

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y AMBIENTALES



Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por las bacterias *Pseudomonas putida* Trevisan y *Pseudomonas aeruginosa* Migula a condiciones controladas de temperatura y pH

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AMBIENTAL

AUTOR

César Junior Soto Soria

ASESOR

Armando Chiclla Salazar

Tarma, Perú

2024

METADATOS COMPLEMENTARIOS

Datos del autor

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	
Número de Orcid (opcional)	

Datos del asesor

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	
Número de Orcid (obligatorio)	

Datos del Jurado

Datos del presidente del jurado

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	

Datos del segundo miembro

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	

Datos del tercer miembro

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	

Datos de la obra

Materia*	
Campo del conocimiento OCDE Consultar el listado:	
Idioma (Normal ISO 639-3)	
Tipo de trabajo de investigación	
País de publicación	
Recurso del cual forma parte (opcional)	
Nombre del grado	
Grado académico o título profesional	
Nombre del programa	
Código del programa Consultar el listado:	

*Ingresar las palabras clave o términos del lenguaje natural (no controladas por un vocabulario o tesoro).

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 042 - 2024/UCSS/FCAA/DI

Siendo las 11:00 a.m. del martes 10 de setiembre de 2024 a través de la plataforma virtual zoom de la Universidad Católica Sedes Sapientiae, el Jurado de Tesis integrado por:

- | | |
|------------------------------------|-----------------|
| 1. Elvira Teófila Castañeda Chirre | presidente |
| 2. Juan José Monroy Ramos | primer miembro |
| 3. Nelly Lissette Molina Tejada | segundo miembro |
| 4. Armando Chiclla Salazar | asesor(a) |

Se reunieron para la sustentación virtual de la tesis titulada:

Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por las bacterias *Pseudomonas putida* Trevisan y *Pseudomonas aeruginosa* Migula a condiciones controladas de temperatura y pH

Que presenta el bachiller en **Ciencias Ambientales**:

César Junior Soto Soria

Cumpliendo así con los requerimientos exigidos por el reglamento para la modalidad de titulación; la presentación y sustentación de un trabajo de investigación original, para obtener el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**.

Terminada la sustentación y luego de deliberar, el jurado acuerda:

APROBAR	X
DESAPROBAR	...

La tesis, con el calificativo de **MUY BUENA** y eleva la presente acta al decanato de la **Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales**, a fin de que se declare EXPEDITA para conferirle el TÍTULO de INGENIERO AMBIENTAL.

Lima, 10 de setiembre de 2024.



Elvira Teófila Castañeda Chirre.
Presidente



Juan José Monroy Ramos
1° miembro



Nelly Lissette Molina Tejada
2° miembro



Armando Chiclla Salazar
Asesor(a)

Anexo 2

CARTA DE CONFORMIDAD DEL ASESOR(A) DE TESIS / INFORME ACADÉMICO/ TRABAJO DE INVESTIGACIÓN/ TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL CON INFORME DE EVALUACIÓN DEL SOFTWARE ANTIPLAGIO

Lima, 08 de setiembre de 2024.

Señor(a),
Wilfredo Mendoza Caballero
Jefe del Departamento de Investigación
Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales

Reciba un cordial saludo.

Sirva el presente para informar que **la tesis** / informe académico/ trabajo de investigación/ trabajo de suficiencia profesional, bajo mi asesoría, con **título: Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por las bacterias *Pseudomonas putida* Trevisan y *Pseudomonas aeruginosa* Migula a condiciones controladas de temperatura y pH**, presentado por **César Junior Soto Soria** (código de estudiante 2011101095 y DNI 73064674) para optar el **título profesional**/grado académico de **Ingeniero Ambiental** ha sido revisado en su totalidad por mi persona y **CONSIDERO** que el mismo se encuentra **APTO** para ser sustentado ante el Jurado Evaluador.

Asimismo, para garantizar la originalidad del documento en mención, se le ha sometido a los mecanismos de control y procedimientos antiplagio previstos en la normativa interna de la Universidad, **cuyo resultado alcanzó un porcentaje de similitud de 0 % (poner el valor del porcentaje)**. Por tanto, en mi condición de asesor(a), firmo la presente carta en señal de conformidad y adjunto el informe de similitud del Sistema Antiplagio Turnitin, como evidencia de lo informado.

Sin otro particular, me despido de usted. Atentamente,



Armando Chiclla Salazar

DNI N°: 09967838

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6178-5599>

Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales - UCSS

* De conformidad con el artículo 8°, del Capítulo 3 del Reglamento de Control Antiplagio e Integridad Académica para trabajos para optar grados y títulos, aplicación del software antiplagio en la UCSS, se establece lo siguiente:

Artículo 8°. Criterios de evaluación de originalidad de los trabajos y aplicación de filtros

El porcentaje de similitud aceptado en el informe del software antiplagio para trabajos para optar grados académicos y títulos profesionales, será máximo de veinte por ciento (20%) de su contenido, siempre y cuando no implique copia o indicio de copia.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a:

Mis padres John y Dina, quienes con su esfuerzo, apoyo y paciencia han contribuido a hacer realidad un sueño más, por darme un ejemplo de esfuerzo, perseverancia y superación.

A mi hermana Karina por ese apoyo incondicional en todo este proceso, por estar conmigo en todo momento. A toda mi familia porque con el aliento constante y consejos me han hecho una mejor persona y de una forma u otra me acompañan en todos mis sueños y metas trazadas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios por concederme salud y bienestar en este largo proceso de preparación para la vida.

A mis padres y hermana, por la formación y valores que me inculcaron para afrontar la vida. El deseo de ver superarme día a día fue el principal motivo por el cual llegué hasta donde estoy hoy en día. Estaré eternamente agradecido a mi familia.

A mi asesor, Armando Chiclla por el tiempo brindado, apoyo y colaboración continúa en esta etapa de investigación realizada.

A la UCSS, por brindarme los medios y recurso para poder realizar mi investigación en todo este tiempo.

A todos los profesores que me transmitieron sus conocimientos, amigos y compañeros de la universidad y familiares, con quienes llegué a pasar muchos momentos y aprender nuevos conocimientos y experiencias junto a ellos.

¡A todos muchas gracias!

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes.....	4
1.2. Bases teóricas especializadas.....	13
1.2.1. La biodegradación.....	13
a. Polihidroxicanoatos.....	18
b. Poliuretano.....	19
c. Nylon y polietileno.....	19
d. El polietileno de baja densidad.....	20
e. Biodegradación bacteriana del polietileno.....	20
f. Efectos de la actividad microbiana sobre el polietileno.....	21
1.2.2. Las bacterias.....	22
a. La superficie bacteriana.....	23
b. Las <i>Pseudomonas</i>	24
e. Evaluación de la bacteria <i>Pseudomonas</i> como degradador del polietileno.....	25
f. Importancia de las biopelículas para la biodegradación.....	26
g. Degradación plástica por enzimas extracelulares e intracelulares.....	27
1.2.3. Factores que afectan la biodegradación del plástico.....	28
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1. Diseño de la investigación.....	30
2.2. Lugar y fecha.....	30
2.3. Descripción del experimento.....	31
2.4. Tratamientos.....	34
2.5. Unidades experimentales.....	35
2.6. Identificación de variables y su mensuración.....	35
2.7. Diseño estadístico del experimento.....	36
2.8. Análisis estadístico de datos.....	36
2.9. Materiales y equipos.....	37
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	39
3.1. Análisis del crecimiento de <i>P. putida</i> y <i>P. aeruginosa</i> en las láminas de polietileno..	39
3.2. Pérdida de peso del polietileno por <i>P. putida</i> y <i>P. aeruginosa</i>	41

3.3. Obtención del grado de biodegradación y obtención del Índice de Carbonilo.....	43
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN.....	47
4.1. Análisis del crecimiento de <i>P. putida</i> y <i>P. aeruginosa</i> en las láminas de polietileno..	47
4.2. Pérdida de peso del polietileno por <i>P. putida</i> y <i>P. aeruginosa</i>	48
4.3. Obtención del grado de biodegradación y el Índice de Carbonilo	49
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	53
TERMINOLOGÍA.....	62
APÉNDICES	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. <i>Tratamientos propuestos en la investigación. (A= solución conteniendo P. putida, B= solución conteniendo P. aeruginosa, LDPE= polietileno de baja densidad)</i>	35
Tabla 2. <i>Variables de la investigación y su mensuración.....</i>	36
Tabla 3. <i>Lista de compuestos químicos usados para la preparación de los medios basales minerales.....</i>	38
Tabla 4. <i>Crecimiento de las poblaciones de P. putida y Pseudomonas aeruginosa en las láminas de polietileno a diferentes tratamientos.....</i>	40
Tabla 5. <i>Registro promedio del peso y pérdida de peso (%) del polietileno de baja densidad por P. putida y P. aeruginosa.....</i>	42
Tabla 6. <i>Valores del índice de carbonilo (IC) obtenido en los diferentes tratamientos....</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Proceso de formación de la biopelícula bacteriana.....	16
<i>Figura 2.</i> Mecanismo de degradación abiótica y biótica del polietileno.....	29
<i>Figura 3.</i> Localización de las instalaciones donde se desarrolló la investigación.....	31
<i>Figura 4.</i> Crecimiento de poblaciones de <i>P. putida</i> y <i>P aeruginosa</i> evaluados a 30, 60 y 90 días	40
<i>Figura 5.</i> Resultados de la reducción de peso (%) del polietileno expuestos a diferentes tiempos.....	43
<i>Figura 6.</i> Resultados del Índice de Carbonilo tras la exposición a <i>P. putida</i> y <i>P. aeruginosa</i>	46

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Análisis de la varianza del Log (UFC/cm ²) y los diferentes tratamientos	64
Apéndice 2. Prueba de Tukey del tratamiento y el Log (UFC/cm ²)	64
Apéndice 3. Análisis de la varianza de la pérdida de peso del polietileno (%)	65
Apéndice 4. Prueba de Tukey del tratamiento y la pérdida de peso (%)	65
Apéndice 5. Análisis del FTIR del polietileno después de 30 días de incubación con la <i>P.</i> <i>putida</i>	66
Apéndice 6. Análisis del FTIR del polietileno después de 60 días de incubación con la <i>P.</i> <i>putida</i>	66
Apéndice 7. Análisis del FTIR del polietileno después de 90 días de incubación con la <i>P.</i> <i>putida</i>	67
Apéndice 8. Análisis del FTIR del polietileno después de 30 días de incubación con la <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	67
Apéndice 9. Análisis del FTIR del polietileno después de 60 días de incubación con la <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	68
Apéndice 10. Análisis del FTIR del polietileno después de 90 días de incubación con la <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	68
Apéndice 11. Registro fotográfico	69

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar cómo las bacterias *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa* influyen en la degradación del polietileno de baja densidad (LDPE), buscando alternativas que mitiguen los efectos ambientales de este plástico. Para ello, los microorganismos se activaron en un caldo nutritivo e incubaron a 30 °C durante 24 horas. En un medio mineral sin carbono, se utilizaron tiras de LDPE en forma de bolsas de plástico desinfectadas con etanol al 70 % y luego expuestas al cultivo bacteriano. La degradación del LDPE se midió por la pérdida de peso de las láminas y el índice de carbonilo. Los resultados mostraron que las bacterias formaron biopelículas en la superficie del LDPE, con una mayor cantidad de colonias en *P. putida* (Log [UFC/cm²]=13,20) que en *P. aeruginosa* (Log [UFC/cm²]=12,12). Además, se observó una reducción de peso significativa en las láminas de LDPE durante el experimento, excepto en el control. El índice de carbonilo aumentó notablemente en *P. aeruginosa*, alcanzando hasta 27 veces más en 90 días. Estos resultados demuestran la capacidad de *P. putida* y *P. aeruginosa* para biodegradar LDPE, sugiriendo su potencial como una solución biológica para reducir el impacto ambiental de este plástico.

Palabras clave: Degradación, LDPE, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate how the bacteria *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* influence the degradation of low-density polyethylene (LDPE), looking for alternatives that mitigate the environmental effects of this plastic. To do this, the microorganisms were activated in a nutrient broth and incubated at 30 °C for 24 hours. In a carbon-free mineral medium, LDPE strips were used in the form of plastic bags disinfected with 70% ethanol and then exposed to bacterial culture. LDPE degradation was measured by the weight loss of the sheets and the carbonyl index.

The results showed that the bacteria formed biofilms on the surface of the LDPE, with a higher number of colonies on *P. putida* (Log [CFU/cm²] =13.20) than on *P. aeruginosa* (Log [CFU/cm²] =12.12). In addition, a significant weight reduction was observed in the LDPE sheets during the experiment, except in the control. The carbonyl index increased remarkably in *P. aeruginosa*, reaching up to 27 times more in 90 days. These results demonstrate the ability of *P. putida* and *P. aeruginosa* to biodegrade LDPE, suggesting their potential as a biological solution to reduce the environmental impact of this plastic.

Keywords: Degradation, LDPE, *Pseudomona aeruginosa*, *Pseudomona putida*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la problemática de los desechos sólidos es una preocupación global, con una producción ascendente que alcanzó los 2,7 millones de toneladas métricas para el año 2021. Dentro de este panorama, el plástico se destaca como uno de los desechos más predominantes. El plástico se ha vuelto indispensable para el hombre debido a su amplia gama de aplicaciones tales como bolsas de plástico hasta botellas, tuberías, juguetes, etc., siendo fabricados desmesuradamente. Sin embargo, esta alta demanda ha generado una sobreproducción desmesurada que sumado a su difícil degradación lo ubica como uno de los principales contaminantes de ríos, mares y suelos (Mihai *et al.*, 2021).

Los plásticos, especialmente los polietilenos, tienen una amplia gama de aplicaciones, desde bolsas de plástico hasta botellas, tuberías, juguetes, etc., con una producción anual de alrededor de 140 millones de toneladas. Sin embargo, la alta demanda de estos materiales como materias primas ha conducido a una producción excesiva, generando contaminación en todos los niveles ecológicos. A su vez, los métodos para reducir su presencia han sido insuficientes. A pesar de los esfuerzos en el reciclaje y el reúso de los plásticos, no han podido contrarrestar la sobreproducción, lo que ha resultado en una acumulación peligrosa con presencia de lixiviados altamente tóxicos para la biota y el ser humano (Shimao, 2001).

El polietileno de baja densidad (LDPE) han sido ampliamente utilizados debido a su naturaleza versátil y efectividad en la fabricación de juguetes, tuberías, cables, envases y tapones de plástico, cartones de leche, etc. (Roy *et al.* 2008). Cada año, se estima que se consumen 500 mil millones de bolsas de plástico en todo el mundo. (Suleman *et al.* 2022) Después de su uso, estos materiales plásticos se arrojan en vertederos que conducen a la contaminación dada su lenta descomposición, pudiendo tardar hasta 1 000 años (Kale *et al.* 2015).

En el Perú, el manejo de los residuos sólidos compete directamente a las municipalidades; siendo depositados principalmente el 55 % en rellenos sanitarios y le restante en botaderos,

estas entidades reciben grandes volúmenes de materiales plásticos debido a la alta generación diaria de residuos sólidos; sin embargo, actualmente la mayoría se han excedido de dicha capacidad y urge aplicar formas de reducir estos contaminantes (Duran, E. 2021).

En la actualidad, dentro de los organismos que han sido usados como potenciales degradadores de los plásticos tenemos a las bacterias, actinomicetos y hongos (Iram *et al.* 2019). Siendo las bacterias las que adquieren especial importancia ya que biodegradan de manera óptima estos contaminantes o permiten dar las condiciones para favorecer su descomposición. Dentro de las bacterias, las especies del género *Pseudomonas* son un grupo usadas para procesos de biorremediación, ya que tienen la capacidad de utilizar como parte de su metabolismo al carbono presente en los lugares contaminados. Debido a ello, se han realizado diversos estudios con la finalidad de introducir nuevas metodologías que puedan ser aplicados en la reducción de plásticos. Una de las principales estrategias para facilitar la desintegración y la degradación posterior, es por degradación directa del polietileno de baja densidad, en la que los microorganismos utilizan solo el polímero de plástico como fuente de carbono (Muhonja *et al.* 2018).

Actualmente existen estudios que comunican sobre la biodegradación de polietileno por bacterias y especies de hongos, en forma muy general, siendo muy escasas las investigaciones en la degradación de los polímeros por especies de *Pseudomonas* (Yao *et al.* 2022). Por lo que esta investigación evaluó la actividad biodegradadora de polietileno por *P. putida* y *P. aeruginosa* y de esta manera buscar una alternativa para la reducción de los impactos ambientales generados por este plástico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la influencia de las bacterias *P. putida* y *P. aeruginosa* en la degradación de polietileno de baja densidad en condiciones controladas de temperatura y pH.

Objetivos específicos

- Estudiar el crecimiento de *P. putida* y *P. aeruginosa* en las láminas de polietileno.
- Determinar la pérdida de peso del polietileno de baja densidad por *P. putida* y *P. aeruginosa*.
- Evaluar el grado de biodegradación de *P. putida* y *P. aeruginosa* en el polietileno a través del Índice de Carbonilo.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Internacionales

Montazer *et al.* (2021) en el estudio “Degradación in vitro de polietileno de baja densidad por nuevas bacterias procedentes de larvas de la polilla mayor de la cera, *Galleria mellonella*”; tuvieron como objetivo evaluar la capacidad de utilizar el polietileno de baja densidad (LDPE) como única fuente de carbono. Para esto fueron aislados tres especies bacterianas de extractos de las larvas de la polilla de la cera mayor *Galleria mellonella* L. Las larvas de la polilla de la cera mayor, así como, la experimentación fue adquiridos del Departamento de Entomología de la Universidad de Manitoba, Irán. Estas bacterias fueron identificadas como *Lysinibacillus fusiformis* Ahmed, *Bacillus aryabhattai* FACU y *Microbacterium oxydans* Chatelain & Second y evaluaron su capacidad para biodegradar LDPE mediante curvas de crecimiento, producción de biomasa celular, pérdida de peso del polietileno (PE) y la presencia de productos de hidrólisis en los medios de cultivo. Además, evaluaron otras bacterias que degradaron el PE (*Cupriavidus necator* H16, *Pseudomonas putida* LS46 y *Pseudomonas putida* IRN22). Fue usado el paquete estadístico R para las evaluaciones estadísticas. Las medias de las variables se compararon mediante la prueba de Duncan y las correlaciones entre variables se calcularon mediante el método del cuadrado de Pearson con un nivel de probabilidad del 5 %. Los resultados mostraron que las curvas de crecimiento de las bacterias que utilizan LDPE como única fuente de carbono revelaron un pico en la densidad celular después de 24 h. Las densidades celulares disminuyeron a las 48 h, pero volvieron a aumentar lentamente hasta diferentes grados, dependiendo de la bacteria. La Incubación con bacterias aisladas de las larvas de polilla tuvieron efectos significativos en la producción masiva de células bacterianas y la pérdida de peso de LDPE en PE. Los autores concluyeron que los consorcios bacterianos fueron más capaces de degradar el LDPE que las especies individuales solas.

