

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGIA Y MEDIO
AMBIENTE



TESIS

**CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE *Pseudomonas aeruginosa* FRENTE
AL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD**

PRESENTADA POR:

SANDRA BEATRIZ BUTRON PINAZO

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

**DOCTOR EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE**

PUNO, PERÚ

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE

TESIS

CAPACIDAD DE BIODEGRADACION DE *Pseudomonas aeruginosa* FRENTE
AL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD

PRESENTADA POR:

SANDRA BEATRIZ BUTRON PINAZO

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO:

PRESIDENTE



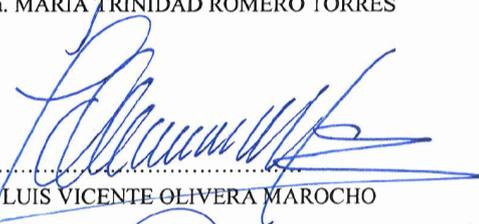
.....
Ph.D. SABINO ATENCIO LIMACHI

PRIMER MIEMBRO



.....
Dra. MARIA TRINIDAD ROMERO TORRES

SEGUNDO MIEMBRO



.....
Dr. LUIS VICENTE OLIVERA MAROCHO

ASESOR DE TESIS



.....
Dra. ROXANA DEL CARMEN MEDINA ROJAS

Puno, 17 de enero del 2020

ÁREA: Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente

TEMA: Biodegradación

LÍNEA: Evaluación tecnológica y del medio ambiente

DEDICATORIA

A Dios, quien me da fortaleza día a día.

A mi esposo Luis Alberto, tu apoyo y ánimo me dan fuerzas para alcanzar nuevas metas.

A mi hijo Stephano Gerard, eres la razón de que me levante cada día esforzándome por el presente y el mañana. eres mi principal motivación

A mis padres y hermanos, por haberme brindado su comprensión y apoyo. Madre, me enseñaste que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensado.

AGRADECIMIENTOS

- *Doy infinitas gracias a Dios, porque sin él nada de esto sería posible, por permitirme llegar hasta este momento y lograr una meta más.*
- *A la Universidad Nacional del Altiplano, mi alma mater, por enriquecerme de conocimientos.*
- *A los miembros del jurado Ph.D. Sabino Atencio Limachi, Dra. María Trinidad Romero Torres y Dr. Luis Vicente Olivera Marocho; por sus sabias observaciones e indicaciones.*
- *A la Roxana Del Carmen Medina Rojas, por su acertada conducción y asesoramiento.*
- *A mi esposo Luis Alberto y a mi hijo Stephano Gerard, que son el pilar fundamental en mi vida, que con su amor y respaldo me ayudan a alcanzar mis metas.*
- *A mis padres y hermanos, por su apoyo y consejos.*

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco teórico	4
1.1.1 <i>Pseudomonas</i>	4
1.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.1.3 Condiciones de crecimiento	5
1.1.4 Requerimientos nutricionales	5
1.1.5 Medios de cultivo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.1.6 Métodos de observación microscópica.....	7
1.1.7 Polímeros	9
1.1.8 Plásticos	10
1.1.9 Polietileno de baja densidad	10
1.1.10 Microplásticos	11
1.1.11 Degradación de polímeros	11
1.1.12 Biodegradación.....	12
1.2 Antecedentes	13
1.2.1 Aislamiento e Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
1.2.2 Adaptación de microorganismos para la biodegradación de polietileno	14
1.2.3 El género <i>Pseudomonas</i> como biodegradadores de polietileno	14
1.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y su capacidad para biodegradar polietileno	20
1.2.5 Otras bacterias biodegradadoras de polietileno.....	23

CAPÍTULO II**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

2.1	Identificación del problema	26
2.2	Enunciados del problema.....	28
2.2.1	Problema general	28
2.2.2	Problemas específicos	28
2.3	Justificación	28
2.4	Objetivos.....	29
2.4.1	Objetivo general	29
2.4.2	Objetivos específicos.....	29
2.5	Hipótesis	29
2.5.1	Hipótesis general	29
2.5.2	Hipótesis específicas	30

CAPÍTULO III**METODOLOGÍA**

3.1	Lugar de estudio.....	31
3.2	Población	32
3.3	Muestra	32
3.4	Método de investigación.....	32
3.5	Procedimientos metodológicos	32

CAPÍTULO IV**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1	Aislamiento de bacterias con capacidad de biodegradación frente al polietileno	41
4.2	Adaptación del metabolismo de cepas puras en medios sintéticos con polietileno de baja densidad.....	45
4.3	Condiciones de temperatura y pH donde <i>Pseudomonas aeruginosa</i> logra mayor actividad biodegradativa frente al polietileno.....	48
	CONCLUSIONES	57
	RECOMENDACIONES.....	58
	BIBLIOGRAFÍA	59
	ANEXOS	70

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Coordenadas UTM del Botadero de Cancharani	31
2. Peso inicial del PEBD en mg	38
3. Crecimiento bacteriano de 24-72h a 37°C	42
4. Pruebas bioquímicas para Pseudomonas aeruginosa	44
5. Crecimiento de colonias en Agar nutritivo a 37°C	46
6. Crecimiento de colonias (UFC) en un tiempo de 24-72h	46
7. Condiciones de temperatura y pH donde Pseudomonas aeruginosa logra mayor actividad biodegradadora	48
8. Análisis de varianza	50
9. Porcentaje de biodegradación	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Representación esquemática del procedimiento de la tinción de Gram	8
2. Mapa del botadero de Cancharani	31
3. Botadero de Cancharani.....	33
4. Cepa pura en caldo nutritivo.....	35
5. Crecimiento de bacterias en Agar MacConkey a las 48 horas a 37°C.....	42
6. Crecimiento de bacterias en Agar Cetrimide a las 72 horas a 37°C	43
7. Bacilos Gramnegativos con tinción de Gram	43
8. Pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CITRATO, SIM)	45
9. Actividad biodegradativa a 25°C, pH 5 y 7	49
10. Actividad biodegradativa a 35°C, pH 5 y 7	49
11. Actividad biodegradativa a 25°C-35°C, pH 5-7	50
12. Condiciones de T° y pH para actividad biodegradativa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	51
13. Porcentaje de biodegradación del PEBD	52
14. Resultados cualitativos después de los 30 días a T° de 25°C, pH de 5.0 y 7.0	54
15. Resultados cualitativos después de los 30 días a T° de 35°C, pH de 5.0 y 7.0	54
16. Cambios superficiales en el PEBD	55
17. Viabilidad de la formación del biofilm (biopelícula) bacteriano.....	56
18. Toma de muestra.....	71
19. Preparación de medios de cultivo	71
20. Crecimiento de la cepa en agar nutritivo después de la adaptación.....	72
21. Lavado de muestras con etanol en cabina de flujo laminar	72
22. Colorante Rodamina B.....	73
23. Medio mineral.....	73

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Panel fotográfico.....	71
2. Confirmación y validación de la cepa.....	74

RESUMEN

La biodegradación del polietileno de baja densidad por microorganismos, es una solución para reducir la contaminación por plásticos constituyéndose una alternativa importante desde el punto de vista del medio ambiente y de la salud humana; la investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad de biodegradación de *Pseudomonas aeruginosa* frente al polietileno de baja densidad; la bacteria fue aislada de residuos plásticos obtenidos del botadero de Cancharani de la ciudad de Puno, el aislamiento e identificación taxonómica se realizó en base a características macroscópicas de crecimiento en placa y el estudio microscópico empleando la tinción de Gram; la adaptación de la cepa bacteriana se realizó en un medio mineral con partículas de polietileno de baja densidad; la capacidad biodegradativa se determinó a temperaturas de 25 y 35°C con un pH de 5.0 y 7.0, durante 30 días, obteniendo como resultados un porcentaje de 21.7% y 27.3% de pérdida de peso a una temperatura de 25°C y 35°C respectivamente a un pH de 7.0. Además, se evidenció la viabilidad de la biopelícula con microscopio de fluorescencia. *Pseudomonas aeruginosa* demostró tener capacidad de biodegradación en un rango de temperatura de 25-35°C.

Palabras clave: Bacteria, biodegradación, biopelícula, cepa, fluorescencia, medio mineral, polietileno.

ABSTRACT

The biodegradation of low density polyethylene by microorganisms, is a solution to reduce plastic pollution, constituting an important alternative from the point of view of the environment and human health; the objective of the research was to evaluate the biodegradation capacity of *Pseudomonas aeruginosa* against low density polyethylene; the bacterium was isolated from plastic waste obtained from the Cancharani dump in the city of Puno, taxonomic isolation and identification was performed based on macroscopic characteristics of plaque growth and microscopic study using Gram staining; the adaptation of the bacteria was carried out in a mineral medium with low density polyethylene particles; the biodegradable capacity was determined at temperatures of 25 and 35°C with a pH of 5.0 and 7.0, for 30 days, obtaining as a result a percentage of 21.7% y 27.3% weight loss at a temperature of 25°C and 35°C respectively at a pH of 7.0. In addition, the viability of the biofilm was evidenced with a fluorescence microscope. *Pseudomonas aeruginosa* proved to have biodegradation capacity in a temperature range of 25-35 °C.

Keywords: Bacteria, biodegradation, biofilm, strain, fluorescence, mineral medium, polyethylene.

INTRODUCCIÓN

Hace más de medio siglo los polímeros sintéticos comenzaron a sustituir materiales naturales en casi todas las áreas y hoy en día los plásticos se han convertido en una parte indispensable de nuestra vida. Con el tiempo, la estabilidad y durabilidad de los plásticos han sido mejorado continuamente, y por lo tanto este grupo de materiales es ahora considerado como sinónimo de materiales resistentes a muchas influencias ambientales. La palabra plástico viene de la palabra griega "*plastikos*", que significa capaz de ser moldeado en diferentes formas (Fried, 2014). Los plásticos que usamos hoy son hechos de materias primas inorgánicas y orgánicas, como el carbono, silicio, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y cloruro. Los materiales utilizados para la fabricación de plásticos se extraen del petróleo, el carbón y gas natural (Seymour, 1989).

El plástico es uno de los principales enemigos de la naturaleza al ser un material sintético derivado de hidrocarburos que tarda más de 400 años en degradarse (dependiendo de su estructura), por lo que se le podría considerar acumulable y un contaminante que, aunque no parezca, causa daños irreversibles. El polietileno representa hasta el 64% de los plásticos sintéticos que se descartan dentro de un corto período de tiempo después de su uso (Lee *et al.*, 1991). Es altamente resistente a los ácidos, alcoholes, bases y ésteres. También es biológicamente inactivo y considerado un material recalcitrante. El polietileno es una preocupación para la gestión de residuos sólidos debido a su acumulación en vertederos y hábitats naturales (Thompson *et al.*, 2004). Sin embargo, el mayor problema no radica en los envases, fibras y productos plásticos fabricados, radica en los microplásticos, que al ser partículas con un tamaño menor o igual a 5mm representan un grupo de agentes contaminantes imposible de detener por ser poco perceptibles a la vista, volviéndose así el asesino silencioso de ríos, lagos y océanos. Los microplásticos no se generan solo por el deterioro de los macroplásticos en suelos y aguas, muchas de estas pequeñas perlas forman parte de productos de nuestro uso diario como cosméticos, pastas dentífricas, exfoliantes, etc. Lagunas, ríos y bahías están impregnadas con este material, generando contaminación en océanos y arrecifes, y cuando los plásticos son ingeridos por las distintas especies ocasionan alteraciones en la cadena alimenticia generando un ciclo de contaminación repetitivo y sin aparente solución. La fuente primaria de estas partículas es la entrada directa a los ambientes marinos de microesferas de plástico, y la liberación de fragmentos de fibra de plástico a partir de restos textiles.

La fuente secundaria son los desechos plásticos que eventualmente se rompen en el mar y en tierra debido a una serie de procesos físicos, biológicos y químicos (Wu *et al.*, 2017). El impacto negativo de los desechos plásticos en los organismos vivos puede estar relacionado con el enorme potencial de daño mecánico de los microplásticos en los tractos gastrointestinales de los organismos que los ingieren, así como con la liberación de monómeros y aditivos, algunos de los cuales han demostrado ser tóxicos, carcinógenos o disruptores endocrinos (Ivleva, Wiesheu & Niessner, 2017).

La producción anual de plásticos ha superado los 300 millones de toneladas a nivel mundial. Las investigaciones más recientes proponen una solución a este problema basada en la biodegradación, utilizando para ello cepas microbianas seleccionadas (Paço *et al.*, 2017). Por lo tanto, un método adecuado para la eliminación que se considera para el reciclaje de polietileno es con la degradación microbiana. Algunos informes sobre la biodegradación de los plásticos indican que podría ser una propuesta viable cuando sea adecuado el uso microorganismos. En la degradación biológica o biodegradación intervienen diferentes microorganismos, entre los que existe una gran diversidad catabólica, que son capaces de degradar, transformar o acumular, de forma natural, un amplio rango de compuestos: desde ligninas, almidón, celulosa y hemicelulosa (Shalini & Sasikumar, 2015), hasta hidrocarburos, fármacos y metales (Kannahi & Sudha, 2013).

Estos microorganismos, además, pueden asociarse para formar consorcios que degradan los compuestos poliméricos por cometabolismo (Skariyachan *et al.*, 2015). Dependiendo del tipo de proceso se generan diferentes productos finales. Así, en el caso de un ambiente aeróbico, sólo se registran como productos finales la formación de agua, CO₂ y masa microbiana, mientras que en condiciones anaeróbicas se registran, además de los productos señalados, otros como metano y ácido sulfhídrico, como resultado de metabolismos metanogénicos y sulfidogénicos (Shahnawaz, Sangale & Ade, 2019).

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 *et al.*, 2007). Existen especies de bacterias cuya versatilidad metabólica es muy amplia y son capaces de adaptarse y sobrevivir en una gran variedad de condiciones y parámetros. En este grupo, encontramos diversos géneros de los cuales uno de los más

conocidos y estudiados son los géneros *Pseudomonas*, cuyas características de adaptabilidad a tan variadas condiciones incrementan su interés por encima de otras especies para utilizarlas como herramientas biotecnológicas.

El presente trabajo de investigación se encuentra dividido en los siguientes capítulos: Capítulo I. Fundamentos teóricos de la investigación, se expone las teorías centrales y referenciales que corresponden a las variables dependientes e independientes a ello se acompaña los objetivos de la investigación y las hipótesis. Capítulo II. El problema que refiere al planteamiento del problema que conlleva a la investigación seguida de la justificación. Capítulo III Describe la metodología de la investigación, ubicándose el método, diseño tipo y nivel de investigación que le dan orientación al estudio al igual que la cobertura del estudio de la muestra, las técnicas e instrumentos que han viabilizado para el recojo de la información. Capítulo IV Resultados y discusión. Dedicado a los resultados de la investigación con aplicación de instrumentos en los diferentes cuadros estadísticos, contrastación de hipótesis; culmina con las conclusiones, recomendaciones, bibliografía consultada y los anexos referidos.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco teórico

1.1.1 *Pseudomonas*

Pseudomonas literalmente significa “falsa unidad”, derivado del griego pseudo = “falso” y monas = “una sola unidad”. El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se encuentra dentro del orden *Pseudomonadales*. Las *Pseudomonas* son “células en forma de bastón, curvadas o derechas, pero no helicoidales, de 0.5 - 1 μm de diámetro por 1.5 - 5 μm de longitud” (Palleroni *et al.*, 1972). Las *Pseudomonas* son Gram negativas, generalmente móviles y presentan uno o varios flagelos polares, aunque también se han descrito flagelos laterales más cortos. Son de metabolismo respiratorio, nunca fermentativo, aunque pueden producir ligeras cantidades de ácido a partir de la glucosa en aerobiosis. Las *Pseudomonas* tienen requerimientos nutritivos muy simples. En el laboratorio se pueden cultivar en medio mínimo con alguna materia orgánica en solución como fuente de carbono, a pH neutro, temperaturas del intervalo mesófilo (28 - 40°C) y en general, sin añadir factores de crecimiento (Madigan *et al.*, 2005; Prescott, 2004). La especie *Pseudomonas* tiene un hábitat de crecimiento en un rango de temperatura de 4 – 42 °C, un pH comprendido entre 4-8 (Ruíz, 2007).

1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

En 1872 fue aislada por primera vez por Schroeter, a partir de muestras ambientales. La denominación de aeruginosa deriva de la palabra aeruginoso (aeruginous) que significa “el color del cobre oxidado”. Emiten pigmentos de

fenazina en agar nutritivo, después de 24 horas de incubación a 37 °C y posteriormente a temperatura ambiente; los mismos pueden ser azul (piocianina), amarillo verdoso (pioverdina), rojo (piorubina) y negro (piomelanina) (Ren *et al.*, 2018).

Los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* pueden mostrar varios tipos de colonias: lisas, rugosas, mucoides, redondas, alargadas, con pigmento verde metálico y olor dulzón. Las *Pseudomonas aeruginosa* generan numerosos exoproductos, incluyendo proteasas, hemolisinas, ramnolípidos y derivados de fenazina, factores potencialmente citotóxicos que aumentan su competitividad y supervivencia. El estrés por nutrientes induce en *Pseudomonas* algunos cambios morfológicos y bioquímicos que, en condiciones limitantes de crecimiento, la bacteria expresa mecanismos de protección, permitiendo a las células sobrevivir a desafíos ambientales (Aguirre, 2015).

1.1.3 Condiciones de crecimiento

Crecen con facilidad en los medios de cultivo y produce en ocasiones un olor dulzón a uvas, crecen entre 10 y 42 °C, aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 35-37 °C (Ren *et al.*, 2018).

El pH es un factor químico importante, ya que puede afectar principalmente a las poblaciones de *Pseudomonas* y la biodisponibilidad de las fuentes de carbono y energía. Este factor se constituye como uno de los indicadores del proceso de biorremediación y aunque las *Pseudomonas* se pueden adaptar fácilmente a condiciones extremas, estas cepas microbianas tienen un determinado rango de tolerancia. A pH extremadamente alcalinos o extremadamente ácidos la biodegradación se hace lenta. El rango óptimo para la biodegradación está entre 6–8 pH. Sin embargo, para mantener una mejor capacidad degradante, por periodos de tiempo prolongados, el pH debe ser neutro, entre 7.4–7.8, evitando al máximo las fluctuaciones (Romero *et al.*, 2008).

1.1.4 Requerimientos nutricionales

La *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente (Peix, Ramírez-Bahena & Velázquez, 2009). Cuentan con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria. Se considera

a esta especie como bacteria aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones, esta bacteria puede llegar a persistir de manera eficaz en el agua y en el suelo viviendo con un requerimiento nutricional mínimo y tolerando diversos medios físicos (Mesquita, Soares-Castro & Santos, 2013). Se caracteriza por ser parte del grupo de no fermentadores que tienen en común la incapacidad de fermentar lactosa, con la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoniaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares (Strateva & Yordanov, 2009).

