



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
UNIDAD DE POSGRADO
MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL

Proyecto de Investigación previo la
obtención del Grado Académico de
Magister en Gestión Ambiental.

TEMA

BACTERIAS AISLADAS CON POTENCIAL DE DEGRADACIÓN DE
POLIETILENO Y SUS EFECTOS EN SUELOS CONTAMINADOS CON
DESPERDICIOS PLÁSTICOS, CANTÓN QUEVEDO, AÑO 2018.

AUTORA

ZAMBRANO SOLÓRZANO MARÍA JOSÉ

DIRECTOR

ING. FOR. HAYRON CANCHIGNIA M, Ph.D.

QUEVEDO – ECUADOR

2017 – 2018

CERTIFICACIÓN

Ing. Fabricio Canchignia PhD, en calidad de Director del proyecto, previa la obtención de grado Académico de Magister en Gestión Ambiental.

CERTIFICA:

Que la Ing. Zambrano Solórzano María José autora de la tesis titulada: “Bacterias aisladas con potencial de degradación de polietileno y sus efectos en suelos contaminados con desperdicios plásticos, cantón Quevedo, año 2018”, ha sido revisada en todos sus componentes por lo que se autoriza su presentación entre el tribunal respectivo.

Ing. Fabricio Canchignia Ph. D.

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, Zambrano Solórzano María José declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.

Ing. Zambrano Solórzano María José

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por permitirme lograr esta meta en mi vida, también por darme a una familia maravillosa, ya que, con su apoyo, confianza, y amor incondicional, permitieron culminar mis estudios y poder ser un profesional. Este logro se los dedico a ellos, pues son mi vida entera, sin ellos no soy nadie.

A mis hermosos hijos Andrés y Javier que siempre me apoyaron y estuvieron pendientes de mí sacándome una sonrisa en todo momento.

A mi Madre por ese apoyo muy especial en mi vida.

AGRADECIMIENTO

El autor de la presente investigación quiere dejar constancia de su sincero agradecimiento a las personas que hicieron posible la culminación de la misma.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, institución digna que me acogió como estudiante y forjó mis conocimientos.

Le agradezco a mi Director de tesis, Hayron Canchignia Martínez Ph.D, por su enseñanza, apoyo y confianza para la exitosa culminación de este trabajo de investigación.

Al Ing. Ricardo Romero por brindarme su amistad y confianza en el tiempo que estuve en el laboratorio.

A mis amigos incondicionales Laura, Karina, Pablo y Verónica por su amistad, confianza y apoyo durante nuestros estudios de posgrado.

A los integrantes del tribunal de revisión: Ing. Roque Vivas Moreira M.Sc (presidente), Econ. Carlos Zambrano PhD (primer miembro) e Ing. Jaime Morante Carriel PhD (segundo miembro), por su guía y sugerencias dadas a la presente investigación.

También a mis amigos de aula que han formado parte de mi vida profesional a quienes agradezco su amistad, apoyo, ánimo y compañía en los buenos y malos momentos.

Zambrano Solórzano María José

PRÓLOGO

Los contenidos presentados en la investigación “Caracterización de consorcios microbianos con capacidad biorremediadora de pesticidas, *Piretroides* (Cipermetrina), *Organofosforados* (Clorpirifos) Y *N-(fosfonometil) glicina* (Glifosato)” expone un trabajo investigativo de tipo experimental apoyado por información de manuscritos científicos relacionados a la degradación de pesticidas.

El Ecuador sufre severos efectos de contaminación por el empleo excesivo de pesticidas destinados al control de enfermedades e insectos plagas. Con el interés de aumentar la productividad agrícola, aumentado la cantidad de trazas de pesticidas en los alimentos y causando daño a la diversidad microbiota del suelo. Una de las alternativas para la recuperación de los suelos contaminados con estos pesticidas se ha requerido de la ayuda de microorganismos. Dando paso a condiciones favorables tanto en clima como en calidad de suelo para garantizar un amplio porcentaje de éxito.

Este programa diversifica las opciones con el aislamiento de bacterias de uso para el suelo y con el paso de los años la recuperación de los recursos microbianos. Que permitirán neutralizar las sustancias tóxicas, ya sea transformándolas en sustancias menos tóxicas o haciéndolas inofensivas para el medio ambiente y la salud humana.

Este trabajo expone la existencia de bacterias capaces de adaptar y emplear como única fuente de energía los pesticidas, haciendo factible la descomposición de los mismos. Observando diferencias significativas al desarrollo bacteriano y adaptabilidad, reduciendo el contenido de los pesticidas. Estos resultados cumplieron con la capacidad de seleccionar los microorganismos a condiciones adversas altera sus funciones básicas, optimizando el uso de los recursos que los rodean como es el caso de fuentes de carbono alternas donde se encuentran los pesticidas *Piretroides*, *Organofosforados* y *N-(fosfonometil) glicina*.

Fernando Abasolo Ph.D

RESUMEN

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la UTEQ, enfocado a los objetivos de aislar e identificar cepas bacterianas con capacidad para biodegradar partículas de polietileno, caracterizar morfológica y molecularmente los aislados bacterianos con capacidad degradadora de polietileno evaluar la degradación del polietileno por las cepas aisladas. Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para la caracterización morfológica y los ensayos de biodegradación de las cepas bacterianas. Se realizó una caracterización molecular mediante ERIC-PCR generando un árbol filogenético de los diferentes aislados realizando ensayos de biodegradación del polietileno con las cepas aisladas. La interpretación y análisis de los resultados permitió concluir lo siguiente: los aislados bacterianos con capacidad degradadora de polietileno corresponden a un consorcio bacteriano debido a sus diferencias moleculares según caracterización molecular ERIC-PCR, la cepa AP-5 obtuvo el mayor promedio de degradación reduciendo el peso de la muestra de polietileno en 2.8 g a los 9 días después de la inoculación.

Palabras claves: cepa, bacteriana, polietileno, suelo.

ABSTRACT

The research was carried out in the Microbiology Laboratory of the UTEQ, focused on the objectives of isolating and identifying bacterial strains with the capacity to biodegrade polyethylene fractions, morphologically and molecularly characterize the bacterial isolates with polyethylene degrading capacity to evaluate the degradation of polyethylene by polyethylene. isolated strains. A completely randomized DCA design was applied for the morphological characterization and the biodegradation tests of the bacterial strains. A molecular characterization was carried out by means of ERIC-PCR generating a phylogenetic tree of the different isolates carrying out biodegradation tests of the polyethylene with the isolated strains. The interpretation and analysis of the results allowed to conclude the following: the bacterial isolates with polyethylene degrading capacity correspond to a bacterial consortium due to their molecular differences according to molecular characterization ERIC-PCR, the AP-5 strain obtained the highest average degradation reducing the weight of the polyethylene sample in 2.8 g 9 days after inoculation.

Keywords: strain, bacterial, polyethylene, soil.

ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
PRÓLOGO.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
INTRODUCCIÓN	xv
CAPÍTULO I: MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN.	1
1.1 Ubicación y contextualización de la problemática.....	2
1.2 Situación actual de la problemática.....	3
1.3 Problema de investigación	3
1.3.1 Problema general.....	3
1.3.2 Problemas derivados	3
1.4 Delimitación del problema.....	3
1.5 Objetivos	4
1.5.1 Objetivo General	4
1.5.2 Objetivos Específicos.....	4
1.6 Justificación.....	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
2.1 Fundamentación conceptual.....	7
2.1.1 Bacteria.....	7
2.1.1.1 Funciones	7

2.1.1.2 Tamaño	7
2.1.1.3 Morfología.....	8
2.1.1.4 Estructura	8
2.1.2 Plásticos.....	9
2.1.3 Polietileno	9
2.1.3.1 Tipos de Polietileno.....	10
2.1.4 ERIC PCR (Secuencias de consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas).....	10
2.1.5 Biodegradación	11
2.2 Fundamentación teórica	12
2.2.1 Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario.....	12
2.2.2 Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina.	12
2.2.3 Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno.....	13
2.2.4 Microorganismos biodegradadoras de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material.....	14
2.3 Fundamentación legal	15
2.3.1 Constitución Política del Ecuador (2008).	15
2.3.2 Ley de Gestión Ambiental (2004).	15
2.3.3 Acuerdo Ministerial N° 061: Reforma del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria (2015).	17
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	19
3.1 Tipo de investigación	20
3.1.1 Experimental	20
3.2 Métodos de investigación.....	20
3.2.1 Inductivo	20
3.2.2 Deductivo.....	20
3.2.3 Muestras	20
3.3 Fuentes de recopilación de información.....	20

3.3.1 Fuentes secundarias.....	20
3.3.2 Fuentes primarias	21
3.4 Instrumento de investigación	21
3.4.1 Ficha de laboratorio.....	21
3.4.2 Ficha de monitoreo.....	21
3.5 Procesamiento y análisis de la información	21
3.5.1 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas con capacidad de biodegradar residuos de polietileno.....	21
3.5.1.1 Identificación de Colonias Productoras de Catalasa.	22
3.5.1.2 Caracterización molecular mediante ERIC-PCR.	23
3.5.1.3 Agrupamiento filogenético.....	23
3.5.2 Selección de bacterias con capacidad de degradación de polietileno.....	24
3.5.3 Evaluación de la degradación del polietileno por las cepas aisladas.....	25
3.5.4 Biomasa.	26
3.6 Diseño de la Investigación	26
3.6.1 Determinación de la capacidad degradadora de polietileno mediante el crecimiento radial en condiciones in vitro.	26
3.6.2 Diseño para la evaluación in-vitro de ensayos (degradación de polietileno).	26
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas con capacidad para biodegradar fracciones de polietileno.....	28
4.1.1 Purificación de las cepas con capacidad de degradación de polietileno.	28
4.1.2 Aislamiento y selección de bacterias descomponedores de polietileno.	29
4.2 Caracterización morfológica y molecular de los aislados bacterianos con capacidad degradadora de polietileno.	30
4.2.1 Identificación de cepas productoras de Catalasa y Fluorescencia.....	30
4.2.2 Tinción de Gram	30
4.2.3 Relación fenotípica de las colonias bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.....	31

4.2.4 Determinación del PH	32
4.2.5 Relación filogenética de los aislados bacterianos con capacidad degradadora de polietileno mediante marcadores morfológicos.	33
4.2.6 Relación genética de los aislados de bacterias con capacidad degradadora de polietileno mediante marcadores moleculares REP-PCR.	33
4.2.7 Agrupamiento filogenético de de los aislados de bacterias con capacidad degradadora de polietileno mediante ERIC-PCR.	34
4.3 Evaluación de las cepas aisladas con poder para degradar polietileno.....	35
4.3.1 Determinación de la capacidad degradadora de polietileno mediante el crecimiento radial en condiciones in vitro.	35
4.3.2 Determinación de la capacidad degradadora de polietileno mediante actividad metabólica.....	36
4.3.3 Biomasa de las células bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.	37
4.4 Discusión.....	38
4.4.1 Purificación de las cepas con capacidad de degradación de polietileno.	38
4.4.2 Tinción de Gram	39
4.4.3 Determinación del pH	39
4.4.4 Agrupamiento filogenético de de los aislados de bacterias con capacidad degradadora de polietileno mediante ERIC-PCR.	40
4.4.5 Determinación de la capacidad degradadora de polietileno mediante actividad metabólica.....	40
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
5.1 Conclusiones	42
5.2 Recomendaciones.....	43
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA	44
6.1 Referencias bibliográficas	45
ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Esquema del Análisis de Varianza.....	26
Tabla 2. Esquema del Análisis de Varianza.....	26
Tabla 3. Selección de bacterias con capacidad degradadora de polietileno	29
Tabla 4. Caracterización bioquímica y morfológica de las cepas bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.	32
Tabla 5. Determinación del pH	32
Tabla 6. Aumento de biomasa (g).....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa geográfico de Quevedo.....	2
Figura 2. Relación filogenética de los aislados bacterianos con capacidad degradadora de polietileno.....	24
Figura 3. Aislamiento y purificación de bacterias con capacidad degradadora de plásticos	28
Figura 4. Aislamiento y selección de bacterias descomponedores de polietileno.....	29
Figura 5. Caracterización Bioquímica de las bacterias con capacidad degradadora de polietileno..	30
Figura 6. Caracterización mediante la tinción de Gram de las cepas bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.	31
Figura 7. Relación genética de los aislados de bacterias con capacidad degradadora de polietileno mediante marcadores moleculares REP-PCR..	33
Figura 8. Agrupamiento filogenético de los aislados de bacterias con capacidad degradadora de polietileno mediante ERIC-PCR.	34
Figura 9. Determinación de la capacidad degradadora de polietileno en condiciones in vitro... ..	35
Figura 10. Determinación de la capacidad degradadora de polietileno en condiciones in vitro..	36
Figura 11. Determinación de la capacidad degradadora de polietileno en condiciones in vitro.	37
Figura 12. Curvas de biomasa de las cepas bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.	38
Figura 13. Biomasa de las cepas con capacidad degradadora de polietileno.	38

INTRODUCCIÓN

Los plásticos en general son productos muy utilizados y fabricados en grandes cantidades; sin embargo, debido a su difícil degradación se han vuelto un serio problema ambiental a nivel mundial. (Walters, 2007).

