

UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental



Una Institución Adventista

Evaluación de la biodegradación de plásticos de baja densidad por pseudomonas

Tesis para obtener el Título Profesional de Ingeniero Ambiental

Por:

Magali Ccallo Arela

Franklin Sacaca Masco

Asesor:

MSc. Rose Adeline Callata Chura

Juliaca, noviembre de 2022

DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA DEL INFORME DE TESIS

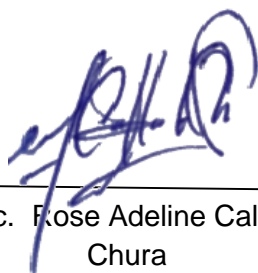
MSc. Rose Adeline Callata Chura, de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, de la Universidad Peruana Unión.

DECLARO:

Que el presente informe de investigación titulado: **“EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE PLÁSTICOS DE BAJA DENSIDAD POR PSEUDOMONAS”** constituye la memoria que presenta los Bachilleres **Magali Ccallo Arela** y **Franklin Sacaca Masco** para obtener el título de Profesional de Ingeniero Ambiental, cuya tesis ha sido realizada en la Universidad Peruana Unión bajo mi dirección.

Las opiniones y declaraciones en este informe son de entera responsabilidad del autor, sin comprometer a la institución.

Y estando de acuerdo, firmo la presente declaración en Juliaca, a los 07 días del mes de diciembre del año 2022.



MSc. Rose Adeline Callata
Chura



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Puno, Juliaca, Villa Chullunquiari, a 18 día(s) del mes de noviembre del año 2022, siendo las 11:00 horas, se reunieron en el Salón de Grados y Títulos de la Universidad Peruana Unión, Filial Juliaca, bajo la dirección del Señor Presidente del jurado: Mtro. Juan Eduardo Viga Rivera, el secretario: Ing. Verónica Naydee Rari Mamoni y los demás miembros: Dr. Efraim Sijano Saura y el asesor: Msc. Rose Adeline Gallala

y hora 4 hora con el propósito de administrar el acto académico de sustentación de la tesis titulada: Evaluación de la biodegradación de plásticos de baja densidad por pseudomonas de el(los)/a(las) bachiller(es): a) Magali Escallo Arela b) Franklin Sacaca Masco conducente a la obtención del título profesional de Ingeniero Ambiental (Nombre del Título Profesional)

con mención en El Presidente inició el acto académico de sustentación invitando al (los)/a(la)(las) candidato(a)s hacer uso del tiempo determinado para su exposición. Concluida la exposición, el Presidente invitó a los demás miembros del jurado a efectuar las preguntas, y aclaraciones pertinentes, las cuales fueron absueltas por el(los)/a(la)(las) candidato(a)s. Luego, se produjo un receso para las deliberaciones y la emisión del dictamen del jurado.

Posteriormente, el jurado procedió a dejar constancia escrita sobre la evaluación en la presente acta, con el dictamen siguiente:

Candidato (a): Magali Escallo Arela

Table with columns: CALIFICACIÓN, ESCALAS (Vigesimal, Literal, Cualitativa), Mérito. Row 1: Aprobado, 16, B, Bueno, Muy Bueno

Candidato (b): Franklin Sacaca Masco

Table with columns: CALIFICACIÓN, ESCALAS (Vigesimal, Literal, Cualitativa), Mérito. Row 1: Aprobado, 16, B, Bueno, Muy Bueno

(*) Ver parte posterior

Finalmente, el Presidente del jurado invitó al(los)/a(la)(las) candidato(a)s a ponerse de pie, para recibir la evaluación final y concluir el acto académico de sustentación procediéndose a registrar las firmas respectivas.

Signatures of President, Secretary, Assessor, and Candidates (a) and (b).

DEDICATORIA

Dedico esta investigación a Dios, por ser mi principal fortaleza, a mis padres por ser el soporte durante mi preparación en estos años transcurridos, a mis hermanos, por ser el motor y motivo de esta bonita aventura, a mis abuelos, quienes depositaron su confianza en mí y a mis docentes por impartirme valores y principios durante mi permanencia en la universidad.

-Magali Ccallo Arela

AGRADECIMIENTO

Los autores de este trabajo de investigación agradecemos infinitamente a Dios, a PRONABEC, a nuestros padres y docentes universitarios por aportarnos conocimientos durante los años de preparación en nuestra casa de estudios, formándonos con valores y principios para la vida y la eternidad.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1 Toma de muestra del área de estudio.....	14
2.2 Preparación del medio mineral y aislamiento de bacteria.....	14
2.3 Identificación de la cepa <i>Pseudomonas</i>	15
2.4 Evaluación de la degradación del PDBD.....	15
2.5 Metodología estadística.....	16
2.6 Tratamiento de datos.....	17
2.6.1. Diseño Completamente al Azar (DCA) y el test LSD de Fisher.....	17
3. RESULTADOS.....	17
3.1. Aislamiento de la <i>Pseudomona</i> y pruebas bioquímicas.....	17
3.2. Resultados de los datos de la biodegradación del polietileno de baja densidad.....	17
3.3. Resultados estadísticos.....	18
3.4. DCA y test LSD de Fisher.....	19
4. DISCUSIONES.....	19
5. CONCLUSIONES.....	20
6. ÉTICA Y CONFLICTO DE INTERESES.....	20
7. REFERENCIAS.....	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para determinación del LDPE.

Tabla 2. Datos del porcentaje de biodegradación del polietileno de baja densidad (LDPE)

Tabla 3. Análisis de varianza para biodegradación de LDPE.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de degradación del plástico por microorganismos.

Figura 2: Etapas del mecanismo de biodegradación de polímeros plásticos. 0

Figura 3: Metodología del aislamiento de la *Pseudomonas aeruginosa* y evaluación de la biodegradación del PDBD.

Figura 4. Vista de la evaluación con mayor degradación de polietileno de baja densidad.

