

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA  
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS AMBIENTALES**



**BIODEGRADACIÓN BACTERIANA DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD  
BAJO CONDICIONES CONTROLADAS EN BIORREACTORES AIR LIF**

**Tesis**

**Para optar el título de:**

**INGENIERO AMBIENTAL**

**Presentado por:**

**OSMAR CACERES AZURIN**

**Promoción 2005**

**TINGO MARIA**

**2011**



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA  
Tingo María - Perú



FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

## ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 01 de diciembre de 2011, a horas 09:00 a.m. en la Sala de Grado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, para calificar la tesis titulada:

### “BIODEGRADACIÓN BACTERIANA DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD BAJO CONDICIONES CONTROLADAS EN BIORREACTORES AIR LIF”

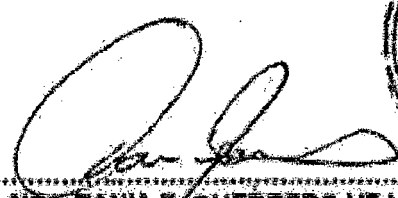
Presentado por el Bachiller: **OSMAR CACERES AZURIN**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobado con el calificativo de “BUENO”.

En consecuencia el sustentante queda apto para optar el Título de **INGENIERO AMBIENTAL**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del título correspondiente.

Tingo María, 07 de diciembre de 2011.

  
.....  
Bigo. M.Sc. **MANUEL A. NIQUE ALVAREZ**  
Presidente

  
.....  
Bigo. M.Sc. **MARGARITA ALCEDO ROMERO**  
Vocal

  
.....  
Ing. M.Sc. **TANIA E. GUERRERO VEJARANO**  
Vocal

  
.....  
McBigo. M.Sc. **CESAR SAMUEL LOPEZ LOPEZ**  
Asesor



## DEDICATORIA

A DIOS; quien mediante la guía de su Espíritu iluminó mi camino durante el transcurso de mi formación profesional dándome inteligencia y sabiduría para alcanzar mis metas.

A mis padres Donato y Leonor por el apoyo incansable en el día a día de mi formación profesional y por el gran amor que me brindan.

A mis queridos hermanos Nigdan, Mirian, Sharmely, Noraly y Jamil por su apoyo moral y todo su cariño.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi alma mater Universidad Nacional Agraria de la Selva, Facultad de Recursos Naturales Renovables – Ingeniería Ambiental y plana docente, por la contribución en mi formación profesional.

Al Dr. Mtblgo. MSc. César López López, asesor; por la confianza que me brindo para la realización en el transcurso del presente trabajo y la orientación moral y académica en el proceso de mi formación profesional.

A Víctor Beteta Alvarado y Maribel Roca Capcha por su amistad, apoyo y confianza durante mi formación profesional y colaboración en el presente trabajo.

A Richard Sías Rodríguez, por su amistad y colaboración para poder realizar el presente trabajo.

Al Ing. Mc Luis Ore Cierzo por su apoyo y confianza en la realización del presente trabajo.

## ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo general .....	2
1.1.1. Objetivos específicos.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1. Los plásticos: polietileno .....	4
2.2. Biorremediación y biodegradación .....	5
2.2.1. Biorremediación.....	5
2.2.2. Biodegradación.....	5
2.3. Los beneficios de la biodegradación .....	5
2.4. Resistencia del polietileno al ataque microbiano.....	6
2.5. Oxidación fotoquímica y térmica del polietileno (PE) con aditivos pro-oxidantes (d <sub>2</sub> W).....	10
2.6. Mecanismos de la biodegradación del polietileno .....	12
2.7. Actividad fisiológica microbiana en la degradación .....	14
2.8. Condiciones ambientales para la biodegradación de polietileno.....	15
2.9. Biorreactores de lecho fluidizado tipo air lift.....	16
2.10. Biopelículas .....	18
2.11. Formación de la biopelículas.....	19

III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
3.1. Descripción de la zona de trabajo .....	22
3.1.1. Lugar de ejecución .....	22
3.1.2. Condiciones climáticas .....	22
3.2. Materiales y equipos .....	23
3.3. Unidad experimental .....	23
3.4. Muestras de suelo .....	23
3.4.1. Ubicación del punto de recolección .....	23
3.4.2. Características de la Muestra .....	24
3.5. Aislamiento, selección y elección de bacterias degradadoras de plástico .....	24
3.5.1. Aislamiento .....	24
3.5.2. Etapa de adaptación-selección de bacterias degradadoras de plástico .....	25
3.6. Preparación de biorreactores .....	25
3.7. Operación en biorreactores de los cultivos .....	26
3.8. Datos a registrar .....	26
3.8.1. Determinación de la biomasa .....	26
3.8.2. Determinación de oxígeno disuelto .....	27
3.8.3. Determinación del pH .....	27
3.8.4. Determinación de temperatura .....	28
3.8.5. Concentración de bolsas de polietileno de baja densidad .....	28
3.8.6. Identificación de microorganismos .....	29

IV. RESULTADOS .....	30
4.1. Biomasa .....	30
4.2. Oxígeno disuelto .....	33
4.3. pH      36	
4.4. Concentración de polietileno .....	39
4.5. Análisis de varianza para los resultados de biodegradación de polietileno de baja densidad.....	42
4.6. Microorganismos determinados .....	42
V. DISCUSIÓN.....	44
5.1. Biomasa .....	44
5.2. Oxígeno disuelto (OD).....	46
5.3. pH      47	
5.4. Concentración en peso de PEBD.....	49
5.5. Caracterización de microorganismos .....	51
5.6. Correlación de Spearman .....	52
VI. CONCLUSIÓN.....	53
VII. RECOMENDACIONES.....	54
VIII.            ABSTRACT .....	55
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
X. ANEXO.....	63

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
1. Biomasa al inicio, a los 3 días y al final de la operación en los biorreactores.....	31
2. Prueba de Duncan respecto a biomasa y tipos de Plástico.....	33
3. Datos registrados de oxígeno disuelto.....	33
4. Comparaciones de OD entre los tres tipos de bolsas para pruebas de Duncan .....	35
5. Datos registrados de pH .....	36
6. Comparaciones de pH para los tres tipos de plástico según la prueba de Duncan.....	38
7. Datos registrados de concentración (peso).....	39
8. Comparaciones de concentración para los tres tipos de PEBD según la prueba de Duncan.....	41
9. ANVA de los resultados de biodegradación de polietileno de baja densidad (bolsas de plástico).....	42
10. Resultados de las pruebas de identificación bioquímica.....	43
11. Composición del medio mínimo de sales de DAVIS.....	64



12.	Composición de la solución de traza.....	64
13.	Correlación de Pearson entre los parámetros medidos y los tres tipos de bolsas .....	65
14.	Correlación de Spearman entre los parámetros medidos y los tres tipos de bolsas .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1. Curvas de biomasa para datos de PEBD de Metro $d_2w$ .....	31
2. Curvas de biomasa para datos de PEBD de Veá $d_2w$ .....	32
3. Curvas de biomasa para datos de PEBD sin marca.....	32
4. Variación de OD inicial y final para los datos de PEBD de Metro.....	34
5. Variación de OD inicial y final para los datos de PEBD de Veá.....	34
6. Variación de OD inicial y final para los datos de PEBD sin marca.....	35
7. Variación de pH inicial y final para los datos de PEBD de Metro .....	37
8. Variación de pH inicial y final para los datos de PEBD de Veá .....	37
9. Variación de pH inicial y final para los datos de PEBD sin marca.....	38
10. Variación de concentración para PEBD de Metro.....	40
11. Variación de concentración para PEBD de Veá .....	40
12. Variación de concentración para PEBD sin marca.....	41
13. Recolección de muestras de plástico.....	67
14. Recolección de muestras de plástico del botadero .....	67
15. Siembras de adaptación .....	68
16. Evaluación de parámetros de los reactores .....	68

17. Conteo de colonias de microorganismos en las placas .....	69
18. Medios para la identificación bioquímica .....	69
19. Cambios estructurales de PEBD de Metro al final de la prueba.....	70
20. Diferencias entre PEBD degradadas y sin degradar.....	70

## RESUMEN

En la presente investigación se probó la capacidad de bacterias nativas ambientales aisladas del botadero la Moyuna, de Tingo María, de degradar bolsas plásticas (polietileno de baja densidad), utilizándose para ello biorreactores de tipo air lift en un sistema sumergido teniendo como única fuente de carbono y energía las bolsas de polietileno de baja densidad, lográndose aislar las bacterias que desarrollan en presencia de polietileno de baja densidad pertenecientes a las especies *Pseudomonas sp*, *Edwarsiella sp.* y *Alcaligenes sp.*, que se consideran como la más eficientes en la biodegradación del polietileno ya que se adaptó a las condiciones de la actividad microbiana dentro de un rango de 6.4 – 8.3 pH a temperaturas de 24 – 30 °C en medio acuoso, observando además la pérdida de peso del PEBD provenientes de Metro al final de la operación del biorreactor y cambios en la estructura del polietileno como son coloración, etc.

## I. INTRODUCCIÓN

Adicionalmente, a la preocupación frente a la contaminación del agua, aire y suelo, ocasionada en gran medida por los grandes volúmenes de residuos que se generan diariamente y que reciben escaso o nulo tratamiento, está la situación agravada de la basura, conformada por residuos de composición muy variada entre ellos materiales plásticos sintéticos que generalmente se juntan y mezclan durante las labores de recolección dificultando su manejo y disposición final.

La peligrosidad de la mayoría de los plásticos sintéticos radica en su característica de no poder ser degradados en el entorno incrementando el deterioro ambiental puesto que al contrario de lo que ocurre con la madera, el papel, las fibras naturales o incluso el metal y el vidrio, los plásticos naturalmente no se oxidan ni se descomponen con el tiempo.

La utilización de los plásticos ha crecido de manera acelerada, la mayoría de los productos que se consumen traen envolturas de plástico (bebidas gaseosas, pastelitos, galletas, chocolates, jeringas hipodérmicas, etc.) constituidas

por polietileno de baja densidad, que siendo fáciles de desechar, ocasionan mayores problemas al ambiente.

La ciudad de Tingo María no es ajena a este problema, la mayoría de los productos plásticos (polietileno de baja densidad) que más se utilizan son desechados al botadero La Moyuna, siendo su degradación natural muy lenta o casi nula, es por ello que se pretende acelerar la degradación biológica incentivando a microorganismos ambientales nativos a que obtengan carbono para su metabolismo y energía a partir de estos productos.

Razón por lo cual se plantea la siguiente interrogante: ¿el polietileno de baja densidad (bolsas plásticas) será susceptible de biodegradación mediada por bacterias ambientales que lo utilizarían para su crecimiento y desarrollo?, por lo que se esboza la hipótesis de que las bacterias ambientales de La Moyuna degradan el polietileno de baja densidad utilizándolo como fuente de carbono y energía.

### **1.1. Objetivo general**

Determinar la biodegradación de polietileno de baja densidad (bolsas de plástico) mediada por bacterias nativas de La Moyuna.

### **1.1.1. Objetivos específicos**

- Determinar la biomasa de las bacterias que degradan el polietileno.
- Medir las condiciones en que las bacterias ambientales pueden degradar el polietileno.
- Mediante la disminución en peso determinar la degradación del polietileno de baja densidad.
- Mediante una selección/elección determinar los géneros de bacterias que degradan el polietileno de baja densidad.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Los plásticos: polietileno

El polietileno (PE), es un plástico compuesto por monómeros de oleofinas, que conjuntamente con el cloruro de polivinilo son los plásticos de mayor uso en el Perú y en el mundo; se utilizan principalmente en la fabricación de rollos de plástico transparente para envolturas, películas, tuberías y botellas de bebidas gaseosas (MÉNDEZ *et al.*, 2007).

Los productos elaborados con polietileno presentan dos tipos de problemas: el deterioro cuando están siendo utilizados y la contaminación ambiental posterior a su uso. En este último caso debido a sus características de resistencia, no son degradados por los microorganismos del suelo y permanecen visibles en el medio ambiente por tiempo indefinido (MANGIAROTTI *et al.*, 1994).



## **2.2. Biorremediación y biodegradación**

### **2.2.1. Biorremediación**

La biorremediación es una tecnología basada en la utilización de los microorganismos y su potencial degradador para eliminar los contaminantes del medio, mediante su transformación en productos inocuos como el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O (SOLANAS, 2009).

### **2.2.2. Biodegradación**

Cuando hablamos de biodegradación microbiana nos referimos al hecho de que los microorganismos crecen a expensas de la utilización de estos compuestos químicos. Aunque pueda sorprendernos que un organismo sea capaz de alimentarse a expensas de compuestos tan extraños para el ser humano como el benceno, naftaleno o pireno (SOLANAS, 2009).

## **2.3. Los beneficios de la biodegradación**

La biodegradación de plásticos constituye una posible vía de minimización de estos desechos (CARRASCO, 1991; COMISIÓN TÉCNICA PLASTIVIDA, 1999; MORTON y SURMAN, 1996), lo que disminuiría la superficie necesaria para disponer los mismos (en rellenos sanitarios, por ejemplo). En el caso del polipropileno, y de algunos otros plásticos, quizás los resultados

negativos de los estudios de biodegradación realizados por algunos autores (MÜLLER y DECKWER, 2000, LOMBARDI *et al.*, 1978) hayan desalentado la realización de trabajos de otros grupos sobre este tema, y ésa sea tal vez la razón de una disponibilidad bibliográfica tan escasa sobre biodegradación de polipropileno (CACCIARI *et al.*, 1993).