Cada año alrededor de 500.000 billones de botellas y un trillón de bolsas plásticas son fabricados en el mundo (EPA, 2012). En América Latina 31,5 kilos de envases y fundas son consumidos al año por habitante.

Uno de los desechos más comunes es el plástico. Esto se debe en gran medida a que muchos de los objetos utilizados en nuestra vida diaria están constituidos en su totalidad por este material. Tan solo en la industria de los alimentos podremos encontrar que muchos de los empaques son plásticos.

Su peligrosidad reside en la cantidad que se produce y desecha anualmente a nivel global. Es tal la demanda de plásticos en la industria que la sobreproducción de éste ha hecho insuficientes los métodos de reciclaje y reúso, trayendo como consecuencia contaminación, tanto por el volumen, como por tiempo de degradación, como por los lixiviados que se generan, derivados del proceso.

En el Ecuador la producción de plástico en el 2011 presentó un 16% más que el año 2010 lo que representó alrededor de US\$1.500 millones de ingresos (Banco Central del Ecuador, 2011).

En virtud de lo descrito en párrafos anteriores, resulta fundamental investigar acerca del poder de degradación de las bacterias en suelos contaminados con desperdicios plásticos, por lo cual la presente investigación se ha estructurado de la siguiente forma:

Capítulo I: Marco contextual de la investigación, detalla la ubicación y contextualización de la problemática a investigar, así como los problemas derivados del problema general. También se especifica la delimitación del problema, objetivos y justificación del estudio.

Capítulo II: Marco teórico de la investigación, describe los fundamentos conceptuales y teóricos relativos a las variables involucradas en el estudio, de igual forma se especifican los argumentos legales referentes a la degradación biológica del polietileno.

Capítulo III: Metodología de la investigación, dentro de este apartado se puntualiza el diseño metodológico a emplear: tipo y métodos de investigación, población y muestra, fuentes de recopilación de información, instrumento de investigación, procesamiento y análisis de la información.

Capítulo IV: Resultados y discusión, incluye todos los hallazgos derivados de la aplicación de las técnicas e instrumentos de investigación, y una comparación de los mismos con otros estudios similares.

Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones, agrupa aquellos aspectos relevantes de la investigación, así como las posibles medidas a implementarse como solución al problema identificado.

Capítulo VI: Bibliografía, reúne el compendio de fuentes de consulta utilizadas (textos, artículos científicos, tesis, normativas, y similares).

CAPÍTULO I.

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

“Ahora que finalmente nos hemos dado cuenta del terrible daño que hemos ocasionado al Medio Ambiente, estamos extremando nuestro ingenio para hallar soluciones tecnológicas”

Jane Goodall

1.1 UBICACIÓN Y CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA

La contaminación producida por desperdicios plásticos se extiende por todo el país, debido principalmente, a una ineficiente planificación de entidades responsables de proteger el entorno y de la poca conciencia de las personas, que arrojan sus desechos sin medir el impacto ambiental generado.

La investigación se realizó en el cantón Quevedo provincia de Los Ríos, una de las urbes más pobladas del país y la provincia, con 150.827 habitantes. Su principal actividad económica es la agronomía (Figura 1).



Figura 1. Mapa geográfico de Quevedo.

El estudio se dividió en dos fases: campo y laboratorio. La primera consistió en recolectar muestras de agua y suelo en el área de influencia de residuos contaminantes plásticos (zona urbana y rural). La segunda se refirió al análisis de las muestras en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ).

1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PROBLEMÁTICA

Quevedo es una ciudad de mucho comercio, lo que genera abundancia de personas en sus calles las cuales desechan desperdicios plásticos en su cotidiano andar, lo cual representa un daño ambiental de gran impacto en sus zonas urbanas y rurales.

El polietileno es el plástico que más contamina el medio ambiente debido a su uso indiscriminado. Su proceso de degradación natural es muy lento, ya que le toma por si solo alrededor de 50 a 300 años completarlo generando una gran cantidad de lixiviados.

La biorremediación es una práctica que ha permitido identificar ciertos tipos de bacterias con capacidad para acelerar la descomposición de estos derivados de carbono con una generación mínimo de desechos dañinos.

1.3 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.3.1 Problema general

¿Cuál es el efecto de la cepa bacteriana en el proceso de degradación de polietileno en suelos contaminados con desperdicios plásticos?

1.3.2 Problemas derivados

- ¿Cómo se aislarán e identificarán las cepas bacterianas con capacidad para biodegradar desperdicios plásticos?
- ¿De qué forma se seleccionó la cepa de degradadora de polietileno?
- ¿Cuál fue el resultado de la degradación del polietileno con la bacteria aislada?

1.4 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

- **Campo:** Ciencias Ambientales
- **Área:** Microbiología del suelo

- **Aspecto:** Contaminación del suelo con polietileno
- **Tiempo:** diciembre-junio, 2018
- **Línea de investigación:** Evaluación de la calidad del agua, aire y suelo incluyendo las alternativas de mitigación a los impactos ambientales.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo General

Identificar bacterias con potencial de degradación de polietileno en suelos contaminados con desperdicios plásticos.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Aislar y describir cepas bacterianas con capacidad para biodegradar partículas de polietileno.
- Caracterizar morfológica y molecularmente los aislados bacterianos con capacidad degradadora de polietileno.
- Evaluar la degradación del polietileno por las cepas aisladas.

1.6 JUSTIFICACION

El polietileno es uno de los plásticos que más contamina en el mundo debido a su largo tiempo de degradación natural haciendo que el mundo cada vez se vea afectado por su contaminación progresiva.

La producción de desechos, conocidos coloquialmente como basura, asciende a 2 billones de toneladas anuales lo que hace pertinente buscar alternativas que puedan remediar este problema de gran impacto ambiental.

La selección de microorganismos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos con una única fuente de carbono el polietileno, es una estrategia eficiente para evaluar el porcentaje de biodegradación de residuos de polietileno en suelos urbanos dependiendo de éstas el éxito en las siguientes etapas de tratamiento de suelos contaminados con residuos plásticos.

La biorremediación no ha perdido vigencia, interés y pertinencia; por el contrario, la Constitución Política del Ecuador (2008), reconoce que “la naturaleza tiene derecho a la restauración” (Art. 72), por lo cual se puede estimar a la reparación del suelo como una política de Estado que es necesario cumplir.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

“La tierra ama nuestras pisadas, y teme
nuestras manos.”

Joaquín Araujo

2.1 FUNDAMENTACION CONCEPTUAL

2.1.1 Bacteria

Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Las bacterias son células procariotas, por lo que a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.) **Fuente especificada no válida..**

2.1.1.1 Funciones

En general, las bacterias descomponen los substratos de fácil uso, los compuestos de carbono simple tales como las exudaciones de las raíces y los residuos frescos de las plantas. Los desechos producidos por las bacterias se convierten en materia orgánica **Fuente especificada no válida..** Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento (Pírez, 2006).

2.1.1.2 Tamaño

El tamaño oscila entre 0.5 y 3 μm , pudiendo llegar en algunos tipos a 10 μm . Las bacterias de interés médico miden entre 0.4 y 2 μm . Solo son visibles entonces, al microscopio óptico o microscopio electrónico. Para observarlas con el microscopio óptico se usa el objetivo de inmersión (100X), sumergiendo esta lente en una gota de aceite (aceite de inmersión) en el preparado a observar. A modo comparativo, una célula eucariota mide más de 5 μm (un eritrocito tiene un diámetro de 7 μm), mientras que un reovirus mide menos de 0.1 μm . Su tamaño pequeño determina una relación entre la superficie y el volumen elevada, con alta tasa metabólica (Pírez, 2006).

2.1.1.3 Morfología

Microscópica: La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esférica u ovalada), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral); dentro de estas últimas se encuentran: *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira* (Pírez, 2006).

Macroscópica: La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima. Existen excepciones como *M. tuberculosis*, que requiere para su desarrollo de dos a ocho semanas de incubación (Pírez, 2006).

2.1.1.4 Estructura

Las diferentes estructuras bacterianas las podemos dividir, según sean constantes en las células o no, en estructuras permanentes o variables. Dentro de las primeras se destaca: la pared celular, la membrana celular, los ribosomas y el material genético. Las estructuras variables son: los flagelos, las fimbrias o pilis, la cápsula y los esporos (Pírez, 2006).

Estructuras variables, son aquellos que existen en algunas bacterias, pero no en todas; un mismo grupo bacteriano o una misma cepa bacteriana las puede presentar o no, dependiendo de las condiciones en donde se desarrolle. Las estructuras variables no resultan esenciales para la vida de la bacteria (Vargas & Kuno, 2014).

Además, podemos clasificar las estructuras bacterianas en internas o citoplásmicas y externas o de la envoltura celular. Dentro de las internas destacamos el material genético, los ribosomas y los cuerpos de inclusión. La envoltura celular engloba la membrana

plasmática, la pared celular que la recubre, la cápsula y los apéndices como fimbrias o pilis y flagelos. Contiene los sitios de transporte para nutrientes, interviene en la relación huésped parásito, es blanco de las reacciones del sistema inmune y puede contener estructuras tóxicas para el huésped (Vargas & Kuno, 2014).

2.1.2 Plásticos

Los plásticos son materiales orgánicos: esto es, están basados en la química del carbono. Esto elimina materiales como el hormigón y el cristal, pero no excluye el asfalto, que no está clasificado como plástico (Dietz, 1973).

Los plásticos son materiales sintéticos, productos de la industria química, que convierte materias primas en formas nuevas y diferentes. Esto elimina materiales naturales tales como el asfalto y la laca, pero no excluye las ceras sintéticas (Dietz, 1973).

Los plásticos son polímeros de elevado peso molecular; esto es, son moléculas gigantes formadas por numerosas unidades repetidas combinadas en agregados muy grandes (Dietz, 1973).

