

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



“Biodegradación del polietileno de baja densidad usando diferentes concentraciones de *Aspergillus niger*, bajo condiciones de laboratorio”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA:

Bach. Díaz Cabellos, Gabriela Mercedes

ASESOR:

M.Sc. Alva Muñoz, Eterio Amaranto

ORCID: 0000-0002-4113-7981

Nuevo Chimbote – Perú

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**“BIODEGRADACIÓN DEL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD
USANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Aspergillus niger*,
BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”**

Tesis para obtener el Título Profesional de Licenciado en Biotecnología

Revisado y aprobado por el Asesor:

M. Sc. Alva Muñoz, Eterio Amaranto
DNI: 32406295
ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Revisado y aprobado por el Jurado Evaluador:

Ms. Villanueva Carlos José Manuel
PRESIDENTE
DNI: 32733772
ID ORCID: 0000-0002-5056-0001

M. Sc. Alva Muñoz Eterio Amaranto
SECRETARIO
DNI: 32406295
ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

M. Sc. Lecca Zavaleta Victor Eduardo
INTEGRANTE
DNI: 42636735
ID ORCID: 0000-0002-3759-8128

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión en el Aula de la Escuela de Posgrado UNS , dando cumplimiento a la Resolución N° 401-2022-UNS-CFC , siendo las 18:00 horas del día 14 diciembre del 2022

se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Ms. Blgo Mblgo José Villanueva Carlos, teniendo como miembros a. M.Sc .Víctor Lecca Zavaleta. (secretario) (a) y al Ms Eterio Alva Muñoz. (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por él, (la), (los) tesista (as) Gabriela Mercedes Díaz Cabellos con código 0201423036 de la Escuela Profesional de Biotecnología .quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

“BIODEGRADACION DEL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD USANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Aspergillus niger* BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO”

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **BUENO** asignándole un calificativo de Diecisiete puntos. Según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS)

Siendo las 19:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



Nombre: Ms. José Villanueva Carlos
Presidente



Nombre: M Sc Víctor Lecca Zavaleta
Secretario



Nombre: M Sc Eterio Alva Muñoz
Integrante

Distribución: Integrantes JE (03), tesistas () y archivo FC (02).

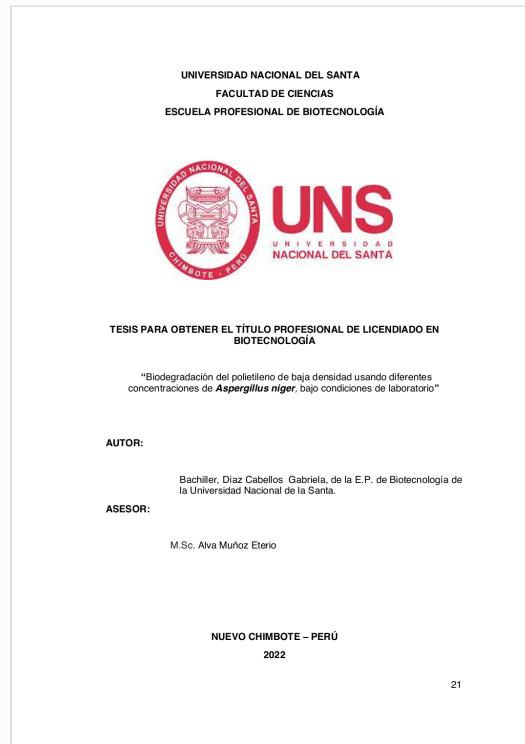


Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Jhonny Jasson SILVA RODRIGUEZ
Título del ejercicio: 2023
Título de la entrega: DIAZ CABELLOS GABRIELA
Nombre del archivo: D_AZ_CABELLOS_GABRIELA_TESIS_2022_4_turniting_corregido...
Tamaño del archivo: 880.63K
Total páginas: 72
Total de palabras: 15,229
Total de caracteres: 70,191
Fecha de entrega: 03-jul.-2023 08:40p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 2117765682



