



Universidad  
Continental

FACULTAD DE INGENIERÍA

Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental

**Influencia de factores ambientales de  
crecimiento microbiano en la degradación  
de polietileno de baja densidad por la  
bacteria *pseudomona aeruginosa*  
en Huancayo**

**Karem Yemina Rebeca Gutierrez Taipe**

Huancayo, 2018

Tesis para optar el Título Profesional de  
Ingeniero Ambiental



Repositorio Institucional Continental  
Tesis digital



Obra protegida bajo la licencia de [Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 2.5 Perú](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/peru/)

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Corporación Continental por inculcarme el interés en los estudios de investigación científica y brindarme las facilidades de uso de recursos, reactivos y equipos para el proceso experimental de la presente investigación.

Un agradecimiento singular, a la Mg. Verónica Canales Guerra que me ha orientado, apoyado y corregido en el desarrollo de esta tesis y a la Ing. Elizabeth Oré quien supo motivarme para la finalización del presente proyecto y al Blgo. Jorge Eduardo Cordero Azabache (QEVF), quien me apoyó en mi labor científica con paciencia y dedicación.

A Dios, quien es mi fortaleza en todo momento, a mis padres y hermano que son la motivación para superarme cada día y a todas las personas que incondicionalmente me apoyaron para la realización de este objetivo importante en mi vida.

A Dios, a mis padres y hermano, quienes son los pilares para mi superación y me han apoyado incondicionalmente para poder llevar a cabo mis objetivos y metas en la vida.

Karem

# ÍNDICE

Portada.....	i
Agradecimientos.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Índice.....	iv
Lista de tablas.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Lista de fotografías.....	viii
Resumen.....	x
Abstrac.....	xi
Introducción.....	xii
<b>Capítulo I Planteamiento del Estudio.....</b>	<b>14</b>
1.1. Planteamiento del problema.....	14
1.2. Formulación del problema.....	16
1.3. Objetivos.....	18
1.3.1. Objetivo general.....	18
1.3.2. Objetivos específicos.....	18
1.4. Hipótesis y descripción de variables.....	19
1.4.1. Hipótesis.....	19
1.4.2. Descripción de variables.....	20
1.5. Justificación e importancia.....	21
1.5.1. Justificación teórica.....	21
1.5.2. Justificación práctica.....	22
1.5.3. Justificación metodológica.....	25
<b>Capítulo II Marco Teórico.....</b>	<b>28</b>
2.1. Antecedentes del problema.....	28
2.1.1. Antecedentes internacionales.....	28
2.1.2. Antecedentes nacionales.....	48
2.2. Bases teóricas.....	52
2.2.1. Factores ambientales de crecimiento microbiano.....	52
2.2.2. Factores ambientales abióticos.....	53
2.2.3. Degradación.....	62
2.2.4. Biodegradación.....	63
2.2.4.1. Fundamento bioquímico de la biodegradación.....	64
2.2.5. Polietileno.....	67
2.2.5.1. Factores que inciden en la degradación de los polietilenos..	70

2.2.5.2. Reacciones involucradas en la degradación.....	72
2.2.6. Bacteria.....	73
2.2.6.1. Definición.....	73
2.2.6.2. Biología.....	74
2.2.6.3. Taxonomía.....	75
2.2.7. Género pseudomona.....	76
2.2.7.1. Descripción general.....	77
2.2.8. Biodegradación de polietileno por la bacteria pseudomona.....	86
2.2.8.1. Definición.....	86
2.3. Definición de términos básicos.....	86
<b>Capítulo III Metodología.....</b>	<b>89</b>
3.1. Método y alcance de la investigación.....	89
3.1.1. Método general de investigación.....	89
3.1.2. Método específico.....	89
3.1.3. Tipo de investigación.....	90
3.1.4. Nivel de la investigación.....	90
3.2. Diseño de la investigación.....	90
3.3. Población y muestra.....	91
3.4. Diseño muestral.....	91
3.5. Variables de investigación.....	96
3.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	96
3.6.1. Técnicas.....	96
3.6.2. Instrumentos.....	98
<b>Capítulo IV Resultados y Discusión.....</b>	<b>103</b>
4.1. Resultado del tratamiento y análisis de la información.....	103
4.2. Análisis estadístico de resultados.....	115
4.3. Discusión de resultados.....	120
Conclusiones.....	125
Recomendaciones.....	126
Referencias bibliográficas.....	127
Anexos.....	133

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables.....	21
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	76
Tabla 3. Inoculación de bacterias de la muestra de agua en el CALDO M9.....	103
Tabla 4. Cultivo de bacterias en Agar Nutritivo.....	104
Tabla 5. Cultivo de bacterias en Agar Cetrimide repique N° 1.....	105
Tabla 6. Cultivo de bacterias en Agar Cetrimide del repique N° 2 .....	107
Tabla 7. Cultivo de bacterias en Agar Cetrimide del repique N° 3 .....	108
Tabla 8. Cultivo en medio de enriquecimiento N°1.....	110
Tabla 9. Cultivo en medio de enriquecimiento N° 2.....	111
Tabla 10. Cultivo en Agar Polietileno – variación de pH.....	112
Tabla 11. Cultivo en Agar Polietileno – variación de temperatura.....	113
Tabla 12. Estadísticos descriptivos de la influencia del pH sobre el crecimiento de colonias de la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	115
Tabla 13. Prueba de igualdad de medias – Anova de un factor .....	116
Tabla 14. Prueba de comparación múltiple - Turkey para pH.....	117
Tabla 15. Estadísticos descriptivos de la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de colonias de la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	118
Tabla 16. Prueba de igualdad de medias – Anova de un factor .....	119
Tabla 17. Prueba de comparación múltiple– Turkey para temperatura.....	119

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Asociación internacional de residuos sólidos.....	16
Figura 2. Escala de pH.....	57
Figura 3. Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento.....	61
Figura 4. Rangos de temperatura para el crecimiento microbiano.....	62
Figura 5. Comparación de bacteria, Archea y Eucarya.....	75
Figura 6. Sistema de filogenia de cinco reinos según Whittaker.....	76
Figura 7. Degradación aerobia.....	82
Figura 8. Degradación anaerobia .....	82
Figura 9. Medio de crecimiento – Caldo M9.....	92
Figura 10. Preparación de agar polietileno.....	94
Figura 11. Medio de enriquecimiento N° 1.....	95
Figura 12. Medio de enriquecimiento N° 2.....	95
Figura 13. Cultivo de bacterias en agar nutritivo.....	105
Figura 14. Cultivo de bacterias en agar Cetrimide.....	106
Figura 15. Cultivo de bacterias en agar Cetrimide– repique N° 1.....	108
Figura 16. Cultivo de bacterias en agar Cetrimide – repique N° 2.....	109
Figura 17. Cultivo en medio de enriquecimiento N° 1 – cepa pura.....	110
Figura 18. Cultivo en medio enriquecimiento N° 2 – cepa pura.....	112
Figura 19. Número de colonias vs pH.....	113
Figura 20. Número de colonias vs temperatura.....	114
Figura 21. Gráfico de las medias de crecimiento de colonias a diferentes pH....	117
Figura 22. Gráfico de las medias de crecimiento de colonias a diferentes temperaturas .....	120

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

- Fotografía 1. Polietileno de baja densidad
- Fotografía 2. Lavado de materiales
- Fotografía 3. Materiales de esterilización
- Fotografía 4. Esterilización de materiales
- Fotografía 5. Cultivo del caldo M9 en placas con medios
- Fotografía 6. Cultivo de en Agar Nutritivo
- Fotografía 7. Cultivo de en Agar Cetrimide
- Fotografía 8. Placas con agar Cetrimide 1er repique
- Fotografía 9. Placas con agar Cetrimide 2do repique
- Fotografía 10. Placas con agar Cetrimide 3er repique
- Fotografía 11. Placas con agar polietileno en pH 8 listas para hacer el cultivo, para someterlas a incubar a diferentes temperaturas.
- Fotografía 12. Placas con agar Cetrimide 1er repique
- Fotografía 13. Placas con agar Cetrimide 2er repique
- Fotografía 14. Placas con agar Cetrimide 3er repique
- Fotografía 15. Horno microbiológico para el cultivo de bacterias, programación inicial.
- Fotografía 16. Horno microbiológico para el cultivo de bacterias, programación a 25°C
- Fotografía 17. Horno microbiológico para el cultivo de bacterias, programación a 20°C
- Fotografía 18. Horno microbiológico para el cultivo de bacterias, programación a 35°C
- Fotografía 19. Horno microbiológico para el cultivo de bacterias, programación a 35°C
- Fotografía 20. verificación del pH 10 para la preparación de medios
- Fotografía 21. verificación del pH 8 para la preparación de medios
- Fotografía 22. Placas con medio de enriquecimiento N° 1
- Fotografía 23. Placas con medio de enriquecimiento N° 2
- Fotografía 24. Placas con Agar Cetrimide para el análisis en VITEK II COMPACT

- Fotografía 25. Agar nutritivo y Agar Cetrimide con el polietileno en polvo para preparar Agar Polietileno
- Fotografía 26. Frascos para preparación de buffers para la modificación de pH
- Fotografía 27. Pesado de frasco estéril para pesar el polietileno
- Fotografía 28. Polietileno en polvo para preparar Agar Polietileno
- Fotografía 29. Pesado de frasco estéril para pesar el polietileno
- Fotografía 30. Incubación de placas con agar nutritivo y caldos.
- Fotografía 31. Tinción Gram
- Fotografía 32. Tinción Gram enjuague
- Fotografía 33. Tinción Gram aplicación de tinciones
- Fotografía 34. Bateria Gram (Safranina, lugol, cristal violeta, alcohol acetona)
- Fotografía 35. Tubos de estériles para el proceso de centrifugado
- Fotografía 36. Proceso de centrifugado
- Fotografía 37. Proceso de centrifugado
- Fotografía 38. Proceso de centrifugado
- Fotografía 39. Proceso de centrifugado
- Fotografía 40. Colonias de *Pseudomonas Aeruginosa* en agar polietileno.
- Fotografía 41. Colonias de *Pseudomonas Aeruginosa* en agar polietileno.

## RESUMEN

La preservación de nuestro planeta es un desafío que impulsa la participación de todos y nos invita a tomar conciencia sobre nuestras actitudes y estilo de vida, los avances tecnológicos, la creciente demanda y las expectativas del ser humano inician un proceso de crecimiento acelerado en la producción de materiales sintéticos, que nuestro ambiente no es capaz de degradar lo cual causa muchas formas de contaminación. El presente trabajo aplica principios básicos de biotecnología y de biodegradación de materiales sintéticos que permiten regresar al proceso de descomposición natural de materiales con ayuda de microorganismos, principio que permitió analizar y determinar la influencia de los factores ambientales como crecimiento microbiano, pH y temperatura para la degradación de polietileno de baja densidad. Se trata de una investigación aplicada, con un método experimental bajo condiciones controladas en laboratorio que permitió describir el proceso de degradación. Para la obtención de la bacteria que fomentaría el proceso de degradación analizada, se tomaron muestras de agua para su cultivo y aislamiento, que a su vez fueron sometidas al consumo de polietileno como principal fuente de alimento, manejando condiciones de pH y temperatura para su mejor desarrollo. Se observó crecimiento de colonias de bacterias identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, indicando de esta manera que son capaces de degradar el polietileno de baja densidad.

**Palabras clave:** polietileno, bacteria, *Pseudomonas Aeruginosa*, temperatura, pH, biodegradación.

## ABSTRACT

The preservation of our planet is a challenge that encourages the participation of all and invites us to become aware of our attitudes and lifestyle, technological advances, increasing demand and human expectations begin a process of accelerated growth in production of synthetic materials, which our environment is not able to degrade which causes many forms of contamination, therefore the present work applies basic principles of biotechnology and biodegradation of synthetic materials that allow to return to the process of natural decomposition of materials with the help of microorganisms. Principle that allowed to analyze and to determine the influence of the environmental factors of microbial growth, pH and temperature for the degradation of low density polyethylene. The method used corresponds to an applied research, with an experimental method under controlled conditions in laboratory that allows to describe the process of degradation. To obtain the bacterium, water samples were taken for later cultivation and isolation, which in turn will be subjected to the consumption of polyethylene as the main source of food, handling conditions of pH and temperature for its better development. The results obtained were that the bacterium identified as **Pseudomonas aeruginosa** are able to degrade the low density.

**Key word:** Polyethylene, bacterium, **Pseudomonas Aeruginosa**, temperature, pH, biodegradación.

## INTRODUCCIÓN

Se estima que en el 2010, las ciudades generaron aproximadamente 1300 toneladas de residuos sólidos urbanos en total, y se espera que este volumen aumente a 2200 millones de toneladas para el 2025, (46) cuyas causas serían el incremento poblacional, los hábitos de consumo en países industrializados, así como los cambios en las costumbres de consumidores que habitan los países en vía de desarrollo, pero no es solo la concentración de población en grandes urbes lo que acarrea el aumento en la demanda de recursos; se trata de los hábitos que el capitalismo ha implementado en el colectivo (4). Es por ello que en la actualidad nos encontramos en problemas crónicos de contaminación e incluso la aparición de fenómenos atmosféricos inusuales son cada vez más recurrentes y perjudiciales.

Es por ello que se debe aplicar tecnologías amigables con el ambiente, que ayuden a la adecuada disposición o tratamiento de residuos sólidos. La biotecnología es un proceso inspirado en la aplicación de conocimientos de la ciencia e ingeniería para tratamientos de materiales orgánicos e inorgánicos por sistemas biológicos para producir bienes y servicios. Entre sus ramas encontramos a la biotecnología blanca en donde se registra la utilización de microorganismos para la biodegradación o destrucción de contaminantes (43). Se considera que estos sistemas de descontaminación se basan en la digestión de sustancias orgánicas por los microorganismos, los cuales obtienen la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y una fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones metabólicas. (36)

El creciente aumento de materiales sintéticos no degradables forman un gran porcentaje de los residuos sólidos, causando un gran impacto de contaminación en el ambiente; es por ello que, el objetivo de la presente investigación fue analizar la influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de plásticos específicamente polietileno de baja densidad con ayuda de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, que permitirá proponer una forma alternativa y

ecológicamente sana de manejo de residuos plásticos. Se identificaron también las condiciones óptimas de crecimiento microbiano y se analizó la viabilidad técnica de los resultados obtenidos de los procesos experimentales en laboratorio.

Se recomienda extender este estudio al uso de una mezcla de microorganismos con mayor tiempo de exposición, para lograr una biodegradación que permita que el carbono y el nitrógeno presente en el residuo, sea consumido completamente por la diversidad de microorganismos para así estar disponible como recuperador de suelos para la agricultura, realizando los estudios de toxicidad necesarios. (36)

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

***“Antes de haberlo hecho debió pensarse en el desecho”***

Hasta el día de hoy no hubo alguien que produzca algo y que haya pensado en los desechos que su hallazgo generaría. Cada vez que surge un descubrimiento, esta brinda confort a la sociedad y todos tratamos de aprovecharlo al máximo; sin embargo, no nos preocupamos por los efectos nocivos que esta pueda causar a la naturaleza e incluso al ser humano. (1)

En los últimos años vivimos en sociedades de hiperconsumismo, exceso de urbanismo y el hacinamiento poblacional van en aumento. En este marco “las megaciudades nos señalan que con las dinámicas de crecimiento poblacional actual (del 2,5% al 6%) esta situación pueda ser revertida, previéndose que para el año 2050, las 2/3 partes de la población mundial habitarán en ciudades y no necesariamente en ecosistemas sostenibles”. Así mismo, las megaciudades no solo traen crecimiento económico y desarrollo si no también la pobreza y la exclusión social, costos sociales y sobre todo

ambientales que por lo general no son contabilizados por los respectivos gobiernos. (18)

Es por ello que el crecimiento desmedido de la población mundial ha originado un aumento en la demanda de productos y bienes generados a partir de la sobre explotación de los recursos naturales; adicionalmente, el cambio en las costumbres de consumo de los individuos ha llevado al incremento de la oferta de estos productos y bienes. Ambos sucesos, se consideran como los principales multiplicadores de la generación de residuos sólidos en el planeta y el mayor porcentaje de los residuos son los polietilenos que son más conocidos como plásticos. (4)

El impacto ambiental negativo está relacionado con la contaminación de los recursos hídricos, como cuencas, subcuencas, lagos, océanos que en su mayoría son fuente de abastecimientos de agua potable; del suelo, que son la principal fuente de cultivo de alimentos; contaminación del aire y del paisaje. El inadecuado manejo y disposición de estos residuos y, la exposición de estos, provoca la aparición de vectores (ratas, mosquitos, cucarachas, moscas entre otros) que son los principales factores que afectan la salud de las personas causando enfermedades como la malaria, dengue, fiebre amarilla, cólera, entre otros. La protección del ambiente tiene limitaciones de orden institucional, de legislación ambiental, financieros y sobre todo de vigilancia para el cumplimiento de las regulaciones. (16)

La aplicación de procesos de remediación y descontaminación con ayuda de la biotecnología consiste, en el uso de microorganismos para la degradación de ciertos contaminantes y su posterior asimilación en el ambiente sin causar impactos negativos o alguna forma de contaminación al ambiente.



*Figura 1. Asociación internacional de residuos sólidos*

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

Hoy en día el uso creciente de materiales sintéticos, como el plástico en la vida cotidiana es una de las fuentes de contaminación más grande en el planeta. Los datos demuestran que la producción mundial de plásticos sintéticos fue de 1 millón de toneladas en 1963, 100 millones de toneladas en 1990 y en 1996 la producción mundial anual de materiales poliméricos estaba alrededor de 150 millones de toneladas con un promedio de consumo per cápita de plásticos en los países desarrollados de 80–100 kg/año; la producción mundial de materiales plásticos en 2015 fue de 269 millones de toneladas. (17) “En la distribución de la producción global de materiales plásticos, China es el mayor productor de materiales plásticos (solo termoplásticos y poliuretanos), seguido por Europa. Por ejemplo, en China se estimó la producción de desechos plásticos en 16 millones de toneladas en el año 2000, siendo el quinto país en el mundo responsable de estos residuos, después de EEUU, Japón, Alemania y Corea del Sur”. (17)

Los distintos tipos de plásticos más comunes (poliolefinas, PVC, PS, EPS y PET) representan casi el 70% de la demanda mundial, es decir aproximadamente 200 millones de toneladas. (17)

Los residuos 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. Luego de un largo proceso de consolidación, las empresas del sector, en su mayoría, han mostrado una significativa mejora en su situación financiera. (47)

En estos últimos años, en la ciudad de Huancayo, el consumo de productos embolsados va en aumento y con ello el volumen de residuos plásticos. El impacto de los plásticos sobre el medio ambiente nos impulsa a realizar estudios que ayuden a reducir la contaminación; la aplicación de biotecnología es una opción de remediación, basándose en estos principios se analizó la influencia de los parámetros de cultivo como el pH, temperatura en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria aeróbica ***Pseudomona aeruginosa***. El estudio se realizó en la ciudad de Huancayo en los laboratorios de la Universidad Continental en el periodo 2016 y 2017 bajo la asesoría del microbiólogo Cordero Azabache, Jorge Eduardo. Por ello, la presente investigación pretende minimizar el efecto contaminante de los plásticos y sus posibles formas de contaminación en el ambiente, cuyo problema afecta a muchas ciudades y una de ellas es Huancayo que, debido a su crecimiento poblacional y al incremento de empresas e industrias presentes en el mercado, es víctima de esta forma de contaminación antropogénica.

La minimización de plásticos presenta técnicas para tratar residuos sólidos poliméricos como por ejemplo el reciclaje, el compostaje, la incineración y el relleno sanitario; así mismo, hoy en día se cuenta con la

biotecnología que permite transformar el contaminante mediante procesos metabólicos, esto se puede aplicar en los casos en que no se haya previsto el aprovechamiento de los residuos plásticos por reciclaje u otro proceso y contribuiría igualmente a reducir el volumen total de residuos sólidos.

Por todo esto se formula el siguiente problema de estudio:

#### **Problema general**

- ¿Cuál es la influencia de los factores ambientales de crecimiento microbiano, pH y temperatura, en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Huancayo?

#### **Problemas específicos:**

- ¿Cuál es la influencia del pH del medio de cultivo en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Huancayo?
- ¿Cuál es la influencia de la temperatura de incubación en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Huancayo?

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1. Objetivo general:**

- Determinar la influencia de los factores ambientales de crecimiento microbiano, pH y temperatura, en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Huancayo.

#### **1.3.2. Objetivos específicos:**

- Determinar la influencia del pH del medio de cultivo en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Huancayo.

- Determinar la influencia de la temperatura de incubación en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Huancayo.

## 1.4. HIPÓTESIS Y DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

### 1.4.1. HIPÓTESIS

#### Hipótesis general

- Los factores ambientales de crecimiento microbiano, pH y temperatura, influyen significativamente en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Huancayo.

#### Hipótesis específicas

- El pH del medio de cultivo influye significativamente en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Huancayo.
- La temperatura de incubación influye significativamente en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Huancayo.

## 1.4.2 DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

Tabla 1. Operacionalización de variables

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES					
VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIONES	INDICADORES	INSTRUMENTO	ESCALA VALORATIVA
<b>Factores ambientales de crecimiento microbiano pH, temperatura</b>	El crecimiento de microorganismos está influido notablemente por la naturaleza química y física de su ambiente, es decir permitirá controlar el crecimiento microbiano y estudiar la distribución ecológica de los microorganismos. (28)	pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido Ph&lt;7</li> <li>• Neutro pH=7</li> <li>• Básico Ph&gt;7</li> </ul>	pHmetro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido</li> <li>• Neutro</li> <li>• Alcalino</li> </ul>
		Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura mínima 4°C</li> <li>• Temperatura óptima 25° C - 30° C</li> <li>• Temperatura máxima 40°C</li> </ul>	Termómetro eléctrico como parte de la incubadora	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura mínima</li> <li>• Temperatura óptima</li> <li>• Temperatura máxima</li> </ul>
<b>Degradación del polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i></b>	Proceso biológico metabólico enzimático realizado por bacterias los cuales secretan enzimas que se encargan de romper la estructura molecular del plástico degradándolo en el tiempo. (45)	Proceso metabólico de bacterias	Colonias de bacterias - <b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b>	Contador de colonias (ASTM – D5465)	Unidades formadoras de colonias (UFC)

Fuente: elaboración propia

## **1.5. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA**

### **1.5.1. Justificación teórica**

Los plásticos en general son productos muy utilizados y fabricados en grandes cantidades, sin embargo, debido a su difícil degradación se han vuelto un serio problema ambiental a nivel mundial.

Se estima que las bolsas que se usan diariamente en compra de diversos productos, representan una gran cantidad de la basura doméstica, siendo nocivos para el medio ambiente y además encarecen el producto original. El suelo en la ciudad de Huancayo contiene grandes cantidades de polietileno de baja densidad dispersas en todas sus calles que generan inestabilidad, una gran contaminación visual, contaminación de los suelos y alteran la biota presente en el valle. El cual es motivo suficiente para iniciar una investigación que permita combatir esta forma de contaminación analizando los principales factores que contribuyen a su demanda, dispersión y acumulación.

El LPD está presente en casi todos los productos finales en las diversas industrias, esto lo indicaría su gran dispersión y la facilidad de alcance al público. Así mismo estos desechos plásticos llegan a distintos lugares, entre ellos el océano. El estudio, realizado por científicos de la (UCA) Pontificia Universidad Católica Argentina, demostró que además de la ya conocida acumulación de residuos plásticos del Pacífico Norte, existen bloques similares en el centro del Atlántico Norte, el Pacífico Sur, el Atlántico Sur y el Océano Índico. Los científicos de la Asociación para la Educación Marina, con sede en Estados Unidos, y del Instituto Oceanográfico Woods Hole en Hawai describieron el plástico como un "gran contaminante". "Su

durabilidad y lenta biodegradación hacen que estos polímeros sintéticos puedan tolerar el ambiente oceánico por años, décadas e incluso períodos más largos", los daños que pueden provocar que los animales marinos pueden quedar atrapados por la basura, las aves y otras criaturas marinas pueden consumir el plástico, la basura puede actuar a modo de balsa y trasladar a algunas especies fuera de su área, las bolsas plásticas producen toneladas de basura y atentan contra la vida de la fauna marina. Se calcula que son cerca de 100.000 mamíferos marinos y un millón de aves los que mueren anualmente por esta causa o al quedar atrapados en estos desperdicios "Si bien se han hallado grandes cantidades de basura plástica flotando en el Océano Pacífico, no hay mucha información que permita cuantificar y explicar su distribución geográfica". Esto sería un indicador de la gran polución y acumulación del LDP, por ello se pretende generar reflexión sobre cuán importante es la elaboración de productos amigables con el ambiente y cuan indispensable es que estos sean de degradación rápida.

Las bolsas biodegradables no son una solución a largo plazo ya que su producción necesita grandes cantidades de energía, tardan años (y no meses) en biodegradarse correctamente y cuando lo hacen, producen dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). En varios países del mundo se prohibió la distribución de bolsas de plástico en los supermercados y la gente va de compras con bolsas de tela, mochilas, entre otros. Ya es tiempo que nuestro gobierno se comprometa, empezando con medidas simples como la prohibición de la distribución de bolsas de plástico en los supermercados.

### **1.5.2. Justificación práctica**

La presente investigación pretende ayudar a resolver una de las tantas problemáticas que atenta contra el ambiente y las vidas

humanas, la amplia polución de plásticos, la distribución y acumulación de este, la invasión de desechos, específicamente, el polietileno de baja densidad (LDP) constituye un alarmante índice de acumulación futura, ya que estamos hablando de varias toneladas que se van juntando en todos los botaderos del mundo. Los lugares de acumulación de residuos sólidos en espacios públicos (calles, avenidas. etc.), se representan como potenciales focos infecciosos e impactan negativamente en la salud de la población y el medio ambiente, el Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA) considera puntos críticos. En Lima, el 83% de estos lugares está concentrado en tres distritos de la periferia: Villa María del Triunfo (39,4%), Villa El Salvador (25,3%) y El Agustino (18,3%). En contraste, estos distritos albergan aproximadamente solo al 12% de la población de Lima Metropolitana.

La presencia de puntos críticos representa un verdadero peligro para la salud pública. La acumulación de basura eleva la probabilidad de infecciones respiratorias y gastrointestinales, explica el director de Calidad Ambiental del Ministerio del Ambiente, Juan Narciso. Agrega, además, que los gases generados por la descomposición de materia orgánica son dañinos para las vías respiratorias. Por otro lado, la quema de basura es un problema para el medio ambiente y para la salud, pues con dicha práctica se emiten componentes químicos cancerígenos, como la dioxina, según diversos estudios en *El Comercio*

Existe un marco jurídico que regula este problema ambiental, como la Ley General de Residuos Sólidos, la Ley Orgánica de Municipalidades (esta norma define las competencias y responsabilidades en el tema), la Ley que Regula la Actividad de los Recicladores y el artículo 306 del Código Penal que tipifica el delito ambiental. Sin embargo, los principales problemas son la falta de

articulación y coordinación entre los poderes Ejecutivo y Judicial, municipalidades y la sociedad civil; y la falta de fiscalización, según el biólogo Elmer Quichiz, de la Dirección General de Salud Ambiental (Digesa).

Así mismo, esta investigación ayudará a un adecuado manejo de residuos enfocándose primordialmente en la minimización de plásticos específicamente del polietileno de baja densidad (LDP). Existen numerosos tipos y formas de polución por plástico. La polución por plástico puede afectar de forma negativa a los terrenos, cursos de agua y océanos. En determinadas regiones se han implementado planes para intentar reducir el consumo de plástico y promover el reciclado. La importancia y extensión de la polución por plástico está correlacionada con el bajo costo y durabilidad del plástico, lo que conduce a que los seres humanos utilicen gran cantidad de elementos de plástico. Los investigadores han revelado además que las aguas superficiales de las intersecciones de las corrientes oceánicas no son necesariamente el destino final de estas basuras, ya que grandes cantidades de microplásticos están pasando a la cadena alimenticia marina y a los fondos oceánicos, según publica la reconocida revista *Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS). (49)

Finalmente, para este problema de manejo adecuado de residuos sólidos se propone aplicar biotecnología a través del uso de bacterias en donde se identificará la eficacia de degradación y la influencia de los parámetros de crecimiento microbiano, se estudiarán también a las bacterias según su forma taxonómica para su mejor análisis con los parámetros de cultivo; así mismo, se brindará información sobre la influencia de estos en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria aeróbica heterótrofa ***Pseudomona aeruginosa***. El presente estudio ayuda a enriquecer

los conocimientos y la aplicación de nuevos métodos para la degradación de polietileno, también con estos análisis se podrá lograr mejoras en el tratamiento de estos residuos y emprender una investigación adecuada en nuevas biotecnologías.