2.1.3 Polietileno

El polietileno es probablemente el polímero que más se ve en la vida diaria. Es el plástico más popular del mundo. Éste es el polímero que hace las bolsas de almacén, los frascos de champú, los juguetes de los niños, e incluso chalecos a prueba de balas. Por ser un material tan versátil, tiene una estructura muy simple, la más simple de todos los polímeros comerciales. Una molécula del polietileno no es nada más que una cadena larga de átomos de carbono, con dos átomos de hidrógeno unidos a cada átomo de carbono (Jhoan, 1996).

A través de la polimerización de etileno se obtienen productos con propiedades físicas muy variadas, compartiendo en común la estructura química esencial (-CH₂-CH₂-), y en general tienen propiedades químicas de un alcano de peso molecular elevado. Este tipo de polímero se creó para usarlo como aislamiento eléctrico, pero después ha encontrado muchas aplicaciones en otros campos, especialmente como película y para envases (Jhoan, 1996).

2.1.3.1 Tipos de Polietileno

En general hay dos tipos de polietileno:

- De baja densidad (LDPE)
- De alta densidad (HDPE)

El de baja densidad tiene una estructura de cadena enramada, mientras que el polietileno de alta densidad tiene esencialmente una estructura de cadena recta (ANAIP, 1991).

El polietileno de baja densidad fue producido comercialmente por primera vez en el Reino Unido en 1939 mediante reactores autoclave (o tubular) necesitando presiones de 14.500 psi (100 Mpa) y una temperatura de unos 300 °C. El polietileno de alta densidad fue producido comercialmente por primera vez en 1956-1959 mediante los procesos de Philips y Ziegler utilizando un catalizador especial. En estos procesos la presión y temperatura para la reacción de conversión del etileno en polietileno fueron considerablemente más bajas (ANAIP, 1991).

2.1.4 ERIC PCR (Secuencias de consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas).

Las secuencias de consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC) son palíndromos imperfectos de 127 pb que se producen en copias múltiples en los genomas

de bacterias entéricas y vibriones. Las secuencias ERIC están sorprendentemente conservadas, lo que implica que han adquirido alguna función, tal vez relacionada con la estabilidad del ARNm. Las relaciones entre las copias dentro de *E. coli* son consistentes con un modo de generación de copia maestra. La inserción de nuevas copias parece ocurrir en la duplicación del dinucleótido timina y adenina (TA). Dos clases de insertos de aproximadamente 70 pb cada uno ocurren en diferentes sitios específicos dentro de las secuencias de ERIC; estos insertos evolucionan independientemente de las secuencias ERIC (Wilson & Sharp, 2006).

2.1.5 Biodegradación

La biodegradación es la característica de algunas sustancias químicas de poder ser utilizadas como sustrato por microorganismos, que las emplean para producir energía (por respiración celular) y crear otras sustancias como aminoácidos, nuevos tejidos y nuevos organismos. Puede emplearse en la eliminación de ciertos contaminantes como los desechos orgánicos urbanos, papel, hidrocarburos, etc.

No obstante, en vertidos que presenten materia biodegradable estos tratamientos pueden no ser efectivos si nos encontramos con otras sustancias como metales pesados, o si el medio tiene un pH extremo. En estos casos se hace necesario un tratamiento previo que deje el vertido en unas condiciones en la que las bacterias puedan realizar su función a una velocidad aceptable (Atkins & Jones, 2006).

2.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.2.1 Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario.

En el trabajo desarrollado en Lima, Perú se describe el aislamiento y la actividad de biodegradación de microorganismos sobre polietileno de baja densidad. Los microorganismos fueron aislados de materiales plásticos con evidencias de deterioro procedentes de un relleno sanitario de Lima. Las muestras fueron filtradas y preseleccionadas en medio de sales minerales a pH 5,5 y 7, para hongos y bacterias respectivamente. Se aislaron 6 cepas, identificadas como *Pseudomonas sp.* MP3a y MP3b, *Penicillium sp.* MP3a, *Rhodotorula sp.* MP3b, *Hyalodendron sp.* MP3c y una levadura no identificada. La acción degradativa del consorcio microbiano aislado fue evidenciada por variaciones en el espectro infrarrojo del polietileno con respecto al polímero sin tratamiento, observándose la reducción del índice de carbonilo (83,89% a pH 7 y 4,08% a pH 5,5) y de terminaciones con dobles enlaces (19,77% a pH 7 y 6,47% a pH 5,5). Finalmente se determinó el porcentaje de peso perdido por el polietileno sometido a las cepas aisladas, observándose una disminución de 5,4% a pH 7 y 4,8% a pH 5,5 (Uribe, 2010).

2.2.2 Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina.

Los plásticos son productos muy utilizados y fabricados en grandes cantidades, sin embargo, debido a su difícil degradación se han vuelto un serio problema ambiental a nivel mundial. Esta investigación tuvo como finalidad, sentar un precedente ó alternativa en la remediación ambiental causada por la producción indiscriminada de plásticos. Se

trabajó con bacterias nativas de tres tipos de humus: lombriz, caballo y gallina; así también con muestras de polietileno tereftalato y oxopolietileno las cuales fueron trituradas hasta obtener finas partículas para ser utilizadas como única fuente de carbono del medio de cultivo para las bacterias. La biodegradación se determinó mediante el peso residual [mg] de los plásticos durante 1 mes y 5 días. Al finalizar la investigación se obtuvo que las bacterias del humus de caballo biodegradaron un 10,89% de polietileno tereftalato; mientras tanto las bacterias nativas del humus de lombriz biodegradaron el 39.99% de oxopolietileno (Meza, 2010).

2.2.3 Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno.

La biodegradación del polietileno por microorganismos es una solución para la reducción de la contaminación por plásticos. En el presente trabajo se muestran los resultados del aislamiento y caracterización de cepas de hongos capaces de degradar el polietileno, así como la determinación de las condiciones de pH y temperatura en las que se logran la mayor actividad. Los hongos fueron aislados de productos elaborados con polietileno obtenidos de relleno sanitario, la identificación taxonómica en base a características macroscópicas del crecimiento en placa petri y el estudio microscópico empleando la técnica de microcultivo en lámina. La actividad biodegradadora se determinó con la técnica de Kavelman y Kendrick, a temperaturas entre 20 y 30 °C y a pH 4,5 8,0. Veinte cepas de micromicetos fueron aisladas e identificadas, en 5 (25%) se evidenció la capacidad de biodegradar el polietileno a 20 °C, siendo el pH 6,5 el óptimo, la cepa de mayor rendimiento pertenece a la especie de *Aspergillus flavus*. A temperatura de 30 °C, 6 (30%) cepas evidenciaron actividad degradadora, siendo pH 6,5 el óptimo, la cepa de mayor rendimiento fue la misma del caso anterior (Méndez, 2007).

2.2.4 Microorganismos biodegradadoras de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material.

El uso irracional y la resistencia a la degradación ambiental son las causas de que el polietileno de baja densidad (LDPE del inglés low density polyethylene) se acumule, lo que genera un grave problema ambiental [3], debido a esto se han hecho investigaciones en la búsqueda de soluciones al problema, siendo las más importantes el sustituir completamente el LDPE o acelerar su proceso de biodegradación (Acuña, 2017).

El presente trabajo es un estudio bibliográfico en el cual se recopilan, comparan y organizan amplia y sistemáticamente los aspectos más relevantes reportados sobre la biodegradación del polietileno de baja densidad (LDPE) en los cuales están incluidos: los microorganismos capaces de utilizarlo como fuente de carbono; las enzimas utilizadas y la comparación de sus eficiencias a partir de la pérdida de masa, considerando las condiciones en las que se realizaron dichas pruebas; todas las técnicas de análisis disponibles, los aditivos o sustitutos existentes; Finalmente se propone una estrategia metodológica de identificación de los microorganismos y cuantificación de la biodegradación que sea adecuada para su implementación local (Acuña, 2017).

2.3 FUNDAMENTACIÓN LEGAL

2.3.1 Constitución Política del Ecuador (2008).

Capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales

Sección quinta: Suelo

Art. 409.- Es de interés público y prioridad nacional la conservación del suelo, en especial su capa fértil. Se establecerá un marco normativo para su protección y uso sustentable que prevenga su degradación, en particular la provocada por la contaminación, la desertificación y la erosión.

En áreas afectadas por procesos de degradación y desertificación, el Estado desarrollará y estimulará proyectos de forestación, reforestación y revegetación que eviten el monocultivo y utilicen, de manera preferente, especies nativas y adaptadas a la zona.

Art. 410.- El Estado brindará a los agricultores y a las comunidades rurales apoyo para la conservación y restauración de los suelos, así como para el desarrollo de prácticas agrícolas que los protejan y promuevan la soberanía alimentaria.

2.3.2 Ley de Gestión Ambiental (2004).

Título I: Ámbito y Principios de la Gestión Ambiental contempla:

Art. 1.- La presente Ley establece los principios y directrices de política ambiental; determina las obligaciones, responsabilidades, niveles de participación de los sectores público y privado en la gestión ambiental y señala los límites permisibles, controles y sanciones en esta materia.

Art. 2.- La gestión ambiental se sujeta a los principios de solidaridad, corresponsabilidad, cooperación, coordinación, reciclaje y reutilización de desechos, utilización de

tecnologías alternativas ambientalmente sustentables y respecto a las culturas y prácticas tradicionales.

Art. 3.- El proceso de Gestión Ambiental, se orientará según los principios universales del Desarrollo Sustentable, contenidos en la Declaración de Río de Janeiro de 1992, sobre Medio Ambiente y Desarrollo.

Art. 4.- Los reglamentos, instructivos, regulaciones y ordenanzas que, dentro del ámbito de su competencia, expidan las instituciones del Estado en materia ambiental, deberán observar las siguientes etapas, según corresponda: desarrollo de estudios técnicos sectoriales, económicos, de relaciones comunitarias, de capacidad institucional y consultas a organismos competentes e información a los sectores ciudadanos.

Art. 5.- Se establece el Sistema Descentralizado de Gestión Ambiental como un mecanismo de coordinación transectorial, interacción y cooperación entre los distintos ámbitos, sistemas y subsistemas de manejo ambiental y de gestión de recursos naturales.

En el sistema participará la sociedad civil de conformidad con esta Ley.

Art. 6.- El aprovechamiento racional de los recursos naturales no renovables en función de los intereses nacionales dentro del patrimonio de áreas naturales protegidas del Estado y en ecosistemas frágiles, tendrán lugar por excepción previo un estudio de factibilidad económico y de evaluación de impactos ambientales.

Título II: Del Régimen Institucional de la Gestión Ambiental

Capítulo I: Del Desarrollo Sustentable

Art. 7.- La gestión ambiental se enmarca en las políticas generales de desarrollo sustentable para la conservación del patrimonio natural y el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales que establezca el Presidente de la República al aprobar el Plan Ambiental Ecuatoriano. Las políticas y el Plan mencionados formarán parte de los objetivos nacionales permanentes y las metas de desarrollo. El Plan Ambiental Ecuatoriano contendrá las estrategias, planes, programas y proyectos para la gestión ambiental nacional y será preparado por el Ministerio del ramo.

Para la preparación de las políticas y el plan a los que se refiere el inciso anterior, el Presidente de la República contará, como órgano asesor, con un Consejo Nacional de Desarrollo Sustentable, que se constituirá conforme las normas del Reglamento de esta Ley y en el que deberán participar, obligatoriamente, representantes de la sociedad civil y de los sectores productivos.