Evaluación de la biodegradación de plásticos de baja densidad por pseudomonas

Evaluation of the biodegradation of low-density plastics by pseudomonas

RESUMEN

[Introducción]: El incremento de la población y la rápida industrialización han dado luz a problemas ambientales, como el incremento de residuos sólidos, siendo el 10 al 13 % plásticos, hoy en día estos polímeros han reemplazado al papel y demás productos por su buena resistencia y ligereza, en sus diferentes presentaciones. **[Objetivo]:** El presente trabajo de investigación tiene por finalidad realizar una evaluación de la biodegradación de polietileno de baja densidad con *Pseudomonas*. **[Metodología]:** El aislamiento de la cepa se realizó de una muestra de suelo con polietileno de baja densidad proveniente de un botadero, asimismo se realizó 8 pruebas bioquímicas para la identificación de la cepa *Pseudomona aeruginosa*, seguidamente se evaluó la degradación del polietileno en placas Petri, donde la cepa se cultivó en agar cetrimide a diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , y seguidamente se colocó el polietileno sobre el cultivo, asimismo, este se incubó a dos temperaturas de 35 y 40 °C por 14 días, también, se evaluó el peso de las muestras de polietileno tanto el antes como el después. **[Resultados]:** La mayor biodegradación se presenta a los 14 días, a 40 °C en la dilución 10^{-5} , con un 8.67 % de biodegradación. Los tratamientos tienen un efecto parcialmente significativo. **[Conclusiones]:** Las *Pseudomona aeruginosa*, son una de las alternativas de biodegradación de polietileno de baja densidad, que a través de sus enzimas utilizan al plástico como una fuente de carbono, convirtiendo los polímeros a monómeros. Siendo este estudio, una alternativa para contrarrestar la contaminación del medio ambiente por plásticos y aportando a las investigaciones futuras sobre la biodegradación del polietileno de baja densidad por microorganismos.

Palabras clave: *Colonización, Biofragmentación, Mineralización, Polímeros, Enzimas*

ABSTRACT

[Introduction]: The increase in population and rapid industrialization have given light to environmental problems, such as the increase in solid waste, being 10 to 13% plastic, today these polymers have finished paper and other products due to their good quality. resistance and lightness, in its different presentations. **[Objective]:** The purpose of this research work is to carry out an evaluation of the biodegradation of low-density polyethylene with *Pseudomonas*. **[Methodology]:** The isolation of the strain was carried out from a soil sample with low-density polyethylene from a dump , 8 biochemical tests were carried out to identify the *Pseudomonas aeruginosa* strain, followed by the evaluation of polyethylene degradation in Petri dishes, where the strain was cultivated in cetrimide agar at dilutions of 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} , and The polyethylene was then placed on the culture, likewise, it was incubated at two temperatures of 35 and 40 °C for 14 days, also, the weight of the polyethylene samples was evaluated both before and after. **[Results]:** The greatest biodegradation occurs after 14 days, at 40 °C in the 10-5 dilution, with 8.67% biodegradation. The treatments have a partially determining effect. **[Conclusions]:** *Pseudomonas aeruginosa* are one of the alternatives for the biodegradation of low-density polyethylene, which uses plastic as a carbon source through its enzymes, converting polymers to monomers. Being this study, an alternative to counteract the contamination of the environment by plastics and contributing to future research on the biodegradation of low-density polyethylene by microorganisms.

Keywords: Colonozation, Biofractionation, Mineralization, Polymers, Enzymes

1. INTRODUCCIÓN

Desde 1950 hasta la actualidad, el incremento de la población, la creciente urbanización, la rápida industrialización y el uso de polímeros sintéticos a nivel industrial, han sacado a la luz varios conflictos ambientales críticos ocasionados por el hombre, así lo expresan Danko et al. (2004), dado que, uno de los problemas como la gestión de residuos sólidos, se ha convertido en un problema plagado en las mega ciudades y áreas urbanas, siendo de 10 a 13 % la contribución de los residuos plásticos a nivel mundial (Moharir & Kumar, 2019). Por lo tanto, la demanda de plástico se encuentra incrementando continuamente, desde la última década a un 12 % anualmente o 204 a 348 millones de toneladas en el 2017, por este motivo, la producción depende del uso de polímeros sintéticos a nivel industrial los cuales están presentes en cada área de la sociedad humana, así lo afirma Li et al. (2020).

Hoy en día los plásticos han reemplazado al papel y demás productos a base de celulosa, ya que cuentan con mejor resistencia a la tracción, ligereza, resistencia al agua, y al ataque microbiano (Eashur & Jasim, 2020). Los mismos, que se clasifican como, polietileno (PE), polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno de densidad media (MDPE), polietileno de alta densidad (HDPE), polietileno de baja densidad lineal (LLDPE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC) y poliuretano (PU) según Zheng et al. (2005). Debido a los bajos costos de producción del plástico, estos se han convertido en una carga para el ecosistema global como sostiene Bollinger et al. (2020), los residuos de los plásticos se producen a un ritmo mucho más rápido de lo que se reciclan de acuerdo con Yoshida et al. (2016), la naturaleza no degradable de los residuos de plásticos conduce a su continua acumulación en el medio ambiente, por lo tanto, representa una amenaza seria para casi todas las formas de vida causando infertilidad de suelos, agotamiento de la fuente de agua subterránea y se ha demostrado ser peligroso para los animales, humanos y ecosistemas, como dan a conocer Stepien et al. (2017).