Se pretende iniciar el proceso de degradación del LDP mediante el análisis e influencia de los parámetros de crecimiento microbiano en el polietileno de baja densidad por bacterias aeróbicas heterótrofas en la ciudad de Huancayo, esta resulta ser un medio confiable para encontrar una solución y minimizar la contaminación sin efectos secundarios de una manera sostenible.

La investigación se realizará para el beneficio de la sociedad, principalmente las nuevas generaciones y sobre todo del medio ambiente. A partir de esta investigación se dará a conocer en comunidades, municipios y la aplicación de esta rama de la ciencia en campo para obtener resultados confiables y sustentables con el ambiente y sociedad.

### **1.5.3. Justificación metodológica**

La presente investigación servirá como instrumento para analizar datos y definir variables que ayuden a lograr mejoras en la aplicación de nuevos métodos en el manejo de residuos sólidos, específicamente, en la minimización de plásticos desechables (LDP). Las investigaciones de bacterias, actinomicetos y hongos han adquirido importancia, debido a que biodegradan de manera efectiva a los plásticos o a su vez, determinan las condiciones favorables para realizar esta acción en el ambiente. (5)

Este sistema de biodegradación forma parte de la biotecnología ambiental, pues hace uso de seres vivos (hongos, microorganismos y

plantas) para aportar nuevas técnicas de recuperación del medio ambiente y su cuidado, así mismo estos procesos no solo son una opción de remediación si no también permitirá minimizar y en algunos casos la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su concentración en el medio en que se encuentra. Es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos.

La biodegradación es un proceso natural, metabólico y enzimático realizado por microorganismos, que excretan enzimas las que a su vez se encargan de romper la estructura molecular del plástico. Este proceso es ventajoso no solo por permitir la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su concentración, sino que además es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales en la formación y crecimiento de los organismos. La descomposición puede llevarse a cabo en presencia de oxígeno (aeróbica) o en su ausencia (anaeróbica). La primera es más completa y libera energía, dióxido de carbono y agua, es la de mayor rendimiento energético. Los procesos anaeróbicos son oxidaciones incompletas y liberan menor energía.

(45)

La metodología aplicada fue la siguiente, como primer proceso se realizó la toma de muestra de agua, posteriormente se diseñó un medio de crecimiento apto para el desarrollo de bacterias desintegradoras, al medio de crecimiento desarrollado se le adicionó polietileno en polvo denominado medio de enriquecimiento. Así mismo, se procedió con el aislamiento inicial de la bacteria, seguido por un proceso de centrifugado, se realizó también una prueba de identificación de la bacteria ***Pseudomonas aeruginosa***.

La elaboración del medio de enriquecimiento se aplicó para familiarizar a la bacteria ***Pseudomonas aeruginosa*** al contacto del polietileno de baja densidad y llegar a que el LDP sea su única fuente de alimento, se pasó a inocular las muestras de bacterias ***Pseudomonas aeruginosa***, se observaron y se contaron las colonias para su correcta identificación, así mismo se sometió a tinción para una mejor observación de colonias. Para la manipulación del factor ambiental de crecimiento microbiano pH se inició con la adición de los buffers para la variación del mismo, se inoculó e incubó a 37° C, se sometió a tinción para el conteo de colonias, procedimiento tomado del libro de Microbiología de Prescott 2008 y de la ASTM – D5465, Estándares Americanos y métodos de prueba, para el conteo de colonias en placa simple (Conteo manual).

Finalmente, para iniciar la variación de temperatura se comenzó a incubarla a diferentes temperaturas para así identificar el porcentaje de crecimiento de colonias a dichas temperaturas y verificar su adecuación al clima de la ciudad de Huancayo para su posterior aplicación.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

##### 2.1.1. Antecedentes internacionales

a) *“Biodegradabilidad de los residuos plásticos degradables”.*

Investigación presentada por el Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Malaya, Kuala Lumpur, Malasia; donde se tuvo como objetivo demostrar la aplicabilidad y la contribución de los plásticos degradables en el ambiente (EDP) para alcanzar una gestión eficaz de los residuos plásticos. Las muestras a base de polietileno no se biodegradaron a 60°C, pero se degradaron oxidativamente cuando se expusieron al aire por 60 días. El método aplicado fue el de espectro FTIR, se utilizó como guía la norma D6003-96, de la American Standard and Testing Methods (ASTM). Los resultados de compostaje coincidieron con los datos oxidativos. Por último, el crecimiento de *P. aeruginosa* en todas las placas inoculadas donde el plástico era la única fuente de carbono demostró la biodegradabilidad y la capacidad de

compostaje del plástico. El EDP es biodegradable y, por lo tanto, puede utilizarse para prevenir, de manera segura, los numerosos problemas relacionados con los residuos plásticos no degradables en los rellenos sanitarios. (2)

**b) “Biodegradación ambiental de polietileno”.**

El objetivo de este estudio fue intentar correlacionar la pérdida de productos de oxidación de baja masa molar a partir del polímero con el crecimiento de microorganismos seleccionados en la superficie del polímero termo-oxidado en condiciones próximas a las experimentadas en compost. Una serie de observaciones importantes del actual trabajo indican que se debe arrojar más luz sobre la progresión y el mecanismo de oxo-biodegradación. Se concluyó que la reducción de la masa molar debido a la acción de microorganismos no se produce a cualquier medida significativa durante la incubación y que el papel principal de los microorganismos en este proceso es para barrer la baja de productos de oxidación de peso molecular, ya que son formados. Es decir, el proceso de per-oxidación abiótico es el paso determinante para el proceso de reducción.

Estos resultados son de considerable importancia para procesos de compostaje comerciales, en los que es deseable que se requieran plásticos a desintegrarse a pequeños fragmentos dentro del tiempo de ciclo de compostaje y para ser posteriormente absorbidos en el ambiente del suelo como nutriente para plantas en crecimiento. (5)

c) *“Biodegradación de polietileno y plástico por la ayuda de herramientas microbianas: Un enfoque reciente”*

Investigación presentada en la revista internacional de biomedicina y avances de investigación. (29)

El objetivo de la presente tesis es identificar y aislar microorganismos asociados con diversas degradaciones de polietileno y plástico en el suelo. Generalmente, la adherencia de microorganismos en la superficie de plásticos seguido de la colonización de la superficie expuesta es el principal mecanismo implicado en la degradación microbiana de los plásticos. La degradación enzimática de los plásticos por hidrólisis es un proceso de dos pasos: primero, se une la enzima; a continuación, el sustrato de polímero; posteriormente, cataliza un hidrolítico escote. Los polímeros se degradan en oligómeros de bajo peso molecular, dímeros y monómeros y finalmente mineralizadas de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. (29)

Las propiedades de plásticos están asociadas con su biodegradabilidad. Tanto las propiedades físicas como químicas de los plásticos influyen en el mecanismo de la biodegradación. Las condiciones de la superficie (área de superficie, y propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas), las primeras estructuras de orden (estructura química, peso molecular y la distribución del peso molecular) y las estructuras de alto orden (de transición vítrea, la temperatura, la temperatura de fusión, módulo de elasticidad, cristalinidad y estructura cristalina) de los polímeros juegan papeles importantes en la biodegradación de procesos. En general, los poliésteres con cadenas laterales son menos asimilados que los que no tienen cadenas laterales. El peso molecular también es

importante para la biodegradabilidad porque determina muchas propiedades físicas del polímero. (29)

El aumento molecular del peso del polímero disminuyó su degradabilidad. Dentro de la escala de tiempo de nuestro experimento, el microorganismo asociado con el polietileno y plástico. Se identificaron las películas que reveló la presencia de ambas bacterias y hongos en gran número. Estos microorganismos utilizan películas de polietileno como fuente única de carbono que resulta en la degradación de polietileno y plástico. Finalmente, esta investigación en biodegradación de polietileno en las últimas décadas ha aumentado nuestro conocimiento de microorganismos degradantes bajo la condición natural, mejorar nuestro conocimiento en el desarrollo de nuevas tecnologías o modificar el existente, los que degradan los plásticos en una manera respetuosa del medio ambiente al no ser de subproductos tóxicos. Por lo tanto, la futura atención está en el desarrollo comercial y aplicación de los recursos naturales y eco-amigables polietileno y plástico. Sobre la base de la información uno podría concluir que en a fin de mejorar la biodegradación de polietileno y plásticos los siguientes enfoques podrían ser adaptados como estudios de biodegradación de polietileno y plásticos en el suelo, en el interior del laboratorio (bajo condiciones controladas) y fuera del laboratorio (bajo condición natural) con la ayuda de herramientas microbianas. (29)

**d) “Biodegradación de polietileno de baja densidad por una variedad de *Pseudomonas*”. (24)**

Este manuscrito tiene como objetivo investigar el grado de biodegradabilidad de LDPE por cuatro diferentes cepas de ***Pseudomonas*** bacterias ***Pseudomonas aeruginosa*** PAO1

(ATCC 15729), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692), *Pseudomonas putida* (ATCC KT2440 47054) y *Pseudomonas syringae* (DC3000 ATCC 10862). La degradación de LDPE se determinó en pérdida de peso de la muestra, los cambios morfológicos, mecánica y variaciones espectroscópicas. Los compuestos diluidos después de la degradación se analizaron por cromatografía de gases que se acoplaron con la espectroscopia de masas. Los resultados muestran que *Pseudomonas spp* puede degradar películas de LDPE. (24)

La formación de biopelículas se inició a partir del día 40 de incubación, se observó que el período inicial de crecimiento tanto de las células planctónicas y biofilm fue rápido. Esto debido a que las cepas bacterianas son capaces de utilizar películas de polietileno como fuente de carbono. El crecimiento de biopelículas se encontró que era aumentando de manera constante en los días 80 y 120 en comparación con el día 40. Sin embargo, la tasa de crecimiento se redujo en comparación con el período inicial. Por otro lado, la serie de diluciones y métodos de recuento de colonias mostraron que la proliferación bacteriana se hizo más o menos constante después de 15 días y un muy pequeño aumento en los recuentos bacterianos fue observado. Las células del biofilm, así como las células planctónicas mostraron una curva de crecimiento similar. Esto puede ser atribuido a la aclimatación de bacterias en el medio basal con la fuente de carbono degradado a partir de los plásticos. 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%. La pérdida de peso de las películas de polietileno se

puede atribuir a la ruptura de columna vertebral de carbono debido a la degradación enzimática por estas bacterias. Se observó que la pérdida máxima en peso se observó para polietileno donde se incubaron con *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. (24)

e) “*Repaso de la biodegradación de polietileno: de una manera microbial*”. (19)

La siguiente investigación tiene como objetivos: 1) dar a conocer el nivel de contaminación del polietileno, 2) revisar los métodos (rentable) más eficientes, 3) identificar de dónde vienen esos microbios que degradan el polietileno, 4) enseñar el mecanismo de la degradación de polietileno. 5) dar a conocer los métodos usados para la biodegradación del polietileno, 6) revisar las discusiones de la degradación de polietileno por microbios eficientes, 7) poner en práctica los productos del polietileno bajo el proceso de degradación, 8) probar el nivel de toxicidad de los productos del polietileno después del proceso de degradación, 9) hablar de los aspectos futuros de la degradación de polietileno. (19)

Resultados: 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 bacteriana 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. En las mezclas de polietileno en el agua de mar hubo muy poca degradación observada en el invierno, pero en verano hubo mucha pérdida de peso en el polietileno con la adición de MB después de 20 meses. La pérdida de peso llegó a

26% por semana y un máximo de 4.1594 g/L de CO<sub>2</sub> fue liberado después de la degradación del polietileno. El nivel máximo de degradación del polietileno (pérdida de peso) de los cuatro tipos de bacterias fue encontrado como 20% por ***Pseudomonas aeruginosa*** después de 120 días. El contenido de almidón en mezcla fue encontrada directamente proporcional a la proporción de degradación. Entonces un contenido más alto de almidón da mayor degradación. Películas de polietileno (capa) 75 -85% (contenido de hierro estearato) y 31 % - 67% (de calcio estearato) en 45 grados causa la reducción en el índice carbonil donde hubo 7.5% de pérdida de peso del polietileno después de 8 semanas. Se registró un 8% de degradación de polietileno en 4 semanas. (19)

Concluida la biodegradación esta es controlada principalmente por la naturaleza de la adición del pro-oxidante y también está afectado por la matriz, pero no tanto como el pro-oxidante. Después de 45 días el cambio máximo de la extensión del porcentaje (73.38% reducción) punto de tensión (0.01 N/cm<sup>2</sup> fue similar incluso después de 15 y 30 días) y elongación 1.8 cm del polietileno fueron registrados.

f) *“La biodegradación de plásticos por ***Pseudomonas putida*** aislado de muestras de suelo de jardín”.* (26)

El objetivo del estudio es aislar ***Pseudomonas putida*** de muestras de suelo de jardín y caracterizar su capacidad degradante en material plástico. (26)

Los microorganismos tales como bacterias y hongos están involucrados en la degradación de ambos plásticos naturales y sintéticos. Un total de diez muestras de suelo se obtuvieron de diversos jardines en y alrededor de Chennai. Las muestras

recogidas fueron procesadas para el aislamiento de *P. putida*. La eficiencia de la degradación de las cepas aisladas y cepa estándar se compararon. Cuatro cepas fueron aisladas en agar tripticosa soya (TSA) medio. Las cepas aisladas se identificaron como *P. putida* mediante la realización de pruebas de identificación correspondientes. Las cepas aisladas fueron confirmadas como *P. putida* por la ausencia de prueba del hidrólisis de gelatina y ausencia de crecimiento en agar cetrimide. (26)

Los cambios en la superficie de la muestra plástica, en la mayoría de las aplicaciones previstas para las películas o fibras en contacto con el suelo, la pérdida en las propiedades de tracción y pérdida de peso son los criterios prácticos más relevantes para determinar su degradación. Se observaron los diversos cambios en la superficie de las muestras de plástico después de la incubación que con el suelo aislado. La superficie de las muestras de plástico se ha convertido de suave a rugosa con grietas. (26)

Entre las muestras utilizadas para este estudio, en la muestra D se encontró que era más degradativo en el intervalo de 63,1% a 75,3%. Entre las cuatro cepas aisladas, la muestra plástica D fue muy degradada por la tensión. Las cepas restantes degradaron la muestra, similar a la cepa estándar utilizada. La cepa 1 y 2 muestran los niveles de biodegradación altas de 75,3% y 71,7% en comparación con la cepa estándar que utilizan el 63,1%. La capacidad degradativa de las bacterias oscilaron entre 4-17%. La superficie morfológica de película de polietileno / almidón ha sido analizada por microscopía electrónica de barrido (SEM) antes y después de la degradación. Propiedades físico-mecánicas, también se ha determinado antes y después de la degradación de la película con el fin de comprender la tasa, así como el mecanismo de la degradación. La superficie de los materiales de plástico ha

pasado de ser suave a rugosa con grietas. Esto puede ser debido a los compuestos secretados extracelularmente por los microbios que pueden romper la compleja estructura molecular del plástico. Por lo tanto, estudiar más a fondo sobre las enzimas microbianas o ácidos orgánicos en la degradación de los plásticos de polietileno se hallan en el camino para encontrar la tecnología para degradar los materiales de plástico, que son de otro modo peligroso para el medio ambiente. Por lo tanto, el presente estudio revela la ***P. putida*** donde se encontró que las bacterias son eficaces para la biorremediación de material plástico. (26)

g) “*Estudios sobre la biodegradación de polietileno natural y sintético por Pseudomonas spp*” (52)

El presente artículo hace un análisis comparativo entre la biodegradación de los recursos naturales y polietileno sintético por tres especies diferentes de ***Pseudomonas***. Las tres ***Pseudomonas spp.*** (P1, P2, y P3), (1) el sitio de disposición de residuos domésticos debe desecharse con la basura doméstica y los residuos vegetales; (2) del suelo de textiles en el sitio de drenaje efluentes; y (3) los suelos objeto de dumping con los lodos de depuradora, respectivamente. La capacidad de estas especies en la degradación de polietileno natural y sintético fue investigada. Hubo cultivo puro de incubación de frasco de agitación durante 8 semanas que fue realizado con la finalidad de biodegradación. El polietileno natural o biodegradable utilizado en el estudio eran bolsas de plástico desechable que contienen 6% de almidón vegetal. Los pesos en seco inicial y final 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 encontró para degradar eficientemente con

polietileno 46,2% para natural y 29,1% para el polietileno sintético. En contraste, *Pseudomonas sp.* de los hogares basurero (P2) dio la biodegradabilidad más baja de 31,4% y 16,3% para el polietileno natural y sintético, respectivamente. Sin embargo, *Pseudomonas sp.* aislado de efluentes textiles, sitio de drenaje, dio una biodegradabilidad intermedia de 39,7% y 19,6% para el polietileno natural y sintético, respectivamente. En general, el polietileno natural, dio una rápida biodegradación dentro de la misma duración que los sintéticos. Las enzimas activas producidas por las bacterias causan abolladuras mecánicas y la pérdida de peso en polietileno. (52)

Dentro de todos los tratamientos, el T1 presenta biodegradación más o menos consistente, mientras que T2 era un pequeño meandro. El polietileno natural que contiene almidón vegetal del 6% que podría haber mejorado la velocidad de biodegradación de la fase inicial de la prueba experimental. Además de los nutrientes basales del caldo, *Pseudomonas spp.* han utilizado los extractos vegetales y otros componentes orgánicos de polietileno natural que puede ser otra de las razones de esta uniformidad de biodegradación. Sin embargo, la viabilidad de crecimiento microbiano de bacterias *Pseudomonas* en el caldo, en el día 56, sugiere que el organismo estaba todavía en la fase de registro. Esto explica que el polietileno natural proporciona suficiente fuente de carbono y energía para las bacterias para el crecimiento y la multiplicación. P3 mostró máxima biodegradabilidad tanto de las bolsas de polietileno y degradación de prácticamente el 50% de los naturales. La razón podría ser el metabolismo de la cepa particular, que está aislado desde una ubicación con ricos nutrientes orgánicos de los lodos de depuradora, y puede tener la capacidad de utilizar el carbono orgánico máximo. Por lo tanto, el polietileno natural sirvió a las

bacterias con su almidón ingrediente vegetal adicional que los llevó a consumir polietileno natural más rápidamente que los sintéticos. Con nuestros resultados, se asume que las bacterias eran capaces de utilizar polímeros naturales más rápidos que los sintéticos porque menos actividades metabólicas son suficientes para disociar los fondos de carbono de origen natural del polietileno de las complejas reacciones enzimáticas que se requieren para los polímeros sintéticos. (52)

h) “La biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE) por Cultura Mixta de *Lysinibacillus xylanilyticus* y *Aspergillus niger* en el suelo” (10)

En este estudio, el objetivo es la biodegradación de las películas de LDPE puro sin aditivos pro-oxidantes, con y sin tratamiento previo de la foto-oxidación, se evaluó en el suelo en presencia y ausencia de un cultivo mixto de microorganismos vertedero de código seleccionados (*Aspergillus niger* F1 cepa designada y *Lysinibacillus xylanilyticus* XDB9 (T) S7-10F cepa designada). Los datos obtenidos a partir de las mediciones de respiración y de población microbiana mostraron diferencias significativas con los microorganismos seleccionados. Las mediciones de dióxido de carbono mostraron que la biodegradación en el tratamiento no inoculado era lento, y estaba alrededor de 7,6% y 8.6% de la mineralización de la no-UV-irradiado y UV irradiado LDPE respectivamente después de 126 días. En contraste, en la presencia de los microorganismos seleccionados, la biodegradación era mucho más eficiente y los porcentajes de biodegradación eran 29,5% y 15,8% para los no irradiados UV-UV-irradiados y películas, respectivamente. El porcentaje de disminución en el IC fue mayor para el LDPE UV-irradiado cuando la biodegradación era realizada en el suelo inoculado con lo fúngico

y bacteriano seleccionado en aislamientos. El FT-IR, XRD y SEM, estos análisis demostraron la capacidad de los microorganismos seleccionados para modificar y colonizar ambos tipos de PE como la fuente de carbono, y demostraron el importante papel de estas cepas en el proceso de biodegradación del PE. (10)

El tratamiento previo de oxidación facilitó la biodegradación del PE; sin embargo, al contrario de otros informes, nuestro estudio confirma la capacidad de la fúngica seleccionada y aislados bacterianos para utilizar virgen PE sin pro-oxidante y pretratamientos de oxidación. Los resultados de este estudio muestran que los microorganismos seleccionados (cepas S7 10F y F1) presentan un gran potencial de biodegradación de LDPE

En condiciones naturales, tales como las que se encuentran en el suelo en un futuro cercano, estos microorganismos pueden ser utilizados para reducir la cantidad de los residuos sólidos, que se acumulan rápidamente en el medio natural del medio ambiente. (10)

i) “Desarrollo y dinámica de biopelículas *Pseudomonas sp*” (35)

En la siguiente investigación se presenta como objetivo observar el desarrollo y dinámica de biopelículas *Pseudomonas sp*. Los organismos modelos utilizados en el presente estudio representan dos tipos diferentes de formación de biopelículas. Inicialmente, las bacterias forman microcolonias planas, pero en la fase posterior de biofilm la formación de *Pseudomonas sp*. B13 forman cepas ovoidales en microcolonias; mientras que las *P. putida* OUS82 forman cepas de estructuras irregulares. Aunque las razones para el diferente comportamiento de las dos *Pseudomonas* se desconocen, se consideró ventajoso usar

bacterias que muestren diferentes tipos de formación de biopelículas. El uso de buenas prácticas agrarias y dsRed como genes indicadores o etiquetas genéticas para distinguir entre diferentes especies, especies idénticas, o de tipo salvaje y mutante es, sin duda, un enfoque muy útil para estudios en línea de biopelículas. **(35)**

Las bacterias en biofilms son células sésiles en un estado fisiológico diferente de la de las células planctónicas, y algunos informes que documentan la expresión diferencial de genes en sésiles (unido a la superficie) donde han aparecido bacterias (8, 26, 29). Informaron que la expresión de 38% de los genes en *E. coli* difieren entre sésiles y las células planctónicas. Entre estos, el gen FLIC fue reprimido en las bacterias sésiles, y los flagelos eran no detectados en las bacterias sésiles. El presente trabajo sugiere, sin embargo, que las bacterias en biofilms muestran tanto temporales como variación espacial con respecto a la diferenciación. Algunas de las bacterias eran bacterias sésiles aparentemente no móviles, pero una gran fracción de las bacterias del biofilm de vez en cuando nadaban en una microcolonia. Las bacterias *P. putida* OUS82 fueron aparentemente inmóviles y sésiles dentro de las microcolonias en la fase temprana de desarrollo de la biopelícula, pero después de 3 días de crecimiento, presumiblemente cuando las microcolonias habían alcanzado un tamaño crítico, las bacterias comenzaron a nadar rápidamente en círculos, la microcolonias compactas se disolvieron, y estructuras sueltas se formaron conteniendo bacterias de diferentes microcolonias. En consecuencia, le sugerimos que los biofilms contienen tanto sésiles poblaciones y poblaciones planctónicas. La capacidad de una fracción de las bacterias en un biofilm para responder células planctónicas como puede permitir que la comunidad del biofilm para responder de manera eficiente a entornos cambiantes. Tales

respuestas se observaron en una modelo de consorcio de dos especies capaces de presentar comensales o no comensales de crecimiento. A partir de estos experimentos hemos concluido que las biopelículas son estructuras dinámicas, y nos han hecho sugerencias de que las bacterias en biopelículas pueden mostrar diversos estados de diferenciación dependiente de su ubicación temporal y espacial. Sin embargo, la expresión de genes específicos de las llamadas bacterias sésiles diferenciadas, no se conocen, por lo que un análisis más integral de los estados de la diferenciación bacteriana en biofilms sería necesario. (35)

j) *“La biodegradación de polietileno y polipropileno” (56)*

Esta revisión tiene como objetivo biodegradar el polietileno y el polipropileno que son las dos poliolefinas con aplicaciones de amplio alcance. Ellas son recalcitrantes y, por lo tanto, permanecen inertes a la degradación y el deterioro que conduce a su acumulación en el medio ambiente. La mayoría de los ejemplos hacen frente a los hongos y la degradación basada en la bacteriana. Los polímeros pretratados se degradan más fácilmente que los polímeros no tratados. Además, la degradación es más fácil con almidón y polímeros de celulosa mezclados. La célula hidrofóbica de la superficie y la adición de agentes tenso-activos mostró un papel importante en la formación de biopelículas que es un requisito previo para la biodegradación. Cables de degradación de disminución en el peso molecular, resistencia a la tracción y la viscosidad, la formación de nuevos grupos funcionales tales como podría concluir que con el fin de mejorar la biodegradación de PP o PE los siguientes enfoques podrían ser adoptados: (56)

I. Modificar el polímero para la utilidad microbiana por: la adición de polímeros naturales y / o pro-oxidantes al PP; modificación de polímeros hidrolizados de proteínas; y pretratamiento del polímero.

II. Modificar los microbios para utilizar el polímero mediante: la modificación de la composición del medio, y por lo tanto la mejora de la utilización de polímero; y modificar genéticamente el microorganismo a utilizar con el polímero.