En cuanto a los criterios y técnicas empleados para evaluar los resultados de una posible biodegradación de un plástico determinado, se encuentran, entre otros: la pérdida de peso luego de remoción de la biomasa de la superficie del polímero y la espectroscopía, sirviendo esta última para determinar cambios estructurales del polímero debido a la actividad microbiana (FILIP, 1985).

De encontrarse resultados favorables de biodegradación, los microorganismos responsables de la misma podrían reproducirse de modo de aumentar su concentración, y así acelerar la velocidad de biodegradación, ya que se sabe que en fuentes naturales de microorganismos, tales como tierra, compost, etc., las cinéticas de degradación de diferentes polímeros son lentas (ALONSO *et al.*, 2001; MÜLLER y DECKWER, 2000).

#### **2.4. Resistencia del polietileno al ataque microbiano**

En la actualidad, los plásticos son productos muy utilizados y fabricados en grandes cantidades; sin embargo, debido a su difícil mineralización

son uno de los contaminantes más importantes de los suelos y océanos (URIBE *et al.*, 2010).

La resistencia del polietileno al ataque microbiano se relaciona con su elevado carácter hidrológico, su elevada impermeabilidad al agua, su alto peso molecular y a la ausencia de grupos funcionales que puedan ser reconocidos por los sistemas enzimáticos de los microorganismos. Los primeros estudios demostraron que las cadenas lineales de parafina de pesos moleculares inferiores a 500 Da o los n-alcános hasta el tetratetracontano ( $C_{44}H_{90}$ )<sup>17</sup> pueden ser usados de forma significativa como fuente de carbono por microorganismos. Los estudios sobre el tamaño molecular de la cadena de polietileno y la colonización y/o biodegradación de la estructura por microorganismos han sido muy numerosos, llegándose a la conclusión en todos los casos, a límites bajos de pesos molecular para que se produzca una biodegradación eficiente. En experimentos con ceras de PE donde la distribución de pesos moleculares estaba centrada en 1000 Da se observó la biodegradación con un consorcio de bacterias y de forma efectiva en tamaños moleculares superiores a 1000 (KAWAY *et al.*, 2004).

En otro trabajo, microorganismos del suelo fueron capaces de degradar de forma rápida (70% de mineralización en un año de incubación) la fracción de pesos moleculares (PM = 1,500 Da) extraída con acetona de polietileno con aditivos pro oxidantes y previamente termo – oxidado (YAMADA *et al.*, 2001). Recientemente, se ha observado la colonización y biodegradación en

cierta medida de polietilenos no degradados de peso molecular inferior a 28,000 Da, por el hongo *Penicillium simplicis simum* (YAMADA *et al.*, 2001).

A lo largo del tiempo se han realizado muchos estudios con el objetivo de evaluar la biodegradación de polietilenos en términos de mineralización realizando experimentos de larga duración sobre muestras de polietileno de baja densidad tanto sin degradar como altamente fotodegradados (ALBERTSSON y KARLSSON, 1988).

En suelos naturales los resultados indican que el polietileno puede tardar más de 100 años en experimentar la mineralización (OHTAKEKOKA y ASHIASABE, 1998).

El PE, considerado como inerte, puede ser biodegradado si se emplea la cepa microbiana adecuada. Aislaron y estudiaron la bacteria termófila *Brevibacillus borstelensis* capaz de utilizar el polietileno como única fuente de carbono. En 30 días a 50 °C, esta bacteria disminuyó el peso molecular de un polietileno foto degradado un 30% y el peso del material en un 11%, *B. borstelensis* también biodegradó el polietileno no irradiado (KOUTNY *et al.*, 2006).

Hay que señalar que el crecimiento de microorganismos en la superficie del PE no debe interpretarse como prueba de que el polietileno se biodegrada. En muchos estudios se observó un crecimiento rápido de los

microorganismos en el comienzo de la incubación y que está causado por el consumo de aditivos y/o fragmentos oxidados de bajo peso molecular del polietileno. En estos casos después de esa fase inicial, la actividad metabólica se detiene o se relentiza a niveles difíciles de detectar pero que se mantienen durante bastante tiempo (KOUTNY *et al.*, 2006).

En todos los trabajos realizados sobre polietilenos termo y oxidados se aumenta de forma significativa el ataque microbiano con respecto al material sin oxidar. La biodegradación empieza en la superficie y debe progresar hacia el interior del material, la velocidad del proceso de biodegradación dependerá de cómo la colonización superficial se propaga a lo largo del espesor del polietileno y, por tanto, de la velocidad de difusión de los sistemas enzimáticos generados por los microorganismos en el material, al igual que en la degradación oxidativa es fundamental la difusión del oxígeno, el agua y otras especies que catalizan la degradación (KOUTNY, *et al.*, 2006).

Por otro lado LEE *et al.* (1991) reportaron la degradación del polietileno por cepas de hongos y bacterias, aunque no menciona que géneros bacterianos están involucrados. POMETTO *et al.* (1992) lograron aislar una enzima fúngica capaz de degradar plásticos, existe información con respecto a fungi que degradan plásticos así como por ejemplo CUEVAS y MANALIGOD (1997) aislaron micromicetos del suelo capaces de degradar productos de

polietileno y en 2001 CLUTARIO y CUEVAS demostraron que el micromiceto *Xylaria* sp. es capaz de colonizar el polietileno.

## **2.5. Oxidación fotoquímica y térmica del polietileno (PE) con aditivos pro - oxidantes (d<sub>2</sub>W)**

El polietileno que se fabrica industrialmente siempre contiene estabilizantes, incluso en mínimas concentraciones han de incorporarse estabilizantes ya que son necesarios para su procesado. Los residuos de estabilizantes antioxidantes, atrapadores de radicales libres y descomponedores de hidroperóxidos, pueden inhibir la oxidación y prolongar la vida útil del material. Sin embargo, la situación puede cambiar radicalmente si se añaden aditivos pro oxidante (d<sub>2</sub>w), pues estos contribuyen a aumentar la velocidad de los procesos degradativos del material. Con una combinación adecuada de estabilizantes y pro-oxidantes puede controlarse el tiempo de duración de la vida útil del material y, una vez finalizada ésta (consumo del estabilizante) el material se degradará y fragmentará rápidamente por acción del aditivo pro-oxidante (d<sub>2</sub>w) (SCOTT y WILES, 2001).

Los aditivos pro oxidantes (d<sub>2</sub>w) se caracterizan por contener aditivos que presentan sales metálicas de hierro, manganeso, níquel y cobalto que provocan la fragmentación del polímero oxo biodegradable (SCOTT y WILES, 2001).

Estos catalizadores de la degradación actúan aumentando las eficiencias de las etapas de iniciación y propagación de la degradación oxidativa. La base de los aditivos pro-oxidantes son iones de metales de transición que se suelen emplear en forma de carboxilatos de cadena larga u otros ligandos orgánicos complejos, frecuentemente estereados de Hierro, Manganeso y cobalto. Los pro-oxidantes más activos están basados en metales capaces de dar dos iones metálicos de estado de oxidación diferente (por ejemplo,  $Mn^{2+}/Mn^{3+}$  o  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ). En el caso de Mn o Co la aceleración de la oxidación se produce muy eficientemente vía térmica y no es necesaria la influencia de luz. Otros productos como los de  $Fe^{3+}$ , por ejemplo, juegan un importante papel en el proceso de foto degradación del polietileno (SCOTT y WILES, 2001).

Los microorganismos y sus enzimas no solo interaccionan directamente con el sustrato, sino que también producen especies reactivas de oxígeno (ERO) tales como superóxido, radicales peróxido, radicales hidróxido y radicales derivados de compuestos generados en su metabolismo y que sirven por sus fácil difusión de mediadoras del proceso oxidativo. En el polietileno según apuntan algunos autores, estas especies podrían contribuir a la biodegradación reaccionando con el material y acelerando la oxidación junto a los catalizadores pro oxidante. Asimismo estudiando la emisión de quimioluminiscencia de muestras de polímeros biodegradados, gelatina y triacetato de celulosa se demostró la oxidación del material por estas especies ERO generadas en el metabolismo microbiano. Estas fuertes emisiones de quimioluminiscencia también

se observan en los materiales de polietileno (PE) biodegradados (ABRUSCI *et al*, 2009).

## **2.6. Mecanismos de la biodegradación del polietileno**

Se conoce que la biodegradación del polietileno (PE) ocurre mediante dos mecanismos: hidro - biodegradación y oxo - biodegradación. Estos dos mecanismos consisten en modificaciones del producto por un aditivo, que puede ser un almidón o un pro-oxidante, usados en la síntesis de polietileno biodegradable. La mezcla de PE con almidón tiene una fase continua de almidón que hace al material hidrofílico y luego es catalizado por enzimas de amilasa. Los microorganismos pueden acceder fácilmente a este producto, atacar y remover esta parte. Así, el polietileno hidrofílico, con una matriz continua, es hidrobiodegradado. En caso de utilizar un aditivo pro-oxidante, la biodegradación ocurre siguiendo una fotodegradación y una degradación química. Si el pro-oxidante es un combinación de metales, después de la transición, el metal es catalizado térmicamente por peroxidación y la biodegradación de los productos de bajo peso molecular obtenidos por oxidación ocurre secuencialmente, (SHAHA *et al.*, 2009).

Las enzimas microbianas catalizan la ruptura de materiales complejos usados como sustratos (polímeros) en unidades más simples susceptibles de ser



asimiladas por los microorganismos, para la formación de biomasa (bioasimilación) (KYRIKOU *et al.*, 2007).

Mientras muchos polímeros naturales tales como las proteínas, los polisacáridos y el material genético (DNA, RNA), son fácilmente biodegradables por los microorganismos, éstos carecen de enzimas capaces de romper las uniones de las cadenas macromoleculares de los polímeros sintéticos convencionales, es decir los plásticos más usados (polietileno, polipropileno, PVC, poliestireno, PET, etc.) (ARIOSTI, 1999).

Además de la biodegradación, es importante mencionar la biodesintegración. Esta ocurre en materiales compuestos que están constituidos por un componente biodegradable y un componente no biodegradable (por ejemplo: blends o mezclas de almidón y polietileno, respectivamente) (ARIOSTI, 1999). Los microorganismos metabolizan la fracción amilácea, mientras que la fracción polimérica prácticamente queda sin atacar (KYRIKOU *et al.*, 2007). No hay consenso en que estos materiales sean plásticos biodegradables, y sus fragmentos podrían contaminar más el medio ambiente, que una bolsa plástica convencional íntegra (KYRIKOU *et al.*, 2007).

Dentro de los mecanismos de biodegradación es preciso mencionar además el criterio de las condiciones de desarrollo sobre el llamado sustrato primario que viene a ser la más alta concentración del xenobiótico (en este caso el

polietileno) que es degradada por las bacterias relegando como sustratos secundarios a concentraciones intermedias entre la baja concentración o mínima del sustrato y la concentración donde ocurre mayor actividad (SEMPLE, 2001, citado por LÓPEZ, 1998).

## **2.7. Actividad fisiológica microbiana en la degradación.**

Un ser vivo se define principalmente por desarrollar una serie de actividades biológicas, durante su ciclo vital. Ésta actividad biológica consiste en un variedad de reacciones fisicoquímicas que transcurren en el marco de las células y denominamos como bioquímica (BAILON, 2003).

El conjunto de reacciones que puede realizar un ser vivo se llama metabolismo y engloba tanto las reacciones de degradación (catabolismo) como de síntesis (anabolismo) (BAILON, 2003), cuando hay actividad microbiana la cantidad de OD tiende a disminuir ya que los microorganismos utilizan el oxígeno para su metabolismo (LÓPEZ, 1998).

IAKIMOV *et al.* (1994) manifestó que la bacteria *Pseudomonas sp.* Y2 utilizó estireno como única fuente de carbón y energía cuando ésta fue modificada genéticamente con el transposon Tn5 (Kmr), mostrando actividad transformante y desarrollar sobre tres tipos de compuestos como estireno, 2 - feniletanol y fenilacetato, mostrando que el 2 - feniletanol no es un metabolito obligado de la

transformación del estireno, concluyendo que la *Pseudomonas sp.* Y2 puede degradar el estireno por la vía oxidativa.

URIBE *-et -al.* (2010), describen 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, aislándose 6 cepas, identificadas como *Pseudomonas sp.* MP3a y MP3b, *Penicillium sp.* MP3a, *Rhodotorula sp.* MP3b, *Hyalodendron sp.* MP3c y una levadura no identificada. Asimismo los mismos autores reportan 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 54 % a pH 7 y 4.8 % a pH 5.5.

## **2.8. Condiciones ambientales para la biodegradación de polietileno**

Las condiciones para la biodegradación del polietileno son variables de acuerdo al tipo de microorganismos que se utilizaran en dicho proceso ya que

no todos los microorganismos tienen las mismas características, para 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 *et al.*, 2007).

## **2.9. Biorreactores de lecho fluidizado tipo air lift**

Un sistema de tratamiento biológico tipo Air lift, consiste básicamente en una columna en cuyo interior se encuentra una fase líquida móvil que contiene al lecho filtrante en suspensión y una fase continua de reacción de gas o líquido (AGUAYO, 2005).

