



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del Título de
Ingeniera en Gestión Ambiental

Proyecto de Investigación:

“BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO MEDIANTE EL USO DE
MICROORGANISMOS”

Autora:

Gissela Eloisa Vargas Cedeño

Director

PhD. Jaime Morante Carriel

Quevedo-Los Ríos- Ecuador

2020

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **VARGAS CEDEÑO GISSELA ELOISA** 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.

VARGAS CEDEÑO GISSELA ELOISA

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. Jaime Alfredo Morante Carriel, docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la Egresada Vargas Cedeño Gissela Eloisa, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniera en Gestión ambiental titulado “Biodegradación de polietileno mediante el uso de microorganismos”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

PhD. Jaime Morante Carriel

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO



Urkund Analysis Result

Analysed Document: PROYECTO INVESTIGACION GISSELA VARGAS.docx (D79014477)
Submitted: 9/12/2020 4:25:00 PM
Submitted By: jmorante@uteq.edu.ec
Significance: 4 %

Sources included in the report:

final urkund.docx (D40831627)
[https://www.researchgate.net/
publication/290433266_Alternaria_y_su_potencial_uso_en_degradacion_de_plasticos](https://www.researchgate.net/publication/290433266_Alternaria_y_su_potencial_uso_en_degradacion_de_plasticos)

Ing. Jaime Morante Carriel PhD

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL**

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“Biodegradación de polietileno mediante el uso de microorganismos”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera en Gestión Ambiental.

Aprobado por:

Blga. Yarelis Ferrer Sánchez

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Blgo. Juan Pablo Urdánigo
INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

Ing. Oscar Prieto Benavides
INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

**Quevedo - Los Ríos - Ecuador
2020**

AGRADECIMIENTO

De manera especial a mi tutor Dr. Jaime Morante por haberme guiado durante este proceso, quien con sus conocimientos, enseñanzas y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

De igual manera al Dr. Fabricio Canchignia, Ing Ángel Cedeño, Ing Antonio Mendoza, Ing Luis Vera y el Ing Víctor García por la paciencia, orientación y enseñanza de su valioso conocimiento en el desarrollo de esta investigación.

A María Fernanda, una gran amiga a quien estimo tanto y a quien le debo su apoyo incondicional, por facilitarme los caminos para seguir, sin pedir nada a cambio y sin dudar de mi capacidad.

DEDICATORIA

Principalmente a Dios por haberme dado la vida y permitirme llegar a este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres por su amor, trabajo y sacrificios en todos estos años, me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más siendo ustedes mi mayor inspiración.

A mis hermanos por su apoyo incondicional en todo este proceso.

A mi novio que en el transcurso de estos años estuvo motivándome a no decaer, por su apoyo incondicional.

A mis amigos con los que compartí dentro y fuera de las aulas. Aquellos amigos que se convierten en amigos de vida y aquellos que serán mis colegas, gracias por todo su apoyo y diversión.

RESUMEN EJECUTIVO

El polietileno es un polímero que causa grandes problemas ambientales a nivel mundial, debido a su composición a base de hidrocarburos le brinda propiedades únicas de durabilidad en la naturaleza lo que impide que la misma lo degrade, de este modo se vuelve un agente toxico en el ecosistema; los microorganismo ofrecen una solución viable en la descomposición del polietileno lo que nos lleva a la búsqueda de conocer que mecanismos utilizan para lograr dicho fin por lo que se vuelve una alternativa viable para degradar dicho polímero.

Para el presente trabajo se escogió diferentes cepas del laboratorio de biología molecular y microbiología de la UTEQ;. Se realizaron pruebas bioquímicas (degradación de urea, fósforo y potasio), se midió la absorbancia, biomasa, UFC, pH, degradación de polietileno y se correlacionó la absorbancia con las UFC. Entre los resultados, la mayor absorbancia tuvo la cepa VI8 a los 0.21 a los 10 días, la cepa bacteriana que generó mayor biomasa celular fue RR4 generó promedios de 0.06 gr/ml a los 10 días, el contenido celular de las bacterias en el VI8 alcanzó promedios de 2.1×10^6 , el Potencial de Hidrogeno en la cepa PN7 se mantuvo un pH de 7.2 a 6.6 durante los 30 días, en la degradación de polietileno, la cepa con mayor degradación de polietileno a 300 mg fue la cepa VI8 redujo de 32 y 38 mg a los 15 y 30 días respectivamente. Se concluyó que la velocidad en la degradación depende de múltiples factores bioquímicos como la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos que desdoblan las moléculas del plástico en fracciones más sencillas que pueden ser asimiladas por otro tipo de microorganismos.

Palabras clave: Contaminación, O.D. Preservación, Ureasa, Fosfatasa

ABSTRAC

Polyethylene is a polymer that causes global environmental problems through degradation and deterioration that leads to its accumulation in the environment and, therefore, creates serious environmental problems. An attempt has been made to cover the biodegradation mechanism, the various bacterial and fungal organisms that have been reported for them, the methods adopted for the studies and the different characterization techniques followed to measure the degree of degradation. Different strains from the UTEQ molecular biology and microbiology laboratory were chosen for the respective work. Biochemical tests were performed (degradation of urea, phosphorus and potassium), absorbance, biomass, CFU, pH, polyethylene degradation were measured and absorbance was correlated with CFU. Among the results, the VI8 strain had the highest absorbance at 0.21 at 10 days, the bacterial strain that generated the highest cell biomass was RR4, which generated averages of 0.06 gr / ml at 10 days, the cell content of bacteria in VI8 reach averages of 2.1×10^6 , the Hydrogen Potential in the PN7 strain was maintained at a pH of 7.2 to 6.6 during the 30 days, in the degradation of polyethylene, the strain with the greatest degradation of polyethylene at 300 mg was the strain VI8 reduced 32 and 38 mg at 15 and 30 days respectively. It was concluded that the rate of degradation depends on multiple biochemical factors such as the production of organic and inorganic acids that break down the plastic molecules into simpler fractions that can be assimilated by other types of microorganisms.

Keywords: Contamination, D.O. Preservation, Urease, Phosphatase

TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO.....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE PLAGIO ACADÉMICO.....	iv
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN EJECUTIVO.....	viii
ABSTRAC	ix
TABLA DE CONTENIDO.....	1
CÓDIGO DUBLÍN.....	5
INTRODUCCIÒN.....	6
 CAPÍTULO I CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	7
1. Problema de la investigación	6
1.1. Planteamiento del problema	6
1.1.1. Diagnostico.....	7
1.1.2. Pronostico.....	7
1.1.3. Formulación del problema	7
1.1.4. Sistematización del Problema.....	7
1.2. Objetivos	8
1.2.1. Objetivo general	8
1.2.2. Objetivos específicos	8
1.3. Justificación.....	9
 CAPÍTULO II FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	21
2.1. Marco Conceptual.....	11
2.1.1. El plástico	11
2.1.2. Los residuos plásticos	11
2.1.3. Tipos de platicos	11
2.1.3.1. Termoplásticos.....	11
2.3.1.2. Termoestables	11
2.3.1.3. Elastómeros	12
2.1.4.1. Historia	12

2.1.4.1.2. Propiedades	12
2.1.4.1.3. Tipos de polietileno	12
2.1.5. Aplicaciones de los plásticos sintéticos	13
2.1.6. Contaminación e impacto ambiental de los plásticos	14
2.1.8. Microorganismos del Suelo	15
2.1.9. Degradación de hidrocarburos	15
2.2. Marco referencial	19
2.2.1. Biodegradación de polietileno.	19
2.2.2. Biodegradación bacteriana de polietileno.	19
2.2.3. Biodegradación de polietileno de tereftalato	19
2.3. Fundamentación legal	20
2.3.1. Constitución Política del Ecuador (2008)	20
2.3.2. Ley de Gestión Ambiental (2004)	20
2.3.4. Reforma del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria (2015) ..	22
 CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	11
3.1. Localización del área de estudio	26
3.2. Tipo de investigación	26
3.2.1. Experimental	26
3.3. Método de investigación	26
3.4. Fuentes de recopilación de información	27
3.4.1. Fuentes primarias	27
3.4.2. Fuentes secundarias	27
3.5. Materiales y equipos	27
3.5.1. Materiales de laboratorio	27
3.5.2. Material de oficina	27
3.5.3. Equipos de laboratorio	28
3.7. Diseño de la investigación	28
3.7.1. Diseño para evaluar el comportamiento de los microorganismos	28
3.7.2. Diseño para evaluar la Biodegradación de polietileno	29
3.7.3. Diseño para evaluar las UFC y pH	29
3.8. Manejo del experimento	29
3.8.1. Pruebas bioquímicas	30
3.8.1.1. Inducción a la producción de enzima ureasa por parte de las PGPRs	30
3.8.1.2. Solubilización de potasio en las PGPRs en estudio	30

3.8.1.3. Solubilización de fosfato en las PGPRs en estudio.....	31
3.8.2. Degradación del polietileno.....	31
3.8.2.1. Comportamiento de los microorganismos.....	31
3.8.3. Biodegradación de polietileno	32
3.8.4. Determinación del peso seco de polietileno residual y masa bacteriana	32
3.8.5. Unidades formadoras de colonia y potencial de hidrógeno	33
 CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1. El comportamiento de los microorganismos frente al polietileno	35
4.1.1. Absorbancia.....	35
4.1.2. Biomasa	35
4.2. El microorganismo con capacidad de biodegradación de polietileno.....	36
4.2.1. UFC.....	36
4.2.2. Correlación entre UFC/Absorbancia.....	37
4.2.3. Unidad formadoras de colonias (UFC) y potencial de hidrogeno (pH).....	37
4.3. La capacidad y rapidez de biodegradación de polietileno	39
4.3.1. Degradación del polietileno.....	39
4.4. Discusión	41
 CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
5.1. Conclusiones.....	41
5.2. Recomendaciones	41
 CAPITULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42
6.1. Bibliografía.....	48
 CAPITULO VII ANEXO	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Código Dublín.....	5
Tabla 2: Esquema del Análisis de Varianza	28
Tabla 3: Esquema del Análisis de Varianza	29
Tabla 4: Esquema del Análisis de Varianza	29
Tabla 5: Esquema del Análisis de Varianza	30
Tabla 6. Pruebas bioquímicas	39