III. Sobreexpresión de la enzima, que es responsable de la degradación y se debe purificar y utilizar para este propósito. Estrategias II y III requieren de la comprensión de mecanismo de la degradación microbiana de estos polímeros. (56)

k) *“La diversidad y la eficacia de los manglares tropicales de suelo microflora sobre la degradación del polietileno lleva bolsos”*. (55)

Se determinó la diversidad y la carga de bacterias heterotróficas, así como los hongos asociados al suelo del manglar de Suva, Islas Fiji, utilizando el método de conteo de placas, usado también para medir la capacidad de bacterias aisladas para producir enzimas hidrolíticas como amilasa, gelatinasa y lipasa. La carga bacteriana heterotrófica resultó ser considerablemente más alta que la carga funguicida. Hubo predominancia de bacterias “Gram-positivas” del género de ***Bacillus***. Otros géneros encontrados fueron ***Staphylococcus***, ***Micrococcus***, *Listeria* y *Vibrio*. La eficacia de esta microflora en la degradación del polietileno comercial de bolsas hechas de polietileno de alta densidad (HDPE) y de baja densidad (LDPE) fue estudiada en el laboratorio por un periodo de ocho semanas. La biodegradación fue medida en términos de pérdida de peso, la cual indicó una disminución del 5 %. Después de ocho semanas en el suelo de un

manglar, el polietileno clase 1 y clase 3 contenían fundamentalmente **Bacillus**, pero en la Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744) Vol. 55 (3-4): 777-786, september-december 2007 785 polietileno clase 2, predominó el género **Staphylococcus**. (55)

Mientras que la mayoría de bacterias aisladas fueron capaces de producir enzimas hidrolíticas como la amilasa y la gelatinasa, la actividad lipolítica fue muy baja. La clase 2 (HDPE) experimentó la mayor biodegradación. (55)

En conclusión, los resultados revelaron que las bacterias heterótrofas aisladas de manglar suelo eran capaces de producir enzimas hidrolíticas que pueden contribuir a la degradación de polietileno que se usa en el presente estudio, también, había una selección de diferentes géneros hacia diferentes clases de polietileno que indican que diferentes géneros podrían ser responsables de la degradación de diferentes tipos de polietileno. Los resultados también mostraron que la clase 3 de polietileno había sufrido más biodegradación, esto podría ser debido a la presencia de aditivos que pueden aumentar la tasa de degradación por la disminución del punto de fusión, delta H, fuerza de unión y temperatura de transición vítrea. (55)

I) *“La variabilidad en **Pseudomonas aeruginosa** lipopolisacárido expresión durante la degradación de petróleo crudo” (57)*

Este estudio demuestra una correlación entre **P. aeruginosa** U1 y la variación LPS superficie celular U3 y la capacidad de estas cepas que degradan n-alcanos. Curiosamente, tanto suave y fenotipos ásperos se han mantenido en BLC- cultivos degradantes de enriquecimiento durante más de 48 meses, lo que sugiere

diferentes papeles para facilitar la degradación del aceite crudo en el enriquecimiento de cultivos. Además, la presencia de células U1 y U3 impactaron las capacidades degradadoras de la comunidad microbiana (11), tal vez debido a la producción de compuestos antimicrobianos. Este estudio también apoya el uso de alta resolución AFM combinado con análisis bioquímicos para identificar alteraciones en estructuras subcelulares que ocurren durante la degradación microbiana mediada de los contaminantes ambientales. Otros experimentos examinarán los papeles lisos (U1) y rugosos (U3), fenotipos en crudo, la degradación del aceite y sus efectos sobre otros miembros de la BLC-degradado de comunidad microbiana. (57)

**m) “Proyección de polietileno y degradantes plásticos de microbios de muthupet suelo del manglar” (58)**

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo estudiar el nivel de toxicidad del polietileno y plásticos biodegradados. Los resultados de este estudio, concluyen que **S. aureus**, **P. aeruginosa**, **A. niger**, **Rhizopus** y **Streptomyces**, degradan eficazmente los materiales de polietileno y plástico. Así, la **P. aeruginosa** es eficiente para degradar la polietileno y material plástico. La plántula de *Vigna radiata* se trasplantó en 12 macetas de igual tamaño, que eran señalados como Tratamiento I - VI (polietileno) y I - VI (plástico). Los parámetros morfológicos como la germinación, capacidad, longitud de la raíz, longitud de brotes y el contenido de clorofila fueron analizados. Los De materiales de desecho de polietileno y plástico suelen causar serios problemas ambientales, por lo que los materiales de desecho deben ser eliminados utilizando el microorganismo. Este método es barato y eficaz, de modo que

puede ser utilizado ampliamente para el tratamiento de polietileno y vaso de plástico. (58)

n) *“Biorremediación de p-nitrofenol por **Pseudomonas putida** cepa 1274”* (53)

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la eficacia de la **Pseudomona putida** 1274 para la eliminación de la PNP. Los resultados fueron que la **P. putida** 1274 muestra un buen crecimiento y la degradación PNP a 37 ° C en pH neutro. Ácido y alcalino pH retardan el crecimiento de **P. putida**, así como la degradación de la PNP. Sobre la base de técnicas especializadas, se identificó hidroquinona como producto degradado importante. La vía fue identificada por la biodegradación de PNP. Se trataba de la eliminación inicial del grupo nitrato y la formación de hidroquinona como uno de los intermedios. Finalmente, los resultados sugieren que la **P. putida** cepa 1274 sería un aspirante adecuado para la biorremediación de compuestos nitro-aromáticos en sitios contaminados en el medio ambiente. (53)

o) *“Estudio de las propiedades mecánicas y de envejecimiento a la intemperie de polietilenos cargados con polisacáridos”* (54)

El presente estudio trata sobre la evaluación de las propiedades mecánicas y el envejecimiento a la intemperie de películas de polietileno de baja densidad (PEBD) cargadas con polisacáridos (almidón) (20% p/p). Los ensayos de tensión, en especial, los módulos de elasticidad y la deformación en el estado inicial, antes y después de someter las películas a envejecimiento por exposición a la luz durante trece semanas, proporcionan informaciones relevantes sobre el efecto del tiempo de exposición. Además, los termogramas de análisis termo gravimétrico obtenidos

mostraron como se redujo la estabilidad térmica del PEBD por la presencia del almidón de maíz, y después de ser biodegradadas en un cultivo microbiano de *Aspergillus niger* durante 21 días. (54)

Los resultados obtenidos al evaluar el PEBD antes y después de ser cargado con polisacáridos de tipo almidón, y sometido a degradación ambiental y bacteriana, reflejaron que el ataque microbiano fue facilitado por la incorporación del polisacárido originando un aumento en la velocidad de degradación. Respecto al módulo de elasticidad y la deformación para las películas de polietileno de baja densidad cargada y original, después de la presencia de los polisacáridos en el polietileno provocó una disminución en el tiempo de vida útil de las películas en cuanto a las propiedades mecánicas del polímero. (54)

p) “Evaluación de la bacteria *Pseudomona* como degradador del polietileno” (38)

El objetivo de la presente investigación es evaluar a la bacteria *Pseudomona*, como agente degradador de uno de los derivados del petróleo que mayor impacto ecológico tiene, el polietileno, basándose en los principios generales de la biorremediación. El polietileno es uno de los plásticos que más contamina el ambiente debido a que es utilizado de forma indiscriminada. Además, su proceso natural de degradación es lento ya que le toma entre 50 y 300 años completarlo y se producen una gran cantidad de lixiviados. La biorremediación es una práctica en la que se ha encontrado que ciertos tipos de bacterias son capaces de acelerar la descomposición de estos derivados de carbono con un mínimo de desechos dañinos. Las bacterias *Pseudomonas* son capaces de degradar estos productos ya que forman parte de su nutrición. Por ello, se decidió evaluar su

efectividad para lo que se aislaron colonias de ***Pseudomonas*** a partir de muestras de agua estancada y suelo procedentes de tiraderos de basura, reportadas como un reservorio de estos organismos, mismos que posteriormente fueron cultivados en un medio donde el polietileno fue la única fuente de carbón. Es así como las ***Pseudomonas***, no teniendo otra fuente de carbón en su dieta, degradaron el polietileno, reduciendo en un 58% el peso original de la muestra, en un tiempo de siete semanas. Este procedimiento resultó ser muy efectivo al compararse con el periodo prolongado de tiempo que requiere una bolsa de plástico para degradarse sin acción de ninguna práctica de biorremediación. Si se decidiera implementar esta como una técnica para la degradación de desechos plásticos, sería necesario separar y triturar las bolsas dejándolas como única fuente de carbono, para someterse a la acción degradante de tapetes microbianos que incluyeran bacterias ***Pseudomonas***. (38)

A partir de los resultados obtenidos, es evidente que al restringir las bacterias ***Pseudomonas*** de cualquier otra fuente de carbono diferente al polietileno, éstas comenzarán a utilizar dicho plástico como fuente principal de esto, logrando su degradación. Este proceso podría mejorarse al mezclar cepas de ***Pseudomona sp.*** con otras bacterias y hongos degradadores a fin de crear tapetes microbianos que optimizarán la descomposición del plástico. Se recomienda la separación de la basura, para que las bacterias enfoquen su acción degradante únicamente al polietileno y no a otras fuentes de carbono. (38)

## 2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES

### a) “Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno” (23)

La investigación tiene como objetivo aislar cepas de micromicetos capaces de degradar el polietileno, identificarlas, caracterizarlas y determinar las condiciones ambientales en las que se logra la mayor actividad biodegradadora. El método de estudio realizado fue del tipo correlacional, explicativo y prospectivo longitudinal, Se efectuó un muestreo no probabilístico intencional y en la recolección de datos se aplicó la técnica observacional, sistemática y estructurada. (23)

La biodegradación del polietileno por microorganismos es una solución para la reducción de la contaminación por plásticos. Los hongos fueron aislados de productos elaborados con polietileno obtenidos de relleno sanitario, la identificación taxonómica fue en base a características macroscópicas del crecimiento en placa petri y el estudio microscópico empleado fue la técnica de microcultivo en lámina. La actividad biodegradadora se determinó con la técnica de Kavelman y Kendrick, a temperaturas entre 20 y 30 °C y a pH 4,5 – 8,0. Veinte cepas de micromiceto fueron aisladas e identificadas, en 5 (25%) se evidenció la capacidad de biodegradar el polietileno a 20 °C, siendo el pH 6,5 el óptimo, la cepa de mayor rendimiento pertenece a la especie de ***Aspergillus flavus***. A temperatura de 30 °C, 6 (30%) las cepas evidenciaron actividad degradadora, siendo pH 6,5 el óptimo, la cepa de mayor rendimiento fue la misma del caso anterior. El proceso de biodegradación del polietileno fue mayor cuando se empleó la temperatura de 30 °C y las condiciones favorables de temperatura y pH pudieron haber facilitado el proceso de biodegradación. (23)

b) “Efecto de tratamientos fisicoquímicos y cometabolismo en la degradación de polietileno de baja densidad por hongos filamentosos” (44)

La investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de dos tipos de tratamiento fisicoquímico (temperatura y radiación gama) y del cometabolismo microbiano en la biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE) por acción de hongos filamentosos en medio líquido. El polietileno de baja densidad (LDPE) es uno de los polímeros más utilizados en la fabricación de productos que son desechados en corto tiempo, por lo que es uno de los principales componentes de la fracción de residuos plásticos en los desechos sólidos. Su degradación en la naturaleza implica varias décadas, sin embargo, es posible acelerarla provocando oxidación de la molécula. (44)

El método utilizado fue el analítico para evaluar los cambios morfológicos y estructurales en el LDPE, por efecto de los tratamientos biológicos, y periódicamente se tomaron muestras del polímero. Durante el presente trabajo se estudió la degradación, en medio líquido, de muestras pulverizadas de LDPE tratado fisicoquímicamente con temperatura (80 OC durante 15 y 75 días) o radiación gama (10, 15 y 20 Mrad). Las muestras se incubaron a 30 OC, durante 31 meses con cultivos puros de ***Aspergillus niger*** o ***Penicillium pinophilum***, o durante 27 meses con un cultivo mixto (***Aspergillus niger***, ***Penicillium pinophilum***, ***Aureobasidium pullulans***, ***Gliocadiumvirens***, ***Chaetomium globosum*** y ***Phanemchaetechrysosporum***). Ambos tipos de cultivo se incubaron en ausencia de sustratos (etanol o tolueno) en el medio, con el objeto de promover procesos cometabólicos y evaluar su efecto en la biodegradación. La degradación fisicoquímica y

biológica del LDPE se evaluó por cambios en la estructura química (FTIR) y en la morfología cristalina (DSC y XRD). La actividad biológica y la mineralización del LDPE, se determinaron por respirometría. En el tiempo final del estudio, las muestras se analizaron por SEM con el fin de detectar cambios superficiales. (44)

La exposición simultánea a temperatura o radiación y oxígeno dio como resultado la degradación oxidativa del polímero (detectada por cambios morfológicos y estructurales), lo que favoreció su biodegradación. El aumento en el tiempo del tratamiento térmico, así como en la dosis de radiación gama, provocaron aumentos significativos en la oxidación del LDPE. El porcentaje de cristalinidad del LDPE disminuye y el tamaño promedio de cristales aumenta, por efecto del tratamiento con microorganismos. Este resultado se atribuye al ataque de las regiones amorfas que limitan las partículas cristalinas, provocando además un aumento en el contenido de cristales pequeños y la disminución en el espesor de láminas amorfas y cristalinas del LDPE. Finalmente, en las conclusiones se demostraron que una oxidación inicial en la molécula de LDPE, así como la presencia de etanol como sustrato en el medio, favorecen su biodegradación por cultivos axénicos y por el cultivo mixto. La mayoría de las cepas fúngicas estudiadas poseen el sistema enzimático necesario para degradar oligómeros de LDPE (44).

**c) “Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima” (41)**

El presente trabajo tuvo como objetivo la búsqueda de microorganismos con capacidad biodegradativa sobre el polietileno de baja densidad (PEBD) y evalúa en condiciones controladas su

actividad. El método aplicado fue de recolección de muestras colectado de la plataforma. 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 ***Pseudomona ssp.*** MP3a y MP3b, ***Penicilliumsp.*** MP3a, ***Rhodotorulasp.*** MP3b, ***Hyalodendronsp.*** 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. (41)

Las conclusiones indicaron presencia de hongos en este tipo de consorcios, generando la posibilidad de una duda en cuanto a su capacidad degradativa; y es que son tan versátiles bioquímicamente, que podrían estar tomando como fuente de carbono, los productos de degradación de las demás cepas integrantes del consorcio, por lo cual, sería importante la elaboración de pruebas de biodegradación individualizadas para cada microorganismo encontrado. (41)

## **2.2. BASES TEÓRICAS**

### **2.2.1. FACTORES AMBIENTALES DE CRECIMIENTO MICROBIANO**

#### **DEFINICIÓN**

Son considerados parámetros físico-químicos, importantes para el desarrollo microbiológico y bioquímico (carbono de biomasa microbiana, respiración microbiana o diversas actividades enzimáticas). El conocimiento de estos factores ambientales permite controlar el crecimiento microbiano y estudiar la distribución ecológica de los microorganismos. La habilidad de algunos microorganismos para adaptarse a ambientes extremos e inhóspitos es realmente extraordinaria. Se encuentran en cualquier lugar. Muchos hábitats donde las bacterias pueden prosperar destruirían la mayoría del resto de microorganismos. Los microorganismos que crecen en condiciones tan extremas se suelen denominar extremófilos. Se revisará brevemente cómo afectan al crecimiento microbiano algunos de los más importantes factores ambientales. Un mayor énfasis se pondrá en el efecto del agua, pH y temperatura. (28)

El componente microbiológico es muy importante en el desarrollo y funcionamiento de los ecosistemas y su fertilidad, pues interviene tanto en el establecimiento de los ciclos biogeoquímicos, como en la formación de la estructura de los suelos. Los microorganismos y los productos de su metabolismo son los componentes vivos del suelo. Sin embargo, la medida de la actividad de estos microorganismos es difícil de evaluar debido a la compleja estructura de las comunidades que alberga y sus relaciones, sobre todo en función al ecosistema u otros factores de efecto dominante. Ya que los microorganismos reaccionan fácil y rápidamente a estímulos ambientales, los parámetros de efectos

específicos son difíciles de determinar en medio de un gran número de variables influyentes que pueden ser desconocidas o no constantes; la medición de CO<sub>2</sub> producido es una estimación de la actividad y, por lo tanto de la presencia microbiana, su actividad varía en función de muchos factores, como el uso del suelo, mineralogía, cobertura vegetal, prácticas de manejo, calidad de los residuos que entran al sistema, factores ambientales, entre otros. (28)

Los factores ambientales en la actividad microbiana, tales como temperatura, pH, humedad, disponibilidad de oxígeno, nutrientes inorgánicos y accesibilidad al sustrato, influyen en la descomposición de la materia orgánica.

Se clasifican en bióticos (suelo, capacidad metabólica del microorganismo, nutrientes, respiración y aireación) y abióticos (pH, temperatura y humedad) se consideraron los más trascendentes para el presente estudio siendo el caso de factores ambientales abióticos. Por todo lo anteriormente mencionado, se ha considerado el estudio a nivel de laboratorio para un adecuado manejo de dos variables ambientales conocidas, temperatura y pH, que influyen en las variaciones de actividad microbiana, estudiándose cada vez los efectos de la variación de cada una de estas variables, en condiciones estándares de los otras dos. (30)

## **2.2.2. FACTORES AMBIENTALES ABIÓTICOS**

### **a) pH**

La acidez o alcalinidad de un medio se expresa por su pH. Los hábitats en que crecen los microorganismos varían ampliamente desde valores de pH entre 1 y 2, en el extremo ácido, hasta pH entre 9 y 10, en algunos lagos y suelos alcalinos. Resulta

sorprendente que el pH afecte intensamente al crecimiento microbiano. Cada especie tiene un rango definido de pH para su crecimiento y un pH óptimo. Los acidófilos tienen un valor de pH óptimo de crecimiento entre 0 y 5.5; los neutrófilos entre 5.5; y los alcalófilos prefieren un rango de pH entre 8.5 y 11.5. Los alcalófilos extremos tienen un valor de pH óptimo de crecimiento de 10 a más. La mayoría de las bacterias y protozoos son neutrófilos. (37)

La mayor parte de los hongos prefiere estar en medios ligeramente ácidos, con valores de pH de 4 a 6; las algas prefieren también una ligera acidez. Existen numerosas excepciones a esta norma. Aunque los microorganismos crecen a menudo en medios con un amplio rango de pH, pero su tolerancia tiene un límite.

Las variaciones intensas, en el pH pueden dañar a los microorganismos alterando la membrana plásmática o inhibiendo la actividad de las enzimas y las proteínas transportadoras. En general los procariotas mueren si el pH interno desciende por debajo de 5.0 a 5.5. Los cambios en el pH externo pueden modificar la ionización de las moléculas de nutrientes. Disminuyendo, por ello, su disponibilidad para el organismo. Se han propuesto diversos mecanismos para el mantenimiento del pH neutro en el citoplasma. (37)

Parece ser que los neutrófilos intercambian protones por potasio mediante un sistema de transporte antiporte. Los acidófilos extremos mantienen su pH interno próximo a la neutralidad, intercambiando protones externos por iones de sodio internos. También los búferes internos pueden contribuir a la homeostasis del pH. Los microorganismos tienen que adaptarse a menudo a cambios ambientales de pH para sobrevivir.

Cuando el pH baja hasta valores de 5.5 a 6.0, *salmonela / typhimurium* y *E. Coli* sintetizan un grupo de nuevas proteínas como parte de la denominada respuesta de tolerancia un medio ácido. Si el pH externo disminuye a valores de 4.5 o inferiores, se sintetizan chaperonas como las proteínas de choque térmico. Probablemente, estas sustancias eviten la desnaturalización de las proteínas y faciliten de nuevo el plegamiento de las desnaturalizadas.

Los microorganismos cambian con frecuencia el pH de su propio hábitat, al producir productos residuales metabólicos ácidos o básicos. Los microorganismos fermentadores producen ácidos orgánicos a partir de hidratos de carbono, mientras que los quimiolitótrofos como *Thiobacillus* oxidan compuestos reducidos de azufre a ácido sulfúrico. Otros alcalinizan su ambiente produciendo amonio mediante la degradación de los aminoácidos. (28)

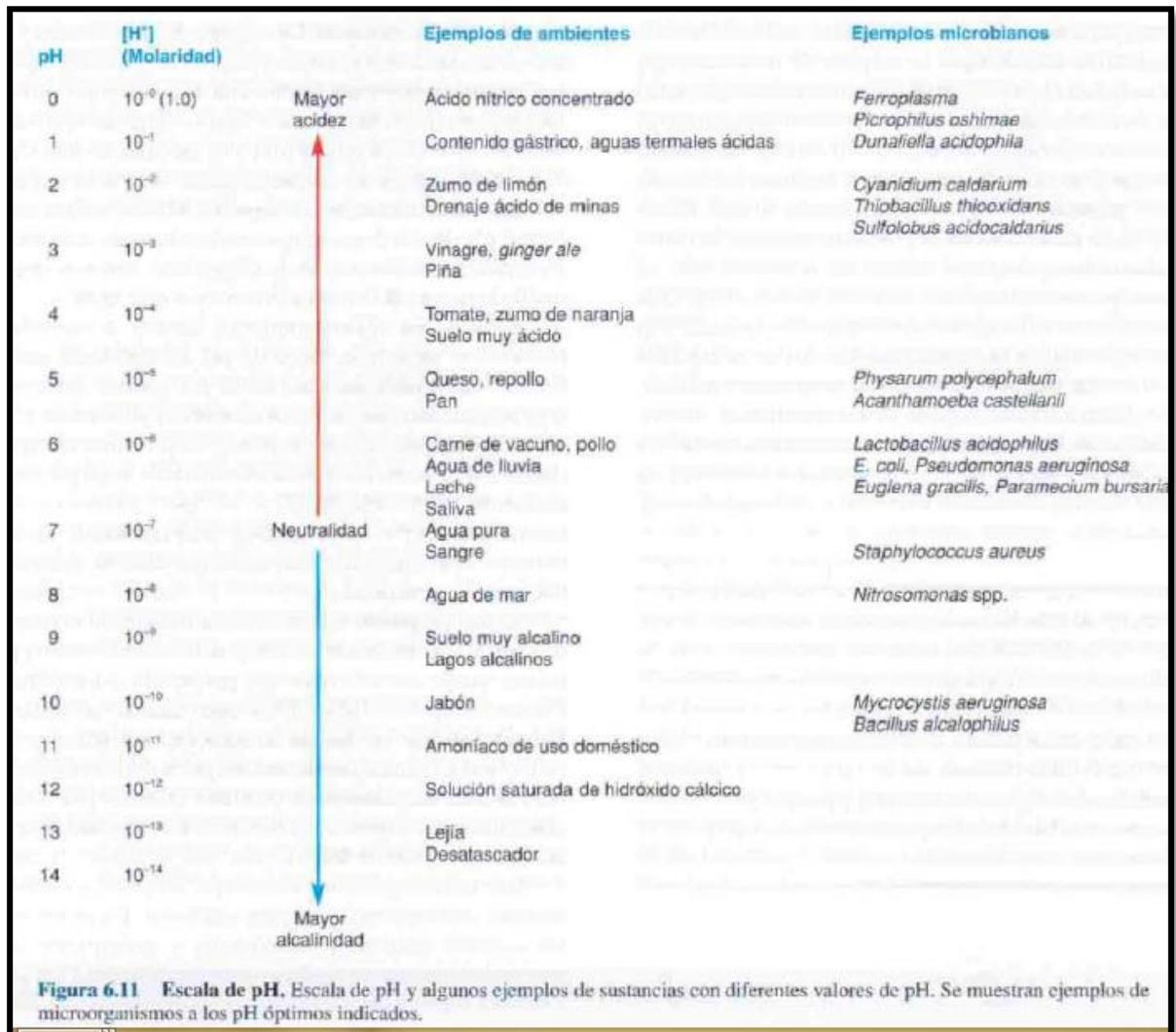
## POTENCIAL DE HIDRÓGENO

La concentración de iones de hidrógeno del medio afecta directamente a los microorganismos y enzimas, e influyen también en la disociación y solubilidad de moléculas que lo requieren. Se utilizó el instrumento de laboratorio llamado ph-metro y el instrumento de efecto pH que consta de un conjunto de pasos y procedimientos con los respectivos materiales.

El pH es un factor químico importante que influye en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, 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. Generalmente los suelos contaminados por hidrocarburos tienden a ser ácidos, lo cual limita el crecimiento y la actividad de las ***Pseudomonas***. 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. (14)

- Ácido pH<7
- Neutro pH=7
- Básico pH>7



**Figura 2. Escala de pH – Prescott et al. 2008**

## b) Temperatura

Cada microorganismo tiene una temperatura óptima en la cual su crecimiento es más rápido; una temperatura mínima por debajo de la cual no crece y una temperatura máxima por encima de la cual el crecimiento no es posible, estas tres temperaturas se denominan temperaturas cardinales y son características de cada microorganismo. El rango de temperaturas entre las que un microorganismo puede crecer es variable, hay microorganismos con un rango estrecho llamados estenotermes y se encuentran

en hábitat de temperatura relativamente constante. Los microorganismos de rangos más amplios se encuentran en medios ambientales donde la temperatura varía considerablemente y estos son llamados euritermales. (28)

La temperatura ambiental afecta intensamente a los microorganismos, así como al resto de organismos. De hecho. Los microorganismos son especialmente susceptibles porque son generalmente unicelulares y su temperatura varía con la ambiental. Por estas razones la temperatura de la célula microbiana refleja directamente la de su ambiente. Las reacciones catalíticas son las más vulnerables, ya que, el factor que más influye sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento es la termosensibilidad de las enzimas.

En condiciones por debajo de la temperatura óptima un aumento en la temperatura eleva la velocidad de crecimiento, porque la velocidad de una reacción catalizada por enzimas, como la de cualquier reacción química casi se duplica por cada aumento de temperatura de 10°C. Como la velocidad de cada reacción aumenta, el metabolismo en general es más activo a temperaturas altas y el microorganismo crece más rápidamente. A partir del punto (temperatura óptima), un mayor aumento disminuye la velocidad de crecimiento, y temperaturas más altas llegarán a ser letales. Las altas temperaturas ocasionan daños a los microorganismos y a desnaturalizar las enzimas, las proteínas transportadoras, y otras proteínas. El calor también deteriora las membranas microbianas; la doble capa lipídica puede fundirse y desintegrarse. (28)

Por ello, a pesar de que las enzimas funcionales actúan más rápidamente a temperaturas elevadas. El microorganismo puede

alterarse hasta el punto de inhibirse su crecimiento, porque el daño no puede repararse. A muy bajas temperaturas, las membranas acidifican y las enzimas no operan a gran velocidad. En definitiva, cuando los organismos están por encima de la temperatura óptima tanto la estructura como la función celular están afectadas, las temperaturas son muy bajas. Aunque la forma de la curva de dependencia de la temperatura puede variar, la óptima está siempre más próxima a la máxima que a la mínima. Las temperaturas cardinales de una especie en particular no son invariables, sino que dependen de los factores ambientales, como el pH y los nutrientes disponibles. De acuerdo con el rango de temperatura a la que crecen, los microorganismos se dividen en: (28)

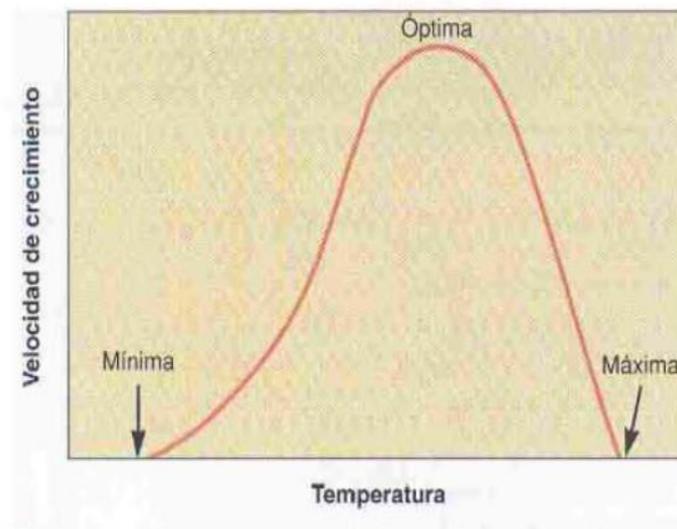
- Psicrófilos: microorganismos capaces de crecer a bajas temperaturas. Existen varias definiciones de psicrófilos, en un inicio se definía como psicrófilo a cualquier microorganismo que podía crecer a 0° C. Sin embargo, parecen haber dos grupos diferentes que pueden crecer a esa temperatura. El primer grupo está constituido por los psicrófilos estrictos o aquellos microorganismos que pueden crecer a 0° C, pero cuya temperatura óptima es de 15° C. El otro grupo los constituyen aquellos microorganismos que pueden proliferar a 0° C pero que tienen temperaturas óptimas más elevadas 20° - 30° C llamados psicrófilos facultativos. Ej. ***Pseudomonas***. (28)
- Mesófilos: microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra dentro de un rango de 25° – 40° C. Dentro de este grupo se encuentran la mayoría de los microorganismos contaminantes de los productos farmacéuticos, alimentos y cosméticos y los microorganismos patógenos para el hombre. Ej. ***Neisseria gonorrhoeae***. (28)

- Termófilos: microorganismos cuya temperatura óptima es de 50° - 60° C, hay algunos con temperaturas óptimas aún más altas 80° - 121° C, a estos se les denomina hipertermófilos o termófilos extremos. Ej. ***Thermus aquaticus*** (temperatura óptima 72° C; crece entre 50° - 80° C). (28)

Por ejemplo, ***Crihidia fascitulata***, protozoo flagelado que habita en el intestino de los mosquitos, crecerá en un medio simple entre 22° y 27° C. Sin embargo, no puede cultivarse a temperaturas de entre 33° y 34° C, sin añadir metales aminoácidos, vitaminas y lípidos. Las temperaturas cardinales varían ampliamente entre microorganismos. Las óptimas se encuentran normalmente en un rango de 0° C hasta un valor tan alto como 7.5° C, mientras que el crecimiento microbiano se produce en un rango de -20° C hasta más de 100° C. El principal factor que determina este rango de crecimiento parece ser el agua, ya que, incluso a las temperaturas más extremas, los microorganismos necesitan agua líquida para crecer. La temperatura de crecimiento de un microorganismo determinado abarca normalmente un margen de 30° C. (28)

La biorremediación llevada a cabo entre 20° C y 40° C muestra que este intervalo de temperatura es óptimo para la actividad microbiana, sin embargo, en climas tropicales es mejor una temperatura aproximadamente de 30° a 35° C para la actividad de las ***Pseudomonas***. La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de la misma es útil. Cuando la temperatura se incrementa en 10° C la biorremediación se duplica, pero se elevan los costos. Para mantener constante este factor se hace necesario cubrir la zona del derrame ya sea con paja, vegetación o plástico para conservar la radiación solar, o la utilización de electrodos enterrados en el suelo o la circulación

constante de agua caliente. Cuando se supera los 40° C se produce una disminución de la actividad microbiana, una rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas o puede decrecer la biorremediación debido a la desnaturalización de enzimas y proteínas de las bacterias. Cuando la temperatura está a 0° C se detiene esencialmente la biodegradación. Cuando ocurren derrames de petróleo en regiones cuyas temperaturas son entre 1° a 15° C se suelen usar microorganismos psicrófilos. (14)



**Figura 3. Efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento microbiano**

**Fuente: Prescott et al. 2008**

**Tabla 6.5** Rangos de temperatura para el crecimiento microbiano

Microorganismo	Temperaturas cardinales (°C)		
	Mínima	Óptima	Máxima
<b>Bacterias no fotosintéticas</b>			
<i>Bacillus psychrophilus</i>	-10	23-24	28-30
<i>Micrococcus cryophilus</i>	-4	10	24
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4	25-30	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.5	30-37	46
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	37	44
<i>Escherichia coli</i>	10	37	45
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	30	35-36	38
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	45	59	62
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	30	60-65	75
<i>Thermus aquaticus</i>	40	70-72	79
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	60	80	85
<i>Pyrococcus abyssi</i>	67	96	102
<i>Pyrodictium occultum</i>	82	105	110
<i>Pyrolobus fumarii</i>	90	106	113
<b>Bacterias fotosintéticas</b>			
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	SD*	30-35	SD
<i>Anabaena variabilis</i>	SD	35	SD
<i>Oscillatoria tenuis</i>	SD	SD	45-47
<i>Synechococcus eximius</i>	70	79	84

**Figura 4.** Rangos de temperatura para el crecimiento microbiano

Fuente: Prescott et al. 2008

### 2.2.3. DEGRADACIÓN

#### DEFINICIÓN

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 dicho test, por tanto, como un efecto y no una causa; sin embargo, es una característica potencial del material, en este caso un plástico. La degradación corresponde a un proceso de tipo químico y por lo tanto para los compuestos orgánicos la bibliografía define como degradación a la pérdida de átomos de carbonos, por ejemplo, la degradación de hidratos de carbono se concreta en una pérdida de

dióxido de carbono pasando a un hidrato de carbono inferior en su longitud de cadena. (39).