Las investigaciones más recientes, proponen una solución a este problema, basada en la biodegradación, utilizando cepas microbianas seleccionadas (Paço et al., 2017). En vista de que, el plástico reacciona con el oxígeno del aire y luego los microorganismos facilitan este proceso de degradación produciendo enzimas que degradan el polietileno para oxidar o descomponer los productos para obtener su energía de los plásticos en subproductos más pequeños como el dióxido de carbono, agua y metano para los microorganismos, es una reacción en condiciones aerobias, señalan Chinaglia et al. (2018), teniendo en cuenta a Awasthi et al. (2020) y Shovitri et al. (2017) afirman que, asimismo la descomposición de los plásticos por microorganismos resulta de la actividad de enzimas como; esterasas, lipasas y cutinasas que trabajan rompiendo la cadena de los polímeros, convirtiéndolos de monómeros a oligómeros (mineralización), ya que, el plástico que es ingresado a la enzima, es absorbida por las células microbianas que son usadas en el proceso metabólico como lo describe Taghavi et al. (2021) (Figura 1).

No obstante, el alto peso molecular junto con la estructura tridimensional y la naturaleza hidrofóbica lo hacen reactivo a la degradación, la hidrofobicidad del polietileno evita la formación de biopelículas por parte del microorganismo que, a su vez, evita la adhesión y la colonización del polietileno (Chen et al., 2020).

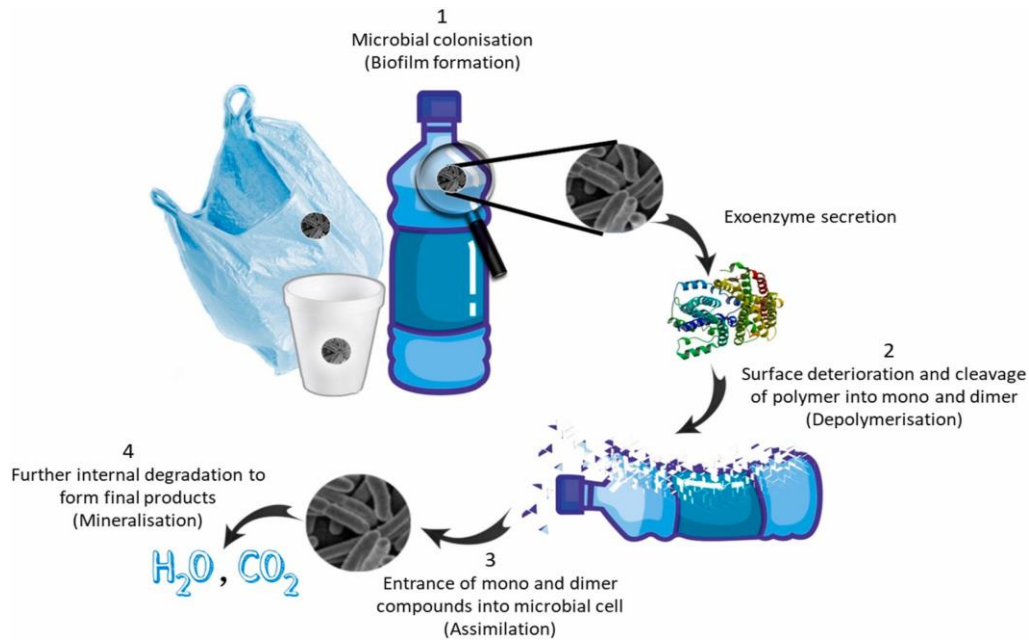


Figura 5: Mecanismo de degradación del plástico por microorganismos. Fuente: Taghavi et al. (2021).

Savich & Novik (2016), plantean que los estudios sobre biodegradación del LDPE, se han apoyado en técnicas físico-químicas e instrumentales, como propiedades mecánicas, microscopía de fluorescencia, espectrometría infrarroja o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, entre otros; para identificar microorganismos, hongos, algas o consorcios microbianos, degradadores (enzimas), de los productos intermedios o finales y la velocidad de biodegradación (Biki et al., 2021), ya que es un proceso natural que descompone un material en dióxido de carbono, metano, agua, y constituyentes orgánicos, a causa de la acción enzimática de los microorganismos.

También, Gong et al. (2019), agregan que la biodegradación se debe a la alteración de la estructura física y/o química de la cadena del polímero, a su vez esta minimiza el peso molecular del polímero, estas variaciones pueden ser indeseables como los cambios durante el uso o deseables como en la biodegradación, estos cambios se producen principalmente por el efecto de factores en la composición de los polímeros, mientras que Ali et al. (2021), mencionan que, la degradación del PE, depende básicamente del peso molecular, cristalinidad y pretratamientos. El peso molecular de los polímeros de polietileno, se mide utilizando los pesos moleculares promedio en número, peso y tamaño en general, cuanto mayor sea el peso molecular y la cristalinidad del PE, más difícil será su biodegradación, señala Howard (2002), a diferencia del HDPE, el LDPE y el LLDPE, exhiben una cristalinidad más baja debido a que tienen más estructuras ramificadas, lo que los hace menos resistentes a la biodegradación (Yin et al., 2020).

La biodegradación microbiana se da en 5 etapas y son: la colonización, biodeterioración, biofragmentación, asimilación y mineralización (ver Figura 2).

La primera etapa del mecanismo de degradación microbiana es la colonización de especies microbianas en la superficie del plástico, durante el cual los microorganismos forman consorcios que conducen a la formación de biopelículas, lo que provoca graves daños en la

superficie del polímero (Ali et al., 2021). Posterior a ello, en la etapa de biodegradación se produce una degradación superficial alterando las propiedades fisicoquímicas del polímero plástico, además, los microorganismos que utilizan los enlaces químicos de los sustratos orgánicos o el oxígeno como fuente de energía pueden liberar ácidos orgánicos, el cual modifica el pH del medio lo que conduce a un aumento de la erosión superficial, en el caso del biodeterioro enzimático, los microorganismos como las *Pseudomonas spp* tienden a producir algunos grupos enzimáticos como lipasas, esterases, ureasas y proteasas para superar la cristalinidad de estos polímeros (Chen et al., 2020).

La fragmentación es un proceso lítico, primordial para la degradación polímeros en monómeros, dímeros y oligómeros, los enlaces químicos que unen los monómeros que forman el plástico son similares a los que se encuentran en los polímeros naturales; como los compuestos lignocelulósicos, por lo tanto, es razonable suponer que la mayoría de las enzimas que degradan la lignocelulosa también pueden degradar los polímeros plásticos (Savich & Novik, 2016).