INDICE DE GRAFICOS

Grafico 1. Absorbancia de las diferentes cepas de bacterias	35
Grafico 2. Peso de la biomasa bacteriana sometida a polietileno..	36
Grafico 3. Concentración celular a los 10 días de crecimiento.....	36
Grafico 4. Correlación de las UFC y absorbancia.....	37
Grafico 5. Correlación de las UFC y absorbancia de las cepas sometidas a polietileno.	38
Grafico 6. Degradación del polietileno de las cepas en estudio.....	40

CÓDIGO DUBLÍN

Título:	“Biodegradación de polietileno mediante el uso de microorganismos”
Autor:	Gissela Eloisa Vargas Cedeño
Palabras clave:	Contaminación, O.D. Preservación, Ureasa, Fosfatasa
Fecha de publicación:	
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2020
Resumen: (hasta 300 palabras)	El polietileno es un polímero que causa grandes problemas ambientales a nivel mundial, debido a su composición a base de hidrocarburos le brinda propiedades únicas de durabilidad en la naturaleza lo que impide que la misma lo degrade, de este modo se vuelve un agente toxico en el ecosistema; los microorganismo ofrecen una solución viable en la descomposición del polietileno lo que nos lleva a la búsqueda de conocer que mecanismos utilizan para lograr dicho fin por lo que se vuelve una alternativa viable para degradar dicho polímero. Para el presente trabajo se escogió diferentes cepas del laboratorio de biología molecular y microbiología de la UTEQ;. Se realizaron pruebas bioquímicas (degradación de urea, fósforo y potasio), se midió la absorbancia, biomasa, UFC, pH, degradación de polietileno y se correlacionó la absorbancia con las UFC. Entre los resultados, la mayor absorbancia tuvo la cepa VI8 a los 0.21 a los 10 días, la cepa bacteriana que generó mayor biomasa celular fue RR4 generó promedios de 0.06 gr/ml a los 10 días, el contenido celular de las bacterias en el VI8 alcanzó promedios de 2.1×10^6, el Potencial de Hidrogeno en la cepa PN7 se mantuvo un pH de 7.2 a 6.6 durante los 30 días, en la degradación de polietileno, la cepa con mayor degradación de polietileno a 300 mg fue la cepa VI8 redujo de 32 y 38 mg a los 15 y 30 días respectivamente. Se concluyó que la velocidad en la degradación depende de múltiples factores bioquímicos como la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos que desdoblan las moléculas del plástico en fracciones más sencillas que pueden ser asimiladas por otro tipo de microorganismos. .
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162
URI:	

Tabla 1. Código Dublín

INTRODUCCIÓN

El polietileno es una constitución de polímeros que posee una alta dificultad de degradación puesto que sus componentes principales son el petróleo y la adición de otros elementos tóxicos dándole así la característica especial de volverlos de difícil degradación por la acción de microorganismos que se encuentran en el suelo, lo que los vuelve elementos tóxicos presentes en la naturaleza por tiempo indefinido afectando así de forma directa e indirecta la salud de todos los seres vivos alterando la estabilidad frágil de los ecosistemas del planeta (Siracusa, 2019).

Muchas industrias a nivel mundial fabrican enormes cantidades de productos plásticos elaborados a base de polietileno con la finalidad de satisfacer las necesidades humanas pero todo ello lleva a generar contaminación ya que son elementos que la naturaleza por sí sola le toman muchos años degradarlos y convertirlos en elementos inofensivos convirtiéndose así en problema ambiental a nivel mundial, todo esto lleva a plantearnos la forma de vida que como sociedad estamos llevando y a su vez buscar nuevas alternativas de solución para reducir el daño que le ocasionamos al planeta (Mohanty *et al.*, 2018).

La biodegradación como proceso natural propiciado por los microorganismos busca descomponer diversos materiales en dióxido de carbono, metano, agua o sustancias orgánicas mediante la acción enzimática producida por organismos microscópicos o por la asimilación de dichas sustancias a su dieta nutritiva (Yang *et al.*, 2017).

Investigaciones realizadas en bacterias, actinomicetos y hongos muestran la capacidad que estos poseen para lograr una biodegradación de manera efectiva de polietileno o plásticos, así también pueden determinar condiciones favorables para la realización de la biodegradación por el medio ambiente natural; *Brevibacillus sp.* *Pseudomona sp.* *Rhodococcus sp* y *Penicillium* son algunos de los géneros bacterianos que poseen esta habilidad para degradar y descomponer el polietileno. Es de mucha importancia brindarle un espacio importante en las investigaciones el poder de biodegradación que poseen los microorganismos y su uso de estos para remediar problemas ambientales generados por la mano del hombre (Qi *et al.*, 2017).

CAPÍTULO I
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1. Problema de la investigación

1.1. Planteamiento del problema

La acumulación de los desechos plásticos es uno de los principales problemas ambientales con gran impacto a nivel mundial en la actualidad, el polietileno tiende acumularse durante una fase de tiempo, dejando una huella indeseable ya que no son depositados correctamente provocando contaminación de agua y suelo. La producción de polietileno sigue creciendo debido a la gran demanda que proporciona la humanidad.

El polietileno (PE) es semejante que todos los demás plásticos tienen una existencia de alrededor de 1000 años y debido a que su rapidez de degradación o porcentaje de reciclaje es mucho menor que su producción.

La producción mundial ha pasado de 2,3 millones de toneladas en 1950 a 407 millones en 2015 (ONU Medio Ambiente, 2018) se estima que todo el plástico que el ser humano ha producido durante estos 150 años en todo el mundo, el 79%, está acumulado en vertederos o en entornos naturales. El mismo refleja que actualmente el 57% del plástico producido mundialmente acaba abandonado (ONU Medio Ambiente, 2018).

Desde 1950 la población en el Ecuador, ha incrementado su tamaño en más de 4 veces. Para el 2020, el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) presento que en el país se registraran 17.510.643 habitantes. Este crecimiento poblacional conlleva al aumento de generación de polietileno, forma un problema ambiental ya que son derivados del petróleo, que se convierte en un alto contaminante, ser manipulado constantemente está ayudando extinguir un recurso no renovable de nuestro planeta.

El uso de los diversos microorganismos que habitan en el suelo los cuales poseen capacidad de biodegradar los diversos elementos tóxicos en la naturaleza tal es el caso del polietileno que puede ser degradado por bacterias debido a que estas descomponen las moléculas complejas que la forman en sustancias orgánicas más asimilables dentro de la naturaleza, este proceso se puede dar por la producción enzimática o por la asimilación nutricional requerida para el microorganismo se vuelve una alternativa de solución para reducir el impacto que ocasiona el polietileno en el ambiente.

1.1.1. Diagnostico

La contaminación por polietileno causa daños irremediables, demora 500 años para degradarse siendo esto un producto que afecta al medio ambiente debido a la falta de concientización de los habitantes respecto a esta problemática.

El polietileno es el polímero sintético que más se utiliza en la vida diaria del ser humano ya que con este se elabora las bolsas plásticas de almacén, frascos de champú, juguetes e incluso chalecos a prueba de bala, su producción anual es de aproximadamente ochenta millones de toneladas métricas, así mismo los compuestos de este material se basa en hidrocarburos derivados del petróleo sustancia muy toxica para el medio ambiente, agregando a esto los productos fabricados a base de polietileno son difíciles de ser degradados por acción de la naturaleza ocasionando un desequilibrio en los ecosistemas y la salud de los organismos vivos.

1.1.2. Pronostico

El inadecuado control de la generación de polietileno contribuye a la preocupación de la contaminación de suelo y agua. Consecuencias que amenazas con la pérdida de biodiversidad y daños a la salud. Si no se realiza estudio relacionado con la biodegradación de polietileno no se obtendrá mejoramiento de alternativa y práctica de la biodegradación de polietileno para la conservación del medio ambiente.

1.1.3. Formulación del problema

¿De qué manera la biodegradación de polietileno ayudará a reducir la contaminación ocasionados por el consumo inadecuado?

1.1.4. Sistematización del Problema

Esta investigación contribuirá a evaluar la biodegradación de polietileno mediante el uso de microorganismo, en donde se tomó como punto de partida las siguientes preguntas:

- ¿Cuáles son los comportamientos de los microorganismos frente al polietileno?
- ¿Cuáles son los microorganismos con capacidad de biodegradación de polietileno?
- ¿Cómo serán las capacidades y rapidez en la biodegradación de polietileno con los microorganismos específicos seleccionados?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la biodegradación de polietileno mediante el uso de microorganismos.

1.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar el comportamiento de los microorganismos frente al polietileno.
- Seleccionar microorganismos con capacidad de biodegradación de polietileno.
- Determinar la capacidad y rapidez de biodegradación de polietileno con los microorganismos específicos seleccionados.

1.3. Justificación

El Ecuador adquiere grandes porcentajes de polietileno elaborado (platos, vasos, espumaflex) y su adquisición incrementa progresivamente debido a sus características físicas y su bajo costo, razones por las cuales han llegado a ser predominante en el mercado. Sin embargo, la generación de residuos polietileno ocasionan problemas ambientales en las zonas urbanas y rurales. Los residuos del polietileno son persistentes en el ambiente y su baja degradación por efectos físico-químicos ejerce una preocupación por los efectos negativos en la salud de los seres vivos.

En este contexto se busca posibles estrategias que puedan estar en el alcance de la sociedad, para mejorar la calidad de vida de los seres humanos y del medio ambiente incluyendo un equilibrio entre lo social, económico y ambiental. El uso de microorganismos es una medida eficiente para reducir la contaminación causada por el polietileno, porque accionan de componentes enzimáticos que liberan para desdoblar los polímeros y tomar como fuente de alimentación para su desarrollo.

La investigación que se llevó a cabo investiga muestra de material plástico, la indagación busca microorganismos con capacidad biodegradativa sobre el polietileno de baja densidad para minimizar los impactos ambientales que conlleva la utilización de plásticos, mal manejo y el inadecuado tratamiento de ellos.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA
INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Conceptual

2.1.1. El plástico

El termino plástico hace referencia a diversos materiales sintéticos que son obtenidos por el proceso de la polimerización o multiplicación artificial de los átomos de carbono en cadenas de componentes orgánicos; son derivados de hidrocarburos pero también se puede lograr obtener de sustancias naturales presentes en el medio ambiente; el plástico posee diversas propiedades tales como la facilidad que tienen para ser moldeados, la impermeabilidad, baja densidad y conductividad eléctrica entre otras lo que lo vuelve un elemento muy codiciado para ser utilizado en las diversas industrias; las cualidades que para la industria son buenas pero para el medio ambiente los plásticos pueden tener inconvenientes para el manejo de residuos sólidos que se genera pues estos son capaces de incorporarse al ambiente natural generando diversos daños ecológicos (Segura *et al.*, 2007).