1.1.5 Medios de cultivo para *Pseudomonas aeruginosa*

Un medio de cultivo es una mezcla de determinadas sustancias con o sin gelificación sobre el cual o dentro de él crecen los microorganismos los microorganismos son extraordinariamente diversos en sus características fisiológicas y sus requerimientos nutricionales, en condiciones naturales, los nutrimentos requeridos para sintetizar su material celular, generar energía y efectuar su fundamento son tomados del ambiente (González, 2019). En tanto que para cultivarlos in vitro se han diseñado múltiples medios de cultivos que son disoluciones acuosas con base a sustancias orgánicas, inorgánicas o ambas que proporcionan los nutrimentos requeridos por los mismos (Ramírez *et al.*, 2015).

Los requerimientos nutricionales de *Pseudomonas aeruginosa* no son exigentes, por lo que crece en casi todos los medios de cultivo, exceptuando aquellos medios que sean selectivos para alguna especie en particular o que contengan antibióticos o sustancias que inhiban el crecimiento. Su cultivo bacteriano se da en caldos y agares.

Agar Nutritivo. Es un medio de cultivo usado normalmente como rutina para todo tipo de bacteria. Es muy útil porque permanece sólido incluso a relativamente altas temperaturas. Su utilidad en el laboratorio es muy variada, principalmente sirve para el subcultivo de especies, mantenimiento de cepas, contaje de colonias, como base para preparar agar sangre, entre otras (Gil, 2019).

Caldo Nutritivo. Es un medio de cultivo universal para microorganismos poco exigentes en cuanto a sus necesidades nutritivas con su fórmula original o adicionada de indicadores, carbohidratos, sales, líquidos orgánicos, etc. Contiene

pluripeptona, extracto de carne que constituyen la fuente de carbono y nitrógeno necesarias para el adecuado desarrollo bacteriano (Laboratorios Britania, 2019).

Agar MacConkey. Es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento y la diferenciación de bacterias diseñado para aislar selectivamente bacilos Gram negativos y entéricos. El cristal violeta y las sales biliares inhiben el crecimiento de organismos grampositivos, lo que permite la selección y el aislamiento de bacterias gramnegativas, tiene un indicador rojo neutro el cual marca microorganismos que fermenten la lactosa o no (Anderson *et al.*, 2013).

Agar Cetrimide. Medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa*, la peptona sirve como fuente de nitrógeno, y el glicerol se utiliza como fuente de carbono y energía. La producción de piocianina se estimula mediante el cloruro de magnesio y el sulfato potásico en el medio. La cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio) es un compuesto de amonio cuaternario que inhibe una amplia variedad de otros organismos, incluidos otras determinadas especies de *Pseudomonas* y organismos relacionados (Gil, 2019).

Medios diferenciales. Un medio diferencial consiste en un medio de cultivo que es capaz de distinguir dos microorganismos por su crecimiento diferencial en el mismo, usando las propiedades metabólicas de ambos en presencia de un determinado nutriente y de un indicador que evidencia por ejemplo, un pH ácido en su entorno. Son empleados para detectar reacciones bioquímicas, con carácter diferencial de grupos, géneros o especies microbianas, mediante el viraje de color del indicador presente en el medio, demostrando algunas de sus características. Estos medios son el TSI (agar hierro triple azúcar), LIA (agar lisina hierro), Citrato de Simmons y SIM (medio de sulfuro indol para movilidad) (Laboratorios Linsan, 2009).

1.1.6 Métodos de observación microscópica

La tinción o coloración es una técnica auxiliar utilizada para mejorar el contraste en la imagen vista al microscopio y es utilizado para estudiar microorganismos no vivos; en estas tinciones se observa la morfología, estructura y agrupamiento.

Las tinciones se realizan a partir de suspensiones de microorganismos extendidas en un portaobjetos (frotis), secadas y fijadas. La fijación, procedimiento que permite preservar estructuras celulares, se puede llevar a cabo con diferentes

tratamientos: fijación por calor o fijación química. La fijación por calor es la más utilizada para la observación de bacterias. Este procedimiento consiste en pasar el portaobjetos, con la suspensión bacteriana extendida y seca, a través de una llama de un mechero. La fijación por calor preserva la morfología externa de los microorganismos, pero no las estructuras internas. La fijación química con agentes como etanol, formaldehído y ácido acético entre otros muchos, se utiliza para preservar las estructuras celulares (Vázquez *et al.*, 2011).

Tinción de Gram. Esta tinción diferencial fue propuesta por el médico danés Christian Gram (1884) (Tortora *et al.*, 2007). Es la tinción diferencial más utilizada de forma rutinaria y prácticamente la primera prueba a la que se someten las muestras de cualquier origen antes de su estudio. Proporciona una información esencial, además de sobre la forma, tamaño y agrupación celular, como es el tipo y composición de la pared que presentan las bacterias. La tinción de Gram divide a las bacterias con pared del Dominio Bacteria en dos grandes grupos: bacterias con pared de tipo gram positiva y bacterias con pared de tipo gram negativa. La diferente estructura y organización de la pared celular en estos dos tipos de organismos hace que ambos grupos respondan de manera distinta, así mientras las bacterias gram positivas mantienen y conservan el complejo cristal violeta-iodo, las bacterias gram negativas se decoloran rápidamente con la aplicación del alcohol, admitiendo el colorante de contraste que proporciona un color entre rosa y rojo que contrasta con el intenso color violeta (Vázquez *et al.*, 2011).

Procedimiento	Gram +	Gram -	Observación
Paso 1. Colorante fundamental: cristal violeta durante 1 minuto.			Las bacterias gram positivas y gram negativas se tiñen de violeta.
Paso 2. Mordiente, solución de yodo y yoduro potásico, 1 minuto.			Las bacterias gram positivas y gram negativas se tiñen de violeta.
Paso 3. Decoloración, lavado con etanol, 30 segundos.			Las bacterias gram positivas mantienen el color violeta, las gram negativas pierden el colorante.
Paso 4. Colorante de contraste, safranina 1 minuto.			Las bacterias gram negativas se tiñen de rojo, las gram positivas mantienen su color violeta.

Figura 1. Representación esquemática del procedimiento de la tinción de Gram
Fuente: Vázquez *et al.* (2011).

Microscopia de fluorescencia. Una alternativa para la observación bacteriana es la microscopía de fluorescencia. Este tipo de microscopía se puede utilizar para visualizar células que posean moléculas capaces excitarse y emitir fluorescencia cuando son iluminadas con una luz de determinada longitud de onda, la mayoría de las aplicaciones de la microscopía de fluorescencia para el estudio de bacterias se basan en teñir las muestras con determinados compuestos químicos, que reciben el nombre de fluoróforos o fluorocromos (Vázquez *et al.*, 2011).

Conservación de microorganismos. La conservación ha de estar encaminada al mantenimiento de las cepas altamente productivas durante largos períodos de tiempo sin que se produzcan cambios fenotípicos, especialmente en las características relacionadas con la producción de los metabolitos secundarios de interés (Hunter-Cevera & Belt, A., 1996). La mayoría de los métodos de preservación logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno; por reducción de la temperatura de conservación; o por combinación de ambos (Doyle, 1999).

La crio conservación es uno de los mejores métodos de conservación, se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector (usualmente glicerol) y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura (Kirsop, 1999).

1.1.7 Polímeros

Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión repetida de una o varias moléculas unidas por enlaces covalentes. Dependiendo de su origen, los polímeros pueden ser naturales o sintéticos. Los sintéticos contienen normalmente entre uno y tres tipos diferentes de unidades que se repiten, mientras que los naturales o biopolímeros como la celulosa, el ADN o las proteínas presentan estructuras mucho más complejas. Los polímeros sintéticos tienen, mayor interés desde el punto de vista comercial (Beltrán y Marcilla, 2012).

1.1.8 Plásticos

Son polímeros sintéticos generalmente de naturaleza química hidrófoba, que normalmente poseen una alta durabilidad y resistencia, suelen no tener un punto de fusión fijo y poseen en determinado intervalo de temperaturas características flexibles y moldeables. Se calcula que pueden tardar entre 100 y 1000 años para degradarse dependiendo del tipo de plástico (Usha, Sangeetha & Palaniswamy; Pramila, 2011). Alrededor de 8 millones de residuos llegan al océano cada día, siendo uno de los principales factores para la destrucción de la fauna y flora marina ya que los residuos que se encuentran en su totalidad ahí son los plásticos, objetos hechos a base de plásticos como botellas, fundas, tapas etc. (Ecomundo, 2011). Se calcula que pueden tardar entre 100 y 1000 años para degradarse dependiendo del tipo de plástico. La American Society for testing materials (ASTM) define plástico como: “Cualquier material de un extenso y variado grupo que contiene como elemento esencial una sustancia orgánica de gran peso molecular, siendo sólida en su estado final (Gonzáles, 2019).

1.1.9 Polietileno de baja densidad

El polietileno de baja densidad (PEBD o LDPE) en su forma de bolsas, se transforman recién a los 150 años en contacto con los agentes naturales. Aproximadamente el 50% en peso de los desechos son prácticamente no biodegradables, correspondiendo a los plásticos el 13.3% del total. El polietileno de baja densidad es el material plástico que más se recicla, para fabricar bolsas de residuos. Las firmas del rubro se nutren de materiales que provienen de fábricas y evitan utilizar desperdicios recolectados en la calle o en basurales, para evitar imperfecciones en los productos obtenidos (Gaggino, 2008).

El PEBD es flexible y suave al tacto, es más brillante y resistente, es el más usado para las bolsas de congelados, envoltorios de plástico adherente, este material ofrece variedad de colores, medidas, impresiones. Se trata de un polietileno con una cadena muy ramificada, lo que implica mayor volumen y, por ello, su densidad es menor (0.915-0.930 g/cm³) (Sáenz, 2008; Quispe, 2017).

En el Perú, el congreso de la República ha promulgado la ley que regula el plástico de un solo uso y los recipientes o envases descartables (Ley N° 30884), en el Art. 2, Reducción progresiva de bolsas de base polimérica. 2.1 indica que los

supermercados, autoservicios, almacenes comercios en general u otros establecimientos similares, así como sus contratistas o prestadores de servicios, dentro del plazo de 36 meses, contados desde la vigencia de la presente ley, deben reemplazar en forma progresiva la entrega de bolsas de base polimérica no reutilizable por bolsas reutilizables u otras cuya degradación no generen contaminación por microplástico o sustancias peligrosas y que aseguren su valorización (El Peruano, 2019).

1.1.10 Microplásticos

Pese a su gran estabilidad física, los plásticos, con el tiempo, se pueden ver sometidos a erosión física y química, degradándose en fragmentos más pequeños: los microplásticos y los nanoplásticos (Pastor, 2019). Los microplásticos con un tamaño no superior a los 5 mm o 1/5 de pulgadas y los nanoplásticos, miden menos de 100 milmillonésima de metro. Algunos microplásticos son lo suficientemente pequeños para ser ingeridos por pequeños animales como el zooplancton en la cadena alimenticia. Los animales que ingieren gran cantidad de plásticos, mueren por inanición (Cole *et al.*, 2013). Un segundo aspecto, relacionado con la ingesta de microplásticos es la adsorción de todo este tipo de toxinas en los tejidos animales (Engler, 2012). El riesgo para los vertebrados (animales con columna vertebral incluyendo a los humanos) es similar al riesgo para los invertebrados, pero hay un aspecto adicional relacionado con los animales vertebrados porque el potencial de acumulación de plásticos asociados a las toxinas aumenta en la cadena alimenticia (Sarria-Villa & Gallo-Corredor, 2016).

1.1.11 Degradación de polímeros

El concepto degradable se presenta, cuando su estructura química puede sufrir cambios significativos que resultan en una pérdida de algunas propiedades que pueden variar según el test que se aplique y la unidad de tiempo en que se aplique. La degradación corresponde a un proceso de tipo químico y por lo tanto a la pérdida de átomos de carbonos (ECOEMBES, 2017). La degradación de polímeros es un proceso dirigido a modificar la estructura del polímero, para hacerlo vulnerable y perecedero; es decir, que desaparezca como residuo (Limón, 2001). La degradación de los polímeros es causada principalmente, por reacciones que producen el rompimiento de los enlaces en las macromoléculas y puede ser:

física: mecánica, térmica, por efecto de radiaciones de energía alfa y foto degradación, química, ambiental y biológica denominada biodegradación (Sáenz, 2008).

1.1.12 Biodegradación

Biodegradación es la transformación bioquímica de los compuestos por la acción de microorganismos, la cual ocurre debido a la actividad de varias enzimas, que son producidas por los microorganismos (Limón, 2001). La biodegradación es la transformación catalizada biológicamente de un compuesto a formas más simples de polímeros, normalmente se refiere al ataque de los microorganismos sobre materiales plásticos, la biodegradación es un proceso biológico natural llevado a cabo por procesos bioquímicos y que puede ser clasificado en función al producto final (Volke, 1997).

La biodegradación de plásticos es un proceso usualmente heterogéneo, la falta de solubilidad en agua y el tamaño de las moléculas del polímero impiden que los microorganismos incorporen el material directamente, es necesario que ocurra una liberación de enzimas extracelulares, las cuales inician la degradación del polímero fuera de las células, inicialmente el polímero se fragmenta generando intermediarios que pueden ser solubles en agua, transportados al interior del microorganismo e incorporados a sus rutas metabólicas. El resultado final del metabolismo microbiano genera CO₂, agua y nueva biomasa (Vieyra, 2009). Una manera simple y rápida de medir la biodegradación de los polímeros es mediante la determinación de la pérdida de peso, aunque los microorganismos que crecen utilizando un sustrato polimérico pueden conducir a un aumento de peso debido a su adherencia, la pérdida de peso detectada sobre dicho polímero indica un deterioro de su integridad, producto del ataque microbiano (Gajendiran, Krishnamoorthy & Abraham, 2016). Para las variaciones de masa las piezas una vez limpias y secas deben pesarse con una aproximación de 0.1 mg y realizarse los cálculos correspondientes (González, 2019).

1.2 Antecedentes

1.2.1 Aislamiento e Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

Para los aislamiento se utilizaron medios de cultivos selectivos o enriquecidos como lo reporta Hussein, Al-Mayaly & Khudeir (2015) los aislamientos bacterianos revelaron una apariencia colonial diferente dependiendo de los medios selectivos o diferenciales utilizados, así mismo Arenas (2018) indica que los resultados de la siembra en medios generales y enriquecidos se desarrollaron a 37°C, esto debido a que en una población de bacterias que se encuentren en crecimiento equilibrado aumentan de manera proporcional con el tiempo.

La tinción de Gram es una coloración que nos ayuda a la identificación de bacterias como lo reportado por Gutiérrez (2013) que indica que con la tinción de Gram, se puede apreciar con más definición la morfología de los microorganismos, tamaño y diversidad, como también reporta Arenas (2018) la tinción de Gram realizada sirvió como primer análisis microscópico de las cepas obtenidas y también permitió obtener detalles sobre su estructura interna, cuyas características macroscópicas se complementan con las descripciones, quien indica que este tipo de características corresponden al tipo *Pseudomonas aeruginosa*.

Una prueba de confirmación de cepas bacterianas es el uso de pruebas bioquímicas como lo reporta Pramila *et al.* (2012) las pruebas bioquímicas utilizadas fueron motilidad, catalasa, oxidasa, carbono, aminoácidos, nitrato. Así también lo indica Begum, Varalakshmi & Umamagheswari (2015) los aislados bacterianos seleccionados se identificaron mediante caracterización bioquímica como la motilidad y la catalasa, oxidasa, indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, triple azúcar de hierro, utilización de citrato, ureasa, reducción de nitrato y prueba de fermentación de carbohidratos. Arenas (2018) reporta que las pruebas bioquímicas como oxidasa, TSI, urea, indol y gelatina constituyen pruebas preliminares que se utilizan en la identificación y la inmediata lectura.

El uso de instrumentos o equipos automatizados son muy útiles para la confirmación y validación de cepas bacterianas como lo reporta Hussein, Al-Mayaly & Khudeir (2015) el equipo Vitek 2 es una técnica poderosa para

identificar los aislados bacterianos. Así mismo Gutiérrez (2018) indica que con ayuda del instrumento Vitek II Compact se sometió a una última prueba de análisis final que comprobaría que se trataba de *Pseudomona aeruginosa*.

1.2.2 Adaptación de microorganismos para la biodegradación de polietileno

Para potenciar la capacidad de biodegradación de los microorganismos es necesario realizar un proceso de adaptación o acondicionamiento como lo reporta Arenas (2018) las cepas encontradas en su medio natural poco a poco se fueron adaptando de suero fisiológico a medio de cultivo sintético con PEAD, en períodos determinados de tiempo con lo cual se logró adaptar y re-direccionar el metabolismo de cepas puras de tipo *Pseudomonas Aeruginosa* y *P. Fluorescens* y *Bacillus Humi*, *B. Amyloliquefaciens*, *B. Subtilis*, *B. Sinesaloumensys* y *B. Tequilensis*. Singh, Gupta & Shrivastava (2015) indican que los cultivos de enriquecimiento y adaptación para aislar las bacterias degradantes del polímero se incubaron a 37°C y después de 14 días de incubación, las colonias individuales se recogieron y se pusieron en estrías en placas de agar nutritivo para aislamiento y purificación. Pramila *et al.* (2012) menciona que para la adaptación añadieron 5 g de muestra de suelo y 500 mg de polvo de LDPE en 100 ml de medio sintético esterilizado (SM) y se incubaron a 37°C durante 24 h y las bacterias aisladas se obtuvieron como cultivos puros. Rajandas *et al.* (2012) realizaron un estudio con cepas de *Microbacterium paraoxydans* y *Pseudomonas aeruginosa*, para lo cual antes de la cuantificación, estas cepas bacterianas se aclimataron a LDPE pretratado con ácido nítrico durante 2 meses.

De lo mencionado anteriormente Barbarán, Cabanillas y Rubio (2018) infiere que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* aplicada para la degradación del PET, tuvo un proceso de crecimiento más lento debido a que no fue aislada de un medio similar necesitando un periodo de adaptación que no fue tomado en cuenta, por lo que los investigadores consideran importante resaltar un tiempo de adaptación.