La asimilación de los monómeros producidos, la célula microbiana obtiene las fuentes de energía de estos monómeros integrados, lo que permite a la celular microbiana crecer, dentro de la celular los monómeros degradados se oxidan utilizando las vías catabólicas microbianas para producir orgánulos celulares y moléculas portadoras de energía como trifosfato de adenosina (ATP), lo que se lleva a cabo de tres vías; respiración aeróbica, respiración an-aeróbica y fermentación tanto en ambiente aeróbico como anaeróbico (Moharir & Kumar, 2019).

la mejor biodegradación se presenta a los 14 días, por lo que se presume que mientras mayor sea el tiempo de desarrollo de la *Pseudomona aeruginosa*, teniendo como principal fuente de alimentación, la muestra de polietileno, mayor será la biodegradación, en cuanto a la temperatura, se trabajó mejor con 40°C, lo que da a entender que estos microorganismos, se adaptan y se desarrollan mejor en altas temperaturas, para la concentración del microorganismo, por medio de diluciones, la biodegradación de los plásticos se desarrolló mejor en una dilución de 10^{-5} .

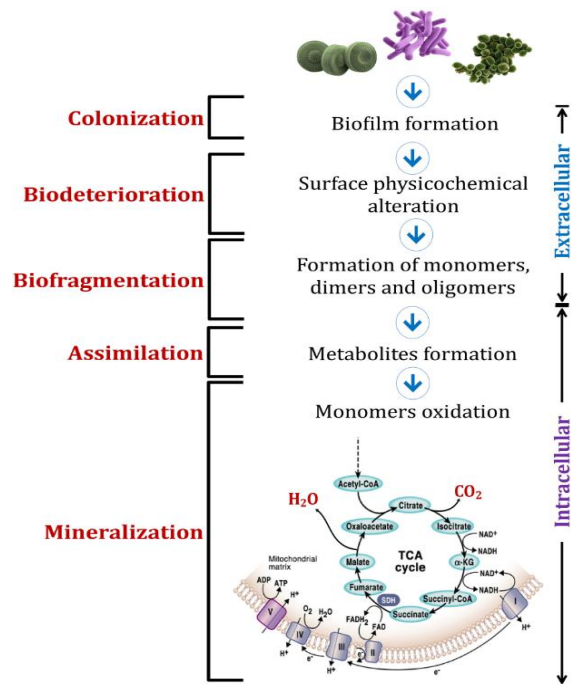


Figura 6: Etapas del mecanismo de biodegradación de polímeros plásticos. Fuente: (Ali et al., 2021).

Teniendo en cuenta a Gupta & Devi (2020), mencionan que entre los microorganismos biodegradadores de plásticos, se determinó que las bacterias *Pseudomonas* son las más activas teniendo una degradación de 20,54 % del polietileno y del 8,16 % de los plásticos en un periodo de un mes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Toma de muestra del área de estudio.

Se recolectó muestras de suelo y plásticos con signos de deterioro de 2 puntos seleccionados previamente (botadero del centro poblado Chilla y la laguna de oxidación del campus universitario de la Universidad Peruana Unión (UPeU)) (Loza, 2020), las muestras se recogieron asépticamente y se guardaron en bolsas Ziploc (Muhonja et al., 2018) y se transportaron en un cooler al laboratorio para su tratamiento.

2.2 Preparación del medio mineral y aislamiento de bacteria.

Primeramente se preparó un medio mineral modificado de Gutierrez (2019), compuesto por: 0.09 g de Fosfato dipotásico (H_2HPO_4), 0.045 g de Fosfato monobásico (KH_2PO_4), 0.045 gr de cloruro de amonio (NH_4Cl), 0.045 gr de Cloruro de sodio ($NaCl$), 0.0216 de g Sulfato de magnesio ($MgSO_4$), 0.05 g de Cloruro de calcio ($CaCl_2$), 0.02 g de Monóxido de hidrógeno ($2H_2O$), 0.005 g de Cloruro Ferroso ($FeCl_2$) 0.3 g de extracto de levadura, 0.5 g de Peptona y 0.1 g de Triptosa, en un matraz Erlenmeyer para 100 mL de medio mineral al que se adicionó 0.1g de muestra de suelo con restos de plástico; seguidamente se colocó en agitación en el equipo agitador magnético por un tiempo de cuatro horas. Después, se preparó caldo peptonado para realizar diluciones en 10 tubos de ensayo con 9 ml de caldo peptonado

en cada tubo, se tomó 1 ml de la muestra del matraz Erlenmeyer para realizar las diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-10} en los tubos de ensayo e incubarlas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas (Gutierrez, 2018; Barbarán et al. 2018). Al mismo tiempo, se prepararon 3 placas Petri con Agar Cetrimide, en el cual se vertió 1 mL de las diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} e incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas; seguidamente se observó el desarrollo morfológico de los microorganismos presentes en las placas Petri (Butron, 2020), finalmente se realizó un repique en 4 placas Petri con Agar nutriente con divisiones de 8 en cada placa, para 32 cepas que se cultivaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, asimismo se conservaron las 32 cepas en tubos de ensayo con agar nutriente para su posterior análisis (Hussein et al., 2015).

2.3 Identificación de la cepa *Pseudomonas*.

De las cepas encontradas, se realizaron repiques en 8 placas Petri con 4 divisiones en Agar Cetrimide que se incubó por 72 horas a 37°C (Cáceres, 2012), asimismo, se realizó repique en el medio de King A y King B para observación de las cepas en sus distintas características morfológicas y coloración que presenta. Además, se realizaron 8 pruebas bioquímicas de: Tiron Sugar Iron (TSI); Citrato de Simmons; Urea, Indol test (reactivo de Kovacs); Movilidad; Lisina Hierro Agar (LIA); Manitol; Catalasa y tinción de Gram (Butron, 2020) para la identificación de la *Pseudomonas aeruginosa* (ver Figura 3 metodología de aislamiento, reconocimiento y biodegradación del LDPE).