2.1.2. Los residuos plásticos

Los residuos plásticos son desechos provenientes de elementos elaborados a partir de polietileno tales como envases descartables, contenedores de bebidas, fundas plásticas, entre otras; se cree que el uso de productos plásticos crece en un 4% cada año ya que su alta demanda en la diversas industrias dedicadas a la fabricación de elementos antes mencionados; la producción de plástico en 1978 fue de 10 toneladas métricas y esto se elevó a 60 Tm para el año 2000 de esto el 50% es de Estados Unidos y lo restante se va para Japón, Europa y américa latina (Arandes *et al.*, 2004).

2.1.3. Tipos de platicos

Los plásticos son obtenidos de los derivados del petróleo, también se pueden obtener a partir del carbón con cal el cual da como resultado el carburo de calcio, adicionalmente se pueden encontrar como fuente natural en desechos orgánicos; dependiendo de su actuación frente a las diversas temperaturas los plásticos se logran clasificar como: termoplásticos, son aquellos que con la aplicación de calor se funden y pueden volverse a moldear para obtener un producto diferente al que era inicialmente; los termofijos, son plásticos que no se pueden moldear una vez obtenido una forma principal ya que si se aplica calor se degrada o carboniza lo que reduce o elimina toda posibilidad de ser reutilizado; los elastómeros a

diferencia del resto presenta una gran elasticidad que le permite regresar a su forma original después de ser sometida a fuerzas que deforman su estado (Madrigal y Ranganath, 2011).

2.1.4. Polietileno (PE)

2.1.4.1. Historia

El polietileno se desarrolló gracias al trabajo de varios científicos europeos, el polímero fue descrito por primera vez en la década de los 20 por un químico alemán Herman Staudinger el cual por ese trabajo recibió el premio nobel en 1953. Otras investigaciones otorgan el descubrimiento y fabricación al científico Hans Von Pechman quien en colaboración con Eugen Baumberger y Frederich Tschirner adquirieron y caracterizaron el polímero accidentalmente en 1898 mientras trabajaban en la elaboración de otro compuesto. sin embargo fue recién en 1933 que los científicos británicos Eric Fawcett y Reginald Gibson realizaron la fabricación de manera industrial en ICI Chemicals en Inglaterra. (Cardona *et al.*, 2010).

2.1.4.1.2. Propiedades

El polietileno posee una combinación de diversas propiedades tales como la tenacidad, alta resistencia al impacto, alta flexibilidad, buena procesabilidad, estabilidad y propiedades eléctricas notables pero aunque sea resistente al agua y a algunas soluciones acuosas, incluso a altas temperaturas, es atacado lentamente por agentes oxidantes. Además, alifáticos, aromáticos y clorados, provocan hinchazón a temperatura ambiente, es poco soluble en disolventes polares como alcoholes, ésteres y cetonas. La permeabilidad al agua de es baja cuando en comparación con otros polímeros. La permeabilidad ha compuestos orgánicos polares como alcohol o ésteres mucho más bajo que los compuestos orgánicos no polar como el heptano o el éter dietílico (Coutinho *et al.*, 2003).

2.1.4.1.3. Tipos de polietileno

Según se distinguen dos tipos de polietilenos: de baja densidad ($0,92 - 0,93 \text{ g/cm}^3$) y el de alta densidad ($0,94 - 0,97 \text{ g/cm}^3$), también se produce el lineal de baja densidad.

El de baja densidad es un polímero ramificado, es decir: a la cadena principal se le “pegan” lateralmente trozos de polietileno, lo que lo hace menos compacto. La polimerización se hace en masa y vía radicales libres y a alta presión. El material resultante es un sólido ligeramente flexible, dependiendo de su grosor, ligero de peso y buen aislante eléctrico. Presenta, además, una gran resistencia mecánica y química. Dado su bajo coste se utiliza mucho como papel de envolver, bolsas plásticas, envasado, revestimiento de cables eléctricos, fabricación de tuberías y en la producción de materiales inyección por moldeo. A partir del polietileno de baja densidad se prepara el polietileno reticulado (resultante de la formación de enlaces entre cadenas de polímero), rígido y resistente a la tracción y al cambio de temperaturas, su mayor uso es en la protección y aislamiento de líneas eléctricas de baja y media tensión.

La polimerización del polietileno de alta densidad se lleva a cabo a baja presión y utilizando catalizadores en suspensión. El polímero obtenido es altamente cristalino, de cadena lineal y muy poco ramificada. Su resistencia térmica y química, su dureza, opacidad e impermeabilidad es muy superior a la del polietileno de baja densidad; solo que es menos resistente al agrietamiento y al impacto. Su uso común es en envases contenedores de gases, líquidos, combustibles, como materiales prostéticos y en la industria de la construcción.

El polietileno lineal de baja densidad se obtiene mediante la reacción química del etileno con otro alqueno (reacción de copolimerización), generalmente el 1-butenio, a baja presión, en disolución, suspensión o fase gaseosa y en presencia de catalizadores. El resultado es un polímero altamente lineal con ramificaciones cortas, lo que lo convierte en un polímero resistente a la tracción, con alto punto de fusión y resistente al agrietamiento, mucho más que en el polímero del polietileno de baja densidad. Se aplican fundamentalmente en el revestimiento de cables y en la fabricación de objetos de moldeo por extrusión o soplado en la fabricación de bolsas

2.1.5. Aplicaciones de los plásticos sintéticos

Los plásticos tienen cada vez más aplicaciones en los sectores industriales y de consumo, debido a sus bajos costos y propiedades, se caracterizan por ser versátiles, duraderos, seguros, ligeros y tienen buena relación costo/beneficio. De esta forma los plásticos están

presentes en todos los ámbitos de la sociedad y son fundamentales en sectores como la agricultura, la industria, alimentos, la medicina y las telecomunicaciones. A continuación se describen las aplicaciones más comunes de los diferentes tipos de plásticos de acuerdo a las propiedades físico-Químicas descritas anteriormente (Montoya y Roncancio, 2016).

2.1.6. Contaminación e impacto ambiental de los plásticos

Las ventajas del plástico en cuanto a su resistencia a los procesos de degradación físicos y químicos se convierten en un problema cuando el producto pierde su valor de uso. Así, el residuo persiste en el ambiente, impactando visualmente, como así también agrediendo a los ecosistemas (al no existir estos materiales en la naturaleza, los seres vivos no han desarrollado defensas ante ellos). Una vez cumplida su vida útil del plástico surge la cuestión sobre qué hacer con los mismos. Estos problemas no son resueltos de inmediato, y se van acumulando en algún lugar, el destino de los mismos son mayoritariamente tres:

- Se queman.
- Se entierran.
- Se arrojan a la vera de algún camino.

En el primer caso, el quemado del plástico en forma no controlada contamina el aire y puede deteriorar la salud. Así, el humo de esos plásticos esparce por el aire las dioxinas, elementos químicos cancerígenos. El enterrado de los plásticos afecta las características físicas del suelo, ya que los mismos tardan cientos de años en degradarse e incorporarse en la tierra. Mientras que la degradación de productos orgánicos tarda 3 ó 4 semanas, la de telas de algodón 5 meses, la del plástico puede tardar 500 años. El arrojado a la vera de un camino no sólo provoca un impacto visual negativo. La pseudo degradación de estos plásticos en realidad genera plásticos más pequeños que, en forma menos evidente, se dispersan y acumulan en diversos ecosistemas. Por caso, la presencia de plásticos en los mares es más que un problema estético, ya que representa un peligro para los organismos marinos, que sufren daños y hasta muerte por ingestión y atragantamiento (García, 2011).

2.1.7. Biorremediación

Es el proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, presenta un

enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental. La biorremediación se ha centrado en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica que caracteriza a las bacterias para transformar contaminantes en productos inocuos o, en su defecto, menos tóxicos, que pueden entonces integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales. No obstante, existen casos aislados de utilización de otros tipos de organismos como, por ejemplo, los hongos y, más recientemente, las plantas (la llamada "fitorremediación" es un campo altamente prometedor) (Garbisu *et al.*, 2002).

2.1.8. Microorganismos del Suelo

El suelo es un recurso viviente y dinámico que condiciona la producción de alimentos. Su calidad tiene un papel fundamental en el mantenimiento del balance entre producción y consumo de dióxido de carbono en la biosfera. El suelo no sólo es la base para la agricultura, sino que de él depende toda la vida del planeta. La mayor parte de las etapas de los ciclos biogeoquímicos tienen lugar en él (9). La actividad microbiana del suelo (o edáfica) da cuenta de las reacciones bioquímicas que se suceden dentro de este complejo y heterogéneo sistema. La Hiperdensidad e hiperdiversidad son los dos aspectos fundamentales que caracterizan a las comunidades microbianas del suelo. La cantidad de microorganismos en un gramo de suelo puede variar entre 10^7 y 10^9 células, mientras que algunas estimaciones indican la posibilidad de que haya al menos 104 especies microbianas distintas por gramo de suelo. La biodiversidad es una propiedad que condiciona la capacidad de recuperación del sistema edáfico ante una alteración y que le asegura su estabilidad funcional (García, 2011).

2.1.9. Degradación de hidrocarburos

La mayoría de los suelos contaminados con hidrocarburos, contienen microorganismos capaces de degradarlos. Sin embargo, el crecimiento de dichos microorganismos está limitado en el ambiente natural por diversos factores, tales como la baja solubilidad en agua de los HPA, su baja biodisponibilidad, la limitación de algunos nutrientes, especialmente nitrógeno (N), la presencia de otros contaminantes que pueden inhibir la degradación de los HPA (por ejemplo el pentaclorofenol) y otros diversos. Por lo anterior, se han utilizado dos estrategias para contrarrestar dichas limitaciones y fomentar la actividad degradadora de la flora microbiana nativa:

a) la bioestimulación (adición de nutrientes o compuestos estimuladores de la degradación)

b) la bioaumentación (adición de cepas microbianas con atributos especiales para degradar los contaminantes) (Holguin *et al.*, 2007).