2.3.3 Acuerdo Ministerial N° 061: Reforma del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria (2015).

Parágrafo II: Del Suelo, se establece lo siguiente:

Art. 212 Calidad de Suelos. - Para realizar una adecuada caracterización de este componente en los estudios ambientales, así como un adecuado control, se deberán realizar muestreos y monitoreos siguiendo las metodologías establecidas en el Anexo II y demás normativa correspondiente.

La Autoridad Ambiental Competente y las entidades del Sistema Nacional Descentralizado de Gestión Ambiental, en el marco de sus competencias, realizarán el control de la calidad del suelo de conformidad con las normas técnicas expedidas para el efecto. Constituyen normas de calidad del suelo, características físico-químicas y

biológicas que establecen la composición del suelo y lo hacen aceptable para garantizar el equilibrio ecológico, la salud y el bienestar de la población.

Art. 213 Tratamiento de Suelos Contaminados. - Se lo ejecuta por medio de procedimientos validados por la Autoridad Ambiental Competente y acorde a la norma técnica de suelos, de desechos peligrosos y demás normativa aplicable. Los sitios de disposición temporal de suelos contaminados deberán tener medidas preventivas eficientes para evitar la dispersión de los contaminantes al ambiente.

Art. 214 Restricción. - Se restringe toda actividad que afecte la estabilidad del suelo y pueda provocar su erosión.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

“El mundo es un lugar peligroso. No por causa de los que hacen el mal, sino por aquellos que no hacen nada por evitarlo.”

Albert Einstein

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

3.1.1 Experimental

La presente investigación es de tipo experimental, debido a que se la realizó con la manipulación directa de las variables a estudio: cepa bacteriana, suelo contaminado con residuos de polietileno, a través del análisis en laboratorio, empleando todos los estándares internacionales y nacionales que rigen la microbiología del suelo.

3.2 MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

3.2.1 Inductivo

Se lo usó durante el proceso del aislamiento, identificación y selección de cepas con capacidad degradadora de residuos de polietileno.

3.2.2 Deductivo

Se lo empleó para la evaluación del nivel de degradación del polietileno a través del empleo de cepas bacterianas.

3.2.3 Muestras

Las muestras fueron tomadas de suelos contaminados con desechos de polietileno en el sector urbano de la ciudad de Quevedo, las mismas que fueron conservadas en fundas ziploc, y procesadas en el Laboratorio de Biotecnología de la UTEQ después de 24 h.

3.3 FUENTES DE RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN

3.3.1 Fuentes secundarias

De este tipo de fuentes se utilizaron documentos científicos pertinentes: textos, artículos, revistas, etc. Toda esta información sirvió para un uso correcto de la metodología para la realización de la investigación.

3.3.2 Fuentes primarias

Fue tomado en cuenta como fuente primaria a las observaciones realizadas durante todo el proceso de la investigación.

3.4 INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

3.4.1 Ficha de laboratorio

En ella se recabó toda la información obtenida del análisis microbiológico realizado en el laboratorio: número de cepas aisladas, porcentaje de polietileno degradado, crecimiento bacteriano, etc.

3.4.2 Ficha de monitoreo

Se la utilizó para el registro de la información obtenida del monitoreo de la calidad del suelo: cantidad de muestras, peso de las muestras, transporte, tiempo de almacenamiento.

3.5 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

3.5.1 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas con capacidad de biodegradar residuos de polietileno.

Se recolectaron muestras de tierra contaminadas con residuos plásticos obtenidas de la zona urbana del cantón Quevedo, se las almacenó en fundas ziploc para su traslado al laboratorio.

Para su aislamiento se utilizó un medio mínimo con sales [(g/L): 20.0; glicerol, 15 mL; K₂HPO₄, 1.5; MgSO₄ x 7H₂O, 1 lt de agua destilada (pH 7.2)], al cual se le adicionó como fuente de carbono única polietileno en polvo, los componentes del medio fueron esterilizados en autoclave a 120 °C.

Se utilizaron vasos Erlenmeyer con 50ml del medio de cultivo y 10 gr de la muestra en agitación por 10 días el procedimiento se lo repitió tres veces por cada muestra para la selección bacteriana.

A los 30 se recuperaron 20 µL del crecimiento bacteriano en dilución seriada de 1×10^{-2} células/mL, y se plaquearon en cajas Petri con medio King B solido (agar 15 g/L) suplementado con chloramphenicol (13 µg/mL), ampicillina (40 µg/mL) (Simon & Ridge, 1974), incubadas a 27 °C por 24 h. Además, se procedió a la evaluación de caracteres morfológicos a forma de la colonia: circular, puntiforme, irregular, fusiforme. Forma del borde: entero, ondulado, lobulado, filamentoso. Elevación de colonia: plana, convexa, elevada.

La visualización de las muestras del cultivo a obtenerse en el medio selectivo King B para el aislamiento de cepas degradadoras de residuos de polietileno, se preparó llevando a cabo tinciones de Gram, técnica de tinción diferencial que permitió clasificar las bacterias en Gram positivas y negativas, según el tipo de coloración que adquirieran y se observarán las preparaciones en el microscopio óptico.

3.5.1.1 Identificación de Colonias Productoras de Catalasa.

De los aislamientos obtenidos, se tomaron 10 µl y se los incubaron en medio King B liquido en agitación por 24 h para su multiplicación. Se recuperaron 4 µl del crecimiento bacteriano diluido en agua ultra Pura 1 en 1000, las muestras fueron plaqueadas con King B solido (agar 15g/ 1l), y se las incubaron a 27 °C por 24 h. para la obtención de colonias puras.

Se colocaron 2 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en un porta objeto, y se ubicaron en el microscopio, se “pincharon” las colonias bacterianas, con ayuda del microscopio OLYMPUS 10x para su observación de producción de burbujas (catalasa +).

3.5.1.2 Caracterización molecular mediante ERIC-PCR.

Para la caracterización de los diferentes aislados bacterianos se realizó una PCR previamente obtenido el ADN mediante el kit QIAGEN-Start Protocol empleando como cebadores ERIC1R (5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'); ERIC2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Louws et al. 1994).

La PCR se la realizó en tubos de 1.5 mL con un volumen final del mix de 20 uL que contienen: Agua 9.7 uL Ultra pura, Partidores: 1 uL ERIC1R (forward), 1 uL ERIC2 (reverse), 5 uL Buffer 10x, 1 uL DNTPs, 0.3 uL de Taq Polimerasa y 2 uL de ADN.

Las muestras fueron puestas en un termociclador con las condiciones siguientes: un ciclo inicial a 94 °C por 3 minutos (desnaturalización); 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto (segunda desnaturalización), para el alineamiento del primer 37 °C por 2 minutos, hibridación del ADN 72 °C por 2 minutos.

Se observaron las muestras en un gel de agarosa al 2.5% mediante electroforesis por 3 horas teñidas con bromuro de Etidio 2uL donde se obtuvieron varios productos de amplificación que varían en peso desde 100 a 1500 bp.

3.5.1.3 Agrupamiento filogenético.

Para el agrupamiento genético mediante ERIC PCR y caracteres morfológicos y químicos de las bacterias aisladas se realizó un análisis de los perfiles de información binaria de (1 y 0) generados por los productos de amplificación.

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método UPGMA. El árbol filogenético se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético (Figura 2). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Kimura 2-parámetro y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 6.0.

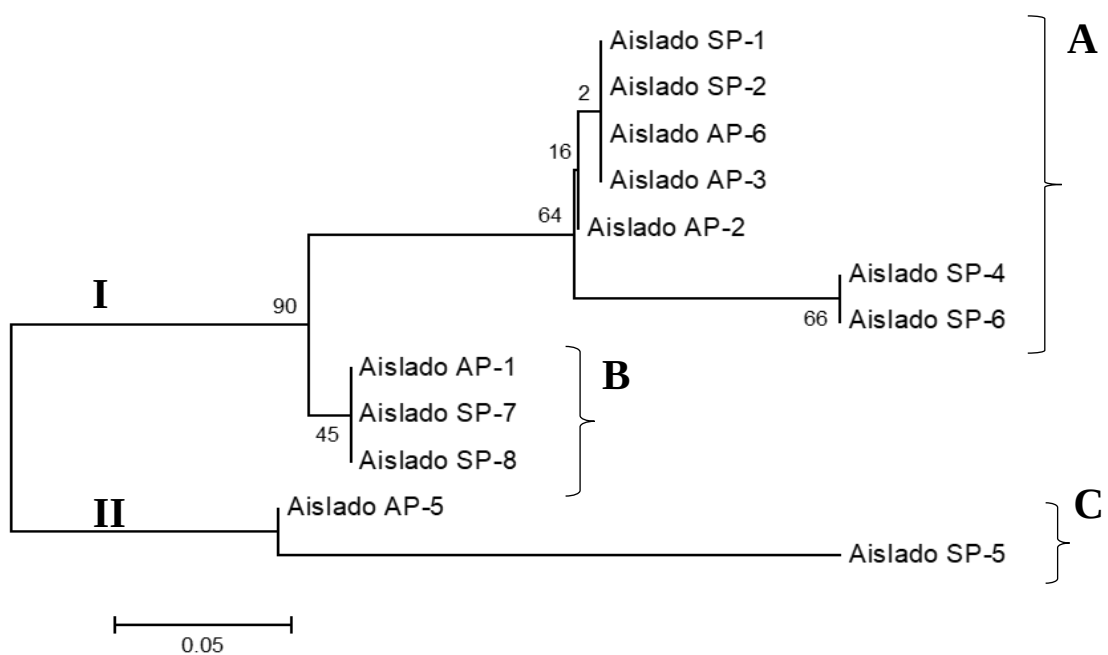


Figura 2. Relación filogenética de los aislados bacterianos con capacidad degradadora de polietileno. Dendrograma construido con datos de caracteres morfológicos y bioquímicos de los aislados correspondientes a las muestras obtenidas de suelos y aguas contaminadas con desechos plásticos. La distancia evolutiva se dedujo empleando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético se construyó empleando Maximum Composite Likelihood. Los números representan porcentajes de bootstrap.

3.5.2 Selección de bacterias con capacidad de degradación de polietileno.

Para la selección de bacterias se inocularon 50 ul de células bacterianas en medio de cultivo mínimo sólido con única fuente de carbono polietileno en polvo para su crecimiento en placas petri por 18h.

Se sembraron 3 discos de agar con crecimiento bacteriano en caja petri con medio de cultivo sólido y se evaluó el crecimiento radial de la colonia a las 18, 24 y 36 horas.

Se seleccionaron las cepas con mayor crecimiento radial.

3.5.3 Evaluación de la degradación del polietileno por las cepas aisladas.

Luego de efectuado el aislamiento de las cepas, se procedió a estudiar sus capacidades biodegradadoras. Para ello, se realizó un ensayo de biodegradación con muestras de plástico de polietileno, el mismo que se describe a continuación:

Cada cepa aislada se incubó en Erlenmeyer de 100 mL (capacidad nominal) con 20 mL de medio King B y una muestra de polietileno.

Se inoculó 100 µL de resuspensión de las cepas, a una turbidez equivalente de 0,9 unidades de absorbancia a 600 nm. Se utilizó como control a la cepa *B. subtilis*.

Se colocó los cultivos a incubar en agitación a 150 rpm, 30 °C y en oscuridad durante 15 días.

La evaluación de la actividad degradadora se la efectuó mediante el peso de las muestras de polietileno colocadas en el medio de cultivo.

Se registró el peso de la muestra del polietileno con medio de cultivo.

Se evaluó la actividad metabólica del consumo del medio de cultivo como única fuente de carbono el polietileno a 3, 6 y 9 días. Donde es el resultado de la diferencia del (peso Inicial – peso del tratamiento con bacteria).