Existen tipos de degradación, entre ellas tenemos la termodegradación, fotodegradación, degradación química y la biodegradación. La termodegradación está sujeta a la alteración por altas temperaturas (generalmente superiores a 150°C). La fotodegradación el agente es la luz, que produce modificaciones en las estructuras del material que permiten la posterior degradación a otros compuestos más pequeños. Se dice que un plástico es fotodegradable cuando la degradación se produce, por tanto, como resultado de la acción de la luz natural. (39)

La acción continuada y directa de la radiación solar, superior en energía a la de muchos de los enlaces presentes en polímeros, conduce a reacciones fotoquímicas de ruptura y degradación, cuyos resultados son también alteraciones y cambios en propiedades ópticas y mecánicas. Son particularmente sensibles a la fotodegradación plásticos tipo PVC, poliolefinas, ésteres de celulosa, PS y poliamidas. En cuanto a la degradación química, existen dos principales formas: oxidación e hidrólisis. En el caso de la degradación química, son ciertos agentes químicos los que actúan sobre el plástico, es la descomposición natural y no contaminante de una sustancia o producto por la acción de agentes naturales, considerada también una degradación molecular de una sustancia orgánica mediante la acción compleja de organismos vivos entre ellos las bacterias. (21)

#### **2.2.4. BIODEGRADACIÓN**

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; sin embargo, el deterioro o la pérdida de la integridad física del polímero se ha confundido con biodegradación porque no hay un consenso en la definición de biodegradación de plásticos. No obstante, la biodegradación es un proceso biológico natural llevado a cabo por procesos bioquímicos y que puede ser clasificado en función al producto final. (44)

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 CO<sub>2</sub>, agua y nueva biomasa. (43)

#### **2.2.4.1. FUNDAMENTO BIOQUÍMICO DE LA BIODEGRADACIÓN**

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que, en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, se van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia. Los aceptores más

comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio. (13)

La concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes está influenciada por diversos factores:

- **Necesidad de nutrientes:** el metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y estos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y sintetización. Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno. Por lo general suele haber en el suelo una concentración de nutrientes suficiente, sin embargo, si estos no se encontrasen en el rango normal se puede adicionar mayor cantidad al medio. El rango normal de C:N:P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1.
- **pH del suelo:** afecta significativamente en la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el

transporte de metales pesados en el suelo. La acidificación o la reducción del pH en el suelo se puede realizar adicionando azufre o compuestos del azufre.

- **Temperatura:** generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15° y 45°C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40°C e inhibiéndose a inferiores a 0°C.
- **Humedad:** Los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo.

Ciertos microorganismos como es el caso de las bacterias producen una enzima que degrada o rompe los enlaces moleculares de los compuestos y los utiliza como fuente de carbono, el contaminante para el microorganismo es un alimento, aunque no la pueda utilizar en su totalidad, pero la modifica para que otro microorganismo que exista en el mismo medio la utilice. Se utiliza la habilidad de los microorganismos para degradar compuestos orgánicos. Esta tecnología está basada en el uso de organismos naturales o mejorados genéticamente para recuperar sitios contaminados y proteger el ambiente. (36)

El proceso de biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico en los siguientes tipos: fitorremediación, biorremediación animal y biorremediación microbiana y en esta última se basó el proceso de experimentación. (36)

Existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados. La utilización de microorganismos que transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo reciente. Aunque las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo. (36)

## **2.2.5. POLIETILENO**

### **DEFINICIÓN**

En la presente sección se hace referencia especialmente al polietileno debido al importante lugar que este ocupa como componente de los desechos sólidos plásticos, además de ser el objeto de este estudio.

Los polietilenos son importantes polímeros olefínicos, se engloban dentro de los polímeros de uso general. Presentan un rango amplio de propiedades que les hace útiles en aplicaciones muy variadas. La combinación de propiedades útiles, fabricación fácil y buenos aspectos económicos ha originado se les considere como

materiales comerciales. Son resinas termoplásticas producidas mediante procesos a alta y baja presión en los que se usan varios sistemas catalíticos complejos. (43)

Es un polímero de cadena ramificada, por lo que su densidad es más baja, se caracteriza por una buena resistencia química. El polietileno de baja densidad es un termoplástico comercial, semicristalino (un 50% típicamente), transparente y más bien blanquecino, flexible, liviano, impermeable, inerte (al contenido), no tóxico, tenaz (incluso a temperaturas bajas), con poca estabilidad dimensional, pero de fácil procesamiento y de bajo costo. Además, posee excelentes propiedades eléctricas (buen aislante eléctrico) pero con una resistencia débil a los cambios de temperatura. Su resistencia química también es muy buena, pero es propensa al agrietamiento bajo carga ambiental. Su resistencia a los rayos UV es mediocre y tiene propiedades de protección débiles, salvo con el agua. Buena dureza y resistente al impacto en bajas temperaturas. (20)

Según la industria de plásticos del Perú los polímeros se clasifican en termoplásticos cuya característica es que se reblandecen al ser calentados y pueden ser reprocesados fácilmente, son termoestables, tiene la característica que una vez moldeados no pueden ser reprocesados por calentamiento y finalmente los elastómeros, se comportan como los termoplásticos a temperaturas elevadas y como elastómeros a temperaturas bajas. Los termoplásticos de uso más general son:

- Polietileno tereftalato (PET)
- Polietileno (PE): LDPE y HDPE
- Polietileno lineal de baja densidad (LLDPE)
- Polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE)
- Cloruro de polivinilo (PVC)

El polietileno (PE), es un plástico compuesto por monómeros de oleofinas, que conjuntamente con el cloruro de polivinilo son los plásticos de mayor uso en el Perú y en el mundo; se utilizan principalmente en la fabricación de rollos de plástico transparente para envolturas, películas, tuberías y botellas de bebidas gaseosas. Los productos elaborados con polietileno presentan dos tipos de problemas: el deterioro cuando están siendo utilizados y la contaminación ambiental posterior a su uso. En este último caso debido a sus características de resistencia, no son degradados por los microorganismos del suelo y permanecen visibles en el medio ambiente por tiempo indefinido. (20)

Por otro lado, la industria de plásticos en el Perú da a conocer que los polietilenos de baja densidad son sintetizados a muy altas presiones (1200 – 1500 atm) y a una temperatura de 250°C. Este material sintético tiene una baja densidad, tiene una cadena ramificada que hace que disminuya su grado de cristalinidad y su densidad (0.91 – 0.94 g/cm<sup>3</sup>), pero le da una gran flexibilidad y cristalinidad.

## **HISTORIA**

El polietileno fue sintetizado por primera vez por el químico alemán Hansvon Pechmann, cuando sus colegas Eugen Bambergery y Friedrich Tschirner caracterizaron la sustancia grasosa y blanca que él creó, descubrieron largas cadenas compuestas por -CH<sub>2</sub> y lo llamaron polietileno. El 27 de marzo de 1933 fue sintetizado como lo conocemos hoy en día, por Reginald Gibsony y Eric Fawcetten en Inglaterra, quienes trabajaban para los Laboratorios ICI. Logrando aplicar una presión de aproximadamente 1400 bar y una temperatura de 170°C, donde en una autoclave fue obtenido el material de alta viscosidad y color blanquecino que hoy en día se conoce. La presión

requerida para lograr la polimerización del etileno era demasiado alta, por ello es que la investigación sobre catalizadores realizada por el Alemán Karl Ziegler y el italiano Giulio Natta, que dio origen a los catalizadores Ziegler-Natta valió el reconocimiento del más famoso premio a la ciencia a nivel mundial, el premio Nobel en 1963 por su aporte científico a la química, con estos catalizadores se logra la polimerización a presión normal.

#### **2.2.5.1. FACTORES QUE INCIDEN EN LA DEGRADACIÓN DE LOS POLIETILENOS**

- **Ramificación:** los polímeros ramificados contienen más átomos de hidrógeno terciarios que los materiales lineales puros, estos átomos son más vulnerables al ataque por radicales que los átomos de hidrógeno primarios o secundarios. De manera que un aumento en el grado de ramificación del polímero, aumenta su susceptibilidad a la degradación, debido a un proceso de autoxidación. La ramificación en las poliolefinas puede anular el efecto de cristalización.
- **Tipo de grupos y enlaces presentes:** en general la estabilidad de un polímero depende del tipo de enlaces químicos presentes en la estructura de la cadena principal. Esta varía con la naturaleza de los átomos presentes y con las fuerzas que interceden asociadas con estos enlaces. Por ejemplo: la presencia de dobles enlaces en la cadena polimérica favorece el mecanismo de degradación oxidativa, en donde los radicales libres pueden unirse.

- **Entrecruzamientos:** la rigidez de un polímero depende de la densidad de entrecruzamientos en la estructura. Un incremento en la densidad de entrecruzamientos provoca una mayor rigidez Z, por consiguiente, una mayor estabilidad térmica.
- **Grado de cristalinidad:** el aumento en el grado de cristalinidad de un polímero provoca una disminución en su susceptibilidad a la oxidación, y por consiguiente a la degradación. En general, el grado de oxidación es mayor en los polímeros amorfos que en los cristalinos. En el PE, el grado de oxidación es inversamente proporcional al grado de cristalinidad. La movilidad de radicales, así como la difusión de oxígeno y la solubilidad de gases son mayores en las regiones amorfas. Las fracciones cristalinas son inaccesibles al oxígeno.
- **Peso molecular:** en general los pesos moleculares altos incrementan la dureza y las propiedades (resistencia y estabilidad) de un polímero, es decir incrementan su resistencia a la degradación. Cualquier proceso que provoque un cambio en el peso molecular, puede alterar las propiedades del polímero significativamente.
- **Espesor de películas:** en general, un aumento en el espesor de una película o partícula polimérica disminuye la susceptibilidad, la oxidación y a la degradación.
- **Presencia de impurezas v contaminantes:** este tipo de compuestos, así como la presencia de irregularidades estructurales pueden dar inicio a acelerar la degradación de un polímero. (44)

### 2.2.5.2. REACCIONES INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACIÓN

- **Escisión de cadena principal y despolimerización:** involucra la ruptura de enlaces C-C en la cadena principal, lo que provoca una ruptura de la cadena polimérica produciéndose moléculas de estructura similar a la del polímero, pero de menor espesor molecular.
- **Escisión oxidativa:** se lleva a cabo por la ruptura de radicales alcoxi (ROO), es la reacción de escisión dominante a temperaturas moderadas o con altas concentraciones de oxígeno.
- **Entrecruzamientos:** son producidos por los mismos mecanismos de radicales involucrados en la degradación, ambos son procesos competitivos. Bajo condiciones de termooxidación, el proceso de entrecruzamiento en el PE, se atribuye a reacciones de adición de radicales alquilo (R.) a las insaturaciones olefínicas (vinilos (-CH=CH<sub>2</sub>), vinilidenos (>C=CH<sub>2</sub>)) que son producidas durante el proceso de polimerización.
- **Ramificación de cadenas:** es provocada por la termólisis y/o fotólisis de hidroperóxidos, da como resultado la formación de radicales alcoxi (iRO) e hidroxí (HO).
- **Eliminación:** da como resultado la formación de fragmentos de bajo peso molecular o de moléculas no relacionadas con el polímero original, por ejemplo, el ácido clorhídrico (PVC).

- **Sustitución:** la naturaleza química de las unidades repetidas puede cambiar debido a reacciones de los grupos sustituyentes en la cadena principal (anillos aromáticos, halógenos, etc.), aunque la estructura química permanece intacta. (44)

## 2.2.6. BACTERIA

### 2.2.6.1. DEFINICIÓN

Las bacterias son el grupo de organismos más abundantes en los suelos. Miles de especies han sido identificadas en suelos del mundo y la existencia de varios millones más de especies probablemente no han sido identificadas. El número de bacterias y la presencia de especies dominantes presentes es una función de las características del suelo y los ambientes específicos. Las bacterias son un grupo extremadamente diverso de organismos con variaciones extensivas de las propiedades morfológicas, ecológicas y fisiológicas y son los degradadores primarios de compuestos orgánicos naturales y xenobióticos encontrados en el suelo. Las bacterias se clasifican usando sus características físicas, químicas, genéticas y metabólicas. Entre otras propiedades, las bacterias tienen una pared celular de peptidoglicano que contiene ácido murámico o están relacionadas con bacterias que tienen este tipo de pared celular, y tienen lípidos de membrana con ácidos grasos de cadena recta con enlaces éster que se asemeja a los lípidos de la membrana de las células eucariotas. (42)

El uso y tolerancia al oxígeno es uno de los métodos más generales de clasificación. Los géneros más comunes de bacterias en el suelo son ***Pseudomonas, Arthrobacter, Achromobacter, Micrococcus, Vibrio, Acinefobacter, Brevibacterium, Crynebacterium y Flavobacterium***. El crecimiento celular se define simplemente como un incremento en el número de microorganismos por unidad de tiempo. El ciclo de crecimiento típico para una población bacteriana en un sistema discontinuo o cerrado consta de: fase de latencia, crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. El crecimiento mide el cambio en el número de células o en la masa celular. El número de células se mide de dos formas: medios de cultivo y microscopía. (42)

#### 2.2.6.2. **BIOLOGÍA**

El grupo de bacterias relacionadas con el género ***Pseudomonas*** es muy amplio y comprende especies patógenas para humanos ***Pseudomonas cepacia*** (patógeno oportunista que puede causar infecciones muy serias con alta tasa de mortalidad en pacientes comprometidos, especialmente han aumentado los datos de infecciones producidas en los pulmones de pacientes con fibrosis cística) y ***Ps. aeruginosa***. Hay especies patógenas vegetales como ***Ps. solanacearum*** que produce marchitación, ***Ps. syringae*** causante de manchas cloróticas en ciertas plantas y ***Ps. marginalis*** causante de pudriciones blandas en las raíces de las plantas.

Por otra parte, existen varios géneros bacterianos estrechamente relacionados con el de ***Pseudomonas*** que

también tienen una importancia especial: el género ***Xanthomonas*** comprende varias especies patógenas vegetales que producen necrosis del follaje. El género *Zooglea* comprende varias especies capaces de producir agregados celulares de gran tamaño que intervienen de forma importante en la digestión de las aguas orgánicas de ciudades e industrias, y los géneros ***Acetobacter*** y ***Gluconobacter***, de los que hablaremos más adelante, que son capaces de oxidar alcoholes y tienen importancia industrial en la fabricación de vinagre. (28)

### 2.2.6.3. TAXONOMÍA

Pertenece al rango taxonómico de protobacterias, clase III gamma proteobacterias. (28)

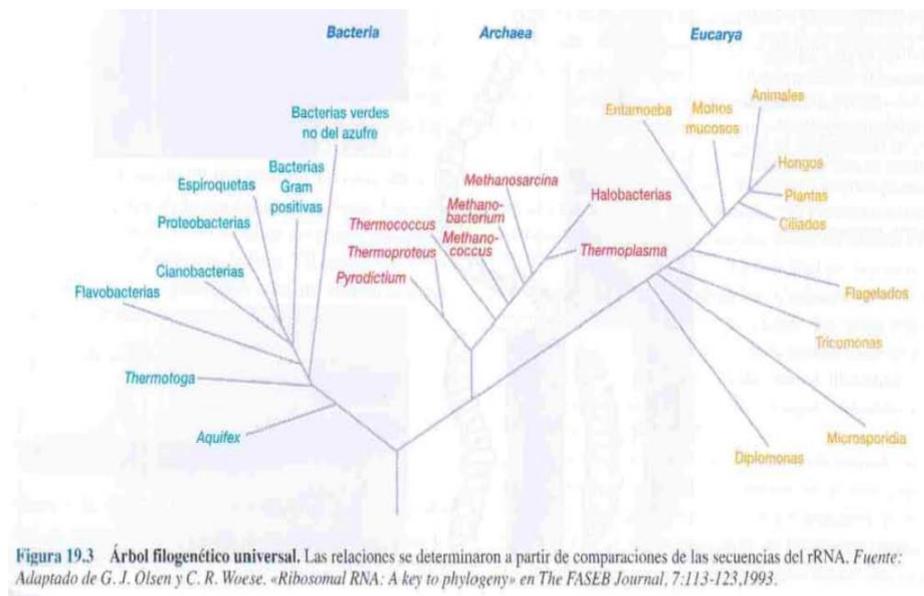
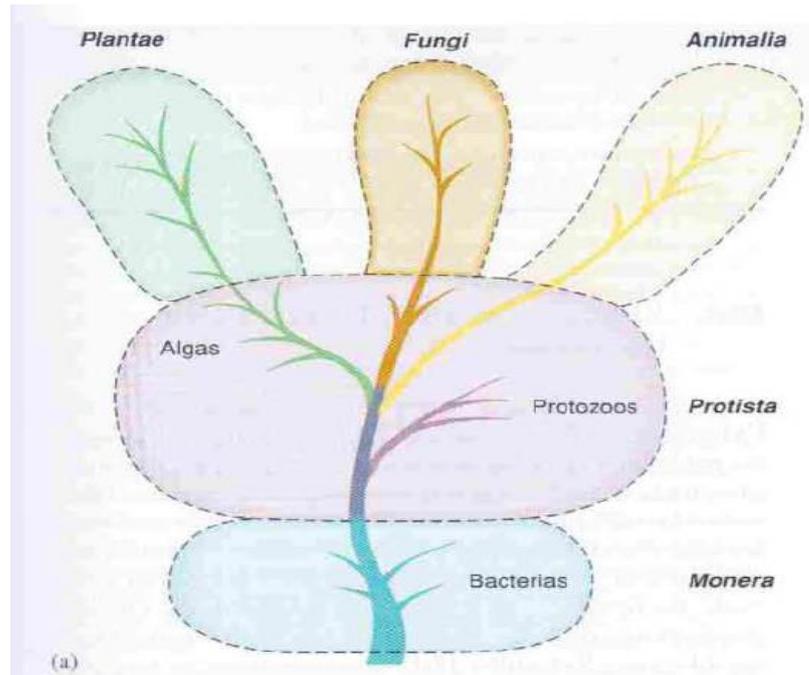


Figura 19.3. Árbol filogenético universal. Las relaciones se determinaron a partir de comparaciones de las secuencias de rRNA. Fuente: Adaptado de G. J. Olsen y C. R. Woese. «Ribosomal RNA: A key to phylogeny» en *The FASEB Journal*, 7:113-123, 1993.

**Figura 5. Comparación de bacteria, archea, eucarya**

**Fuente: Prescott et al. 2008**



**Figura 6. Sistema de filogenia de cinco reinos según Whittaker**  
**Fuente: Prescott et al. 2008**

**Tabla 2. Clasificación Taxonómica de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa***

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	
Dominio	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gamma - Proteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonaceae
Género	Pseudomonas
Especie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

**Fuente: Prescott et al. 2008**

### 2.2.7. GÉNERO PSEUDOMONA

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales*, este grupo es tradicionalmente, conocido por los microbiólogos como un grupo patógeno de plantas más que de animales. Se cree que el género fue presentado por primera vez en

1895 por Walter Migula en el *Bacteriologischen Institut der Technische Hochschule zu Karlsruhe* en una publicación que lleva por título "*Ueber ein neues System der Bakterien*", en donde describía y comparaba todas las bacterias conocidas hasta el momento. La descripción inicial de ***Pseudomonas*** por migula estaba basada únicamente en características morfológicas.

Dentro del género ***Pseudomonas***, de todas las especies que existen, la importante clínicamente es ***P. aeruginosa*** ya que esta especie tiene la capacidad de producir infecciones en humanos.

#### **2.2.7.1. Descripción general**

Son bacilos G(-), móviles con flagelos polares, aerobios estrictos, metabolismo oxidativo no fermentativo. Las bacterias del género ***Pseudomonas*** son muy ubicuas y se encuentran en suelos, aguas, y ambientes intrahospitalarios. Son muy resistentes a antibióticos lo que origina que los pocos patógenos que se dan en este género sean muy peligrosos. Contenido de guanina y citosina es de 58 a 70. (28)

Las bacterias del grupo al que pertenecen las ***Pseudomonas*** están constituidas por microorganismos Gram-negativos, siempre móviles con flagelación polar. Se encuentran normalmente en el suelo, aunque pueden ser patógenos oportunistas en animales (***Ps. aeruginosa***) y patógenos de plantas (***Ps. syringae***).

La principal especie es la ***Pseudomona aeruginosa***, crecen entre 10 y 42°. Muy repartidas por el medio: suelo, agua y de aquí pasan a las plantas o animales. En el

hombre son oportunistas. Los alimentos implicados: vegetales crudos, agua, leche no pasteurizada. (28)

Su metabolismo es siempre respiratorio, o bien aerobio (la mayoría usa como aceptor de electrones  $O_2$ ) o anaerobio (algunos usan  $NO^-$ ). Presentan una versatilidad metabólica muy grande que se traduce en su capacidad de utilizar como fuente de carbono substratos muy variados (hay especies, como *Ps. cepacia*, que pueden utilizar como nutrientes más de 100 compuestos químicos diferentes). Por otra parte, hay algunos individuos del grupo que son quimiolitótrofos usando  $H_2$  o  $CO$  como donadores de electrones. El metabolismo central de azúcares en este grupo se desarrolla por la vía de Etner-Doudoroff, y disponen de un ciclo de Ácidos Tricarboxílicos normal. (28)

Algunas *Pseudomonas* son capaces de llevar a cabo procesos de desnitrificación con lo que se empobrecen los suelos de nitrógeno utilizable desde el punto de vista agrícola. Este proceso de reducción del nitrógeno (que actúa como aceptor de electrones en un proceso de respiración anaerobia) se denomina reducción disimilatoria del nitrógeno. La versatilidad metabólica del grupo se debe a la presencia de un gran número de plásmidos que contienen operones inducibles para la síntesis de enzimas específicos que permitan catabolizar los compuestos presentes en el medio. Esto confiere una importancia grande a las bacterias del género *Pseudomonas* como digestores aerobios de materiales animales y vegetales, lo que contribuye al reciclaje biológico de materia orgánica. Algunas bacterias de este grupo producen pigmentos fluorescentes de colores amarillo-verdosos fácilmente

solubles en agua. Estos pigmentos actúan como sideróforos: moléculas cuya función es capturar el hierro del medio necesario para el metabolismo del microorganismo. (28)

El crecimiento de las poblaciones bacterianas en un sistema de cultivo cerrado (sin entrada ni salida de los componentes del sistema), está limitado por el agotamiento de los nutrientes o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Cuando las bacterias se siembran en el laboratorio en un medio líquido (por ejemplo, en un tubo de ensayo), se trata de un sistema cerrado de cultivo. Si se toman muestras a intervalos regulares en diferentes tiempos de incubación y se realiza un recuento del número de células viables por mililitro de cultivo, la representación gráfica de los datos (conteo de células viables en función del tiempo) dará la curva de crecimiento característica que consta de cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y muerte.

### **Capacidad metabólica del microorganismo**

En el proceso de biorremediación la degradación efectuada por las *Pseudomonas spp*, se debe tener en cuenta que al ser parte de una población nativa, está interactuando con otros microorganismos formando los llamados consorcios microbianos. Esta interrelación, que se fundamenta en que el cultivo mixto, crece a expensas de los contaminantes, mientras que *P. aeruginosa* GL1 degrada los metabolitos por la ruptura en la posición meta, estabilizando la población microbiana en el cultivo. Relaciones y condiciones naturales que han sido muy

difíciles de recrear en el laboratorio. Con referencia a la biomasa, se debe tener en cuenta la cinética de crecimiento del microorganismo obteniendo mayor rendimiento metabólico en la fase exponencial, debido a que el aumento de esta es un indicador del proceso de biorremediación. (14)

Se ha logrado estimar que la cantidad suficiente de microorganismos para efectuar en buenas condiciones un proceso de biodegradación es de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/g suelo y de heterótrofos totales de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g de suelo, capaces de metabolizar y mineralizar el contaminante a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  compuestos que permiten efectuar el reciclaje en el medio ambiente al ser fácilmente incorporados en los ciclos biogeoquímicos. La conformación genética de ***Pseudomonas*** es muy versátil; por poseer operones, elementos móviles como transposones y plásmidos, que permiten la transferencia de los genes y, por lo tanto, la rápida adaptación frente a la presencia de agentes contaminantes nuevos en un ecosistema en particular. Además, poseen genes que codifican para enzimas, con las que se lleva a cabo la mineralización del contaminante. (14)

Se ha estudiado la producción en la fase estacionaria de biosurfactantes o tensoactivos por parte de las ***Pseudomonas aeruginosa*** cuyo papel en la biorremediación es de solubilizar los compuestos hidrofóbicos. El proceso de biorremediación se inicia con la oxidación del anillo aromático mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno catalizado por una dioxigenasa. Sin embargo, este proceso puede ser limitado por la

estructura química del contaminante, ya que al incrementar la cantidad de enlaces y grupos funcionales o al polimerizarse resulta más difícil la incorporación al metabolismo bacteriano, especialmente cuando presentan grupos halógenos y metales pesados, catalogados como tóxicos para los microorganismos. (14)

### **Respiración y aireación**

La biorremediación es fundamentalmente un “proceso metabólico de transferencia de electrones”. La energía necesaria para el crecimiento microbiano se obtiene durante el proceso de oxidación de materiales reducidos, donde las enzimas microbianas catalizan la transferencia de los electrones. Este proceso se denomina “respiración microbiana”, y se basa en que, en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, producen una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico que es externo a la célula y actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia. Los aceptores más utilizados por los microorganismos en general y particularmente por las *Pseudomonas spp*, son el oxígeno y los nitratos. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, los microorganismos convierten en última instancia los contaminantes en dióxido de carbono, agua y masa celular microbiana de las *Pseudomonas* (mineralización) por enzimas oxigenasas. Sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono, se produce en condiciones reductoras o anaerobias. El

proceso de biorremediación aerobia y anaerobia puede esquematizarse de la siguiente manera. (14)



**Figura 7. Degradación Aerobia**  
**Fuente: elaboración propia**



**Figura 8. Degradación Anaerobia**  
**Fuente: elaboración propia**

El oxígeno generalmente es el mejor aceptor de electrones, es decir, el que produce la mayor energía libre en una reacción completa. En consecuencia, para un mismo sustrato orgánico, los microorganismos que emplean el oxígeno como agente oxidante pueden generar mayor energía que aquellos que emplean nitratos, sulfatos u otros aceptores de electrones alternativos, logrando de esta forma crecer a mayor velocidad, lo que implica un mayor consumo del sustrato. Por lo tanto la biorremediación aerobia es típicamente más eficiente que la biorremediación de contaminantes orgánicos en forma anaerobia. Para cuantificar el proceso se utiliza la medición del CO<sub>2</sub> producido por unidad de tiempo en un área determinada. Esta es una medida indirecta del proceso biodegradativo, cuyo objetivo es evaluar a través de métodos como el de respirometría, la actividad metabólica de los microorganismos del suelo durante el proceso de degradación de los compuestos orgánicos. (14)

Debido a la aireación del suelo estimula la actividad bacteriana. Se tienen en cuenta los siguientes factores: se

degradarán más fácilmente las moléculas más pequeñas (hasta CO<sub>2</sub>), siendo más fácilmente biodegradables los compuestos parafinados o de cadena lineal que los compuestos aromáticos. En general, son favorables los compuestos de alta volatilidad (presión de vapor mayor de 10 mm de Hg a 20°C). Los suelos deben contener bajos contenidos en arcilla y ser homogéneos, con un valor de permeabilidad al aire adecuado (> 10<sup>10</sup> cm<sup>2</sup>). Cuanto menor es la solubilidad de los contaminantes menor será la biodisponibilidad de los microorganismos. Los aportes de oxígeno deben ser suficientes, así como la existencia de fuentes de carbono, aceptores de electrones y energía que complementan el proceso. El residuo debe ser susceptible de biodegradarse biológicamente, y presentarse en una forma física a los microorganismos, es decir, que el producto obtenido de la biodegradación no vaya a ser más tóxico que el contaminante. (14)