Según la investigación de (Torres, 2003) demostraron la eficiencia de bacterias del género *Pseudomonas* en la degradación del ácido 3-Phenoxybenzoico en suelos. Este experimento sirvió también para evaluar el papel biodegradativo de dos *Pseudomonas* que habían sido manipuladas genéticamente. Las bacterias resultaron ser efectivas en todos los casos; sin embargo, las bacterias modificadas genéticamente tuvieron una mayor capacidad para sobrevivir a factores ambientales adversos. Este resultado es alentador, dado que uno de los factores que muchas veces impide la biorremediación de suelos in situ son las condiciones ambientales desfavorables para el crecimiento bacteriano. Otra especie de bacteria que ha sido usada para la degradación de hidrocarburos es *Sphingomonas wittichii* RW1, la cual en condiciones anaeróbicas es capaz de transformar el 2,7 diclorobenceno, produciendo el metabolito 4 clorocatenol y el 1,2,3,4 tetraclorodibenceno. Los hongos también han sido evaluados para la degradación de hidrocarburos, el papel del hongo *Cladophialophora sp.* sobre la degradación de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno. El hongo no fue capaz de degradar el benceno, pero degradó los compuestos alcalinizados (tolueno, etilbenceno y xileno). El mecanismo de degradación fue una combinación de asimilación y cometabolismo. El tolueno y el etilbenceno fueron usados como fuente de carbono y energía. En el proceso degradativo actúa la enzima monooxigenasa la cual se encargó de la degradación del tolueno, etilbenceno y el xileno.

2.1.10. Mecanismos de degradación del plástico

En la degradación de los plásticos, y en particular del polietileno, intervienen tres tipos de mecanismos: degradación química, fotodegradación y biodegradación. La degradación química ocurre cuando los prooxidantes catalizan la formación de radicales libres, los cuales reaccionan con las moléculas de oxígeno para atacar a la matriz del plástico, siendo el proceso acelerado por el calor y el oxígeno. La fotodegradación también se produce dentro de la matriz del plástico, donde la luz UV cataliza la autooxidación y la generación de radicales libres. En la degradación biológica o biodegradación intervienen diferentes microorganismos, entre los que existe una gran diversidad catabólica, que son capaces de degradar, transformar o acumular, de forma natural, un amplio rango de compuestos: desde

ligninas, almidón, celulosa y hemicelulosa, hasta hidrocarburos, fármacos y metales. Estos microorganismos, además, pueden asociarse para formar consorcios que degradan los compuestos poliméricos por cometabolismo; dependiendo del tipo de proceso se generan diferentes productos finales. Así, en el caso de un ambiente aeróbico, sólo se registran como productos finales la formación de agua, CO₂ y masa microbiana, mientras que en condiciones anaeróbicas se registran, además de los productos señalados, otros como metano y ácido sulfhídrico, como resultado de metabolismos metanogénicos y sulfidogénicos (Martin, 2017).

2.1.11. Bacterias degradadoras de Polietileno

De acuerdo al trabajo de investigación de (Vertus , Ruiz, Henriquez, & Ortiz, 2017) habla que los microorganismos *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodoturula*, *Bacillus*, *Aspergillus niger*, *Sphingomons sp.*, entre otros, han sido utilizados y aislados para estudios por su acción biodegradante. El papel de los microorganismos es muy importante para la degradación del polietileno, como ya ha mencionado, existen muchas bacterias que hacen de la biodegradación microbiana. estudios revelan que el suelo de manglar es rico en microorganismos capaces de degradar polietileno y plásticos. Esto se puede deber a factores como la temperatura, humedad, etc. siendo la *Rhizopora* de los géneros más abundantes encontrados en los manglares panameños.

Pseudomonas

Las *Pseudomonas* han sido identificadas como el género con mayor eficiencia de degradación. Esto se puede deber a que es uno de los géneros más proclives a la degradación de compuestos orgánicos, especialmente las cepas de la especie *Pseudomonas putida*. Este género es capaz de procesar, integrar y reaccionar a una amplia de variedad de condiciones cambiantes en el medio ambiente y muestra una alta capacidad de reacción a señales físico-químicas y biológicas. Otra de las ventajas de este género, es que son capaces de crecer en medios simples. Las condiciones ideales que se han demostrado que son más viables para el crecimiento de las *Pseudomonas putida* es en temperaturas de 22°C a 37°C, pH 6.4. Las *Pseudomonas putida* son la especie más eficiente, esto se puede deber a la habilidad de estas de secretar enzimas como catalasa, proteasa, gelatinasa, celulasa y pectinasa. Entre las

ventajas de su uso, se encuentra que presenta la capacidad de ser manejable desde el punto de vista genético.

Streptomyces sp.

Según el análisis de resultados, esta bacteria fue capaz de reducir el peso en un máximo de 46.07% realizando un pre-tratamiento por 6 meses de exposición a rayos UV y alteración de la glucosa al polímero. El crecimiento óptimo se dio a un pH $5.16 \pm 0.11/0.06$.

Brevibacillus borstelensis

Esta una bacteria termófila (organismo que soporta temperaturas extremadamente altas, por encima de los 45°C) se ha demostrado que reduce el PE en un 30% en 30 días a 50°C bajo las condiciones adecuadas. Con un pre-tratamiento de radiación UV se aumenta la biodegradación máxima del polímero.

Staphylococcus sp.

La temperatura de crecimiento de la bacteria se dio de 25°C - 30°C. Según el análisis se determinó una biodegradación de 2.19% a 20.54% para polietileno y de 0.56% a 8.16% en otros plásticos en 6 meses.

Bacillus cerus

Los resultados de una investigación de biodegradación con esta bacteria demostraron que con un pre-tratamiento que incluye exposición del polietileno a radiación UV y tratamiento térmico por 10 días, el polímero es modificado químicamente, aumentando el crecimiento de la bacteria en un 61%. El crecimiento óptimo se dio en pH 7 ± 0.2 , a una temperatura de entre 21°C a 37°C. Se demostró que la bacteria es capaz de degradar el polímero en un 14%.

Rhodococcus ruber

Rhodococcus ruber C208, fue aislada de la superficie de un polietileno procedente de un relleno sanitario según los análisis de las muestras, en 4 semanas se observó 33% de la reducción del polímero.

Serratia marcescens

En base a estudios realizados con esta bacteria se detectó una degradación de 22.22% del polietileno por mes, haciéndose la prueba con un pH 4, temperatura ambiente y agitación regular.

2.2. Marco referencial

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

(Uribe *et al.*, 2010) realizó el aislamiento de microorganismos procedentes de materiales plásticos con signos de deterioro, este material provino de un relleno sanitario de Lima; para analizar la actividad degradadora de los microorganismos tomaron muestras que fueron filtradas y posteriormente aislaron 6 cepas de bacterias *Pseudomonas* sp. MP3a y MP3b, *Penicillium* sp. MP3a, *Rhodotorula* sp. MP3b, *Hyalodendron* sp. MP3c. todos los aislados microbianos lograron evidenciar una acción degradativa del polietileno esto fue determinado por el espectro infrarrojo del polietileno.

2.2.2. Biodegradación bacteriana de polietileno y propuesta de aplicación para Cerro Patacón.

(Vertus *et al.*, 2017); analizó el potencial de biodegradación en bacterias como *Pseudomonas*, *Streptomyces* sp., *Brevibacillus borstelensis*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, *Rhodococcus ruber*, etc, su eficiencia, así como las condiciones aptas para su crecimiento. A partir de esta información se planteó una metodología para la biodegradación del polietileno en Panamá, específicamente en relleno sanitario de Cerro Patacón (Vertus *et al.*, 2017).

2.2.3. Biodegradación de polietileno de tereftalato por microorganismos aislados de sitios de disposición final de residuos sólidos, Táchira, Venezuela.

Los problemas de contaminación ambiental relacionados con la acumulación de residuos sólidos plásticos, son una de las principales preocupaciones a nivel mundial en la actualidad ya que estos materiales son difíciles de degradar debido a su alto grado de resistencia, ocasionando contaminación en diversos espacios, igual manera se conoce que existen microorganismos que tienen la capacidad de degradar compuestos poliméricos, de allí que se propone determinar el efecto degradador de un grupo de microorganismos, extraídos de sitios de disposición de residuos sólidos; de acuerdo a (Gomez y Oliveros, 2016) realizaron aislados microbianos en contacto con láminas de polietileno de tereftalato en tubos de ensayo con un caldo MMM y posterior incubación, después de ello se extrajeron las láminas para

medir la pérdida de peso de estas, adicionalmente, se observaron las características físicas de las láminas después de la incubación a través de observación directa y microscópica, arrojando como resultado de este proceso la pérdida de peso efectivas con resultados destacados en las cepas D (43,7 mg), seguida de E (1,1 mg) y luego C (0,8 mg), dos de las cuales (C y D) corresponden a bacterias del tipo bacilos Gram negativos.

Fue posible apreciar cambios de opacidad en las láminas del polímero a simple vista y en las observaciones al microscopio se aprecian quiebres y zonas donde se estaría dando el desprendimiento de partes de la estructura, dando lugar a partículas microscópicas del material en suspensión en los tubos contenedores de los caldos de cultivo con las láminas de polietileno. De acuerdo con esto se evidencia que existen diversos microorganismos capaces de degradar PET utilizándolo como única fuente de carbono, siendo esta una alternativa tecnológica para lograr disminuir la gravedad del problema mundial que representa la acumulación de residuos sólidos (Gomez y Oliveros, 2016).

2.3. Fundamentación legal

2.3.1. Constitución Política del Ecuador (2008)

El Capítulo segundo: Biodiversidad y recursos naturales en la sección quinta: Suelo señala. 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.

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)

El Título I: Ámbito y Principios de la Gestión Ambiental determina que:

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.

2.3.4. Reforma del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria (2015)

Parágrafo II: Del Suelo incluido en el Acuerdo Ministerial No.061 establece.

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.

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
MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

3.1. Localización del área de estudio

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez”, ubicado en la ciudad de Quevedo, provincia de Los Ríos, Km. 1½ de la vía Quevedo – Santo Domingo de los Tsáchilas. Sus coordenadas geográficas son 01° 01” de latitud Sur y 79° 47” de longitud Occidental, ubicada a una altura de 73 msnm.

3.2. Tipo de investigación

3.2.1. Experimental

El estudio posee las cualidades de una investigación de tipo experimental, puesto que se realizó la manipulación directa de las variables en estudio: tipo de microorganismos reducción de concentraciones de polietileno. A través del análisis en laboratorio se procedió a la identificación de los microorganismos y clasificación de los mismos, empleando todos los estándares nacionales e internacionales que rigen la microbiología del suelo y del medio ambiente.