Dey *et al.* (2020) en la investigación “Biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE) tratado previamente por *Stenotrophomonas* sp. y *Achromobacter* sp.”; tuvieron como objetivo principal explorar y caracterizar la capacidad de biodegradación de polietileno de baja densidad por bacterias aerobias, enriquecidas a partir de residuos municipales y fluidos de perforación. Esta investigación se centró en identificar cepas bacterianas con potencial biodegradador y evaluar su eficiencia tanto individualmente como en consorcios, con el fin de entender mejor los mecanismos de biodegradación y su aplicabilidad en los residuos plásticos. Para que realicen esta investigación, utilizaron dos tipos de muestras ambientales como fuente de microorganismos degradantes de polietileno: (1) muestra de plástico de desecho del suelo del vertedero de Kharagpur y (2) fluido de perforación de la región de Koyna, ambas localidades de la India. Evaluaron el crecimiento bacteriano junto con una pérdida de peso significativa de las perlas de polietileno, cambio de pH a condición ácida y crecimiento de células de biopelícula alrededor de las perlas. Los resultados mostraron una reducción máxima en el peso del LDPE de 7,54 % en las muestras de fluido de perforación y 7,45 % en muestras del vertedero. También, exhibieron un mayor crecimiento celular de biopelículas con un recuento de unidades formadoras de colonias de hasta $10^6/\text{cm}^2$ en muestras del vertedero, mientras que en muestras de fluido de perforación mostraron recuentos más bajos $3 \times 10^5/\text{cm}^2$, así mismo, se observó una disminución significativa en el pH, de 7,0 a 5,6 para muestras del vertedero y una disminución en el pH de 7,0 a 6,0 muestras de fluido de perforación. Las muestras tratadas con suelo asociado a plástico del vertedero de Kharagpur demostraron un mayor crecimiento celular de biopelículas y cambios más significativos en el pH en comparación con las muestras inoculadas con fluidos de perforación. Sin embargo, en términos de reducción de peso del LDPE, las muestras de fluido de perforación tuvieron una ligera ventaja sobre las del vertedero. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando software especializado, comparando las medias de las variables mediante pruebas de significancia estadística. Los resultados se presentaron con niveles de confianza del 95 % ($p < 0,05$), lo que asegura que las diferencias observadas no son atribuibles al azar. El estudio concluyó que las bacterias *Stenotrophomonas* sp. y *Achromobacter* sp. tenían un potencial significativo para degradar LDPE, especialmente cuando se utilizaban en consorcios. Estos resultados sugirieron que la degradación de LDPE por bacterias es un proceso complejo que puede beneficiarse del uso de consorcios bacterianos para mejorar la eficiencia.

Montazer *et al.* (2019) en el estudio “Degradación microbiana del polietileno de baja densidad y síntesis de polímeros de polihidroxicanoato”; tuvieron como objetivo principal proporcionar evidencia de fragmentación microbiana y conversión (asimilación) del polietileno de baja densidad (LDPE) en polímeros de polihidroxicanoato por las células bacterianas. Para esta investigación usaron polvo de LDPE, con un tamaño de partícula menores de 400 micras, los cuales fueron sometidas a cuatro bacterias que degradan LDPE aisladas de un suelo de vertedero de plástico ubicado en Mashhad, Irán, incluyendo *P. putida* IRN22 (MF348181), *Acinetobacter pittii* IRN19 (MF348182), *Micrococcus luteus* IRN20 (MF348185) y *Delftia tsuruhatensis* IRN27 (MF348184). Los resultados demostraron que la producción de masa celular en medio que contenía LDPE después de 21 días de incubación varió entre $0,15 \pm 0,007$ g/L de masa seca celular para *Micrococcus luteus* IRN20 y $0,3 \pm 0,05$ g/L para *Cupriavidus necator* H16. El porcentaje de disminución en la masa de LDPE osciló entre $18,9 \pm 0,72$ % para *M. luteus* IRN20 a $33,7 \pm 0,12$ % para *C. necator* H16. *Acinetobacter pittii* IRN19 mostró una producción de masa celular más baja, pero fue eficaz en la degradación de partículas de LDPE, reduciendo su masa aproximadamente un 30 %. Los productos de hidrólisis de alcanos lineales de la degradación de LDPE fueron detectados en los medios de cultivo, y las longitudes de cadena de carbono de los productos de hidrólisis detectados variaron, dependiendo de la especie de bacteria. Se midió el crecimiento bacteriano en términos de densidad óptica a 600 nm la producción de biomasa se determinó al final de los experimentos mediante la medición del peso seco celular. La pérdida de peso de las partículas de LDPE se determinó utilizando la fórmula de pérdida de peso porcentual, y la presencia de productos de hidrólisis de LDPE se analizó mediante cromatografía de gases. Los datos de pérdida de peso de LDPE, crecimiento celular y la concentración total de productos de hidrólisis para cada bacteria se sometieron a análisis estadísticos utilizando el paquete de estadísticas R Core Team. Las medias de las variables se compararon mediante la prueba de Duncan y las correlaciones entre variables se calcularon utilizando el método de Pearson Square con un nivel de probabilidad del 5 %. Los autores informaron que estos resultados proporcionaron evidencia directa de la bioconversión simultánea de plástico LDPE en polihidroxicanoato biodegradable.

Muhonja *et al.*, (2018) en el estudio “Biodegradabilidad del polietileno por bacterias y hongos del vertedero de Dandora Nairobi-Kenia”; tuvieron como objetivo identificar bacterias y hongos con la capacidad de degradar el polietileno de baja densidad (LDPE).

Evaluaron la actividad degradadora de los inóculos fúngicos colectados de diferentes puntos de muestreo del vertedero de Dandora. Dicha biorremediación fue realizada bajo condiciones de laboratorio, para lo cual incubaron muestras de LDPE con los inóculos por 16 semanas a condiciones de temperaturas de 37 °C para hongos y 28 °C para bacterias, en una incubadora con agitador. El grado de biodegradación en las láminas de polietileno fue evaluado mediante diversas técnicas que incluyeron análisis de pérdida de peso y la espectroscopía infrarroja modificada Fourier (FTIR). Los resultados de FTIR reveló la aparición de nuevos grupos funcionales, específicamente aldehídos, éteres y carboxilos que fueron atribuidos a la degradación de hidrocarburos después de la incubación con las bacterias y hongos. El resultado del análisis de las secuencias de ADNr 16S y ADNr 18S para bacterias y hongos respectivamente mostraron que las bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Cellulosimicrobium* y *Lysinibacillus*, y los hongos del género *Aspergillus*, fueron implicados como degradadores de polietileno. Un análisis general de la biodegradación se realizó comparando la reducción de peso promedio de las láminas de polietileno incubadas con diferentes inóculos microbianos. Este análisis incluyó la comparación estadística de las tasas de degradación entre hongos y bacterias, utilizando pruebas de significancia como la prueba menos significativa protegida de Fisher ($P < 0,05$) para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos. El análisis general confirmó que los hongos fueron mejores degradadores de polietileno que las bacterias. La mayor actividad de degradación fúngica fue una reducción de peso promedio de $36,4 \pm 5,53$ % atribuido a la cepa A5 de *Aspergillus oryzae* (MG779508). La mayor actividad de degradación bacteriana fue atribuida a *Bacillus cereus* con una degradación del 35,72 y 20,28 % de degradación para *Brevibacillus borstelensis*. La investigación concluyó en que los géneros *Aspergillus*, *Bacillus* y *Brevibacillus* fueron buenos candidatos para la biodegradación de polietileno de baja densidad.

Abraham *et al.* (2017) en el estudio “Degradación microbiana del polietileno de baja densidad”; tuvieron como objetivo evaluar la biodegradabilidad del polietileno sintético mediante el uso de la cepa fúngica *Aspergillus nomius* y *Streptomyces* sp aislada, así como la cepa *actinobacteriana* del suelo de lodos. Las muestras de Polietileno utilizadas en este estudio fueron recolectadas del mercado de Vellore, India. Las tiras de polietileno tenían un espesor de 20 mm y fueron esterilizados con etanol al 70 %. Los lodos fueron recolectados del vertedero de aguas residuales en el Instituto de Tecnología de Vellore, India y utilizaron

este suelo para el aislamiento de microorganismos degradantes del LDPE. Se añadió un gramo de muestra de suelo a 99 ml de agua bidestilada estéril y se agitó adecuadamente. Tras tres ciclos de enriquecimiento, la solución se diluyó en serie para aislar hongos y actinobacterias. Se utilizaron medios específicos como agar ISP-2 para actinobacterias y agar dextrosa de Sabouraud (SDA) para hongos, y los cultivos se incubaron a temperatura ambiente y a 25 °C respectivamente. Se utilizaron caldos M1 y AGS complementados con tiras de plástico como única fuente de carbono para enriquecer hongos y actinobacterias, incubándose los matraces en un agitador rotatorio a 120 rpm durante 15 días. Después de tres ciclos de enriquecimiento, se sembraron muestras en agar SDA y AGS. Las películas de LDPE se recuperaron del medio de degradación y se lavaron con una solución de SDS al 2 %, luego se secaron a 60 °C antes de pesarlas. Se midió la pérdida de peso del LDPE incubado con *Aspergillus nomius* y *Streptomyces* sp. durante 90 días. Se utilizaron técnicas como microscopía de fuerza atómica (AFM), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para analizar los cambios en las películas de LDPE. Se observó la topología de la superficie de las películas tratadas y no tratadas usando AFM, y GC-MS se utilizó para identificar los compuestos producidos después de la degradación del LDPE. FTIR se utilizó para analizar los grupos funcionales presentes en las películas degradadas. La investigación se basó en un diseño experimental donde se compararon los resultados de degradación en presencia de los aislados microbianos frente a controles sin estos microorganismos. Los datos de los parámetros incluyeron la pérdida de peso porcentual de las películas de LDPE, la evolución de CO₂ durante la biodegradación, y los cambios en las propiedades químicas y físicas de las películas mediante AFM, GC-MS y FTIR. El modelo estadístico utilizado para analizar los resultados no se especifica explícitamente en el documento, pero generalmente incluye análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia de las diferencias observadas. Los niveles de confianza para la interpretación de los resultados se establecieron al 95 %. Los resultados mostraron que las cepas aisladas de *Aspergillus nomius* tuvieron la capacidad de degradar 4,9 % y *Streptomyces* sp. mostró un 5,2 % de pérdida de peso de las películas de polietileno respectivamente. Los autores concluyeron que la degradación de polietileno por *Aspergillus nomius* y *Streptomyces* sp. aislados, fueron capaces no solo de adherirse a la superficie de la película del plástico si no de usarla como fuente de carbono y energía, lo que posibilita encontrar microbios en el entorno que puedan degradar los plásticos sintéticos.

Gajendiran *et al.* (2016) en el estudio “Degradación microbiana del polietileno de baja densidad (LDPE) por la cepa JASK1 de *Aspergillus clavatus* aislada del suelo de un vertedero”; tuvieron como objetivo evaluar la biodegradación de películas de polietileno de baja densidad (LDPE) al ser expuestas a una cepa fúngica aislada. Las películas de LDPE utilizadas en el estudio fueron recolectados del mercado de Vellore, Tamil Nadu, India, y consistían en bolsas de 20 micras de espesor. Primero, cortaron las películas de LDPE en tiras pequeñas y las esterilizaron con etanol al 70 %. Luego, recolectaron muestras de suelo del vertedero del Instituto Vellore de Technology (VIT) y extrajeron microorganismos degradadores de LDPE. La degradación del LDPE por *A. clavatus* fue monitoreada durante 90 días de incubación en medio acuoso. Los resultados confirmaron la degradación del polietileno mediante el cambio en su peso, la evolución de CO₂ según la prueba de Strum, así como cambios morfológicos registrados mediante microscopía electrónica de barrido. La investigación empleó una técnica de enriquecimiento para seleccionar el hongo eficiente en la degradación del polietileno. Se utilizó caldo M1 complementado con tiras de plástico como única fuente de carbono y energía. Los hongos aislados se incubaron a 120 rpm durante 15 días. Posteriormente, se realizaron ciclos de enriquecimiento y se aislaron los hongos mediante placas de PDA. Para la medición precisa del peso seco del LDPE residual, las películas de LDPE se recuperaron del medio de degradación y se lavaron con una solución de dodecilsulfato de sodio al 2 %. Las películas lavadas se secaron a 60 °C antes de pesarlas y se determinó el porcentaje de pérdida de peso utilizando la fórmula estándar. El análisis evolutivo filogenético y molecular de los aislados se realizó utilizando el software MEGA 4.0 con el modelo de 2 parámetros de Kimura y el algoritmo de unión de vecinos. Los valores de arranque se determinaron a partir de 1000 conjuntos de datos remuestreados. En cuanto a la evolución del CO₂, se utilizó la prueba Strum para evaluar la producción de CO₂ como resultado de la degradación del LDPE. Los cambios se registraron comparando con un control, confirmando la degradación efectiva del LDPE por *Aspergillus clavatus*. Los autores concluyeron que la degradación de polietileno por el hongo *A. clavatus* fue altamente eficiente, lo que sugiere que podría ser un candidato adecuado para la degradación del polietileno de baja densidad.

Biffinger *et al.* (2015) en la investigación “La aplicabilidad de Impranil® DLN para medir la biodegradación de poliuretanos”; tuvieron como objetivo evaluar el efecto de Impranil® DLN para medir la biodegradación de poliuretanos. El estudio fue realizado en la División

de Química del Laboratorio de Investigación Naval de EE.UU. Los polímeros a base de poliuretano y sus productos de degradación impregnaron la sociedad moderna. Un método común para determinar si un microorganismo o proteína podía degradar esta clase de polímero fue evaluar cualitativamente su capacidad para "limpiar" un coloide de poliéster y poliuretano de la marca Impranil® DLN (Impranil), cuya formulación es patentada. Sin embargo, su estado coloidal finalmente convirtió al Impranil en una opción precaria para determinar si un organismo o una enzima podía degradar los poliuretanos. En este estudio, fueron identificados productos de hidrólisis química de Impranil utilizando HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M, los cuales fueron evaluados mediante técnicas de espectroscopia magnética nuclear de protones (RMN) y espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Las concentraciones reportadas fueron calculadas a partir de la intensidad integrada promedio de las señales de RMN en δ 3,5 ppm y señales entre δ 1,0 y 0,5 ppm frente al estándar interno. Los cambios en OD600 nm fueron determinados restando los espectros resultantes de una muestra de control que contenía la misma cantidad de Impranil antes de la adición de ácido o base. Estos datos confirmaron que hubo producción de una hidrólisis significativa sólo en condiciones alcalinas y que la cantidad de degradación no pudo ser determinada usando mediciones ópticas. Además, expusieron suspensiones de Impranil (10 mg/mL) a una concentración de HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M. Cada reacción se calentó a 65 °C durante 24 horas y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las reacciones se centrifugaron (14,000 rpm, 45 min) y los sobrenadantes se separaron de los sedimentos de Impranil y se usaron para una caracterización analítica adicional. Además, también se prepararon suspensiones de Impranil (0,8 mg/mL) como solución estándar para este ensayo. Esta suspensión tenía un OD600 de $0,42 \pm 0,2$ y permitió la estandarización de las condiciones de reacción. Normalmente se añadieron 2,5 mL de la suspensión a cubetas de vidrio con tapa de rosca de 10 mL. Cada reacción se llevó a cabo utilizando el mismo proceso utilizado en las reacciones químicas ácidas o básicas. Los autores concluyeron que este estudio demuestra el uso de Impranil para evaluar cuantitativamente la biodegradación del polímero en lugar de ser simplemente un indicador cualitativo, además, se destacó la necesidad de usar métodos espectroscópicos cuantitativos junto con los estudios de "aclaramiento" de Impranil para confirmar la degradación efectiva de los poliuretanos.

Nacionales

Hermoza (2019) en la investigación “Biodegradación microbiana de polietileno de baja densidad, bajo condiciones térmicas controladas en biorreactor air lift, en Santa Clara- Lima 2019”; tuvieron como objetivo evaluar la biodegradación microbiana del polietileno bajo propiedades térmicas controladas. Esta investigación fue de tipo experimental con un enfoque cuantitativo, donde la muestra estuvo constituida por bolsas de polietileno recolectadas de un botadero en la localidad de Santa Clara del distrito de Ate. Los microorganismos bacterianos usados para la biodegradación fueron *P. aeruginosa* y *Aspergillus brasiliensis*, los cuales fueron sometidos a condiciones controladas de temperatura, oxigenación y pH en un reactor air lift por un periodo de siete días. Para el análisis estadístico de los datos fue necesario contrastar las variables a través del análisis de varianza de una vía con un nivel de confianza del 95 %. Los resultados mostraron que *P. aeruginosa* redujo significativamente ($p < 0,05$) en un 2 % al polietileno de baja densidad, sometido a una temperatura de 21,8 °C con un pH de 6,5 y a una oxigenación de 6,8 mg/L. Por otro lado, el hongo *A. brasiliensis* redujo significativamente ($p < 0,05$) la muestra de polietileno en un 7 % a condiciones de temperatura de 22,1 °C, pH 7,14 y oxígeno disuelto de 7,45. El autor concluyó que el hongo *A. brasiliensis* fue el organismo más eficiente en la reducción del polietileno de baja densidad.

Barbarán *et al.* (2018) en la investigación “Biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por acción de *Pseudomonas aeruginosa*, en condiciones de laboratorio”; tuvieron como objetivo determinar la concentración de *P. aeruginosa* aplicada en diferentes periodos de tiempo para lograr el mayor porcentaje de biodegradación del Polietileno tereftalato. Esta investigación de tipo experimental fue desarrollada utilizando 35 g de polietileno tereftalato en polvo a partir de botellas de agua CIELO, a los que se le aplicó nueve tratamientos de 3 concentraciones de *P. aeruginosa* (8×10^7 UFC, 36×10^7 UFC y 9×10^8 UFC) para periodos de 15, 25 y 35 días, considerando tres repeticiones por cada tratamiento. El porcentaje de biodegradación bacteriana fue determinada por el método de pérdida de peso. Los valores de pérdida de peso fueron sometidos a la estadística inferencial a través del análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan. Los resultados demostraron una degradación del 19,93 % del polímero por aplicación de una concentración de 9×10^8 UFC de *P. aeruginosa* a un periodo de 35 días. Los autores concluyen que, la

remoción del polietileno tereftalato es dependiente del tiempo y de la concentración bacteriana a la que es sometida.

Alania y Pérez (2017) en el estudio “Efecto de la temperatura en el crecimiento de dos cepas ATCC de *Pseudomonas* sp. expuestas a polipropileno”; tuvieron como objetivo evaluar la temperatura en el crecimiento de dos bacterias del género *Pseudomonas* sp. expuestas a polipropileno. Este estudio se realizó en los laboratorios de la escuela de Tecnología Médica de la Universidad Cayetano Heredia, Lima. En esta investigación, evaluaron el crecimiento de dos poblaciones bacterianas de *Pseudomonas* ATCC en los medios de cultivo selectivo. La muestra de plástico de polipropileno fue obtenida a partir del fraccionamiento de tubos Falcón a un tamaño de 2 mm, y agregaron 2 g de este material a cada unidad experimental. Además, fue añadido 1 mL del medio enriquecido, para luego incubarlos a 2 y 37 °C durante 60 días. Para el análisis estadístico utilizaron la prueba de t-Student, con el que determinaron las diferencias de promedio de acuerdo con la condición, con un nivel de confianza del 95 %. Los autores pudieron corroborar de manera significativa ($p < 0,001$) la interacción de las bacterias con el plástico; además, obtuvieron una mejor respuesta de degradación a 37 °C. Los autores concluyeron, a la luz de los resultados obtenidos de la evaluación de las absorbancias promedio, que el mayor crecimiento de las bacterias ATCC sometidas al polipropileno fue a 37 °C.

Chunga y Cieza (2017) en la investigación “Biodegradación de poliestireno utilizando microorganismos presentes en el humus de lombriz durante los meses, octubre–diciembre 2016”; tuvieron como objetivo establecer la degradación del poliestireno por organismos bacterianos encontrados en el humus de lombriz. Para la realización de esta investigación, utilizaron poliestireno obtenido de plásticos descartables, los que fueron depositados en macetas con humus de lombriz a diferentes periodos, profundidades y a una temperatura de 22 °C (condiciones del laboratorio de investigación de la Universidad de Lambayeque, Perú). Para el análisis de los datos usaron la estadística descriptiva a través del programa Excel. Los resultados de la identificación de los organismos bacterianos presentes en las muestras de humus determinaron la presencia de: *Bacillus* spp y *Clostridium* spp. Los autores realizaron el pesaje del poliestireno, obteniendo para octubre 0 % para la parte superficial; 0,4 % para la parte media; y 1,6 % para el fondo. En noviembre, obtuvieron

0,4 % para la parte superficial, 0,8 % para la parte media y 4,8 % para la parte del fondo, mientras que en diciembre obtuvieron 0 % para la superficie, 0,8 % para la parte media y 3 % para el fondo. Los autores concluyeron que hubo una alta capacidad degradadora principalmente en el fondo de la maceta con un porcentaje del 9,4 % superior a los otros estratos.