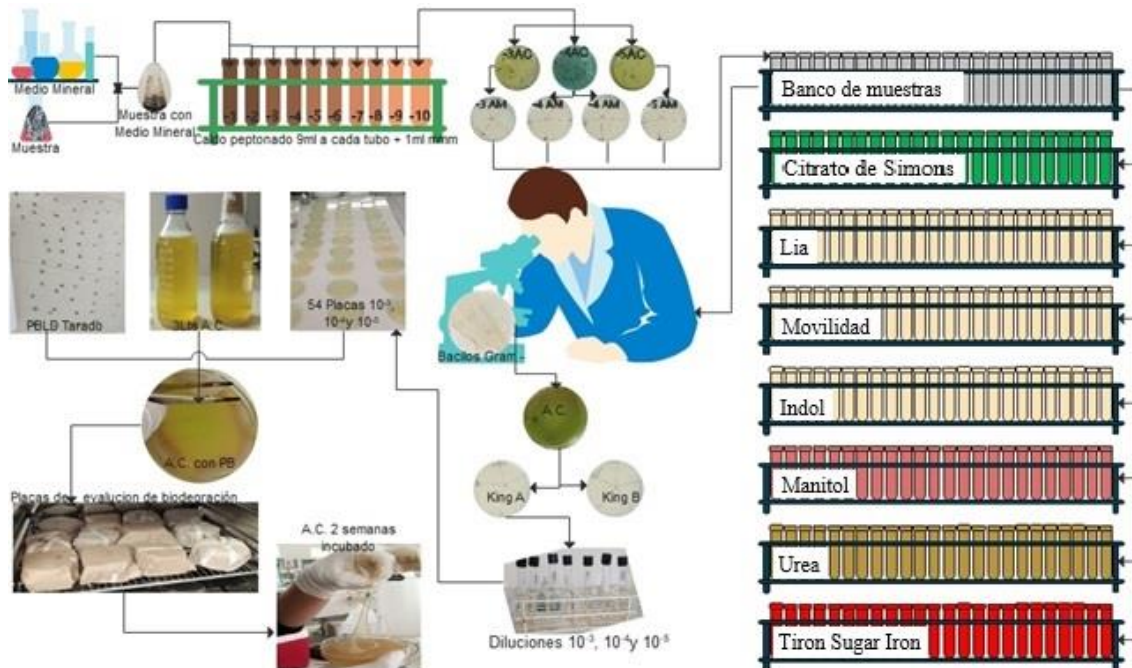


Figura 7: Metodología del aislamiento de la *Pseudomonas aeruginosa* y evaluación de la biodegradación del PDBD.

2.4 Evaluación de la degradación del PDBD.

Se cultivó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* en el medio mineral para su desarrollo a una temperatura de 37°C por 72 horas, asimismo se realizaron diluciones de la cepa de 10^{-3} ; 10^{-4} y 10^{-5} antes de sembrar sobre la placa Petri con contenido de Agar Cetrimide (45mL de

agar cetrimide con 0.5 ml del medio mineral en la placa). El cultivo en placa se evaluó por 3 semanas cada 7 días a temperaturas de 35 °C y 40 °C (Hou et al., 2022), donde se realizó el pesado de los polietilenos de baja densidad de 2x2 cm² en un balanza analítica, así Stepien et al. (2017), presenta la Ecuación 1 para evaluar la pérdida de masa.

$$\%P\acute{e}rdida = \frac{(W_{inicial}-W_{final})}{W_{inicial}} \times 100 \quad (E. 1)$$

Donde:

Winicial: Peso inicial del polietileno de baja densidad

Tabla 4. Pruebas bioquímicas para determinación del LDPE.

Muestra	Tiron		Sugar		Iron		Ure a	Indo l	Citrat o	Movilida d	Li a	Tinción Gram	Oxigen asa	Manitol
	Bisel	Fondo	Gas	H ₂ S										
<i>Pseudomona a.</i>	K	A	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<i>Bacteria 1</i>	-	A	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Bacteria 2</i>	-	A	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 3</i>	K	A	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 4</i>	-	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 5</i>	-	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 6</i>	-	A	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Bacteria 7</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 8</i>	K	A	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 9</i>	-	A	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 10</i>	-	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 11</i>	K	A	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
<i>Bacteria 12</i>	-	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Bacteria 13</i>	-	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 14</i>	-	A	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 15</i>	-	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 16</i>	-	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 17 a</i>	-	A	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Bacteria 18 b</i>	-	A	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>Bacteria 19 c</i>	-	A	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Bacteria 20 d</i>	K	A	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Bacteria 21 e</i>	-	A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 22 f</i>	-	A	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Bacteria 23 g</i>	-	A	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 24 h</i>	-	A	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacteria 25 i</i>	-	A	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Bacteria 27 j</i>	-	A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Bacteria 28 k</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Bacteria 29 l</i>	-	A	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Bacteria 30 m</i>	-	A	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>Bacteria 31 n</i>	-	A	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>Bacteria 32 o</i>	-	A	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-

Wfinal: Peso final del polietileno de baja densidad

K: Alcalino color rojo; **A:** ácido color amarillo; **+**: positivo; **-**: negativo

2.5 Metodología estadística.

Se aplicó el diseño estadístico del modelo de efectos fijos, para demostrar la eficiencia de las *Pseudomonas aeruginosa* frente al polietileno de baja densidad a 35 – 40 °C a

concentraciones del microorganismo presentadas en diluciones (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) y evaluados de 7 a 14 días. En consecuencia, se tomará una prueba de comparación de medias y demostrar si los tres factores presentan una diferencia significativa (0.05 %). Se realizará un diseño factorial de tres factores, considerando la intersección de los factores.