1.2.3 El género *Pseudomonas* como biodegradadores de polietileno

Diversos estudios científicos afirman que el género *Pseudomonas* tienen un potencial para biodegradar plásticos, así lo afirma Devi *et al.* (2019) en su

investigación encontró bacterias marinas con potencial de biodegradación de polietileno de alta densidad aisladas de las regiones costeras de Tamil Nadu, India. Los resultados obtenidos de la pérdida de peso, la viabilidad y el FT-IR, confirma que la mayoría de los aislamientos bacterianos pertenecen al género *Bacillus spp.* y *Pseudomonas spp.* Wilkes & Aristilde (2017) afirman que existen factores que controlan la capacidad de *Pseudomonas sp.* para procesar estos diferentes polímeros plásticos y sus subproductos, estos factores incluyen la fijación de la superficie celular dentro de biopelículas, enzimas catalíticas involucradas en la oxidación o hidrólisis del polímero plástico, vías metabólicas responsables de la absorción y asimilación de fragmentos de plástico y factores químicos que son ventajosos o inhibidores del proceso de biodegradación destacando las futuras investigaciones necesarias para aprovechar al máximo las capacidades de *Pseudomonas sp.* en estrategias de biorremediación. Spontón *et al.* (2013) indican que la síntesis y biodegradación de espumas de poliuretano obtenidas de procesos benignos para el medio ambiente fueron sintetizados en aceite de ricino modificado con anhídrido maleico (MACO) con cultivos de *Pseudomonas sp.* cepa (DBFIQ-P36) en períodos de incubación de 2 meses a 37°C, los resultados demostraron que la cepa más la adición de MACO produce un aumento considerable en la tasa de degradación y un cambio importante en las estructuras químicas y morfológicas. Sharma (2004) evaluó el grado de degradación del polietileno de baja densidad (LDP) y el polipropileno (PP) utilizando *Pseudomonas stutzeri* en condiciones de laboratorio encontrando que ambos tipos de plástico experimentaron cambios cualitativos y cuantitativos, los experimentos se realizaron por triplicado y se llevaron a cabo durante 45 días. Iakimov *et al.* (1994) indica que los géneros bacterianos caracterizados en que degraden polietileno fueron *Pseudomonas sp.*

Los cambios morfológicos en la superficie de los polímeros se evidencian con la pérdida de cristalinidad, así como por la presencia de arrugas, fisuras y cavidades. Bhatia *et al.* (2014) indica que las micrografías SEM del LDPE no degradado como control demostraron una morfología de superficie lisa y después de 4 días de incubación la película de LDPE reveló las áreas desgastadas con grietas distribuidas al azar y las fisuras demostraron la alteración de la textura superficial de película de LDPE, las bacterias utilizadas en esta investigación se sometieron

a un ensayo de biodegradación en presencia de láminas de LDPE en medio de crecimiento dando como resultado que cuatro cepas dieron una tasa de degradación de 5%, 17.8%, 0.9% y 0.6% basada en la pérdida de peso en el ensayo in vitro realizado durante cuatro días, el aislado fue nombrado como *Pseudomonas citronellolis*. Anwar *et al.* (2013) reporta que los cambios morfológicos de la película de PVC y LDPE debido a la acción del consorcio *Pseudomonas otitidis*, *Bacillus aerius*, *Acanthopleuribacter pedis*, *Bacillus cereus* se analizaron después de un período de incubación de tres meses en condiciones, la película de LDPE, la micrografía SEM reveló algunas estructuras arrugadas en forma diagonal con fisuras ensanchadas, lo que condujo a la formación de cavidades con arrugas y áreas globulares blancas por lo tanto, las observaciones sugirieron el considerable deterioro superficial del polímero en virtud de la acción del consorcio.

Para verificar la actividad metabólica de la biopelícula en la superficie de polietileno se utiliza el microscopio de fluorescencia por lo que Tribedi, Gupta & Sil (2015) en su investigación reportan que las células bacterianas de *Pseudomonas sp.* AKS2 exhiben una mayor aptitud para su crecimiento en la superficie de LDPE, para esto examinaron la viabilidad de células AKS2 en biopelícula en la superficie de LDPE realizando doble tinción con bromuro de etidio y naranja acridina, la naranja de acridina tiñó tanto a las células muertas como a las células viables, mientras que el bromuro de etidio tiñó selectivamente las células muertas. Otro estudio realizado por Tribedi & Sil (2013) indican que los resultados evidencian la adherencia de *Pseudomonas sp.* AKS2 a la superficie de LDPE en diferentes puntos de tiempo mediante la tinción de bacterias con naranja de acridina y observado bajo un microscopio de fluorescencia, la capacidad de un organismo para formar una biopelícula mejora significativamente su potencial de biodegradación.

Pérez y Alania (2017) evaluaron el crecimiento de dos cepas ATCC de *Pseudomonas sp.* N° 9027 y N° 10145 a dos temperaturas diferentes; obteniendo como resultados que las dos cepas tuvieron mejor crecimiento a 37°C en comparación a la temperatura de 4°C, y demostrándose estadísticamente la relación directa de la cinética de las *Pseudomonas sp.* con la degradación del polipropileno.

Gupta, Devi & Rana (2016) demostraron que la actividad de biodegradación de los aislamientos se investigó con la ayuda del método de zona clara mediante el uso de polvo de LDPE. La zona de aclaramiento se detectó mediante el uso de solución de azul de coomassie, 7 aislados demostraron resultados positivos para la zona clara alrededor de las colonias bacterianas, los aislados bacterianos se identificaron como *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Micrococcus sp.*

Begum, Varalakshmi & Umamagheswari (2015) realizaron aislamientos bacterianos y encontraron bacterias tales como *Desulfotomaculum nigrificans* y *Pseudomonas alcaligenes*. Se encontró que *Pseudomonas alcaligenes* con un 20.1% de degradación era más efectivo que *Desulfotomaculum nigrificans* con un 16.2% a los 30 días a 37°C en la pérdida de peso de las bolsas de polietileno.

Jailawi, Ameen & Saraf (2015) determinaron que algunas condiciones óptimas para la degradación del polietileno van en relación de la temperatura y del pH. Se encontró que *P. putida* S3A tuvo un crecimiento en medio de sal mineral (pH 6.5) que contiene 0.5% de polietileno e incubado con agitación (180 rpm) a 37°C durante siete días. Además, se ha encontrado que la bacteria fue capaz de sobrevivir con hasta 0.9% de polietileno. Los resultados indicaron que el polietileno era degradado por *P. putida* S3A, que utilizó los grupos (O-H, C-O y C-H) como fuente de carbono.

Bhatia *et al.* (2014) indica que las bacterias seleccionadas se sometieron a un ensayo de biodegradación en presencia de láminas de LDPE en medio de crecimiento. Cuatro cepas dieron una tasa de degradación del 5%, 17.8%, 0.9% y 0.6% basada en la pérdida de peso en el ensayo in vitro realizado durante cuatro días. La identificación genotípica reveló la bacteria como *Pseudomonas citronellolis*, dio una similitud con la base de datos del 96%, por lo que la evaluación filogenética aclaró la bacteria como una cepa nueva. El aislado se denominó *Pseudomonas citronellolis* EMBS027 y la secuencia se depositó como especie degradante de LDPE, en GenBank con número de acceso KF361478.

Cáceres (2012) menciona que la determinación de los microorganismos da como resultados que entre las bacterias que degradan el polietileno se encuentran bacterias del género *Pseudomonas sp.*, *Edwardsiella sp.* y *Alcaligenes sp.*, entre las condiciones óptimas en las que se realizó la degradación por actividad microbiana

se encuentran un pH de 6.4- 8.3, temperatura 24 °C -30 °C, oxígeno disuelto inicial de 5.64 a 6.6 mg/L, se observó disminución en peso para bolsas provenientes de Metro en 4.2 mg para la concentración de 50 mg/L, 4.6 para la concentración de 100 mg/L, 3.2 mg para la concentración de 150 mg/L y 1.6 mg para la concentración de 200 mg/L. Los microorganismos que mejor se adaptaron a la degradación de polietileno de baja densidad fueron *Pseudomonas sp.*, *Edwardsiella sp* y *Alcaligenes sp.*

Pramila *et al.* (2012) realizó una investigación con *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas citronelolis*. La formación de biopelículas también se cuantificó utilizando la técnica de estimación de proteínas. Se realizó la adhesión bacteriana al hidrocarburo para determinar la hidrofobicidad bacteriana. La biomasa bacteriana se cuantificó para estimar la densidad de población de la biopelícula. Este trabajo se identifica claramente con nuestro objetivo de encontrar un microbio adecuado para degradar el LDPE resistente al dar resultados prometedores del presente estudio.

Martín (2012) identificó los principales microorganismos capaces de degradar el polietileno y proponer procedimientos biológicos ejecutables para la degradación del polietileno; llegando a la conclusión que las bacterias con mayor capacidad de degradar el polietileno fueron *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Pseudomonas sp.* y *Rhodococcus sp.* 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, las cuales permiten que los productos de degradación biótica sean llevados al interior de la célula transformando los por la β -oxidación a CO₂, H₂O.

Usha, Sangeetha & Palaniswamy (2011) menciona que las especies microbianas asociadas con los materiales de polietileno se identificaron como *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus* y *Streptomyces sp.* La eficacia de los microorganismos en la degradación de polietileno se realizó en un cultivo líquido (agitador), la bacteria *Pseudomonas sp* degrada el 37.09% del polietileno y el 28.42% de residuos plásticos en un período de 6 meses. Los hongos el 20.96% de polietileno y 16.84% de residuos plásticos y *Streptomyces* 46.16% de polietileno y 35.78% de residuos plásticos.

Nanda, Sahu, & Abraham (2010) en su estudio hacen un análisis comparativo entre la biodegradación de polietileno sintético por tres especies diferentes de *Pseudomonas*. Los pesos secos iniciales y finales de las bolsas de plástico antes y después de la incubación en el medio de cultivo se compararon y se calculó el porcentaje de degradación. Entre todos los tratamientos, *Pseudomonas sp.* del vertedero de lodos de depuradora (P1) se descubrió que degrada el polietileno de manera eficiente con 46,2% para polietileno natural y 29,1% para sintético. En contraste, *Pseudomonas sp.* del basurero del hogar (P2) dio la biodegradabilidad más baja de 31.4% y 16.3% para polietileno natural y sintético, respectivamente. Sin embargo, *Pseudomonas sp.* aislado del sitio de drenaje de efluentes textiles dio una biodegradabilidad intermedia de 39.7% y 19.6% para polietileno natural y sintético, respectivamente en 8 semanas a 40 °C. En general, el polietileno natural dio una rápida biodegradación dentro de la misma duración que las sintéticas.

Nanda & Sahu (2010) realizaron una investigación sobre la capacidad de biodegradación de *Brevibacillus*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus spp.* Previamente adaptadas en un medio con polietileno. La incubación del matraz con agitación durante 3 semanas a 40 °C se realizó con el propósito de biodegradación. Los pesos secos iniciales y finales de polietileno antes y después de la incubación en el medio de cultivo se compararon y se calculó el porcentaje de degradación. *Pseudomonas* se encontró más eficiente en polietileno degradante con su biodegradabilidad del 40.5% seguido de *Brevibacillus* con 37.5% y *Rhodococcus* con 33% de biodegradabilidad, respectivamente.

Uribe *et al.* (2010) indica en su investigación que los microorganismos fueron aislados de materiales plásticos con evidencias de deterioro procedentes de un relleno sanitario de Lima. Las muestras fueron filtradas y preseleccionadas en medio de sales minerales a pH 5.5 y 7, para hongos y bacterias respectivamente. Se aislaron 6 cepas, identificadas como *Pseudomonas sp.* MP3a y MP3b, *Penicillium sp.* MP3a, *Rhodotorula sp.* MP3b, *Hyalodendron sp.* MP3c y una levadura no identificada. La acción degradativa del consorcio microbiano aislado fue evidenciada por variaciones en el espectro infrarrojo del polietileno con respecto al polímero sin tratamiento, observándose la reducción del índice de carbonilo (83.89% a pH 7 y 4.08% a pH 5.5) y de terminaciones con dobles

enlaces (19.77% a pH 7 y 6.47% a pH 5.5). Finalmente se determinó el porcentaje de peso perdido por el polietileno sometido a las cepas aisladas, observándose una disminución de 5.4% a pH 7 y 4.8% a pH 5.5.

Sharma & Sharma (2004) en su estudio utilizaron *Pseudomonas stutzeri* en condiciones de prueba de laboratorio. A lo largo de la investigación, ambos tipos de plástico experimentan cambios cualitativos y cuantitativos por bacterias, pero el PP es más biodegradable en comparación con LDP.

1.2.4 *Pseudomonas aeruginosa* y su capacidad para biodegradar polietileno

Los desechos de plástico y polietileno, incluido el polietileno de baja y alta densidad, se acumulan continuamente en el medio ambiente por que presentan una amenaza ecológica y su biodegradación es de vital importancia, por lo que investigaciones como las realizadas por Barbarán, Cabanillas y Rubio (2018) mencionan que de los tratamientos utilizados el mejor tratamiento para la biodegradación de polietileno tereftalato fue la aplicación de 9×10^8 UFC de *Pseudomonas aeruginosa* durante un periodo de 35 días con un porcentaje de biodegradación del 19.93% y se caracterizó el polímero mediante el método de pérdida de peso, obteniendo como resultado que biodegrada un 19.93% de polietileno tereftalato.

Gutiérrez (2018) Tuvo como propósito determinó cómo influían los factores ambientales, tales como las variable de pH y temperatura en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* con el fin de degradar el polietileno de baja densidad, concluyendo que existe una influencia significativa de los factores de crecimiento microbiano de pH en el medio de cultivo y la temperatura de incubación en el proceso de biodegradación del polietileno de baja densidad, esta bacteria degrada el polietileno de baja densidad a un pH 8 y 25°C.

Hussein, Al-Mayaly & Khudeir (2015) realizaron un aislamiento, detección e identificación de bacterias que degradan el polietileno de baja densidad (LDPE) del suelo contaminado con desechos plásticos y obtuvieron que cuarenta y dos aislamientos muestran una alta eficiencia para degradar el polvo de LDPE, luego se realizó un cribado secundario dependiendo del crecimiento bacteriano, el cambio de color en el medio sólido y el cambio en el medio de pH. Los

aislamientos bacterianos Mw43, Tw53 y Shw51 recibieron alta capacidad para degradar las tiras de LDPE. Estos aislamientos se han identificado como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter ursingii*.

Singh, Gupta & Shrivastava (2015) realizaron una investigación que reveló la biodegradación con la ayuda de cepas bacterianas aisladas del suelo contaminado con polietileno alrededor de la ciudad de Gwalior, (M.P) India. El aislamiento se realizó mediante enriquecimiento en medio de sal mineral con LDPE como única fuente de carbono y energía y se identificaron *Pseudomonas putida* (P.E.7) *Pseudomonas aeruginosa* (P.E.10) y *Bacillus amyloliquefaciens* (P.E.5). El aumento en el crecimiento bacteriano y la pérdida de peso de LDPE en el medio, se registraron a intervalos de tiempo regulares. La capacidad de degradación se analizó mediante la reducción de peso de LDPE *Pseudomonas putida* + LDPE no tratado logró el 15%, *Pseudomonas putida* + LDPE pretratado el 20%, *Pseudomonas aeruginosa* + LDPE no tratado 12%, *Pseudomonas aeruginosa* + LDPE tratado 18%, *Bacillus amyloliquefaciens* + LDPE no tratado 10%, *Bacillus amyloliquefaciens* + LDPE tratado 12%.

Kannahi & Sudha (2013) menciona que la degradación de la bolsa de polietileno y la copa de plástico se analizaron 35, 45 y 55 días de incubación en el método de cultivo líquido. Se realizó cultivo en maceta de *Vigna radiata*. Se analizaron los parámetros morfológicos como la capacidad de germinación, la longitud de la raíz, la longitud del brote y el contenido de clorofila. Este método era barato y efectivo, así que puede usarse ampliamente para el tratamiento de polietileno y vasos de plástico. Los resultados obtenidos fueron para *Staphylococcus aureus* 15.2 +0.01, *Pseudomonas aeruginosa* 19.1 +0.35, *Aspergillus niger* 10.1 +0.86, *Rhizopus sp* 7.04 +0.86 y *Streptomyces sp* 12.04 + 0.33.

Abdullahi & Saidu (2013) indica que la degradación del polietileno y el plástico se examinó después de 2, 4, 6 y 9 meses de enterramiento en FS modificado con fertilizantes orgánicos e inorgánicos. Las especies de bacterias aisladas de FS, fertilizantes orgánicos e inorgánicos antes de las enmiendas incluyen: *S. aureus*, *Micrococcus*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis*. Las especies de hongos fueron: *A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigates*, *Mucor*, *Penicillium* y *Fusarium*. El

porcentaje de pérdida de peso de las bolsas de polietileno fue del 18.1% y el de los plásticos del 6.0% después de nueve meses.

En el estudio realizado por Rajandas *et al.* (2012) indican que la biodegradación de LDPE se realizó con dos cepas bacterianas, *Microbacterium paraoxydans* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados indicaron que *M. paraoxydans* degradó el 61.0% de LDPE mientras que *P. aeruginosa* se degradó 50.5% en 2 meses.

Das *et al.* (2012) en su investigación evidenció que la biodegradación in vitro sobre poli (cloruro de vinilo) (PVC) plastificado con aceite de semilla de *Mesua ferrea* epoxidado a tres porcentajes en peso diferentes (relación PVC / ENO de 75/25, 50/50 y 25/75) utilizando *Pseudomonas aeruginosa* y *Achromobacter sp.* El material de PVC / ENO con una relación 25/75 mostró el mayor porcentaje (%) de biodegradación en comparación con otros sistemas probados.

Kyaw *et al.* (2012) evidenció que *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15729), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692), *Pseudomonas putida* (KT2440 ATCC 47054) y *Pseudomonas syringae* (DC3000 ATCC) 10862). La degradación del LDPE se determinó por la pérdida de peso de la muestra, los cambios morfológicos, las variaciones mecánicas y espectroscópicas. Los resultados muestran que *Pseudomonas spp.* puede degradar películas de LDPE. Las mediciones de pérdida de peso después de 120 días de periodo de incubación, donde el porcentaje de la reducción de peso fue del 20% en *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) (B1), 11% en *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) cepa (B2), el 9% en *Pseudomonas putida* (B3), y el 11.3% en *Pseudomonas syringae* (B4) cepa. La reducción de peso para el control negativo fue de 0.3%.

Kumari, Aanad & Narula (2009) obtuvo un 18-21% de degradación a 30°C en 4 semanas por *Pseudomonas aeruginosa*, Entre los diversos aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, la mayor degradación fue de Is 3, Is 22 y Is 31 en el rango de 25 a 27%. Se descubrió que la temperatura alta (40 ° C) mejora la tasa de degradación del polietileno de manera más efectiva en un 24–28% en comparación con la temperatura baja a 30°C (18–21%).

Agamuthu & Faizura (2005) en su investigación mencionan que hubo una pérdida de peso del 8% con *Pseudomonas aeruginosa* en medios libres de carbono con

muestras de plástico degradables como única fuente de carbono mostraron resultados confirmatorios.

1.2.5 Otras bacterias biodegradoras de polietileno

Montazer, Habibi & Levin (2018) en su estudio evidenciaron la degradación microbiana de polietileno de baja densidad y síntesis de polímeros de polihidroxicanoato después de 21 días de incubación varió entre 0.083 ± 0.015 g / L de masa seca de células (cdm) para *Micrococcus luteus* IRN20 y 0.39 ± 0.036 g / L para *Cupriavidus necator* H16. La disminución porcentual en la masa de LDPE varió de $18.9\% \pm 0.72\%$ para *M. luteus* IRN20 a $33.7\% \pm 1.2\%$ para *C. necator* H16.

Muhonja *et al.* (2018) realizaron un estudio para demostrar la biodegradabilidad del polietileno por bacterias y hongos del vertedero de Dandora Nairobi-Kenia. La incubación de las hojas de LDPE se realizó durante dieciséis semanas a 37°C y 28°C para bacterias y hongos. La actividad de degradación más alta para las bacterias fue una media de $35.72 \pm 4.01\%$ y $20.28 \pm 2.30\%$ atribuida a la cepa A5 de *Bacillus cereus*, a (MG645264) y a la cepa *Brevibacillus borstelensis* B2,2 (MG645267) respectivamente.