Para BLENKLE *et al* (2002), un reactor de biopelícula de lecho circulante típico tiene dos fases: una fase sólida y una fase líquida que crean el movimiento de los sólidos dentro del biorreactor. Según EDWARDS *et al.*, (2002), pueden estar presente también una fase gaseosa la cual proporciona el sustrato gaseoso y/o generar el movimiento de la biopelículas. Los contaminantes a ser degradados por la biopelículas deben estar presentes en la fase líquida.

Según ZUBER *et al.*, (1997), los biorreactores del tipo Air lift son extensamente utilizados para el tratamiento de agua; sin embargo, su aplicación al tratamiento de gases ha sido escasamente desarrollada. Originalmente los biorreactores Air lift se desarrollaron para el pos tratamiento de aguas industriales tratadas anaeróbicamente, existiendo instalaciones a nivel industrial en funcionamiento (HEIJNEN *et al.*, 2001).

Los biorreactores air lift ofrecen ciertas ventajas con respecto a las demás tecnologías de tratamiento biológico, como la incorporación de transferencia y biodegradación total en un solo recipiente del biorreactor y además no presentan problemas de humedad, siendo el control de biomasa su única limitación (EDWARDS, *et al.*, 2002).

Los biorreactores tipo air lift están constituidos por una cámara de cultivo cilíndrica de vidrio, tubo deflector o de distribución central y frascos con solución saturada de NaCl como filtros para aire, la fuente de aeración fue una bomba de aire de pecera (AIR PUMP JUNIOR) que proporciona 1,100 mL/min (LÓPEZ, 1998; MIRANDA *et al.*, 2006).

Antes de poner en marcha la operación de un biorreactor es importante la esterilización al vapor de agua, utilizando el autoclave a 121 °C a 15 lbs/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos; y por sumersión en solución alcohol-ácida al 1 % (etanol-HCl) los accesorios del biorreactor como son la cubierta superior (material micro

poroso), válvulas de control de entrada/salida de aire y conectores de flujo de aire (LÓPEZ, 1998; MIRANDA *et al.*, 2006).

## **2.10. - Biopelículas**

EIGHMY *et al.* (1983), describen la biopelícula como un ensamblado de bacterias que está adosada por un pegamento a una superficie húmeda por medio de una matriz extracelular de polisacáridos fibrosos. Esta matriz, llamada cápsula o glicocálix, es sintetizada por las bacterias y su función principal es sujetar las células adsorbidas al soporte. WALEED (1993) describe la biopelícula como un entramado complejo de microorganismos dotados de sustancias poliméricas extracelulares. La distribución espacial de estos componentes principales dentro de la matriz de la biopelícula, así como sus propiedades (físicas, químicas y biológicas) influyen la actividad en el mismo y su relación con el ambiente acuoso inmediato. Además es muy dinámico y su composición y características cambian en el tiempo.

Según COSTERTON (1999), las biopelículas son comunidades bacterianas englobadas en una matriz de exopolisacáridos producida por las bacterias y adheridas a una superficie viva o inerte. En la naturaleza constituyen un modo de crecimiento protegido que permite la supervivencia de las bacterias en un medio hostil. Las estructuras que forman estas microcolonias contienen canales por los que circulan los nutrientes.

Lewandowski *et al.* (1994), citado por GÁLVEZ (2001) describe la biopelícula o biofilm, como una estructura compleja formada por agregados celulares (grupos de células densamente empaquetados) y huecos intersticiales, adherida a un material que puede ser de origen natural o sintético. Su estructura es morfológica y fisiológicamente distinta a la de bacterias libres, utilizándose incluso mediadores químicos intercelulares para desarrollar la película, los microorganismos de la biopelícula adheridos al soporte, toman principalmente el oxígeno de la atmósfera, para la respiración y se alimentan de materia orgánica contenida en el líquido residual, la cual difunde a través de la biopelícula por diversos mecanismos (WELTER *et al.*, 2004).

### **2.11. Formación de la biopelículas**

La primera fase es reversible, en función del proceso de adhesión de los microorganismos a la superficie que ocurre por fuerzas Van der Waals y atracciones electrostáticas. La segunda fase, ocurre con la interacción física de las células a la superficie por medio de material extracelular de naturaleza polisacárida o proteica producida por las bacterias, esta se denomina matriz de glicocálix, y soporta la formación de la biopelícula. El glicocalix, es producido después del proceso de adhesión superficial, y va a favorecer las condiciones de adhesión de los peptidoglicanos de las bacteria Gram positiva (COSTERTON, 1999).

Otra teoría citada por el mismo autor, sugiere para la formación de biopelículas, 5 etapas que esquemáticamente pueden ser colocadas en el siguiente orden:

- Acondicionamiento de la superficie por adsorción de materia orgánica.
- Transporte de células y nutrientes al sitio de adherencia.
- Inicio del proceso de adhesión bacteriana, todavía reversible, por atracción electrostática.
- Crecimiento celular, colonización y adhesión irreversible.
- La biopelícula presenta alta actividad metabólica y liberación de células localizadas en la periferia.

BARROS DE MACEDO (2000) describe la formación de la biopelícula en 3 etapas: Fijación de las bacterias, consolidación de las bacterias a la superficie, colonización y crecimiento de las bacterias. En la etapa de consolidación, ocurre la producción de material extracelular que facilita la fijación de los microorganismos.

Otros factores que incide en la adhesión de un microorganismo a determinada superficie, es la naturaleza del soporte, principalmente: balance entre cargas eléctricas resultantes en la superficie y rugosidad superficial.



La composición de población microbiana varía a medida que el efluente fluye a través del reactor. Las diferentes especies que crecen a lo largo del mismo contribuyen a la formación de un sistema mixto. La variedad y proporción de las diferentes especies de microorganismos dependen de varios factores, como por ejemplo: características del líquido residual a tratar, carga hidráulica, carga orgánica y disponibilidad de oxígeno. Debemos considerar también otros parámetros ambientales que si bien, para algunos autores son adicionales, contribuyen al éxito o fracaso del proceso, tales como: temperatura y pH (WELTER *et al.*, 2004).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Descripción de la zona de trabajo**

##### **3.1.1. Lugar de ejecución**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología General, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva ubicada en el campus universitario Km. 1.5 entre las coordenadas UTM 390631, 8971184 y 390642, 8971164, distrito de Rupa Rupa provincia de Leoncio Prado departamento de Huánuco, durante los meses de abril – septiembre.

##### **3.1.2. Condiciones climáticas**

El clima del área de muestreo (Moyuna), presenta alta pluviosidad con una precipitación anual promedio de 3,428.8 mm. Las mayores precipitaciones se producen entre los meses de noviembre a abril y alcanza un máximo extremo en el mes de enero con un promedio mensual de 4,830.6 mm, humedad relativa de 87% y una temperatura media anual de 24 °C (gabinete de meteorología UNAS).

### **3.2. Materiales y equipos**

Para la ejecución del presente trabajo de investigación, se utilizaron diferentes equipos, entre ellos oxímetro (HANNA) modelo HI 9146, pH metro (EXTECH) modelo 47227, termómetros digitales (ROAST) modelo JR- 5 y una balanza analítica marca AND modelo GR-200, debidamente calibrados.

### **3.3. Unidad experimental**

Se utilizaron tres tipos de polietileno de baja densidad – PEBD (bolsas plásticas tipo chequera) entre los cuáles se tienen polietilenos biodegradables de las tiendas Metro (d<sub>2</sub>W), polietilenos biodegradables de las tiendas Vea (d<sub>2</sub>W) y polietilenos sin marca de baja densidad color blanco.

### **3.4. Muestras de suelo**

#### **3.4.1. Ubicación del punto de recolección**

Las muestras de suelo se recolectaron de tres zonas distintas del botadero “Moyuna” de la ciudad de Tingo María, ubicada a 1.5 km de distancia a orillas del río Huallaga, del distrito de Rupa Rupa provincia de Leoncio Prado departamento de Huánuco.

### **3.4.2. Características de la Muestra**

Se recolectaron 250 g de suelo con plásticos en aparente estado de descomposición, dichas muestras fueron colocadas en bolsas plásticas nuevas estériles y trasladadas al laboratorio de microbiología.

## **3.5. Aislamiento, selección y elección de bacterias degradadoras de plástico**

### **3.5.1. Aislamiento**

Para el aislamiento se mezclaron las muestras recolectadas de las tres distintas zonas de La Moyuna procesándolas con la técnica de las diluciones decimales en caldo peptona y depositadas en placas con 10 mL de medio Mueller Hinton (MH) y medio CLED e incubados a temperatura ambiental (20 °C a 25 °C) por 24 a 72 horas en condiciones de aerobiosis (KUMAR *et al.*, 2001), permitiendo así el desarrollo bacteriano de especies ahí presentes. Luego de la incubación, las colonias desarrolladas se repicaron en 25 mL de medio BHI y se las mantuvo en refrigeración para un posterior uso en la etapa de adaptación (LÓPEZ, 1998).

### **3.5.2. Etapa de adaptación-selección de bacterias degradadoras de plástico**

Para la etapa de adaptación y selección, se repicaron las colonias mantenidas en BHI sobre placas con 10 mL de Agar Mínimo de Sales Minerales adicionado con concentraciones bajas (5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L y 20 mg/L) de bolsas de PEBD de las distintas procedencias en estudio. Se seleccionaron las especies bacterianas que crecieron en la más alta concentración probada en esta etapa, las cuáles se las consideró como un consorcio bacteriano, repicándolas en caldo BHI y mantenidas en refrigeración hasta la operación en los biorreactores.

Es preciso mencionar que se aislaron, seleccionaron e identificaron bacterias aplicando las técnicas de cultivo y aislamiento primario rutinarias y repiques en medios especiales para la identificación bioquímica (Buchanan y Gibbons, 1979; citados por KUMAR *et al.*, 2001).

### **3.6. Preparación de biorreactores**

Los biorreactores tipo air lift que se utilizaron para este trabajo fueron preparados en el laboratorio, constituidos por una cámara de cultivo cilíndrica de vidrio de 100 mm de diámetro 200 mm de altura, tubo deflector o de distribución central de 80 por 28 mm y frascos con solución saturada de NaCl como filtros para

aire, la fuente de aeración fue una bomba de aire de pecera (AIR PUMP JUNIOR) la que proporcionó 1,100 mL/min de O<sub>2</sub> (LÓPEZ, 1998; MIRANDA *et al.*, 2006).

La cámara de cultivo y tubo deflector o de distribución de los biorreactores se esterilizaron al vapor de agua, utilizando el autoclave a 121 °C a 15 lbs/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos; y se esterilizaron por sumersión en solución alcohol-ácida al 1 % (etanol - HCl) los accesorios del biorreactor como son la cubierta superior (materialmicro poroso), válvulas de control de entrada/salida de aire y conectores de flujo de aire (LOPEZ, 1998; MIRANDA *et al.*, 2006).

### **3.7. Operación en biorreactores de los cultivos**

Las bacterias seleccionadas y mantenidas en refrigeración, fueron reactivadas en nuevos medios BHI constituyéndose en inóculos de siembra para los biorreactores tipo air lift en una proporción del 15 % del volumen total del biorreactores (1,000 mL). La operación se dio inicio al poner en funcionamiento las bombas aireadoras con un tiempo de operación de 7 días.

### **3.8. Datos a registrar**

#### **3.8.1. Determinación de la biomasa**

Para la determinación de biomasa se procedió con la siembra en placas petri para los cuales se realizó las diluciones seriadas en tres tubos de

ensayo de 100 uL de muestra extraídos del biorreactor con una pipeta milimétrica, del cual se hizo la siembra en profundidad en Agar Plate Count de 100 uL del último tubo de la serie de muestra llevándose a la incubadora a 37 °C por 24 horas debidamente selladas para evitar la contaminación, posteriormente se realizó el conteo de las colonias, expresando en células por mililitros (cél/mL).

### **3.8.2. Determinación de oxígeno disuelto**

Se determinó mediante el método de membrana adaptada a un biosensor utilizando un Oxímetro marca HANNA modelo HI 9146 debidamente calibrado, realizando una prueba testigo al inicio de la operación, a los tres días y al final de la operación del biorreactor (siete días). Los resultados se reportaron en mg/L.

### **3.8.3. Determinación del pH**

Se utilizó para la determinación del pH, un potenciómetro o pH metro debidamente calibrado. La acidez titulable, se midió aplicando el método N° 942.15 (AOAC, 1997) y el pH por el método N° 11.032 (AOAC, 1996), los datos se registraron al inicio, a los tres días y al final de la operación del biorreactor.

### 3.8.4. Determinación de temperatura

La temperatura interna de operación se midió al inicio, a los tres días y al final de la operación (siete días), por los termómetros ambientales calibrados (ROAST) acoplados a los biorreactores.

### 3.8.5. Concentración de bolsas de polietileno de baja densidad

La degradación del polietileno se determinó por la disminución de concentración del mismo presente en los biorreactores, para lo cual se trabajó con cuatro concentraciones de 50, 100, 150 y 200 mg/L, al momento de iniciar la operación pesando las muestras a tratar en una balanza analítica marca AND modelo GR – 200, para los datos que se deberían registrar a los tres días se hizo un cálculo utilizando la ecuación siguiente:

$$\frac{dc}{dt} = -kc^n$$

$$C = C_0 e^{-kt}$$

Donde:

C = concentración final

C<sub>0</sub> = concentración inicial

T = tiempo

K = constante



$$K = \frac{\ln \frac{c}{c_0}}{t}$$

Con la cual se determinó el peso a los tres días, ya que el pesado en balanza era imposible por lo que se trataba de un reactor cerrado existiendo la posibilidad de contaminarse si es que se extraían las muestras.