## **CRECIMIENTO DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS**

### **FASE DE LATENCIA**

Las bacterias transferidas de un cultivo en fase estacionaria a un medio fresco, sufren un cambio en su composición química antes de ser capaces de iniciar la multiplicación. Hay aumento de los componentes macromoleculares y de la actividad metabólica, casi sin división celular, asociado a un incremento de la susceptibilidad a los agentes físicos y químicos. Por lo tanto, la mal llamada fase de latencia implica intensa actividad metabólica. (28)

## **FASE EXPONENCIAL**

Las células se dividen a velocidad constante, determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio. Existe gran aumento del número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial. Próximo al final de esta fase, se produce la liberación de exotoxinas por las bacterias que las producen. (28)

## **FASE ESTACIONARIA**

Eventualmente el agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos determinan el cese del crecimiento. Hay pérdida de células por muerte, la cual es balanceada por la formación de nuevas células. Cuando esto ocurre, el conteo total de células aumenta levemente, aunque el de las bacterias viables permanece constante. Hacia el final de esta etapa, puede ocurrir la esporulación en aquellas bacterias que poseen este mecanismo de resistencia. (28)

## **FASE DE MUERTE**

Luego de la fase estacionaria, la tasa de muerte se incrementa, el número de bacterias viables disminuye rápidamente y, por lo tanto, la curva de crecimiento declina. Las características de la curva de crecimiento pueden variar, dependiendo de las características propias del microorganismo, del estado metabólico del inóculo, del medio de cultivo y de las condiciones de incubación. Las condiciones físicas y químicas del medio donde el

microorganismo crece afectan las actividades de estos. La comprensión de cómo influye el ambiente en el crecimiento, nos ayuda a explicar la distribución de los microorganismos en la naturaleza y hace posible diseñar métodos que permitan estudiar y controlar el crecimiento bacteriano. Además, existen sistemas de cultivo abiertos que son poco usados en el laboratorio de microbiología clínica. El cultivo continuo (con aporte y salida de nutrientes y requerimientos a una tasa constante), permite mantener a las bacterias en una misma fase de crecimiento durante un largo período de tiempo (por ejemplo, en la fase estacionaria o en la exponencial). Dicha técnica es interesante por ejemplo para los procesos productivos. (28)

## **ENTORNO FÍSICO**

Los microorganismos, según interactúan entre sí y con otros organismos en los ciclos biogeoquímicos, también se ven influidos por el entorno físico inmediato, que puede estar en el suelo, el agua, los fondos marinos, las plantas o los animales. Por ello, es importante considerar estos entornos específicos en donde se producen estas interacciones entre organismos e incluso con el propio medio físico. (28)

## **MICROAMBIENTE Y NICHO**

La localización física específica de un microorganismo es su ambiente. En este microambiente físico, el flujo de los oxidantes, reductores y nutrientes requeridos puede estar limitado, al mismo tiempo, los productos de desecho del microorganismo puede que no

difundan adecuadamente e inhiban su propio crecimiento. Estos flujos y gradientes crean un nicho único, el cual incluye los microorganismos, su hábitat físico y las fuentes temporales disponibles de nutrientes para su desarrollo. (28)

## **BIOFILMS Y TAPETES MICROBIANOS**

Los microorganismos tienden a crear sus propios microambientes y nichos mediante la formación de biofilms, incluso sin disponer de entornos físicos estructurados. Estos sistemas microbianos organizados consisten en capas de células microbianas asociadas con superficies. Dichos biofilms constituyen un factor importante en casi todos los campos de la microbiología, estos se desarrollan cuando microorganismos se adhieren y forman una monocapa de células. (28)

### **2.2.8. BIOGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD POR LA BACTERIA PSEUDOMONA**

#### **2.2.8.1. DEFINICIÓN**

Proceso biológico metabólico enzimático realizado por microorganismos como bacterias los cuales secretan enzimas que se encargan de romper la estructura molecular del plástico degradándolo en el tiempo. (45)

### **2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS**

**Factores ambientales de crecimiento microbiano:** son considerados parámetros físico-químicos, importantes para desarrollo microbiológico y

bioquímico (carbono de biomasa microbiana, respiración microbiana o diversas actividades enzimáticas). (28)

**pH:** La acidez o alcalinidad de un medio se expresa por su pH. 37

**Temperatura:** cada microorganismo tiene una temperatura óptima en la cual su crecimiento es más rápido; una temperatura mínima por debajo de la cual no crece y una temperatura máxima por encima de la cual el crecimiento no es posible, estas tres temperaturas se denominan temperaturas cardinales y son características de cada microorganismo. (28)

**Biodegradación:** no obstante, la biodegradación es un proceso biológico natural llevado a cabo por procesos bioquímicos y que puede ser clasificado en función al producto final. (43)

**Polietilenos:** son polímeros olefínicos que se engloban dentro de los polímeros de uso general. Presentan un rango amplio de propiedades que les hace útiles en aplicaciones muy variadas. La combinación de propiedades útiles, fabricación fácil y buenos aspectos económicos ha originado se les considere como materiales comerciales. (43)

**Polietileno de baja densidad:** es un polímero de cadena ramificada, por lo que su densidad es más baja, se caracteriza por una buena resistencia química, es un termoplástico comercial, semicristalino (un 50% típicamente), transparente y más bien blanquecino, flexible, liviano, impermeable, inerte (al contenido), no tóxico, tenaz (incluso a temperaturas bajas), con poca estabilidad dimensional, pero de fácil procesamiento y de bajo coste. (43)

**Bacteria:** son los degradadores primarios de compuestos orgánicos naturales y xenobióticos encontrados en el suelo. (28)

**Pseudomonas:** son bacilos G(-), móviles con flagelos polares, aerobios estrictos, metabolismo oxidativo no fermentativo. Las bacterias del género ***Pseudomonas*** son muy ubicuas y se encuentran en suelos, aguas, y ambientes intrahospitalarios. Son muy resistentes a antibióticos lo que origina que los pocos patógenos que se dan en este género sean muy peligrosos. Contenido de guanina y citosina es de 58 a 70. (28)

***Pseudomona aeruginosa:*** especie de ***Pseudomona***, crecen entre 10° y 42°. Muy repartidas por el medio: suelo, agua y de aquí pasan a las plantas o animales. En el hombre son oportunistas y los alimentos implicados son: vegetales crudos, agua, leche no pasteurizada. (28)

**CEPA:** es una población de organismos que desciende de un único organismo o de un aislamiento en cultivo puro. (37)

## **CAPÍTULO III METODOLOGÍA**

### **3.1. MÉTODO Y ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1.1. MÉTODO GENERAL DE INVESTIGACIÓN**

El método de investigación utilizado es el universal “Método Científico”, ya que, mediante la formulación del problema, de las hipótesis y la interpretación de la data; se analizarán hechos y sucesos en forma metódica y secuencial cumpliendo con la comprobación de las hipótesis. (25)

#### **3.1.2. MÉTODO ESPECÍFICO**

La siguiente investigación fue realizada con el método experimental 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. (32)

### **3.1.3. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

La investigación corresponde al tipo de investigación aplicada que consiste en la utilización de los conocimientos prácticos, para aplicarlos, en la mayoría de los casos, en provecho de la sociedad. Según Hugo Sánchez y Carlos Reyes esta investigación es una puesta en práctica del saber científico.

### **3.1.4. NIVEL DE INVESTIGACIÓN**

La investigación corresponde al nivel explicativo porque se medirá el efecto de los factores ambientales de crecimiento bacteriano de pH y temperatura sobre la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en la ciudad de Huancayo.

## **3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

La presente investigación hizo uso del diseño experimental bajo condiciones controladas en laboratorio, para la obtención de resultados aplicables a la ejecución del proyecto, el diseño experimental se realizó de la siguiente manera:

### **EXPLICATIVO / EXPERIMENTAL:**

**GE: 0<sub>1</sub> X 0<sub>2</sub>**

**Donde:**

G.E. grupo experimental

01 Pretest

02 Postest

X: Manipulación de la variable independiente

### 3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

La presente investigación es experimental por ello no se tiene una población determinada de cepas de bacterias de *Pseudomonas* con la que se trabajó, su diseño muestral se presenta a continuación.

### 3.4. DISEÑO MUESTRAL

#### ETAPA 1: TOMA DE MUESTRA

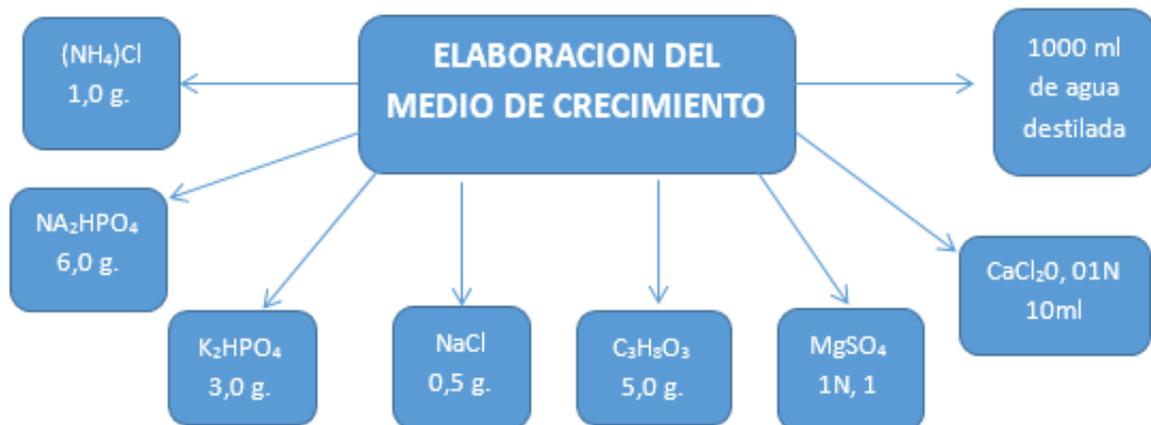
Para la toma de muestra de agua se consideró la cadena de custodia y las mejores condiciones de higiene, la muestra microbiológica se tomó en un frasco de vidrio esterilizado con la ayuda de una jarra de plástico esterilizada a una profundidad de 20 a 25 cm, la toma de muestra es directa dejando un espacio para la aireación y mezcla de 1/3 del frasco de muestreo. (50)

#### ETAPA 2: CRECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE LA BACTERIA *PSEUDOMONA AERUGINOSA*

A través de la investigación bibliográfica, el aislamiento inicial de la bacteria aeróbica *Pseudomona aeruginosa* se inició con el proceso de centrifugado a las muestras tomadas, se obtuvo 5 submuestras, así mismo se preparó un medio de crecimiento apto para el desarrollo de bacterias desintegradoras, el caldo M9 consta de una mezcla de los nutrientes necesarios para el correcto metabolismo de las bacterias *Pseudomona aeruginosa*, se registró el crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas, en donde se tomó como muestras positivas a las muestras que presentaron crecimiento desde las 24 horas de incubación. La muestra tomada producto del cultivo en caldo M9 se replicó en agar nutritivo como parte del aislamiento primario, de la misma manera las muestras consideradas positivas fueron las que no mostraron contaminación por mohos y hongos.

La muestra positiva tomada del producto del cultivo en Agar nutritivo fue inoculada en agar cetrimide como parte del aislamiento secundario, con 2 repiques posteriores para su correcta conservación, a una temperatura de 37°C y para su identificación se hizo coloración gram, de la misma manera las muestras que presentaron mejores características morfológicas y de color fueron consideradas muestras positivas.

Posteriormente se llevó la muestra que más características presentaba de ser la bacteria *Pseudomona aeruginosa* al hospital del Carmen con ayuda del instrumento VITEK II COMPACT se sometió a una última prueba de análisis final que comprobaría qué tipo de bacteria es (*Pseudomona aeruginosa*). Por esta razón resulta de gran importancia caracterizar desde el punto de vista fenotípico y serológico de cepas de *P. aeruginosa*. A la muestra sometida al análisis de identificación de bacterias, se le asignó por nombre cepa pura.

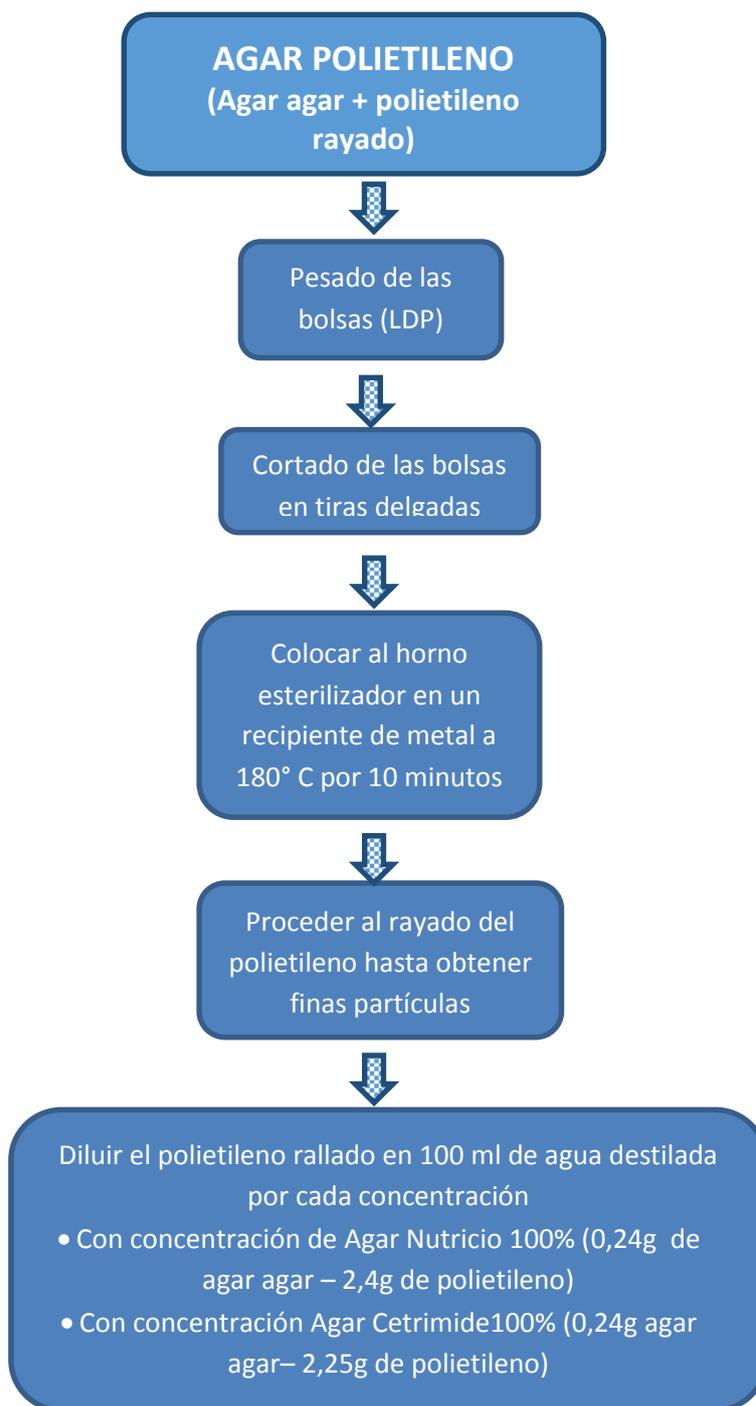


**Figura 9. Medio de crecimiento – Caldo M9**

**Fuente: elaboración propia**

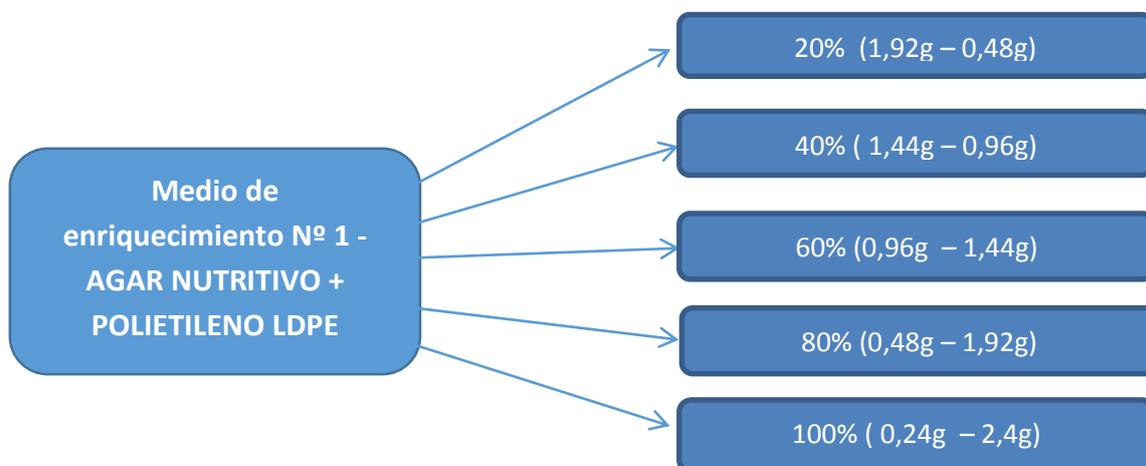
### ETAPA 3: ACONDICIONAMIENTO

Para la elaboración del medio de enriquecimiento se utilizó polietileno de baja densidad porque es uno de los plásticos que se encuentra en mayor cantidad y son los que más contaminan. El medio de enriquecimiento N° 1 se elaboró a partir de la unión de polietileno triturado con Agar Nutritivo, el medio de enriquecimiento N° 2 se elaboró a partir de la unión de polietileno triturado con Agar Cetrimide, las concentraciones de polietileno serán progresivas, iniciará con un 20%, 40%, 60%, 80% hasta llegar al 100% (ver cuadro 2 y 3), el objetivo de la variación de concentración de polietileno rallado es para familiarizar a la bacteria *Pseudomona aeruginosa* al contacto del polietileno de baja densidad y llegar a que el LDPE sea su única fuente de alimento. Contando con el medio anterior se comenzó a inocular las muestras de bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, Se realizó el primer acondicionamiento en medio de enriquecimiento N° 1; así mismo, se colocó en un horno bacteriológico a una temperatura de 37°C, se observó y se contaron las colonias, posteriormente se inocularon cepas de la placa que contenía polietileno al 100%, en el medio de enriquecimiento N° 2; así mismo, la muestra resultante se sometió a tinción con Hematoxilina y Eosina (tinción supravital) para una mejor observación de colonias.

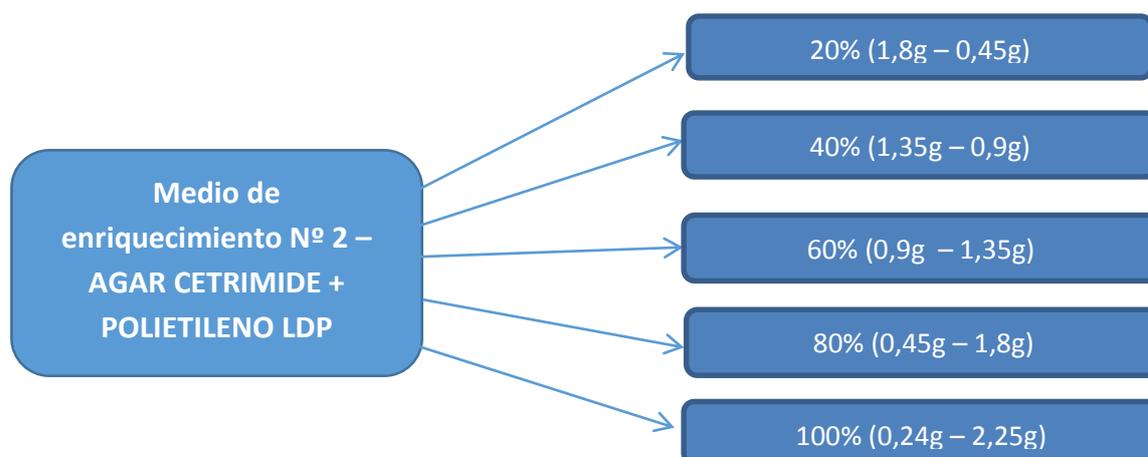


**Figura 10. Preparación de agar polietileno**

**Fuente: elaboración propia**



**Figura 11. Medio de enriquecimiento N° 1**



**Figura 12. Medio de enriquecimiento N° 2**

#### **ETAPA 4: VARIACIÓN DE PH Y TEMPERATURA**

Para la manipulación del factor ambiental de degradación microbiológica pH, se procedió a preparar Agar de Polietileno (ver figura 10), posteriormente se inició a la adición de los buffers para la variación de pH (9; 8; 7,5; 7; 6,5; 6; 5,5) para luego esterilizar, contando con el medio anterior se empezó a

inocular en las 8 placas a diferentes concentraciones de pH, se observó un mejor crecimiento a pH 8 e incubar a 37° C por 72 horas después se sometió a tinción, para ello se probó el colorante que más se adecúe a la bacteria *Pseudomona aeruginosa* la tinción más idónea fue el Lugol, para el conteo de colonias.

Finalmente, para iniciar la variación de temperatura se prepararon 5 placas que fueron incubadas al 20° C, 25° C, 30° C, 35°C y 40°C se tomó la muestra de la placa que presentó mayor crecimiento microbiano.

### 3.5. VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

**Variable independiente:** influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano pH, temperatura.

**Variable dependiente:** degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.6. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

#### 3.6.1. TÉCNICAS

#### TÉCNICA DE AISLAMIENTO POR ESTRÍA ESCOCESA O AGOTAMIENTO EN PLACA

La siembra por estría escocesa es un método cualitativo de aislamiento de microorganismos por agotamiento en placa a partir de una muestra natural o de un cultivo de laboratorio. Este método está basado en arrastrar, mediante un asa de siembra, un número cada vez más pequeño de individuos. Es un método rápido y simple de agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre un medio sólido contenido en una placa de Petri. El objetivo es obtener, a partir de un

elevado número de bacterias, un número reducido de ellas distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa. Al incubar la placa, y dejar crecer las bacterias distribuidas sobre ella, cada una de las bacterias originará una colonia. (8)

## **TINCIÓN GRAM**

Inicialmente, realizamos una observación directa del cultivo mixto al microscopio mediante la llamada tinción de Gram. Esta prueba es fundamental en la clasificación de los microorganismos ya que permite establecer diferencias morfológicas y estructurales de la pared. El alumno tendrá que distinguir el tipo de pared bacteriana (Gram positivo o Gram negativo) y la morfología bacteriana (cocos, bacilos u otros) de las diferentes bacterias contenidas en la mezcla problema. (8)

## **DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE MICROORGANISMOS**

El proceso de recuento tiene que iniciarse con la definición de microorganismos que tienen que ser cuantificados, hay que considerar que, si se tiene que hacer recuentos de todos los microorganismos o solo de ciertos grupos, si hay que realizar una conversión de número de microorganismos en una estima de la biomasa y en cuáles son las características del hábitat que deben ser examinadas. No se puede aplicar un método universal a cualquier tipo de microorganismo o hábitat: la diversidad de los microorganismos y de sus hábitats requiere enfoques metodológicos muy diferentes.

Hay dos enfoques principales para llevar a cabo el recuento de microorganismo: la observación directa (o recuento directo) o el uso de procedimientos indirectos (o recuentos viables). Ocasionalmente, el número de microorganismos también se calcula a partir de métodos

que determinan los constituyentes bioquímicos específicos de estos, aunque debería tenerse en cuenta que este método en realidad lo que mide es la cantidad de biomasa. Cada método posee ventajas y limitaciones. (41)

## **TÉCNICAS DE RECuento DIRECTO**

Métodos de recuento microscópico. Los microorganismos pueden contarse mediante la observación directa al microscopio. Los procedimientos de recuento directo dan la estimación más elevada del número de microorganismos y a veces se usan para el cálculo indirecto de la biomasa. La técnica a utilizar será D5465 de la ASTM Estándares americanos y métodos de prueba.

### **3.6.2. INSTRUMENTOS**

#### **CONTEO DE COLONIAS POR UFC (UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS)**

Representa cada colonia contada y su número total representa al número total de bacterias viables en la muestra, para ello se utilizó el método de extensión en placa.

$$\text{UFC/ml o UFC/g} = \text{N}^\circ \text{ de colonias por placa} \times \text{el factor de dilución/ ml de la muestra sembrada}$$

#### **EQUIPO CONTADOR DE COLONIAS**

El conteo de colonias para laboratorio de microbiología, está diseñado para el conteo rápido y preciso de las colonias de bacterias y moho en placas de cultivo. Permite el conteo de las colonias de bacterias por cada pulsación del contador quedando grabada en la

pantalla digital de tres (3) dígitos hasta un total de 999 colonias. Provisto de luz blanca que ilumina directamente desde abajo, lo cual permite una óptima visualización de las cajas petri con cultivos o colonias de bacterias de colores diferentes. (*Manual Colony Meter, Kerlaboratory*)

## **POTENCIÓMETRO**

Se aplicó el Potenciómetro para medir el indicador de pH en las muestras y la observación fue directa.

- Ácido
- Neutro
- Básico

### A) Encender el medidor y comprobar estado de las pilas

- Mantenga pulsado el botón MODE durante 2-3 segundos
- Todos los segmentos utilizados en pantalla serán visibles durante breves segundos, seguido de una indicación porcentual del nivel de pilas restante. P. Ej. % 100 BATT. (*Manual pH HI 98127*)

### B) Toma de mediciones

- Seleccione el modo pH mediante el botón SET/HOLD
- Sumerja el electrodo en la solución a analizar
- Las mediciones deberán tomarse cuando desaparezca el símbolo de estabilidad  $\checkmark$  en la parte superior izquierda de la pantalla
- El valor pH con compensación automática de temperatura se muestra en la pantalla primaria mientras que la pantalla secundaria muestra la temperatura de la muestra

### C) Notas

- Antes de realizar cualquier medición cerci6rese de que el medidor ha sido calibrado
- Para eliminar una calibraci6n previa, pulse el bot6n MODE tras entrar en modo calibraci6n. La pantalla inferior mostrar6 ESC durante 1 segundo y el medidor volver6 a modo medici6n normal. El s6mbolo CAL desaparecer6 de pantalla. El medidor se resetear6 a la calibraci6n por defecto
- Si se realizan mediciones sucesivas en diferentes muestras, lave la sonda minuciosamente para eliminar la contaminaci6n cruzada; y tras la limpieza, enjuague la sonda con parte de la muestra a analizar

### **BALANZA ANAL6TICA**

Balanza port6til digital. Sensibilidad 0.01g. Calibraci6n externa. Unidades de pesaje: g, oz, oz t, dwt. Modos de pesaje: conteo de piezas con reajuste de apw, porcentual, totalizaci6n y resultado sostenido. Di6metro del plato para muestra: 12cm. Temperatura de operaci6n 10 a 40°C. Pantalla LCD de alto contraste con 6 d6gitos y 15mm de altura. Incluye: adaptador AC. Peso 700g

Dimensiones 21\*19.2\*5.4cm. (*Manual Modelo SCOUT PRO. Marca OHAUS*)

### A) Pesaje

- Para la estabilizaci6n se necesita un periodo de precalentamiento de 1 hora a 4 horas (modelos d = 0,01 mg)
- Encender la balanza con la tecla [ON/OFF]. La balanza efectúa un autotest

- En cuanto aparezca "0.0000 g" en la pantalla, la balanza estará lista para realizar pesajes

B) Nota:

- Mediante la tecla [TARE] la balanza se puede reponer a cero en cualquier momento
- Poner el material a pesar, esperar que aparezca la visualización de parada después leer el resultado de pesaje

C) Taraje

- El peso propio de algunos recipientes de pesaje se puede deducir mediante el apriete del botón para que en los pesajes siguientes se indique solo el peso neto del material que se va a pesar
- Colocar el recipiente a tarar vacío sobre el platillo de pesaje. El peso total del recipiente es indicado en la pantalla
- Apriete la tecla [TARE] para iniciar el proceso de taraje. El peso del recipiente ahora está almacenado en memoria
- Coloque el material a pesar en el recipiente de taraje
- Lea ahora el peso del material a pesar en el indicador

## **LÁMPARA UV 366 NM/113203**

### Empleo e interpretación

- Inocular la superficie del medio de cultivo, con cultivos, se sospecha que contiene *Pseudomonas* de modo que las colonias individuales se desarrollan. Incubación: hasta 7 días a 35 ° C
- Compruebe para el crecimiento bacteriano después de 24, 48 y 72 horas y después de 6 días

- ***Pseudomonas aeruginosa*** puede crecer en ***Pseudomonas*** Agar P forman colonias rodeadas por un color azul para zona verde debido a formación piocianina o con un rojo a la zona de color marrón oscuro, debido a producción pyorubin. Los pigmentos de color pueden ser extraídos con cloroformo.
- Según Blazevic et al. (1973), ***pyocyanin negative*** atípico, fluoresceína positiva de ***Ps. aeruginosa*** cepas pueden ser diferenciado de ***Ps. fluorescens*** y ***Sal. putida***. Brodsky y Nixon (1973) informó que la fluorescencia de ***Ps. aeruginosa*** en colonias es luz ultravioleta; el siguiente crecimiento sobre Mac Conkey agar puede ser explotado para proporcionar una prueba de orientación rápida, ***Ps. fluorescencia*** y ***Sal. putida No fluorescens*** y mostrar solo escaso crecimiento. (51)

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. RESULTADO DEL TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

##### AISLAMIENTO DE LA BACTERIA *PSEUDOMONA AERUGINOSA*

**Crecimiento y enriquecimiento de bacterias.**

*Tabla 3. Inoculación de bacterias de la muestra de agua en el CALDO M9*

INOCULACIÓN DE BACTERIAS - MUESTRA DE AGUA (Caldo M9)			
CULTIVO N° 1	Tubo n°1		
	24 horas	48 horas	72 horas
	No	No	No
	Tubo n°2		
	24 horas	48 horas	72 horas
	Si	Si	Si
	Tubo n°3		
	24 horas	48 horas	72 horas
	Si	Si	Si
	Tubo n°4		
	24 horas	48 horas	72 horas
	No	Si	Si
	Tubo n°5		
	24 horas	48 horas	72 horas
	No	No	Si

*Fuente: elaboración propia*

Para el proceso de inoculación en el medio de crecimiento – Caldo M9 se preparó 5 tubos con muestras como se observa en la Tabla N° 3, se registró si hubo crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas, siendo consideradas muestras positivas el tubo N° 2 y N° 3; sin embargo, las muestras 4 y 5 presentaron crecimiento microbiano posteriores a las 24 horas los cuales no se consideraron muestras positivas infiriendo una posible contaminación de las mismas luego del primer registro.