Yang, *et al.* (2014) realizaron una investigación con gusanos de cera o polillas de la India (las larvas de *Plodia interpunctella*) y evidenciaron que eran capaces de masticar y comer películas de PE. Se aislaron dos cepas bacterianas capaces de degradar PE del intestino de este gusano, *Enterobacter asburiae* YT1 y *Bacillus sp.* YP1. Durante un período de incubación de 28 días se observó la viabilidad de las células bacterianas en la película de PE utilizando un microscopio fluorescente después de la tinción con el kit de viabilidad bacteriana LIVE / DEAD BacLight bajo fluorescencia, las células vivas (verde) dominaron en las biopelículas de las dos cepas, y solo se observó un número limitado de células muertas (rojo). Después de un período de incubación de 28 días, se observaron los cambios en las propiedades fisicoquímicas de la superficie de las láminas de película de PE incubadas en las placas de CFBAM después de que la biopelícula se eliminó por completo de las muestras de PE. El cambio en la topografía de la superficie se examinó utilizando SEM y AFM, y el deterioro de la superficie se estimó en base

a la formación de fosas y cavidades observadas en las superficies de las muestras de PE con inoculación bacteriana. Las superficies de los controles permanecieron lisas, sin ningún defecto.

Sudhakar *et al.* (2013) menciona que en su estudio se seleccionaron dos microorganismos marinos, específicamente el subgrupo IV de *Bacillus sphaericus* GC y el subgrupo A de *Bacillus cereus*, durante un año, a un pH de 7.5 y una temperatura de 30°C con el polímero como única fuente de carbono. La pérdida de peso de las muestras de LDPE y HDPE tratadas térmicamente fue de aproximadamente 19% y 9% respectivamente, y las muestras no tratadas fueron de 10% y 3.5% respectivamente con *B. sphaericus* en 1 año. La pérdida de peso del LDPE sin tratar mezclado con almidón fue del 25% con *B. cereus*. Se observaron cambios morfológicos superficiales de las muestras tratadas biológicamente por microscopía de fuerza atómica. El número de organismos vivos en el LDPE y superficies de HDPE con ambos organismos después de 1 año el tratamiento se determinó con la viabilidad bacteriana BacLight Kit, se observan más organismos vivos (manchas verdes) en térmicamente LDPE y HDPE tratados que en películas sin tratar. Los organismos muertos aparecen de color rojo.

Harshvardhan, K., & Jha, B. (2013) realizaron una investigación y analizaron 60 bacterias marinas aisladas de aguas pelágicas por su capacidad para degradar la baja densidad polietileno; entre ellos, tres fueron positivos y pudieron crecer en un medio que contenía polietileno como la única fuente de carbono. Los aislamientos positivos se identificaron como *Kocuria palustris* M16, *Bacillus pumilus* M27 y *Bacillus subtilis* H1584 basado en la homología de secuencia del gen 16S rRNA. La pérdida de peso del polietileno fue 1%, 1.5% y 1.75% después de 30 días de incubación con los aislamientos M16, M27 y H1584 respectivamente.

Sangale, Shahnawaz, & Ade (2012) realizó una investigación después de 3 meses de agitación, los discos del polietileno fueron oxidados en la superficie y punto de tensión (resistencia máxima) donde disminuye y alcanza un máximo de 12.3% de pérdida de peso que fue registrado. Después de un mes de incubación bacterial y fúngica se aisló la degradación máxima por (*Aspergillus niger*) y la bacteria (*Streptococcus lactis*). Fue encontrada como a 12.25% y 12.5%

respectivamente. 11% (gravimétrico) y 30 % (molecular) la pérdida de peso fue registrada a 50°C después de 30 días.

Koutny *et al.* (2009) menciona que la mayoría de ellos pertenecían a diferentes géneros del grupo de las proteobacterias; sin embargo, tres de los aislamientos fueron cepas de *Rhodococcus*. Con la excepción de una de las cepas de *Rhodococcus*, los aislamientos no exhibieron hidrofobicidad significativa de sus superficies celulares. El estudio mostró que las bacterias capaces de adherirse a la superficie del polietileno oxidado, crecer allí y posiblemente biodegradar sus productos de oxidación no son raras en los suelos forestales y que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos comunes en el ambiente del suelo.

Hadad, Geresh, & Sivan (2005). Realizaron un estudio donde demostraron que una bacteria termofílica *Brevibaccillus borstelensis* cepa 707 (aislada del suelo) utilizó polietileno ramificado de baja densidad como la única fuente de carbono, la incubación de polietileno con *B. borstelensis* (30 días, 50 ° C) redujo sus pesos gravimétricos y moleculares en 11 y 30% respectivamente. La actividad y la viabilidad de la biopelícula bacteriana se determinaron mediante la viabilidad celular con un kit de viabilidad bacteriana BacLight™ vivo / muerto (Molecular Probes Eugen, OR, EE. UU.)

Gilan & Sivan (2004) realizaron un procedimiento de enriquecimiento condujo al aislamiento de una cepa de *Rhodococcus ruber* (C208) que utilizaba películas de polietileno como única fuente de carbono. En cultivo líquido, C208 formó una biopelícula en la superficie de polietileno y degradó hasta un 8% (gravimétricamente) de la poliolefina dentro de los 30 días de incubación.

Bonhomme *et al.* (2003) las imágenes del crecimiento de las biopelículas se observaron por microscopía de fluorescencia, la colonización fue rápida y la cobertura superficial fue completa para *N. asteroides* y *R. rhodochrous* dentro de 17 semanas y el crecimiento de *C. cladosporoides* fue ligeramente más lento.

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema

La utilización del polietileno en diversidad de empaques y productos constituye un problema ambiental debido que su reciclaje es en porcentaje mínimo. El polietileno de baja densidad (plástico PEBD o LDPE) es uno de los principales enemigos de la naturaleza al ser un material sintético derivado de hidrocarburos, posee una permanencia alrededor de 1000 años, por lo que se le podría considerar acumulable.

A nivel mundial los grandes países generan residuos sólidos de una totalidad de 2 515 millones de toneladas al año provenientes de actividades económicas y hogares con una representación del 9% (213 millones de toneladas) en plásticos, actualmente existe una gestión inadecuada de estos residuos incinerándolos, con un alto costo de inversión y deterioro directamente al medio ambiente y América latina produjo en el 2014 el 5% de la producción total (Plastics Europe, 2010) siendo el polietileno el de mayor demanda con un 37 % y el 9% corresponde al LDPE (Téllez, 2012) El bajo costo, la alta demanda y el prolongado tiempo de permanencia del plástico ha hecho posible que éste sea considerado un contaminante peligroso a nivel mundial. Debido a la insuficiente cantidad de rellenos sanitarios, muchos de los residuos plásticos son llevados al mar, originando de esta manera la muerte de incontables especies. (Digesa, 2013).

Sin embargo, el mayor problema no radica en los envases, fibras y productos plásticos fabricados, radica en los microplásticos, representan un grupo de agentes contaminantes imposible de detener por ser poco perceptibles a la vista, volviéndose así el asesino silencioso de ríos, lagos y mares. En el dossier de prensa llamado Plásticos en los océanos. Datos comparativos e impactos, menciona que 8 millones de toneladas de plásticos tienen

como destino final los mares y océanos cada año y representa 60-80% de la basura marina y la gran proporción se encuentra en forma de micro plásticos (5 mm). No se tiene la cantidad con exactitud, pero se estima que 5-50 billones de fragmentos se encuentran en los mares (Greenpeace, 2011). Los microplásticos son trozos y fibras de plástico invisibles al ojo humano y que según una investigación de la organización periodística Orb, se encuentran en el 83% de las muestras de agua potable de casi un centenar de países, se les ha encontrado en el estómago de peces y otras especies acuáticas (Huerta, 2018).

Los estudios científicos demuestran que aditivos comunes del plástico son muy peligrosos para la salud ,entre ellos destacan los bisfenoles, los ftalatos, el cloruro de vinilo ,el estireno, algunos son disruptores endocrinos, lo cual significa que imitan el comportamiento de las hormonas inclusive existen pequeñísimas concentraciones (partes por billón) que pueden producir mutaciones graves a nivel celular en ambos sexos donde los niños y los fetos son susceptibles, observándose las enfermedades como el cáncer de mama, ovarios, vagina cérvix, cáncer del cerebro y sistema nervioso ,leucemias, cáncer de pulmón y del sistema respiratorio, cáncer de próstata y testículos, obesidad, diabetes es decir casi todas las dolencias (Gonzáles, 2019).

Los plásticos constituyen el tercer volumen más grande de residuos en lo que respecta a residuos sólidos municipales en el Perú, ya que la industria de productos plásticos ha experimentado un sostenido crecimiento en los últimos años, impulsada por la reactivación de la demanda interna, la mayor apertura comercial y el impacto positivo de la demanda global sobre las exportaciones (Apiplast, 2012). En el Perú los residuos se dividen como restos orgánicos de cocina y de alimentos, un 47,0% del total de residuos generados, seguido de los plásticos con un 9,5%, entre ellos los plásticos no reciclables como el polietileno. (MINAM, 2013).

En la actualidad, los pobladores de Puno producen entre 92 y 110 toneladas de residuos sólidos y en fechas festivas aumenta en treinta toneladas más, siendo el 19% residuos plásticos y el 7% corresponde al PEBD (Municipalidad Provincial de Puno, 2019), lo cual representa una amenaza para los ecosistemas. El problema de los residuos plásticos en la ciudad de Puno tiene un efecto negativo directo sobre el desarrollo de la ciudad, y que conllevaría un riesgo de salud ambiental así como el deterioro del paisaje de la ciudad además de la proliferación de enfermedades, representando una amenaza para los ecosistemas puneños, siendo uno de los problemas ambientales más peligrosos y

contaminantes del suelo, aire y agua, por lo que es crucial y de suma importancia proponer alternativas de solución para la degradación en beneficio del medio ambiente, de la salud humana y de todo ser viviente, así mismo, varios estudios mencionan que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* tiene capacidad biodegradadora frente al polietileno, sin embargo no se sabe cuáles serán los factores condicionantes para una mayor biodegradación, asimismo sería una alternativa de tratamiento para este tipo de residuo por ser una solución efectiva y rápida para reducir, mitigar la contaminación actual y hacer frente al uso de polietileno; razón por la cual se realizó el trabajo de investigación con las siguientes interrogantes:

2.2 Enunciados del problema

2.2.1 Problema general

¿Cuál será la capacidad de biodegradación de *Pseudomonas aeruginosa* frente al polietileno de baja densidad?

2.2.2 Problemas específicos

- ¿Se podrá aislar a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* con capacidad de biodegradación frente al polietileno de baja densidad?
- ¿La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* adaptará su metabolismo a medios sintéticos con polietileno de baja densidad?
- ¿En qué condiciones de temperatura y pH *Pseudomonas aeruginosa* logrará mayor actividad biodegradativa frente al polietileno de baja densidad?

2.3 Justificación

En los últimos años vivimos en sociedades de hiperconsumismo, exceso de urbanismo y el crecimiento poblacional van en aumento. Hoy en día el uso creciente de materiales sintéticos, como el polietileno de baja densidad (plástico) en la vida cotidiana es una de las fuentes de contaminación más grande en el planeta. El consumo mundial de este material está causando problemas cada vez mayores en nuestro planeta. Por una parte, ofrece ventajas porque es ligero, resistente, económico y duradero, por otra, plantea un problema enorme para el medio ambiente. Basta con echar un vistazo a nuestro alrededor, el plástico domina desde hace mucho tiempo nuestro día a día, la fatal combinación de la cantidad de plástico a nivel mundial y su larga durabilidad tiene un impacto enorme en nuestro medio ambiente y en los seres humanos.

La presencia de grandes cantidades de polietileno dispersas en el suelo genera inestabilidad, contaminación visual, contaminación de los suelos y alteran la biota. A partir de los resultados, conocer los efectos benéficos que pueden ejercer los microorganismos sobre el polietileno de baja densidad al emplearlo como fuente de carbono para disminuir el impacto negativo que produce al ecosistema y a la salud; plantear alternativas para el tratamiento de este polímero con microorganismos identificados capaces de degradarlo, así mismo proporcionara conocimientos básicos para aislar, caracterizar e identificar bacterias nativas y la comprensión de la acción de los microorganismos sobre el polietileno de baja densidad, será sustento y referencia para futuros proyectos que busquen contribuir con la reducción de los polímeros sintéticos por acción de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, que es un microorganismo que se caracteriza por poseer una extrema versatilidad metabólica y que en condiciones controladas es capaz de degradar el PEBD.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de biodegradación de la *Pseudomonas aeruginosa* frente al polietileno de baja densidad.

2.4.2 Objetivos específicos

- Aislar a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* con capacidad de biodegradación frente al polietileno de baja densidad.
- Adaptar el metabolismo de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en medios sintéticos con polietileno de baja densidad.
- Determinar las condiciones de temperatura y pH donde *Pseudomonas aeruginosa* logre mayor actividad biodegradativa frente al polietileno de baja densidad.

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis general

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* tiene capacidad de biodegradación frente al polietileno de baja densidad.

2.5.2 Hipótesis específicas

- La bacteria aislada, tiene capacidad de biodegradación frente al polietileno de baja densidad.
- La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* adapta su metabolismo en medios sintéticos con polietileno de baja densidad.
- La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* tiene igual actividad biodegradativa frente al polietileno a distintas temperaturas y pH

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Lugar de estudio

Botadero de Cancharani, ubicado en el Departamento, Provincia y distrito de Puno, ubicado en el sur oeste de la comunidad campesina de Cancharani; colinda con la zona denominada Itapalluni conducente a la red vial vecinal de San Luís de Alba, a 8 km de la ciudad de Puno, sobre la vía asfaltada Puno - Laraqueri a una altitud de 3,995 msnm, se ubica sobre un terreno accidentado con zonas bajas y rodeado de cerros y quebradas, entre las coordenadas UTM siguientes:

Tabla 1

Coordenadas UTM del Botadero de Cancharani

Norte	Este
N 8 242 400	E 389 500
N 8 242 400	E 390 300
N 8 243 000	E 389 500
N 8 243 000	E 390 300



Figura 2. Mapa del botadero de Cancharani
Fuente: Google maps (2019)

Procesamiento de muestras: Las muestras se procesaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Humana y en el Megalaboratorio de la Universidad Nacional del Altiplano.

3.2 Población

Bolsas de plástico tipo chequera.

3.3 Muestra

Quince bolsas de plástico (PEBD) de 0.910-0.940 g/cm³

3.4 Método de investigación

La investigación es de carácter experimental, el cual se realizó tanto en campo y en laboratorio, según Sánchez (1998) ya que se fundamenta en el método científico y utilizan procesos lógicos como la inducción y deducción y una relación causa y efecto que a su vez son fundamentales para la comprobación de las hipótesis.

3.5 Procedimientos metodológicos

Para alcanzar el OE1: Identificación de bacterias con capacidad de biodegradación del polietileno de baja densidad

La metodología utilizada para la identificación de bacterias con capacidad de biodegradación del polietileno de baja densidad se realizó en cuatro fases: de campo, pre analítica, analítica y post analítica.

Materiales y equipos. Microscopio óptico compuesto, autoclave, incubadora de 37°C, refrigerador, destiladora de agua.

Reactivos. Kit para tinción de Gram, aceite de inmersión, glicerol, reactivo de Kovacs.

Medios de cultivo. Agar MacConkey, agar Cetrimide, caldo nutritivo, kit para pruebas bioquímicas TSI (agar hierro triple azúcar), LIA (agar lisina hierro), CITRATO (agar citrato de Simmons), SIM (medio de sulfuro indol para movilidad).

a. Fase de campo

La fase de campo se realizó en el botadero de Cancharani de la ciudad de Puno en los meses julio a agosto 2019, se seleccionó 15 muestras de residuos sólidos plásticos que mostraban deterioro que fueron tomados de 3 a 5 cm de profundidad en diferentes puntos seleccionados por conveniencia (Usha, Sangeetha & Palaniswamy, 2011), luego se colocaron en bolsas plástico ziploc de primer uso y se trasladó a laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas para su procesamiento (Rivera, Gándara & Ortigoza, 2015).



Figura 3. Botadero de Cancharani

b. Fase pre analítica

Preparación de muestras y medios de cultivo

La preparación del material fungible se realizó en el laboratorio de acuerdo a las normas microbiológicas, estandarización de equipos (incubadora y autoclave), luego se preparó los medios de cultivo como son agar MacConkey (AMC), agar Cetrimide (AC), kit para pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CITRATO, SIM)

Seguidamente, se sacó las muestras en recipientes estériles, se lavaron con solución salina al 0.85% quitando todos los residuos posibles hasta que quede sin adherencias, se enjuago con agua destilada estéril, luego se fraccionaron y fueron enjuagadas con agua destilada estéril durante 20 minutos (Gonzáles, 2019).

c. Fase analítica

Se fraccionaron las muestras en cuadrados de 1cm x 1cm previamente secadas y se sembraron en placas con agar AMC, se incubo a 37°C por 7 días (Arenas, 2018).

Se tomó una muestra de colonias de bacterias de las placas Petri y se realizaron repiques en agar cetrimide (AC) y se incubaron a 37°C por 48 horas, para obtener cultivos puros.

Después de la incubación correspondiente se realizó la identificación en el microscopio óptico compuesto con la tinción de Gram para observar la morfología característica de bacilos gramnegativos correspondiente a *Pseudomonas aeruginosa* (Koneman & Allen, 2008).

Las cepas axénicas se mantuvieron viables para su posterior utilización (Kyaw *et al.*, 2012)

d. Fase post analítica

Esta fase corresponde a las lecturas finales y de confirmación, se utilizó el kit o batería de pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CITRATO, SIM) y se hizo una lectura con las tablas de comparación para identificar a *Pseudomonas aeruginosa*.

Posteriormente se llevó la muestra al hospital ESSALUD Puno, y con ayuda del instrumento WalkAway 96 plus se sometió a una prueba de análisis final para comprobar y validar la cepa. A la muestra sometida al análisis de identificación de bacterias, se le asignó por nombre cepa pura (Begum, Varalakshmi & Umamagheswari, 2015).

Finalmente, la cepa pura se inculo en el caldo nutritivo y fueron envasadas para ser crio conservadas con glicerol, por cada 100ml de muestra se utilizó 3ml de glicerol. Se tomó 1ml del matraz y se trasladó a 3 tubos Eppendorf estériles. A cada tubo con 1mL de inóculo se adicionó 0.3ml de glicerol para su conservación. Para culminar con el proceso de conservación los 3 tubos Eppendorf fueron refrigerados a -40°C (Arenas, 2018).



Figura 4. Cepa pura en caldo nutritivo

Para alcanzar el OE2: Adaptación del metabolismo de cepas puras en medios sintéticos con polietileno de baja densidad.

Materiales y equipos. Autoclave, incubadora de 37°C, destiladora de agua.