1.2. Bases teóricas especializadas

1.2.1. La biodegradación

La degradación de acuerdo con lo expresado por Posada (1994), se refiere a los cambios que se pueden originar de manera térmica, mecánica, química, fotoquímica, radiantes y biológica. En el contexto de la biodegradación de materiales a base de plástico, incluidos espumas de plástico, varios términos se usan indistintamente sin tener en cuenta diferencias sutiles en su significado. Se mencionan algunos de estos términos aquí: degradación ambiental, fotodegradación, degradación térmica y biodegradación. El término “degradación ambiental” se refiere al efecto total de varios factores ambientales como la luz solar, calor, oxígeno, aire, viento, lluvia, polvo, agua, contaminación química. Mientras que la biodegradación está referida a la degradación generada por microorganismos, insectos, animales, etc.; que pueden provocar la disminución de algún contaminante cuando se deja expuesto al ambiente (Alania y Pérez, 2017).

Biodegradación de los plásticos

La biodegradación de los plásticos está referida a la transformación de estos polímeros y posterior asimilación, principalmente por microorganismos como bacterias y hongos. Los principales productos de esta degradación son el CO₂, H₂, O, CH₄ y agua (Tyagi *et al.*, 2022).

La degradación enzimática de los materiales plásticos es considerada biodegradación, y el término “biodegradación enzimática” se usa ampliamente para expresar la actividad ejercida por microorganismos. La biodegradación de las espumas poliméricas se logra bajo condiciones relativamente más suaves y generalmente a condiciones ambientales de pH,

temperatura y presión controladas. En este papel, “biodegradación” se refiere a la degradación tanto microbiana como enzimática de espumas poliméricas (Lee *et al.*, 2014).

Como resultado de la degradación, principalmente microbiana, se obtiene un cambio total de la estructura química inicial, lo que conlleva a una disminución en el peso molecular de este polímero. Este proceso biodegradador se desarrolla óptimamente manteniendo un control de los principales parámetros como la de temperatura, pH, O₂ y fuentes energéticas que contribuyan en el desarrollo de estos microorganismos bacterianos, tales como el bacilo *Pseudomonas*. Se han desarrollado estudios que han podido establecer que la actividad degradadora se puede desarrollar a temperaturas bajas, desde los 0 °C hasta valores muy altos como los 70 °C. Además, se ha determinado que la mayor actividad degradadora de las bacterias y hongos se realiza a los 35 °C. Según González–García *et al.* (2013), en los recientes estudios muestran que, la degradación de polímeros por microorganismos puede ocurrir tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Además, se ha observado que los valores óptimos de pH para lograr una alta reducción en la degradación de estos polímeros se encuentran en el rango de 5 a 8. Es importante destacar que el espesor de los polímeros debe recibir una atención especial durante el proceso de degradación, ya que a medida que aumenta el espesor del plástico, la estructura orgánica del polímero se vuelve más compleja, lo que implica que se requiere un tiempo considerablemente mayor para su descomposición.

Mecanismo de biodegradación

Los pasos de biodegradación han sido identificados y descritos por Márquez-Peñaranda *et al.* (2016) como:

- **Biodeterioración**

Relacionado con la degradación superficial de material plástico, esto con lleva a una modificación de sus propiedades mecánicas, físicas y químicas. Esta actividad es producto de la presencia de microorganismos en la superficie de cualquier material expuesto a ellos.

- **Fragmentación microbiana**

Relacionado a la descomposición de polímeros plásticos por microorganismos, donde enzimas como lipasas, proteasas y amilasas catalizan la ruptura de los enlaces químicos en los polímeros, facilitando su descomposición en fragmentos más pequeños que pueden ser metabolizados por los microorganismos.

- **Asimilación bacteriana**

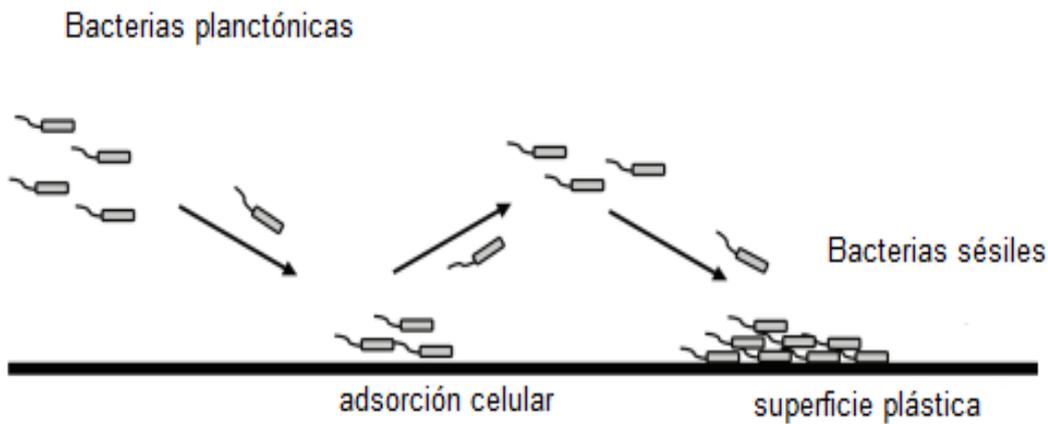
Proceso mediante el cual las bacterias incorporan moléculas del entorno hacia el citoplasma celular para su posterior procesamiento metabólico. Este proceso implica la participación de diversas rutas metabólicas, como el glicólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, que permiten la obtención de energía en forma de ATP.

- **Mineralización**

Resultado final de la degradación que proporciona productos como CO₂, N₂, CH₄ y H₂O. Para los procesos de degradación bacteriana es necesario que los microorganismos puedan adherirse a cualquier sustrato (biopelícula), esto hace que puedan crecer y desarrollarse, tal como se aprecia en la Figura 1. Las naturalezas de las superficies generalmente son hidrofóbicas o hidrofílicas, siendo la superficie del polietileno de naturaleza hidrofóbica, por lo que es necesario recurrir a bacterias hidrofóbicas que puedan interactuar directamente sobre la superficie del plástico en mención. La degradación del plástico comienza con secreción de enzimas por parte de la bacteria sobre la superficie, esto genera la ruptura del polímero produciendo fragmentos de menor peso molecular. Luego de procesos continuos aeróbicos de degradación se obtiene CO₂ y H₂O. Existen también degradaciones bajo condiciones anaeróbicas de tipo metanogénicas en presencia de metano, logrando productos como CO₂, H₂O, CH₄; y degradaciones bajo condiciones anaeróbicas de tipo sulfogénicas en presencia de azufre, H₂S, CO₂, y H₂O (Shah *et al.*, 2014).

Figura 1

Proceso de formación de la biopelícula bacteriana



Nota. Adaptado de *Biological Degradation of Polymers in the Environment* (p. 8), por A. Glaser (2019), Gomiero A. Editores.

Biodegradación de algunos plásticos

a. Poliéster

Los poliésteres son polímeros cuyos monómeros están unidos a través de enlaces éster. Se producen muchos tipos de ésteres en la naturaleza y las enzimas que los degradan, como las esterasas, son ubicuos en organismos vivos. Los enlaces éster son generalmente fáciles de hidrolizar. De hecho, una serie de plásticos sintéticos del tipo de los poliésteres son biodegradables y los poliésteres bacterianos (polihidroxicanoatos) han sido usados para hacer plásticos biodegradables. Varios poliésteres ahora son producidos a escala semi-comercial por un número de empresas que fabrican plásticos biodegradables (Balaji *et al.* 2018).

Degradación microbiana de poliéster

Es un proceso gobernado biológicamente y se puede definir como la degradación microbiana de polímeros complejos en un determinado período de tiempo, bajo condiciones naturales logrando moléculas más simples como el dióxido de carbono, el agua y la biomasa. La biodegradación de polímeros es un fenómeno complejo controlado por muchos elementos incluyendo factores bióticos y abióticos. Los microorganismos presentes en el medio

ambiente utilizan fácilmente los plásticos como fuente de carbono y su degradación potencial puede variar dependiendo de los tipos de enzimas que albergan. Estos microorganismos con potencial de biodegradación se encuentran más abundantemente en suelo y compost a diferencia de los ecosistemas acuáticos como agua dulce y ambiente marino (Emadian *et al.*, 2017).

Papel de las enzimas en la biodegradación del poliéster

La hidrólisis enzimática es uno de los métodos de eliminación disponibles para la gestión de residuos plásticos, se considera el más atractivo y eficaz método vigente. Los poliésteres biodegradables tienen enlaces éster lábiles presentes en su estructura, que hacen ellos susceptibles al ataque enzimático. Las enzimas son específicas al sustrato, lo que nos permite lograr la recuperación de monómeros de residuos plásticos mixtos mediante el uso progresivo de las enzimas (Vollmer *et al.*, 2020).

Debido a la insolubilidad en agua y la longitud de la cadena, los microorganismos no pueden asimilar los plásticos en su citoplasma, que es el principal lugar de procesos bioquímicos. Durante el proceso de degradación, los microorganismos secretan enzimas, que dan como resultado la descomposición de polímeros complejos y producen moléculas más pequeñas, como oligómeros y monómeros. Estas moléculas más pequeñas son absorbidas dentro de las células microbianas a través de la membrana semipermeable celular y luego son utilizados por los microorganismos. Las células, incluidos los microorganismos, contienen enzimas, pero la cantidad y la variedad de enzimas varían significativamente entre varios organismos. Las enzimas son altamente específicas al sustrato, por lo tanto, son responsables de la despolimerización de diferentes tipos de plásticos. Estas enzimas hidrolíticas se clasifican en lipasas, esterasas, ureasas y proteasas, que hidrolizan los polímeros rompiendo los enlaces éster (Ghosh *et al.*, 2013).

La despolimerización del poliéster se lleva a cabo por la hidrólisis de los enlaces éster presentes en ellos. Este ataque hidrolítico lo llevan a cabo enzimas que hidrolizan enlaces éster tales como lipasas, esterasas, cutinasas, proteasas o ureasas con diferentes preferencias de sustrato y variaciones en su activación interfacial. Las enzimas que degradan los plásticos

pertenecen a la serina hidrolasas y se ha encontrado que poseen la misma tríada catalítica en su sitio activo. Entre las hidrolasas, las hidrolasas de éster carboxílico son enzimas globales y se encuentran en las tres esferas de la vida (bacterias, arqueas y eucariotas), incluso en virus. Se sabe que llevan a cabo la hidrólisis de un enlace éster en presencia de agua, lo que resulta en la formación de un alcohol y un ácido carboxílico. Dentro de familia de hidrolasas de éster carboxílico, hay dos grupos bien conocidos: esterases y lipasas. Las enzimas de microbios se consideran más ventajosas en comparación con las enzimas obtenidas de animales o plantas debido a las diversas actividades catalíticas disponibles, mayor rendimiento, facilidad de manipulación genética, rápida tasa de crecimiento de microorganismos en medios bastante baratos, más estabilidad y la producción es más conveniente y segura (Satti y Shah, 2020).

a. Polihidroxicanoatos

El polihidroxicanoato (PHB) es un poliéster natural que se acumula en las células bacterianas como carbono y compuesto de almacenamiento de energía. El PHB y los copolímeros que contienen otros hidroxicanoatos, como el 3-hidroxicanoato, están siendo utilizados para la fabricación de plásticos biodegradables. Los polímeros PHB y otros polihidroxicanoatos (PHA) son metabolizados por muchos microorganismos; además, una cantidad de despolimerasas de PHA bacterianas y sus genes han sido aislados recientemente. Las despolimerasas de PHA son serina hidrolasas y sus secuencias de proteínas contienen cuatro regiones: una secuencia de señal; un dominio catalítico que contiene la caja de lipasa; un dominio de unión al sustrato que actúa como un sitio de adsorción para sustratos poliméricos; y un dominio que une los dominios catalíticos y de unión al sustrato. Los de dominio de enlace puede comprender una secuencia enriquecida con treonina o una secuencia similar a fibronectina tipo III. Los PHA despolimerasas generalmente tienen un dominio de unión al sustrato, aunque recientemente un PHB despolimerasa con dos dominios de unión a sustrato fueron reportados. Se piensa que la presencia de dos dominios de unión al sustrato puede agrandar el sustrato especificidad o mejorar la adsorción de la enzima (Ohura y Kasuya, 1999; González-García *et al.*, 2013).

b. Poliuretano

El diisocianato produce poliuretano (PUR) por un proceso llamado poliadición. El eslabón de la cadena característica de este polímero es el enlace de uretano; aunque generalmente está presente en menor medida y en la mayoría de los casos son grupos de uretano unidos a enlaces éster de polialquileno (poliéter PUR) y/o secuencias de poliéster (poliéster PUR) con masas moleculares de entre 200 y 6 000 g/mol. Desde el primer estudio sobre el ataque fúngico de PUR, una serie de informes relacionados con el biodeterioro de PUR por microorganismos han sido publicados. La biodegradación por estos organismos es, sin embargo, incompleto; su crecimiento no pudo ser apoyado por una disminución de PUR y requiere fuentes adicionales de carbono y nutrientes. Las PUR despolimerasas de estos microorganismos no se han examinado en detalle, aunque se cree que la mayor parte de la degradación es realizada por esterases. Recientemente, se ha reportado la cepa bacteriana *Delftia acidovorans* TB-35, que utiliza un poliéster PUR como fuente de carbono (Rajan y Vijayalakshmi, 2023). De igual manera, la bacteria *D. acidovorans* degradó completamente 50 mg de la muestra PUR en 5 mL de un medio de sal mineral dentro de siete días a 30 °C; en un medio con PUR como única fuente de carbono y nitrógeno, el 48 % se degradó después de siete días. Dietilenglicol y ácido adípico se detectaron como productos de degradación, pero no se encontraron metabolitos para indicar la escisión del enlace de uretano (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995; Loo y Sudesh, 2007).

c. Nylon y polietileno

La membrana de nylon-66 de alto peso molecular puede degradarse significativamente por medio de la acción de pudrición blanca, un proceso que descompone la lignina. Esto generado por los hongos cultivados en condiciones ligninolíticas con limitada glucosa o tartrato de amonio. La enzima responsable de la degradación de nylon, que se purificó a partir de un sobrenadante de cultivo de la cepa fúngica de pudrición blanca IZU-154, resultó ser idéntica a los de manganeso peroxidasa. Además, la enzima también degrada las fibras de Nylon-6. La presencia de una erosión drástica y regular en la superficie del nylon sugiere que el material se descompone en oligómeros solubles. Por otro lado, se ha observado que el alto peso molecular del polietileno también puede degradarse mediante la acción de hongos ligninolíticos en condiciones de limitación de nitrógeno o carbono, gracias al

manganeso peroxidasa. Esta enzima ha sido parcialmente purificada a partir de una cepa de *Phanerochaete chrysosporium* (Liyoshi *et al.*, 1998).

d. El polietileno de baja densidad

El polietileno de baja densidad (LDPE) es el principal insumo para la formación de bolsas y uno de los generadores de contaminación en el mundo. Su degradación es lenta, considerando que recién se transforma a los 150 años en contacto con la naturaleza. Este polímero permite ser reciclado para elaborar bolsas de residuos. Dentro de las características principales está su flexibilidad y la suavidad al tacto, así como su brillo y resistencia. La estructura química de este plástico corresponde a un polietileno de cadena de carbonos muy ramificada, esto implica que este plástico presente mayor volumen y una menor densidad (Sáenz, 2008).

e. Biodegradación bacteriana del polietileno

Más de 20 géneros bacterianos degradan diferentes tipos de Polietilenos. Estos incluyen varias especies gram-negativas y gram-positivas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobactor*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, etc. La mayoría de estas cepas bacterianas poseen la capacidad de deteriorar la superficie y/o formar una biopelícula en el polietileno. Estudios sobre diversas actividades del género *Pseudomonas* se han llevado a cabo para investigar sus capacidades para degradar y metabolizar una variedad de polímeros plásticos sintéticos y sus derivados. Las especies de *Pseudomonas* tienen la capacidad única de degradar y metabolizar los polímeros con oxidación extracelular y/o actividades de enzimas hidrolíticas, que facilitan la absorción y degradación de los fragmentos de polímero (Danso *et al.*, 2019).

Existen registros de la degradación completa del polietileno en agua después del tratamiento con *P. fuorescens* en presencia de surfactante y biosurfactante, lo que sugiere su importancia en la oxidación y biodegradación de polímeros. La posible biodegradación de una película del polietileno se exhibe en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido y

por microscopía de fuerza atómica (AFM), observando corrosión, grietas y la rugosidad de la superficie del subsuelo producidas por bacterias (Glaser, 2019).

f. Efectos de la actividad microbiana sobre el polietileno

El efecto de la colonización microbiana en la superficie de polietileno fue estudiado mediante el seguimiento de siete características diferentes con respecto al grado de biodegradación del polímero: grupos funcionales en la superficie, hidrofobicidad/hidrofilicidad, cristalinidad, distribución del peso molecular, topografía de la superficie, propiedades mecánicas y balance de masa. La espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) se utiliza para estudiar la formación de varios grupos funcionales en la superficie del polietileno después de la oxidación abiótica y biótica por tratamiento termo-Ultravioleta y degradación microbiana. El tratamiento del polietileno con ácido nítrico conduce el aumento en la absorbancia de la luz ultravioleta infrarroja a 1710–1715 cm^{-1} (correspondiente al grupo carbonilo) y 1640 cm^{-1} y 830–880 cm^{-1} (correspondiente a $-\text{C}=\text{C}-$), que luego se ve reflejada en una reducción después de la incubación con consorcios microbianos (Ghatge *et al.*, 2020).

La cristalinidad es otro parámetro importante para predecir el grado de biodeterioro del polímero y puede ser medido con la ayuda de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis FTIR. En general, la región amorfa es fácilmente accesible y degradada por microorganismos, dando como resultado un aumento inicial en la cristalinidad. Después del ataque (o permanencia) en las regiones amorfas, los microorganismos comenzarán a degradar la región cristalina y un aumento en la proporción de cristales más grandes [2, 105]. La cromatografía de exclusión por tamaño y el análisis de espectrometría de masas (TOF-MS) dan una idea sobre la distribución del peso molecular del polietileno después de la biodegradación (Ghatge *et al.*, 2020).

Los análisis de microscopia electrónica de barrido (SEM) se emplean comúnmente para investigar la topografía de la superficie de las películas del polietileno durante la biodegradación. Así mismo, los microorganismos utilizan el polietileno como única fuente de carbono metabolizando CO_2 durante la respiración, por lo que la medición del CO_2

liberado se puede vincular a la cantidad de polímero consumido. Esta disminución en el peso de las muestras puede ser establecidas por mediciones gravimétricas (Nowak *et al.*, 2011).

1.2.2. Las bacterias

Las bacterias son seres vivos microscópicos unicelulares pertenecientes al reino Eubacteria. Las bacterias son las más antiguas, estructuralmente más simple, y la más abundante forma de vida en la tierra. Ellos son también los únicos organismos procarióticos con organización celular. Las bacterias eran abundantes hace más de 2 mil millones de años antes de la aparición de los eucariotas en el mundo. Fueron las primeras bacterias fotosintéticas (cianobacterias) que alteraron la atmósfera terrestre con la producción de oxígeno que condujo a bacterias extremas y a una diversidad eucariótica. Las bacterias juegan un papel vital tanto en la productividad como en el reciclaje de sustancias esenciales para otras formas de vida. Las bacterias son los únicos organismos capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Moshtaq, 2016).

Las bacterias son ubicuas en la Tierra y viven en todas partes. Muchos de los otros entornos más extremos en los que se encuentran las bacterias serían letales para cualquier otra forma de vida. Las bacterias viven en aguas termales que podrían cocinar otros organismos, en ambientes hipersalinos que deshidrataría otras células y en atmósferas ricas en gases tóxicos como el metano o el sulfuro de hidrógeno que matarían la mayoría de los otros organismos (Rampeloto, 2013).