3.5.4 Biomasa.

Los datos para los promedios de peso de la biomasa bacteriana fueron tomados simultáneamente con evaluación de la degradación del polietileno con una muestra modelo no incluida en los tratamientos, se recolectó 1ml de muestra y se la pesó en una balanza analítica.

3.6 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.6.1 Determinación de la capacidad degradadora de polietileno mediante el crecimiento radial en condiciones in vitro.

Se empleó un diseño completamente al azar DCA, para el crecimiento radial de las cepas de las bacterias descomponedores de plásticos generando 12 cepas a evaluar realizando 3 repeticiones.

Tabla 1. Esquema del Análisis de Varianza de crecimiento radial de cepas

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	35
Tratamientos	11
Total	46

Elaborado: Autor

3.6.2 Diseño para la evaluación in-vitro de ensayos (degradación de polietileno).

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto de biodegradación de polietileno de las 5 cepas con capacidad degradadora de plásticos generando 5 tratamientos con 4 repeticiones.

Tabla 2. Esquema del Análisis de Varianza de biodegradación de polietileno

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	19
Tratamientos	4
Total	23

Elaborado: Autor

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“La verdadera ignorancia no es la ausencia de conocimientos, sino el hecho de negarse a adquirirlos.”

Karl Popper

4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS CON CAPACIDAD PARA BIODEGRADAR FRACCIONES DE POLIETILENO.

4.1.1 Purificación de las cepas con capacidad de degradación de polietileno.

Las muestras recolectadas de agua y suelo con contaminantes plásticos fueron el inicio para el aislamiento y selección de bacterias descomponedores de polietileno.

Se realizó el aislamiento de las colonias bacterianas mediante un proceso de adaptación al medio de cultivo mínimo con fuente única de carbono el polietileno. En la primera inoculación se obtuvo una sinergia de crecimiento bacteriano en los Erlenmeyer con 100 ml de cultivo, donde se observó abundante crecimiento bacteriano a los 10 días, se recuperaron 100 uL de cultivo bacteriano, incubándolo en un nuevo medio de cultivo para su selección (Figura 3). Este procedimiento se lo realizó tres veces a partir de la matriz inicial para la selección de bacterias que tengan la capacidad de descomposición de residuos de polietileno. La selección de las bacterias descomponedores se lo realizó por selección de adaptación y tolerancia al medio de cultivo con fuente de carbono única de residuos de polietileno, observado a los 15 días, con la presencia de bacterias en el Erlenmeyer con el medio de cultivo King B + polietileno.

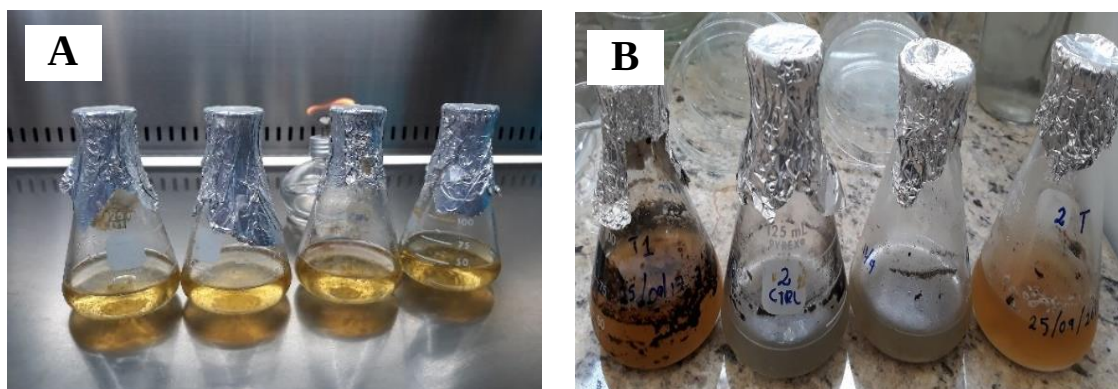


Figura 3. Aislamiento y purificación de bacterias con capacidad degradadora de plásticos. (A), Medio de cultivo mínimo con fuente de carbono única polietileno. (B), Crecimiento de células bacterianas con capacidad degradadora de plásticos de muestras de agua y suelos contaminados.

4.1.2 Aislamiento y selección de bacterias descomponedores de polietileno.

Del crecimiento bacteriano obtenido a los 30 días previos a su selección y purificación, se recuperaron 10 uL y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} e inoculadas en medio sólido para su aislamiento y selectividad de colonias bacterianas (Figura 4).

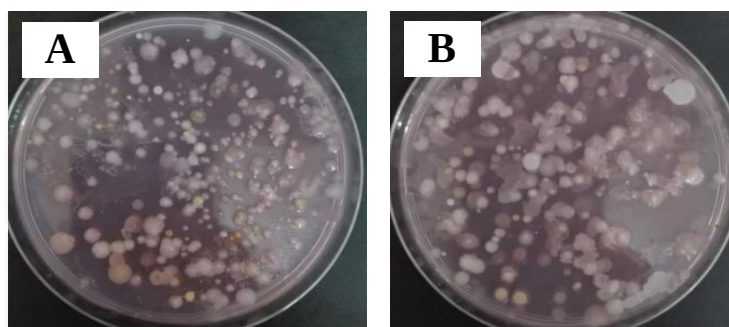


Figura 4. Aislamiento y selección de bacterias descomponedores de polietileno. (A), Muestra de Agua. (B), Muestra de suelo.

Se seleccionaron las bacterias que tenían mejores características en cuanto a su crecimiento y cantidad de colonias similares, se consiguió la selección de 12 colonias bacterianas, para su procedencia de agua, suelo con potencial de degradación de polietilenos en la Tabla 3. Se procedió a clasificar en las colonias bacterianas según su procedencia.

Tabla 3. Selección de bacterias con capacidad degradadora de polietileno

Procedencia de la Muestra	Codificación
Muestra de Agua	AP-1
Muestra de Agua	AP-2
Muestra de Agua	AP-3
Muestra de Agua	AP-5
Muestra de Agua	AP-6
Muestra de Suelo	SP-1
Muestra de Suelo	SP-2
Muestra de Suelo	SP-4
Muestra de Suelo	SP-5
Muestra de Suelo	SP-6
Muestra de Suelo	SP-7
Muestra de Suelo	SP-8

4.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS AISLADOS BACTERIANOS CON CAPACIDAD DEGRADADORA DE POLIETILENO.

4.2.1 Identificación de cepas productoras de Catalasa y Fluorescencia.

De las muestras contaminadas se obtuvieron 12 aislados bacterianos, a los que se realizó la identificación de la enzima descomponedora de peróxido de hidrogeno catalasa y fluorescencia, los 12 aislados dieron positivo para la producción de la enzima catalasa y solo 6 emitieron fluorescencia., observando 20 de las colonias bacterianas con mayor producción enzimática y con emisión de fluorescencia (Figura 5).

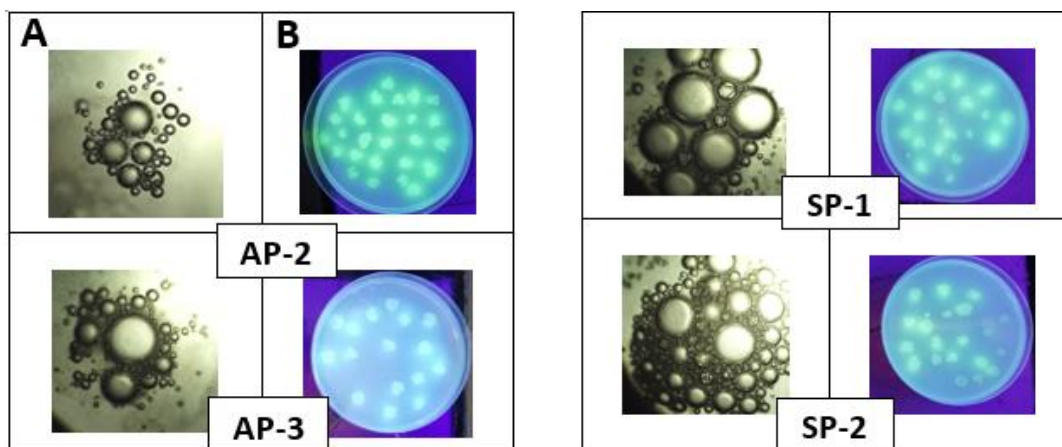


Figura 5. Caracterización Bioquímica de las bacterias con capacidad degradadora de polietileno. (A), Producción de catalasa; (B), Emisión de fluorescencia.

4.2.2 Tinción de Gram

Los 12 aislados bacterianos obtenidos de muestras de agua y suelos con rastros de contaminación por desechos plásticos fueron caracterizados mediante tinción de Gram, dando como resultado la tinción de color violeta para los 12 aislados, dando positivo para Gram negativo debido a su delgada capa de péptidoglucano, así como una membrana externa (Figura 6).

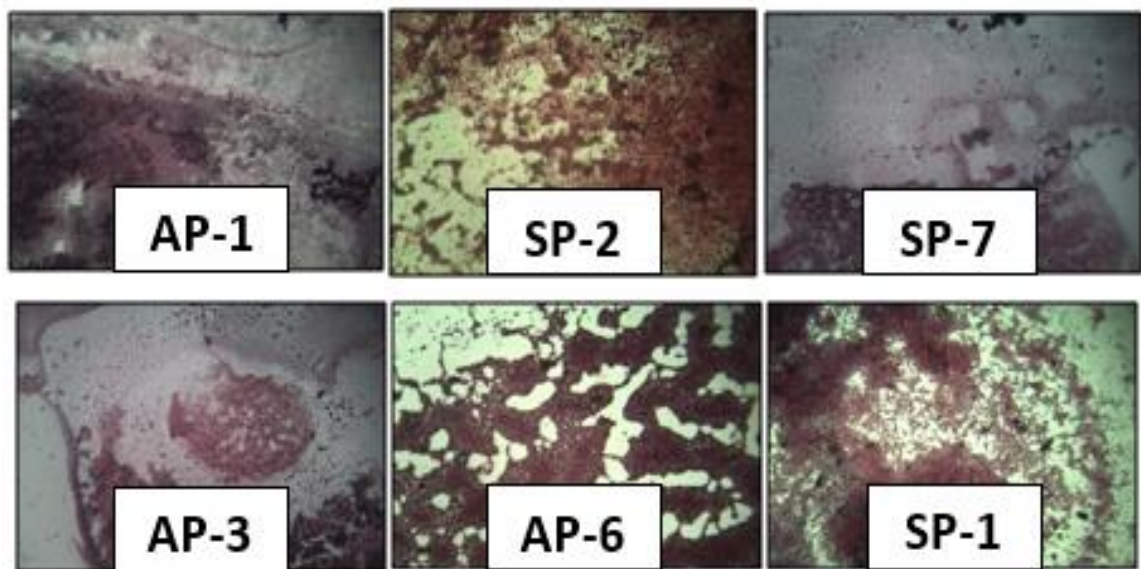


Figura 6. Caracterización mediante la tinción de Gram de las cepas bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.

4.2.3 Relación fenotípica de las colonias bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.

Del análisis de las muestras recolectadas con rastros de contaminación por desechos plásticos de agua y suelo, se aislaron y seleccionaron 12 cepas bacterianas, procediendo a su caracterización mediante marcadores morfológicos. De los cuales 11 de los aislados bacterianos presentaron forma circular y uno de ellos con forma filamentosa, 10 colonias presentaron una elevación convexa y dos con elevación elevada. Todas las colonias bacterianas presentaron un margen entero como se observa en la Tabla 4. También se evaluaron características como: forma granular, elevación plana y las márgenes ondulada, lobulada y dentada; sin embargo, no se obtuvieron valores para cada una de ellas, por lo que no se encuentran descritas en la tabla abajo trazada.