**Aislamiento primario con agar nutritivo para la identificación de colonias de bacterias.**

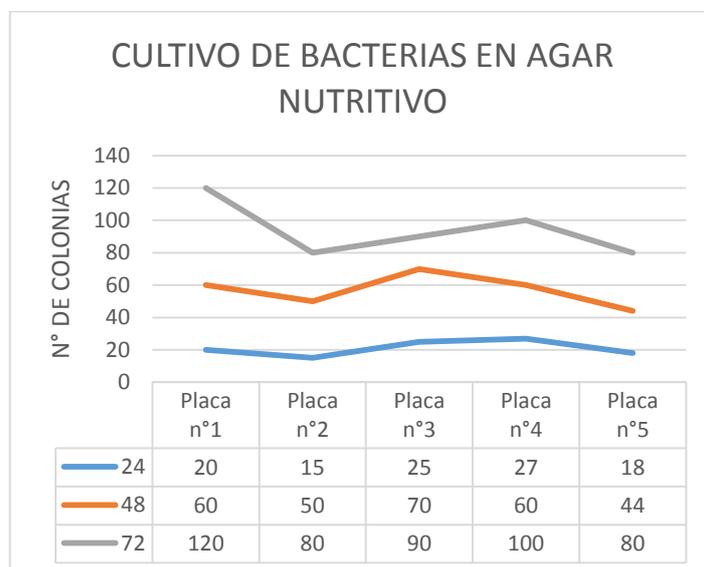
*Tabla 4. Cultivo de bacterias en agar Nutritivo*

<b>CULTIVO DE BACTERIAS – EN AGAR NUTRITIVO</b>				
<b>CULTIVO N° 1</b>	Placa n°1			Contaminación del medio de cultivo
	24 horas	48 horas	72 horas	
	20	60	120	Si
	Placa n°2			Si
	24 horas	48 horas	72 horas	
	15	50	80	
	Placa n°3			No
	24 horas	48 horas	72 horas	
	<b>25</b>	<b>70</b>	<b>90</b>	
	Placa n°4			No
	24 horas	48 horas	72 horas	
	<b>27</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	
	Placa n°5			Si
	24 horas	48 horas	72 horas	
	18	44	80	

*Fuente: elaboración propia*

Para el proceso de aislamiento primario con agar nutritivo para la identificación de colonias, se preparó 5 placas como se muestra en la Tabla N°4, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas siendo consideradas muestras positivas las que no fueron contaminadas por mohos,

hongos y otros, entre ellas las placas N° 3 y N° 4 con  $9 \times 10^6$  UFC y  $10 \times 10^6$  UFC respectivamente para las 72 horas.



**Figura 13. Cultivo de bacterias en agar Nutritivo**

*Fuente: elaboración propia*

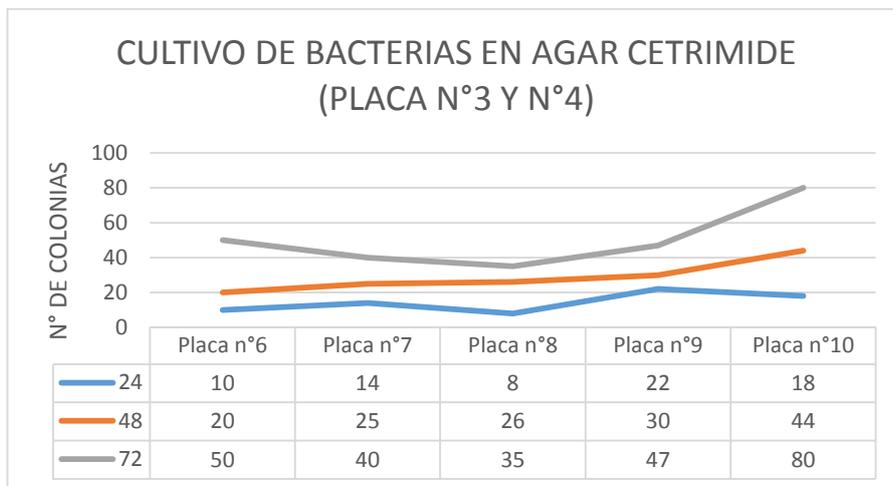
**Aislamiento secundario con agar cetrimide para la identificación de colonias de *Pseudomona aeruginosa***

**Tabla 5. Cultivo de bacterias en Agar Cetrimide**

<b>CULTIVO DE BACTERIAS EN AGAR CETRIMIDE (Placa N°3 y Placa N°4)</b>			
<b>AISLAMIENTO</b>	Placa n°6		
	24 horas	48 horas	72 horas
	10	20	50
	Placa n°7		
	24 horas	48 horas	72 horas
	14	25	40
	Placa n°8		
	24 horas	48 horas	72 horas
	8	26	35
	Placa n°9		
24 horas	48 horas	72 horas	
20	30	47	
Placa n°10			
24 horas	48 horas	72 horas	
<b>18</b>	<b>44</b>	<b>80</b>	

*Fuente: elaboración propia*

Para el proceso de aislamiento secundario con agar cetrimide para la identificación de colonias de *Pseudomona aeruginosa*, se preparó 5 placas como se muestra en la Tabla N° 5, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas siendo considerada muestra positiva la que presentó mejores características morfológicas y de color para la identificación de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* la que resultó ser la placa N° 10, con  $8 \times 10^6$  UFC para las 72 horas.



**Figura 14. Cultivo de bacterias en agar Cetrimide**

**Fuente: elaboración propia**

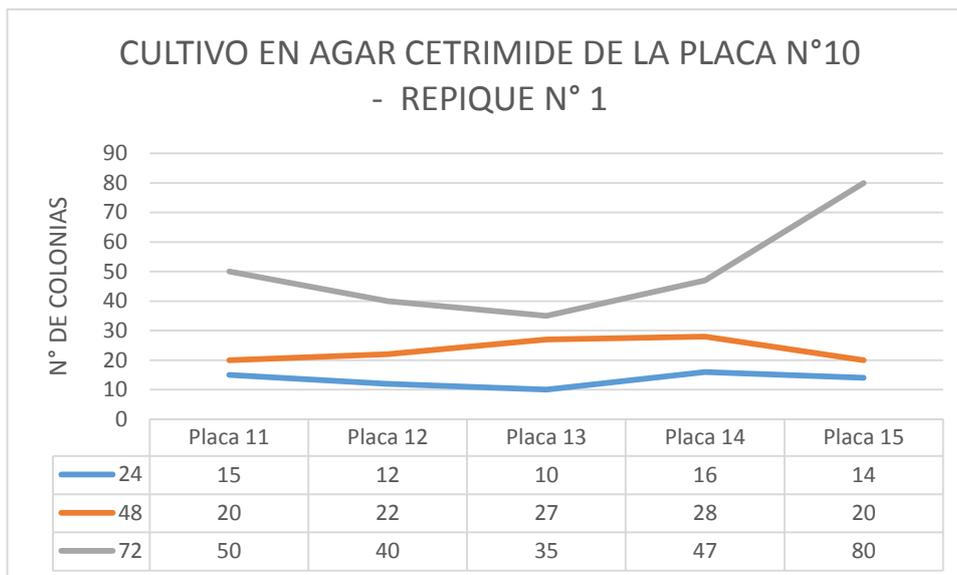
## Repiques de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* para su conservación

**Tabla 6. Bacterias en Agar Cetrimide Repique N° 1**

CULTIVO EN AGAR CETRIMIDE DE LA PLACA N° 10			
REPIQUE N°1	Placa n°11		
	24 horas	48 horas	72 horas
	15	20	50
	Placa n°12		
	24 horas	48 horas	72 horas
	12	22	40
	Placa n°13		
	24 horas	48 horas	72 horas
	10	27	35
	Placa n°14		
	24 horas	48 horas	72 horas
	16	28	47
	Placa n°15		
	24 horas	48 horas	72 horas
	<b>14</b>	<b>20</b>	<b>80</b>

**Fuente: elaboración propia**

Para el proceso de la conservación de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Agar Cetrimide se preparó 5 placas como se muestra en la Tabla N° 6, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas siendo consideradas muestras positivas la que presentó mejores características morfológicas y de color la que resultó ser la placa N° 15, con  $8 \times 10^6$  UFC.



**Figura 15. Cultivo de bacterias en agar cetrimide Repique N° 1**

*Fuente: elaboración propia*

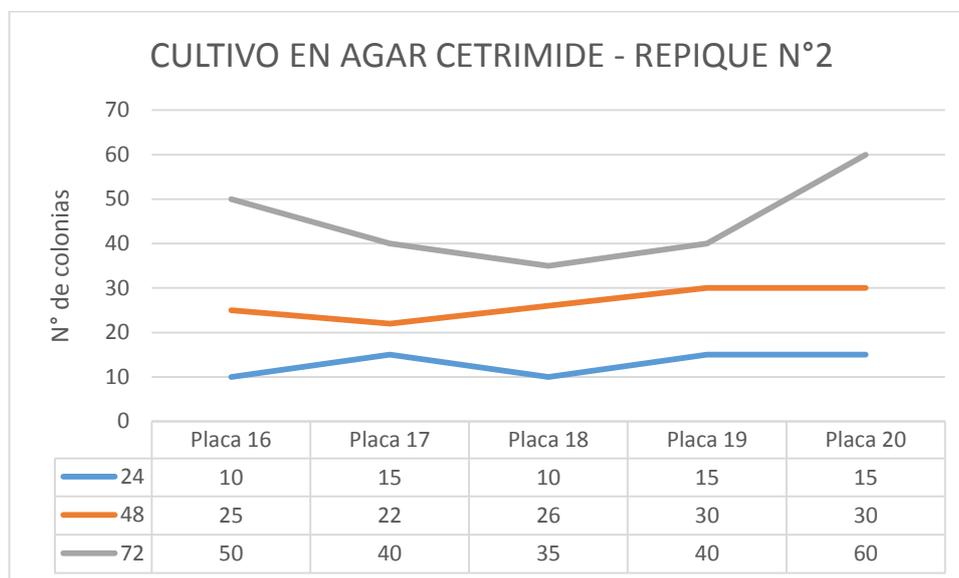
**Tabla 7. Cultivo de bacterias en agar cetrimide Repique N° 2**

<b>CULTIVO EN AGAR CETRIMIDE DE LA PLACA N° 15</b>			
<b>REPIQUE N°2</b>	Placa n°16		
	24 horas	48 horas	72 horas
	10	25	50
	Placa n°17		
	24 horas	48 horas	72 horas
	15	22	40
	Placa n°18		
	24 horas	48 horas	72 horas
	10	26	35
	Placa n°19		
	24 horas	48 horas	72 horas
	15	30	40
Placa n°20			
24 horas	48 horas	72 horas	
<b>15</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	

*Fuente: elaboración propia*

Para el proceso de conservación de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* en Agar Cetrimide se preparó 5 placas como se muestra en la Tabla N° 7, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas siendo consideradas muestra positiva la que presentó mejores características

morfológicas y de color la que resultó ser la placa N° 20 con  $6 \times 10^6$  UFC a las 72 horas.



**Figura 16. Cultivo de bacterias en Agar Cetrimide Repique 2**

**Fuente: elaboración propia**

### **ANÁLISIS DE VALIDACIÓN DEL AISLAMIENTO DE LA BACTERIA *PSEUDOMONA AERUGINOSA*.**

De la placa N° 20 se identificó una colonia con las mejores características morfológicas y de color que identifica a la bacteria ***Pseudomona aeruginosa***, de la cual se sacó una muestra y se llevó al hospital de El Carmen para validar el aislamiento con ayuda del instrumento VITEK II COMPACT comprobando que la bacteria aislada era la ***Pseudomona aeruginosa*** al 100% (Ver Anexo 8), a la muestra sometida al análisis de validación, se le asignó por nombre cepa pura.

Acondicionamiento de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* para el consumo del agar hecho a base de agar Nutritivo y polietileno.

Tabla 8. Cultivo en medio de enriquecimiento N° 1

CULTIVO EN MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO N°1			
% DE POLIETILE NO	CEPA PURA		
	NO	24	48
20%	60	75	86
40%	40	60	82
60%	30	58	67
80%	0	12	28
100%	0	0	10

Fuente: elaboración propia

Se sometió a la cepa pura a un acondicionamiento de agar nutritivo con polietileno a diferentes concentraciones tal como muestra la Tabla 8, donde se observa un crecimiento de colonias en el agar con 100% de contenido de polietileno, con una cantidad de colonias de  $1 \times 10^6$  UFC a las 72 horas de registro.

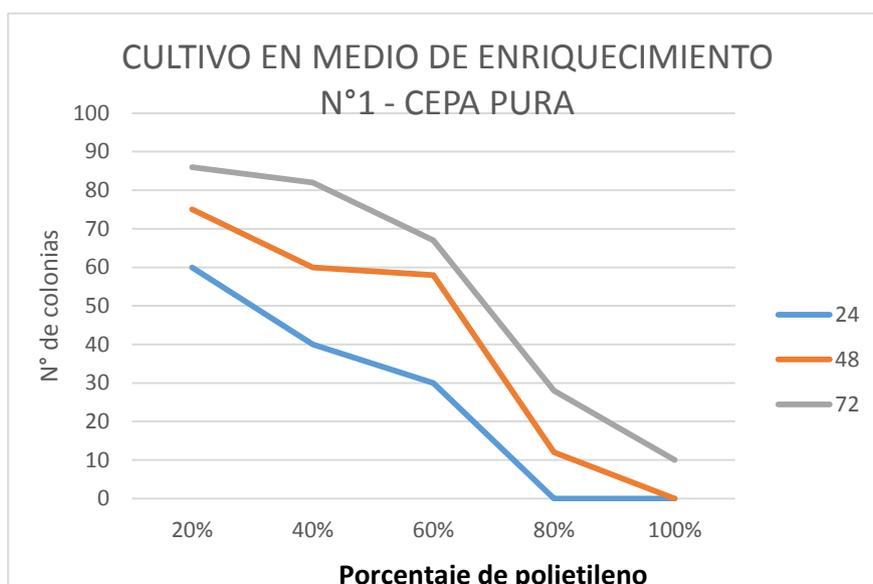


Figura 17. Cultivo en medio de enriquecimiento N° 1 – cepa pura

Fuente: elaboración propia

**Acondicionamiento de la bacteria *Pseudomona aeruginosa* para el consumo del agar hecho a base de Cetrimide y polietileno.**

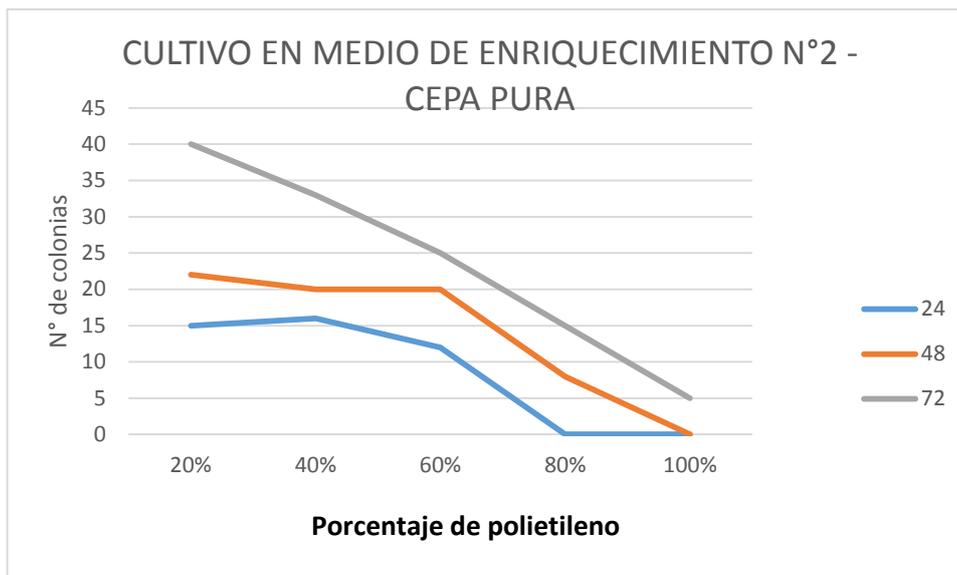
Las colonias que se acondicionaron a un agar al 100% de contenido de polietileno fueron sometidas a un segundo acondicionamiento en agar hecho a base de Cetrimide y polietileno para lograr las condiciones de aislamiento diferencial.

**Tabla 9. Cultivo en medio de enriquecimiento N° 2**

<b>CULTIVO EN MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO N°2</b>			
<b>% DE POLIETILE NO</b>	<b>CEPA PURA</b>		
	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>20%</b>	15	22	40
<b>40%</b>	16	20	33
<b>60%</b>	12	20	25
<b>80%</b>	0	8	15
<b>100%</b>	0	0	<b>5</b>

**Fuente: elaboración propia**

Se sometió la cepa pura a un acondicionamiento de agar Cetrimide con polietileno a diferentes concentraciones tal como muestra la Tabla 9, donde se observa un crecimiento de colonias en el agar con 100% de contenido de polietileno, con una cantidad de colonias de  $0.5 \times 10^6$  UFC a las 72 horas de registro.



**Figura 18. Cultivo en medio de enriquecimiento N° 2 – cepa pura**

*Fuente: elaboración propia*

### Influencia de la variación de pH y temperatura en el crecimiento de la bacteria *Pseudomona aeruginosa*

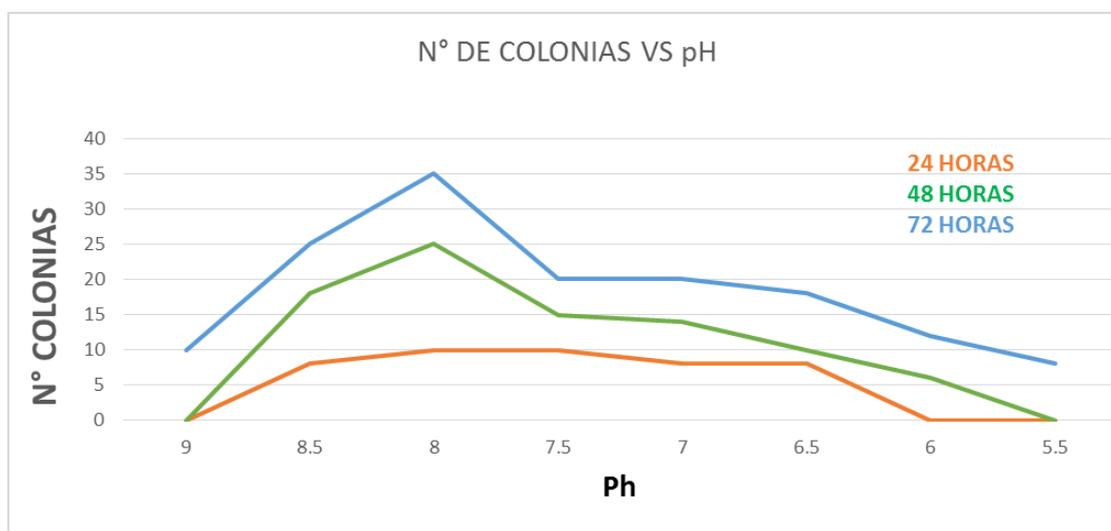
**Tabla 10. Cultivo en medio de Agar Polietileno – variación de pH**

CULTIVO EN MEDIO DE AGAR POLIETILENO			
Ph	CEPA - PURA		
	24	48	72
9	0	0	10
8.5	8	18	25
8	10	25	35
7.5	10	15	20
7	8	14	20
6.5	8	10	18
6	0	6	12
5.5	0	0	8

*Fuente: elaboración propia*

Para el proceso de Cultivo en medio de Agar Polietileno se preparó 8 placas a diferentes concentraciones de pH como se muestra en la Tabla N°

10, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas en todas las placas, sin embargo, se observó un mejor crecimiento a pH 8 con  $3.5 \times 10^6$  UFC a las 72 horas.



**Figura 19. Numero de colonias vs pH**

*Fuente: elaboración propia*

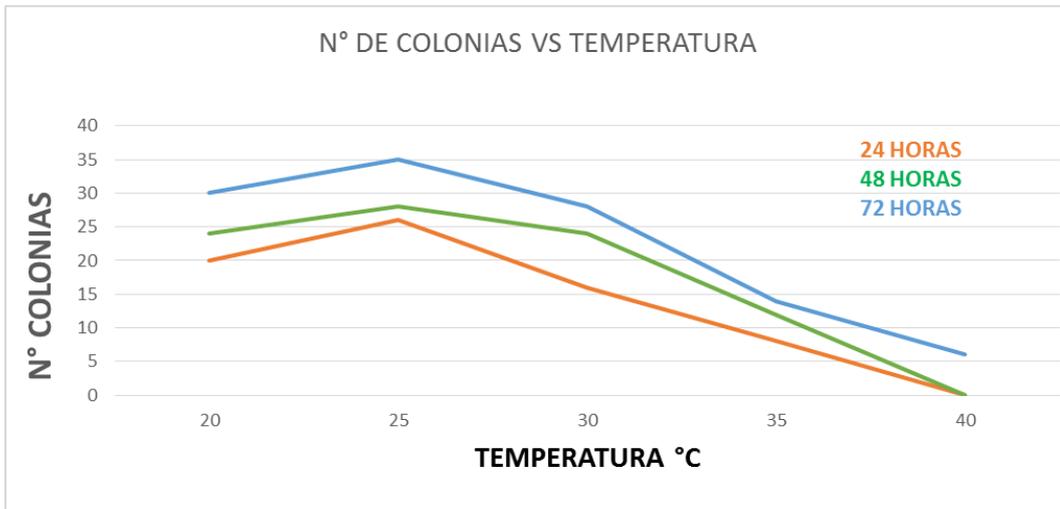
**Tabla 11. Cultivo en medio de Agar Polietileno – Variación de temperatura**

CULTIVO EN MEDIO DE AGAR POLIETILENO			
Temp C°	CEPA - PURA		
	24	48	72
20	20	24	30
25	26	28	35
30	16	24	28
35	8	12	14
40	0	0	6

*Fuente: elaboración propia*

Para el proceso de Cultivo en medio de Agar Polietileno se preparó 5 placas, para su incubación se registraron a diferentes temperaturas (20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C) como se muestra en la Tabla N° 11, se registró crecimiento de colonias desde las 24, 48 y 72 horas, siendo la temperatura de

25°C la que mostró mayor crecimiento de colonias, con  $3.5 \times 10^6$  UFC a las 72 horas.



**Figura 20. Numero de colonias vs Temperatura**

**Fuente: elaboración propia**

## 4.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

### Influencia del pH sobre el crecimiento de colonias de la bacteria *Pseudomona aeruginosa*

#### Análisis descriptivo:

**Tabla 12. Estadísticos descriptivos de la influencia del pH sobre el crecimiento de colonias de la bacteria *Pseudomona aeruginosa***

Descriptivos								
NÚMERO DE COLONIAS								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
5.5	3	2.67	4.619	2.667	-8.81	14.14	0	8
6.0	3	6.00	6.000	3.464	-8.90	20.90	0	12
6.5	3	12.00	5.292	3.055	-1.14	25.14	8	18
7.0	3	14.00	6.000	3.464	-.90	28.90	8	20
7.5	3	15.00	5.000	2.887	2.58	27.42	10	20
8.0	3	23.33	12.583	7.265	-7.92	54.59	10	35
8.5	3	17.00	8.544	4.933	-4.22	38.22	8	25
9.0	3	3.33	5.774	3.333	-11.01	17.68	0	10
Total	24	11.67	9.121	1.862	7.82	15.52	0	35

*Fuente: elaborado con el programa SPSS*

#### Prueba de hipótesis

**HIPÓTESIS NULA:** el crecimiento de las colonias de bacterias es igual a diferentes pH

**HIPÓTESIS ALTERNA:** el crecimiento de las colonias de bacterias no es igual a diferentes pH.

**Tabla 13. Prueba de igualdad de medias - Anova de un factor**

**ANOVA DE UN FACTOR  
NÚMERO DE COLONIAS**

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1091.333	7	155.905	3.035	.031
Intra-grupos	822.000	16	51.375		
Total	1913.333	23			

**Fuente: elaborado con el programa SPSS**

$\alpha = 95\% = 0.05$

$p=0.031$

Como  $p < \alpha$ , se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, existe suficiente evidencia estadística para afirmar que el crecimiento de las colonias de bacterias no es igual a diferentes pH. Según el análisis descriptivo también se puede afirmar que hay un mayor crecimiento a pH 8.

**Prueba de comparación múltiple:**

Test: Tukey

Alfa=0.05

DMS=20.26172

Error: 51.3750 gl: 16

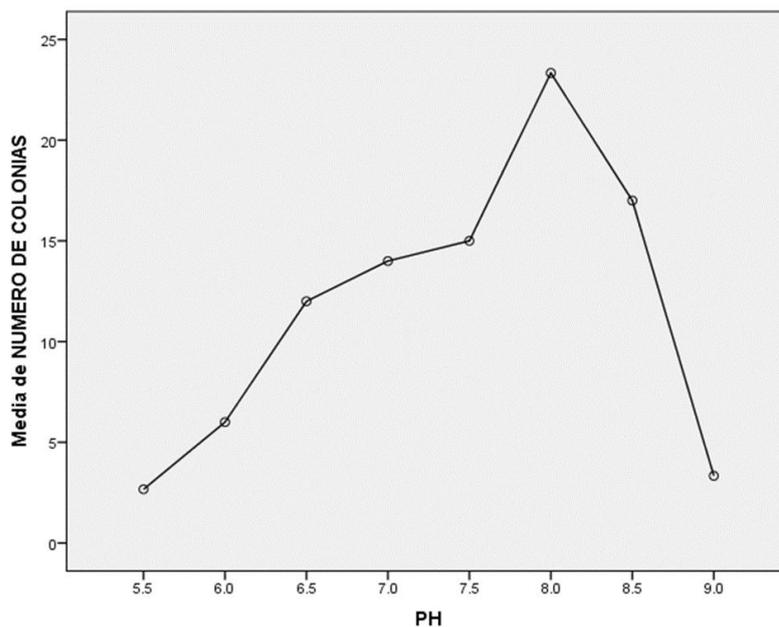
**Tabla 14. Prueba de Comparación múltiple Tukey para pH**

Ph	Medias	n	E.E.		
5.5	2.67	3	4.14	A	
9	3.33	3	4.14	A	B
6	6	3	4.14	A	B
6.5	12	3	4.14	A	B
7	14	3	4.14	A	B
7.5	15	3	4.14	A	B
8.5	17	3	4.14	A	B
8	23.33	3	4.14		B

**Fuente: elaborado con el programa INFO STAT**

Medias, con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Por lo tanto, hay suficiente evidencia estadística para afirmar que hay diferencia significativa en el crecimiento de las colonias a pH 8 y a pH 5.5.