3.3. Método de investigación

En la investigación se emplearon los métodos deductivos, analítico y de observación teniendo en cuenta la bibliografía mencionada en este proyecto.

- **Método deductivo:** El método se inicia con el análisis de los teoremas, leyes, postulados y principios de aplicación universal y de comprobada validez, para aplicarlos a soluciones o hechos particulares.
- **Método analítico:** Consiste en descomponer un objeto de estudio separando cada una de las partes del todo para estudiarlas en forma individual.
- **Método de observación:** Consiste en saber seleccionar aquello que queremos analizar

3.4. Fuentes de recopilación de información

3.4.1. Fuentes primarias

En las fuentes primarias se hizo uso de libros, revistas científicas y de entretenimiento, periódicos, diarios, documentos oficiales de instituciones públicas, informes técnicos y de investigación de instituciones públicas o privadas, patentes, normas técnicas para que optimizar los recursos de la investigación y tratar en lo posible reducir los riesgos dentro del área de trabajo, durante el monitoreo de la calidad del suelo, así como el procedimiento a verificar en el laboratorio.

3.4.2. Fuentes secundarias

En las fuentes o informaciones secundarias se empleó enciclopedias, antologías, directorios, libros o artículos que interpretan otros trabajos que validen todos los procesos de la investigación, como el aislamiento de los microorganismos y la fase de crecimiento en medios de cultivo selectivos.

3.5. Materiales y equipos

3.5.1. Materiales de laboratorio

- ❖ Puntas blancas de micro-pipeta (0.2-10µl)
- ❖ Puntas amarillas de micro-pipeta (2-20µl y 20-200 µl)
- ❖ Puntas azules de micro-pipeta (100-1000µl)
- ❖ Papel toalla
- ❖ Papel filtro
- ❖ Juego de micro-pipetas (0.2-10µl, 2-20µl, 20-200µl y 100-1000µl)
- ❖ Frascos Chopp de vidrio (500 ml)
- ❖ Tubos de Eppendorf (0.6 ml y 1.5 ml)
- ❖ Papel parafilm
- ❖ Cajas Petri
- ❖ Guantes quirúrgicos talla M
- ❖ Tijeras quirúrgicas

3.5.2. Material de oficina

- ❖ Cuaderno

- ❖ Computador
- ❖ Lapiceros
- ❖ USB pendrive

3.5.3. Equipos de laboratorio

- ❖ Nevera de -20 °C
- ❖ Balanza electrónica
- ❖ Campana extractora de gases
- ❖ UV transiluminador
- ❖ Cabina de flujo
- ❖ Cámara fotográfica
- ❖ Baño María
- ❖ Centrífuga
- ❖ Congelador -40 °C
- ❖ Cámara de flujo laminar
- ❖ Autoclave
- ❖ Agitador
- ❖ Estufa

3.7. Diseño de la investigación

3.7.1. Diseño para evaluar el comportamiento de los microorganismos con capacidad biodegradadoras

Se empleó un diseño completamente al azar DCA, para el comportamiento de los microorganismos con capacidad biodegradadoras, se trabajó con 8 tratamientos, cada uno con 3 repeticiones y 3 unidades experimentales.

Tabla 2: Esquema del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	23
Tratamientos	7
Total	30

3.7.2. Diseño para evaluar la Biodegradación de polietileno

Se empleó un diseño completamente al azar DCA para evaluar la biodegradación de polietileno, se trabajó con 8 tratamientos, cada uno con 3 repeticiones y 3 unidades experimentales.

Tabla 3: Esquema del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	23
Tratamientos	7
Total	30

3.7.3. Diseño para evaluar las UFC y pH

Se empleó un diseño completamente al azar DCA para evaluar las UFC y pH, se trabajó con 8 tratamientos, cada uno con 3 repeticiones y 3 unidades experimentales.

Tabla 4: Esquema del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	23
Tratamientos	7
Total	30

Determinación del peso seco de polietileno residual y masa bacteriana

Se empleó un diseño completamente al azar DCA para evaluar el peso seco de polietileno residual y masa bacteriana, se trabajó con 8 tratamientos, cada uno con 3 repeticiones y 3 unidades experimentales.

Tabla 5: Esquema del Análisis de Varianza

Fuente de variación	Grados de libertad
Error	23
Tratamientos	7
Total	30

3.8. Manejo del experimento

3.8.1. Pruebas bioquímicas

3.8.1.1. Inducción a la producción de enzima ureasa

Se procederá al crecimiento bacteriano siguiendo la metodología de (Rodríguez, 1999). Del crecimiento bacteriano se tomará 1 ml del inóculo bacteriano y se centrifugará a 13000 rpm a 5 min. El sobrenadante se descarta y se toma el pellet para introducirlo en el medio de cultivo Christensen Agar (Dextrosa 1 gr, Agar bacteriológico 15 gr, Peptona de gelatina 1gr, Fosfato monopotásico 2 gr, Rojo fenol 0.012 gr, Cloruro sódico 5 gr, ajustado a un pH de 7.2 a 25 °C). A las 72 horas se determinará la prueba ureasica de los microorganismos PGPRs en estudio. Para determinación de ureasa se utilizará la metodología de Holt et al., (1994) donde los valores (+) presencia, (–) ausencia.

3.8.1.2. Solubilización de potasio

Se usará la metodología de Sheng (2005), para determinar la solubilización de potasio en las PGPRs, de las cepas bacterianas se detectará en placas de agar Aleksandrov (Sulfato de magnesio 0.500 gr, carbonato de calcio 0.100 gr, silicato de aluminio y potasio 2.000 gr, glucosa 5.000 gr, cloruro férrico 0.005 gr, fosfato de calcio 2.000 gr, agar 20.000 gr, con un pH final de 25 ° C 7.2 ± 0.2) el azul de bromofenol actuó como indicador de pH. Después de la inoculación puntual del cultivo bacteriano en fase exponencial, las placas se incubaron a 28 ± 1 °C durante 3 a 5 días y se observará la zona de limpieza alrededor de las colonias (debido a la solubilización del potasio inorgánico por bacterias). Para determinación de

solubilización de potasio se utilizará la metodología de Holt *et al.*, (1994) donde los valores, (+) presencia, (–) ausencia.

3.8.1.3. Solubilización de fosfato

Para determinar la capacidad de bacterias fosfosolubilizantes se usará la metodología de Rodríguez y Fraga (1999), el agar Pikovskaya (PVK) por cada litro de preparación se usará de reactivo: 10 g de glucosa; 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 0,2 g KCl; 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g de NaCl; 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,002 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 15 g de Bactoagar; siguiendo la técnica de la placa de dilución. El pH fue ajustado a 7.0 antes de esterilizar en autoclave, las colonias bacterianas rodeadas por un halo indica la eliminación de fosfato. Para determinación de solubilización de fosfato se utilizará la metodología de Holt *et al.*, (1994) donde los valores (+) presencia, (–) ausencia

3.8.2. Degradación del polietileno

3.8.2.1. Comportamiento de los microorganismos con capacidad biodegradadoras de polietileno

Se seleccionó cepas bacterianas con capacidad degradante de polietileno procedente del banco de cepas del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la UTEQ. Para el crecimiento celular en contaminación de polietileno se siguió la metodología de Hedges, (2002) que consiste en realizar diluciones seriadas en relación 9:1 (90 μl H_2O y 10 μl de cultivo bacteriano) luego se plaqueó 20 μl entre las diluciones -5 y -6 en medio de agar nutriente (NA) (Difco) durante 48 horas. De las colonias formadas, 1 colonia se transfirió a un medio de cultivo agar nutriente líquido (15 ml) en un agitador rotatorio INCU-SHAKER Mini (150 rpm) a 30°C durante 48 horas, luego se añadió 1 ml de suspensión del contenido celular $1 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$ del cultivo agar nutriente líquido a matraces erlenmeyer que contenían 100 ml de medio de sal mineral (1,0 g NH_4NO_3 ; 1,0 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,15 g de KCl; 0,1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; y cada uno de los siguientes microelementos: 1.0 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.0 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1.0 mg MnSO_4) además, se añadió 1 gramo de películas de polietileno sin tratar (cortadas en pequeñas tiras) como única fuente de carbono y energía, se dejó agitar a 180 rpm durante 10 días. Para la determinación del contenido celular se utilizó un espectrofotómetro de luz a 600 nm con sus respectivos controles (medio de cultivo con polietileno, sin polietileno). Cada variable del tratamiento

se someterá a ANOVA con 3 repeticiones respectivamente. Los promedios fueron separados por Duncan con un nivel de significancia del 5%.

3.8.3. Biodegradación de polietileno

Para la biodegradación del polietileno se utilizó la metodología de Sivan *et al.* (2006) donde agregaron muestras de películas de polietileno (3 × 3 cm) que habían sido secadas durante la noche a 60 ° C, pesadas, desinfectadas (30 min en etanol al 70%) y agregadas a matraces, cada uno conteniendo 100 ml de SM (5 polietilenos películas, cada una de aproximadamente 200 mg). Los matraces se inocularon con 1 ml de un cultivo de fase media exponencial de las cepas en estudio desarrollado en medio NB (Difco). La densidad celular del inóculo se ajustó a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. Antes de sembrar el medio basal (SM), el inóculo de la suspensión celular se precipitó en una microcentrífuga (1.000 rpm), se lavó en SM para eliminar el medio gastado y se resuspendió en SM. Cada prueba constaba de tres matraces (réplicas). El control se mantuvo con polietileno y tiras de plástico en el medio libre de microorganismos y se dejó en un agitador a 30 ° C, 150 rpm durante períodos de 15 y 30 días . Para la determinación del contenido celular se utilizó un espectrofotómetro de luz a 600 nm con sus respectivos controles (medio de cultivo con polietileno, sin polietileno). Cada variable del tratamiento se someterá a ANOVA con 3 repeticiones respectivamente. Los promedios fueron separados por Duncan con un nivel de significancia del 5%.