Es probable que las bacterias evolucionaran para vivir en estas duras condiciones desde el principio y han conservado la capacidad de explotar estas áreas como el resto de la atmósfera que se modificó. Son metabólicamente mucho más diversos que los eucariotas, razón por la cual pueden existir en una variedad tan amplia de hábitats. Las numerosas bacterias autótrofas, ya sea fotosintéticas o quimios autótrofas, realizan importantes contribuciones al balance de carbono en los ecosistemas terrestres, de agua dulce y hábitats marinos. Otras bacterias heterótrofas juegan un papel clave en la ecología mundial al descomponer los compuestos orgánicos. Una de las funciones más importantes de las bacterias en el ecosistema global se relaciona con el hecho de que sólo unos pocos géneros de las bacterias,

y ningún otro organismo, tiene la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y así hacerlo disponible para su uso por otros organismos (Hibbing *et al.*, 2010).

a. La superficie bacteriana

La pared celular bacteriana es una estructura importante porque mantiene la forma de la célula y la protege de la hinchazón y ruptura. La pared celular generalmente consta de peptidoglucano, una red de moléculas de polisacáridos conectados por enlaces cruzados polipeptídicos. En algunas bacterias, los peptidoglucanos forman una red gruesa y compleja alrededor de la superficie exterior de la célula. Esta red está entrelazada con cadenas peptídicas. En otras bacterias, se encuentra una fina capa de peptidoglucano intercalada entre dos membranas plasmáticas (Moshtaq, 2016).

Muchos tipos de bacterias tienen flagelos helicoidales delgados y rígidos (singular y flagelo) compuestos por la proteína flagelina. Estos flagelos varían de 3 a 12 micrómetros de largo y son muy delgados, sólo de 10 a 20 nanómetros de espesor; y están anclados en la pared celular y giran, tirando de las bacterias a través del agua como una hélice. Las pili (singular, pilus) son estructuras parecidas a pelos que se encuentran en algunas bacterias. Ellos son más cortos que los flagelos bacterianos, hasta varios micrómetros de largo y alrededor de 7,5 a 10 nanómetros de espesor. Las Pili ayuda a las células bacterianas a adherirse a sustratos apropiados e intercambian información genética (Trachtenberg y Cohen-Krausz, 2006).

Algunas bacterias forman endosporas de paredes gruesas alrededor de su cromosoma y una pequeña porción en los alrededores del citoplasma cuando están expuestas a condiciones pobres en nutrientes. Estas endosporas son altamente resistentes al estrés ambiental, especialmente al calor, y pueden germinar para formar nuevos individuos después de décadas o incluso siglos (Moshtaq, 2016).

b. Las *Pseudomonas*

Las *Pseudomonas* son un grupo grande e importante de bacterias Gram-negativas. Son organismos cosmopolitas que presentan una vida independiente en diversos ecosistemas, tanto en suelo, aguas y muy estrechamente ligados con plantas y animales. Muchas veces son reconocidos por presentar una alta actividad degradadora. Poseen una alta adaptabilidad a todo tipo de ambientes adversos y a otros organismos logrando multiplicarse exitosamente. Se les han aislado en lugares muy húmedos, agua estancada, aguas residuales y superficies mojadas (Palleroni, 1981).

Las cepas de *Pseudomonas* son agentes activos de la mineralización de materia orgánica y también son responsables de la descomposición de la comida. El género incluye especies patógenas para el hombre, animales domésticos y cultivos (Palleroni, 1981). La morfología básica de las *Pseudomonas* comunes son bacterias en forma de bacilos rectos o ligeramente curvos en un plano, presentan flagelos polares y ausencia de esporas (Palleroni, 1981).

c. *Pseudomonas putida* Trevisan

Dentro de las características que son útiles para una separación de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* se incluyen la incapacidad de licuar la gelatina, producir cualquier pigmento de fenazina, poca eficiencia en desnitrificar y sobre todo crecer a rangos cercanos a 41 °C. En esta gama de propiedades negativas, la incapacidad de hidrolizar la gelatina es la única que ha definido clásicamente a *P. putida*. Esta especie puede ser aislada del suelo y del agua después del enriquecimiento en medios minerales con diversas fuentes de carbono. La mayoría de las cepas se han asignado a la biovariedad A (biotipo A), a la que se considera la más común. Biovar B difiere del biovar A, sólo en unas pocas propiedades fenotípicas: todas las cepas conocidas de esta biovariedad utilizan L-triptófano, quinurenina, y antranilato, mientras que la mayoría usa D-galactosa como fuente de carbono. Ninguna de las cepas de biovariedad B usa nicotinato. Estudios recientes en muchas cepas de esta especie, sugieren una revisión en base a los patrones de restricción de genes de ARNr (ribotipado) para poder establecer una mejor identificación de esta especie (Palleroni, 2005).

d. *Pseudomonas aeruginosa* Migula

Presenta formas bacilares móviles gracias a un solo flagelo polar. Al examinar una placa de cultivo Petri, se pueden observar dos tipos principales de colonias bacterianas: una grande y lisa, con bordes planos y centro elevado (que tiene un aspecto similar al de un “huevo frito”) y otra pequeña, áspera y convexa. Las grandes colonias tienen parches brillantes de color gris metálico plateado y con picaduras. En general, los materiales clínicos son buenas fuentes para el aislamiento de colonias grandes de *P. aeruginosa*, mientras que las colonias pequeñas se pueden encontrar comúnmente en fuentes naturales. Un tercer tipo de colonia (mucoide), se puede obtener de las secreciones del tracto respiratorio y urinario, siendo descubierto por primera vez por Sonnenshein (1927). Además de pioverdina y piocianina, algunas cepas pueden producir otros pigmentos, incluyendo pigmento rojo oscuro. La desnitrificación y licuefacción de gelatina está presente en la gran mayoría de cepas. La hidrólisis de Tween 80 es débil y la reacción de la yema de huevo es negativa. La temperatura óptima para el desarrollo de esta especie es de 37 °C. *P. aeruginosa* es probablemente la más extendida de todas las especies bacterianas. Se puede aislar del suelo y del agua, especialmente de cultivos de enriquecimiento para bacterias desnitrificantes. También es comúnmente aislado de muestras clínicas (heridas, quemaduras e infecciones del tracto urinario). Es el agente causante del “pus azul”, ocasionalmente patógeno para plantas. La especie se puede dividir internamente en varios subgrupos (tipos) útiles para fines epidemiológicos (Palleroni, 2005).

e. Evaluación de la bacteria *Pseudomonas* como degradador del polietileno

Las *Pseudomonas* presentan una gran capacidad de metabolizar compuestos orgánicos tanto simples como complejos, lo que les ubica como organismos con una alta versatilidad alimenticia. Su principal alimento son las moléculas de carbono, por lo que son organismos ideales para la degradación derivados de los plásticos y sobre todo si este fuera la principal fuente de carbono. Este conocimiento sirve para utilizar a estas bacterias como excelentes degradadores de este material contaminante (Palleroni, 1981).

El género *Pseudomonas* ha sido estudiado extensamente en la biodegradación y deterioro del plástico, en especial polímeros de poliuretano, cloruro de vinilo; así como el polietilenglicol (Obradors y Aguilar, 1991), además, se han observado que otras especies de bacterias

realizan la degradación del plástico; así, *Bacillus* pueden producir exoenzimas degradadores del acetato de celulosa. En general, la actividad principal de los microorganismos está dada por su acción enzimática, siendo el alcano monoxigenasa el responsable del deterioro de la superficie de los polímeros sintéticos tal como lo refiere Seneviratne *et al.* (2006). Las bacterias no son las únicas degradadoras; así también los hongos han sido estudiados, con la posibilidad de determinar su capacidad degradativa. Los mecanismos de consorcio probados demuestran su alta versatilidad en la obtención del carbono no solo por acción propia, sino también por la captura de los productos de degradación de los otros microorganismos del consorcio (López-Mondéjar *et al.*, 2019).

f. Importancia de las biopelículas para la biodegradación

La capacidad de las células bacterianas para unirse y degradar polímeros plásticos depende de la estructura de la superficie del polímero. La adición de grupos funcionales hidrófilos a los polímeros plásticos se requiere a menudo para promover la unión a la superficie celular debido a la naturaleza hidrófila típica de las superficies celulares, lo que perjudica la atracción de los polímeros hidrófobos. Por lo tanto, se demostró que una mayor rugosidad e hidrofiliidad de la superficie del polímero facilitan tanto la unión mejorada de colonias bacterianas como la accesibilidad de las enzimas extracelulares secretadas a la superficie del polímero (Nauendorf *et al.* 2016).

En los casos de polímeros plásticos, incluido el polietileno, que tienen alta hidrofobicidad, la formación de una biopelícula requiere que el polímero sea alterado por reacciones de oxidación o complementado con productos químicos para aumentar las interacciones superficiales con las células bacterianas (Sivan, 2011). Las especies bacterianas formadoras de biopelículas con superficies celulares relativamente hidrófobas han mejorado la unión de la superficie celular a polímeros plásticos no modificados (Devi *et al.*, 2016).

Tribedi *et al.* (2015) refieren que las células *Pseudomonas* sp. AKS2 adaptadas a la biopelícula tienen mayor hidrofobicidad en la superficie celular y capacidad de degradación del polietileno de baja densidad, esto favorecido por la secreción bacteriana de exopolisacáridos que ayudan en la unión al polímero plástico. Por tanto, las condiciones

ambientales y nutricionales que favorecen la génesis de biopelículas sobre polímeros plásticos son estímulos importantes para la degradación de plásticos sintéticos por *Pseudomonas* sp.

g. Degradación plástica por enzimas extracelulares e intracelulares

La degradación enzimática involucra dos procesos importantes que pueden medirse por la pérdida de peso y adiciones de grupos funcionales. La reducción del peso molecular del polímero permite los efectos catalíticos de enzimas que solo pueden operar sobre moléculas más pequeñas y facilita el transporte de estas a través de la membrana celular (Shah *et al.*, 2008).

Las reacciones de oxidación química o biológica a menudo son necesarias para aumentar la hidrofiliidad del polímero al proporcionar un grupo funcional como el alcohol o los grupos carbonilo que pueden mejorar la unión y degradación bacteriana; además, los grupos funcionales carbonilo se pueden metabolizar dentro de la célula a través de la β -oxidación y el ciclo del ácido tricarboxílico (ATC) (Restrepo-Flórez, *et al.*, 2014).

La ruptura hidrolítica del polímero puede ocurrir en el término de la cadena, lo que se conoce como exoataque (Figura 2); o en algún lugar a lo largo de la cadena del polímero, llamada endoataque. Los dos modos diferentes de ataque crean productos diferentes. El exoataque suele generar en pequeños oligómeros o monómeros que las bacterias pueden asimilar en la célula. Por otro lado, el endoataque reduce principalmente el peso molecular del polímero, por lo que no es probable que los productos resultantes sean asimilables sin una degradación adicional (Lenz, 1993).

Se ha comprobado que una despolimerasa extracelular de *Pseudomonas* sp. fue eficaz en la descomposición de poliestireno bromado de alto impacto (Mohan *et al.* 2016). Las esterasas, lipasas y cutinasas son hidrolasas que son fundamentales en la degradación plástica, en la que los enlaces éster se rompen a través del ataque nucleófilo sobre los átomos de carbono del carbonilo creados por reacciones de oxidación previas (Devi *et al.*, 2016). Se cree que

las enzimas degradantes de poliuretano son principalmente esterases o proteasas extracelulares que están unidas a la membrana o se secretan de forma extracelular (Shah *et al.*, 2013). Otro ejemplo de esta actividad enzimática lo encontramos con el poliuretano degradado significativamente por *Pseudomonas* sp. por una esterasa recombinante (Biffinger *et al.*, 2015). Estas acciones enzimáticas están involucradas principalmente en los primeros pasos de la degradación del plástico. Sin embargo, aún se desconoce mucho sobre lo que sucede intracelularmente con los oligómeros o monómeros plásticos asimilables después de que se transportan a través de la membrana celular bacteriana.

1.2.3. Factores que afectan la biodegradación del plástico

Varios factores afectan el proceso de biodegradación, incluido las propiedades del polímero, las condiciones de exposición y las características enzimáticas. Algunos de estos factores se enumeran a continuación.

a. Humedad

La humedad puede influir en la biodegradación del polímero en diferentes maneras debido al requerimiento esencial de agua para el crecimiento y multiplicación de microbios. Por lo tanto, la degradación del polímero y la velocidad se mejora en presencia de suficiente humedad debido a rápida acción microbiana. Además, las condiciones ricas en humedad favorecen el proceso de hidrólisis al generar más reacciones de escisión de cadena (Ahmed *et al.*, 2018).

b. Potencial de hidrógeno y temperatura

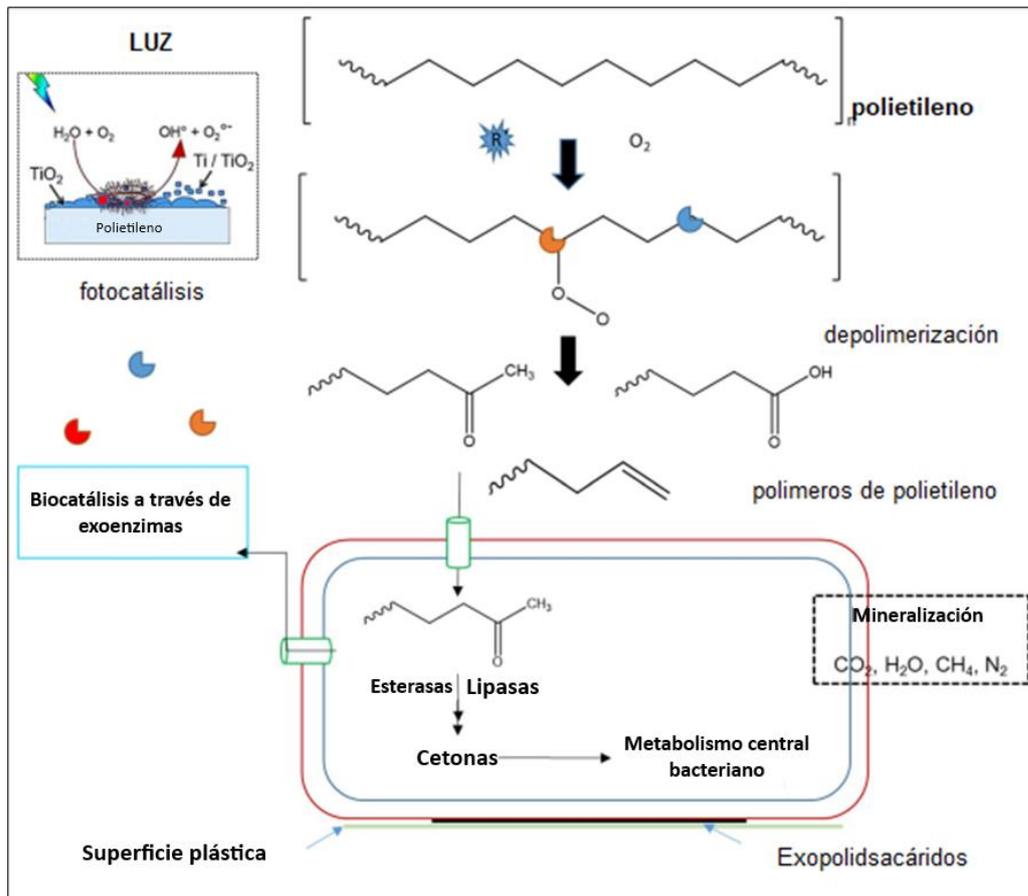
El potencial de hidrógeno (pH) puede modificar la velocidad de las reacciones de hidrólisis cambiando las condiciones ácidas o básicas. Por ejemplo, a pH 5, la tasa de hidrólisis de las cápsulas de ciertos polímeros es más óptima (Henton *et al.*, 2005). productos de degradación de varios

Los polímeros alteran las condiciones de pH seguidas por la velocidad del proceso de degradación y crecimiento microbiano. De manera similar, la degradabilidad enzimática se ve afectada significativamente por la temperatura de ablandamiento. Por lo que, la aplicación de la temperatura y pH va a estar condicionada por el tipo de bacteria a usar. Las bacterias

del grupo de las *Pseudomonas*, han sido evaluadas a diferentes niveles; así, *P. aeruginosa* ha sido probada para degradar el polietileno por Butrón (2020) con éxito a 25 a 35 °C y a pH de 5 a 7. De manera similar fueron probados por Yang *et al.* (2020) en *P. putida* a de 25 y 35 °C y a pH de 6 a 8 por lo que recomiendan Ahmed *et al.* (2018) aplicar en estos rangos de pH y Temperatura para obtener una mayor biodegradación del polietileno.

Figura 2

Mecanismo de degradación abiótica y biótica del polietileno



Nota. Adaptado de *Biological Degradation of Polymers in the Environment* (p. 10), por A. Glaser (2019), Gomiero A. Editores.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de la investigación

La investigación presentó un enfoque de tipo cuantitativo, en la que los valores obtenidos se contrastaron con cada uno de los tratamientos probando cada una de las hipótesis propuestas en el estudio. A su vez, el alcance de la investigación fue de tipo explicativo (Gómez, M. 2006).

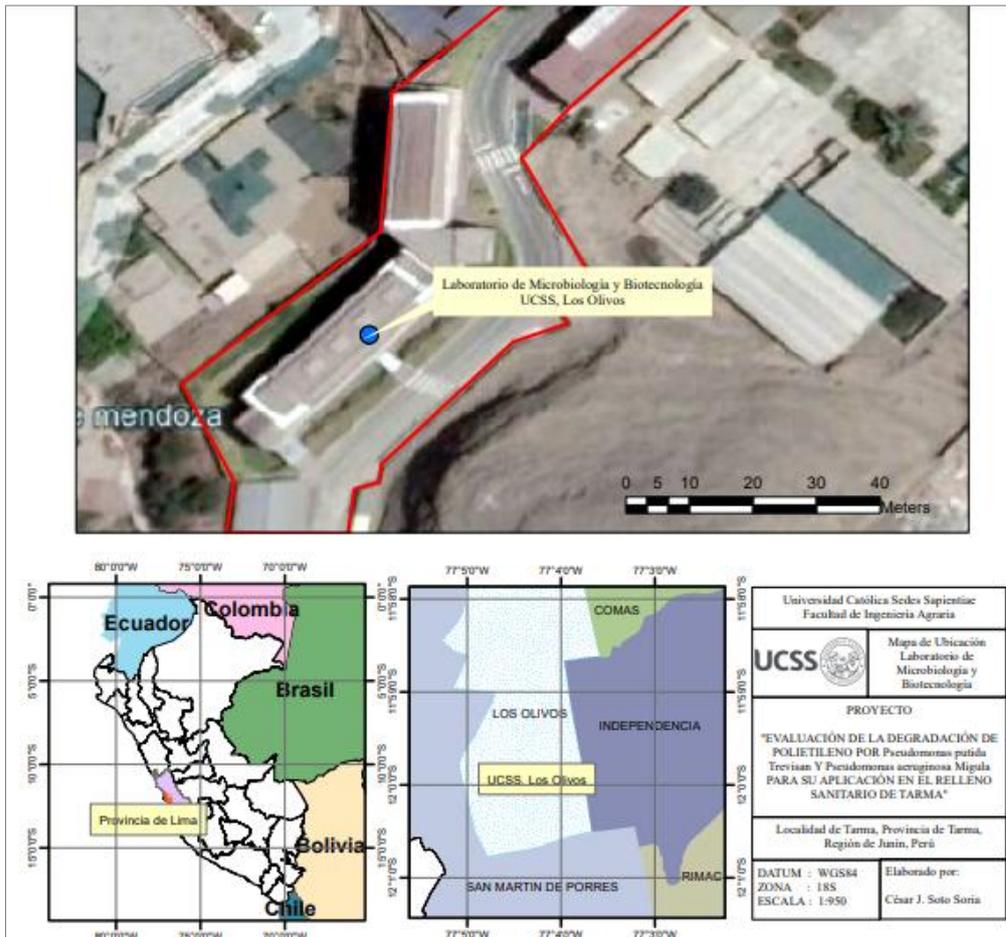
El diseño de la investigación fue de tipo experimental, en donde se manipularon la variable independiente representada por la cantidad de bacteria de diferentes especies, expuestas a diferentes periodos logrando la degradación del polietileno de baja densidad, tal como recomienda (Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018).