2.6 Tratamiento de datos.

Se procesará los datos en el software *IBM SPSS Statistics 25*, mediante el análisis de varianza (ANOVA) de las variables de investigación y el análisis multifactorial con el diseño completamente al azar (DCA) y el test LSD de Fisher.

2.6.1. Diseño Completamente al Azar (DCA) y el test LSD de Fisher.

Proceso por el cual se realizará las comparaciones múltiples, que permitirá comparar medias de los tratamientos después de haber rechazado la hipótesis de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA (Tabla 4).

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento de la *Pseudomonas* y pruebas bioquímicas.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se muestran en la Tabla 1, previamente aisladas 32 tubos de ensayo para cada prueba.

Lo más importante, se tiene a la prueba bioquímica Tirón Sugar Iron (TSI) donde se observó que la cepa B-20D tenía las características propias de *Pseudomonas* como; el bisel era de coloración alcalino rojo (K), el fondo ácido color amarillo (A), no presenta producción de gas (negativo) y también producción de ácido sulfhídrico (negativo), a continuación en el Citrato de Simmons se observó que la cepa B-20D obtuvo un resultado positivo ya que la coloración que se obtuvo fue de color azul, lo cual nos indica que los microorganismos presentes en el tubo de ensayo fueron capaces de utilizar el citrato como su única fuente de carbono y finalmente en la Tinción de Gram se observó la que la cepa B-20 D, obtuvo un resultado negativo de acuerdo a las coloraciones rojizas y la forma de bacilos, características propias de las *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2. Resultados de los datos de la biodegradación del polietileno de baja densidad.

Los tratamientos se evalúan mediante concentraciones de *Pseudomonas aeruginosa* en diluciones, aplicadas en el medio de desarrollo junto a las muestras del polietileno de baja densidad, realizando evaluaciones a los 7 y 14 días a temperaturas de 35 y 40 °C, (evaluaciones cada 7 días), en el que se utilizó el polietileno de baja densidad como fuente de carbono para las enzimas del microorganismo, obteniéndose el porcentaje de biodegradación con la ecuación 1 (Tabla 2).

Tabla 5. Datos del porcentaje de biodegradación del polietileno de baja densidad (LDPE)

Días de evaluación	Temperatura °C	Tratamientos (Réplicas)	Porcentaje de biodegradación del LDPE
7		A (10^{-3})	7,500

	35	B (10^{-4})	0,000
		C (10^{-5})	2,564
	40	A (10^{-3})	9,302
		B (10^{-4})	2,703
		C (10^{-5})	2,500
14	35	A (10^{-3})	5,714
		B (10^{-4})	3,030
		C (10^{-5})	2,564
	40	A (10^{-3})	2,439
		B (10^{-4})	2,703
		C (10^{-5})	8,67
7	35	A (10^{-3})	9,524
		B (10^{-4})	2,632
		C (10^{-5})	4,878
	40	A (10^{-3})	7,317
		B (10^{-4})	2,564
		C (10^{-5})	0,000
14	35	A (10^{-3})	5,714
		B (10^{-4})	2,381
		C (10^{-5})	2,857
	40	A (10^{-3})	2,439
		B (10^{-4})	2,857
		C (10^{-5})	7,500

3.3. Resultados estadísticos.

Tabla 6. Análisis de varianza para biodegradación de LDPE.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Días de evaluación	1,207	1	1,207	0,26	0,619
B: Temperatura	3,866	1	3,866	0,83	0,379
C: Pseudomonas en dilución	62,56	2	31,28	6,75	0,012
Interacciones					
AB	9,444	1	9,444	2,04	0,179
AC	85,79	2	42,89	9,26	0,004
BC	26,97	2	13,48	2,91	0,093
ABC	66,19	2	33,09	7,15	0,009
Residuos	55,57	12	4,631		
Total (corregido)	311,5	23			

La Tabla 3 muestra que las *Pseudomonas* en dilución y las interacciones de AC, BC y ABC son significativas, es decir existe diferencia entre los tratamientos con *Pseudomonas*.

3.4. DCA y test LSD de Fisher.

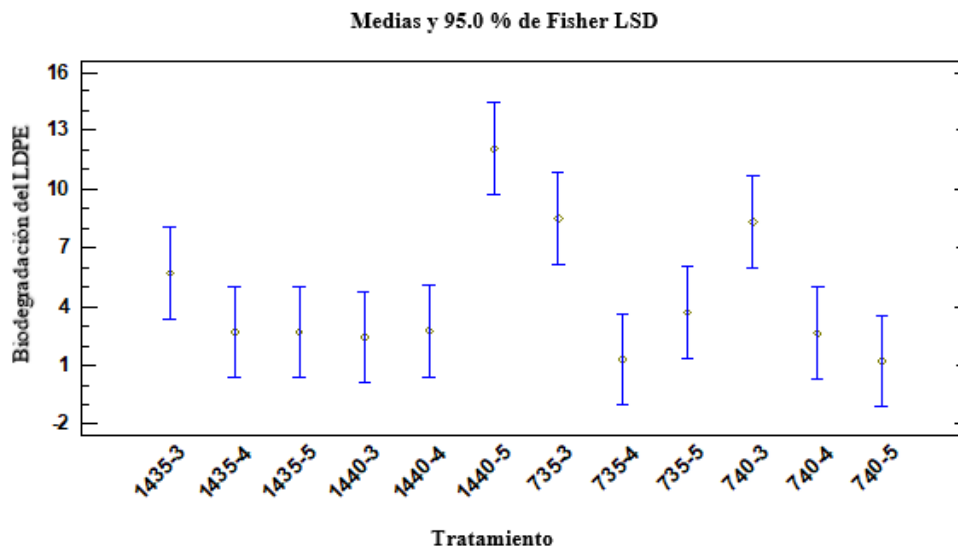


Figura 8. Vista de la evaluación con mayor degradación de polietileno de baja densidad.