3.8.4. Determinación del peso seco de polietileno residual y masa bacteriana

Para facilitar la medición precisa del peso del polietileno residual se siguió la metodología de Devi *et al.*, (2019) se tomó la suspensión de inóculo bacteriano de 6 meses y se retiró la biopelícula bacteriana de la superficie de polietileno incubando las muestras de polietileno en matraces que contenían una solución acuosa de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2% (v/v) durante 4 h. Las muestras de polietileno se recogieron en un papel de filtro, se enjuagaron con agua destilada y luego se secaron durante la noche a 60 ° C antes de que finalmente se recogieron las tiras, se lavaron a fondo con agua destilada, se secaron a la sombra y luego se pesaron para verificar el peso final. Finalmente se calculó la pérdida de peso de las bolsas de polietileno y los plásticos y se comparó con el control. Cada variable del tratamiento se someterá a ANOVA con 3 repeticiones respectivamente. Los promedios fueron separados por Duncan con un nivel de significancia del 5%.

3.8.5. Unidades formadoras de colonia y potencial de hidrógeno

Se seleccionó 8 cepas bacterianas para el estudio, procedente del laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la UTEQ. El crecimiento microbiano inició a partir en medio de cultivo mineral suplementado con 300 mg de polietileno y se agito por 180rpm en un periodo de 10 días, luego se procedió a realizar diluciones seriadas para el respectivo plaqueo. Para el ensayo se empleó la técnica de la microgota y pH (Huang et al., 2008). El conteo de microorganismos se realizó a las 24 horas después de su plaqueo, cada muestra será replicada 3 veces para este ensayo. La cantidad de microorganismo se determinará con la fórmula: $\text{UFC/ml} = \text{Colonias enumeradas/ml sembrados} \times \text{Factor de dilución}$. La determinación de pH se realizó mediante un pHmetro OHAUS fue replicada 3 veces para este ensayo. Cada variable del tratamiento se someterá a ANOVA. Los promedios fueron separados por Duncan con un nivel de significancia del 5%.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. El comportamiento de los microorganismos frente al polietileno

4.1.1. Absorbancia

La absorbancia del crecimiento de los microorganismos fue variable en los distintos tratamientos, dentro de este rango el tratamiento VI8 desarrolló promedios a 0.21 siendo superior a los demás tratamientos, mientras el tratamiento con la cepa PS1 obtuvo una absorbancia menor a 0.05.

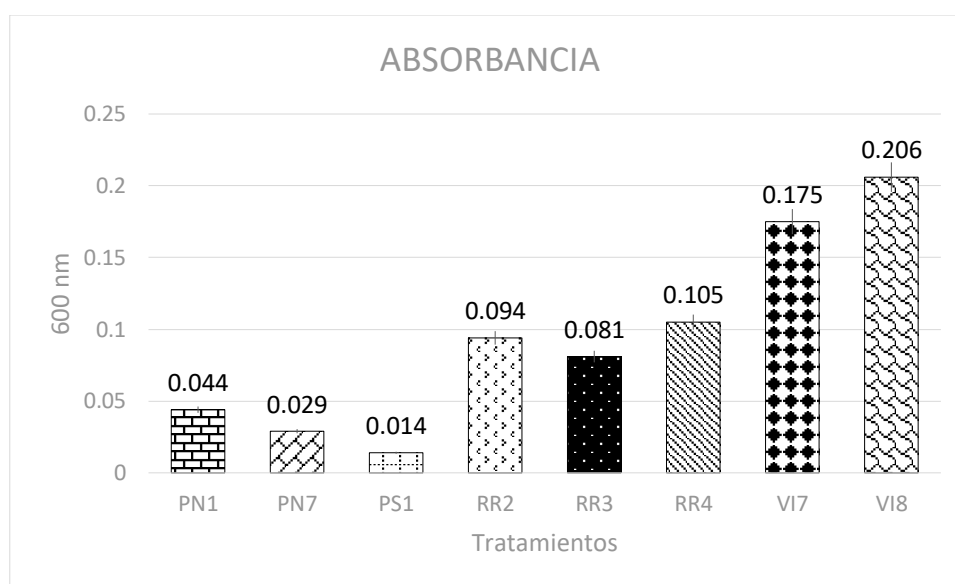


Grafico 1. Absorbancia de las diferentes cepas de bacterias con capacidad degradadora al polietileno. Las barras de error indican $\pm ES$; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test Duncan).

4.1.2. Biomasa

Una vez sometido a polietileno como única fuente de carbono, las cepas bacterianas desarrollaron diferentemente su contenido celular. La cepa RR4 generó promedios de 0.06 gr de biomasa a los 10 días siendo superior a los demás tratamientos que tuvieron promedios entre 0.05 y 0.02.

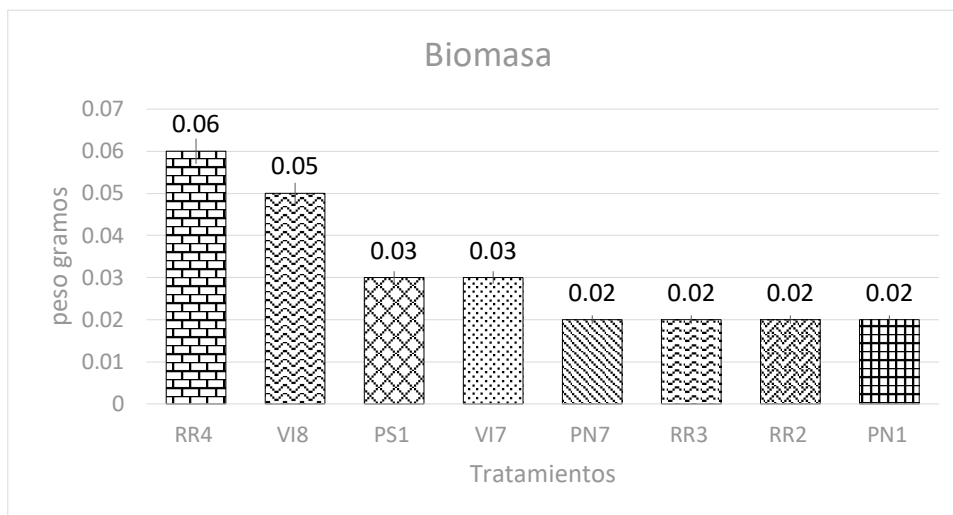


Grafico 2. Peso de la biomasa bacteriana sometida a polietileno. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test Duncan).

4.2. El microorganismo con capacidad de biodegradación de polietileno

4.2.1. UFC

El contenido celular sometido a polietileno aumentó el contenido de unidad formadoras de colonia (UFC), en este contexto el tratamiento VI8 alcanzó promedios de 2.1×10^6 , por otra parte, los demás tratamientos poseen promedios de 2.1×10^6 y valores inferiores a 5×10^5 a los 10 días de crecimiento.

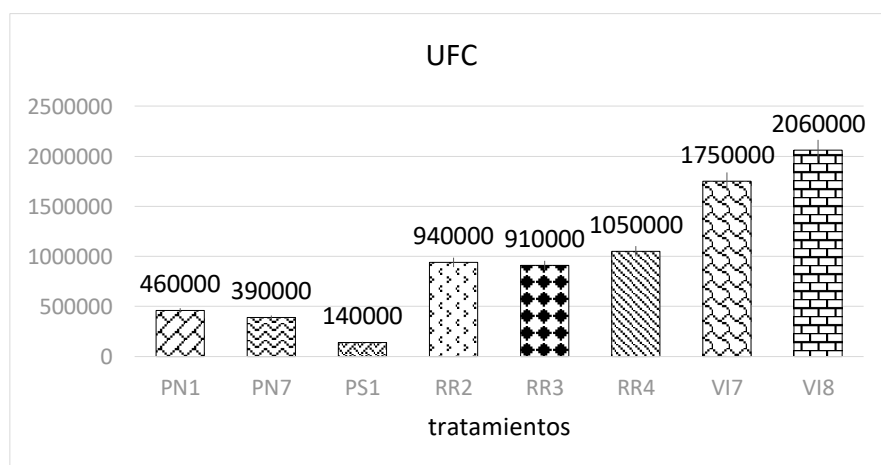


Grafico 3. Concentración celular a los 10 días de crecimiento en medio de cultivo con minerales y polietileno como única fuente de carbono. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test Duncan)

4.2.2. Correlación entre UFC/Absorbancia

Dentro del estudio, se correlaciono las UFC y absorbancia del presente estudio. La presente gráfica emite el desarrollo constante de los microorganismos mediante O.D y UFC sometido a polietileno, este dato presenta una regresión de 0.8784 y una ecuación de $0.0199e^{1E-06x}$, en conclusión, los valores obtenidos son en asociación muy alta.

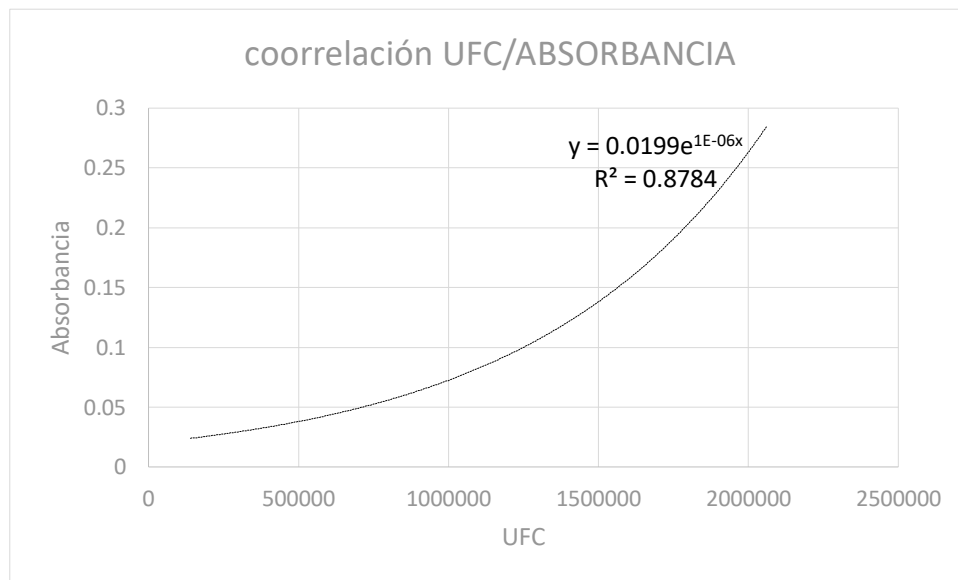


Grafico 4. Correlación de las UFC y absorbancia de las cepas sometidas a polietileno. Las barras de error indican $\pm ES$; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test Duncan).