Para la determinación de la concentración final de la operación se procedió a autoclavara 121 °C a 15 lbs/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos todo el medio de cultivo, extrayendo posteriormente las muestras de PEBD, enjuagando con agua destilada y llevando a la estufa durante 12 - 24 h a 80° C para el secado de las muestras y hacer el peso correspondiente.

### **3.8.6. Identificación de microorganismos**

Para la determinación de las bacterias que degradaron el polietileno de baja densidad, se repicaron alícuotas de 100 uL a partir de los efluentes de los biorreactores en placas petri con medio Mueller Hinton y CLED, se incubaron a 37 °C por 24 horas, para luego escoger las colonias con diferentes características culturales para posteriormente realizar pruebas en medios bioquímicos diferenciales para su identificación.

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1. Biomasa**

En los biorreactores donde se probó la degradación de polietileno de baja densidad se pudo detectar enturbiamiento del medio, el cual nos 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 (7 días), a continuación se muestra en el Cuadro 1 los resultados obtenidos del número de microorganismos y en las Figuras 1, 2, 3 las curvas de crecimiento microbiano para los tres tipos de PEBD para las cuatro concentraciones probadas, además se presenta el Cuadro 2 donde se muestra las diferencias de crecimiento microbiano para los tres tipos de PEBD según la prueba de Duncan.

Cuadro 1. Biomasa al inicio, a los 3 días y al final de la operación en los biorreactores

Tipo de bolsas	Concentración PBD (mg/L)	Biomasa inicial (cél/mL x 10 <sup>4</sup> )	Biomasa a 3 días (cél/mL x 10 <sup>4</sup> )	Biomasa final (cél/mL x 10 <sup>4</sup> )
Metro	50	15	563.2	936.4
	100	19.5	732	1064.5
	150	36.5	896	1143.5
	200	62.5	464.8	1153.5
Vea	50	358.5	3500	36400
	100	472.5	700	3700
	150	389.5	4740	58500
	200	473.1	4250	62500
Sin Marca	50	1500	1800	8500
	100	200	2944	11000
	150	400	1568	24100
	200	200	2296	32800

CURVA DE VARIACION DE BIOMASA PARA PEBD DE METRO

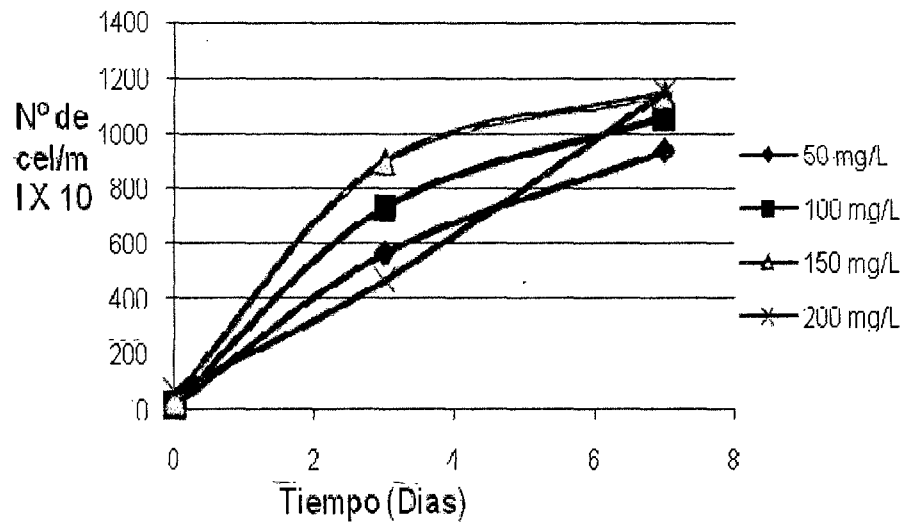


Figura 1. Curvas de biomasa para datos de PEBD de Metro d<sub>2w</sub>.

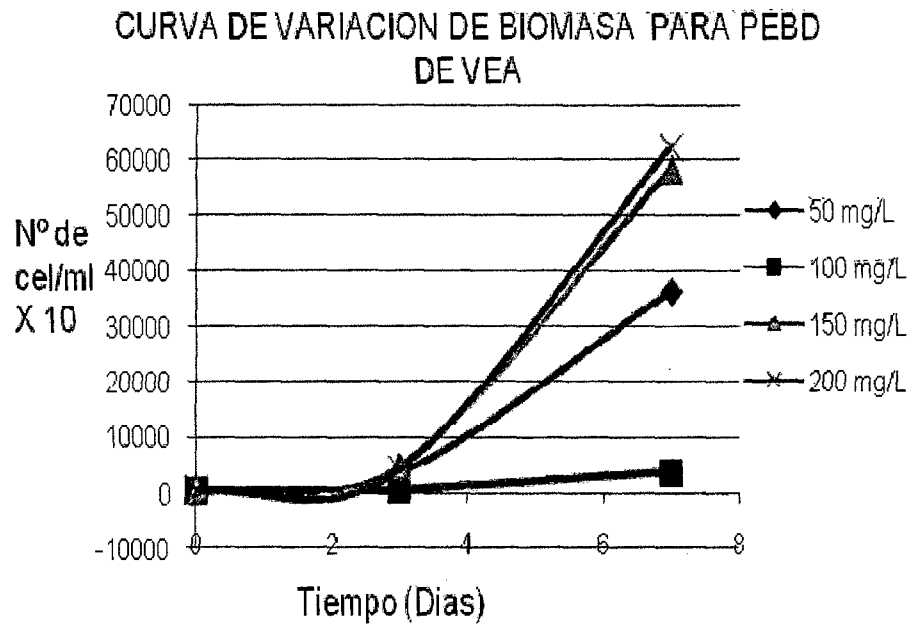


Figura 2. Curvas de biomasa para datos de PEBD de Vea  $d_{2w}$ .

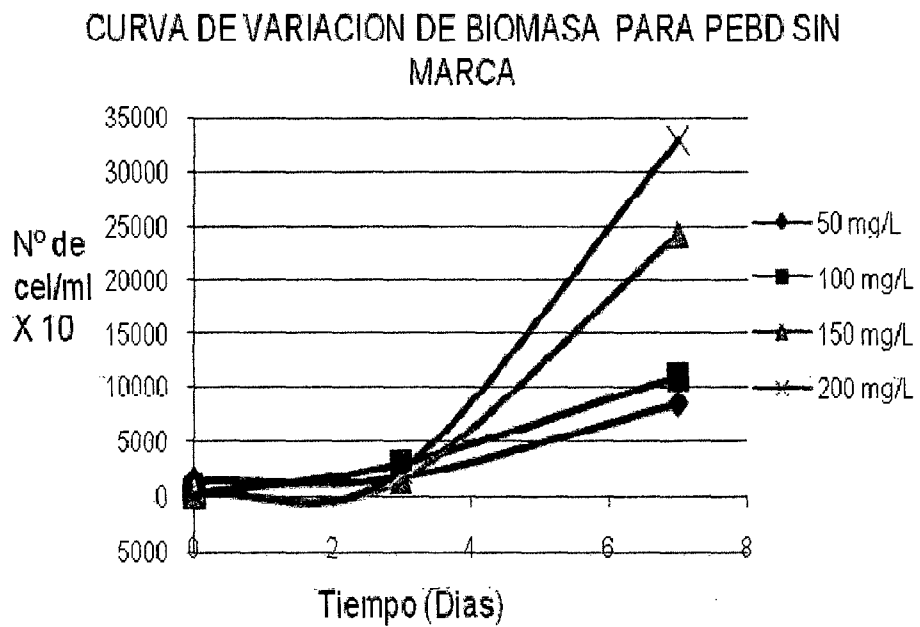


Figura 3. Curvas de biomasa para datos de PEBD sin marca.

Cuadro 2. Prueba de Duncan respecto a biomasa y tipos de Plástico

	<b>Bolsas</b>	<b>Promedios</b>	<b>Sig <math>\alpha = 0.05</math></b>	<b>Grupos</b>
<b>Duncan</b>	1	5906166.667	0.314	B
	3	72756666.67	0.314	B
	2	214078000	1	A

#### 4.2. Oxígeno disuelto

El Cuadro 3 nos muestra los datos registrados de OD en mg/L para los tres tipos de PEBD en las cuatro concentraciones al inicio de la operación (0 días), a los 3 días y al final de la operación (7 días), así como las Figuras 4, 5 y 6 nos muestran las variaciones de dichos datos para los tres tipos de PEBD en las cuatro concentraciones.

Cuadro 3. Datos registrados de oxígeno disuelto

<b>Bolsas</b>	<b>PBD mg/L)</b>	<b>OXIGENO DISUELTO (mg/L)</b>		
		<b>Inicial (0 días)</b>	<b>3 días</b>	<b>Final(7 días)</b>
Metro	50	6.6	6.27	6.09
	100	6.6	6.14	5.92
	150	6.63	6.1	6.00
	200	6.6	5.87	5.59
Vea	50	5.64	5.21	5.15
	100	5.64	5.4	5.35
	150	5.64	5.33	5.29
	200	5.64	5.12	5.07
Sin Marca	50	6.26	6.22	6.16
	100	6.26	6.19	6.19
	150	6.26	6.24	6.23
	200	6.26	6.18	6.13

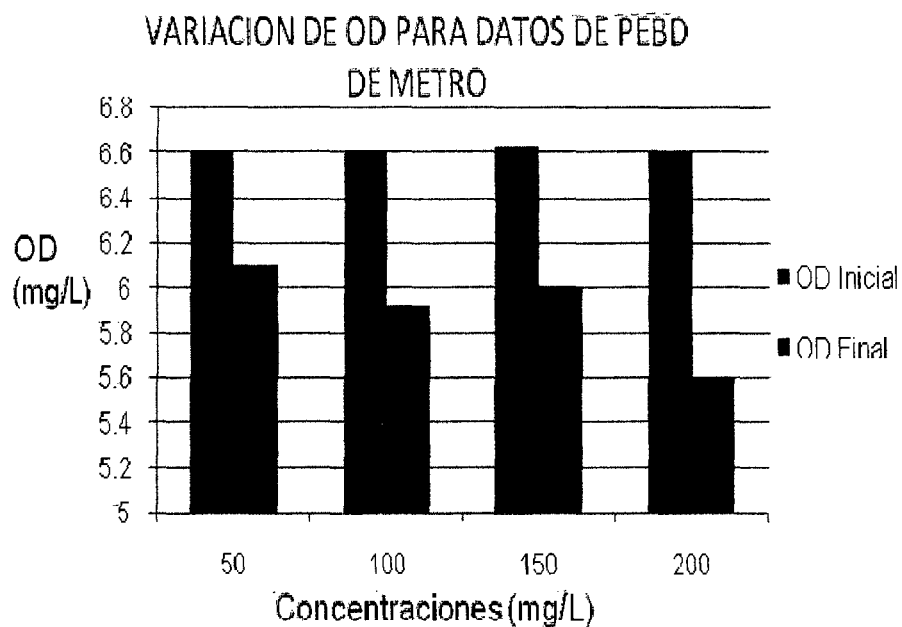


Figura 4. Variación de OD inicial y final para los datos de PEBD de Metro.

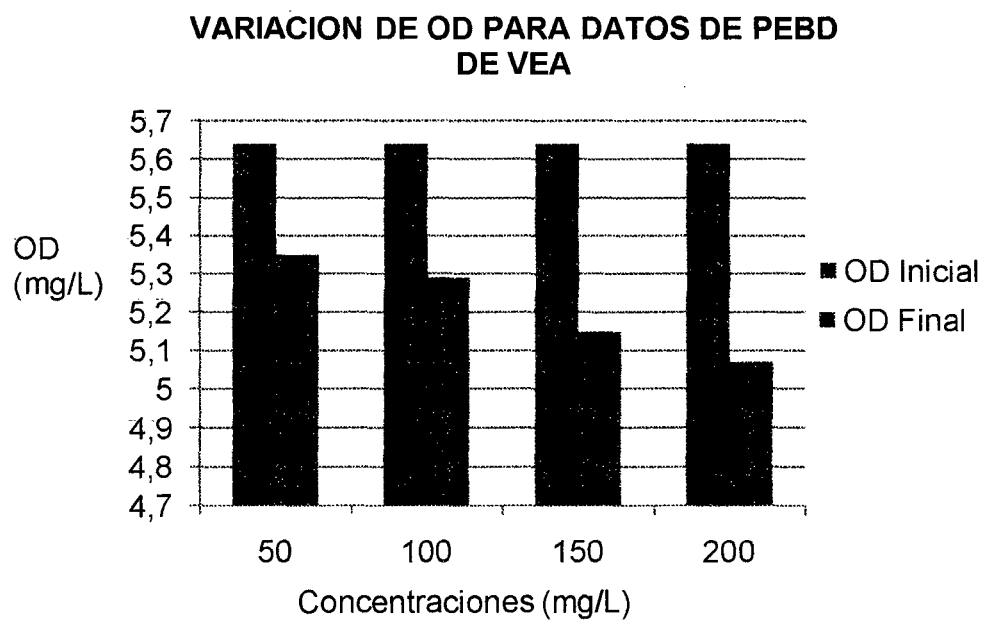


Figura 5. Variación de OD inicial y final para los datos de PEBD de Vea.