Tabla 4. Caracterización bioquímica y morfológica de las cepas bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.

	Muestras	Tinción De Gram	Catalasa	Forma		Elevación		Entera	Fluorescencia
		Negativo		Circular	Filamentosa	Elevada	Convexa		
1	SP-8	1	++	1	0	0	1	1	0
2	AP-1	1	++	1	0	0	1	1	0
3	AP-2	1	++	1	0	0	1	1	1
4	AP-3	1	++	1	0	0	1	1	1
5	AP-5	1	++	1	0	1	0	1	0
6	AP-6	1	++	1	0	0	1	1	1
7	SP-1	1	++	1	0	0	1	1	1
8	SP-2	1	++	1	0	0	1	1	1
9	SP-3	1	+	1	0	0	1	1	0
10	SP-4	1	++	0	1	1	0	1	0
11	SP-6	1	+	1	0	0	1	1	1
12	SP-7	1	++	1	0	0	1	1	0

4.2.4 Determinación del PH

La determinación del pH es determinante para la selección de las cepas con la capacidad degradadora de plástico, reflejando la disminución en el medio de cultivo, considerando la adaptación de las bacterias al porcentaje de hidrogeno del medio. En la Tabla 5 se muestra los datos registrados de pH para los tiempos de evaluación de 3, 6 y 9 días en las cepas (AP-2, AP-3, AP-5, AP-6, SP-4, SP-5, SP-6, SP-7) se observó un aumento del nivel de PH, en las muestras (AP-1, SP-1, SP-2, SP-8) disminuyó el nivel de PH.

Tabla 5. Determinación del pH

Codificación	pH		
	Inicial (3 días)	(6 días)	Final (9 días)
AP-1	8.4	8.4	8.4
AP-2	8.4	8.1	8.22
AP-3	8.4	8.22	8.21
AP-5	8.4	8.23	8.24
AP-6	8.4	8.3	8.29
SP-1	8.4	8.41	8.42
SP-2	8.4	8.41	8.42
SP-4	8.4	8.23	8.23
SP-5	8.4	8.20	8.21
SP-6	8.4	8.22	8.23
SP-7	8.4	8.23	8.26
SP-8	8.4	8.42	8.45

4.2.5 Relación filogenética de los aislados bacterianos con capacidad degradadora de polietileno mediante marcadores morfológicos.

La relación genética mediante la distancia evolutiva de los caracteres morfológicos y bioquímicos formó dos grupos (I y II). El grupo I se subdivide en 2 subgrupos, A conformado por las cepas SP1, SP2, AP6, AP3, AP2, SP4, SP6 con 36% de similitud y B que reúne a las cepas AP1, SP7, SP7 con 55% de similitud. El grupo II reunió a las cepas AP5 y SP5 con 100% de similitud.

4.2.6 Relación genética de los aislados de bacterias con capacidad degradadora de polietileno mediante marcadores moleculares REP-PCR.

La caracterización molecular mediante ERIC-PCR al ADN genómico de los 8 aislados de los aislados bacterianos generó un total de 11 bandas que varían en tamaño desde 100 a 1500 pb (Figura 7), mediante la comparación visual de bandas patrones revelaron 6 perfiles distintos entre los 8 aislados evaluados.

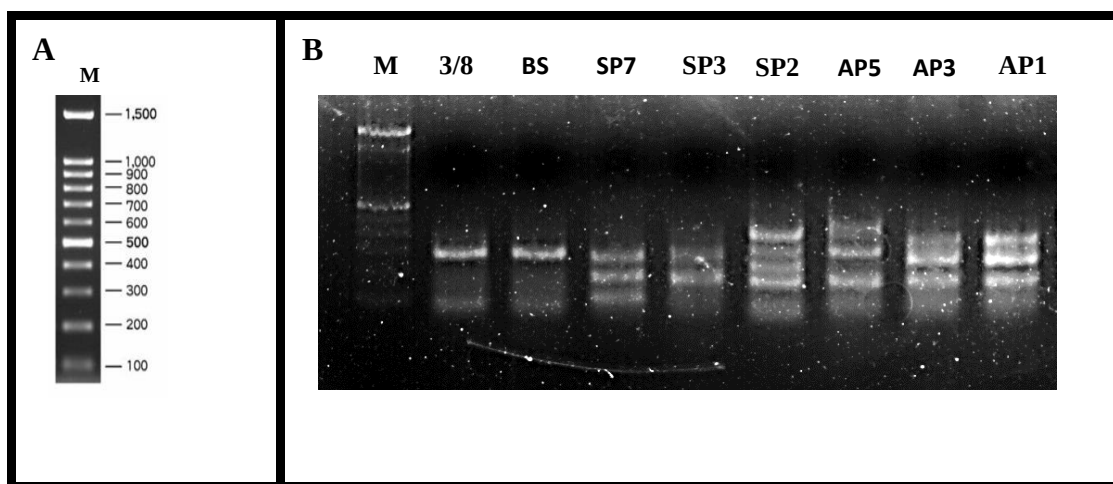


Figura 7. Relación genética de los aislados de bacterias con capacidad degradadora de polietileno mediante marcadores moleculares REP-PCR. (A), Marcador de peso molecular. (B), perfil de amplificación de las cepas con capacidad degradadora de polietileno, (SP7, SP3, SP2) cepas de suelos contaminados con residuos plásticos, (AP5, AP3, AP1) cepas de aguas contaminadas con residuos plásticos, (3/8 y BS) cepas control.

4.2.7 Agrupamiento filogenético de de los aislados de bacterias con capacidad degradadora de polietileno mediante ERIC-PCR.

El análisis de agrupamiento produjo un dendrograma con 2 grupos de los 8 aislados de las cepas bacterianas con potencial degradador de polietileno (Grupo I, II) (Figura 8).

El grupo I agrupó las muestras AP1, AP3, AP5 pertenecientes a las muestras de agua con residuos plásticos y a la cepa SP2 proveniente de suelos las cuales comparten características de producción de catalasa cm un 50% de similitud genética. El grupo II reunió a los aislados SP3 y SP7 los cuales no emitieron fluorescencia dejando un subgrupo aislado en las cuales se encuentran la cepa *B. subtilis* y *S. marcescens* utilizadas como controles.

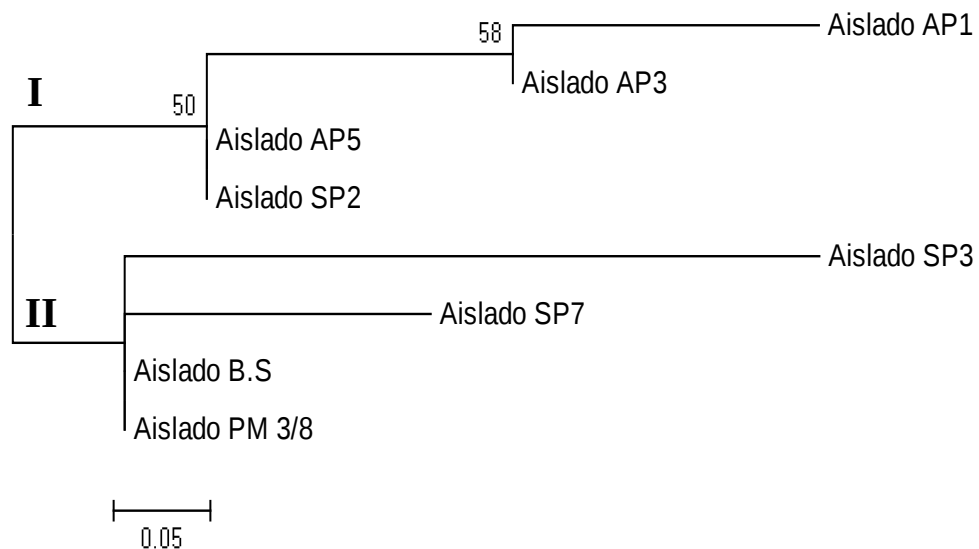


Figura 8. Agrupamiento filogenético de los aislados de bacterias con capacidad degradadora de polietileno mediante ERIC-PCR. Dendrograma construido con datos de caracteres morfológicos y bioquímicos de los aislados correspondientes a las muestras obtenidas de suelos y aguas contaminadas con desechos plásticos. La distancia evolutiva se dedujo empleando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético se construyó empleando Maximum Composite Likelihood. Los números representan porcentajes de bootstrap.

4.3 EVALUACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS CON PODER PARA DEGRADAR POLIETILENO

4.3.1 Determinación de la capacidad degradadora de polietileno mediante el crecimiento radial en condiciones in vitro.

De las bacterias preseleccionadas con capacidad degradadora a polietileno se verificó su capacidad de adaptación al medio mínimo con polietileno como única fuente de carbono. Observando la adaptación de las bacterias a los días de evaluación 12, 24 y 36. Las cepas de mayor velocidad de crecimiento son: (SP-6, AP-3, AP-5 y SP-2) con crecimiento radial de colonia de (20.5, 17.6, 17.5 y 17 mm) a las 36 horas. En contraste las cepas (AP-1, AP-2, AP-6, SP-1, SP-4, SP-7 y SP-8) que mostraron valores que oscilan entre (13.1 y 12.7 mm) a las 36 horas de evaluación (Figura 9).

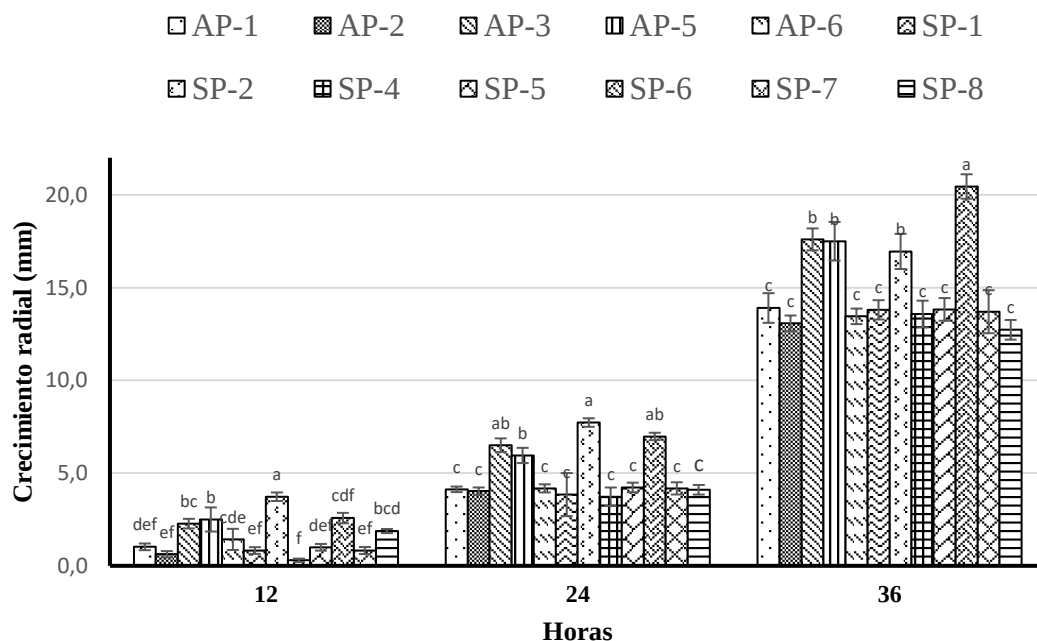


Figura 9. Determinación de la capacidad degradadora de polietileno en condiciones in vitro. Las líneas de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan). Las barras indican el crecimiento bacteriano correspondiente de cada cepa, mostrando resultados simultáneos a las 12, 24 y 36 horas después de la inoculación.