**Figura 21. Gráfico de las medias de crecimiento de colonias a diferentes pH**

**Fuente: elaboración propia**

**Influencia de la temperatura sobre el crecimiento de colonias de la bacteria *Pseudomona aeruginosa***

**Análisis descriptivo:**

**Tabla 15. Estadísticos descriptivos de la influencia en la temperatura sobre el crecimiento de colonias de la bacteria *Pseudomona aeruginosa***

**Descriptivos  
COLONIAS**

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
20	3	24.67	5.033	2.906	12.16	37.17	20	30
25	3	29.67	4.726	2.728	17.93	41.41	26	35
30	3	22.67	6.110	3.528	7.49	37.84	16	28
35	3	11.33	3.055	1.764	3.74	18.92	8	14
40	3	2.00	3.464	2.000	-6.61	10.61	0	6
Total	15	18.07	11.087	2.863	11.93	24.21	0	35

*Fuente: elaborado con el programa SPSS*

**Prueba de hipótesis:**

**HIPÓTESIS NULA:** el crecimiento de las colonias de bacterias es igual a diferentes temperaturas

**HIPÓTESIS ALTERNA:** el crecimiento de las colonias de bacterias no es igual a diferentes temperaturas

**Tabla 16. Prueba de igualdad de medias - Anova de un factor**

**ANOVA DE UN FACTOR  
COLONIAS**

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1508.267	4	377.067	17.730	.000
Intra-grupos	212.667	10	21.267		
Total	1720.933	14			

*Fuente: elaborado con el programa SPSS*

$\alpha = 95\% = 0.05$

$p = 0.031$

Como  $p < \alpha$ , se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, existe suficiente evidencia estadística para afirmar que el crecimiento de las colonias de bacterias no es igual a diferentes temperaturas. Según el análisis descriptivo también se puede afirmar que hay un mayor crecimiento a 25°C.

**Prueba de comparación múltiple:**

Test: Tukey

Alfa=0.05

DMS=12.39204

Error: 21.2667 gl: 10

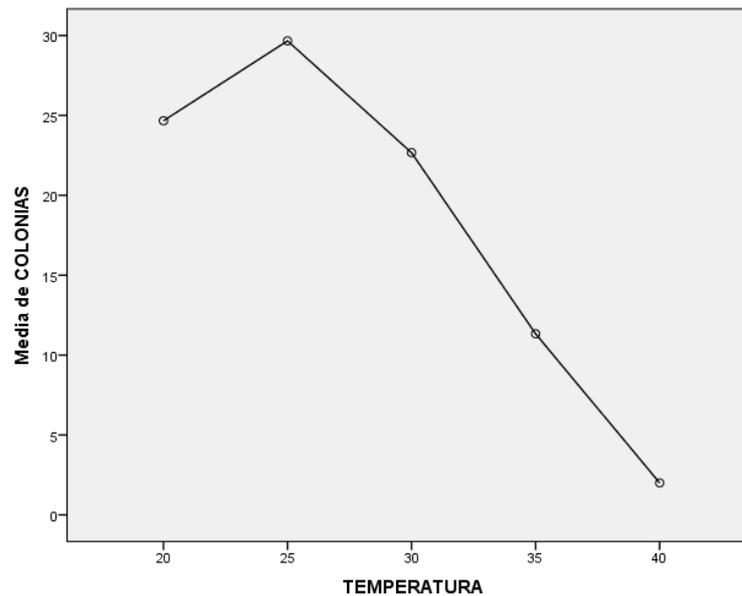
**Tabla 17. Prueba de Comparación múltiple – Tukey para temperatura**

T°	Medias	n	E.E.			
40	2	3	2.66	A		
35	11.33	3	2.66	A	B	
30	22.67	3	2.66		B	C
20	24.67	3	2.66			C
25	29.67	3	2.66			C

*Fuente: elaborado con el programa INFO STAT*

Medias, con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Por lo tanto, hay suficiente evidencia estadística para afirmar que hay diferencia significativa en el crecimiento de las colonias entre las temperaturas 20°C y 35°C, 20°C y 40°, 25°C y 35°C, 25°C y 40°C y 30°C y 40°C.



**Figura 22. Gráfico de las medias de crecimiento de colonias a diferentes temperaturas**

**Fuente: elaboración propia**

#### **4.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

- En la presente investigación, la degradación de polietileno de baja densidad se logró evidenciar, en la etapa de acondicionamiento dentro del proceso de cultivo en medio de enriquecimiento N° 2 se preparó 5 placas con porcentaje de polietileno en polvo como se muestra en la Tabla N° 9, se registró crecimiento de colonias a las 72 horas de monitoreo y al 100% de contenido de polietileno, en cepa pura  $0.5 \times 10^6$  UFC, indicando que las bacterias ***Pseudomona aeruginosa*** son capaces de degradar polietileno de baja densidad, estos resultados son consistentes con observaciones anteriores como, en la tesis “Repaso de la biodegradación de polietileno: de una manera microbial” (19), en donde el nivel máximo de degradación del polietileno (pérdida de peso) de los cuatro tipos de bacterias utilizadas, fue encontrada como 20% de pérdida en peso por acción de la bacteria

***Pseudomonas aeruginosa*** después de 120 días, así mismo cabe mencionar que en la tesis titulada “Biodegradabilidad de los residuos plásticos degradables” (2) da a conocer que el curso de la degradación abiótica era oxidativo en lugar de hidrolítico y esto se debía a la adición de prooxidante y según el proceso de compostaje aplicado se demostró que el plástico degradable es biodegradable y esto se evidenció con los resultados de experimentos microbianos realizados con bacterias ***Pseudomona aeruginosa***, que, en concordancia con la tesis “Estudios sobre la biodegradación de polietileno natural y sintético por ***Pseudomonas spp***” (52) en donde, el polietileno natural sirvió a las bacterias como su única fuente de carbono, que los llevó a consumir polietileno natural más rápidamente que los sintéticos, indicando una vez más que las bacterias ***Pseudomona aeruginosa*** son óptimas para realizar el proceso de biodegradación.

- A comparación de otras investigaciones aún no se había evaluado la posibilidad de elaborar un medio de crecimiento hecho a base de polietileno, sin embargo, en esta investigación se elaboró un agar hecho a base de polietileno, que para su elaboración el factor principal fue triturar el polietileno de baja densidad para así dar pase al proceso de per-oxidación (5), que es un paso determinante para el proceso de reducción y desintegración del polietileno, es decir, el proceso de per-oxidación abiótico es el paso determinante para el proceso de reducción; estos resultados son de considerable importancia para procesos de compostaje comerciales, desintegración de plásticos a pequeños fragmentos dentro del tiempo de ciclo de compostaje y para ser posteriormente absorbido en el ambiente del suelo como nutriente para plantas en crecimiento.
- Es muy importante reconocer que las propiedades físicas y las propiedades químicas del plástico y de las bacterias influye en el mecanismo de biodegradación. Para el proceso de cultivo en medio de Agar Polietileno se realizó variación de pH para identificar el pH óptimo, como se muestra en

la Tabla N° 10, se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 en todas las placas en las muestras de la cepa pura, así mismo se registró mayor crecimiento de colonias en pH de 8 con  $3.5 \times 10^6$  UFC a las 72 horas. Estos resultados son consistentes con observaciones anteriores como “Biorremediación de p-nitrofenol por *Pseudomonas putida* cepa 1274” (53) y en el estudio de “Las propiedades mecánicas y de envejecimiento a la intemperie de polietilenos cargados con polisacáridos” (54), en donde evalúan la influencia de temperatura de incubación y el pH en el crecimiento de bacterias. Es por ello que para el crecimiento de las bacterias es indispensable controlar el pH que, según la fuente bibliográfica y otros antecedentes ya mencionados, el resultado de pH óptimo de crecimiento es el neutro, (28). Sin embargo, la presente investigación dio como resultado el pH 8 como el óptimo para el crecimiento microbiano de la bacteria *Pseudomona aeruginosa*, eso se debe al metabolismo de la bacteria, que genera ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) y que al estar en contacto con un medio externo alcalino lo neutraliza. Es por ello que el descenso del pH en el proceso de crecimiento permitió tolerar un pH ligeramente alcalino.

- Es muy importante reconocer que las propiedades físicas y las propiedades químicas del plástico y de las bacterias influye en el mecanismo de biodegradación. Para el proceso de cultivo en medio de Agar Polietileno se prepararon 5 placas que para su incubación se registraron a diferentes temperaturas (20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C) como se muestra en la Tabla 11, se registró crecimiento de colonias desde las 24, 48 y 72 horas, siendo la temperatura de 25°C que mostró mayor crecimiento de colonias, con  $3.5 \times 10^6$  UFC a las 72 horas en cepa pura. Para el crecimiento de las bacterias es indispensable controlar la temperatura que según fuente bibliográfica y otros antecedentes ya mencionados está dentro del rango de temperatura óptima de crecimiento de 25°C a 30°C (28), como resultado de la presente investigación la temperatura óptima de crecimiento fue de 25°C, la misma que se encuentra dentro del rango, esta afirmación es

corroborada por otras investigaciones en donde hacen uso de herramientas microbiales en el proceso de biodegradación de polietileno (29), en donde se menciona que las características físicas y químicas de los plásticos y microorganismos influye en los mecanismos de biodegradación. Es importante reconocer también que a las temperaturas mínimas en la que se desarrolló la investigación se registró también crecimiento de bacterias.

- En la presente investigación, el proceso de degradación de polietileno de baja densidad se determinó por el crecimiento de colonias de la bacteria ***Pseudomona aeruginosa***, que a comparación de la tesis “Biodegradación de polietileno de baja densidad por una cultura mixta en el suelo” (10) y en la investigación de “Biodegradación de polietileno de baja densidad por especies de **pseudomonas**” (24), que tuvo por objetivo identificar el grado de biodegradabilidad de cuatro diferentes cepas de bacterias de ***Pseudomonas*** entre las que estuvieron: ***Pseudomonas aeruginosa*** (PAO1) (B1), ***Pseudomonas aeruginosa*** (ATCC) cepa (B2), el ***Pseudomonas putida*** (B3), y ***Pseudomonas syringae*** (B4), determinándose la biodegradación del LDPE por pérdida de peso en porcentaje y cambios morfológicos. Sin embargo, el proceso de degradación se logró gracias a la aclimatación de las bacterias en el medio basal, que en concordancia con la presente investigación las bacterias ***Pseudomona aeruginosa*** aisladas también pasaron por un proceso de acondicionamiento primario y secundario para ser sometidas al cultivo en agar hecho a base de polietileno y considerarlo como su única fuente de carbono. Estos descubrimientos soportan el trabajo anterior en biodegradación.
- En la mayoría de las investigaciones y tesis citadas (55), (44), (41) dan a conocer que los diferentes procedimientos para hacer seguimiento a la degradación y biodegradación de polietileno mediante bacterias o consorcios microbianos fueron basados en procesos de cambios físicos o químicos como por ejemplo; espectroscopia de infrarrojo por pérdida de

peso, reducción de masa molar mediante cromatografía de permeación, calorimetría diferencial de barrido, microscopía electrónica de barrido, quimilumniscencia y la cromatografía de gases de líquidos y masas; sin embargo para esta investigación el seguimiento al proceso de biodegradación se realizó mediante la presencia de crecimiento de colonias de bacterias de ***Pseudomona aeruginosa***, el cual es un procedimiento de bajo costo y se ha utilizado en otros trabajos de investigación donde no se contaba con los materiales y equipos sofisticados.

- Finalmente, los resultados de esta investigación confirman los descubrimientos de trabajos anteriores en biodegradación, en donde, una vez sometidas las bacterias ***Pseudomonas aeruginosas*** a temperaturas y pH diferentes, el proceso de degradación del polietileno de baja densidad varía.

## CONCLUSIONES

El uso de la biotecnología en la aplicación de procesos de tratamiento y remediación con ayuda de microorganismos es una alternativa eficiente y eficaz, así mismo el uso de bacterias constituye una estrategia potencialmente viable. La bacteria ***Pseudomona aeruginosa*** a pesar de ser una bacteria oportunista, clínicamente importante y patógena para el ser humano, es una alternativa de biodegradación de polietileno de baja densidad bajo condiciones controladas, así como lo demostró la presente investigación y los antecedentes citados.

Se ha determinado 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 por acción de la bacteria ***Pseudomona aeruginosa***.

Así mismo se ha determinado que la biodegradación óptima del polietileno de baja densidad por la bacteria ***Pseudomona aeruginosa*** se dio a un pH de 8 y una temperatura de 25°C; indicando así que el proceso de biodegradación del polietileno es posible, desarrollarse en la ciudad de Huancayo bajo condiciones controladas.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda extender el uso de esta biotecnología a una escala industrial como parte del proceso de tratamiento de residuos sólidos municipales.
- Se recomienda investigar la biodegradación de la *Pseudomona aeruginosa* en otros materiales sintéticos como polipropilenos e hidrocarburos.
- Se recomienda investigar el uso de otros microorganismos como la *Pseudomona aeruginosa* que tengan la propiedad de biodegradar materiales sintéticos con la finalidad de crear un consorcio microbiano más eficaz.
- Se recomienda la implementación de equipos y materiales de laboratorio con tecnología avanzada para hacer un análisis microbiano más especializado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PERDOMO M., Gilberto. A. y otros. Plástico y medio ambiente. *Revista Iberoamericana polímeros*. 2002. Vol. 3(2), pág. 1 - 13.
2. AGAMUTHU, P. Biodegradabilidad de los residuos plásticos degradables. *Waste Management y Reaserch*. 2005. Vol. 23, pág. 95 -100.
3. AQUIAHUATL RAMOS, María de los Ángeles, y otros. *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general*. Primera Edición. Iztapalaga - México: Universidad Autónoma Metropolitana, 2004.
4. AVENDAÑO ACOSTA, Edwin Fabián, 2015. *Panorama actual de la situación mundial, nacional y distrital de los residuos sólidos. Análisis del caso Bogotá D.C. programa basura cero*. Tesis para optar al grado de: Ingeniero Ambiental, Bogotá Colombia, 2015.
5. BONHOMME, S. y otros. Biodegradación Ambiental del polietileno - *Degradación polimérica y su estabilidad*. ELSIEVER, Science Direct. 2003. Vol. 81, pág. 441 - 412.
6. BURD, Daniel. *El plástico no es fantasía*. 2008.
7. ECHEVERRI JARAMILLO, Gustavo. Adaptación de bacterias a diferentes concentraciones de fenol en el laboratorio: aspectos esenciales para un proceso de biodegradación. *Nova – Publicación científica en ciencias biomédicas*, Vol. 9(15), pág. 1 – 112. ISSN:1794 – 2470.
8. GARCÍA VALDÉS, Elena. Título en línea [Prácticas de microbiología]. Domenech Antonio, López Arantxa, Oliver Antonio y Ramírez Antonio. [Fecha de consulta 18 de julio de 2017] Descripción física.  
<http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>.
9. BORDEN, Robert y otros. Biodegradación anaeróbica de BTEX en material Acuífero. *Agencia de protección ambiental EPA*, 2017, EPA/600/S-97/003.
10. ESMAEILI, Atefeh, y otros. Biodegradación de polietileno de baja densidad por una cultura mixta de *Lysinibacillus Xylanilyticus* y *Aspergillus niger* en el suelo. *PLOS one*. 2013, Vol. 8 (9), DOI:10.1371.
11. SONIL, Nanda y otros. Estudios sobre la biodegradación de polietileno natural y sintético por *Pseudomonas*. *J. App. Science Environmental Management*, 2017, Vol. 14 (2), pág. 57 - 60.

12. FERNÁNDEZ, María Augusta (compiladora). *Ciudades en riesgo*. Primera edición. Lima, Perú: La Red de Estudios Sociales en Prevención de Desastres en América Latina, 1996. [Fecha de consulta 15 de abril del 2017], ISBN: 9972-47-001-6.
13. MAROTO ARROYO, Esther y ROGER QUESADA Juan Manuel. *Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos*. GEOCISA. Div. Protección Ambiental de Suelos. Descripción física. [http://aguas.igme.es/igme/publica/con\\_recu\\_acuiferos/028.pdf](http://aguas.igme.es/igme/publica/con_recu_acuiferos/028.pdf).
14. GÓMEZ ROMERO, Sara y otros. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova Publicación científica en ciencias Biomédicas*, 2008, Vol. 6(9), Pág. 102 – 212. ISSN: 1794-2470.
15. ALLSOPP, Michelle y otros. Contaminación por plásticos en los océanos del mundo. *Green Peace*, 2007. Descripción física:  
<https://es.scribd.com/document/269044181/Allsopp-2007-Contaminacion>
16. GUIDO ACURIO, Antonio y otros. Diagnóstico de la situación del manejo de residuos sólidos municipales en América Latina y el Caribe. Banco Interamericano de Desarrollo y la Organización Panamericana. Washington, 1997, Vol. 97, pág. 107.
17. HINCAPIÉ LLANOS, G. y RAMÍREZ CARDONA, M. Biodegradación de poliuretano residual por fermentación en estado sólido. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 2009, Vol. 7 (2) Medellín – Colombia. 2007
18. ISWA Asociación Internacional de Residuos Sólidos. *Boletines ISWA*. 2016. [Fecha de consulta 18 de febrero del 2017] Descripción física:  
<http://www.iswa.org/media/publications/iswa-newsletters/>,  
<http://www.iswa.org/>.
19. SANGALE Manisha y otros. Una revisión sobre la biodegradación del polietileno - enfoque microbiano. *Biorremediación y Biodegradación*. 2012, Vol. 3 (10), DOI: 10.4172.
20. MANFRON OJEDA, Telm Francisco. *Biodegradabilidad de materiales poliméricos*. Tesis Doctoral inédita. Universidad Federal del Río Grande del Sur, Puerto Alegre Brasil, 2008.

21. MARTÍNEZ DE SOUSA, J. Manual de estilo de la lengua española [Título en línea]. Edición 5, 2015. [Fecha de consulta 24 de octubre del 2017]. ISBN: 978-84-9704-862-0.
22. MARTÍNEZ TRUJILLO, M.A. y GARCÍA RIVERO, M. Aplicaciones Ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2011, Vol. 11 (1), pág. 55 -73.
23. MÉNDEZ, Carmen y otros. Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Peruana De Biología*. 2013, Vol. 13(3). Pág. 203 – 205.
24. MYINT KYAW, Bhone, y otros. Biodegradación de polietileno de baja densidad por especies de pseudomonas. *Indian J. Microbiology*. 2012. Vol. 52 (3), pág. 411 - 419.
25. PISCOYA HERMOZA Luis. Investigación científica educacional [en línea]. Scribd. Amarú. [Fecha de consulta el 16 de agosto del 2017]. Descripción Física:  
<https://es.scribd.com/document/339758428/Luis-Piscoya-Investigacion-Cientifica-y-Educacional-Un-Enfoque-Epistemologico>.
26. PONNIAH SAMINATHAN, y otros. Biodegradación de plástico por *Pseudomonas putida* aislada de muestras de suelo de jardín. *Science Q Revista avanzada de botánica y zoología*, 2014. Vol. 81 (4). ISSN: 2348-7313.
27. PRASUN K. y otros, Degradación del polietileno: Realidad o fantasía. *Environmental Science and Technology*, 2010.
28. PRESCOTT L. y otros. *Microbiología*, Edición 5, Editorial McGraw-Hill. 2008, pág. 128 – 145.
29. PRIYANKA, Nayak y ARCHANA, Tiwari. Biodegradación de polietileno y plástico con la ayuda de herramientas microbiales y un reciente enfoque. *International Journal of Biomedical and Advance Research*. 2011. Vol. 2 (9), pág, 1 -12.
30. RAMOS, E., y ZÚÑIGA, D. 2008. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada*, 2008, Vol. 7, pág. 1-2.

31. RUIZ MARTÍNEZ, Lidia. *Pseudomonas aeruginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos*. Tesis Doctoral inédita, Universidad de Barcelona, Barcelona, 2007.
32. SÁNCHEZ CARLESSI, Hugo y REYES MEZA, Carlos. *Metodología y diseños en la investigación científica*, Lima - Perú, 1998.
33. SÁNCHEZ CARLESSI, H. y REYES MEZA, C. *Metodología y diseños en la investigación científica*. Edición 5. Lima- Perú, Editorial Business Support Aneth, 2015.
34. BORRELLEA Stephanie y otros. "Por qué necesitamos un acuerdo internacional sobre contaminación plástica marina", *Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias PNAS*, 2017, Vol. 114 (38). DOI: 10.1073.
35. TOLKER NIELSEN y otros. Desarrollo y Dinámicas de las biopelículas de *Pseudomonas ssp*. *Revista de Bacteriología*, 2000, Vol. 182 (22). DOI:10.1128.
36. TORRES RODRÍGUEZ, D. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas Revista Científica y Técnica de Ecología Y Medio Ambiente*, 2003, Vol. 12(02).
37. TORTORA, G., FUNKE, B., y CASE, C. *Introducción a la microbiología* (9th ed.). Buenos Aires: Panamericana. 2007
38. Universidad Nacional Autónoma de México. *Evaluación de la Bacteria Pseudomonas como degradador de polietileno*. Área de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Descripción física:  
[http://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria18/B\\_L\\_IE%20Evaluacion\\_de\\_la\\_bacteria\\_Pseudo.pdf](http://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria18/B_L_IE%20Evaluacion_de_la_bacteria_Pseudo.pdf).
39. ECOEMBES. Universidad Politécnica de Madrid. *Informe de biodegradabilidad teórica de envases plásticos*. Madrid, 2017, pág. 10 - 62. Descripción física:  
[https://www.ecoembes.com/sites/default/files/archivos\\_estudios\\_idi/proyecto\\_bioplasticos\\_-\\_resumen\\_ejecutivo.pdf](https://www.ecoembes.com/sites/default/files/archivos_estudios_idi/proyecto_bioplasticos_-_resumen_ejecutivo.pdf).
40. NEHA, Arora y otros. Biodegradación de poliuretano. *Physics Abstract Service*, 2009, Universidad Pontificia Bolivariana. DOI: 10.1063.

41. URIBE, Diego y otros. 2010. Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario. *Revista Perú Biología*, 2010, Lima – Perú, Vol. 17(1), pág. 133 - 136. ISSN: 1727 – 9933.
42. VELASCO CASAL, P. *Biorremediación: Biodisponibilidad de xenobióticos en suelos. Papel de la quimiotaxis bacteriana*. Instituto de recursos naturales y agrobiología de Sevilla - España. 2003.
43. VIEYRA RUIZ, H. *Elaboración de polímeros biodegradables polietileno - almidón y estudios de biodegradabilidad*. Maestro en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional Unidad Legaria, México, 2009.
44. VOLKE SEPÚLVEDA, T. *Efecto de tratamientos fisicoquímicos y cometaabolismo 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.
45. YUTAKA Tokiwa y otros, *Biodegradabilidad de los plásticos*, 2009, Volumen 10 (9).
46. BANCO MUNDIAL. *El financiamiento basado en los resultados para los residuos sólidos urbanos*, 2014, volumen 01, DOI: 91861.
47. Asociación peruana de la industria del plástico, *Situación de la industria plástica en el Perú*, Lima – Perú, 2012.
48. Plastics Europe, Asociación de fabricantes de plásticos. Europa. 2012. Descripción Física:  
<http://www.plasticseurope.es/centro-de-conocimiento/sala-de-prensa/comunicados-de-prensa-2012/11-de-abril-de-2012-la-produccion-mundial-de-plasticos-crece-un-4-segun-las-primeras-estimaciones.aspx>.
49. BORRELLEA Stephanie y otros. “Por qué necesitamos un acuerdo internacional sobre contaminación plástica marina”, *Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias PNAS*, 2017, Vol. 114 (38). DOI: 10.1073.
50. ANA, Protocolo nacional para el monitoreo de calidad de los recursos hídricos superficial. *Autoridad Nacional del agua*. Lima – Perú. 2016.
51. Manual de Lámpara UV 366nm/ 113203, MERCK.

52. SONIL Nanda y otros. Estudios sobre la biodegradación de polietileno natural y sintético por *Pseudomonas* spp. *Revista Science Environmental Managment*. 2010. Vol. 14 (2), pág. 57 – 60.
53. MELVIN S, Samuel y otros. Biorremediación de p-nitrofenol por *Pseudomonas putida* cepa 1274”, *Revista salud ambiental en Ciencia e Ingeniería*, 2014, Volumen 12 (53).
54. MOTHE, Cheila y otros. Estudios de las propiedades mecánicas y de envejecimiento a la intemperie de polietilenos cargados con polisacáridos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2008, Volumen 9(2).
55. KUMAR, S y otros. La diversidad y la eficacia de los manglares tropicales suelo microflora sobre la degradación del polietileno lleva bolsos. *Revista Biology Tropical* 2007, volumen 55 (3-4). ISSN: 0034-7744.
56. ARUTCHELVI, J. y otros. Biodegradación de polietileno y polipropileno, *Indian Journal of Biotechnology*, 2008, volumen 7, pág. 9 – 22.
57. NORMAN, Sean y otros. La variabilidad en *Pseudomonas aeruginosa* lipopolisacárido expresión durante la degradación de petróleo crudo. *Microbiología Aplicada Ambiental*, 2002, volumen 68 (10), pág. 5096 – 5103. DOI: 10.1128.
58. KANNAHI, M. y otros. Proyección de polietileno y degradantes plástico microbios de muthupet suelo del manglar”, *Journal of chemical and pharmaceutical Research*, 2013, Volumen 5 (8). Pág. 122 – 127. ISSN: 0975-7384.

## ANEXOS

- A.1. Matriz de consistencia
- A.2. Cuadro de operacionalización de variables
- A.3. Cultivo y aislamiento selectivo de ***Pseudomona aeruginosa***
- A.4. Cronograma de actividades elaboración de plan de tesis
- A.5. Cronograma de actividades parte experimental laboratorio
- A.6. Control de calidad: mediante coloración y tinción
- A.7. Identificación de ***Pseudomonas aeruginosa***: método tinción Gram
- A.8. Identificación de ***Pseudomonas aeruginosa***: método fluorescencia UV
- A.9. Control de calidad: mediante el instrumento vitek II compact
- A.10. Contador de colonias para laboratorio

## ANEXO Nº 1

### MATRIZ DE CONSISTENCIA

INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES DE CRECIMIENTO MICROBIANO PH, TEMPERATURA EN LA DEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD POR LA BACTERIA AERÓBICA PSEUDOMONA EN HUANCAYO EN EL AÑO 2017				
PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES
<p><b>Problema general:</b></p> <p>¿Cuál es la influencia de los factores ambientales de crecimiento microbiano pH, temperatura en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> en Huancayo?</p>	<p><b>Objetivo general:</b></p> <p>Determinar la influencia de los factores ambientales de crecimiento microbiano pH, temperatura en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> en Huancayo</p>	<p style="text-align: center;"><b>Antecedentes internacionales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Agamuthu (2005)</b> en su tesis titulada "<i>Biodegradabilidad de los residuos plásticos degradables</i>". Investigación presentada por el Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Malaya, Kuala Lumpur, Malasia.</li> <li>• <b>Mothé y otros (2008)</b> en su tesis titulada "<i>Estudio de las propiedades mecánicas y de envejecimiento a la intemperie de polietilenos cargados con polisacáridos</i>", Investigación, presentada en la Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 9(2), marzo de 2008.</li> <li>• <b>Universidad Autónoma de Barcelona (2008)</b>, en su revista Ecosistemas, se realizó la investigación de "<i>Evaluación de la bacteria Pseudomona como degradador del polietileno</i>" Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Ciencias. Recuperado el 30 de noviembre del 2009 VILLE, C (2003) Biología. Mc Graw Hill Interamericana. México p. 143</li> </ul>	<p><b>Hipótesis general:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Los factores ambientales de crecimiento microbiano, pH y temperatura, influyen significativamente en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i>.en Huancayo.</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>Factores ambientales de crecimiento microbiano</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pH</li> <li>• Temperatura</li> </ul>

<p><b>Problemas específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿Cuál es la influencia del pH del medio de cultivo en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> en Huancayo?</li> <li>• ¿Cuál es la influencia de la temperatura de incubación en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> en Huancayo?</li> </ul>	<p><b>Objetivos específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar la influencia del pH del medio de cultivo en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> en Huancayo.</li> <li>• Determinar la influencia de la temperatura de incubación en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> en Huancayo.</li> </ul>	<p><b>Antecedentes nacionales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Méndez y otros (julio 2007)</b>, Rev. Perú. biológica. número especial 13(3): 203 – 205, en su investigación <i>“Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno”</i> Avances de las ciencias biológicas en el Perú, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.</li> <li>• <b>Sepúlveda (2007)</b>, en su tesis titulada <i>“Efecto de tratamientos fisicoquímicos y cometabolismo en la degradación de polietileno de baja densidad por hongos filamentosos”</i>, para obtener el Grado de Doctora en Ciencias Biológicas. Investigación, presentada en la facultad de Ciencias Biológicas y de la salud de la Universidad Autónoma Metropolitana de México.</li> <li>• <b>Uribe y otros (abril 2010)</b> Rev. Perú. Biológica. número especial 17(1): 133 - 136 Avances de las ciencias biológicas en el Perú, en su investigación <i>“Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.</i></li> </ul>	<p><b>Hipótesis específica</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El pH del medio de cultivo influye significativamente en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> en Huancayo</li> <li>• La temperatura de incubación influye significativamente en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> en Huancayo.</li> </ul>	<p><b>Degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colonias de bacterias - <i>Pseudomona aeruginosa</i></li> </ul>
---	---	--	--	---

## ANEXO Nº 2

### CUADRO DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES					
VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIONES	INDICADORES	INSTRUMENTO	ESCALA VALORATIVA
<b>Factores ambientales de crecimiento microbiano pH, temperatura</b>	El crecimiento de microorganismo está influido notablemente por la naturaleza química y física de su ambiente, es decir permitirá controlar el crecimiento microbiano y estudiar la distribución ecológica de los microorganismos. Microbiología Prescott (2004) capítulo 6 Crecimiento Microbiano pág. 128.	pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acido Ph&lt;7</li> <li>• Neutro pH=7</li> <li>• Básico Ph&gt;7</li> </ul>	pHmetro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acido</li> <li>• Neutro</li> <li>• Básico</li> </ul>
		Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura mínima 4°C</li> <li>• Temperatura óptima 25° C - 30° C</li> <li>• Temperatura máxima 40°C</li> </ul>	Termómetro eléctrico como parte de la incubadora	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura mínima</li> <li>• Temperatura óptima</li> <li>• Temperatura máxima</li> </ul>
<b>Degradación del polietileno de baja densidad por la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i></b>	Proceso biológico metabólico enzimático realizado por bacterias las cuales secretan enzimas que se encargan de romper la estructura molecular del plástico degradándolo en el tiempo. (Yutaka Tokiwa y otros, 2009).	Proceso metabólico de bacterias	Colonias de bacterias - <i>Pseudomona aeruginosa</i>	Contador de colonias (ASTM – D5465)	Unidades formadoras de colonias (UFC)

## ANEXO Nº 3

### CULTIVO Y AISLAMIENTO SELECTIVO DE *PSEUDOMONA AERUGINOSA*

#### OBJETIVO

Cultivar y aislar la bacteria aeróbica *Pseudomona Aeruginosa* por el método de estriado.