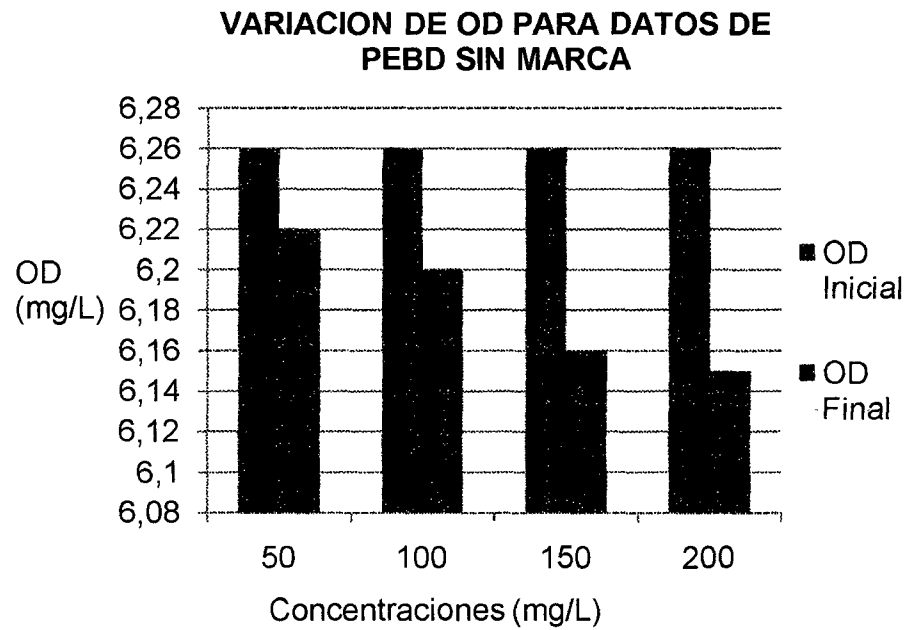


Figura 6. Variación de OD inicial y final para los datos de PEBD sin marca.

El Cuadro 4 nos muestra las comparaciones de OD entre los tres tipos de PEBD según la prueba de Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

Cuadro 4. Comparaciones de OD entre los tres tipos de bolsas para pruebas de Duncan

Prueba	Bolsas	Promedios	Sig $\alpha = 0.05$	Grupos
Duncan	1	5.6992	1	C
	3	6.3217	1	B
	2	6.8133	1	A

### 4.3. pH

El Cuadro 5 nos muestra los datos registrados de pH para los tres tipos de PEBD en las cuatro concentraciones al inicio de la operación (0 días), a los 3 días y al final de la operación (7 días), así como las Figuras 7, 8 y 9 nos muestran las variaciones de dichos datos para los tres tipos de PEBD en las cuatro concentraciones.

Cuadro 5. Datos registrados de pH

Tipo de bolsas	PBD (mg)	pH		
		Inicial (0 días)	a 3 días	Final (7 días)
Metro	50	8.4	8.37	8.3
	100	8.4	8.33	8.22
	150	8.4	8.31	8.3
	200	8.4	8.35	8.21
Vea	50	6.85	6.58	6.58
	100	6.85	6.61	6.57
	150	6.85	6.63	6.57
	200	6.85	6.7	6.61
Sin Marca	50	6.5	6.4	6.4
	100	6.5	6.48	6.48
	150	6.5	6.48	6.48
	200	6.5	6.52	6.47



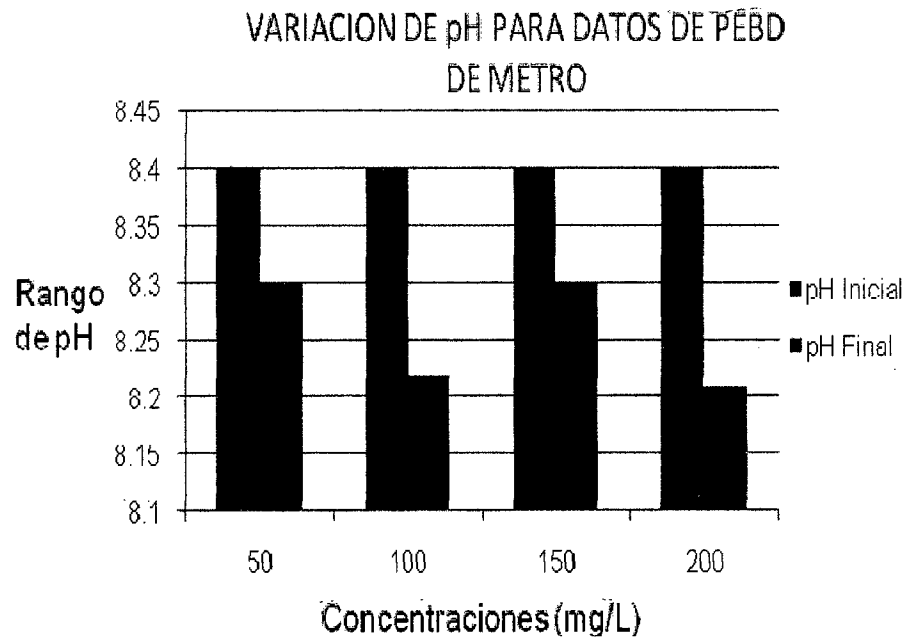


Figura 7. Variación de pH inicial y final para los datos de PEBD de Metro.

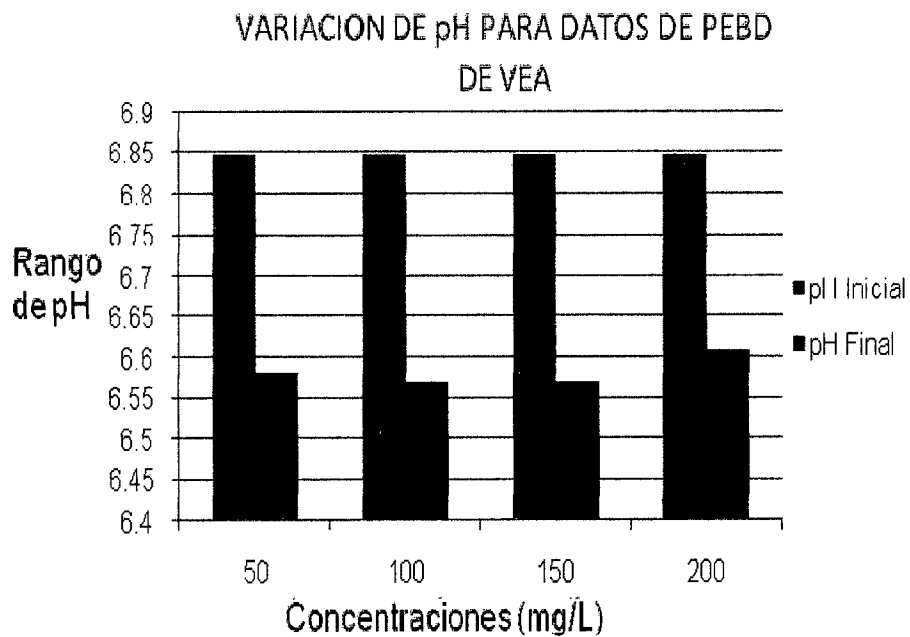


Figura 8. Variación de pH inicial y final para los datos de PEBD de Vea.

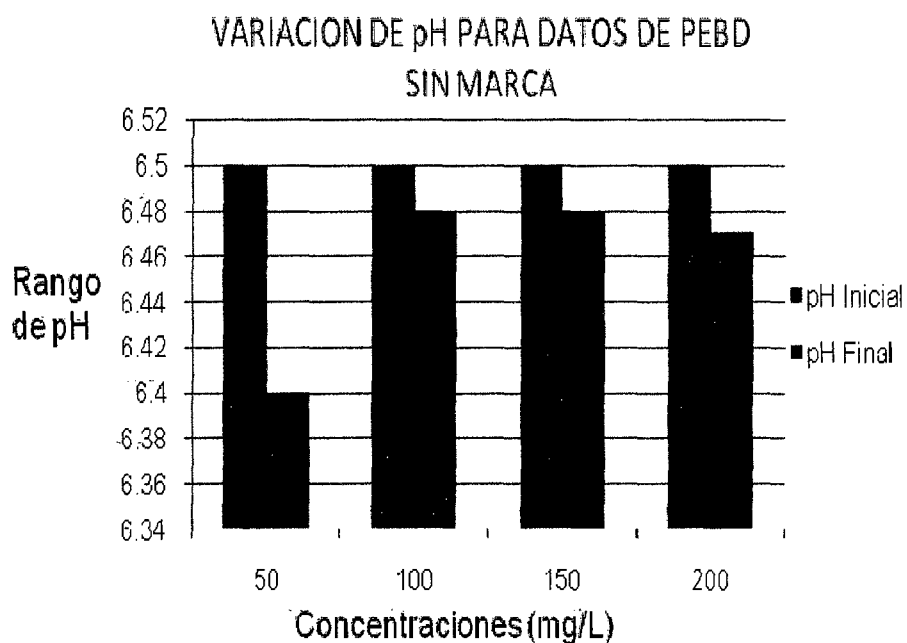


Figura 9. Variación de pH inicial y final para los datos de PEBD sin marca.

En el Cuadro 6 que presentamos a continuación podemos observar las comparaciones con respecto a pH entre los tres tipos de PRBD según la prueba de Duncan.

Cuadro 6. Comparaciones de pH para los tres tipos de plástico según la prueba de Duncan.

Prueba	Bolsas	Promedios	Sig $\alpha = 0.05$	Grupos
	3	6.4617	1	A
<b>Duncan</b>	2	6.6875	1	B
	1	8.2758	1	C

#### 4.4. Concentración de polietileno

El Cuadro 7 nos muestra los datos registrados de concentración (peso) en mg/L para los tres tipos de PEBD en las cuatro concentraciones al inicio de la operación (0 días), a los 3 días y al final de la operación (7 días) así como las Figuras 10, 11 y 12 nos muestran las variaciones de dichos datos para los tres tipos de PEBD en las cuatro concentraciones con respecto al tiempo.

Cuadro 7. Datos registrados de concentración (peso)

<b>TIPO DE BOLSAS</b>	<b>Inicial ( 0 días) (mg/L)</b>	<b>3 días (mg/L)</b>	<b>final (7 días) (mg/L)</b>
Metro	50	48.16	45.8
	100	98	95.4
	150	148.62	146.8
	200	199.31	198.4
Vea	50	49.65	49.2
	100	100.59	101.4
	150	149.87	149.7
	200	200.55	201.3
Sin Marca	50	50.93	55.2
	100	101.98	108.7
	150	151.49	159.5
	200	202.76	215.5