2.2. Lugar y fecha

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Universidad Católica Sedes Sapientiae-Lima, en los meses de setiembre del 2020 a febrero del 2021. La Figura 3 muestra los detalles de la ubicación de Laboratorio.

Figura 3

Localización de las instalaciones donde se desarrolló la investigación



2.3. Descripción del experimento

a. Obtención de los microorganismos bacterianos

Los microorganismos seleccionados para la presente investigación fueron *P. putida* ATCC 49128 y *P. aeruginosa*, los cuales fueron cedidos del depósito del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la UCSS y reactivados con caldo nutritivo según lo propuesto por Kyaw *et al.*, (2012). Una vez preparado el medio se incorporaron cada cepa para su adaptación por un periodo de 24 horas y a la temperatura de 30 °C.

b. Preparación de los medios basales minerales

Los medios minerales basales utilizados para probar la biodegradabilidad del polietileno de baja densidad consistieron en preparar los siguientes elementos en agua destilada, según recomendado por Kyaw *et al.* (2012):

- 12,5 g.L⁻¹ K₂HPO₄
- 3,8 g.L⁻¹ KH₂PO₄
- 1,0 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄
- 0,1 g.L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O

Además, 5 mL de una solución de elementos traza que deben contener cada uno de los siguientes elementos (preparados en agua destilada):

0,232 g.L⁻¹ H₃BO₃

0,174 g.L⁻¹ ZnSO₄ 7H₂O

0,116 g.L⁻¹ FeSO₄ (NH₄)₂SO₄ 6H₂O

0,096 g.L⁻¹ CoSO₄ 7H₂O

0,022 g.L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O

8,0 mg.L⁻¹ CuSO₄ 5H₂O

8,0 mg.L⁻¹ MnSO₄ 4H₂O

c. Estudio de cinética de crecimiento bacteriano y crecimiento en las láminas de polietileno

Fueron colocados una alícuota de cada cepa bacteriana, contenida en los tubos incubados con medio nutritivo a intervalos regulares, durante los primeros 40 días de incubación, para la cuantificación de células bacterianas por la técnica de dilución en serie, para lo cual se utilizaron placas de Agar Pseudomonas para el recuento de colonias viables.

Las bacterias de la biopelícula presentes en las láminas de polietileno fueron cuantificadas utilizando el método convencional, en donde la capa de biopelícula que se formó en el

plástico fue retirada al sumergirla en 2 mL de NaCl al 0,9 % durante 2 horas y agitadas de 5 a 10 min. Posteriormente, fue tomada una alícuota de esta suspensión y se realizó la dilución en serie en placas de agar Pseudomonas, seguidamente fueron contadas las colonias. Las UFC (unidades formadoras de colonias) para las bacterias fueron calculadas a partir de la siguiente fórmula propuesta por Kyaw *et al.*, (2012).

$$\text{Log} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{cm}^2} \right) = \text{Log} \left[\frac{(\text{promedio UFC})}{\text{Volumen de la gota}} \times (\text{Dilución contada}) \left(\frac{(\text{volumen dañado})}{\text{superficie de la muestra}} \right) \right]$$

Donde:

- Log: logaritmo
- UFC: unidades formadoras de colonia bacteriana

d. Preparación de las láminas de polietileno y condiciones para su degradación

Las películas de polietileno (LDPE) fueron bolsas de plástico usadas comercialmente. Estas fueron cortadas en tiras (5 x 1 cm) y luego fueron lavadas con etanol al 70 % durante 30 min, se lavaron con agua destilada, y luego fueron secados en incubadora a 60 °C para posteriormente ser expuestos al medio de cultivo bacteriano. La inoculación y la incubación se llevó a cabo en condiciones asépticas completas. Más adelante, fueron pesados tubos de Falcón en donde se colocaron 30 mL de medio mineral basal y 600 µL de la solución madre bacteriana (la que tuvo 24 horas de adaptación al medio), fueron mezclados y se añadieron 100 mg (una tira) de películas de polietileno, tal lo recomendado por Kyaw *et al.* (2012) y Harshvardhan y Jha (2013). Los tubos fueron incubados en un agitador rotativo (120 rpm) a 15 °C, con la tapa ligeramente abierta para la aireación. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada una de las bacterias. Las películas fueron eliminadas a los 30, 60 y 90 días después de la incubación para verificar periodos mínimos y máximos, tal como lo sugiere Gutiérrez y Álvarez (2019). Posteriormente, fueron verificados los cambios de peso, cambios de propiedades mecánicas y cambios morfológicos (de superficie). El control estuvo compuesto por tubos de ensayo que contenían solo el polietileno en láminas en medio nutritivo basal desprovisto de inóculo bacteriano. A todos los tratamientos se les considero una temperatura de 30 °C y a un pH de 7,0; tal como lo sugiere Ahmed *et al.* (2018).

e. Mediciones de pérdida de peso del polietileno

Las películas de plástico después de la exposición a los tratamientos con las bacterias fueron lavadas con SDS (duodecil sulfato sódico) al 2 % por 4 cuatro horas. Las tiras fueron secadas a 60 °C durante 12 horas. El porcentaje de pérdida de peso fue determinada usando la siguiente fórmula propuesta por Abraham *et al.* (2017):

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Donde: Peso inicial y peso final (g)

f. Análisis espectroscópico y obtención del Índice de Carbonilo

Los cambios en los enlaces de polímero debido a la biodegradación fueron determinados usando la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Las películas de plástico expuestas a las dos cepas de bacterias fueron analizadas a intervalos regulares en el espectrofotómetro obteniéndose así el Índice de carbonilo (CI) que se utilizó para medir el grado de biodegradación dado que su valor depende del enlace carbonilo degradado. El CI se obtuvo de la siguiente fórmula propuesta por Kyaw *et al.* (2012):

$$\text{Índice de Carbonilo} = \frac{\text{Absorción a } 1740 \text{ cm}^{-1}}{\text{Absorción a } 1460 \text{ cm}^{-1}}$$

2.4. Tratamientos

Los tratamientos de la investigación se detallan en la Tabla 1:

Tabla 1

Tratamientos propuestos en la investigación. (A= solución conteniendo P. putida, B= solución conteniendo P. aeruginosa, LDPE= polietileno de baja densidad)

Tratamientos	Descripción
Tratamiento 0	100 mg LDPE + 30 mL medio mineral +30/60/90 días de exposición
Tratamiento 1	600 µL A + 100 mg LDPE +30 mL medio mineral +30 días de exposición
Tratamiento 2	600 µL A + 100 mg LDPE +30 mL medio mineral +60 días de exposición
Tratamiento 3	600 µL A + 100 mg LDPE +30 mL medio mineral +90 días de exposición
Tratamiento 4	600 µL B + 100 mg LDPE +30 mL medio mineral +30 días de exposición
Tratamiento 5	600 µL B + 100 mg LDPE +30 mL medio mineral +60 días de exposición
Tratamiento 6	600 µL B + 100 mg LDPE +30 mL medio mineral +90 días de exposición

2.5. Unidades experimentales

La presente investigación contó con 18 unidades experimentales más el control. Cada unidad experimental estuvo constituida por un tubo de Falcon que contenía 600 µL de cultivo de cepa bacteriana más 30 mL de medio mineral al cual se le añadió 100 mg de láminas de LDPE a diferentes días de exposición (30, 60 y 90). Al control no se le añadió el cultivo con cepa bacteriana. Este experimento presentó 3 repeticiones para cada tratamiento.

2.6. Identificación de variables y su mensuración

La identificación de las variables y su mensuración se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2*Variables de la investigación y su mensuración*

Variable	Unidades	Mensuración
<i>Independiente</i>		
Cepas Bacteriana (dosis)	UFC/mL	Conteo colonias
Tiempo de exposición	días	
<i>Dependiente</i>		
Variación de peso del LDPE	%	Gravimetría
Índice de Carbonilo		Espectrofotometría FTIR

2.7. Diseño estadístico del experimento

Para esta investigación fue propuesto un Diseño Completamente al Azar (DCA). El cual contempló como fuente de variación dos cepas distintas evaluadas a diferentes tiempos (30, 60 y 90 días) lo que permitió comparar los tratamientos de manera efectiva bajo las condiciones de laboratorio. La estructura del diseño es el modelo aditivo lineal, el cual se describe a continuación:

$$Y_i = \mu + t_i + e_i$$

Donde:

- Y_i = Observación del i -ésimo tratamiento
- μ = Parámetro, efecto medio
- t_i = Efecto del tratamiento i
- e_i = Error experimental en el tratamiento i

2.8. Análisis estadístico de datos

Fue usado el software Microsoft Excel para realizar las tablas y gráficos, mientras que los gráficos del FTIR fueron creados usando el software Origin 9,2. Además, se efectuó el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar el efecto de los tratamientos sobre el grado de degradación del LDPE (variación de peso e índice de carbonilo). Así mismo, fue utilizado las pruebas múltiples de Tukey con un valor de significancia de $p < 0,05$. Para las evaluaciones estadísticas fue usado el software SPSS 24.

2.9. Materiales y equipos

2.9.1. Material biológico

- Cepa bacteriana de *P. putida* ATCC 49128
- Cepa bacteriana *P. aeruginosa* ATCC BAA-1744

2.9.2. Material de laboratorio

- Probeta de vidrio de 100 mL
- Mechero de alcohol
- Pinzas
- Matraz Erlenmeyer
- Placas de Petri
- Asa bacteriológica
- Láminas porta objeto y cubreobjeto
- Gradillas

2.9.3. Reactivos

Tabla 3

Lista de compuestos químicos usados para la preparación de los medios basales minerales

Fórmula compuesta	Compuesto químico	Cantidad
K_2HPO_4	Fosfato de dipotasio (g)	12,5
KH_2PO_4	Fosfato de monopotasio (g)	3,8
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amonio (g)	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado (g)	0,1
H_3BO_3	Ácido bórico (g)	0,23
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de zinc heptahidratado (g)	0,174
$FeSO_4 (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$	Sulfato ferroso amoniacal hexahidratado (g)	0,116
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de cobalto heptahidratado (g)	0,096
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	Molibdato de amonio tetrahidratado (g)	0,022
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado (mg)	8,0
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	Sulfato de manganeso tetrahidratado (mg)	8,0
ClNa	Cloruro de sodio (g)	10,0
Detergente SDS	-	-
Agua desionizada	(L)	5

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Análisis del crecimiento de *P. putida* y *P. aeruginosa* en las láminas de polietileno

La formación de la biopelícula bacteriana por las especies *P. putida* y *P. aeruginosa* fue estudiada a través del crecimiento en la superficie de las láminas de polietileno. La Tabla 4 muestra los resultados promedio del crecimiento de las poblaciones bacterianas en los diferentes tratamientos expresados en UFC/cm², en donde se observó un valor mínimo de 1,46x10⁶ UFC/cm² para el Tratamiento 4 y un valor máximo de 1,6 x10¹⁴ UFC/cm² para el Tratamiento 3. Además, en la Tabla 4 se puede observar los valores transformados a logaritmos [Log (UFC/cm²)], cuyo orden de crecimiento celular de mayor a menor fue Tratamiento 3>Tratamiento 6>Tratamiento 5>Tratamiento 2>Tratamiento 1>Tratamiento 4.

En la Figura 4 se detalla un crecimiento bacteriano significativo ($p < 0,05$) durante todo el experimento (ver Apéndice 1, Tabla 6), en donde a 90 días y 30 días se presentó mayor crecimiento por la bacteria *P. putida* y un menor crecimiento para *P. aeruginosa*. Así mismo, se pudo observar que, a través del análisis post hoc de comparaciones múltiples de Tukey (ver Apéndice 2), a los 60 días de exposición, las poblaciones de *P. putida* y *P. aeruginosa* no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos.

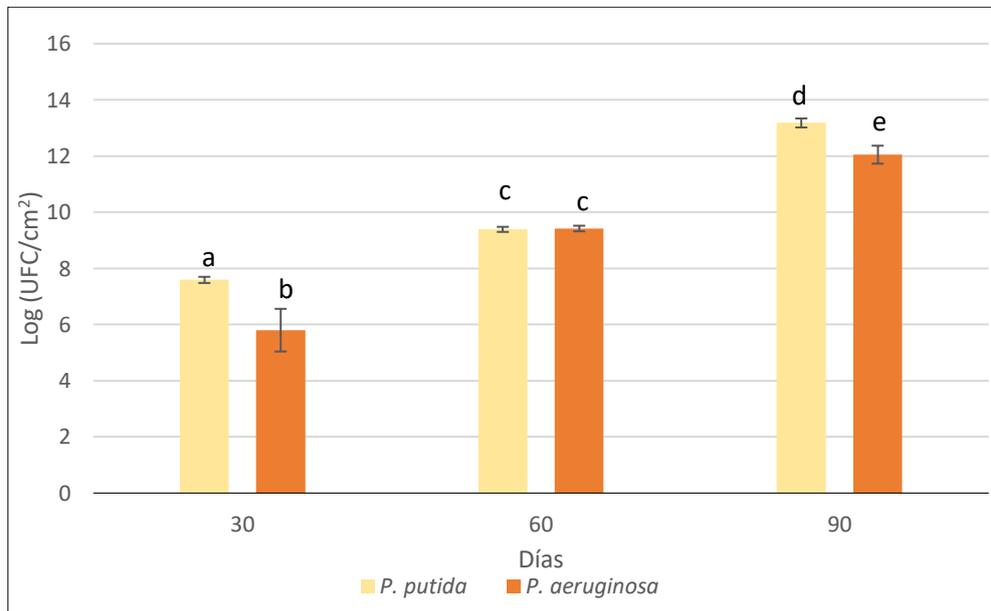
Tabla 4

Crecimiento de las poblaciones de P. putida y P. aeruginosa en las láminas de polietileno a diferentes tratamientos

	Tratamientos					
	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5	Tratamiento 6
R1	$4,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^{14}$	$1,8 \times 10^6$	$3,2 \times 10^9$	$0,5 \times 10^{12}$
R2	$3,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{14}$	$2,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{12}$
R3	$5,1 \times 10^7$	$3,1 \times 10^9$	$1,8 \times 10^{14}$	$0,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^9$	$2,0 \times 10^{12}$
Promedio	$4,1 \times 10^7$	$2,53 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{14}$	$1,46 \times 10^6$	$2,73 \times 10^9$	$1,33 \times 10^{12}$
UFC/cm ²						
Log (UFC/cm ²)	7,61	9,39	13,20	6,1	9,5	12,12

Figura 4

Crecimiento de poblaciones de P. putida y P. aeruginosa evaluados a 30, 60 y 90 días



Nota. Barras con letras iguales no existe diferencias significativas según la prueba de Tukey.

3.2. Pérdida de peso del polietileno por *P. putida* y *P. aeruginosa*

Las películas de polietileno después de la exposición a las poblaciones *P. putida* y *P. aeruginosa* mostraron disminución de peso final con respecto al inicial, lo que se traduce en pérdidas de peso (%) y se detallan en la Tabla 5. Se observó que *P. putida* registró una pérdida de peso promedio de $0,29 \pm 0,10$ % a los 30 días de exposición, mientras que a los 60 días de exposición se obtuvo un valor de $0,61 \pm 0,118$ % de pérdida de peso promedio y a los 90 días se obtuvo una pérdida de peso promedio de $2,14 \pm 0,85$ %. Por otro lado, *P. aeruginosa* registró una pérdida de peso de $0,32 \pm 0,209$ % a los 30 días de exposición, seguido de una pérdida de peso promedio de $3,83 \pm 2,4$ % a los 60 días de exposición y finalmente se logró obtener una pérdida de peso promedio de $5,70 \pm 4,06$ % a los 90 días de exposición.

La Figura 5 muestra que hubo una alta reducción de peso significativo ($p < 0,05$) durante todo el experimento (ver Apéndice 3), en donde a 90 días se presentó una mayor reducción del peso por *P. aeruginosa*, mientras que a los 30 días se mostró una menor pérdida de peso (%) para *P. aeruginosa* como para *P. putida*. Se debe de considerar a los 60 días de exposición con *P. aeruginosa* es más notoria la pérdida de peso, ya que la desviación estándar no llega a cruzar una con otra. El análisis post hoc de comparaciones múltiples de Tukey (ver Apéndice 4) mostró que los valores obtenidos de pérdida de peso (%) a diferentes tiempos (30, 60 y 90 días) poseen diferencias significativas ($p < 0,05$).

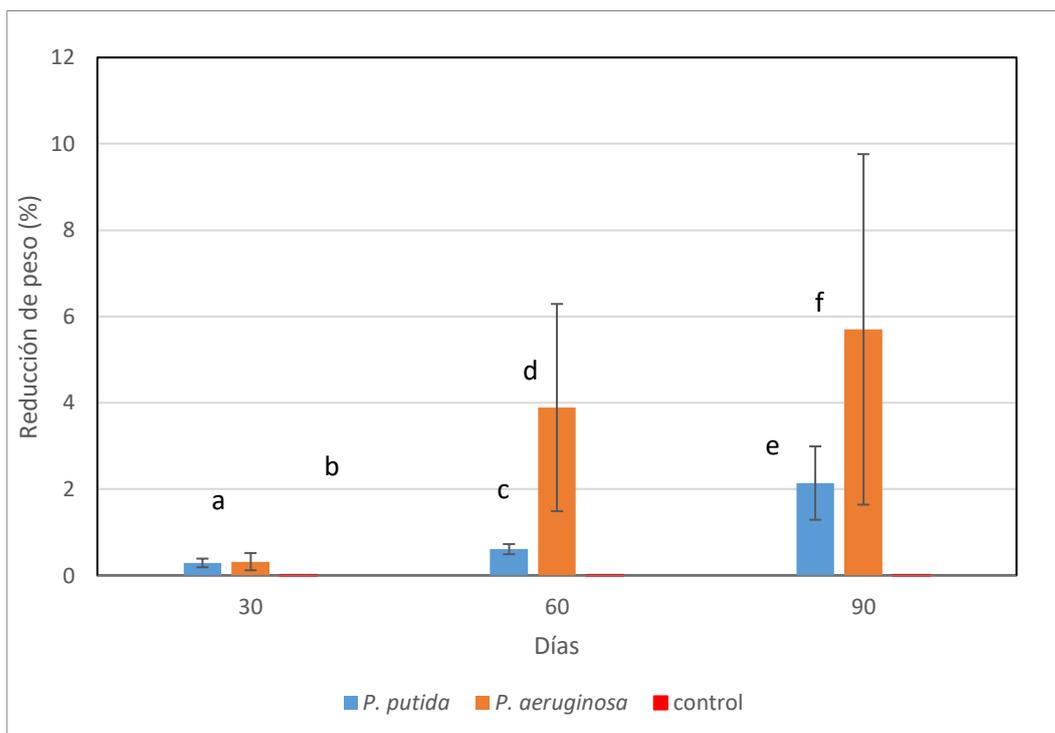
Tabla 5

Registro promedio del peso y pérdida de peso (%) del polietileno de baja densidad por *P. putida* y *P. aeruginosa*

Tiempo de exposición	Peso inicial	Peso final	Pérdida de peso (%)
<i>P. putida</i>			
30 días	0,1008	0,1005	0,29
	0,1010	0,1008	0,19
	0,1014	0,1010	0,39
Promedio \pm desviación estándar			0,29 \pm 0,10
60 días	0,1021	0,1014	0,68
	0,1024	0,1019	0,48
	0,1010	0,1003	0,69
Promedio \pm desviación estándar			0,61 \pm 0,118
90 días	0,1011	0,0980	3,06
	0,1010	0,0990	1,98
	0,1014	0,1000	1,38
Promedio \pm desviación estándar			2,14 \pm 0,85
<i>P. aeruginosa</i>			
30 días	0,1010	0,1005	0,490
	0,1010	0,1006	0,396
	0,1011	0,1010	0,090
Promedio \pm desviación estándar			0,32 \pm 0,209
60 días	0,100	0,094	1,00
	0,1081	0,1020	5,00
	0,1080	0,1020	5,50
Promedio \pm desviación estándar			3,83 \pm 2,4
90 días	0,1014	0,094	7,290
	0,1011	0,100	1,080
	0,1008	0,088	8,73
Promedio \pm desviación estándar			5,70 \pm 4,06

Figura 5

Resultados de la reducción de peso (%) del polietileno expuestos a diferentes tiempos



Nota. Barras con letras iguales no existe diferencias significativas según la prueba de Tukey.