La mayor biodegradación se presenta a los 14 días (Figura 4), a 40 °C de temperatura, en la dilución “10⁻⁵”. Asimismo, el tratamiento que le sigue se presenta a los 7 días, con 35 °C de temperatura, en la dilución “10⁻³”. Sin embargo, estadísticamente no tienen una diferencia significativa.

4. DISCUSIONES

Gupta & Devi, (2020) refiere que el aislado no solo fue capaz de formar una biopelícula en la superficie de LDPE, así mismo utilizó el carbono para el crecimiento, a través de la pérdida de peso de las películas de PE en comparación con el control. Aunque la biodegradación es un proceso lento, los altos recuentos de unidad formadora de colonias (UFC) y los valores de concentración de proteína del aislado reflejan su alta actividad metabólica incluso después de 60 días de incubación. Así mismo, Sridharan et al. (2021) menciona que la ruptura de la superficie del LDPE y la reducción del peso y la resistencia a la tracción de la película, confirman el inicio del proceso de mineralización. Sin embargo Ali et al. (2021) da a conocer que, el reto de la biodegradación de los plásticos reside en su estructura polimérica que limita la descomposición del polímero en monómeros, por lo que, las enzimas microbianas son ineficaces cuando atacan a los polímeros plásticos sintéticos no hidrolizables.

Chen et al. (2020) afirman que las enzimas que degradan los plásticos son las esterasas, lipasas o cutinasas, de las cuales las cutinasas son las más eficaces para la hidrólisis del PE, pues tienen un extenso surco de unión al sustrato; sin embargo Hou et al. (2022) sostienen que, las *Pseudomonas aeruginosa* secretan di oxigenasas, hidroxilasas y mono oxigenasas, y que las oxigenasas podrían ser la principal enzima que causa daño fisicoquímico a la superficie del PE y que lo degrada subsecuentemente, del mismo modo que, la lactasa, lipasa y la peroxidasa también han sido consideradas como enzimas degradadoras de plástico, pero no hay sustento

En cambio, Biki et al. (2021) indica que la pérdida de peso del polietileno y los cambios en el pH de los medios también indicaron que las cepas bacterianas aisladas tenían la capacidad de degradar las láminas de LDPE.

En la presente investigación, los resultados muestran que la mejor biodegradación se presenta a los 14 días, por lo que se presume que mientras mayor sea el tiempo de desarrollo de la *Pseudomonas aeruginosa*, teniendo como principal fuente de alimentación, la muestra de polietileno, mayor será la biodegradación, en cuanto a la temperatura, se trabajó mejor con 40°C, lo que da a entender que estos microorganismos, se adaptan y se desarrollan mejor en altas temperaturas, para la concentración del microorganismo, por medio de diluciones, la biodegradación de los plásticos se desarrolló mejor en una dilución de 10⁻⁵.

5. CONCLUSIONES

La cepa *Pseudomonas aeruginosa*, es una alternativa limpia en la biodegradación de polietileno de baja densidad, debido a sus enzimas que utilizan al plástico como una fuente de carbono, convirtiendo los polímeros a monómeros. Lográndose resultados relativamente significativos a los 14 días a temperatura 40 °C y en dilución 10⁻⁵, seguido del tratamiento a los 7 días, a 35°C en la dilución 10⁻³, que estadísticamente tienen cierta diferencia con los otros tratamientos: Por lo tanto, este un método de tecnologías limpias para remediar la contaminación por residuos sólidos en el medio ambiente; asimismo proporciona una base teórica para futuras investigaciones sobre el mecanismo de biodegradación del LDPE.

6. ÉTICA Y CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que han cumplido con la totalidad de los requisitos éticos y legales pertinentes, durante la investigación y el proceso de la elaboración del artículo; no habiendo conflictos de intereses de ningún tipo y que los autores están en total acuerdo con la versión final editada del artículo.

7. REFERENCIAS

Ali, S. S., Elsamahy, T., Koutra, E., Kornaros, M., El-Sheekh, M., Abdelkarim, E. A., Zhu, D., & Sun, J. (2021). Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. *Science of the Total Environment*, 771. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144719>

Awasthi, A. K., Tan, Q., & Li, J. (2020). Biotechnological Potential for Microplastic Waste. *Trends in Biotechnology*, xx(xx), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.03.002>

Barbarán Silva, H. M., Cabanillas Paredes, L. J., & Rubio Rodriguez, Y. E. (2018). *Biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por acción de Pseudomonas aeruginosa, en condiciones de laboratorio* [Universidad Cesar Vallejo]. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UCVV_44689f90593842836b69665e0df7c682/Details

Biki, S. P., Mahmud, S., Akhter, S., Rahman, M. J., Rix, J. J., Al Bachchu, M. A., & Ahmed, M. (2021). Polyethylene degradation by *Ralstonia* sp. strain SKM2 and *Bacillus* sp. strain SM1 isolated from land fill soil site. *Environmental Technology & Innovation*, 22, 101495. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101495>