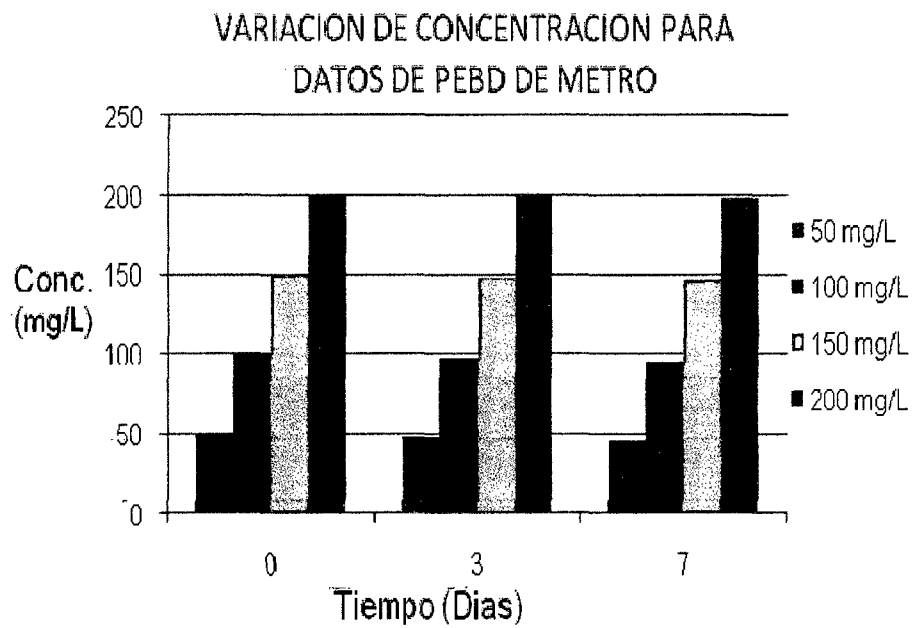


Figura 10. Variación de concentración para PEBD de Metro

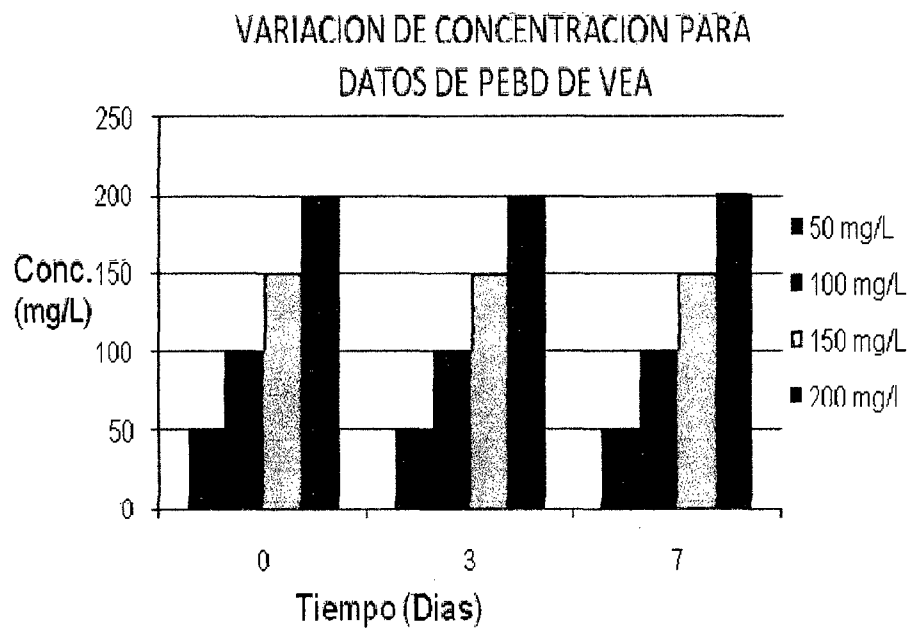


Figura 11. Variación de concentración para PEBD de Vea

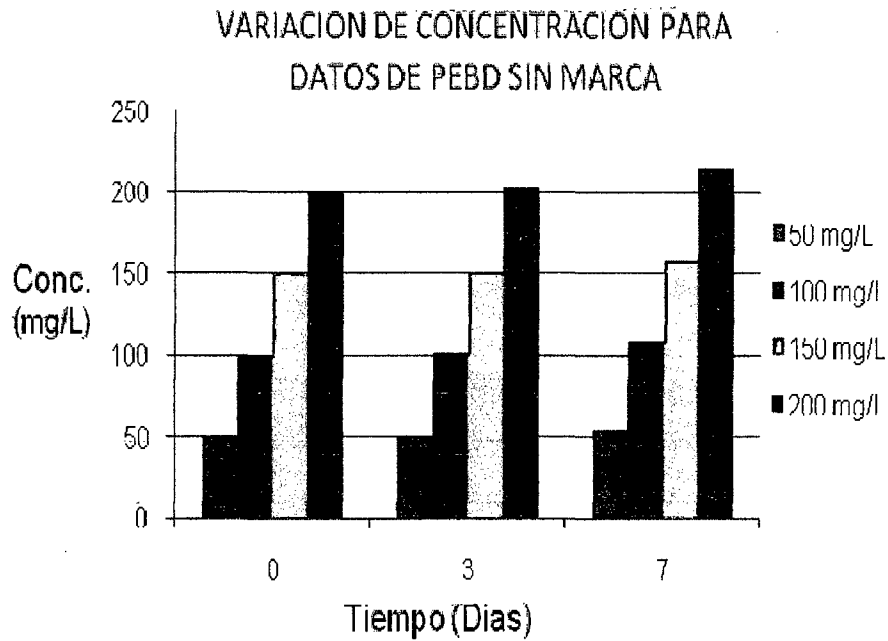


Figura 12. Variación de concentración para PEBD sin marca

El Cuadro 8 nos muestra las variaciones de concentración (peso) entre los tres tipos de PEBD según la prueba de Duncan durante la operación de los biorreactores.

Cuadro 8. Comparaciones de concentración para los tres tipos de PEBD según la prueba de Duncan.

<b>Bolsa</b>	<b>Promedio</b>	<b>Sig alfa = 0.05</b>	<b>Grupos</b>
1	98.6283	1	A
2	125.1883	1	B
3	127.005	1	C

#### 4.5. Análisis de varianza para los resultados de biodegradación de polietileno de baja densidad

El Cuadro 9, nos muestra el análisis de varianza de los datos registrados durante la operación de los biorreactores entre los tres tipos de PEBD y las cuatro concentraciones con las que se probó.

Cuadro 9. ANVA de los resultados de biodegradación de polietileno de baja densidad (bolsas de plástico).

Fuente	G.L.	Suma Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Fo	Significancia
Tratamientos	36-1=35	3.43881E+17	0.497489241	1.4924677	1.42	**
Bloques	4-1=3	3.40408E+17	0.492466032			
Error	(35)(3)= 105	6.91232E+17				
Total		1.37552E+18				

#### 4.6. Microorganismos determinados

La determinación de los microorganismos nos da como resultados que entre las bacterias que degradan el polietileno se encuentran bacterias del género *Pseudomonas sp*, *Edwarsiella sp*. y *Alcaligenes sp*. De los cuales en mayor proporción correspondieron a *Pseudomonas sp*.

Cuadro 10. Resultados de las pruebas de identificación bioquímica

<b>Pruebas</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
kovans (indol)	-	-	-	-
RM	-	-	+	-
VP	-	-	-	-
Citrato	+	-	-	-
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A
lactosa	-	-	+	-
glucosa	+/-	+/-	+	+/-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
gas	+/-	+/-	+	+/-
LIA	K/K	K/K	K/A	K/K
Urea	-	-	-	-
Malonato	-	-	-	-

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Biomasa

Según KOUTNY *et al.* (2006) menciona que en muchos estudios se observó un crecimiento rápido de los microorganismos en el comienzo de la incubación debido al consumo de los aditivos y/o fragmentos oxidables de bajo peso molecular sobre el polietileno sin que ello signifique degradación real del plástico. En nuestro caso se realizaron desinfecciones con etanol al 70 % y tres lavados con agua destilada del polietileno antes de llevar al autoclave a vapor fluente de las bolsas de polietileno de baja densidad (PEBD), con lo que se eliminó los aditivos o fragmentos superficiales que permiten el desarrollo de bacterias, por lo que argumentamos respecto a la presencia incrementada de biomasa en el Cuadro 1 de los resultados que hay degradación de PEBD dentro de los biorreactores

En los datos de biomasa (colonias de microorganismos) registradas en los resultados Cuadro 1 podemos observar un crecimiento de los microorganismos en los tres tipos de polietileno conforme van pasando los días, así en la Figura 1 las curvas presentan una tendencia de incremento hasta el cuarto día



manteniéndose ligeramente constante al final de la operación (7 días) para concentraciones de 50, 100 y 150 mg/L por lo cual podemos afirmar que los microorganismos tienden a reproducirse y colonizar los zenobióticos hasta el cuarto día en las concentraciones antes mencionadas, presentando una curva distinta para la concentración de 200 mg/L en la cual se observa un incremento constante conforme pasan los días, lo cual se debe a que a esta concentración hay mayor adaptación por parte de los microorganismos, esto también se debe a que la reproducción de microorganismos continua inclusive mas de los 7 días debido a que hay mayor cantidad de superficies del PEBD que colonizar formando biopelículas superficiales tal como menciona (URIBE, 2010).

En las Figuras 2 y 3 para PEBD provenientes de Veá y PEBD sin marca podemos observar que hay una similitud entre estos dos tipos de PEBD pero muy distinta con respecto a los datos de PEBD de Metro, de las Figuras 2 y 3 podemos decir que hay mayor crecimiento de microorganismos en las concentraciones de 150 y 200 mg/L y siendo menor en las concentraciones de 50 y 100 mg/L de PEBD estos resultados se deben a que para estos tipos de polietileno de baja densidad hay mayor adaptación a mayor concentración, pudiendo darse también debido a la presencia de residuos de colorantes que constituyen nutrientes para los microorganismos, tal como lo reportan KOUTNY *et al.* (2006).

Se puede apreciar claramente que hay diferencias con respecto a la biomasa de los microorganismos entre los tres tipos de PEBD, esto se comprueba con las pruebas de medias según Duncan Cuadro 2 de los resultados, donde se observa que hay diferencias entre el incremento de biomasa sobre los tres tipos de polietileno de baja densidad. Comprobándose además que si existe diferencias entre los tipos de plástico (Metro, Vea, sin marca) y el crecimiento de microorganismos el cual nos indica que hubo degradación de polietileno ya que los microorganismos sintetizaron el zenobiótico (PEBD).

## **5.2. Oxígeno disuelto (OD)**

Según LÓPEZ (1998) menciona que cuando hay actividad microbiana la cantidad de (OD) disminuye, ya que los microorganismos utilizan el oxígeno para su metabolismo, cuando estos son aerobios. Lo que se ha podido observar en el Cuadro 3 de los resultados que la cantidad de (OD) a disminuido ligeramente lo cual nos indica el metabolismo del polietileno por parte de los microorganismos siendo concordante con lo mencionado por LÓPEZ (1998).

En la figura 4, de OD presentada en los resultados podemos observar que hay disminución en la cantidad de OD para PEBD provenientes de Metro siendo mayor dicha disminución en la concentración de 200 mg/L debido a que en esta concentración los microorganismos siguen aumentando en población, siendo menores las disminuciones de OD para concentraciones de 50, 100 y 150 mg/L

esto debido a que en estas concentraciones la cantidad de microorganismos tiende a mantenerse ligeramente constante al final de la operación del biorreactor (7 días).

En la Figura 5 de OD para PEBD provenientes de Vea podemos observar que hay disminución de OD al final de la operación (7 días) en toda las concentraciones, siendo mayor dicha disminución en concentraciones de 150 y 200 mg/L esto debido a que hay mayor cantidad de microorganismos en estas concentraciones por lo tanto hay mayor actividad microbiana.

En la Figura 6 para los PEBD sin marca podemos observar que el comportamiento de los microorganismos es similares a los datos de PEBD provenientes de Vea siendo mayor la disminución de OD en las concentraciones de 150 y 200 mg/L uno de las causas de este resultado se debe a que en estas concentraciones hay mayor cantidad de microorganismos en actividad, pudiendo existir además las llamadas fuerzas de corte mencionadas por LÓPEZ (1998). Los cuales ayudarían a la degradación del PEBD debido a la fricción y condiciones cambiantes como la humedad, pH, presión osmótica, etc.,

### **5.3. pH**

El Cuadro 5 nos presenta los datos registrados de pH en los cuales se pueden observar que hay disminución de pH final con respecto al inicial para los

tres tipos de PEBD, la Figura 7 nos muestra la variación de pH para PEBD de Metro siendo mayor la disminución en concentraciones de 100 y 200 mg/L y menores en 50 y 150 mg/L estas disminuciones también se pueden observar para los PEBD provenientes de Vea Figura 8 de los resultados en este caso se puede ver que hay mayor disminución para concentraciones de 100 y 150 mg/L, en general los dos tipos de PEBD tienden a acidificar el medio siendo uno de las causas de este resultado es la composición del material pro-oxidante ( $d_2w$ ) con la que son fabricados los PEBD provenientes de Metro y Vea el cual tiene como componentes sales metálicas de hierro, manganeso, níquel y cobalto según SCOTT y WILES, (2001) como bien sabemos que los metales como el aluminio acidifican inclusive los suelos.

En la Figura 9 podemos observar la variación de pH para PEBD sin marca en los cuales podemos ver que hay mayor disminución de pH para la concentración de 50 mg/L y siendo menor la disminución para las concentraciones de 100, 150 y 200 mg/L, con tendencias a ácido, por el cual podemos decir que hay menor disminución de pH debido a que este no está fabricado con el componente pro-oxidante con las que están fabricados los PEBD de Metro y Vea, además esto podría estar dándose debido a la segregación de enzimas por parte de los microorganismos en el intento de degradación del polietileno sin marca ya que este es mucho más difícil de descomponerse o romper los enlaces del polietileno.

Los rangos de pH en donde hay actividad microbiana están entre 6.3 y 8.4 según nuestros resultados obtenidos, si consideramos a URIBE *et al.* (2010), nuestros resultados no están dentro de los rangos mencionados por el autor, esto se debe a que nuestro trabajo se realizó en medio acuoso a diferencia de los autores antes mencionados realizan las pruebas en placas con medios de agar glucosado sabouraud y agar TSA y ASG en plano inclinado.

Según URIBE *et al.* (2010), probó la biodegradación de polietileno en pH de 7.0 y 5.5 en una temperatura de 20 °C, encontrando resultados favorables en los cuales existe degradación por parte de *pseudomonas sp.*, si consideramos el rango de pH en las que trabajo el autor nuestros resultados se asemejan a los propuestos anteriormente por URIBE *et al.* (2010), ya que nuestro trabajo se realizó entre 8.4 y 6.4 de pH encontrando actividad microbiana.

#### **5.4. Concentración en peso de PEBD**

En los datos registrados de concentración de polietileno (Cuadro 7), se puede observar la pérdida de peso de los plásticos conforme avanza los días en provenientes de METRO y sufriendo un aumento de peso para las bolsas de VEA y Comerciales, estos aumentos de peso se dan debido al estar adheridos los microorganismos (colonizando) en los trocitos de plástico consumiendo algún aditivo que haya quedado sobre las bolsas a pesar del lavado exhaustivo practicado a los plásticos antes de la operación del biorreactor.

En la Figura 10 de los resultados para PEBD de Metro podemos ver que hay una mayor disminución en peso con respecto a los PEBD de Vea y sin marca con mayor tendencia a disminución en peso al final de la operación (7 días) para concentraciones de 50, 100 y 150 mg/L, en la Figura 11 podemos ver que la disminución en peso solo se presenta para concentraciones de 50 y 150 mg/L al final de la operación (7 días) sufriendo un incremento en las concentraciones de 100 y 200 mg/L estos últimos resultados se dan debido a que los microorganismos se encuentran adheridos en forma de biofilms o consorcios microbianos según lo menciona URIBE *et al.* (2010), para los PEBD sin marca Figura 12 se observa un incremento en peso al final de la operación (7 días) para toda las concentraciones uno de las causas por las cuales se da este resultado es la formación de biofilms o consorcios microbianos antes mencionados por URIBE *et al.* (2010).