3.3. Obtención del grado de biodegradación y obtención del Índice de Carbonilo

En la presente investigación se utilizó el Índice de carbonilo (IC) para medir el grado de biodegradación por la actividad bacteriana a partir del análisis por espectrometría infrarroja aplicada al polietileno y cuyos resultados se muestran en la Tabla 6. Se determinaron los valores de absorbancia obtenidos a longitudes de onda de 1460 y 1740 cm^{-1} en todos los tratamientos; así, el Tratamiento 1 presentó un $\text{IC}=0,20$; seguido del Tratamiento 2 con un $\text{IC}=1,88$ y el Tratamiento 3 con un valor de $\text{IC}=0,139$. Por otro lado, el Tratamiento 4 obtuvo un $\text{IC}=0,078$; el Tratamiento 5 presentó un $\text{IC}=0,80$; el Tratamiento 6 un $\text{IC}=2,10$ y finalmente el control presentó un $\text{IC}=0,0061$.

La Figura 6 muestra la evolución del Índice de Carbonilo (IC) en función del tiempo en días para muestras de polietileno de baja densidad expuestas a las bacterias *P. putida* y *P. aeruginosa*, así como un control sin exposición bacteriana. El grupo control no muestra cambios en el Índice de Carbonilo a lo largo del tiempo manteniéndose en un valor de IC

igual a 0. Esto indica que sin la presencia de las bacterias el polietileno de baja densidad no experimenta oxidación significativa. Para las muestras expuestas a *P. putida* el Índice de Carbonilo aumenta significativamente alcanzando un valor máximo de 2 en el día 60. Posteriormente en el día 90 el índice desciende a 0, esto sugiere que *P. putida* inicialmente acelera la oxidación del polietileno, pero este efecto disminuye con el tiempo. Para las muestras expuestas a *P. aeruginosa* el Índice de Carbonilo aumenta progresivamente desde 0,25 en el día 30 hasta 2 en el día 90, este comportamiento muestra que *P. aeruginosa* tiene un efecto continuo y creciente sobre la oxidación del polietileno a lo largo del tiempo. En resumen, las bacterias *P. putida* y *P. aeruginosa* afectan el Índice de Carbonilo de manera diferente. *P. putida* provoca un aumento rápido y luego una disminución del índice mientras que *P. aeruginosa* causa un aumento continuo del índice a lo largo del período de estudio. Esto puede ser debido a las diferencias en los mecanismos de degradación y metabolismo de las bacterias sobre el polietileno de baja densidad. Los picos correspondientes a las longitudes de onda obtenidas mediante el análisis de FTIR presentados en los Apéndices del 5 al 10 complementan estos resultados al mostrar las bandas específicas de oxidación y los cambios estructurales en el material.

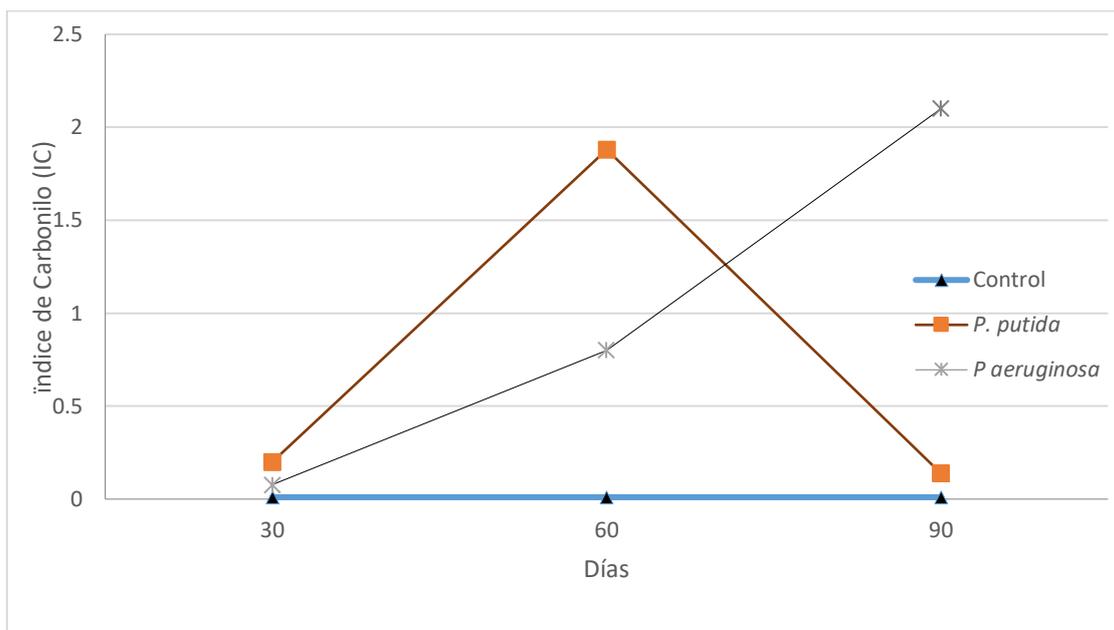
Se puede apreciar que IC para *P. putida* registró un valor máximo de 1,88 a los 60 días de exposición, para posteriormente decrecer a los 90 días de exposición con 0,139. Por otro lado, *P. aeruginosa* registró un valor máximo en el IC a los 90 días de exposición con 2,1 no presentando decrecimiento durante el experimento.

Tabla 6*Valores del índice de carbonilo (IC) obtenido en los diferentes tratamientos*

Tratamientos	Longitud de onda (cm⁻¹)	Absorbancia
Tratamiento 1	1740	0,04
	1460	0,20
IC		0,20
Tratamiento 2	1740	0,376
	1460	0,20
IC		1,88
Tratamiento 3	1740	0,307
	1460	0,22
IC		0,139
Tratamiento 4	1740	0,10
	1460	0,30
IC		0,078
Tratamiento 5	1740	0,160
	1460	0,25
IC		0,80
Tratamiento 6	1740	0,12
	1460	0,0061
IC		2,10
Control	1740	0,0013
	1460	0,21
IC		0,0061

Figura 6

Resultados del índice de Carbonilo tras la exposición a P. putida y P. aeruginosa



CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4.1. Análisis del crecimiento de *P. putida* y *P. aeruginosa* en las láminas de polietileno

En la investigación realizada se pudo evidenciar la presencia de biopelículas generadas por las bacterias *P. putida* y *P. aeruginosa* en la superficie de las láminas de polietileno en los diferentes tratamientos (ver Apéndice 11). Así, en el estudio realizado las dos especies bacterianas generaron un incremento significativo ($p < 0,05$) de la densidad microbiana durante el experimento, generando la formación de microcolonias a los 30 días de incubación presentando biopelículas en la superficie de las láminas de polietileno, siendo *P. putida* la que presentó una mayor colonización bacteriana por área de superficie (Log [UFC/cm²]=7,61) en comparación con *P. aeruginosa* (Log [UFC/cm²]=6,1). Además, ambas presentaron un crecimiento constante hasta el día 90, donde *P. putida* continuó registrando un mayor incremento (Log [UFC/cm²]=13,20) que *P. aeruginosa* (Log [UFC/cm²]=12,12). Similar crecimiento bacteriano fue reportado por Kyaw *et al.* (2012) para *P. putida* (PAO1) (Log [UFC/cm²]=14) y *P. aeruginosa* (ATCC) (Log [UFC/cm²]=14) a 90 días de exposición en la degradación del polietileno de baja densidad. Estos resultados son consistentes con las observaciones realizadas por Tolker-Nielsen *et al.* (2000), quienes informaron que especies del género *Pseudomonas* tienen una facilidad de formación de microcolonias sobre la superficie de películas sintéticas, como el polietileno de baja densidad, en comparación con otros microorganismos, y a condiciones similares de temperatura (30 °C) como lo reportado en esta investigación.

En esta investigación, fueron analizadas las condiciones adecuadas para el desarrollo de la biopelícula teniendo en cuenta como factor el pH; así este estudio reportó un crecimiento bacteriano de *P. putida* y *P. aeruginosa* sobre la superficie de plástico bajo condiciones de pH a 7,04. Esta condición es la misma aplicada por Montazer *et al.* (2021) para evaluar la biodegradación de *P. putida* sobre tiras de polietileno de baja densidad, quienes obtuvieron colonización bacteriana de hasta un 58,6 % sobre la superficie del polímero. Similar

resultado de colonización a nuestra investigación fue reportado por Kyaw *et al.* (2012) para *P. putida* y *P. aeruginosa* en medios de cultivo a 7,4 de pH. Estudios realizados por Restrepo-Florez *et al.* (2014); Sen y Raut (2015) y Wilkes y Aristilde (2017) expresan una biodegradación parcial del plástico por la formación de la biopelícula en la superficie, atribuida principalmente a diversos géneros bacterianos especialmente *Pseudomonas*, quienes poseen la capacidad de deteriorar la superficie y/o formar una biopelícula en el polietileno. Estudios realizados por Wilkes y Aristilde (2017) reafirman que las especies del género *Pseudomonas* tienen una alta capacidad enzimática que facilitan la interacción entre las biopelículas y la superficie del polímero, haciendo que estos organismos bacterianos colonicen eficientemente ese plástico. En el marco de esta investigación, la colonización bacteriana y la formación de la biopelícula por *Pseudomonas* en el polietileno se pueden atribuir a la adaptación de estas bacterias al medio basal empleado en la investigación, así como a la fuente de carbono generada durante la degradación de los plásticos por parte de las bacterias *P. putida* y *P. aeruginosa* (ver Apéndice 11).

4.2. Pérdida de peso del polietileno por *P. putida* y *P. aeruginosa*

En la investigación desarrollada fue observada una alta reducción de peso significativo ($p < 0,05$) del polietileno de baja densidad en los diferentes tratamientos realizados, siendo dependientes del tiempo durante todo el experimento, excepto en el control donde no se registró un valor significativo de pérdida de peso. El Tratamiento 1, Tratamiento 2, Tratamiento 3, Tratamiento 4, Tratamiento 5 y Tratamiento 6, mostraron pérdida de peso del polietileno, observándose la mayor pérdida de peso promedio ($5,70 \pm 4,06$ %) del polietileno por *P. aeruginosa* a 90 días de incubación (Tratamiento 6), a temperatura de 30 °C y a pH 7,04; seguidamente, *P. putida* produjo una pérdida de peso del polietileno de $2,14 \pm 0,85$ % en el mismo tiempo de exposición. Esta alta eficiencia mostrada por estas bacterias fue corroborada por Tribedi y Sil (2013) quienes estudiaron la degradación de polietileno por *Pseudomonas* sp. a temperatura de 30 °C por 60 días, obteniendo similares resultados en la pérdida de peso ($5,0 \pm 1,0$ %) y no se evidenció pérdida de peso en el experimento de control, como en la presente investigación. Esta disminución en el peso del polietileno estaría sustentada por la degradación que realizan las bacterias presentes en las muestras y utilizarían al polietileno como fuente de carbono, tal como lo refiere Dey *et al.* (2020).

Por otro lado, otras investigaciones han demostrado la degradación de plástico de polietileno usando otros géneros bacterianos y fúngicos; así Muhonja *et al.* (2018) comunicaron que *Bacillus cereus* y *Brevibacillus borstelensis* produjeron reducciones en el peso del polietileno de $35,72\pm 4,0$ y $20,28\pm 2,30$ % respectivamente. Dey *et al.* (2020) evaluaron la degradación del polietileno por las bacterias aerobias *Stenotrophomonas* sp. y *Achromobacter* reportando disminuciones del peso cercanas al 8,0 %. De la misma manera Montazer *et al.* (2021) reportaron disminuciones en la pérdida de peso del polietileno en un $8,2\pm 0,65$ % aplicando la bacteria *Lysinibacillus fusiformis*. El uso de los hongos en la degradación del polietileno ha sido reportado por Abraham *et al.* (2017) quienes evaluaron la biodegradabilidad del polietileno sintético por la cepa fúngica *Aspergillus nomius* y *Streptomyces* sp. reportando pérdidas en peso por 4,9 y 5,2 %, respectivamente. Todos ellos mencionan que la degradación del polietileno de baja densidad fue debido a la acción enzimática de los microorganismos adheridos a la superficie y que las cadenas cortas del polímero tienden a ser consumidas primero por estos microorganismos, lo que podría explicar una constante actividad metabólica durante todo el experimento.

Estudios realizados por Uribe *et al.* (2010) en la biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, determinaron que, la enzima alcano mono-oxigenasa sería la enzima iniciadora de la degradación del polietileno de baja densidad. En la presente investigación no se pudo identificar a las enzimas que degradaron al polietileno, pero si se verificó la disminución del peso del plástico. En esta investigación se evidencia que *P. aeruginosa* y *P. putida* son organismos que presentan una fuerte actividad enzimática que permitió la degradación del polietileno, registrando una disminución de peso en la unidad experimental. Además, la reducción en peso pudo ser incentivada por la naturaleza del polímero al ser la única fuente de carbono suministrada a las bacterias.

4.3. Obtención del grado de biodegradación y el Índice de Carbonilo

La técnica de espectroscopia FTIR permitió comprender el mecanismo de degradación enzimática del polietileno de baja densidad. El índice de carbonilo obtenido en esta investigación fue creciente para *P. aeruginosa* (IC=2,10) en todo el experimento, registrando

aumentos significativos de hasta 27 veces más en comparación con el IC obtenido con *P. putida* (IC=0,139) a los 90 días de exposición, este aumento del IC se complementó con la disminución del peso promedio del polietileno ($5,70 \pm 4,06$ %) en el periodo evaluado. Un incremento en el IC (5,5) fue registrado por Kyaw *et al.* (2012) para especie *Pseudomonas aeruginosa* en la degradación del polietileno de baja densidad para 40 días de exposición. El mismo autor reporta una disminución en el índice de Carbonilo del 80 % (IC= 1,1) al prolongar la incubación del polietileno por 120 días en medio mineral con el cual inicio el experimento. En esta investigación *P. putida* presentó un IC de 1,88 a 60 días de incubación para apreciar una notable reducción de IC (0,139) al día 90 de incubación, lo que podría reflejar la notable diferencia entre *P. aeruginosa* y *P. putida* en la actividad degradadora del polietileno de baja densidad. Además, algunos autores establecen que la marcada diferencia en la biodegradación estaría influenciada por la producción de enzimas entre estas especies, que principalmente están representadas por monooxigenas e hidrolasas, tal como refieren Yoshida *et al.* (2016) y Tamnou *et al.* (2021)

Se ha informado que la espectrofotometría de FTIR es un método eficaz para evaluar los cambios en la estructura química del polietileno, sobre todo después de la biodegradación por parte de los microorganismos seleccionados. En esta investigación se usaron tiras de polietileno de baja densidad de primer uso, sometidos a la acción bacteriana a 30 °C de temperatura y a pH 7,0 obteniendo el IC de 0,20 para *P. putida* y *P. aeruginosa*. Por otro lado, Pramila y Ramesh (2015) cultivaron las bacterias *Arthrobacter* sp. y *Streptomyces* sp. en diferentes fases físicas, reportando para plásticos de primer uso IC de 0,09 y 0,02 respectivamente, a 90 días de exposición y a pH 7,0, lo que sugiere que estas dos cepas bacterianas; así como las evaluadas en esta investigación probablemente pertenecen a tipos metabólicos distintivos con diferente excreción de enzimas para atacar los enlaces químicos de la película del polietileno, tal como lo refiere Han *et al.* (2020).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. La especie *P. putida* registró un mayor incremento de formación de micro colonias sobre la superficie del polietileno de baja densidad ($\text{Log [UFC/cm}^2\text{]}=13,20$) que *P. aeruginosa* ($\text{Log [UFC/cm}^2\text{]}=12,12$) que dieron como resultado la formación de la biopelícula en la superficie con capacidad de deteriorar la superficie del polietileno.
2. Los resultados de esta investigación muestran el potencial de biodegradación de polietileno de baja densidad por *P. putida* ($2,14\pm 0,85$ %) y *P. aeruginosa*, siendo esta última la que presentó mayor disminución ($5,70\pm 4,06$ %) en el peso del polímero a condiciones de laboratorio. La pérdida de peso del polímero durante todo el proceso de incubación estuvo influenciada por la actividad metabólica de la bacteria sobre el polímero que fue la única fuente de carbono suministrada a las bacterias.
3. El aumento significativo de los índices de carbonilo demuestra una actividad prometedora como resultado de la biodegradación. Los análisis del FTIR a través del IC confirmaron que *P. aeruginosa* ($\text{IC}=2,1$) fue más exitosa que *P. putida* ($\text{IC}=0,139$) al término del experimento (90 días). En base a estos resultados se pudo comprobar que las bacterias utilizaron al plástico de polietileno de baja densidad de primer uso como fuente de carbono.
4. A través de esta investigación se comprueba la alta influencia de las bacterias *P. putida* y *P. aeruginosa* en la degradación de polietileno de baja densidad, siendo *P. aeruginosa* la más eficiente en la reducción del polietileno siendo verificada por un índice de carbonilo mayor.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

1. Se debería realizar estudios de biodegradación de la combinación de ambas cepas bacterianas con la finalidad de verificar el potencial del consorcio bacteriano sobre el polietileno de baja densidad.
2. Se debería de realizar el conteo de bacterias planctónicas presentes en la unidad experimental, para determinar el grado de adaptación de las bacterias en el medio basal que podría corresponder a una intensa actividad degradadora a ese nivel.
3. Se recomienda probar las cepas bacterianas con otros tipos de plásticos y verificar su potencial degradador.
4. Se recomienda ampliar las evaluaciones de la degradación a periodos superiores a los 90 días y poder constatar si la tendencia de la degradación continúa o disminuye en el tiempo.
5. Se recomienda complementar estudios a través de la microscopia electrónica de barrido, lo que permitiría evidenciar el grado de afección de la superficie del polietileno y verificar la eficiencia del microorganismo usado.