Medios de cultivo. Caldo nutritivo, agar nutritivo, medio mineral modificado (MM) (Fontanela *et al.*, 2003) compuesto de 3.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.8 g KH_2PO_4 , 0.02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g NaCl , 0.3 g NH_4Cl y 1 ml de solución de oligoelementos por litro: 0.20 g MnSO_4 , 0.029 g H_3BO_3 , 0.022 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g Na_2MoO_4 , trazas de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ y trazas de CuSO_4 disuelto en 500 ml de agua.

a. Fase preanalítica

Preparación de muestras y medios de cultivo

La preparación del material fungible se realizó en el laboratorio de acuerdo a las normas microbiológicas, estandarización de equipos (incubadora y autoclave), luego se preparó los medios de cultivo como son agar nutritivo (AN) y caldo nutritivo (CN). Seguidamente, se sacó las muestras crio conservadas, se dejaron a temperatura ambiente, se esterilizaron 6 matraces de 10mL y se rotularon de la siguiente manera: P1, P2, P3, P4, P5, P6 (Arenas, 2018).

b. Fase analítica

La cepa pura se inoculó en el matraz P1 de 10ml de capacidad con 5ml de caldo nutritivo más medio mineral (caldo de crecimiento) en su interior, se colocó en la incubadora a 37°C de temperatura por 72 horas. Transcurrido el tiempo de

crecimiento, se tomaron 4ml del matraz P1 y se colocaron en el matraz P2 que contenía 1 ml de caldo de crecimiento y 0.002g de PEBD. Este nuevo matraz se colocó nuevamente a 37°C de temperatura por 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación del matraz P2, se tomó una alícuota de 3ml y se inoculó en el matraz P3 que contenía 2 ml de caldo de crecimiento y 0.004g de PEBD. Este matraz se colocó nuevamente a 37°C de temperatura por 72 horas. Al cabo de 3 días se tomaron 2ml del P3 y se inocularon en el nuevo matraz P4 con 3ml de caldo de crecimiento y 0.006g de PEBD. Este se colocó nuevamente a 37°C de temperatura por 72 horas. Una vez cumplidos los 3 días de incubación, se tomó una alícuota de 1ml del P4 y se colocó en un nuevo matraz P5 con 4ml de caldo de crecimiento con 0.008g de PEBD. Este nuevo matraz se colocó nuevamente en a 37°C de temperatura por 72 horas. Finalmente se tomó una alícuota de 0.5ml del matraz P5 y se colocó en el P6 con 4.5ml de caldo de crecimiento con 0.009g de PEBD. Este matraz se colocó nuevamente a 37°C de temperatura por 72 horas y se observó el crecimiento y la turbidez cada día. Los matraces P1, P2, P3, P4 y P5 fueron guardados en refrigeración (Arenas, 2018).

c. Fase post analítica

Esta fase corresponde a las lecturas finales y de confirmación, del último ensayo se tomó una alícuota de 1ml y se realizó diluciones seriadas para las siembras bacteriológicas en agar nutritivo, se incubo a 37°C de temperatura por 24-72 horas. Finalmente, se observó el crecimiento de colonias en agar nutritivo para su confirmación de desarrollo bacteriano (Arenas, 2018).

Para alcanzar el OE3: Determinación de las condiciones de temperatura y pH donde *Pseudomonas aeruginosa* logra mayor actividad biodegradativa frente al polietileno de baja densidad.

La determinación de las condiciones de temperatura y pH donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* logra mayor actividad degradativa frente al polietileno se realizó con cepas axénicas, mediante la prueba cualitativa y cuantitativa de la degradación del polietileno de baja densidad, después de los 30 días de incubación.

Materiales y equipos. Autoclave, incubadora de 37°C, destiladora de agua, microscopio de fluorescencia, estereoscopio.

Reactivos. Rodamina B, fenol licuado, permanganato de potasio al 0.5%, aceite de inmersión.

Medios de cultivo. Caldo nutritivo, medio mineral modificado (MM) (Fontanela et al., 2003) compuesto de 3.8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.8 g KH_2PO_4 , 0.02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g NaCl , 0.3 g NH_4Cl y 1 ml de solución de oligoelementos por litro: 0.20 g MnSO_4 , 0.029 g H_3BO_3 , 0.022 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g Na_2MoO_4 , trazas de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ y trazas de CuSO_4 disuelto en 500 ml de agua.

Prueba cuantitativa de la Biodegradación del PEBD

Esta prueba determina la variación directa de la masa o peso del polietileno de baja densidad que ha sido expuesto a las condiciones de biodegradación. El principio básico de la pérdida de la masa o de peso es la adherencia y biodegradación de los microorganismos al LDPE o PEBD, los cuales se han preseleccionado por su capacidad de utilizarlo como fuente de carbono. Su procedimiento consiste en pesar con una micro balanza el material antes y después de realizar una prueba de cultivo (Acuña, 2017). Para realizar esta prueba, se ha realizado en las siguientes fases:

a. Fase pre analítica

Se procedió nuevamente a inocular la cepa adaptada en caldo nutritivo más medio mineral y fue llevada a incubación a 37°C por 1 semana hasta obtener una turbidez de 0.5 de la escala de Mac Farland (González, 2019).

Se prepararon 20 matraces con caldo nutritivo más medio mineral; se ajustó el pH a 5.0 y otro a pH a 7.0 y como controles se utilizaron matraces sin polietileno con cepas bacterianas y matraces con polietileno sin cepas bacterianas (González, 2019).

Se procedió a fraccionar el material plástico en cuadrados de 2cm x 2cm y se pesaron en balanza analítica (peso inicial), según la tabla siguiente:

Tabla 2

Peso inicial del PEBD en mg

PEBD	T°	pH	PI mg	
2x2	25	5.0	0.021	
			0.023	
		7.0	0.021	
			0.023	
		35	5.0	0.022
				0.024
	7.0		0.024	
			0.021	
	7.0		0.021	
			0.023	
				0.023

b. Fase analítica

Se colocaron los cuadrados de 2cm x 2cm en 12 matraces que contenían CN más MN (CNMN) con la suspensión bacteriana. Luego se llevó a incubación in vitro a 25°C y 35°C durante 30 días, periódicamente se fueron agitando y observando el ataque bacteriano (que significa actividad biodegradadora) (González, 2019; Mumtaz, ParvinNur & Khan, 2006).

c. Fase post analítica

Después de los 30 días de incubación se separó el material plástico del CN, colocándolos en una luna de vidrio y en una cámara de flujo laminar se desinfectaron los cuadrados de PEBD para eliminar la película o biofilm generado en la superficie con etanol al 70% durante 30 minutos, luego se lavaron con agua destilada estéril por 10 minutos, fueron secados con papel filtro y colocados a la estufa a 40°C por 15 minutos para que las muestras de PEBD se encuentren secas y el pesaje sea un valor real (Das & Kumar, 2013). Las muestras de PEBD se pesaron en una balanza analítica. Para obtener el porcentaje de pérdida de peso se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%pérdida = \frac{(W_{inicial} - W_{final})}{W_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Kyaw et al., 2012})$$

Metodología estadística. Se aplicó el diseño estadístico del modelo de efectos fijos, para demostrar la eficacia de *Pseudomonas aeruginosa* frente al polietileno a 25°C - 35°C y

pH de 5.0-7.0. Seguidamente se realizó la prueba de comparación de medias y así demostrar si los dos factores presentan diferencia significativa (0.05:5%). Se realizó un diseño factorial de dos factores, considerando el factor A: la temperatura dividido en dos niveles 25°C - 35°C y el Factor B: el pH dividido en dos niveles 5.0 y 7.0.

El modelo aditivo del diseño factorial es como sigue:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

$i=1, 2$.

$j=1, 2$.

$k=1, 2, 3$.

El factor A representa la temperatura a 25° y 35°, mientras que el factor B representa el PH a 5 y 7.

Y_{ijk} : Peso en mg.

τ_i : Efecto medio debido a la temperatura i .

β_j : Efecto medio debido al pH j .

$(\tau\beta)_{ij}$: Efecto medio debido a la interacción entre la temperatura i y el pH j .

Prueba cualitativa de la biodegradación del PEBD

Después de los 30 días de incubación se separó el material plástico del CN, colocándolos en una luna de vidrio. Esta evaluación se realizó mediante la observación al estereoscopio y descripción de los cambios que presento en cuanto refiere a la pérdida de color, brillo, presencia de porosidad, fisuras o grietas en las superficies crecimiento sobre y debajo de la superficie, presencia de biopelículas, biocapas o biofilms (Acuña, 2017).

Seguidamente se observó el crecimiento bacteriano y la formación de biofilm. La viabilidad de la biopelícula bacteriana (biofilm) fue determinada con el microscopio de fluorescencia. Las muestras de polietileno que contenían la biopelícula fueron retiradas del medio, lavadas con agua estéril y teñidas (Chavant *et al.*, 2002).

Para esto se realizó la extensión de la muestra, seguidamente la fijación al calor, se procedió a la coloración con Rodamina B previamente filtrada, por 15 minutos. Seguidamente se lavó la muestra con agua destilada, se añadió permanganato potásico al 5% en agua destilada y se dejó actuar por 5 minutos. Se lavó con agua destilada y se secó

al aire. Finalmente se realizó las observaciones con el microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40X y 100X (Merck, 2019).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de bacterias con capacidad de biodegradación frente al polietileno

El aislamiento primario se realizó en el medio de cultivo Agar MacConkey (AMC), que es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento y la diferenciación de bacilos gram negativos, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas. Se seleccionó las placas con mejores características morfológicas y se realizó un repique en agar Cetrimide, que es un medio selectivo para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa*, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas. Se seleccionó las placas con mejores características morfológicas y de color para la identificación de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* para las 72 horas.

La tabla 3 muestra los resultados de la siembra y aislamiento en medios selectivos, en los cuales el crecimiento de colonias se desarrolló casi de la misma manera (+ bajo, ++ moderado, +++ abundante, ++++ muy abundante), la diferencia estuvo en el aumento de la velocidad de crecimiento de las cepas de acuerdo al tiempo de incubación.

Tabla 3

Crecimiento bacteriano en Agar MacConkey y Agar Cetrimide

Placa	Tiempo		
	24	48	72
1AMC	+	+	++
2AMC	+	++	+++
3AMC	-	-	-
1AC	+	++	+++
2AC	+	+++	++++
3AC	+	++	+++

La tabla 4 muestra los resultados del crecimiento bacteriano en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en un tiempo de 24-72h, en los cuales el crecimiento de colonias se desarrolló casi igual, la diferencia se dio por el aumento de la velocidad de crecimiento de las cepas de acuerdo al tiempo de incubación. Siendo el crecimiento óptimo a las 72h a 37°C.

Tabla 4

Crecimiento bacteriano de 24-72h a 37°C

Medio de cultivo	24 horas colonias (UFC)	48 horas colonias (UFC)	72 horas colonias (UFC)
1MC	12 x 10 ⁵	30 x 10 ⁵	70 x 10 ⁵
2MC	16 x 10 ⁵	40 x 10 ⁵	80 x 10 ⁵
3MC	0	0	0
1C	15 x 10 ⁵	40 x 10 ⁵	80 x 10 ⁶
2C	20 x 10 ⁵	56 x 10 ⁵	112 x 10 ⁶
3C	10 x 10 ⁵	30 x 10 ⁵	70 x 10 ⁶

Las Figuras 5 y 6 muestran el crecimiento de bacterias en los medios de cultivo Agar MacConkey (A) en su 2 día a 37°C y Agar Cetrimide (B) en su 3 día a 37°C, esto debido a que en una población de bacterias que se encuentren en crecimiento aumentan de manera proporcional con el tiempo.

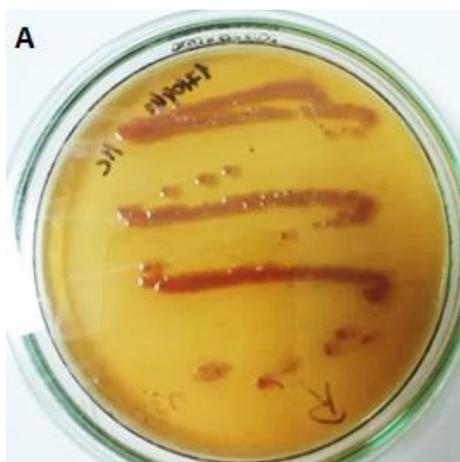


Figura 5. Crecimiento de bacterias en Agar MacConkey a las 48 horas a 37°C



Figura 6. Crecimiento de bacterias en Agar Cetrimide a las 72 horas a 37°C

A estos resultados obtenidos Arenas (2018) indica que la siembra en medios generales y enriquecidos se desarrollaron a 37°C, esto debido a que en una población de bacterias que se encuentren en crecimiento equilibrado aumentan con el tiempo.

Las cepas fueron sometidas a tinción de Gram (Figura 7), mediante la cual se realizó el primer reconocimiento de las bacterias gramnegativas, de este primer ensayo se seleccionaron sólo las bacterias que tenían la forma de bastones y con coloración rosada, esto confirma que las cepas tienen la característica de ser *Pseudomonas aeruginosa*.

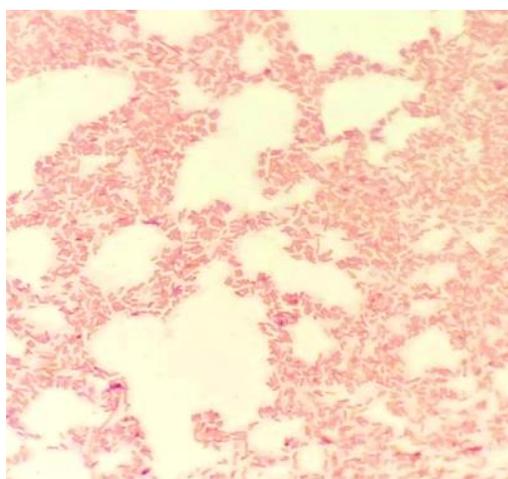


Figura 7. Bacilos Gramnegativos con tinción de Gram

Así como lo indica Gutiérrez (2013) la tinción de Gram es una coloración que nos ayuda a la identificación de bacterias, se puede apreciar con más definición la morfología de los microorganismos, tamaño y diversidad, como también reporta Arenas (2018) la tinción de Gram realizada sirvió como primer análisis microscópico de las cepas obtenidas y también permitió obtener detalles sobre su estructura interna, cuyas características

macroscópicas se complementan con las descripciones, quien indica que este tipo de características corresponden al tipo *Pseudomonas aeruginosa*.

Los resultados obtenidos de las pruebas de reconocimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* por medio de ensayos de tinción de Gram y medios de cultivo descritas en las tablas 3 y 4 se observaron que poseen características de ser bacterias Gramnegativas, crecieron en el agar MacConkey con coloración rosada y en agar Cetrimide con coloración amarillo-verdosa, con características físicas morfológicas con forma circular con elevación plano de superficie lisa y brillante, y de consistencia mucosa.

Esta caracterización concuerda con lo reportado por Ruiz (2007); Ortíz *et al.* (2004) quienes describen a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* de ser bacilos Gramnegativos, coloración amarillo-verdoso por la producción de pioverdina, se considera como sideróforo según Revelles *et al.* (2005) con morfología colonial alargada y plana, con el centro elevado, de crecimiento en medio sólido con producción de mucoide. Hussein, Al-Mayaly & Khudeir (2015) mencionan que los aislamientos bacterianos revelaron una apariencia colonial diferente dependiendo de los medios selectivos o diferenciales utilizados.

Las pruebas bioquímicas de TSI, LIA, CITRATO y SIM, nos confirmaron que las cepas tienen la característica de ser *Pseudomonas aeruginosa*, no fermentaron lactosa, sacarosa, glucosa (resultado de TSI negativo), crecieron en medio LIA por lo que son sideróforo, utilizaron al citrato como fuente de carbono (Citrato de Simmons positivo), prueba de SIM negativa (tabla 5 y figura 8). Posteriormente la validación y confirmación de la cepa se realizó con el instrumento WalkAway 96 Plus.

Tabla 5

Pruebas bioquímicas para Pseudomonas aeruginosa

TSI				LIA		CITRATO	SIM
Lactosa	Sacarosa	Glucosa CO ₂	Desaminación	Descarboxilasa	Hierro		
k	k	-	-	+	+	+	-



Figura 8. Pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CITRATO, SIM)

Según Pramila *et al.* (2012) indica que una prueba de confirmación de cepas bacterianas es el uso de pruebas bioquímicas y las utilizadas por el autor fueron motilidad, catalasa, oxidasa, carbono, aminoácidos, nitrato. Así también lo indica Begum, Varalakshmi & Umamagheswari (2015) los aislados bacterianos seleccionados se identificaron mediante caracterización bioquímica como la motilidad y la catalasa, oxidasa, indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, triple azúcar de hierro, utilización de citrato, ureasa, reducción de nitrato y prueba de fermentación de carbohidratos. De igual manera Arenas (2018) reporta que las pruebas bioquímicas como oxidasa, TSI, urea, indol y gelatina constituyen pruebas preliminares que se utilizan en la identificación y la inmediata lectura. El uso de instrumentos o equipos automatizados son muy útiles para la confirmación y validación de cepas bacterianas como lo reporta Hussein, Al-Mayaly & Khudeir (2015) el equipo Vitek 2 es una técnica poderosa para identificar los aislados bacterianos. Así mismo Gutiérrez (2018) indica que con ayuda del instrumento Vitek II Compact se sometió a una última prueba de análisis final que comprobaría que se trataba de *Pseudomona aeruginosa*.

4.2 Adaptación del metabolismo de cepas puras en medios sintéticos con polietileno de baja densidad

La adaptación de bacterias se desarrolló de forma gradual, las colonias que se acondicionaron en caldo nutritivo más medio mineral (caldo de crecimiento CNMM) con diferentes concentraciones de polietileno de baja densidad fueron incubadas en un

periodo de 24-72 horas (1-3 días). Posteriormente del matraz P6 que contenía 4.5ml de caldo de crecimiento con 0.009g de PEBD (último ensayo), se observó el crecimiento de colonias en agar nutritivo para su confirmación de desarrollo bacteriano en un tiempo de 24-72 horas a 37°C.

El número de colonias crecidas en placas de medio agar nutritivo, nos permitió observar el crecimiento de la bacteria en las diferentes concentraciones de PEBD y así evidenciar su adaptación (Gutiérrez, 2018). La tabla 6 muestra los resultados de la siembra en agar nutritivo, en los cuales el crecimiento de colonias se desarrolló en un tiempo de 24-72 horas a 37°C (+ bajo, ++ moderado, +++ abundante) (tabla 6).

En la tabla 7 se puede observar los resultados del crecimiento bacteriano en Unidades Formadoras de Colonias (UFC), lo cual evidencia la adaptación y crecimiento bacteriano a un medio sintético.

Tabla 6

Crecimiento de colonias en Agar nutritivo a 37°C

Placa	Tiempo		
	24	48	72
1AN	+	++	++
2AN	+	++	+++
3AN	+	++	+++

Tabla 7

Crecimiento de colonias (UFC) en un tiempo de 24-72h

Medio de cultivo	24 horas colonias (UFC)	48 horas colonias (UFC)	72 horas colonias (UFC)
1AN	11 x 10 ⁵	30 x 10 ⁵	70 x 10 ⁵
2AN	15 x 10 ⁵	40 x 10 ⁵	86 x 10 ⁵
3AN	15 x 10 ⁵	40 x 10 ⁵	80 x 10 ⁵

Las cepas encontradas en su medio natural, poco a poco se fueron adaptando a las condiciones de laboratorio. Pasaron de suero fisiológico a medio de cultivo sintético con PEBD. En períodos determinados de tiempo, la adaptabilidad no sólo le otorga la versatilidad a la cepa bacteriana, el ser mesófila permite trabajar en un rango amplio de temperatura y potenciar los resultados (Cava, Hidalgo & Berenguer, 2009).