4.3.2 Determinación de la capacidad degradadora de polietileno mediante actividad metabólica.

Las bacterias de mayor crecimiento micelial (AP-3; AP-5; SP-2; SP-6) como única fuente energía el polietileno, fueron seleccionadas para poder evaluar la degradación por sus actividad metabólica. Se verifico la capacidad degradadora de las bacterias mediante el avance a la descomposición del polietileno como fuente única de carbono al consumo del medio de cultivo, la cepa AP-5 obtuvo el mayor promedio de degradación con 2.8 g a los 9 días de inoculación, en contraste con las cepas (AP-3, SP-2, SP-6) que presentaron valores entre 1.25 y 0.25 g respectivamente, la cepa *B. subtilis* empleado como control se verificó el menor promedio de degradación con 2.8 g (Figura 10 y 11).

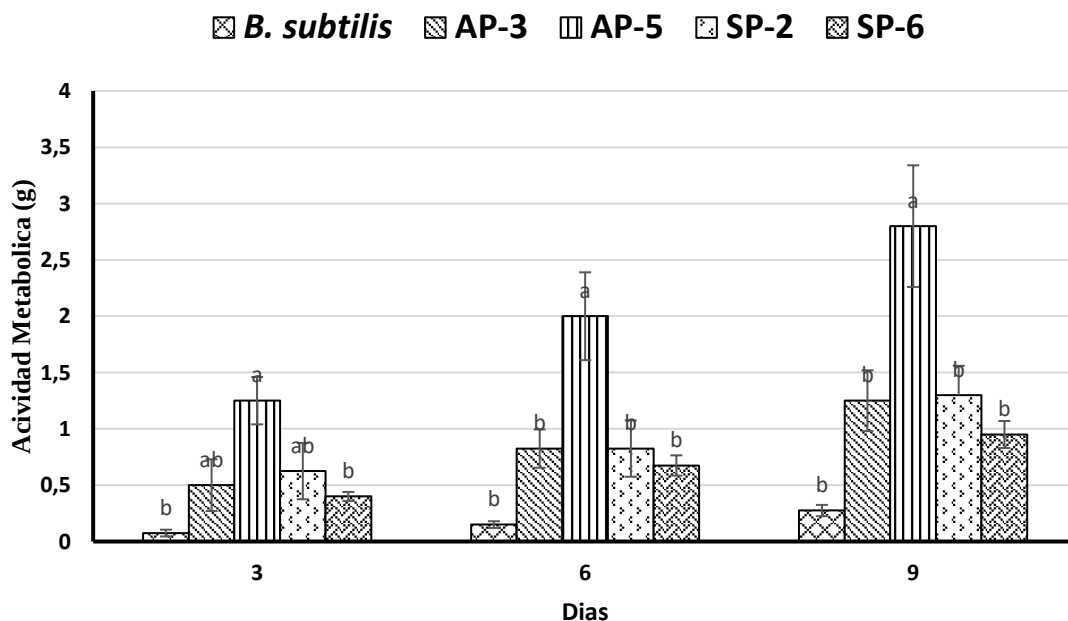


Figura 10. Determinación de la capacidad degradadora de polietileno en condiciones in vitro. Las líneas de error indican $\pm$ ES; letras diferentes indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (prueba de Duncan). Las barras indican el crecimiento bacteriano correspondiente de cada cepa, mostrando resultados simultáneos a los 3, 6 y 9 días después de la inoculación.

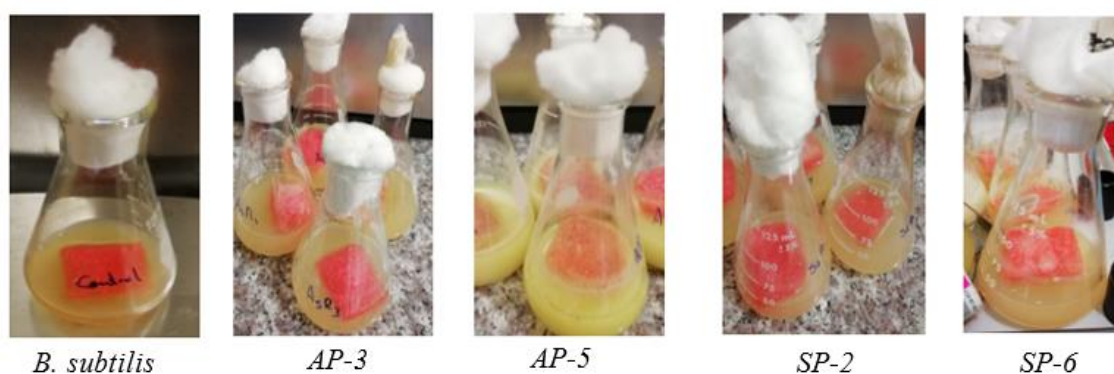


Figura 11. Determinación de la capacidad degradadora de polietileno en condiciones in vitro.

4.3.3 Biomasa de las células bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.

De las evaluaciones para la determinación de la capacidad degradadora de polietileno mediante actividad metabólica se pudo detectar enturbiamiento del medio, el cual indica el desarrollo de biomasa bacteriana, lo que se comprobó con la realización de los respectivos recuentos bacterianos de los efluentes de los biorreactores al inicio de la operación (0 días) a los 3 días y al final de la operación (9 días), La tabla 6 muestra los resultados obtenidos del peso en gramos de biomasa, las curvas de crecimiento microbiano para los tres evaluaciones tomadas respectivamente.

Tabla 6. Aumento de biomasa (g)

Tratamientos	3 días	6 días	9 días
<i>B. subtilis</i>	0,042	0,12	0,2
AP-3	0,053	0,28	0,32
AP-5	0,065	0,38	0,45
SP-2	0,043	0,26	0,33
SP-6	0,038	0,2	0,29

La cepa AP-5 presentó el mayor promedio de biomasa celular con un peso de 0.45 g a los 9 días de evaluación, en contraste con las cepas (AP-3, SP-2, SP-6) que presentan valores entre 0.33 y 0.29 g respectivamente, la cepa *B. subtilis* utilizada como control presentó el menor promedio de biomasa con 0.2 g (Figura 12 y 13).

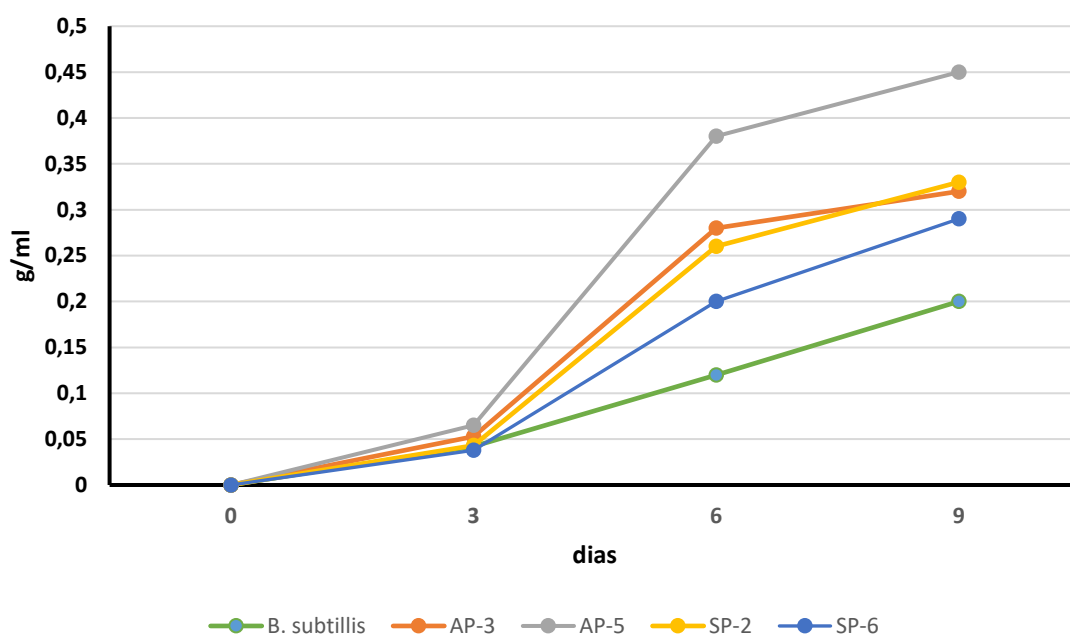


Figura 12. Curvas de biomasa de las cepas bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.

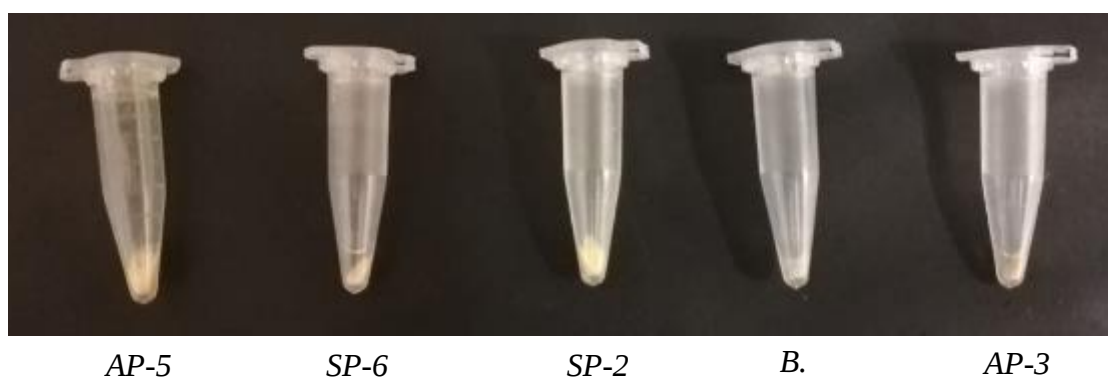


Figura 13. Biomasa de las cepas con capacidad degradadora de polietileno.

4.4 DISCUSIÓN

4.4.1 Purificación de las cepas con capacidad de degradación de polietileno.

Para la purificación y selección de cepas con capacidad de degradación de polietileno se realizaron inoculaciones de muestras provenientes de suelos y aguas contaminadas con plásticos para lo cual se utilizó un medio de cultivo mínimo con única fuente de carbono el polietileno. Esto coincide con lo identificado por Uribe (2010), quien expresa que

durante el proceso de biodegradación empleo el plástico como única fuente de carbono durante todo el periodo de incubación, aplicado desde la pre-selección de las cepas para realizar el aislamiento. Mientras que Johnson (1993) afirma que los organismos que crecen en materiales plásticos pueden utilizar la molécula plastificante (por ejemplo, el almidón o celulosa) o la molécula del polímero.

4.4.2 Tinción de Gram

De los 12 aislados bacterianos provenientes de muestras de agua y suelos con partículas de contaminación por desechos plásticos todas dieron positivo para Gram negativo. Esto coincide con el estudio de biodegradación de plástico efectuado por Cacciari (1998), en el que se determinó que todas las cepas bacterianas con capacidad degradadora corresponden a géneros de bacterias Gram negativo como: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*. Cabe resaltar que todos estos géneros aislados e identificados son bacterias, que generalmente se encuentran en el suelo desempeñando un papel clave en la transformación de compuestos para la liberación de minerales y la biorremediación de suelos contaminados con petróleo o sus derivados.