REFERENCIAS

- Abraham, J., Ghosh, E., Mukherjee, P. y Gajendiran, A. (2017). Microbial degradation of low-density polyethylene. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 36, 147–154. <https://doi.org/10.1002/ep.12467>.
- Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., ... y Muhammad, S. (2018). Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 7287-7298.
- Alania, Y. y Pérez, M. (2017). *Efecto de la temperatura en el crecimiento de dos cepas ATCC de Pseudomonas sp. expuestas a polipropileno*. [Tesis de pregrado-Universidad Cayetano Heredia]. Repositorio de la UPCH. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/819>.
- Balaji, A. B., Pakalapati, H., Khalid, M., Walvekar, R. y Siddiqui, H. (2018). Natural and synthetic biocompatible and biodegradable polymers. *Biodegradable and biocompatible polymer composites*, 286, 3-32. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100970-3.00001-8>.
- Barbarán, H., Cabanillas, L. y Rubio, Y. (2018). *Biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por acción de Pseudomona aeruginosa, en condiciones de laboratorio*. [Tesis de pregrado, Universidad Cesar Vallejo]. Repositorio institucional UCV. <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/32118>.
- Barla, R. (2010). *Un Diccionario para la Educación Ambiental*. Montevideo - Uruguay.
- Biffinger, J.C, Barlow, D., Cockrell, A.L., Cusick, K.D., Hervey, W.J., Fitzgerald, L.A., Nadeau, L.J., Hung, C.S., Crookes-Goodson, W.J., y Russell, J. (2015). The applicability of Impranil® DLN for gauging the biodegradation of polyurethanes. *Polymer Degradation and Stability*. 120: 178-185. <https://doi.org/10.1016/J.Polymdegradstab.2015.06.020>.
- Butrón, S.B. (2020). *Capacidad de Biodegradación de Pseudomonas aeruginosa frente al polietileno de baja densidad*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Altiplano]. Repositorio institucional UNAP. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/13475>.
- Chunga Campos, L. D. R., y Cieza Martínez, C. A. (2017). *Biodegradación de poliestireno utilizando microorganismos presentes en el humus de lombriz durante los meses*,

octubre – diciembre 2016. (Tesis de pregrado, Universidad de Lambayeque)
Repositorio institucional URL. <http://repositorio.udl.edu.pe/handle/UDL/83>

- Danso, D., Chow, J. y Streit, W.R. (2019). Plastics: environmental and bio- technological perspectives on microbial degradation. *Appl Environ Microbiol*, 85:1–14. <https://doi.org/10.1128/aem.01095-19>.
- Devi, R.S., Kannan, V.R., Natarajan, K., Nivas, D., Kannan, K., Chandru, S. y Antony, A.R. (2016). *The role of microbes in plastic*. Environ Waste Manageed. Chandra, R. (pp. 341–370). CRC Press.
- Dey, S., Bose, H., Mohapatra, B. y Sar, P. (2020). Biodegradation of Unpretreated Low-Density Polyethylene (LDPE) by *Stenotrophomonas* sp. and *Achromobacter* sp., Isolated From Waste Dumpsite and Drilling Fluid. *Front. Microbiol.* 11: 603210. doi: 10.3389/fmicb.2020.603210.
- Dufour, D., Leung, V., y Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2-16.
- Duran, E. (2021) Residuos sólidos en el Perú (Trabajo de investigación para obtener el grado de bachiller, PUCP). Repositorio institucional PUCP. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/18237>
- Emadian, S.M., Onay, T.T. y Demirel, B. (2017). Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Manag* 59, 526–536. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.006>
- Gajendiran A, Krishnamoorthy S., y Abraham, J. (2016). Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *Biotech*, 6(1):52. doi: 10.1007/s13205-016-0394-x. PMID: 28330123; PMCID: PMC4752946.
- Ghatge, S., Yang, Y., Ahn, JH. y Hur, H. (2020). Biodegradation of polyethylene: a brief review. *Appl Biol Chem* 63, 27. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00511-3>
- Ghosh, S.K., Pal, S. y Ray, S. (2013). Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environ Sci Pollut Res* 20, 4339–4355. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1706-x>.

- Glaser, J.A. (2019). Biological Degradation of Polymers in the Environment. Plastic in the Environ, *IntechOpen*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85124>
- Gómez, M. (2006). Introducción a la metodología de la investigación científica. Editorial Brujas. Córdoba. Argentina.
- González- García, Y., Meza-Contreras, J., González-Reynoso, P. y Córdoba-López, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1): 77-115.
- Han, Y. N., Wei, M., Han, F., Fang, C., Wang, D., Zhong, Y. J., ... y Li, F. M. (2020). Greater biofilm formation and increased biodegradation of polyethylene film by a microbial consortium of *Arthrobacter* sp. and *Streptomyces* sp. *Microorganisms*, 8(12): 1979. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121979>
- Harshvardhan, K. y Jha, B. (2013). Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. *Marine Pollution Bulletin*, 77 (1–2): 100-106, ISSN 0025-326X, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.025>.
- Henton D.E., Gruber P, Lunt J., y Randall J (2005) Polylactic acid technology natural fibers. *Biopolymers, and Biocomposites* 16:527–577
- Herzoza, M. (2019). Biodegradación microbiana de polietileno de baja densidad, bajo condiciones térmicas controladas en biorreactor air lift, en Santa Clara- Lima 2019. (Tesis de pregrado, Universidad Cesar Vallejo). Repositorio institucional UCV. <https://hdl.handle.net/20.500.12692/51943>
- Hernández-Sampieri, R. y Mendoza, C. P. (2018). Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. McGraw Hill México
- Hibbing, M., Fuqua, C., Parsek, R. y Peterson, S. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jan;8(1):15-25. doi: 10.1038/nrmicro2259
- Ingham, E. (2000). *The soil food web. Chapters 1-6 in: Soil biology primer. Soil and water conservation society*. Rev. edition. Ankeny Iowa. USA.
- Iram, D., Riaz, R., y Iqbal, R. K. (2019). *Usage of potential micro-organisms for degradation of plastics*. *Open J. Environ. Biol*, 4(1), 7-15.

- Kale, S. K., Deshmukh, A. G., Dudhare, M. S., y Patil, V. B. (2015). Microbial degradation of plastic: a review. *Journal of Biochemical Technology*, 6(2), 952-961.
- Kathiresan, K. (2003). Polythene and Plastics-degrading microbes from the mangrove soil. *Revista de Biología Tropical*, 51(3-4), 629-633.
- Kyaw, BM, Champakalakshmi, R., Sakharkar, MK, Lim, CS y Sakharkar, KR (2012). Biodegradación del polietileno de baja densidad (LDPE) por especies de *Pseudomonas*. *Indian Journal of Microbiology*, 52 (3), 411–419. doi: 10.1007 / s12088-012-0250-6.
- Lee, S., Kim, Y. y Song, W. (2014). Biodegradation of Polylactic Acid (PLA) Fibers Using Different Enzymes, *Macromolecular Research*, 22 (6): 657-663. doi 10.1007/s13233-014-2107-9.
- Lenz, R.W. (1993). Biodegradable polymers. In Langer, R.S., Peppas, N.A. (eds). *Biopolymers I* Berlin Heidelberg: Springer. 107: 1–40.
- Liyoshi Y, Tsutsumi Y. y Nishida T. (1998). Polyethylene degradation by lignin degrading fungi and manganese peroxidase. *J Wood Sci*, 44:222-229.
- Loo C.Y. y Sudesh K. (2007). Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 40, 466-471. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.11.003>
- López-Mondéjar, R., Algora, C., y Baldrian, P. (2019). Lignocellulolytic systems of soil bacteria: a vast and diverse toolbox for biotechnological conversion processes. *Biotechnology advances*, 37(6), 107374. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.013>
- Márquez-Peñaranda, J. F., Sanchez-Silva, M., Husserl, J., y Bastidas-Arteaga, E. (2016). Effects of biodeterioration on the mechanical properties of concrete. *Materials and structures*. 49, 4085–4099. doi:10.1617/s11527-015-0774-4
- Mihai, F.-C., Gündoğdu, S., Markley, L. A., Olivelli, A., Khan, F. R., Gwinnett, C., y Gutberlet, J. (2021). Plastic Pollution, Waste Management Issues, and Circular Economy Opportunities in Rural Communities. *Sustainability*, 14(1), 20. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/su14010020>.

- Ministerio del Ambiente [MINAM]. (2012). Glosario de Términos Ambientales. Dirección general de políticas, normas e instrumentos de gestión Ambiental.
- Mohan, A.J., Sekhar, V.C., Bhaskar, T. y Nampoothiri, K.M. (2016). Microbial assisted shigh impact polystyrene (HIPS) degradation. *Bioresour Technol*, 213: 204–207.
- Montazer, Z., Mohammad B. Najafi, H. y Levin, D. (2019). Microbial degradation of low-density polyethylene and synthesis of polyhydroxyalkanoate polymers. *Can. J. Microbiol.* 65: 224–234. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0335>
- Montazer Z, Najafi, y Levin, D. (2021). In vitro degradation of low-density polyethylene by new bacteria from larvae of the greater wax moth, *Galleriamellonella*. *Can J Microbiol.* 67(3):249-258. doi: 10.1139/cjm-2020-0208. Epub 2020 Dec 11. PMID: 33306436.
- Moshtaq, A. (2016). Bacterial introduction.
http://gcwk.ac.in/econtent_portal/ec/admin/contents/3_18BOC101_2020102606040926.pdf.
- Movasaghi, Z., Rehman, S. y Rehman, I. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, 43:2, 134-179, DOI: 10.1080/05704920701829043.
- Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 67(1), 161-172. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>
- Muhonja, C., Makonde, H., Magoma, G. y Imbuga, M. (2018). Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446>
- Nakajima-Kambe, T., Onuma, F., Kimpara, N. y Nakahara, T. (1995). Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *Fems. Microbiol. Lett.* 129:39-42.
- Nauendorf, A., Krause, S., Bigalke, N.K., Gorb, E.V., Gorb, S.N., Haeckel, M., Wahl, M. y Treude, T. (2016). Microbial colonization and degradation of polyethyleneand biodegradable plastic bags in temperate fine-grainedorganic-rich marine sediments. *Mar Pollut Bull*, 103: 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.12.024>

- Nowak, B., Paja, J., Drozd-Bratkowicz, K.M. y Rymarz, G. (2011) Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *Int Biodeterior Biodegradation* 65:757–767. ISSN: 0964-8305
- Obradors, N. y Aguilar, J. (1991). Efficient biodegradation of highmolecular-weight polyethylene glycols by pure cultures of *Pseudomonas stutzeri*. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (8): 2383-2388.
- Ohura, T. y Kasuya, k, (1999). Cloning and characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase gene of *Pseudomonas stutzeri* and analysis of the function of substrate-binding domains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:189-197. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.1.189-197.1999>
- Palleroni, N.J. (1981) Introduction to the Family Pseudomonadaceae. In: Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_58.
- Palleroni N. (2005). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc Online. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>
- Posada, B. (1994). La degradación de los plásticos. *Revista universidad Eafit*, 30 (94): 67-86.
- Pramila, R. y Ramesh, K. V. (2015). Potential biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Acinetobacter baumannii*. *African Journal of Bacteriology Research*, 7(3), 24-28. <https://doi.org/10.5897/JBR2015.0152>
- Rajan, A., y Vijayalakshmi, S. (2023). New insights on polyurethane biodegradation. In *AIP Conference Proceedings*, 2690, (1): 020060, <https://doi.org/10.1063/5.0122262>
- Rampelotto, H. (2013). Extremophiles and extreme environments. *Life (Basel)*, 7, 3(3):482-5. <https://doi.org/10.3390/life3030482>
- Restrepo-Flórez, J.M, Bassi, A. y Thompson, M.R (2014) Microbial degradation and deterioration of polyethylene-a review. *Int Biodeterior Biodegradation* 88:83–90.
- Roy, P., Surekha, P., Tulsi, E., Deshmukh, C. y Rajagopal, C. (2008). Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polym*

- Satti, S. y Shah, A. (2020). Polyester-based biodegradable plastics. *Letters in Applied Microbiology*, 70, 413–430. <https://doi.org/10.1111/lam.13287>
- Sáenz, V. (2008). *Contribución al estudio de la degradación ambiental de poliolefinas fotoestabilizadas*. (Tesis de posgrado, Universidad Politécnica de Valencia). Repositorio Universitat Politècnica de València. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/2909>.
- Sen, S.K, y Raut S. (2015). Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE): a review. *J. Environ. Chem. Eng*, 3:462–473. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003>.
- Seneviratne, G., Tennakoon, N. y Weerasekara, W. (2006). Polyethylene biodegradation by a developed *Penicillium–Bacillus* biofilm. *Current Science* 90 (1): 20-21.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A. y Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol Adv.* 26, 246–265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>.
- Shah, Z., Hasan, F., Krumholz, L., Atkas, D. y Shah, A.A. (2013). Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GC-MS. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 77: 114–122. <http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.ibiod.2012.11.009>.
- Shah, A., Maroof, M. y Ahmad-Asad, P. (2014) Microbial ecology of anaerobic digesters: the key players of anaerobiosis. *The Scientific World Journal*: 21 <https://doi.org/10.1155/2014/183752>.
- Shimao, M. (2001). Biodegradation of plastics. *Curr. Opinion. Biotechnol*; 12:242-7. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00206-8](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00206-8).
- Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Curr Opin Biotechnol*, 22, 422–426. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.013>.
- Sonnenschein, C. (1927). Die Mucosus-Form des *Pyocyanus*-Bakteriums, *Bacterium pyocyanum mucosum*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Abteilung I, Orig.* 104, 365-373.

- Suleman, R., Amjad, A., Ismail, A., Javed, S., Ghafoor, U., y Fahad, S. (2022). Impact of plastic bags usage in food commodities: an irreversible loss to environment. *Environ Sci Pollut Res* 29, 49483–49489. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21091-3>
- Tamnou, M., Tamsa Arfao, E., Nougang, A., Metsopkeng, M.E., Noah Ewoti, C. Mounang,O., L y Nola, M. (2021). Biodegradation of polyethylene by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* in acidic aquatic microcosm and effect of the environmental temperature. *Environmental Challenges*, 3, 100056. doi:10.1016/j.envc.2021.100056
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, PC, Andersen, JB, Jacobsen, CS. y Molin S (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J. Bacteriol*, 182(22):6482–6489.
- Trachtenberg, S. y Cohen-Krausz, S. (2006). The archaeobacterial flagellar filament: a bacterial propeller with a pilus-like structure. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11: 208–220. <https://doi.org/10.1159/000094055>.
- Tribedi, P. y Sil, A. (2013). Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm. *Environ Sci Pollut Res*, 20:4146–4153. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1378-y>.
- Tribedi, P., Das Gupta, A. y Sil, A.K. (2015) Adaptation of *Pseudomonas* sp. AKS2 in biofilm on low-density polyethylene surface: an effective strategy for efficient survival and polymer degradation. *Bioresour Bioprocess* 2,1–10. <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0044-x>.
- Tyagi, P., Agate, S., Velez, O. D., Lucia, L., y Pal, L. (2022). A critical review of the performance and soil biodegradability profiles of biobased natural and chemically synthesized polymers in industrial applications. *Environmental Science & Technology*, 56(4), 2071-2095. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04710>
- Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S. y Merino, F. (2010) Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario. *Rev. Peru. biol.* 17(1): 133 – 136.
- Vollmer, I., Jenks, M. J., Roelands, M. C., White, R. J., van Harmelen, T., de Wild, P., ... y Weckhuysen, B. M. (2020). Beyond mechanical recycling: Giving new life to plastic waste. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(36), 15402-15423. <https://doi.org/10.1002/anie.201915651>

- Wilkes, R.A, y Aristilde, L. (2017) Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp. Capabilities and challenges. *J Appl Microbiol* 123:582–593. <https://doi.org/10.1111/jam.13472>.
- Yang, Y., Pratap Singh, R., Song, D., Chen, Q., Zheng, X., Zhang, C., ...y Li, Y. (2020). Synergistic effect of *Pseudomonas putida* II-2 and *Achromobacter* sp. QC36 for the effective biodegradation of the herbicide quinclorac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109826>
- Yao, Z., Seong, H. J., y Jang, Y. S. (2022). Environmental toxicity and decomposition of polyethylene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 242, 113933. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113933>.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehara, T., y Oda, K., (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science* 351, 1196–1199. <https://doi.10.1126/science.aad6359>.
- Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A. y Gedalanga, P. (2018) Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. 2:1-15. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13300>.

TERMINOLOGÍA

Aislamiento: fenómeno que se presenta cuando no se realiza ningún tipo de intercambio entre otros organismos, es decir cuando un organismo no puede interrelacionarse con el entorno ni con otro individuo (Barla, 2000).

Bacteria planctónica: Bacteria que se desarrollan en ambientes acuáticos de manera libre, nadando o flotando (Nazar, 2007).

Bacteria sésil. Bacteria que se desarrolla adheridas a una superficie, de manera sésil (Nazar, 2007).

Biodegradación del plástico. Relacionados al proceso que permite la descomposición de polímeros mediante la acción de organismos vivos (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2012).

Biodegradabilidad. Es la condición que presentan una sustancia o material a ser degradado por microorganismos, y está referida a la tasa de descomposición química de sustancias por factores asociados a la acción de microorganismos, principalmente bacterias (Barla, 2000).

Biopelícula bacteriana. Las biopelículas son comunidades microbianas adheridas a las superficies y encerradas en una matriz extracelular de origen microbiano. Representan la forma predominante de vida microbiana (Dufour *et al.*, 2010).

Biotecnología. Es la disciplina que aplica el conocimiento técnico o procesos industriales a la par del uso de organismos biológicos, en la recuperación de alguna problemática de índole ambiental (MINAM, 2012).

Contaminación ambiental. Se hace referencia a la presencia de cantidades de agentes cuyas concentraciones puedan ser altamente dañinos para la salud de la población humana y, además; perjudique la vida animal o vegetal (MINAM, 2012).

Consorcio bacteriano. Es la agrupación de microorganismos capaces de sobrevivir a diversas condiciones mediante la formación de estructuras sinérgicas a nivel de población, como estromatolitos, tapetes microbianos y biopelículas (Zhang *et al.*, 2018).

Cooperación bacteriana. La cooperación o sintrofia, es uno de los principios fundamentales principios seguidos por consorcios microbianos naturales y artificiales para mantener un estilo de vida estable a largo plazo (Zhang *et al.*, 2018).

Espectroscopia Infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Es una técnica rápida para evaluar la acción degradativa y costo moderado de los polímeros sintéticos que mide la cuantificación de la reducción de los índices de grupos funcionales carbonilos del polietileno de baja densidad (Movasaghi *et al.*, 2008)

Microorganismos. Son plantas, animales u otros organismos microscópicos que habitan en el suelo y que generalmente descomponen la materia orgánica como los protozoarios, las bacterias, los hongos, algas, nematodos, etc. (Ingham, 2000).

Monitoreo ambiental. Consiste en la actividad de recolección, traslado y análisis de la muestra permitiendo medir los diferentes niveles del contaminante en el ambiente (MINAM, 2012).

Sustancias peligrosas. Son compuestos tóxicos que pueden ser usados para el control de poblaciones de diferentes organismos y usados de manera indiscriminada, pueden ser peligrosos para el ser humano también (MINAM, 2012).