Las bacterias cuya pared celular es la primera en tener contacto con el nuevo entorno, produce D-aminoácidos un tipo de molécula que al ser liberada es capaz de modular la

síntesis de peptidoglicanos que son el principal componente de esta, la envoltura o pared celular de la bacteria es fundamental para su supervivencia, cuando las condiciones ambientales no son favorables, ya sea por falta de nutrientes o por algún tipo de estrés al que se le someta, la bacteria detiene su crecimiento automáticamente, por lo que una falta de comunicación y adaptación con el entorno por parte de la síntesis de peptidoglicanos pondría en riesgo la supervivencia de la cepa en general (Cava *et al.*, 2011).

Al ser la pared celular el primer contacto, le permite a la bacteria protegerse y comunicarse con su entorno, es por eso que la adaptación se llevó a cabo por fases y en períodos moderados de tiempo añadiendo distintas concentraciones de PEBD, por lo que el proceso de adaptación es una alternativa para potenciar la biodegradación. Como lo afirma Arenas (2018) las cepas encontradas en su medio natural poco a poco se fueron adaptando de suero fisiológico a medio de cultivo sintético con PEAD, en períodos determinados de tiempo con lo cual se logró adaptar y re-direccionar el metabolismo de cepas puras de tipo *Pseudomonas Aeruginosa* y *P. Fluorescens* y *Bacillus Humi*, *B. Amyloliquefaciens*, *B. Subtilis*, *B. Sinesaloumensys* y *B. Tequilensis*.

Singh, Gupta & Shrivastava (2015) indican que los cultivos de enriquecimiento y adaptación para aislar las bacterias degradantes del polímero se incubaron a 37°C. Pramila *et al.* (2012) mencionan que para la adaptación se utilizó un medio sintético esterilizado (SM) y se incubaron a 37°C durante 24 h y las bacterias aisladas se obtuvieron como cultivos puros.

Rajandas *et al.* (2012) realizaron un estudio con cepas de *Microbacterium paraoxydans* y *Pseudomonas aeruginosa*, para lo cual antes de la cuantificación, estas cepas bacterianas se aclimataron a LDPE durante 2 meses. Nanda & Sahu (2010) realizaron una investigación sobre la capacidad de biodegradación de *Brevibacillus*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus spp.* previamente adaptadas en un medio con polietileno.

De lo mencionado anteriormente Barbarán, Cabanillas y Rubio (2018) infiere que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* aplicada para la degradación, tuvo un proceso de crecimiento más lento debido a que no fue aislada de un medio similar necesitando un periodo de adaptación que no fue tomado en cuenta, por lo que los investigadores consideran importante resaltar un tiempo de adaptación.

4.3 Condiciones de temperatura y pH donde *Pseudomonas aeruginosa* logra mayor actividad biodegradativa frente al polietileno

Prueba cuantitativa de biodegradación del PEBD

Se observó que después de 30 días de incubación en la cual se ha utilizado el polietileno de baja densidad como única fuente de carbono en el CNMM, se realizó primeramente la comparación de pérdida de peso.

En la tabla se pueda observar el peso inicial y final del polietileno de baja densidad después de un periodo de 30 días, lo cual refleja que hubo una disminución del peso, teniendo una mayor actividad biodegradativa a los 35°C a un pH de 7.0 (tabla 8).

Tabla 8

Condiciones de temperatura y pH donde Pseudomonas aeruginosa logra mayor actividad biodegradadora

Medio de cultivo	T°	pH	PI mg	PF mg
CNMM	25	5.0	0.021	0.020
			0.023	0.022
		7.0	0.021	0.020
			0.023	0.018
			0.022	0.016
			0.024	0.020
	35	5.0	0.024	0.021
			0.021	0.019
		7.0	0.024	0.022
			0.021	0.014
			0.023	0.016
			0.023	0.017

Las figuras 9 y 10 muestran el peso inicial y final del polietileno de baja densidad después de un periodo de 30 días a temperaturas de 25°C y 35°C a un pH de 5.0 y 7.0., lo cual refleja que hubo una disminución del peso a los 25°C y 35°C a un pH de 7.0

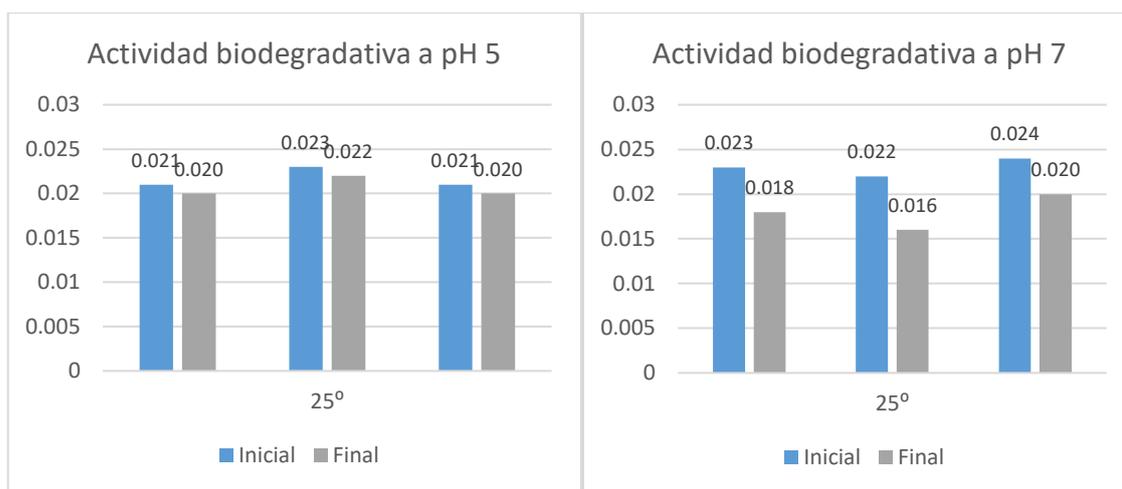


Figura 9. Actividad biodegradativa a 25°C, pH 5 y 7

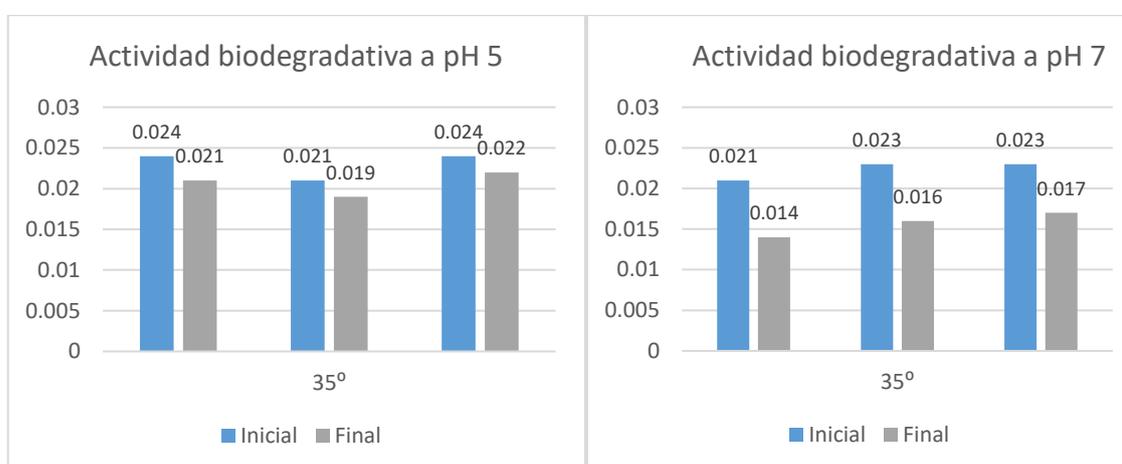


Figura 10. Actividad biodegradativa a 35°C, pH 5 y 7

Pérez y Alania (2017) evaluaron el crecimiento de dos cepas de *Pseudomonas sp.* a dos temperaturas diferentes; obteniendo como resultados que las dos cepas tuvieron mejor crecimiento a 37°C. Así mismo Cáceres (2012) indica que entre las condiciones óptimas en las que se realizó la degradación por actividad microbiana se encuentran un pH de 6.4-8.3, temperatura 24 °C -30 °C.

Según la tabla 9 se puede apreciar que el pH tiene efectos significativos en la variación del peso ($p < 0.0026$), sin embargo, no es significativo los efectos de la temperatura ($p > 0.2731$). Existe diferencias a un nivel de (0.05)5% de significancia entre los valores del pH, lo cual se evidencia cuando el valor de sig=0.003 es menor al 0.05. Por tanto, existen diferencias significativas entre el pH, podemos afirmar que existe diferencia significativa entre el efecto del nivel de pH, los niveles 5.0 y 7.0 son diferentes

significativamente por lo tanto podemos afirmar que la degradación es más significativa en un pH de 7.0.

Tabla 9

Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fc	Sig.
pH	0.00004033	1	0.00004033	18.6154	0.0026
Temperatura	0.00000300	1	0.00000300	1.3846	0.2731
pH * Temperatura (interacción)	0.00000300	1	0.00000300	1.3846	0.2731
Error	0.00001733	8	0.00000217		
Total	0.00006367	11			

En las figuras 11 y 12 se puede observar el promedio de los pesos inicial y final del polietileno de baja densidad después de un periodo de 30 días a temperaturas de 25°C y 35°C a un pH de 5.0 y 7.0., lo cual refleja que la temperatura óptima de biodegradación es a un rango de temperatura de 25°C a 35°C a un pH de 7.0.

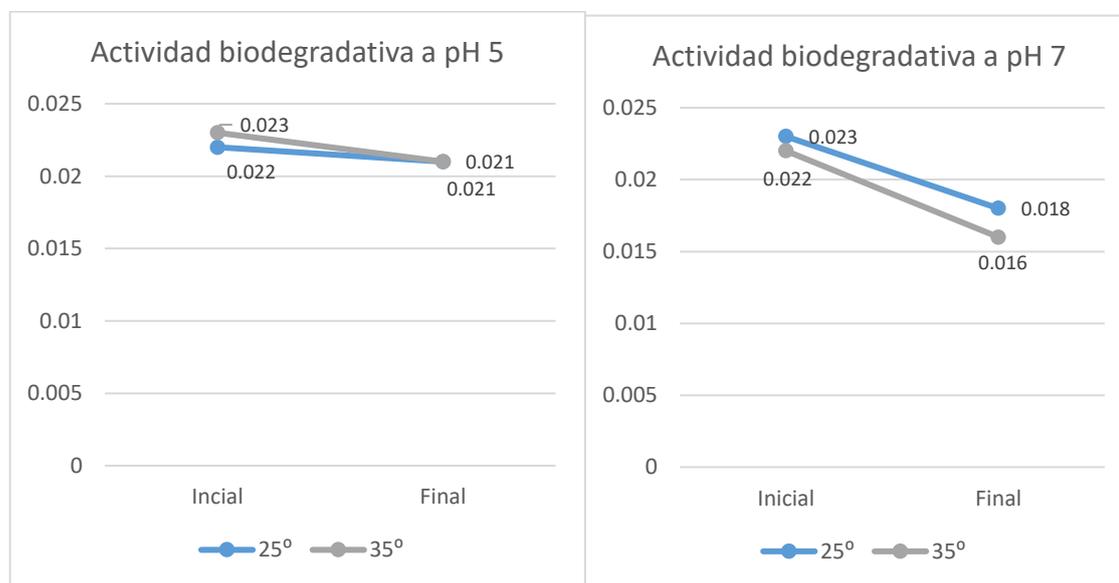


Figura 11. Actividad biodegradativa a 25°C-35°C, pH 5-7

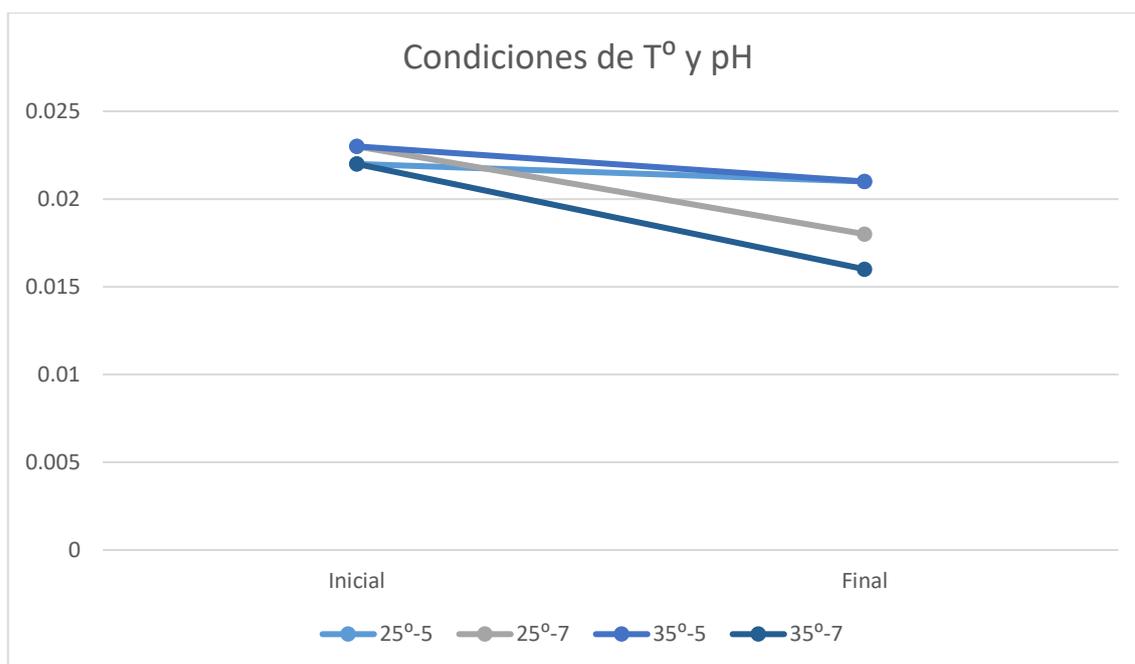


Figura 12. Condiciones de T° y pH para actividad biodegradativa de *Pseudomonas aeruginosa*

Los resultados obtenidos lo corroboran Pérez y Alania (2017) obteniendo como resultados que las dos cepas de *Pseudomonas* tuvieron mejor crecimiento a 37°C. Así mismo Cáceres (2012) indica que las condiciones óptimas van en un rango de pH de 6.4-8.3 y a temperatura de 24°C -30°C. Así como también Uribe *et al.* (2010) menciona que las muestras crecieron en medio de sales minerales a pH 7, para bacterias.

En la tabla 10 y figura 13 se observa el porcentaje de biodegradación a las dos temperaturas (25 °C, 35 °C) y a los dos pH (5.0, 7.0), obteniendo como porcentaje de biodegradación para las temperatura de 25 °C y 35 °C a un pH 5.0 los valores de 4.5 % y 8.7%; para las temperaturas de 25°C y 35°C a un pH 7.0 los valores de 21.7% y 27.3% respectivamente.

Tabla 10

Porcentaje de biodegradación

Medio de cultivo	T°	pH	\bar{X}_{PI}	\bar{X}_{PF}	%
CNMM	25	5.0	0.022	0.021	4.5%
		7.0	0.023	0.018	21.7%
	35	5.0	0.023	0.021	8.7%
		7.0	0.022	0.016	27.3%

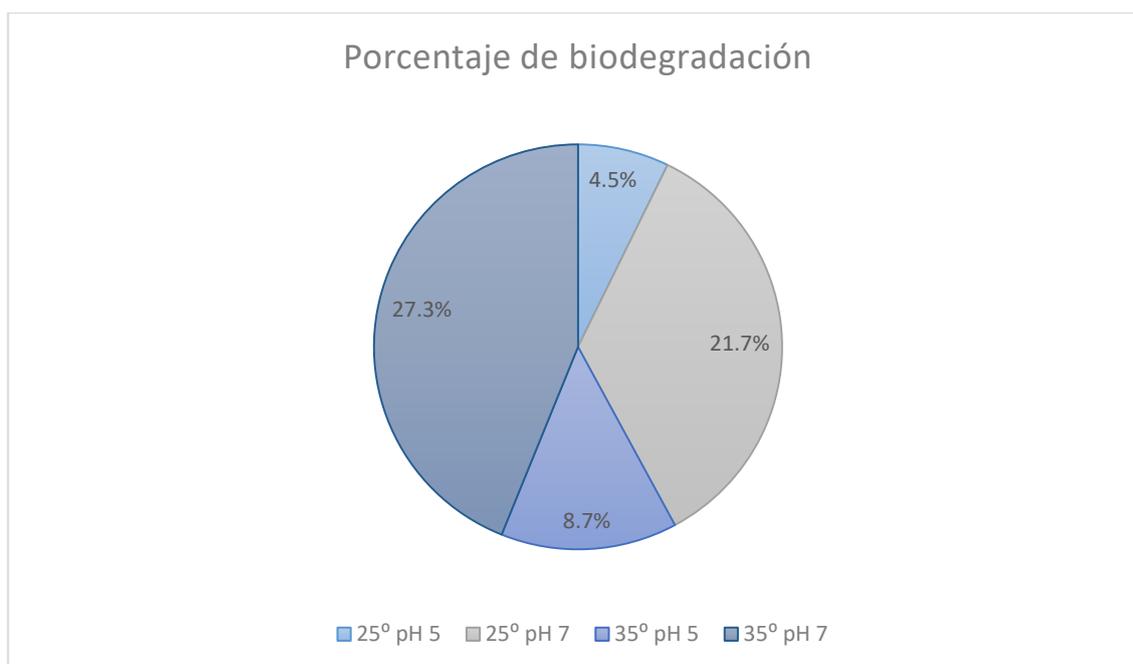


Figura 13. Porcentaje de biodegradación del PEBD

Esto debido a que la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* crece en un rango de temperatura de 10 y 42°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 35-37°C (Ren *et al.*, 2018), con una actividad biodegradativa superior a un pH neutro, a pH extremadamente alcalinos o extremadamente ácidos la biodegradación se hace lenta. El rango óptimo para la biodegradación está entre 6–8 pH. Sin embargo, para mantener una mejor capacidad degradante, por periodos de tiempo prolongados, el pH debe ser neutro, entre 7.4–7.8 (Romero *et al.*, 2008). Jailawi, Ameen & Saraf, (2015) algunas condiciones óptimas para la degradación del polietileno van en relación de la temperatura y del pH ya que se encontró que *P. putida* S3A tuvo un crecimiento en medio de sal mineral (pH 6.5) e incubado a 37°C.

La biodegradabilidad o biodegradación es un proceso metabólico y enzimático realizado por los microorganismos como bacterias y algunos hongos, los cuales secretan enzimas que se encargan de romper la estructura molecular del plástico reduciéndolo (degradando) en su peso a través del tiempo (Tokiwa, 2009). Los resultados obtenidos concuerdan con Kumari, Aanad & Narula (2009) obtuvo un 21% de degradación a 30°C en 4 semanas por *Pseudomonas aeruginosa*. Begum, Varalakshmi & Umamageswari (2015) Se encontró que *Pseudomonas alcaligenes* con un 20.1% a los 30 días a 37 °C. Hadad, Geresh, & Sivan (2005) demostraron que *Brevibaccillus borstelensis* en 30 días, 50°C redujo sus pesos gravimétricos en 30%.