4.4.3 Determinación del pH

El porcentaje de hidrogeno registrado demuestra que las cepas con capacidad degradadora de residuos plásticos tienen un pH 8, difiriendo así con el resultado reportado por Uribe (2010), quién obtuvo una reducción de 5,4% del peso total de polietileno bajo la acción del consorcio conformado solo por bacterias (pH 7,0). En contraste Méndez *et al.*, (2007) reportó un valor de pH 8 (alcalino) en procesos de degradación de pequeñas fracciones o partículas de polietileno. Tal variación en el valor de pH es explicada por Milstein *et al.* (1992), quienes han demostrado que la biodegradación por la colonización bacteriana de polímeros es capaz de adherirse al sustrato a su capacidad de producir polímeros

exocelulares compuestos primariamente de polisacáridos aniónicos, donde la adhesión a la superficie de los sustratos es un paso decisivo en la corrosión microbiana.

4.4.4 Agrupamiento filogenético de de los aislados de bacterias con capacidad degradadora de polietileno mediante ERIC-PCR.

Mediante la caracterización molecular ERIC-PCR se encontró gran variabilidad genética entre las cepas aisladas lo que demuestra la presencia de consorcios bacterianos con capacidad para biodegradar polietileno. Este hecho ha sido demostrado por Azurin (2011), quién reportó la existencia de diversos grupos de bacterias con capacidad para biodegradar el polietileno, entre las más comunes se destacan los géneros: *Pseudomonas sp*, *Edwardsiella sp.* y *Alcaligenes sp*.

4.4.5 Determinación de la capacidad degradadora de polietileno mediante actividad metabólica.

La cepa AP-5 proveniente de muestras de agua contaminada con desechos plásticos obtuvo el mayor promedio de degradación reduciendo su peso en 2.8 g a los 9 días de inoculación. Tal afirmación coincide con el estudio de Tokiwa (2009), a través del cual se demuestra que la biodegradación del plástico es un proceso metabólico y enzimático realizado por microorganismos como bacterias y algunos hongos, los cuales secretan enzimas que se encargan de romper la estructura molecular del plástico reduciéndolo (degradándole) en su peso a través del tiempo.

Por su parte Sonil (2010) estableció que la biodegradación es la comparación entre el peso inicial y final del plástico antes y después de la incubación de este junto con los microorganismos en estudio en un tiempo dado.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

“Un sutil pensamiento erróneo puede dar lugar a una indagación fructífera que revela verdades de gran valor.”

Isaac Asimov

5.1 CONCLUSIONES

- La preselección de bacterias con capacidad degradadora de plásticos responden a la adaptación al medio de cultivo con el polietileno como fuente de carbono única.
- Todas las cepas seleccionadas con capacidad de biodegradación tienen valores de pH que oscilan entre 8 a 8.5 lo que corresponde a que estas bacterias se adaptan a medios alcalinos.
- Los aislados bacterianos obtenidos con capacidad degradadora de polietileno corresponden a un consorcio bacteriano debido a sus diferencias moleculares en base al perfil de amplificaciones encontradas mediante la caracterización molecular ERIC-PCR.
- La cepa AP-5 proveniente de muestras de agua contaminada con desechos plásticos obtuvo el mayor promedio de degradación reduciendo el peso de la muestra de polietileno en 2.8 g a los 9 días después de la inoculación.

5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar una caracterización molecular estudiando la sección 16s del ADN de las cepas bacterianas con capacidad degradadora de polietileno.
- Secuenciar el ADN de las muestras obtenidas de cada cepa, para su posterior identificación a nivel de género y especie.
- Realizar ensayos de biodegradación con las cepas encontradas a gran escala mediante biorreactores.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

“¿La ciencia ha prometido la felicidad? No lo creo. Ha prometido la verdad y la cuestión es saber si con la verdad se conseguirá algún día la felicidad.”

Emilé Zola

6.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAIP. (1991). *Los plásticos, materiales de nuestro tiempo*. Confederación española de Plásticos, España.
- Andrés, D., Antón, J., & Barrio, J. (2008). *Física y Química 4 ESO*. Madrid, España: Editex.
- Antón, J., & Andrés, D. (2016). *Física y Química 4º ESO (LOMCE)*. España: Editex.
- Atkins, P., & Jones, L. (2006). *Principios de química: los caminos del descubrimiento*. México, D.F.: Ed. Médica Panamericana.
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. (2003). *Biología: la vida en la tierra*. Barcelona, España: Pearson Educación.
- AZURIN, C. (2011). Biodegradación bacteriana de polietileno de baja densidad bajo condiciones controladas en biorreactores air lif. Tingo-María, Perú. Obtenido de <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/356/T.AMB-2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Banco Central del Ecuador. (2011). Obtenido de (<http://www.bce.fin.ec/>)
- Bastidas, J., & Cedeño, A. (2016). *Comparación de eficiencia entre Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas putida, y su masificación para la remediación de hidrocarburos totales de petróleo en los pasivos ambientales de AQ-Lab en Puerto Francisco de Orellana*. Riobamba, Ecuador: ESPOCH.

- Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & Miranda, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA - Publicación científica*, 82-90.
- Bustamante, T. (2007). *Detrás de la cortina de humo: dinámicas sociales y petróleo en el Ecuador*. Quito, Ecuador: Flacso-Sede Ecuador.
- Cacciari. (1998). Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotropic cultures of azospirillum sp. and Arthrobacter.
- Cuvi, N., & Bejarano, M. (2015). Los halos de inhibición en la remediación de suelos amazónicos contaminados con petróleo. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 1-35.
- DeLong, E. (2004). Microbial population genomics and ecology: the road ahead. *Environment Microbiology*, 6, 875.
- Dietz, A. G. (1973). "Plásticos para arquitectos y constructores".
- Díez, M. (2011). *Caracterización de la dispersión de contaminantes en la zona costera*. Barcelona, España: Universidad Politécnica de Cataluña.
- E., J. K. (1993). Degradation of degradable Starch-Polyethylene Plastics in compost Environment. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Echeverri, G., Manjarrez, G., & Cabrera, M. (2011). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Revistas NOVA*, 76-86.

- EPA. (2012). *Agencia de proteccion ambiental de los Estados Unidos*. Obtenido de <https://www.epa.gov/>
- FAO. (2010). *Guía para la descripción de suelos*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.
- FAO. (20 de Julio de 2013). *Estructura del suelo: definición e importancia del suelo*. Obtenido de ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO_training/FAO_training/general/x6706s/x6706s07.htm
- Jaramillo, B., Bermúdez, A., & Tirado, I. (2016). Bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados presentes en suelos contaminados. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 13-22.
- Jhoan, C. (1996). Polietileno. Estados Unidos. Obtenido de <http://pslc.ws/spanish/pe.htm>
- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis*. Madrid, España: Ed. Médica Panamericana.
- Labrador, J. (7 de Noviembre de 2016). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Obtenido de Manejo del Suelo: <http://www.fao.org/soils-portal/manejo-del-suelo/es/>
- Lluch, J. (2012). *Tecnología y margen de refino del petróleo*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.
- Maposita, M., Calle, W., Fiallos, C., & Burgos, F. (2011). *Caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos, de tipo Pseudomonas*

en el sector Río Bonanza, provincia de Pastaza. Guayaquil, Ecuador: ESPOL-CICYT.

Martinez, C. E. (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development. *Plant J.* , 209-217.

Méndez, C. Vergaray. G, Bejar. V, Cardenas. K. (Julio de 2007). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Peruana de Biología.*

Meza, M. F. (2010). BIODegradABILIDAD DE POLIETILENO TEREF TALATO. *Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida. Carrera de Biotecnología.*

Milstein O., Gersonde R., Hutterman A. Chem., M. H. & Meister J. J. (1992). Fungal Biodegradation of lignopolystyrene Graft Copolymers. *Applied and Environmental Microbiology.* 58: 3225- 3232.

Núñez, A., Carrera, E., Fernández, M., Bell, A., & Michelena, G. (2012). Selección de una cepa bacteriana y un medio de cultivo industrial para la producción de poli 3-hidroxibutirato. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 49-54.

Pérez, R., Camacho, M., Gómez, J., Ábalos, A., & Cantero, D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo . *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44-50.

Pinedo, J. (2005). *El petróleo en oro y negro*. México: LibrosEnRed.

- Pírez, M. (2006). *Morfología y estructura bacteriana*. Temas de bacteriología y virología médica.
- Ramírez, F. (15 de Abril de 2013). *Prezi.com*. Obtenido de La consistencia del suelo: <https://prezi.com/k703pbxlldzg/untitled-prezi/>
- Ruiz, A., & Molina, J. (2010). *Automatización y telecontrol de sistemas de riego*. Barcelona, España: Marcombo.
- Salgado, R., Pineda, G., Mesta, A., Díaz, F., & Wang, E. T. (2008). Degradación de n-alcanos por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. *Revista Ciencia y Tecnología*, 123-132.
- Saravia, B. (2010). *Capacidad de intercambio cationico*. Madrid, España: Academia.edu.
- Soler, M. (2003). *Evolución: la base de la biología*. Granada, España: Proyecto Sur de Ediciones.
- Sonil, S. (2010). "Biodegradability of polyethylene by *Brevibacillus*, *Pseudomonas* and *Rhodococcus* spp.". *University. Tamil Nadu*. Obtenido de (http://www.sciencepub.net/.../15_2435_ny0307_95_9)
- Tokiwa. (2009). "Biodegradability of Plastics". (N. I. Technology, Ed.)
- Torvisk, V., Ovreas, L., & Thingstad, T. (2003). Prokaryotic Diversity Magnitude, Dynamics and controlling Factors. *Science*, 296,1064.
- Uribe. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*.

- Uribe, D., Giraldo, D., & Merino, S. G. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*.
- Vargas, T., & Kuno, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización clínica*, 2594-2598.
- Veas, L. (2015). *Propuesta de uso alternativo del suelo a través de la determinación del índice de erosión potencial del cantón Quevedo aplicando sistemas de información geográfica*. Quevedo, Ecuador: UTEQ-FCAMB.
- Villamil, P. (15 de Septiembre de 2015). *SlideShare*. Obtenido de Propiedades de los suelos: <http://es.slideshare.net/ingpaolavillamil15/propiedades-de-los-suelos-52823595>
- Walters, A. (2007). *Contaminación por plásticos*. Obtenido de (<http://www.greenpeace.org/raw/content/espana/reports/contaminacion-por-plasticos-en.pdf>)

ANEXOS

Anexo 1. Certificado del reporte de similitud de Urkund

Anexo 1. Certificado del reporte de similitud de Urkund



Urkund Analysis Result

Analysed Document: final urkund.docx (D40831627)
Submitted: 8/15/2018 9:39:00 PM
Submitted By: hcanchignia@uteq.edu.ec
Significance: 6 %

Sources included in the report:

URKUn MAJO.docx (D40296480)
Proyecto final PETROLEO 14-05-2018 (REV.FAP) (2) URKUND.docx (D40462001)

Instances where selected sources appear:

8

URKUND

final urkund.docx (D40831627)

Anexo 2. Balanza analítica



Anexo 3. Mezclador orbital digital ELMI DOS-20L de 20 mm de amplitud con plataforma grande



Anexo 4. Erlenmeyer con el contenido de las muestras colocadas en el agitador orbital



Anexo 5. Refrigerador de muestras.



Anexo 6. Incubador de CO₂ Thermo Cientific



Anexo 7. Microscopio binocular



Anexo 8. Campana de laboratorio / de escape / de pie / de flujo laminar vertical

Anexo 9. Spectrafuge™ 24D
Microcentrífuga



Anexo 10. Mufla de laboratorio