Otra de las causas del incremento en peso se da debido a la fijación de microorganismos en los trocitos de PEBD para su descomposición ya que estas son más difíciles de ser metabolizadas, también no se debe descartar que este incremento para los PE comerciales se debe a que los microorganismos podrían estar degradando algún aditivo de los trocitos de PE como puede ser la pintura y otros compuestos que son utilizados para la fabricación de los PE sin marca.

Según FILIP (1985), en cuanto a los criterios y técnicas empleados para evaluar los resultados de una biodegradación de un plástico determinado, se

encuentran, la pérdida de peso luego de remoción de la biomasa de la superficie del polímero y la espectroscopia, sirviendo esta última para determinar cambios estructurales del polímero debido a la actividad microbiana, a lo que podemos decir que en nuestro estudio también se tomó en cuenta la disminución en peso de los PEBD durante el periodo que duro la prueba observándose en la Figura 10 de los resultados una mayor disminución en peso para PEBD provenientes de Metro.

Las comparaciones de concentración Cuadro 8, con los tres tipos de plástico según Duncan presentan diferencia significativa con respecto a las bolsas de Metro en comparación a las de Vea y sin marca, por lo que decimos que los aditivos diferenciales para la comercialización de estas bolsas contienen sustratos apetecibles por las bacterias que colonizan su superficie.

### **5.5. Caracterización de microorganismos**

Respeto a los géneros bacterianos caracterizados en nuestro trabajo y que posiblemente degradan polietileno, la *Pseudomonas sp.* Y2 ha sido reportada en algunas investigaciones como responsable de la biotransformación de polietileno y poliestireno (IAKIMOV *et al.*, 1994). Por otro lado, LEE *et al.* (1991) reportaron la degradación del polietileno por cepas de bacterias, aunque no menciona que géneros bacterianos están involucrados. URIBE *et al.* (2010) logró identificar cepas de *Pseudomonas sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Hyalodendrom sp* y una levadura no identificada, capaces de degradar polietileno,

en nuestro caso las *Pseudomonas sp.* Son conocidas de poseer enzimas tipo monooxigenasas y dioxigenasas capaces de romper los enlaces de poliestireno y polietileno tal como lo reporta KYRIKOU *et al.* (2007).

Según KOUTNY *et al.* (2006), el PE considerado como inerte, puede ser biodegradado si se emplea la cepa microbiana adecuada, así el autor reporta que se hicieron estudios con la bacteria termófila actinomicetal *Brevibacillus borstelensis* capaz de utilizar el polietileno como única fuente de carbono. En 30 días a 50 °C, esta bacteria disminuyó el peso molecular de un polietileno fotodegradado un 30% y el peso del material en un 11%, *B. borstelensis* también biodegradó el polietileno no irradiado. En nuestro caso el polietileno de Metro ha sido degradado casi en similares condiciones por los géneros *Pseudomonas* y *Alcaligenes*.

#### **5.6. Correlación de Spearman**

De la correlación de Spearman en el Cuadro 13, se puede decir que no hay diferencia entre la biomasa y OD, pero existen diferencias altamente significativas entre la biomasa y el pH; las correlaciones entre OD y pH presentan diferencias significativas para un intervalo de confianza del 5 %, por lo cual se puede afirmar que hubo metabolismo por parte del consorcio microbiano.



## VI. CONCLUSIÓN

1. Se observó aumento en la concentración celular de microorganismos con respecto al inóculo inicial en cifras variables de  $936.4 \times 10^4$  a  $62,500 \times 10^4$  células por mililitro.

2. Entre las condiciones óptimas en las que se realizó la degradación por actividad microbiana se encuentran un pH de 6.4 – 8.3, temperatura 24 °C – 30 °C, oxígeno disuelto inicial de 5.64 a 6.6 mg/L.

3. se observó disminución en peso para PEBD provenientes de Metro en 4.2 mg para la concentración de 50 mg/L, 4.6 para la concentración de 100 mg/L, 3.2 mg para la concentración de 150 mg/L y 1.6 mg para la concentración de 200 mg/L.

4. Los microorganismos que mejor se adaptaron a la degradación de polietileno de baja densidad - PEBD son *Pseudomonas sp.*, *Edwardsiella sp.* y *Alcaligenes sp.*

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas de degradación con bacterias aumentando el periodo de tiempo de incubación para poder observar exactamente en cuanto tiempo pueden ser degradadas en su totalidad.
2. Tomar todas las medidas de seguridad del caso para no sufrir infecciones por los microorganismos ya que estos tienden a ser patógenos.
3. Es preciso evaluar por espectroscopia infra-rojo los cambios estructurales del polietileno.

## VIII. ABSTRACT

In the present research we tested the ability of bacteria isolated from environmental native dump the Moyuna of Tingo Maria, to degrade plastic bags (LDPE), using bioreactor air-lift in a submerged system with the only source carbon and energy constituted for low density polyethylene, able to isolate the bacteria that develop in the presence of low density polyethylene the species *Pseudomonas sp.*, *Edwardsiella sp.* and *Alcaligenes sp.*, which are regarded as the most efficient in the biodegradation of polyethylene and is adapted to the conditions of microbial activity within a range of 6.4 - 8.3 pH at temperatures of 24 to 30 ° C in aqueous medium, noting further the adhesion of microorganisms to some polymer particles developed in the form of aggregates or microbial consortium.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRUSCI C., MARQUINA D., SANTOS A., DEL AMO A., CORRALES T., CATALINA F. 2009. Biodeterioration of cinematographic cellulose triacetate by *Sphingomonas paucimobilis* using indirect impedance and chemiluminescence techniques. *Int. Biodet. Biodeg.*, 63, 759-769 p.
- AGUAYO, P. 2005. Optimización de un sistema de tratamiento biológico de aire tipo airlift para la eliminación de vapores contaminados con hidrocarburos volátiles. Universidad Nacional de Temuco, Chile 23 p.
- ALBERTSSON, A., KARLSSON, S. 1988. The three stages in degradation of polymers - polyethylene as a model substance. *J. Appl. Polym. Sci.*, 35 1289 - 1302 p.
- ALONSO, M., VILTE, E., MADREGAL, S., SARAVIA, J., APAZA, A., LOZANO, A. 2001. Biodegradación de polietileno de alta y de baja densidad a diferentes condiciones operativas. Trabajos presentados en el XXIV Congreso de ASADES, Mendoza, Argentina, 23 al 26 de octubre, Bogotá, Colombia, 134 p.
- ARIOSTI, A. 1999. "Los envases plásticos y el medio ambiente". *INTI - Investigación y Desarrollo*, año 2, Nº 6. 89-95 p.

- BAILON, L., CRUZ, G., CERVANTES, A. 2003. Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, México 54 p.
- BARROS DE MACEDO, J. 2000. Aguas&Aguas. Ed. Ortofarma. Bello Horizonte. Brasil. 20 p.
- BLENKLE, F., SMERT, D. 2002. Biotransformation of Aromatics Hydrocarbons. Material for distribution only to students. *Biodegradation & Bioremediation*. Estados Unidos 65 p.
- CACCIAR, I., QUATRINI, P., ZIRLETTA, G., MINCIONE, E., VINCIGUERRA, V., LUPATTELLI, P., GIOVANNOZZI, G. 1993. Isotactic polypropylene biodegradation by a microbial community: Physicochemical characterization of metabolites produced. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 p.
- CARRASCO, F. 1991. Residuos plásticos: reciclaje y medio ambiente. Ingeniería Química, Mayo, 181-185 p.
- CLUTARIO, M., CUEVAS, V. 2001. Colonization of Plastics by *Xylaria* sp. *Philippine Journal of Science*. Vol. 130, N° 2. 36 p.
- COMISIÓN TÉCNICA PLASTIVIDA 1999. Manual de valorización de los residuos plásticos, edit. FIPMA y PLASTIVIDA ARGENTINA, Buenos Aires, Argentina, 87 p.
- COSTERTON, J. W., PHILIP, S. S., GREENBERG, E. P. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284 p.

- CUEVAS, V., MANALIGOD, R. 1997. Isolation of decomposer fungi with plastic degrading ability. *Philippine Journal of Science* 126: 117-130 p.
- EDWARDS, S., SCHROEDER, CHANG, D., MORTON, R. 2002. Control of volatile organic compound emissions using a compost biofilter. *Biotechnology and Water Environmental Research*. 316 - 321 p.
- EIGHMY, T., MARATEA, D., BISHOP, P. 1983. Electron microscopic examination of wastewater biofilm formation and structural components. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1921 - 1931 p.
- FILIP, Z. 1985. Microbial degradation of polyurethanes. *Actas del Congreso Biodeterioration and Biodegradation of Plastics and Polymers*, edit. K.J. Seal, Cranfield, Inglaterra, 12 y 13 de septiembre, 51 - 55 p.
- GÁLVEZ, R. 2001. Tesis doctoral: Eliminación de la Materia Orgánica y del Nitrógeno en el Agua Residual Urbana Mediante Lechos Inundados. Universidad de Granada. Instituto del Agua. Dpto. de Ingeniería Civil – Dpto. de Microbiología. Granada, España. 49 p.
- HEIJNEN, J., VAN LOOSDRECHT, M., MULDER, R. WELTEVREDE. A. 2001. Large scale anaerobic aerobic treatment of complex industrial wastewater using biofilm reactors. *Wat. Sci. Technol.* 23. 2001. 427-436 p.
- IAKIMOV, M., ROGOZHIN, I., KAL'DERON, E., MATVEEVA, L., KARAVAÏTSEVA, G., BEZBORODOV, A. 1994. Tn5 - mutagenesis of the styrene-degrading strain *Pseudomonas sp.* Y2. Analysis of transformation products and DNA -scopy of the mutants obtained], *PriklBiokhimMikrobiol.* 1994 Jan-Feb;30(1):55-63 p.

- KAWAY, F., WATANABE, M., SHIBATA, M., YOKOYAMA, S., SUDATE, Y., HAYASHI, S., 2004. Comparative study on biodegradability of polyethylene wax by bacteria and fungi, *polym. Deg. Stabil.*, 86, 105-114 p.
- KYRIKOU, L., BRIASSOULIS, D. 2007. "Biodegradation of agricultural plastic films: a critical review". Department of Agricultural Engineering, Agricultural University of Athens, Grecia. *Journal of Polymer Environment* 15:125-150 p.
- KOUTNY, M., SANCELME, M., DABIN, C., PICHON, N., DELORT, A., LEMAIRE, A. 2006. Acquired biodegradability of polyethylenes containing prooxidant additives. *Polym. Deg. Stabil.*, 91, 1495 - 1503 p.
- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I., NEI, M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17, 1244 – 1245 p.
- LEE, B., POMETTO, L., FRATZKE, A., BAILEY, J. 1991. Biodegradation of degradable plastic Polyethylene by *Phanaerochaete* and *Streptomyces* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 678-685 p.
- LOMBARDI, C., CAVALCANTE, M., GREGORIR, E. 1978. Estudo comparativo de biodegradabilidade de alguns plásticos e plásticos utilizados em embalagens comerciais. En: *Actas del III Congresso Brasileiro de Limpeza pública - I Congresso Pan-Americano de Limpeza pública*, Sao Paulo, Brasil, 22 al 25 de agosto, 19 p.
- LÓPEZ, C. 1998. Transformación de tetracloroetano (TCCA) por biopelículas metilotróficas. Tesis Maestría en Biotecnología y Bioingeniería, Trujillo,

Escuela de Postgrado, Sección de Postgrado en Ciencias Biológicas,  
Universidad Nacional de Trujillo.

- MANGIAROTTI, A., CARETTA, G., NELLI, E. PIOTELLI, E. 1994. Biodeterioro de materiales plásticos por Microhongos. Boletín Micológico. Vol. 9 (1-2): 39-47 p.
- MÉNDEZ C., VERGARAY G., BÉJAR V., CÁRDENAS K. 2007. Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM 143 p.
- MIRANDA, H., ROBLES, H., VILLANUEVA, L., RODRIGUEZ, C. 2006. Biorreactores, Diseño y Aplicaciones, Sociedad Peruana de Biotecnología, Trujillo, Perú. 86 p.
- MÜLLER R. J, DECKWER W. D. 2000. Biologically degradable polymers. GBF Annual Report 1999 - 2000, edit. Por Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, Alemania, 35-54 p.
- MORTONL. H., SURMANS, B. 1996. The involvement of biofilms in biodeterioration processes. En Labs 2. Biodegradation and biodeterioration in latin America, edit. C.C. Gaylarde. E:L: Saccol deSá y P:M: Gaylarde, Porto Alegre, Brasil, 85-90 p.
- OHTAKE, Y., KOBAYASHI, T., ASABE, H., MURAKAMI, N. 1998. Studies on biodegradation of LDPE - observation of LDPE films scattered in agricultural fiels or in garden soil. Polym. Deg. Stabil. 60, 79-84 p.