Para lograr un porcentaje de biodegradación mayor sería necesario realizar el proceso en un tiempo más prolongado y a una mayor temperatura, esto lo corrobora Nanda *et al.* (2010) estableció que *Pseudomonas* logró una biodegradabilidad del 40.5% en 8 semanas a 40°C. Nanda, Sahu, & Abraham (2010) menciona que *Pseudomonas sp.* del vertedero de lodos degrada el polietileno de manera eficiente con 46.2%, *Pseudomonas sp.* del basurero del hogar 31.4%. y *Pseudomonas sp.* aislado del sitio de drenaje de efluentes textiles dio una biodegradabilidad intermedia de 39.7% en 8 semanas a 40 °C. Rajandas *et al.* (2012) que *P. aeruginosa* se degradó 50.5% en 2 meses. Estos resultados difieren de Nanda & Sahu (2010) el porcentaje de degradación de *Pseudomonas* fue del 40.5% en 3 semanas a 40 °C, estos resultados se debieron a que las cepas fueron previamente adaptadas.

Resultados cualitativos de la biodegradación del (PEBD)

Se utilizó el caldo nutritivo con medio mineral (CNMM) + PEBD y después de 30 días de incubación se pudo observar el desarrollo de las colonias y una biopelícula formada en la superficie por debajo y encima del PEBD, como se muestra en las figuras. Después del tiempo del proceso de biodegradación se observó que *Pseudomonas aeruginosa* presenta una invasión masiva, demostrando un ataque bacteriano por encima y debajo del polietileno de baja densidad, formando una biopelícula gruesa con aspecto gelatinoso demostrando así la gran capacidad que tienen para adherirse al material plástico y su acción degradante, la evaluación realizada en esta prueba confirma cambios visibles en el polietileno, lo cual demuestra un proceso metabólico de biodegradación.

En las figuras 14 y 15 podemos observar la formación de biofilm formada en la superficie por debajo, laterales y encima del PEBD, existiendo una mayor biopelícula para las temperaturas de 25°C y 35°C a un pH de 7.0 (B, D).

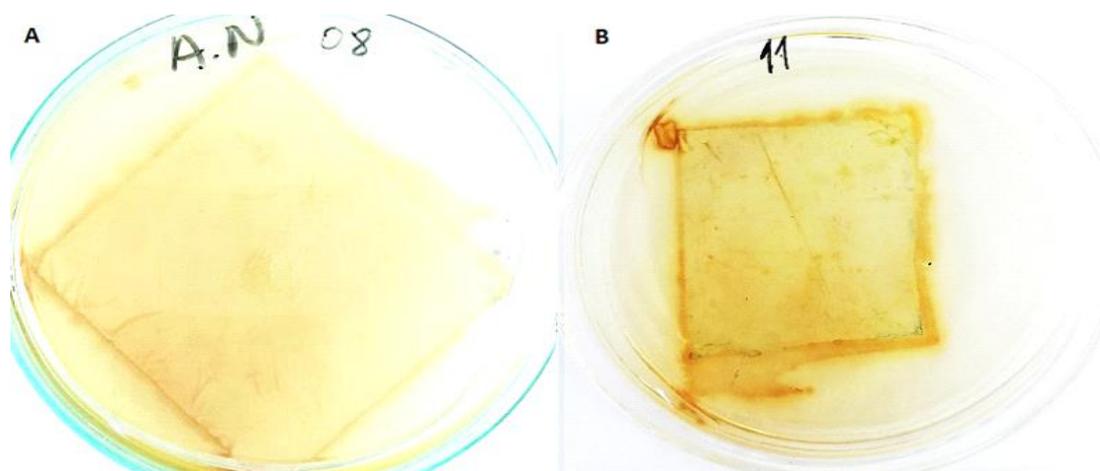


Figura 14. Resultados cualitativos después de los 30 días a T° de 25°C, pH de 5.0 y 7.0

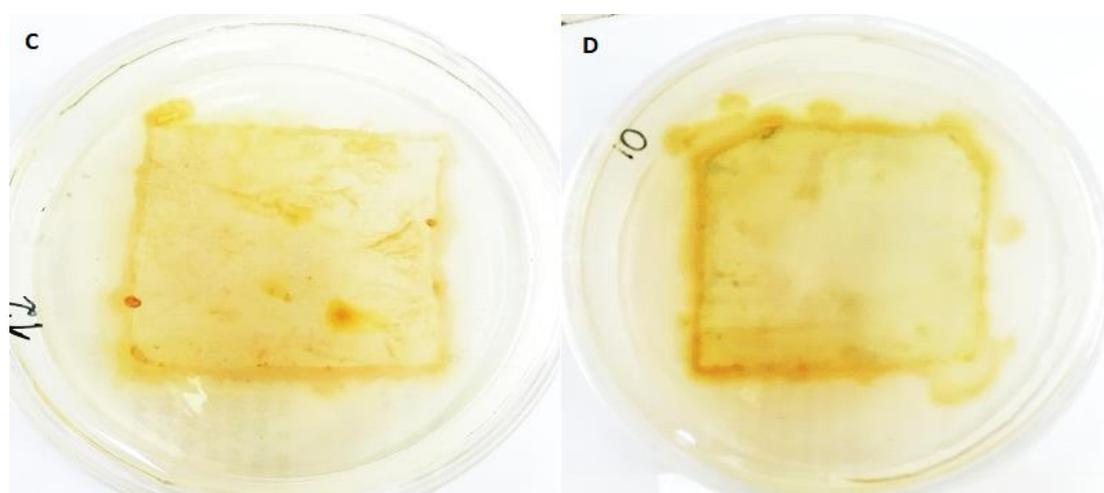


Figura 15. Resultados cualitativos después de los 30 días a T° de 35°C, pH de 5.0 y 7.0

La prueba cualitativa confirma los cambios visibles en el polietileno de baja densidad, los efectos utilizados para describir la biodegradación incluyen corrosión de la superficie, la formación de agujeros y grietas, la fragmentación e inclusive la decoloración así como la formación de biopelículas o biofilms en la superficie; estos cambios demuestran un proceso metabólico de biodegradación, el parámetro de cambios en la observación puede ser utilizado como un primer indicador de ataque bacteriano, este método también puede ser utilizado para obtener resultados cualitativos (Ishigaki *et al.*, 2000); la formación de películas sobre el plástico es un indicador de degradación como indica Uribe *et al.* (2010).

La figura 16 muestra los cambios superficiales del PEBD observados con un microscopio compuesto en la que se puede ver la presencia de grietas y fisuras (B) a diferencia de la muestra control (A) que no presenta cambios superficiales

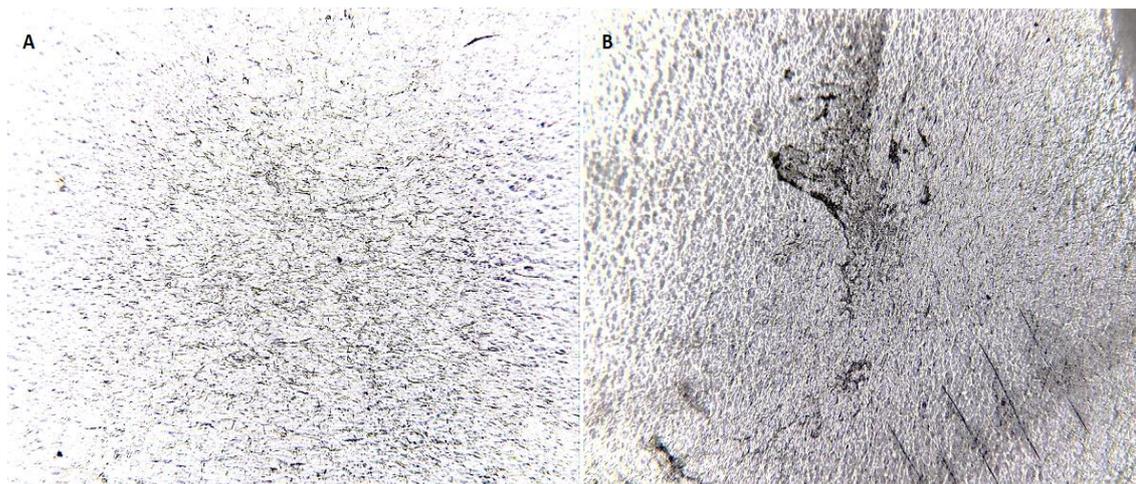


Figura 16. Cambios superficiales en el PEBD

Para evidenciar con más claridad estos cambios es necesario el uso del microscopio electrónico de barrido como lo menciona Bhatia *et al.* (2014) las micrografías SEM del LDPE no degradado como control demostraron una morfología de superficie lisa y después de 4 días de incubación la película de LDPE reveló las áreas desgastadas con grietas distribuidas al azar y las fisuras demostraron la alteración de la textura superficial de película de LDPE.

Anwar *et al.* (2013) reporta que los cambios morfológicos se evidenciaron con la micrografía SEM que reveló algunas estructuras arrugadas en forma diagonal con fisuras ensanchadas, lo que condujo a la formación de cavidades con arrugas y áreas globulares blancas, por lo tanto, las observaciones sugirieron el considerable deterioro superficial del polímero.

Dado que la biodegradación y la utilización de polietileno es un proceso lento, requiere que la biopelícula esté activa durante un período de tiempo. La figura 17 evidencia el número de organismos vivos en el PEBD que se observan como manchas amarillo verdosas (B) en comparación con el PEBD control (A), donde no se observa crecimiento bacteriano.

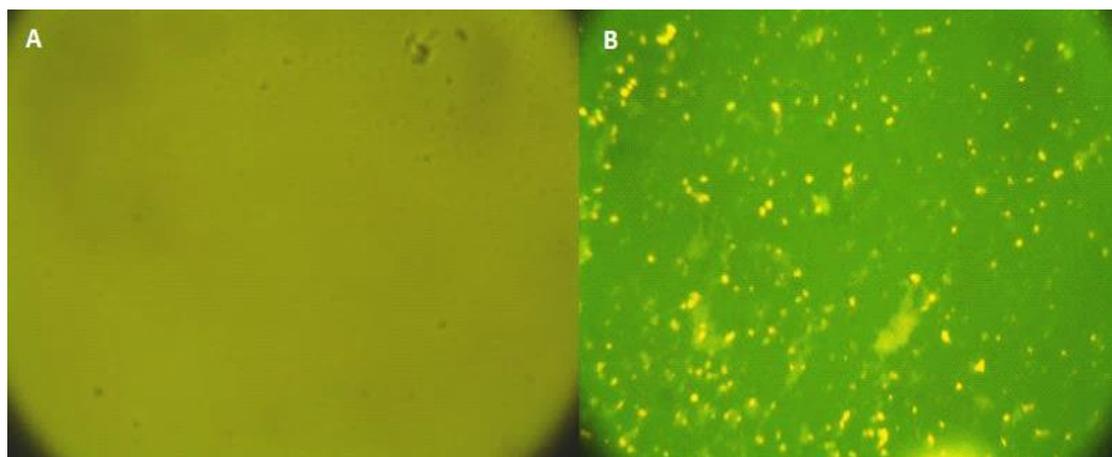


Figura 17. Viabilidad de la formación del biofilm (biopelícula) bacteriano

Así lo afirma Tribedi, Gupta & Sil (2015) que para verificar la actividad metabólica de la biopelícula en la superficie de polietileno se utiliza el microscopio de fluorescencia para evidenciar la viabilidad de células en la superficie de LDPE realizando tinción con dos fluorocromos (bromuro de etidio y naranja acridina), la naranja de acridina tiñó tanto a las células muertas como a las células viables, mientras que el bromuro de etidio tiñó selectivamente las células muertas. Otro estudio realizado por Yang *et al.* (2014) confirmó la viabilidad de las células bacterianas en la película de PE utilizando un microscopio fluorescente después de la tinción con el kit de viabilidad bacteriana LIVE / DEAD BacLight donde observo las células vivas (verde). Tribedi & Sil (2013) indican que los resultados evidencian la adherencia de *Pseudomonas sp.* a la superficie de LDPE en diferentes puntos de tiempo mediante la tinción de bacterias con fluorocromos (naranja de acridina) y observado bajo un microscopio de fluorescencia.

CONCLUSIONES

- La bacteria aislada del botadero de Cancharani se identificó como *Pseudomonas aeruginosa*, la cual tiene capacidad de biodegradación frente al polietileno de baja densidad.
- El proceso de adaptación de la cepa identificada como *Pseudomonas aeruginosa* es una alternativa para potenciar la capacidad y actividad biodegradativa.
- Según las condiciones de temperatura y pH, *Pseudomonas aeruginosa* es un buen biodegradador de polietileno a temperaturas de 25 y 35°C a un pH de 7.0 formando biopelícula gruesa con aspecto gelatinoso y tiene capacidad para adherirse al polietileno de baja densidad.

RECOMENDACIONES

- Utilizar pretratamientos físicos y químicos que favorezca la oxidación y ruptura de cadenas poliméricas del polietileno de baja densidad para facilitar el ataque bacteriano.
- Determinar las enzimas que participan en la biodegradación de muestras de polietileno de baja densidad con otras técnicas.
- Optimizar el tiempo de incubación a más de un mes para alcanzar un porcentaje de biodegradación más elevado.
- Seguir investigando a otras bacterias que forman biopelículas, para formar consorcios y potenciar su capacidad de biodegradación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullahi, M., & Saidu, B. T. (2013). Biodegradation of polythene and plastic using fadama soil Amended with organic and inorganic fertilizer. *Indian journal of scientific research*, 4(1), 17-25.
- Acuña, R. (2017). *Revisión Bibliográfica sobre los Microorganismos Biodegradadores de Polietileno de Baja Densidad LDPE y sus Efectos en el Material*. (Tesis pregrado). Universidad Distrital Francisco José Galdas, Bogotá, DC
- Agamuthu, P., & Faizura, P. (2005). Biodegradability of degradable plastic waste. *Waste management & research*, 23(2), 95-100.
- Aguirre, R. (2015). Análisis espectral del Lago de Guadalupe mediante imágenes de satélite y datos in situ. *Investigaciones geográficas*, 15-24.
- Anderson, C., Johnson, T., Case, C., Cappuccino, J., & Sherman, N. (2013). *Great adventures in the microbiology laboratory* (8th ed). Pearson Custom Publishing. 2015May: 175–176
- Anwar, M., Negi, H., Zaidi, M., Haider, G., Gupta, S., & Goel, R. (2013). Biodeterioration studies of thermoplastics in nature using indigenous bacterial consortium. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 475-484.
- Apiplast. (2012) Asociación peruana de la industria del plástico, *Situación de la industria plástica en el Perú*, Lima – Perú.
- Arenas, L. (2018). *Aislamiento y caracterización molecular 16S rRNA de cepas bacterianas con capacidad de biodegradación de PEAD (polietileno de alta*

- densidad) micro contaminante en aguas sintéticas a escala laboratorio.* (Tesis pregrado) Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú
- Barbarán, H., Cabanillas, J., Rubio, E. (2018). *Biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por acción de Pseudomona aeruginosa, en condiciones de laboratorio.* (Tesis pregrado). Universidad César Vallejo, Lima, Perú
- Beltrán M., Marcilla A. (2012). *Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades.* Editorial: Universidad de Alicante, 2012 - 276.
- Begum, M., Varalakshmi, B., & Umamageswari, K. (2015). Biodegradation of polythene bag using bacteria isolated from soil. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 4(11), 674-680.
- Bhatia, M., Girdhar, A., Tiwari, A., & Nayarisseri, A. (2014). Implications of a novel *Pseudomonas* species on low density polyethylene biodegradation: an in vitro to in silico approach. *SpringerPlus*, 3(1), 497.
- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A. M., Lemaire, J., Sancelme, M., & Scott, G. (2003). Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 81(3), 441-452.
- Cáceres, O. (2012). *Biodegradación bacteriana de polietileno de baja densidad bajo condiciones controladas en biorreactores AIR LIF.* (Tesis pregrado). Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú
- Cava, F., Hidalgo, A., & Berenguer, J. (2009). *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles*, 13(2), 213.
- Cava, F., De Pedro, M., Lam, H., Davis, B., & Waldor, M. (2011). Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *The EMBO journal*, 30(16), 3442-3453.
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M., & Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(2), 728-737.

- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental science & technology*, 47(12), 6646-6655.
- Das, M., & Kumar, S. (2013). Influence of cell surface hydrophobicity in colonization and biofilm formation on LDPE biodegradation. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5, 690-694.
- Das, G., Bordoloi, N., Rai, S., Mukherjee, A., & Karak, N. (2012). Biodegradable and biocompatible epoxidized vegetable oil modified thermostable poly (vinyl chloride): Thermal and performance characteristics post biodegradation with *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. *Journal of hazardous materials*, 209, 434-442.
- Devi, R., Ramya, R., Kannan, K., Antony, A., & Kannan, V. (2019). Investigation of biodegradation potentials of high density polyethylene degrading marine bacteria isolated from the coastal regions of Tamil Nadu, India. *Marine pollution bulletin*, 138, 549-560.
- Digesa. (2013). Disponible: digesa.minsa.gob.pe
- Doi, Y., Kumagai, Y., Tanahashi, N., & Mukai, K. (1992). Structural effects on the biodegradation of microbial and synthetic Poly (hydroxyalkanoates). *Special Publication-Royal Society of Chemistry*, 109, 139-139.
- Doyle, A. (1999). *Guidelines for the Establishment and Operation of Collections Cultures of Microorganisms*. (2nd edition). USD Edition.
- ECOEMBES. (2017) Universidad Politécnica de Madrid. *Informe de biodegradabilidad teórica de envases plásticos*. Madrid, pág. 10 - 62. Descripción física: https://www.ecoembes.com/sites/default/files/archivos_estudios_idi/proyecto_bioplasticos_resumen_ejecutivo.pdf.
- Ecomundo (2016). *Espacio de comunicación sobre el medio ambiente y desarrollo sostenible a nivel nacional e internacional*. Retrieved from [http://www.revistaecomundo.com/edu.mx/online/619-albores,micotoxinas .pdf](http://www.revistaecomundo.com/edu.mx/online/619-albores,micotoxinas.pdf)
- Engler, R. (2012). The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. *Environmental science & technology*, 46(22), 12302-12315.