- Bollinger, A., Thies, S., Knieps-Grünhagen, E., Gertzen, C., Kobus, S., Höppner, A., Ferrer, M., Gohlke, H., Smits, S. H. J., & Jaeger, K. E. (2020). A Novel Polyester Hydrolase From the Marine Bacterium *Pseudomonas aestusnigri* – Structural and Functional Insights. *Frontiers in Microbiology*, *11*(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00114>
- Butron Pinazo, S. B. (2020). *Capacidad de Biodegradación de Pseudomonas aeruginosa frente al polietileno de baja densidad* [Universidad Nacional del Altiplano]. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/13475>
- Cáceres Azurin, O. (2012). Biodegradación bacteriana de polietileno de baja densidad bajo condiciones controladas en biorreactores Air Life. [Universidad Nacional Agraria de la Selva]. In *Universidad Nacional Agraria de la Selva*. <http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/356>
- Chen, C. C., Dai, L., Ma, L., & Guo, R. T. (2020). Enzymatic degradation of plant biomass and synthetic polymers. *Nature Reviews Chemistry*, *4*(3), 114–126. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-0163-6>
- Chinaglia, S., Tosin, M., & Degli-Innocenti, F. (2018). Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level. *Polymer Degradation and Stability*, *147*(October 2017), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.12.011>
- Danko, A. S., Luo, M., Bagwell, C. E., Brigmon, R. L., & Freedman, D. L. (2004). Involvement of linear plasmids in aerobic biodegradation of vinyl chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(10), 6092–6097. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6092-6097.2004>
- Eashur, E. Y., & Jasim, M. A. (2020). Plastic Waste Biodegradation by Local Bacterial Isolates in Ramadi City. *Journal of University of Anbar for Pure Science*, *14*(1), 1–5. <http://www.iasj.net?func=article&ald=181837>
- Gong, M., Yang, G., Zhuang, L., & Zeng, E. Y. (2019). Microbial biofilm formation and community structure on low-density polyethylene microparticles in lake water microcosms. *Environmental Pollution*, *252*, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.090>
- Gupta, K. K., & Devi, D. (2020). Characteristics investigation on biofilm formation and biodegradation activities of *Pseudomonas aeruginosa* strain ISJ14 colonizing low density polyethylene (LDPE) surface. *Heliyon*, *6*(7), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04398>
- Gutiérrez Alvarez, A. I. (2019). *Biodegradación del polietileno de baja densidad utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna* [Universidad Privada de Tacna]. <http://repositorio.upt.edu.pe/bitstream/UPT/1269/1/Gutierrez-Alvarez-Ana.pdf>
- Gutierrez Taípe, K. Y. R. (2018). *Influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria pseudomona aeruginosa en Huancayo* [Universidad Continental]. <https://repositorio.continental.edu.pe/handle/20.500.12394/4507>
- Hou, L., Xi, J., Liu, J., Wang, P., Xu, T., Liu, T., Qu, W., & Lin, Y. B. (2022). Biodegradability of polyethylene mulching film by two *Pseudomonas* bacteria and their potential degradation mechanism. *Chemosphere*, *286*(July 2021). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131758>
- Howard, G. T. (2002). Biodegradation of polyurethane: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *49*(4), 245–252. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00051-3](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00051-3)
- Hussein, A. A., Al-Mayaly, I. K. A., Hussein, A. A., Al-Mayaly, I. K., Khudeir, S. H., Hussein, A. A., Al-Mayaly, I. K., & Kudier, S. H. (2015). Isolation, Screening and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) degrading bacteria from contaminated soil with plastic wastes Isolation,

Screening and Identification of Mesopotamia Environmental Journal Isolation, Screening and Identification o. *Article in Mesopotamia Environmental Journal*, 1(4), 1–14. www.bumej.com

Li, Z., Wei, R., Gao, M., Ren, Y., Yu, B., Nie, K., Xu, H., & Liu, L. (2020). Biodegradation of low-density polyethylene by *Microbulbifer hydrolyticus* IRE-31. *Journal of Environmental Management*, 263(March). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110402>

Loza Osorio, T. F. (2020). Análisis del conflicto socioambiental originado por la gestión y disposición final de residuos sólidos municipales en el botadero del centro poblado de Chilla, Juliaca, 2019 [Pontificia Universidad Católica del Perú]. In *Pontificia Universidad Católica del Perú*. <http://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/12071>

Moharir, R. V., & Kumar, S. (2019). Challenges associated with plastic waste disposal and allied microbial routes for its effective degradation: A comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*, 208, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.059>

Muhonja, C. N., Makonde, H., Magoma, G., & Imbuga, M. (2018). Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. *PLoS ONE*, 13(7), e0198446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446>

Paço, A., Duarte, K., da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Pereira, R., Pereira, M. E., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Science of the Total Environment*, 586, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.017>

Savich, V., & Novik, G. (2016). Waste Biodegradation and Utilization By *Pseudomonas* Species. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(2), 851–857. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.6.2.851-857>

Shovitri, M., Nafi'Ah, R., Antika, T. R., Alami, N. H., Kuswytasari, N. D., & Zulaikha, E. (2017). Soil burial method for plastic degradation performed by *Pseudomonas* PL-01, *Bacillus* PL-01, and indigenous bacteria. *AIP Conference Proceedings*, 1854(June 2017). <https://doi.org/10.1063/1.4985426>

Sridharan, R., Vetrivelan, M., Krishnaswamy, V. G., Jansi R, S., Rishin, H., Kumar D, T., & Doss C, G. P. (2021). Integrated approach in LDPE degradation – An application using Winogradsky column, computational modeling, and pathway prediction. *Journal of Hazardous Materials*, 412(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125336>

Stepien, A. E., Zebrowski, J., Piszczyk, L., Boyko, V. V., Riabov, S. V., Dmitrieva, T., Bortnitskiy, V. I., Gonchar, M., Wojnarowska-Nowak, R., & Ryszkowska, J. (2017). Assessment of the impact of bacteria *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and yeast *Yarrowia lipolytica* on commercial poly(ether urethanes). *Polymer Testing*, 63, 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.08.038>

Taghavi, N., Udugama, I. A., Zhuang, W. Q., & Baroutian, S. (2021). Challenges in biodegradation of non-degradable thermoplastic waste: From environmental impact to operational readiness. *Biotechnology Advances*, 49(February). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107731>

Yin, C. F., Xu, Y., & Zhou, N. Y. (2020). Biodegradation of polyethylene mulching films by a co-culture of *Acinetobacter* sp. strain NyZ450 and *Bacillus* sp. strain NyZ451 isolated from *Tenebrio molitor* larvae. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 155(September). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105089>

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196–1199. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>

Zheng, Y., Yanful, E. K., & Bassi, A. S. (2005). A Review of Plastic Waste Biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(4), 243–250. <https://doi.org/10.1080/07388550500346359>