- POMETTO, A., LEE, B., JOHNSON, K. 1992. Production of an extracellular Polyethylene – degrading Enzyme (s) by Streptomyces Species. Applied and Environmental Microbiology. 58: 731-733.
- SCOTT, G., WILES, D., 2001. Programmed - life plastics from polyolefins: a new look at sustainability. Biomacromolecules 2, 615-622 p.
- SHAH, A., HASAN, F., HAMEED, A., AHMED, S. 2009. Biotechnology Advances. Suplemento: Rev. Latino América. Metal. Mater. 2008; 147-148 p.
- SOLANAS, A., 2009. Biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos, Universidad de Barcelona, Vol IX, Barcelona España. 34p.
- 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. 84 p.
- WALEED, M. ZAID. C. 1993. Tesis doctoral: Physical Properties of Rotating Biological Contactor Biofilms. Copyright by Waleed M. K. Zahid, 62 p.
- WELTER, A., ROMERO, J., GRUMELLI, Y., SANCHEZ, J., ASCAR, G. 2004. La biopelícula en procesos RBC, Universidad Católica de Córdoba, Campus Universitario, Facultad de Ingeniería, Argentina. 59 p.
- YAMADA, K., MUKUMOTO, H., KATSUYAMA, Y., SAIGANJI, A., TANI, Y., 2001. Degradation of polyethylene by a fungus, penicillium simplicissimum YK. Polym. Deg. Stabil., 72, 323-327 p.

ZUBER, L., DUNN, I., DESHUSSES, M. 1997. Comparative Escale-Up and CostEstimation Of a Biological Triklng Filter and a Three-Phase Airlift Bioreactor for theRemoval of Methylene Chloride from Polluted Air. *Journal of the Air & WasteManagement Association* Vol. N° 47, pp 969-975.

**X. ANEXO**

## Apéndice 1. Cuadros de resultados

Cuadro 11. Composición del medio mínimo de sales de DAVIS

<b>compuestos</b>	<b>cantidad</b>
fosfato de potasio dibasico	5.23 g/L
fosfato de potasio monobásico	1.91 g/L
sulfato de magnesio	0.09 g/L
sulfato de amonio	1 g/L
solución traza de elementos	1 ml/L

Cuadro 12. Composición de la solución de traza.

<b>compuestos</b>	<b>cantidad</b>
cloruro de cobalto	20 mg/L
ácido bórico	30 mg/L
sulfato de zinc	10 mg/L
sulfato de cobre	1 mg/L
molibdato de sodio	3 mg/L
sulfato de hierro	10 mg/L
sulfato de magnesio	2.6 mg/L
agua destilada	1000 ml

Cuadro 13. Correlación de Pearson entre los parámetros medidos y los tres tipos de bolsas

Parámetro	Prueba	Biomasa	OD	pH	Con Fin	Con Inicial	Bolsa
<b>Biomasa</b>	Correlación de Pearson	1					
	Sig. (unilateral)						
	N	36					
<b>OD</b>	Correlación de Pearson	0.161					
	Sig. (unilateral)	0.174					
	N	36	36				
<b>pH</b>	Correlación de Pearson	-0.361(*)	0.045				
	Sig. (unilateral)	0.015	0.397				
	N	36	36	36			
<b>Con Fin</b>	Correlación de Pearson	0.273	0.137	-0.002			
	Sig. (unilateral)	0.054	0.213	0.496			
	N	36	36	36	36		
<b>Con Inicial</b>	Correlación de Pearson	0.268	0.121	0.012	1.000(**)		
	Sig. (unilateral)	0.057	0.24	0.473	0		
	N	36	36	36	36	36	
<b>Bolsa</b>	Correlación de Pearson	0.155	0.280(*)	-0.909(**)	0.017	0	
	Sig. (unilateral)	0.184	0.049	0	0.46	0.5	
	N	36	36	36	36	36	36

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

\*\* La correlación es significante al nivel 0,01 (unilateral).

Cuadro 14. Correlación de Spearman entre los parámetros medidos y los tres tipos de bolsas

Parámetro	prueba	Biomasa	OD	pH	ConFin	ConInic ial	Bolsa
<b>Biomasa</b>	Coefficiente de correlación	1	0.252	-.550(**)	0.16	0.062	.377(*)
	Sig. (unilateral)	.	0.069	0	0.176	0.359	0.012
	N	36	36	36	36	36	36
<b>OD</b>	Coefficiente de correlación	0.252	1	-.370(*)	0.218	0.102	.313(*)
	Sig. (unilateral)	0.069	.	0.013	0.101	0.277	0.031
	N	36	36	36	36	36	36
<b>pH</b>	Coefficiente de correlación	-.550(**)	-.370(*)	1	-0.116	0.032	-.946(**)
	Sig. (unilateral)	0	0.013	.	0.249	0.426	0
	N	36	36	36	36	36	36
<b>Con Fin</b>	Coefficiente de correlación	0.16	0.218	-0.116	1	.970(**)	0.141
	Sig. (unilateral)	0.176	0.101	0.249	.	0	0.206
	N	36	36	36	36	36	36
<b>Con Inicial</b>	Coefficiente de correlación	0.062	0.102	0.032	.970(**)	1	0
	Sig. (unilateral)	0.359	0.277	0.426	0	.	0.5
	N	36	36	36	36	36	36
<b>Bolsa</b>	Coefficiente de correlación	.377(*)	.313(*)	-.946(**)	0.141	0	1
	Sig. (unilateral)	0.012	0.031	0	0.206	0.5	.
	N	36	36	36	36	36	36

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (unilateral).

\* La correlación es significativa al nivel 0,05 (unilateral).

## Apéndice 2. Galería de fotos



Figura 13. Recolección de muestras de plástico



Figura 14. Recolección de muestras de plástico del botadero



Figura 15. Siembras de adaptación



Figura 16. Evaluación de parámetros de los reactores



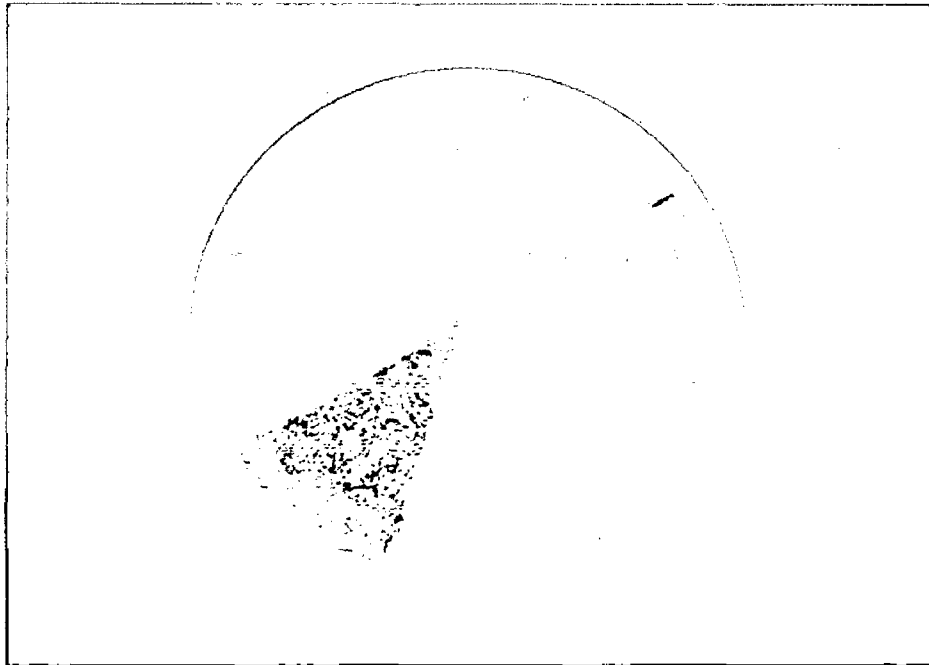


Figura 17. Conteo de colonias de microorganismos en las placas

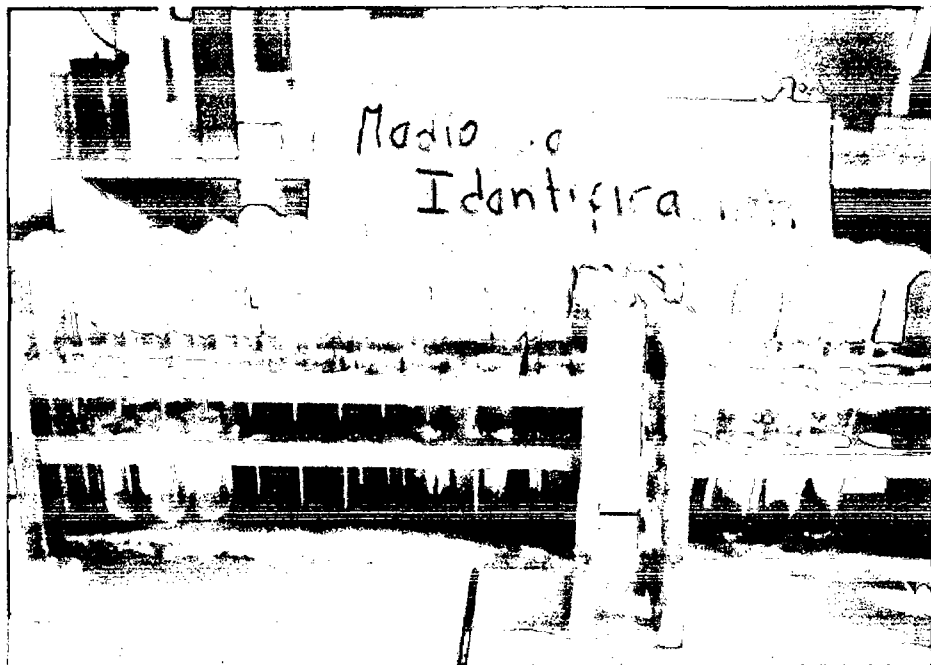


Figura 18. Medios para la identificación bioquímica

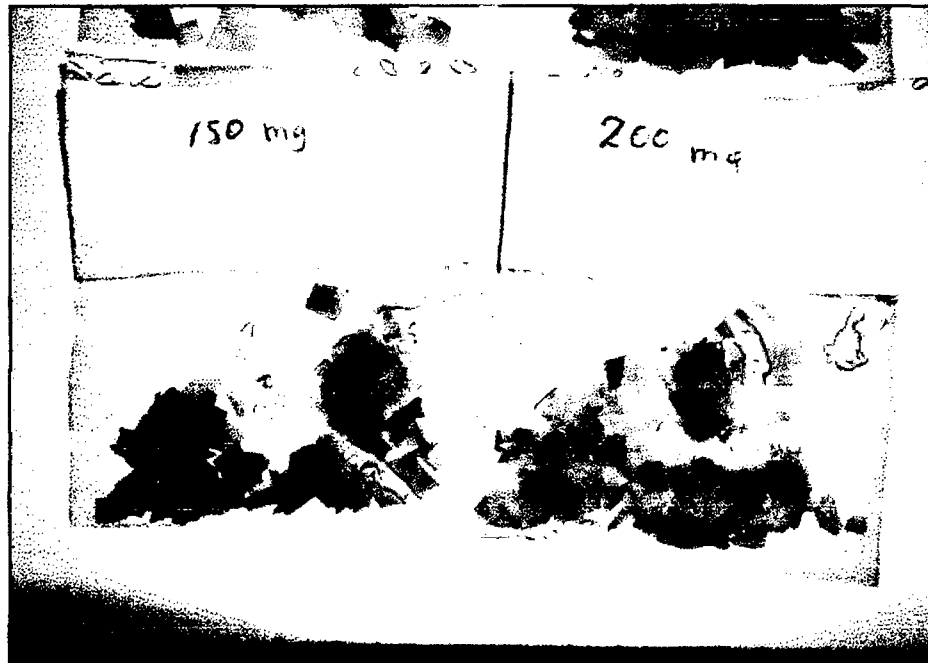


Figura 19. Cambios estructurales de PEBD de Metro al final de la prueba.

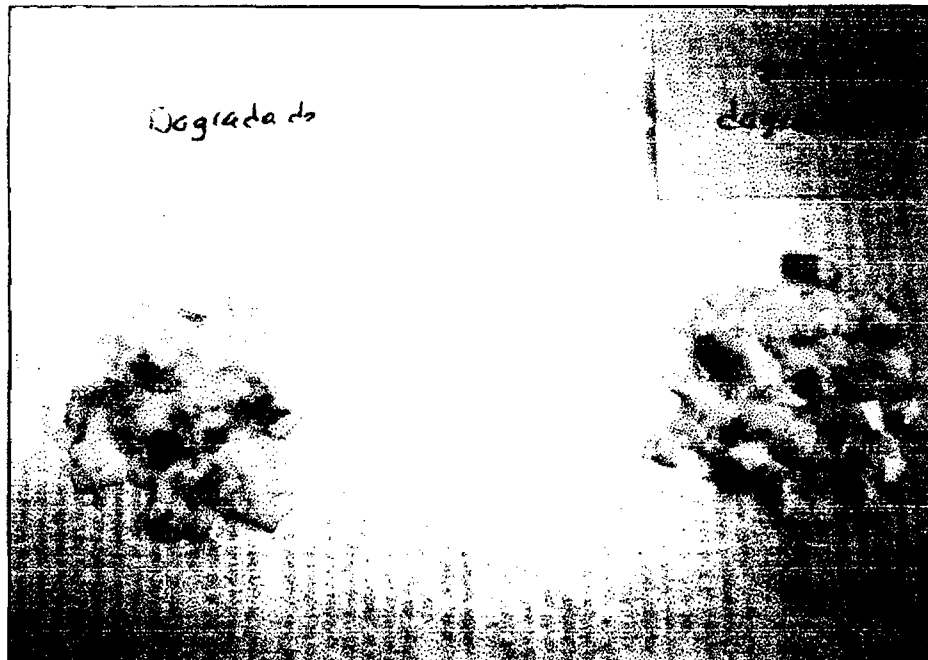


Figura 20. Diferencias entre PEBD degradadas y sin degradar.