4.2.3. Unidad formadoras de colonias (UFC) y potencial de hidrogeno (pH)

El pH es una de los factores químicos que se mide el potencial de H^+ . Después de 10 días los promedios de los valores tuvieron diferencias estadísticas, la cepa PN7 dio valores de 6.6 mientras los demás tratamientos genero valores promedios de 6. Los distintos tratamientos generan diferentes pH, estos valores son relacionados al desarrollo del contenido celular.

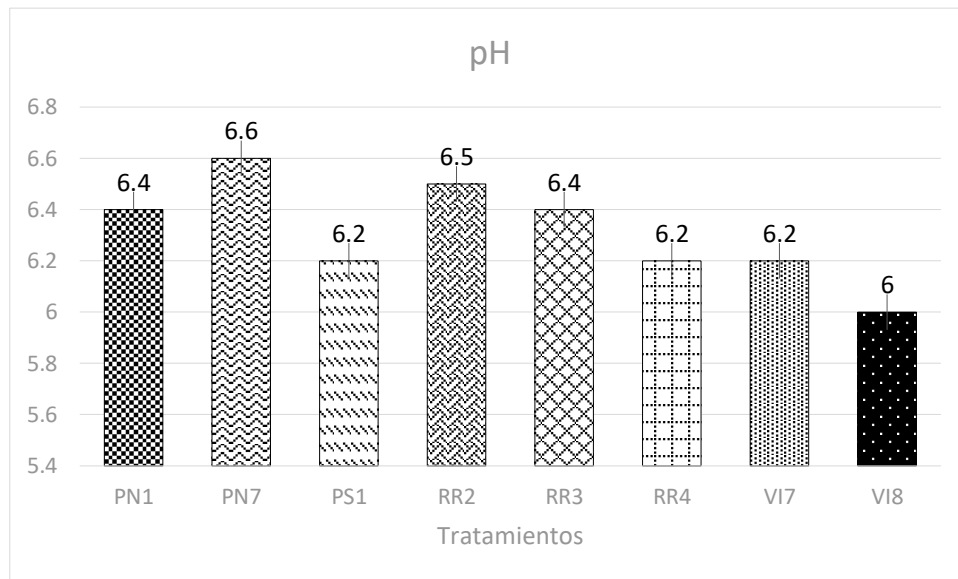


Grafico 5. Correlación de las UFC y absorbancia de las cepas sometidas a polietileno. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test Duncan).

	PN1	PN7	PS1	RR2	RR3	RR4	VI7	VI8
FOSFATASA								
UREASA								

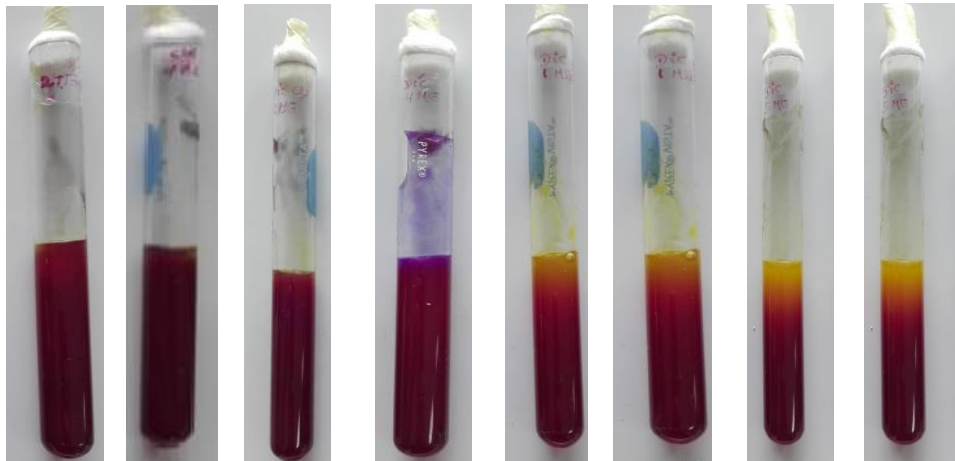
POTASIO	
---------	--

Tabla 6. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas revelaron la capacidad de las cepas para desdoblar componentes como urea, fosforo y potasio, las cepas con mejor capacidad fueron RR4, VI7, VI8 que poseen una alta capacidad enzimática y metabólica mientras que las demás cepas revelaron bajo potencial en las pruebas bioquímicas realizadas, cabe destacar que las pruebas realizadas nos permitieron la clasificación y reagrupación según su capacidad.

4.3. La capacidad y rapidez de biodegradación de polietileno con los microorganismos específicos seleccionados.

4.3.1. Degradación del polietileno

Sometido a 15 y 30 días de crecimiento celular, se efectuó el efecto de la degradación de microorganismos en los distintos tratamientos de microorganismos. El tratamiento VI8 redujo de 300 a 268 mg de polietileno a los 15 días mientras que a los 30 días el efecto de degradación aumentó a 264 mg, siendo superior a los demás tratamientos que tuvieron promedios de 300 y 280 mg respectivamente.

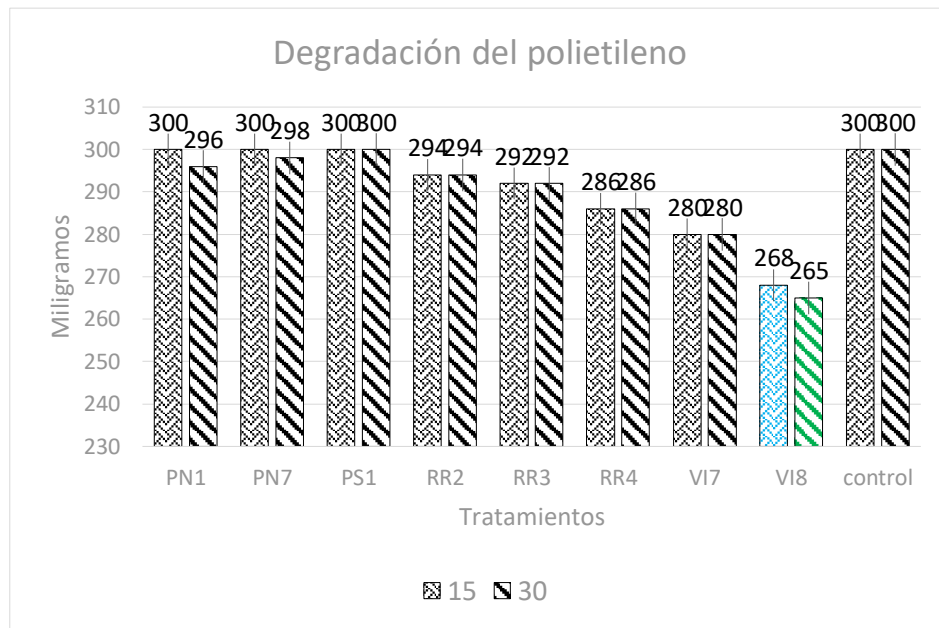


Grafico 6. Degradación del polietileno de las cepas en estudio. Las barras de error indican $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a $p < 0.05$ (test Duncan).

4.4. Discusión

Las cepas bacterianas con capacidad a la degradación al polietileno se seleccionaron por sus características morfológicas y bioquímicas. En la absorbancia, la cepa VI8 fue superior a los demás tratamientos con valores promedios a 0.21 a los 10 días de crecimiento celular, estos datos concuerdan con Devi *et al.*, (2019) que confirman la tasa constante de aumento en el crecimiento bacteriano desde la 1ª hasta la 3ª semana con valores de 0.4 en la cepa K20, debido a la falta de nutrientes en la semana 4 disminuyó el contenido de absorbancia.

La cepa bacteriana que generó mayor biomasa celular fue RR4 generó promedios de 0.06 gr/ml a los 10 días, sin embargo, Sivan *et al.*, (2006) concuerda que la bacteria *Rhodococcus ruber* 0.1 gr/ml, esto debido a que la bacteria genera diferentes estímulos fisiológicos para adaptarse al medio y a su vez liberar componentes enzimáticos para su alimentación en especial los EPS (exopolisacáridos).

El contenido celular de las bacterias en estudios fueron muy variables, en este contexto, el tratamiento VI8 alcanzó promedios de 2.1×10^6 , estos valores se asemejan a Jara *et al.*, (2009) donde sometieron a la cepa de *Bacillus subtilis* con polietileno previamente esterilizado durante 30 días de crecimiento, donde resultó el tratamiento con 6 h de UV + *Bacillus subtilis* con un contenido celular de 9.1×10^7 , en esto la descomposición de componentes orgánicos es un factor que ayuda en el medio, permitiendo un desarrollo microbiano de manera efímera.

El Potencial de H⁺ en la solución de diferentes cepas fue variable a 30 días. En la cepa PN7 se mantuvo un pH de 7.2 a 6.6 durante los 30 días, mientras la cepa VI8 se redujo de 7.2 a 6, estos cambios son similares a los observado por Tansengco y Tokiwa, (1997) que tuvieron cambios notables en el pH (6,7) en la mayoría de los cultivos (PES, PBS, PLA y PHB) debido a la pequeña cantidad de sustancias degradadas presentes en las soluciones. Sin embargo, en las preguntas de PCL, el pH bajó de 6.5 a 5.4, permitiendo deducir la liberación de sustancias acidas que se produjeron en la solución del medio de cultivo. En la degradación de polietileno, la cepa con mayor degradación de polietileno a 300 mg fue la cepa VI8 redujo de 32 mg y 38 a los 15 y 30 días respectivamente, en este contexto el siguiente ensayo se relaciona con el trabajo realizado por Orr *et al.*, (2004) donde la cepa de *Rhodococcus ruber* (C208) en cultivo líquido, formó una biopelícula en la superficie de polietileno y degradó hasta un 8% gravimétricamente.

CAPITULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Una de las cepas que alcanzó los mayores promedios en crecimiento determinados en UFC fue VI8 siendo esta la que podría ser usada en futuras investigaciones para la degradación de polietileno.

El comportamiento ante las altas concentraciones de polímero en medios de cultivo altera el crecimiento microbiano y las características biológicas como la formación de unidades de crecimiento.

Una de las pruebas indispensables para la selección de los microorganismos es la degradación de Ureasa mostrando una característica básica que es el cambio de coloración en el medio y el potencial de hidrogeno.

La velocidad en la degradación depende de múltiples factores bioquímicos como la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos que desdoblan las moléculas del plástico en fracciones más sencillas que pueden ser asimiladas por otro tipo de microorganismos.