APÉNDICES

Apéndice 1

Análisis de la varianza del Log (UFC/cm²) y los diferentes tratamientos

ANOVA					
Log (UFC/cm ²)					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	110,352	5	22,070	176,783	0,000
Dentro de grupos	1,498	12	,125		
Total	111,850	17			

Apéndice 2

Prueba de Tukey del tratamiento y el Log (UFC/cm²)

Log (UFC/cm ²)						
HSD Tukey ^a						
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0,05				
		1	2	3	4	5
Tratamiento 4	3	5,8800				
Tratamiento 1	3		7,5967			
Tratamiento 2	3			9,3933		
Tratamiento 5	3			9,4233		
Tratamiento 6	3				12,0533	
Tratamiento 3	3					13,1833
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Apéndice 3

Análisis de la varianza de la pérdida de peso del polietileno (%)

ANOVA					
Pérdida peso					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	73,729	5	14,746	3,781	0,027
Dentro de grupos	46,805	12	3,900		
Total	120,534	17			

Apéndice 4

Prueba HSD Tukey del tratamiento y la pérdida de peso (%)

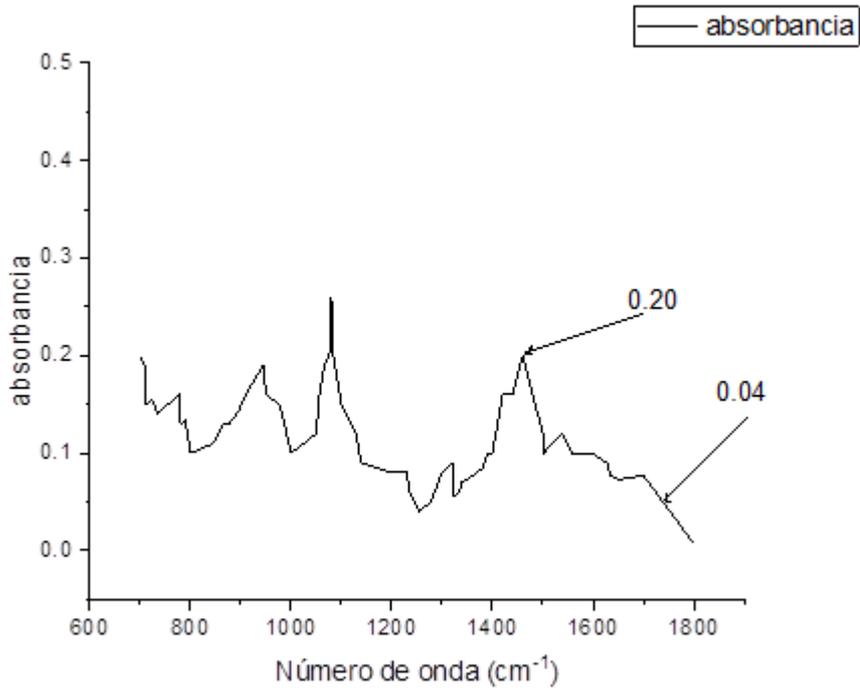
Pérdida_peso HSD Tukey ^a		
Subconjunto para alfa = 0.05		
Tratamientos	N	1
Tratamiento 1	3	0,2900
Tratamiento 4	3	0,3253
Tratamiento 2	3	0,6167
Tratamiento 3	3	2,1400
Tratamiento 5	3	3,8333
Tratamiento 6	3	5,7000
Sig.		0,050

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

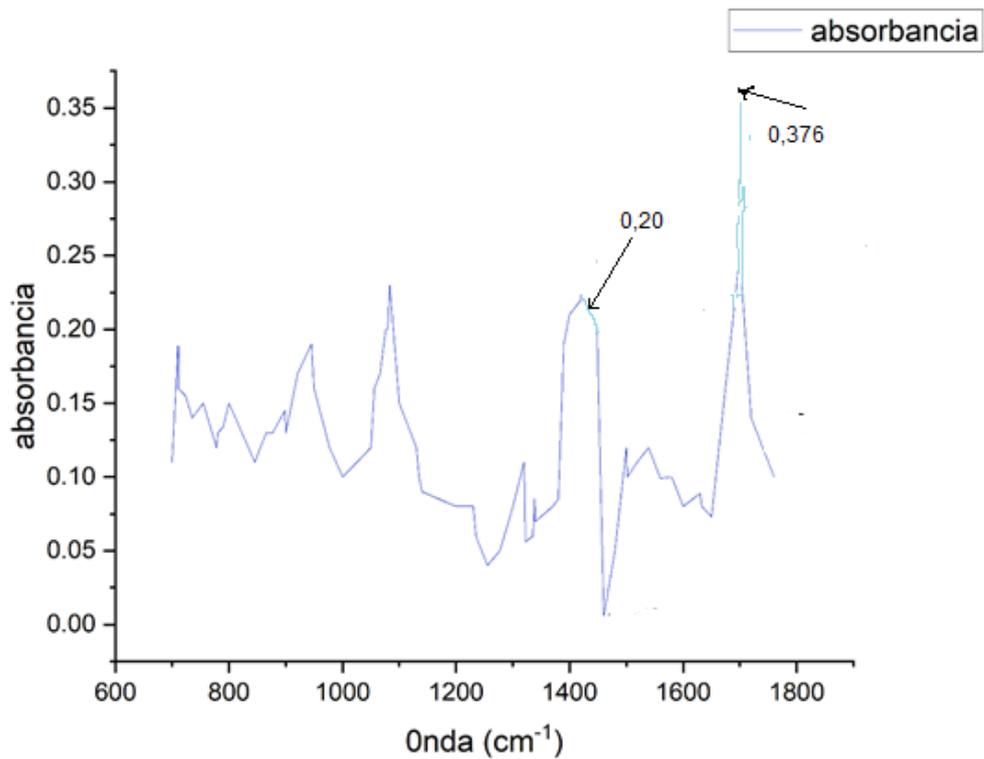
Apéndice 5

Análisis del FTIR del polietileno después de 30 días de incubación con la *P. putida*



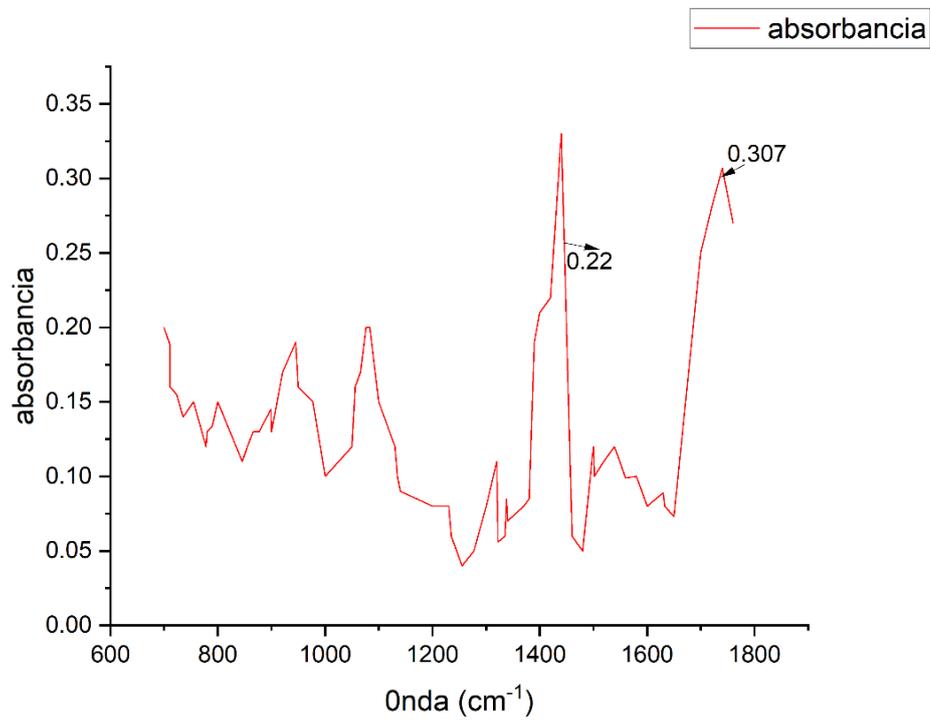
Apéndice 6

Análisis del FTIR del polietileno después de 60 días de incubación con la *P. putida*



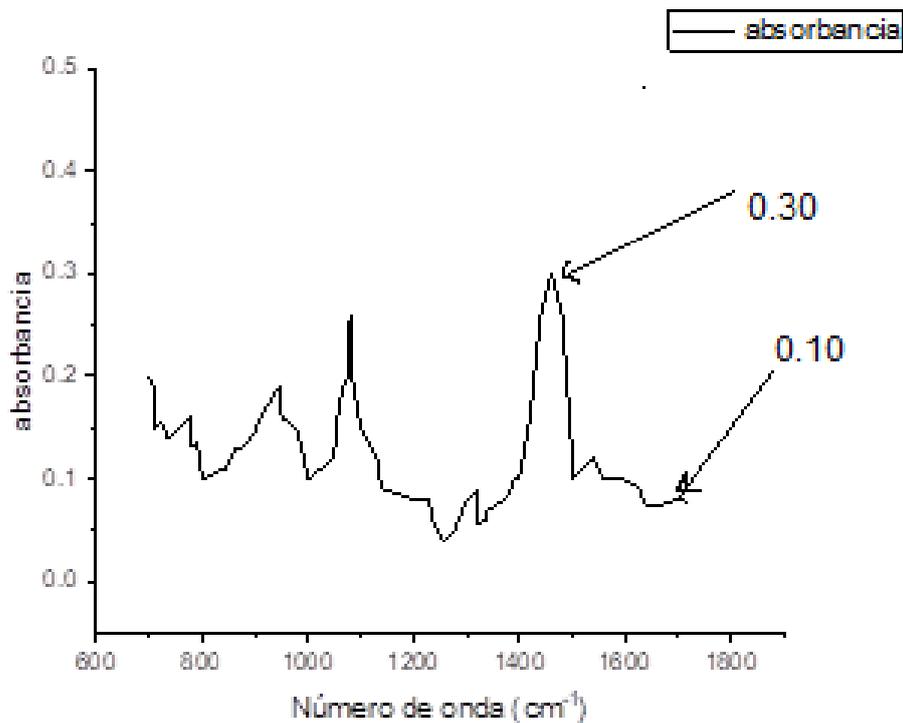
Apéndice 7

Análisis del FTIR del polietileno después de 90 días de incubación con la *P. putida*



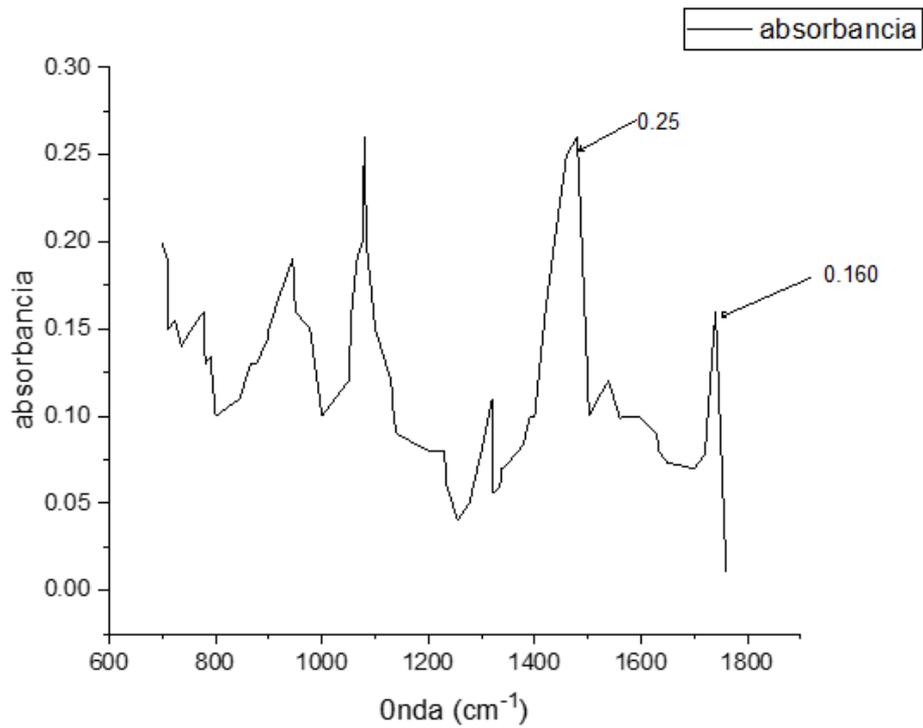
Apéndice 8

Análisis del FTIR del polietileno después de 30 días de incubación con la *P. aeruginosa*



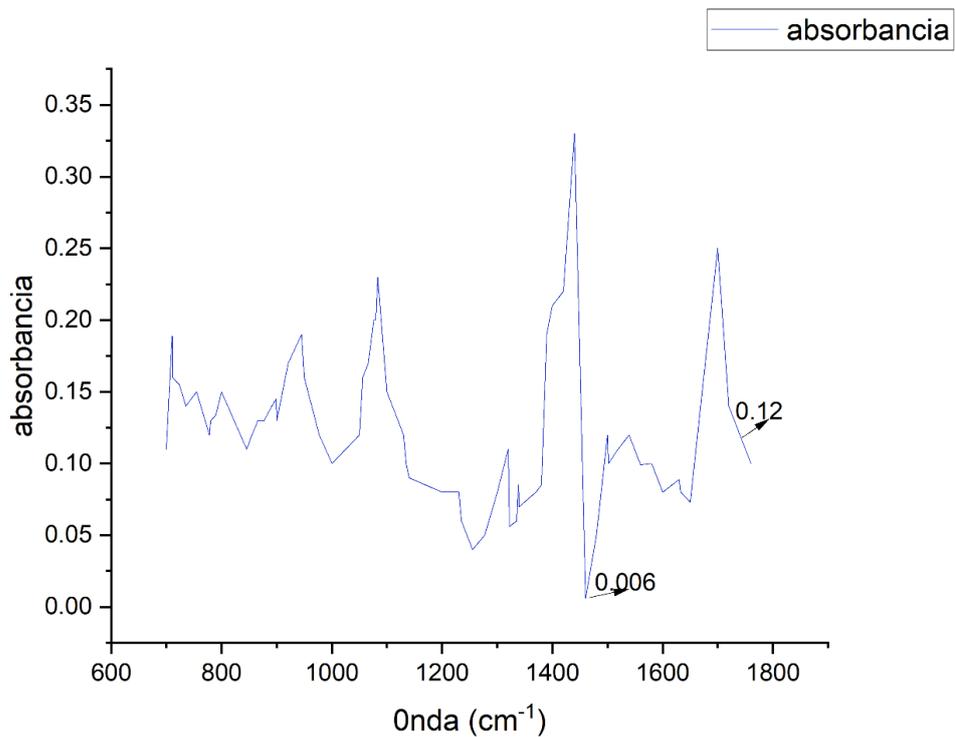
Apéndice 9

Análisis del FTIR del polietileno después de 60 días de incubación con la *P. aeruginosa*



Apéndice 10

Análisis del FTIR del polietileno después de 90 días de incubación con la *P. aeruginosa*



Apéndice 11

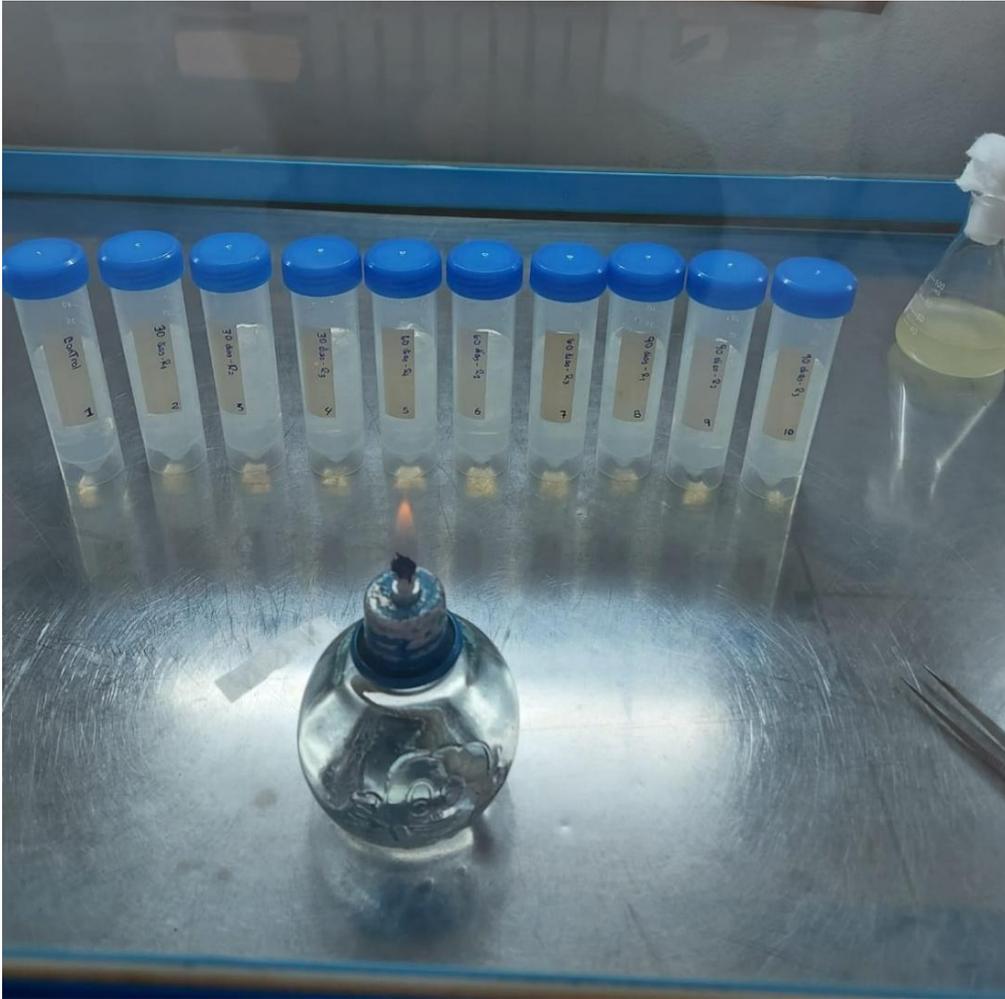
Registro fotográfico



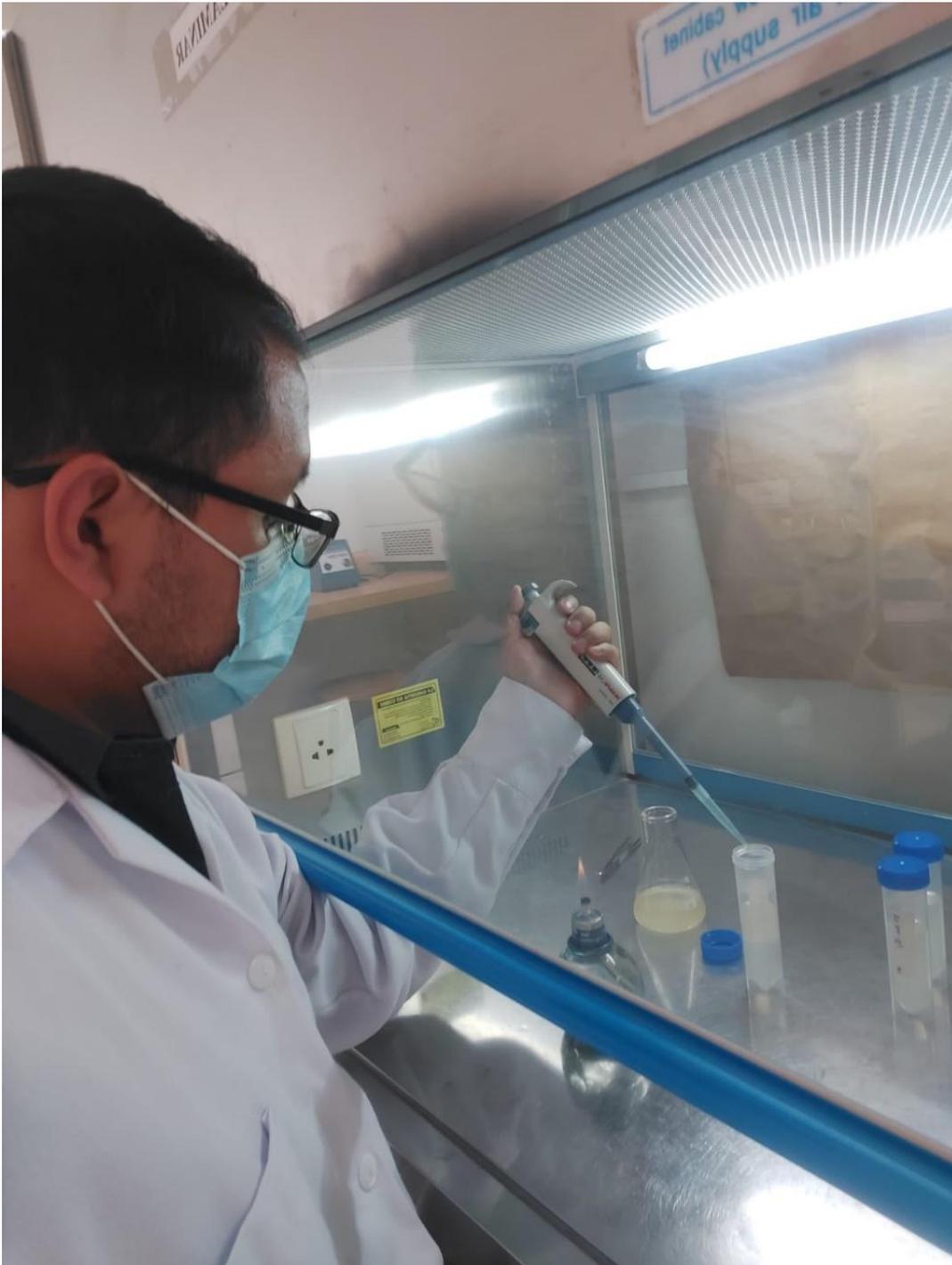
Nota. Tiras de polietileno de baja densidad usada en la investigación.



Nota. Disposición de las tiras de polietileno en los tubos de Falcón.



Nota. Disposición de las unidades experimentales.



Nota. Aplicación de las cepas bacterianas en las unidades experimentales.



Nota. Pesaje final de las tiras con la balanza analítica.