- Fontanella, S., Bonhomme, S., Brusson, J. M., Pitteri, S., Samuel, G., Pichon, G. & Delort, A. (2013). Comparison of biodegradability of various polypropylene films containing pro-oxidant additives based on Mn, Mn/Fe or Co. *Polymer degradation and stability*, 98(4), 875-884.
- Fried, J. (2014). *Polymer science and technology*. Editorial: Prentice Hall.
- Gaggino, R. (2008). Ladrillos y placas prefabricadas con plásticos reciclados aptos para la autoconstrucción. *Revista Invi*, 23(63).
- Gajendiran, A., Krishnamoorthy, S., & Abraham, J. (2016). Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *3 Biotech*, 6(1), 52Gil, M 2019. Cetrimida agar. Disponible en: lifeder.com
- Gilan, I., Hadar, Y., & Sivan, A. (2004). Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(1), 97-104.
- González, V. (2019). *Capacidad biodegradativa de hongos filamentosos frente al polietileno*. (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú
- Greenpeace. (2011) Plásticos en los océanos. Datos, comparativas e impactos. Dossier de prensa. España. Disponible en: greenpeace.org.
- Gupta, K., Devi, D., & Rana, D. (2016). Isolation and screening of low density polyethylene (LDPE) degrading bacterial strains from waste disposal sites. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(11), 1633-1643.
- Gutiérrez, G. (2013). *Biodegradación de polietileno de baja densidad por consorcios microbianos*. (Tesis licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Gutiérrez, Y. (2018). *Influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria Pseudomona aeruginosa en Huancayo*. (Tesis pregrado). Universidad Continental, Huancayo, Perú

- Hadad, D., Geresh, S., & Sivan, A. (2005). Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of applied microbiology*, 98(5), 1093-1100.
- Harshvardhan, K., & Jha, B. (2013). Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1-2), 100-106.
- Huerta E. (2018). El plástico y su impacto ambiental. El comercio. Lima: <https://elcomercio.pe/tecnologia/ciencias/contaminacion-plastico-impacto-salud-noticia-541460>
- Hunter-Cevera, C., & Belt, A. (1996). *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. Elsevier.
- Hussein, A., Al-Mayaly, I., & Khudeir, S. (2015). Isolation, Screening and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) degrading bacteria from contaminated soil with plastic wastes. *Mesopotamia Environ. J*, 1(4), 1-14.
- Iakimov, M., Rogozhin, I., Kal'deron, E., Matveeva, L., Karavaítseva, G., Bezborodov, A., & Rogaev, E. (1994). Tn5-mutagenesis of the styrene-degrading strain *Pseudomonas* sp. Y2. Analysis of transformation products and DNA-scopy of the mutants obtained. *Prikladnaia biokhimiiai mikrobiologiia*, 30(1), 55-63.
- Ishigaki, T., Sugano, W., Ike, M., & Fujita, M. (2000). Enzymatic degradation of cellulose acetate plastic by novel degrading bacterium *Bacillus* sp. S2055. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(4), 400-405.
- Ivleva, N., Wiesheu, A., & Niessner, R. (2017). Microplastic in aquatic ecosystems. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(7), 1720-1739.
- Jailawi, M., Ameen, R., & Saraf, A. (2015). Polyethylene degradation by *Pseudomonas putida* S3A. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 2(1), 90-97.
- Kannahi, M., & Sudha, P. (2013). Screening of polythene and plastic degrading microbes from Muthupet mangrove soil. *J Chem Pharm Res*, 5(8), 122-127.
- Kirsop, B. (1999). *The stability of industrial organisms*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Edition, London, 100-106

- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.
- Koutny, M., Amato, P., Muchova, M., Ruzicka, J., & Delort, A. (2009). Soil bacterial strains able to grow on the surface of oxidized polyethylene film containing prooxidant additives. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(3), 354-357.
- Kumari, K., Aanad, R., & Narula, N. (2009). Microbial degradation of polyethylene (PE). *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 27(1), 66-70.
- Kyaw, B., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M., Lim, C., & Sakharkar, K. (2012). Biodegradation of low density polythene (LDPE) by *Pseudomonas* species. *Indian journal of microbiology*, 52(3), 411-419.
- Laboratorios Britania S.A. (2019). Caldo nutritivo. Disponible en: britanialab.com
- Laboratorios Linsan. (2009). Manual microdiagnóstica tercera parte toma de muestras, medios de transporte, medios de cultivo, y pruebas diferenciales. Disponible en: lablinsan.cl
- Lee, B., Pometto, A., Fratzke, A., & Bailey, T. (1991). Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(3), 678-685.
- Ley N° 30884-Poder legislativo (2017). *Ley que regula el plástico de un solo uso y los recipientes o envases descartables*. EL PERUANO *Diario oficial del Bicentenario*.
- Limón, M. (2001). *Biodegradación de polietileno de baja densidad por hongos filamentosos*. (Tesis maestría) Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Martín, K. (2012). *Bioprospección de la degradación del polietileno* (Tesis licenciatura). Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia
- Méndez, C., Vergaray, G., Béjar, V., & Cárdenas, K. (2007). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Peruana de Biología*, 13(3), 203-206.

- Mesquita, C., Soares-Castro, P., & Santos, P. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, 1, 650-665.
- MINAM. (2013). Disponible: minam.gob.pe
- Montazer, Z., Habibi Najafi, M., & Levin, D. (2018). Microbial degradation of low-density polyethylene and synthesis of polyhydroxyalkanoate polymers. *Canadian journal of microbiology*, 65(3), 224-234.
- Muhonja, C., Makonde, H., Magoma, G., & Imbuga, M. (2018). Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. *PLoS one*, 13(7), e0198446.
- Mumtaz, T., ParvinNur, H., & Khan, M. (2006). Susceptibility of low density polyethylene films to pond water microflora. *Bangladesh J. Bot*, 35(1), 31-37.
- Municipalidad Provincial de Puno (2019). Estudio de caracterización de residuos sólidos municipales del distrito de Puno-2019. Disponible: munipuno.gob.pe
- Nanda, S., Sahu, S., & Abraham, J. (2010). Studies on the biodegradation of natural and synthetic polyethylene by *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 14(2).
- Nanda, S., & Sahu, S. (2010). Biodegradability of polyethylene by *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, and *Rhodococcus* spp. *New York Science Journal*, 3(7), 95-98.
- Ortiz, M., Gerónimo, A., Cuevas, F., Pérez, L., & Coria, R. (2004). Caracterización, por RAPD-PCR, de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *salud pública de méxico*, 46(2), 149-157.
- Paço, A., Duarte, K., da Costa, P., Santos, S., Pereira, R., Pereira, E., & Rocha-Santos, T. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Science of the Total Environment*, 586, 10-15.
- Palleroni, N., Ballard, R., Ralston, E., & Doudoroff, M. (1972). Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology*, 110 (1), 1-11.

- Pastor, C., & Agulló, D. (2019). Presencia de microplásticos en aguas y su potencial impacto en la salud pública. *Rev Esp Salud Pública*, 93(28), 10.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M., & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1132-1147.
- Pérez, S., & Alania, Y. (2017). *Efecto de la temperatura en el crecimiento de dos cepas ATCC de Pseudomonas sp. expuestas a polipropileno*. (Tesis pregrado). Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.
- Plastics Europe (2010). Platform. Plastics Europe. Recuperado el día 10 de agosto de 2011 en http://www.plasticseurope.org/Documents/Document/20100226115604-Full_Spain.pdf
- Pramila, R., Padmavathy, K., Ramesh, K., & Mahalakshmi, K. (2012). *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas citronellolis*-Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE). *African Journal of Bacteriology Research*, 4(1), 9-14.
- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2004). *Microbiología*. (5ta ed.). Madrid, España: McGraw-Hill.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D. (2008). *Microbiología*. (5ta ed.). México: McGraw-Hill.
- Quispe, N. (2017). *Ficha estándar de familia del catálogo de bienes, servicios y obras del MEF*. Lima, Perú: Oficina General de tecnologías de la información del Ministerio de Economía y finanzas-Catalogación 2017.
- Rajandas, H., Parimannan, S., Sathasivam, K., Ravichandran, M., & Yin, L. (2012). A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. *Polymer Testing*, 31(8), 1094-1099.
- Ren, J., Lin, W., Shen, Y., Wang, J., Luo, X., & Xie, M. (2018). Optimization of fermentation media for nitrite oxidizing bacteria using sequential statistical design. *Bioresource Technology*, 99(17), 7923-7.
- Revelles, O., Espinosa U., Fuhrer, T., Sauer, U., & Ramos, J. (2005). Multiple and interconnected pathways for L-lysine catabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of bacteriology*, 187(21), 7500-7510.

- Rivera, H., Gándara, M., & Ortigoza, P. (2015). Bacterias hidrocarbonoclásticas biodegradantes de poliestireno expandido. *Foresta Veracruzana*, 17(2), 21-28.
- Romero, G., Bustos, G., Marín, H., Rodríguez, H., Casallas, L., & Vargas, M. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, 6(9), 76-84.
- Ruíz, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona, Departamento de Patología y Terapéutica experimental, Facultad de Medicina, Barcelona.
- Sáenz, V. (2008). Contribución al estudio de la degradación ambiental de poliolefinas fotoestabilizadas. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Sangale, M., Shahnawaz, M., & Ade, A. (2012). A review on biodegradation of polythene: the microbial approach. *J Bioremed Biodeg*, 3(10), 1-9.
- Sarria-Villa, R., & Gallo-Corredor, J. (2016). La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos. *Journal de Ciencia e Ingeniería*, 8(1), 21-27.
- Seymour, R. (1989). Polymer science before and after 1899: notable developments during the lifetime of Maurits Dekker. *Journal of Macromolecular Science—Chemistry*, 26(8), 1023-1032.
- Sharma, A., & Sharma, A. (2004). Degradation assessment of low density polythene (LDP) and polythene (PP) by an indigenous isolate of *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 293-296
- Shahnawaz, M., Sangale, M., & Ade, A. (2019). Analysis of the Plastic Degradation Products. In *Bioremediation Technology for Plastic Waste* (pp. 93-101). Springer, Singapore.
- Shalini, R., & Sasikumar, C. (2015). Biodegradation of Low Density Polythene Materials Using Microbial Consortium—An Overview. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4(4), 507-514.

- Singh, J., Gupta, K., & Shrivastava, A. (2015). Isolation and identification of low density polyethylene (LDPE) degrading bacterial strains from polythene polluted sites around GWALIOR CITY (M.P.). *Journal of Global Biosciences*, 4(8), 3220-3228
- Skariyachan, S., Megha, M., Kini, M., Mukund, K., Rizvi, A., & Vasist, K. (2015). Selection and screening of microbial consortia for efficient and ecofriendly degradation of plastic garbage collected from urban and rural areas of Bangalore, India. *Environmental monitoring and assessment*, 187(1), 4174.
- Spontón, M., Casis, N., Mazo, P., Raud, B., Simonetta, A., Ríos, L., & Estenoz, D. (2013). Biodegradation study by *Pseudomonas* sp. of flexible polyurethane foams derived from castor oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 85-94.
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*, 58(9), 1133-1148.
- Sudhakar, M., Doble, M., Murthy, P., & Venkatesan, R. (2008). Marine microbe-mediated biodegradation of low-and high-density polyethylenes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(3), 203-213.
- Téllez, A. (2012). *La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia.
- Thompson, R., Olsen, Y., Mitchell, R., Davis, A., Rowland, S., John, A., & Russell, A. (2004). Lost at sea: where is all the plastic?. *Science*, 304(5672), 838-838.
- Tokiwa, Y., Calabia, B., Ugwu, C., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of plastics. *International journal of molecular sciences*, 10(9), 3722-3742.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (9a edición). Argentina. Editorial: Médica Panamericana. 988
- Tribedi, P., & Sil, A. (2013). Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(6), 4146-4153.
- Tribedi, P., Gupta, A., & Sil, A. (2015). Adaptation of *Pseudomonas* sp. AKS2 in biofilm on low-density polyethylene surface: an effective strategy for efficient survival and polymer degradation. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 14.

- Uribe, D., Giraldo, S. y Fernando, M. (2010). Biodegradación de polietileno por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Rev. Perú Biol Laboratorio de Microbiología y Biotecnología microbiana*. 17(1), 133-136.
- Usha, R., Sangeetha, T., & Palaniswamy, M. (2011). Screening of polyethylene degrading microorganisms from garbage soil. *Libyan Agric Res Cent J Int*, 2(4), 200-4.
- Vázquez, C., Martín, A., de Silóniz, I., & Serrano, S. (2011). Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. *Reduca (Biología)*, 3(5).
- Vieyra, H. (2009). *Elaboración de polímeros biodegradables polietileno - almidón y estudios de biodegradabilidad*. (Tesis maestría). Instituto Politécnico Nacional Unidad Legaria, México.
- Volke, T. (2015). *Efecto de tratamientos fisicoquímicos y cometabolismo en la degradación de polietileno de baja densidad por hongos filamentosos*. (Tesis doctoral inédita). Universidad Autónoma Metropolitana - División de ciencias biológicas y de la Salud, México.
- Wilkes, R., & Aristilde, L. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *Journal of applied microbiology*, 123(3), 582-593.
- Wu, T., Jahan, S., Zhang, Y., Zhang, J., Elmounayri, H., & Tovar, A. (2017). Design optimization of plastic injection tooling for additive manufacturing. *Procedia Manufacturing*, 10, 923-934.
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W., Zhao, J., & Jiang, L. (2014). Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental science & technology*, 48(23), 13776-13784.



ANEXOS

Anexo 1. Panel fotográfico



Figura 18. Toma de muestra

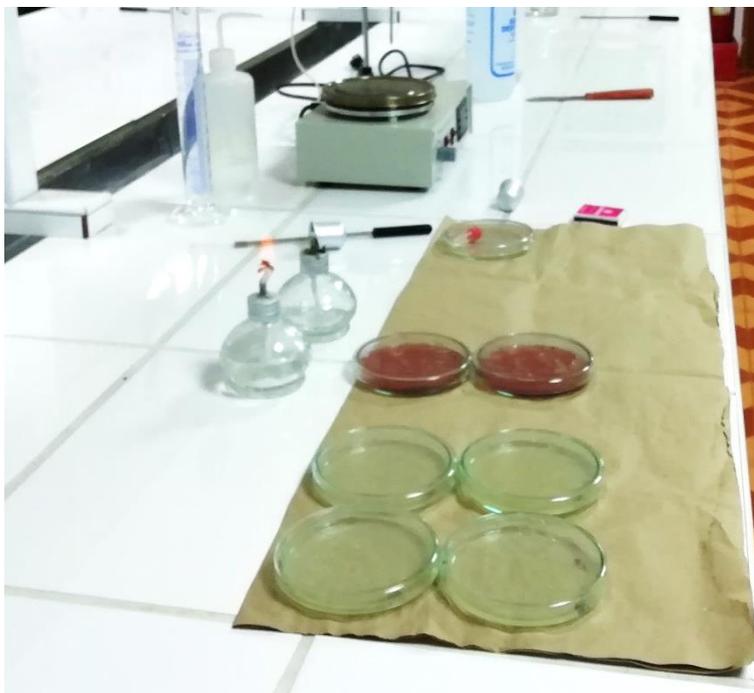


Figura 19. Preparación de medios de cultivo

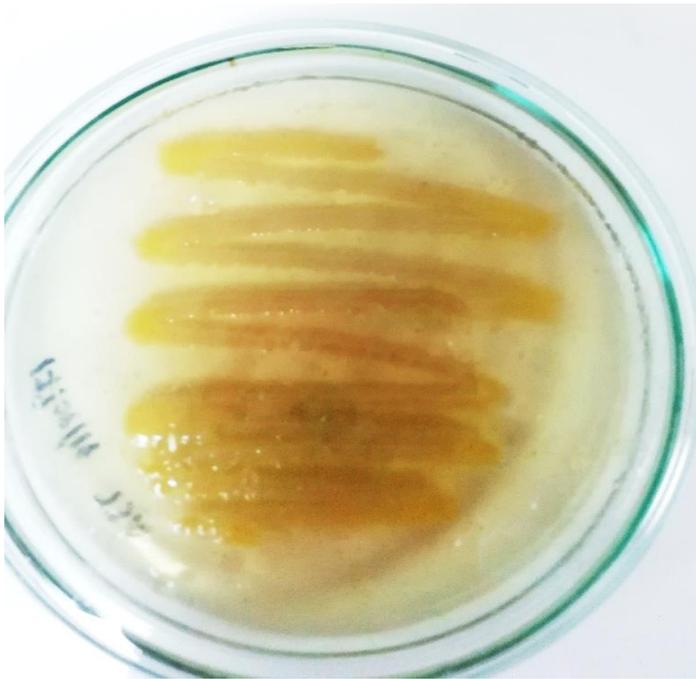


Figura 20. Crecimiento de la cepa en agar nutritivo después de la adaptación



Figura 21. Lavado de muestras con etanol en cabina de flujo laminar



Figura 22. Colorante Rodamina B



Figura 23. Medio mineral

Anexo 2. Confirmación y validación de la cepa

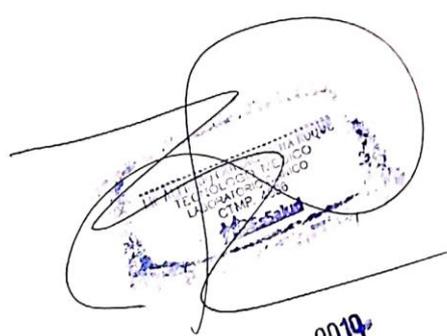
Informe de microbiología

HOSPITAL III PUNO ESSALUD

SERVICIO PATOLOGÍA CLÍNICA				ÁREA DE MICROBIOLOGÍA	
Nombre	BUTRON PINAZO, SANDRA B...	Muestra	2210201900001	Estado	Final
ID del paciente	B437-00002245	Origen	CEPA	Fecha Esta...	25/10/2019
Fecha de naci...		Servicio ais	PARTICULAR	F. muestra	22/10/2019
Méd resp				Méd sol	

CULTIVO POSITIVO		Estado:	Final	25/10/2019
1	Pseudomonas aeruginosa			

1 P. aeruginosa	
<u>Antimicrobiano</u>	<u>CIM Interps</u>
Amicacina	<=16 S
Aztreonam	8 IB
Cefepima	4 S
Ceftazidima	4 IB
Ciprofloxacina	<=1 S
Colistina	<=2 S
Gentamicina	<=4 S
Imipenem	8 R
Levofloxacina	<=2 S
Meropenem	8 R
Norfloxacina	<=4
Pip/Tazo	<=16 IB
Tobramicina	<=4 S



S = Sensible N/R = No Informado Blanco = Dato no disponible o antimicrobiano no probado
 I = Intermedio — = No probado ESBL = Betalactamasa de amplio espectro
 R = Resistente POS = Positivo Blac = Betalactamasa positiva
 MIC = mcg/ml (mg/L) NEG = Negativo TFG = Cepa tímidin dependiente

S* = Interpretación predictiva sensible
 R* = Interpretación predictiva resistente
 EBL? = Posible ESBL. Se precisan pruebas para confirmar ESBL frente a otras beta-lactamasas
 IB = Beta-lactamasa inducible. Aparece en lugar de Sensible en especies portadoras de beta-lactamasas inducibles. pueden ser potencialmente resistentes a todos los antibióticos beta-lactámicos. Se recomienda monitorizar los pacientes durante/después de la terapia. Utilizar otro/ combinado con antibióticos beta-lactámicos

^ = Interpretación informada modificada

Para aislamientos de LCR y sangre se recomienda una prueba de betalactamasa para las especies de enterococo					
Nombre	BUTRON PINAZO, SANDRA B...	Muestra	2210201900001	Estado	Final
ID del paciente	B437-00002245	Origen	CEPA	Fecha Esta...	25/10/2019
Fecha de naci...		Planta/Hab	/	F. muestra	22/10/2019