5.2. Recomendaciones

La aplicación de microorganismos para la descomposición de polímeros se debe realizar después de una valoración del tipo de contaminante y su origen ya que las diferentes moléculas de polímero tienen procesos de desdoblamiento variados.

La reproducción de las bacterias se debe realizar en medios de cultivo que tengan como única fuente de energía moléculas de polietileno.

Se recomienda el uso de bacterias acidófilas ya que estas dan paso a la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos capaces de degradar moléculas que componen el plástico.

CAPITULO VI
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

6.1. Bibliografía

- Arandes, J., Bilbao, J., & Lopez, D. (2004). Reciclado de residuos plásticos. revista Iberoamericana de Polímeros, 28 - 45.
- Bachmeier, K. L., Williams, A. E., Warmington, J. R., & Bang, S. S. (2002). Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. *Journal of biotechnology*, 93(2), 171-181.
- Banco Central del Ecuador. (2011). Obtenido de (<http://www.bce.fin.ec/>)
- Beltan, M. (2011). Tipos de plásticos, aditivación y mezclado. *Tecnología de los polimeros*.
- Cardona, D., Lavernia, C., & Alcerro, J. (2010). Orthopaedic Institute at Mercy Hospital. *Acta Ortopédica Mexicana*, 123 - 128.
- Coutinho, F., Mello, I., & De Santa Maria, L. (2003). Polietileno: Principais Tipos, Propriedades e Aplicações. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 1 - 13.
- Devi, R. S., Ramya, R., Kannan, K., Antony, A. R., & Kannan, V. R. (2019). Investigation of biodegradation potentials of high density polyethylene degrading marine bacteria isolated from the coastal regions of Tamil Nadu, India. *Marine pollution bulletin*, 138, 549-560.
- Garbisu, C., Amezaga, I., & Alkorta, I. (2002). Biorremediación y ecología. *Revista Ecosistemas*, 11(3).
- Garcia de Salamone, I. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas. *Revista argentina de microbiología*, 1 - 3.
- Garcia, M. (2011). El cinturón hortícola platense: ahogándonos en un mar de plásticos. (*ensayo acerca de la tecnología, el ambiente y la política*). Universidad Nacional de la Plata, La plata.
- Gilberto, A., & Perdomo, M. (2002). Passticos y medio ambiente. *Revista Iberoamericana Polímeros*.
- Gomez, J., & Oliveros, C. (2016). Biodegradación de polietileno de tereftalato por microorganismos aislados de sitios de disposición final de residuos sólidos, Táchira, Venezuela. *Serbiluz*, 57 - 62.

- Hedges, A. J. (2002). Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts. *International journal of food microbiology*, 76(3), 207-214.
- Holguin, E., Hernandez, M. E., & Sanchez, G. G. (2007). Contaminacion de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediacion, fitorremediacion y restauracion. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 139 - 154
- Holt JG, Krieng NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edn. Williams and Wilkins Publishers, Baltimore.
- Jara, M. A. T., Antunes, A. A., Barreto, N. S. E., Rufino, R. D., Duran, N. E., Albuquerque, C. D. C., & Campos-Takaki, G. M. (2009). Proceedings of the II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007) (p. 254). World Scientific.
- Madrigal, G. J., & Ranganath, S. (2011). *Manual de plasticos para diseñadores*. Mexico: Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Martin, P. A. (2017). Estudio preliminar de la degradacion de plasticos por bacterias marinas. (*Trabajo final de fin de Grado*). Universidad de la Laguna, España.
- Mohanty, A. K., Vivekanandhan, S., Pin, J. M., & Misra, M. (2018). Composites from renewable and sustainable resources: Challenges and innovations. *Science*, 362(6414), 536-542.
- Montoya, C. C., & Roncancio, C. K. (2016). EVALUACIÓN DE LA GESTIÓN DE RESIDUOS PLÁSTICOS EN LA CIUDAD DE MANIZALES. (*Tesis de pregrado*). UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES, FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA. INGENIERÍA AMBIENTAL, Manizales.
- ONU Medio Ambiente. (2018). *PLÁSTICO DE UN SOLO USO*. Obtenido de https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/25496/singleUsePlastic_SP.pdf?sequence=3&isAllowed=y.
- Orr, I. G., Hadar, Y., & Sivan, A. (2004). Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(1), 97-104.
- Qi, X., Ren, Y., & Wang, X. (2017). New advances in the biodegradation of Poly (lactic) acid. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 117, 215-223.

- Rodriguez H, Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17:319–339.
- Segura, D., Noguez, R., & Espin, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 361 - 371.
- Sheng, X.F., 2005, Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1918-1922.
- Siracusa, V. (2019). Microbial degradation of synthetic biopolymers waste. *Polymers*, 11(6), 1066.
- Sivan, A., Szanto, M., & Pavlov, V. (2006). Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(2), 346-352.
- Tansengco, M. L., & Tokiwa, Y. (1997). Thermophilic microbial degradation of polyethylene succinate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(1), 133-138..
- Torres, R. D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Revista Ecosistemas*, 12(2).
- Uribe, D., Giraldo, D., Gutierrez, S., & Merino, F. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 133 - 136.
- Usha, R., Sangeetha, T., & Palaniswamy, M. (2011). Screening of polyethylene degrading microorganisms from garbage soil. *Libyan Agric Res Cent J Int*, 2(4), 200-4.
- Vertus, D., Ruiz, M., Henriquez, J., & Ortiz, V. (2017). Biodegradacion de polietileno y propuesta de aplicacion en cerro Patacon. *Revista de Iniciación Científica – RIC – Journal of Undergraduate Research*, 1 - 7.
- Yang, Y., Zhang, Y., Li, Z., Zhao, Z., Quan, X., & Zhao, Z. (2017). Adding granular activated carbon into anaerobic sludge digestion to promote methane production and sludge decomposition. *Journal of Cleaner Production*, 149, 1101-1108.

CAPITULO VII

ANEXO

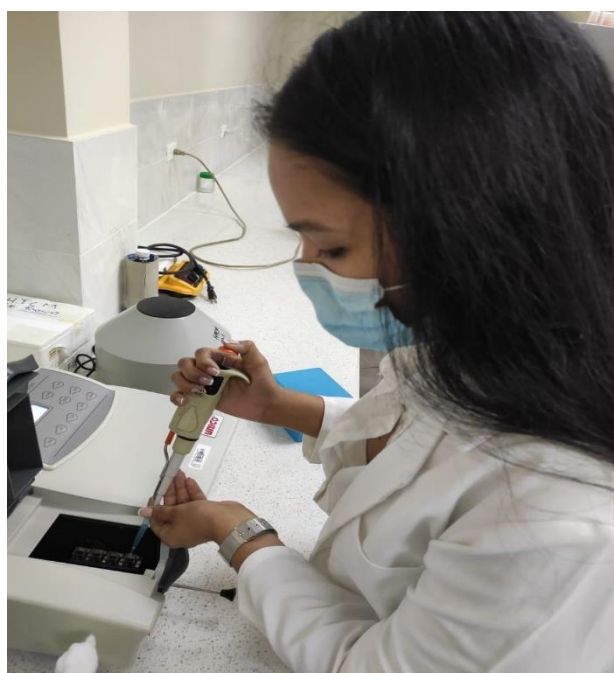
7.1. Anexos



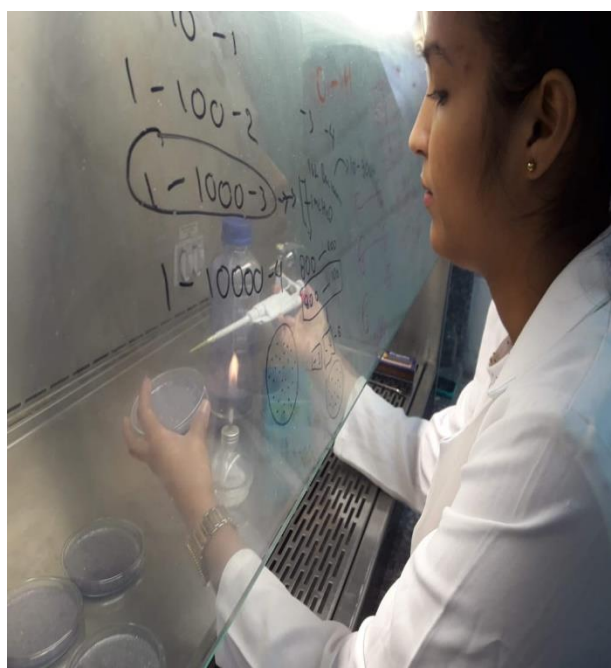
Anexo 1. Crecimiento bacteriano con polietileno.



Anexo 2. Tratamientos con resultados apreciables en relación a turbidez .



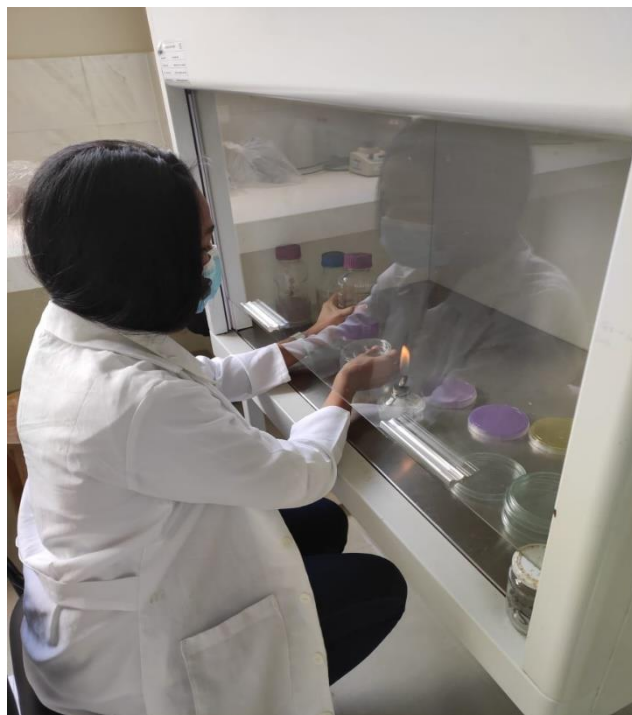
Anexo 3. Determinación de crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría.



Anexo 4. Ensayo de pruebas bioquímicas.



Anexo 5. Esterialización del medio de cultivo M9.



Anexo 6. Siembra en placa petri.



Anexo 7. Crecimiento bacteriano en medio de cultivo M9.