#### FUNDAMENTO

##### *Pseudomona Aeruginosa*

Es el principal patógeno de la familia *Pseudomona daceace* y se identifica por ser un bacilo gram negativo ligeramente curvado que crece mejor en aerobiosis, es muy versátil nutritivamente y no fermenta hidratos de carbono, pero produce ácido a partir de azúcares como la glucosa, fructurosa, lactosa o sacarosa.

Se caracteriza por estar ampliamente distribuida en la naturaleza formando parte de la microbiota normal del hombre. La tierra, plantas, agua corriente pueden actuar como reservorio con clara predilección por los ambientes húmedos tolerando un amplio rango de temperatura de crecimiento.

La glicerina, las sales de magnesio y potasio estimulan la producción de los pigmentos piocianina y piorrubina.

#### AGAR CETRIMIDE:

El agar cetrimide es un medio de aislamiento para la detección de *Pseudomonas aeruginosas* a partir de muestras de origen diverso.

El agar cetrimide estimula la producción de piocianina y la fluorescencia de **P. Aeruginosa**. Su formulación se basa en una optimización del medio King A. La adición de un amonio cuaternario inhibe el crecimiento del resto de microorganismos. Las colonias características presentan una pigmentación verde espontánea y fluorescencia verde bajo luz ultravioleta.

## CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO:

- Medio de cultivo deshidratado: color beige claro, homogéneo, libre deslizamiento.
- Medio de cultivo preparado: color ámbar claro.

## MATERIALES

- 1 muestra de 1ml de agua de regadío, estancada
- 1 estufa
- 2 asas de siembra
- 1 mechero Bunsen
- 1 placa Petri esterilizada
- 3 placas Petri con agar Cetrimide
- 1 tubo estéril
- 1 gradilla

## REACTIVOS

- Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) .....1,0 g
- Fosfato de Disodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).....6,0 g
- Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....3,0 g
- Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ ).....0,5 g
- Glicerol o asparragina ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ).....5,0 g
- Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) 1 N.....1 ml
- Cloruro de calcio 0,01 M.....10 ml
- Agua destilada C.S.P. ....1lt

## PREPARACIÓN DEL CALDO M9

Mezclar en caliente

- Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) .....1,0 g
- Fosfato de Disodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).....6,0 g
- Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....3,0 g
- Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ ).....0,5 g

- Glicerol o asparragina (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>).....5,0 g
- Agua destilada C.S.P. ....1lt

Agregar en frío

- Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) 1 N.....1 ml
- Cloruro de calcio 0,01 M.....10 ml

### **METODOLOGÍA:**

Para el aislamiento de la bacteria se va a seguir el siguiente esquema:

- Inocular la muestra 1ml de agua en caldo de enriquecimiento M9
- Incubar 48 horas a 37 °C
- Tomar una muestra del caldo ya crecido y estriar con un asa de siembra en el medio sólido selectivo, Agar Cetrimide para inhibir la flora acompañante y obtener colonias de ***Pseudomonas aeruginosa***
- Incubar 48 horas a 37 °C
- Observar el crecimiento de colonias con pigmentación verde
- Luego del aislamiento se hará un repique de alguna de las colonias obtenidas a un agar nutritivo para hacer una coloración de Gram

### **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Observar el crecimiento microbiano y la producción de pigmentos. La producción de piocianina se observa como una zona azul-verdoso que rodea la colonia, o que se extiende en todo el medio de cultivo debido a la difusión del pigmento. La producción de piorrubina se observa como una zona de color rojo alrededor de la colonia o que se extiende en todo el medio de cultivo debido a la difusión del pigmento.

### **BIBLIOGRAFÍA:**

Maria Milagro Montero (2012) en su tesis titulada “***Pseudomonas aeruginosa*** multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos” (ASTM, Documento de autoevaluación guía de buenas prácticas)

## ANEXO Nº 4

### CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

#### ELABORACIÓN DE PLAN DE TESIS

Actividades		TIEMPO (semanas del año 2015)												
		enero				febrero				marzo				abril
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	Planteamiento del problema, objetivos y justificación	X												
2	Construcción del marco teórico	X	X											
3	Formulación de hipótesis y marco metodológico	X	X											
4	Elaboración y prueba de instrumentos	X	X											
5	Recolección de datos		X	X										
6	Tratamiento de los datos				X	X								
7	Análisis de resultados y contrastación de hipótesis					X	X							
8	Formulación de conclusiones y recomendaciones						X	X						
9	Redactar el informe final								X	X	X			
10	Presentación del informe											X	X	X

## ANEXO Nº 5

### CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES PARTE EXPERIMENTAL LABORATORIO

<b>CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES EN LABORATORIO - PARTE EXPERIMENTAL</b>																
<b>Actividades / meses / semanas</b>	<b>TIEMPO (semanas del año 2015)</b>															
	<b>junio</b>				<b>julio</b>				<b>agosto</b>				<b>setiembre</b>			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
- Planificación	X															
- Preparación de materiales y reactivos		X														
- Visita a campo			X													
- Toma de muestra - Cadena de custodia					X											
- Aislamiento de la Pseudomona					X	X	X									
- Observación					X	X	X	X								
- Preparación de los medios de enriquecimiento (ME <sub>1</sub> y ME <sub>2</sub> ) - Siembra en ME <sub>1</sub> y ME <sub>2</sub>									X							
- Observación de crecimiento bacteriano - Conteo de colonias									X							
- Preparación de agar polietileno - Siembra en agar polietileno										X						
- Observación de crecimiento bacteriano - Conteo de colonias										X						
- Preparación de agar polietileno con variación de pH - Siembra											X					
- Observación de crecimiento bacteriano - Conteo de colonias											X					
- Cultivo y siembra con variación de temperatura											X					
- Observación de crecimiento bacteriano - Conteo de colonias											X					
- Validación de resultados													X			

## ANEXO Nº 6

### CONTROL DE CALIDAD: MEDIANTE COLORACIÓN Y TINCIÓN

CONTROL DE CALIDAD		
MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO	PRODUCCIÓN DE PIGMENTO
Escherichia Coli	Inhibición total o parcial	-
Staphylococcus aureus	Inhibición total o parcial	-
Pseudomonas Aeruginosa	Satisfactorio	Verde azulado o verde

## ANEXO Nº 8

### CONTROL DE CALIDAD: MEDIANTE EL INSTRUMENTO VITEK II COMPACT

Reporte de Análisis Microbiológico								
Página: 1 de 1								
Razón Social: <b>Análisis Particular</b>				N.I.T 900131287-3				
Contacto: <b>Karem Gutierrez Taibe</b>		Correo electrónico: N.D.						
Dirección:								
Ciudad: <b>Huancayo</b>			Teléfono:			FAX: N.D.		
Observaciones: N.A								
Fecha Muestreo: <b>05/07/2015</b>			Fecha Análisis: <b>06/07/2015</b>			Fecha Reporte: <b>10/07/2015</b>		
INFORMACIÓN DEL PRODUCTO								
Proveedor	Cantidad	Presentación	Lugar Muestra	Tipo de Muestra	Lote	Vencimiento	Temperatura	Condiciones específicas de la muestra
<b>particular</b>	<b>01</b>	<b>simple</b>	<b>laboratorio</b>	<b>cultivo</b>	<b>900131287-3</b>	<b>15/07</b>	<b>21°</b>	<b>cultivo puro en cetrimide</b>
RESULTADOS								
Descripción de la muestra	# LAB	Recuento	Recuento	Recuento	Determinación de E. Coli	Recuento Mohos	Recuento	
		Mesófilos aerobios UFC/g/ml	Coliformes Totales UFC/g/ml	Coliformes Fecales NMP/g/ml		UFC/g/ml	Levaduras UFC/g/ml	
<b>cultivo de pseudomonas</b>	-----	<b>&gt;500000</b>	<b>menor de 3</b>	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>	<b>negativo</b>	
NORMA: NO APLICA - CONCENTRADOS		NO APLICA	NO APLICA	NO APLICA	AUSENTE	NO APLICA	NO APLICA	
MÉTODO DE ANÁLISIS EMPLEADO		Recuento en Placa	Recuento en Placa	Número más Probable	Presencia o Ausencia	Recuento en Placa	Recuento en Placa	
Descripción de la muestra	# LAB	Determinación de Salmonella en 25 g.						
		Presencia o Ausencia	Recuento en Placa					
<b>pseudomonas aeruginosa</b>	-----	<b>negativo</b>						
NORMA: NO APLICA - CONCENTRADOS		AUSENTE						
MÉTODO DE ANÁLISIS EMPLEADO		Presencia o Ausencia						
<b>INSTRUMENTO : VITEK II COMPACT</b>								
								
<b>ANALISTA MICROBIOLOGÍA</b>								
VERIFIQUE LA AUTENTICIDAD DEL RESULTADO CON EL LABORATORIO. RESULTADO VALIDO DE LA MUESTRA ANALIZADA. PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE ESTE DOCUMENTO SIN AUTORIZACIÓN								

## **ANEXO N° 10**

### **CONTADOR DE COLONIAS PARA LABORATORIO**

Contador de colonias tipo Quebec con placa cuadrículada de 110 mm, lectura digital, caja de plástico de alta resistencia, se pueden hacer conteos manuales por medio de interruptor de presión. Incluye: lápiz electrónico para placas cerradas, iluminación fluorescente, opera con 110v.

#### **ESPECIFICACIONES TÉCNICAS**

##### **Conteo manual de colonias**

- Interruptor general de encendido y puesta en marcha
- Restablecimiento a 0 (cero) a través del pulsador "RESET"
- Facilita el conteo y el registro de las unidades formadoras de colonias
- Alarma audible por cada impulso o colonia registrada
- Contador digital hasta 999 colonias
- Lupa de 90 mm con brazo metálico flexible
- Apto para cajas de petri de 100 mm (Diámetro), máximo
- El contador suma 1 número después de cada pulsación del contador
- Memoria de último registro visualizado el cual permite ver el registro final en caso de corte de energía o apagado accidental.

#### **MODO DE USO**

Fácil de usar, simplemente coloque la caja de petri sobre la base iluminada y pulse el contador para marcar cada colonia. el recuento digital en la pantalla se puede restablecer manualmente en cualquier momento pulsando la tecla RESET. Cuenta con una lupa que ofrece facilidad del conteo de colonias más pequeñas.

### **CARACTERÍSTICAS DE LOS CONTADORES DE COLONIAS**

Los contadores de colonias cuentan varias características que hacen que estos aparatos se conviertan en una verdadera ayuda dentro de un laboratorio:

- Tienen puntas en material de plástico o vidrio
- Son resistentes al agua
- Son de alta resistencia al aceite
- Son fácilmente reemplazables

### **USOS Y APLICACIONES DE LOS CONTADORES DE COLONIAS**

Los contadores de colonias generalmente son utilizados para calcular:

- Porcentajes de células sanguíneas
- Clasificación tipo Erlinch
- Clasificación tipo Schilling
- Conteo de leucocitos
- Conteo de Eritrocitos
- Conteo de bacterias

*(ASTM, Documento de autoevaluación guía de buenas prácticas BPL).*

## FOTOGRAFÍAS



**Fotografía 1 – Polietileno de baja densidad**



**Fotografía 2 – Lavado de materiales**



**Fotografía 3 – Materiales de esterilización**



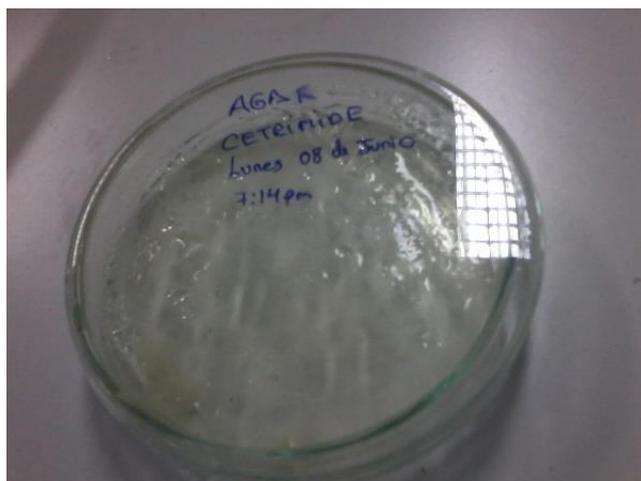
**Fotografía 4 – Esterilización de materiales**



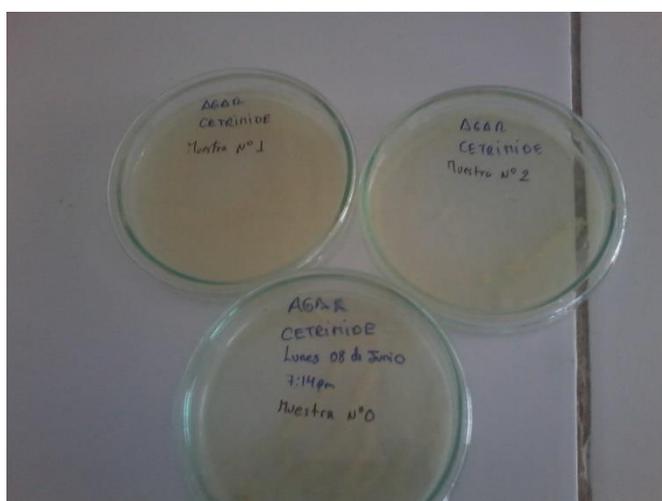
**Fotografía 5 – Cultivo del caldo M9 en placas con medios**



**Fotografía 6 – Cultivo en Agar Nutritivo**



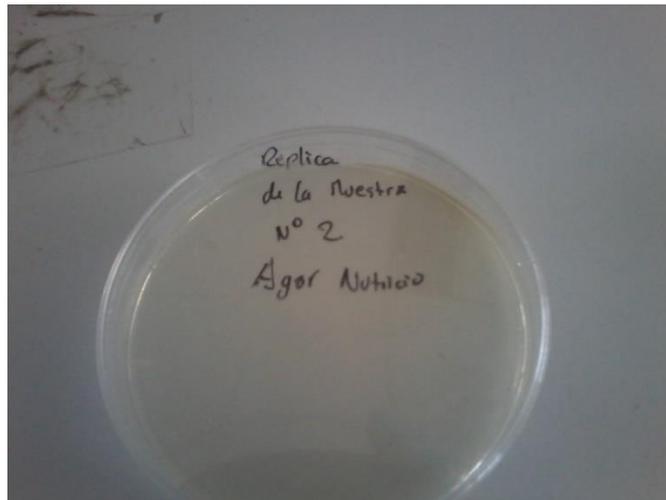
Fotografía 7 – Cultivo en Agar Cetrinide



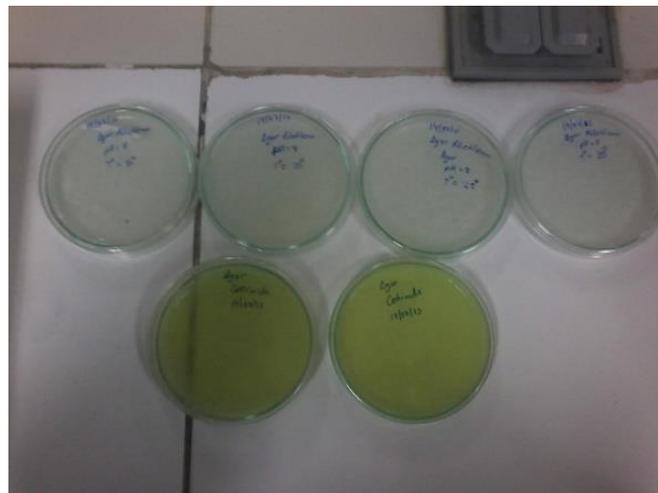
Fotografía 8 – Placas con agar Cetrinide 1er repique



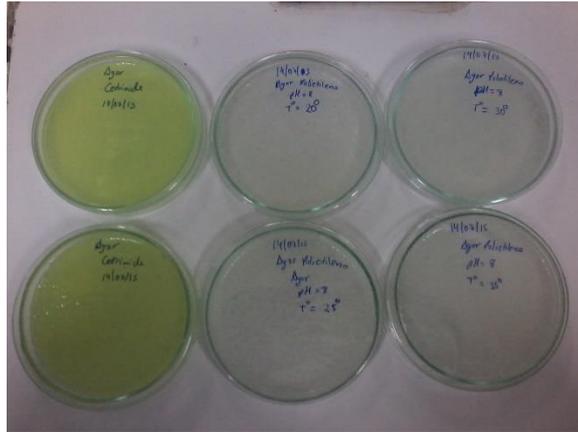
Fotografía 9 – Placas con agar Cetrinide 2do repique



**Fotografía 10 – Placas con agar Cetrimide 3er repique**



**Fotografía 11 – Placas con agar polietileno en ph 8 listas para hacer el cultivo, para someterlas a incubar a diferentes temperaturas**



**Fotografía 12 – Placas con agar Cetrímide 1er repique**



**Fotografía 13 – Placas con agar Cetrímide 2er repique**



**Fotografía 14 – Placas con agar Cetrímide 3er repique**



**Fotografía 15 – Horno microbiológico para el cultivo de bacterias, programación inicial**



**Fotografía 16 – Horno microbiológico para el cultivo de bacterias, programación a 25°C**



**Fotografía 17 – Horno microbiológico para el cultivo de bacterias, programación a 20°C**



**Fotografía 18 – Horno microbiológico para el cultivo de bacterias, programación a 35°C**



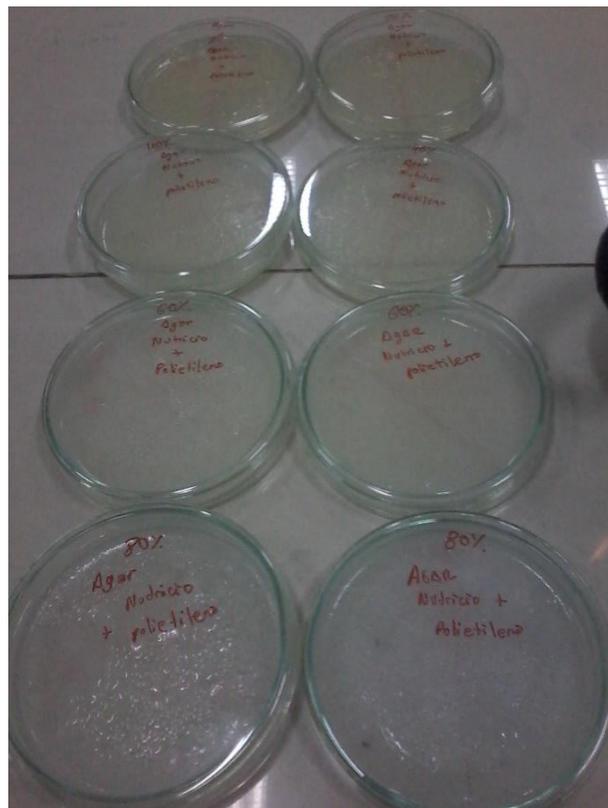
**Fotografía 19 – Horno microbiológico para el cultivo de bacterias, programación a 35°C**



**Fotografía 20 – verificación del pH 10 para la preparación de medios**



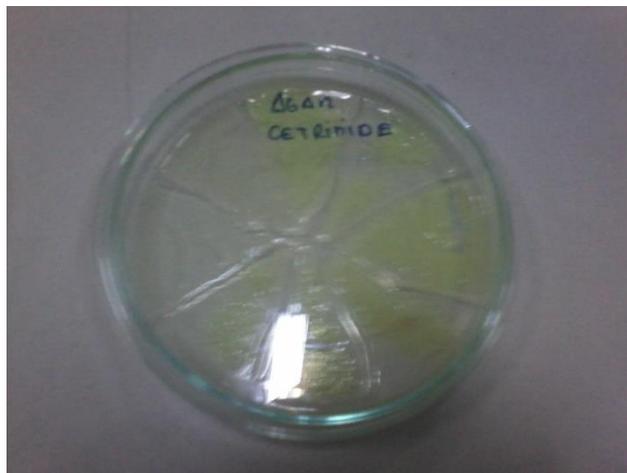
Fotografía 21 – verificación del pH 8 para la preparación de medios



Fotografía 22 – Placas con medio de enriquecimiento N° 1



**Fotografía 23 – Placas con medio de enriquecimiento N° 2**



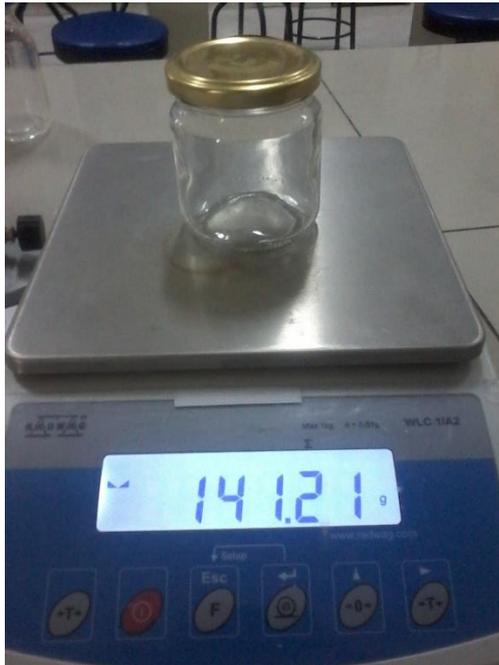
**Fotografía 24 – Placas con Agar Cetrimide para el análisis en VITEK II  
COMPACT**



**Fotografía 25 – Agar nutritivo y Agar Cetrimide con el polietileno en polvo para preparar Agar Polietileno**



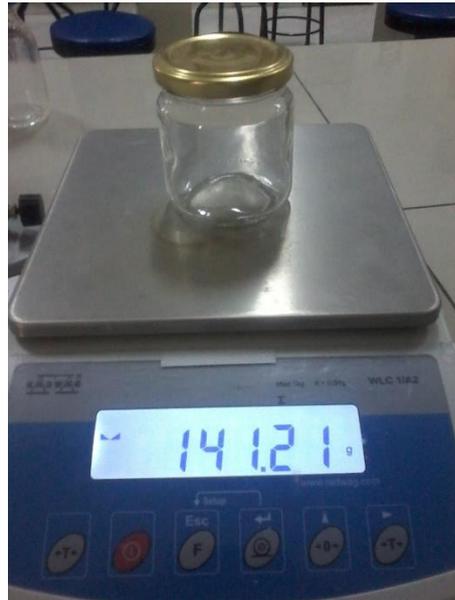
**Fotografía 26 – Frascos para preparación de buffers para la modificación de pH**



**Fotografía 27 – Pesado de frasco esteril para pesar el polietileno**



**Fotografía 28 – Polietileno en polvo para preparar Agar Polietileno**



**Fotografía 29 – Pesado de frasco esteril para pesar el polietileno**



**Fotografía 30 – Incubación de placas con Agar nutritivo y caldos**



**Fotografía 31 – Tinción Gram**



**Fotografía 32 – Tinción Gram enjuage**



**Fotografía 33 – Tinción Gram aplicación de tinciones**



**Fotografía 34 – Batería Gram (Safranina, lugol, cristal violeta, alcohol acetona )**



**Fotografía 35 – Tubos de esteriles para el proceso de centrifugado**



**Fotografía 36 – Proceso de centrifugado**



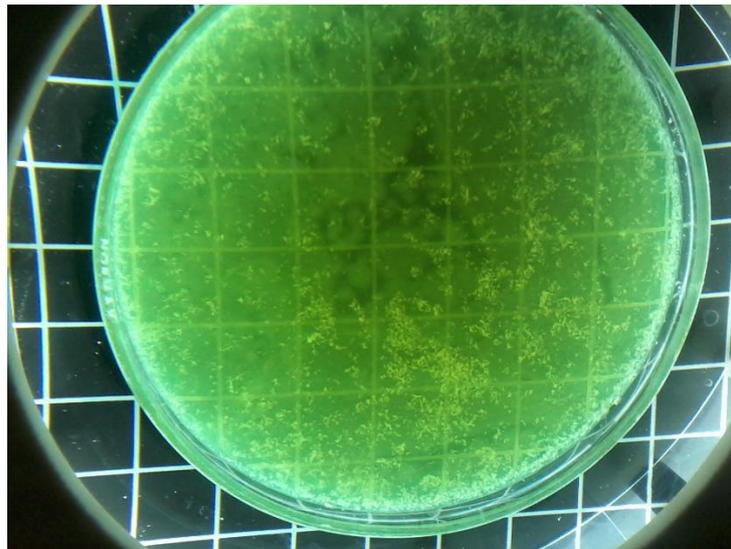
**Fotografía 37 – Proceso de centrifugado**



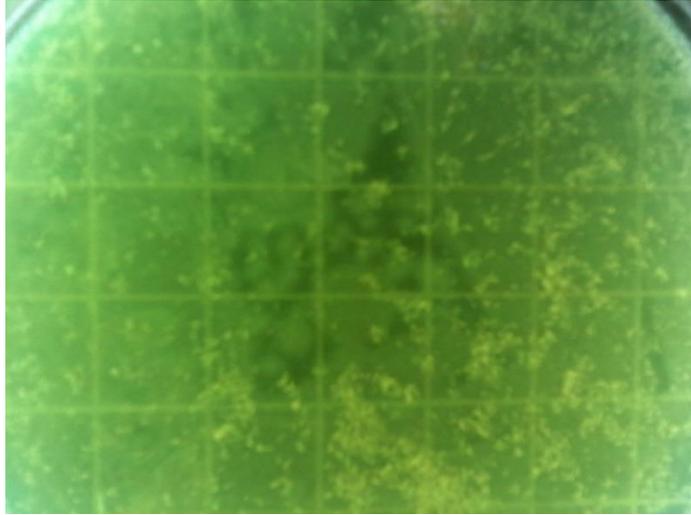
**Fotografía 38 – Proceso de centrifugado**



**Fotografía 39 – Proceso de centrifugado**



**Fotografía 40 – Colonias de *Pseudomonas aeruginosa* en agar polietileno**



**Fotografía 41 – Colonias de *Pseudomonas aeruginosa* en agar polietileno**