DIAZ CABELLOS GABRIELA

INFORME DE ORIGINALIDAD

24%

INDICE DE SIMILITUD

24%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

9%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|--|----|
| 1 | repositorio.uniandes.edu.co Fuente de Internet | 5% |
| 2 | www.zaragoza.unam.mx Fuente de Internet | 5% |
| 3 | www.upo.es Fuente de Internet | 2% |
| 4 | 1library.co Fuente de Internet | 2% |
| 5 | www.jmest.org Fuente de Internet | 1% |
| 6 | repository.udistrital.edu.co Fuente de Internet | 1% |
| 7 | core.ac.uk Fuente de Internet | 1% |
| 8 | repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 9 | repositorio.espe.edu.ec:8080 Fuente de Internet | 1% |

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo está dedicado principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres y mis hermanos por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy. En especial a mi padre, quien me enseñó que el mejor conocimiento que se puede tener es el que se aprende por sí mismo.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi gratitud al profesor Alva Muñoz Eterio por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas.

Y por supuesto a mi compañero, Lic. en Biotecnología, André Ángeles, gracias por la paciencia, orientación y guiarme en el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE

| | |
|--|-------|
| DEDICATORIA | v |
| AGRADECIMIENTO | vi |
| ÍNDICE | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xiv |
| RESUMEN | xx |
| ABSTRACT | xxii |
| CAPÍTULO I | xxiii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 24 |
| OBJETIVOS | 25 |
| Objetivo general | 25 |
| Objetivos específicos | 25 |
| HIPÓTESIS | 25 |
| JUSTIFICACIÓN | 26 |
| CAPÍTULO II | 28 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 28 |
| CAPÍTULO III | 40 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 41 |
| 3.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA. | 41 |
| 3.2. AISLAMIENTO DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> . | 41 |
| 3.3. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> . | 41 |
| 3.4. ESTUDIO MICROSCÓPICO DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> . | 42 |
| 3.5. PREPARACIÓN DE LAS PELÍCULAS DE POLIETILENO. | 42 |
| 3.6. ACTIVIDAD DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> SOBRE EL POLIETILENO, EVALUADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES (103 ,105y 108 esporas × mL – 1) | 43 |
| 3.7. OBSERVACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> . | 44 |
| 3.7.1 Prueba cuantitativa de degradación de LDPE | 44 |
| Medidas de pérdida de peso: | 44 |
| 3.7.2 Cambio de pH: | 44 |
| 3.7.3 Observación en estereoscopio y microscopio: | 44 |
| 3.7.4 Estimación de biomasa a partir del medio: | 45 |
| 3.7.5 Estimación de concentración de proteínas a partir del medio: | 45 |
| CAPÍTULO IV | 46 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 46 |
| 4.1. AISLAMIENTO DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> : | 46 |
| 4.2. Estimación de concentración de proteínas | 48 |
| 4.3. Cinética de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> | 67 |
| | vii |

| | | |
|------|---|-----|
| 4.4. | Cambios morfológicos _____ | 78 |
| 4.5. | Medidas de pérdida de peso _____ | 79 |
| 4.6. | Cambio de pH: _____ | 82 |
| 4.7. | Cálculo de desviación estándar _____ | 83 |
| | DISCUSIÓN _____ | 89 |
| | CAPÍTULO V _____ | 91 |
| | CONCLUSIONES _____ | 91 |
| | RECOMANDACIONES _____ | 93 |
| | CAPÍTULO VI _____ | 94 |
| | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES _____ | 94 |
| | CAPÍTULO VII _____ | 96 |
| 5. | ANEXO: _____ | 97 |
| 5.1 | . Formulación de medio de cultivo para <i>Aspergillus niger</i> . _____ | 97 |
| 5.2 | Medio de biodegradación para <i>Aspergillus niger</i> . _____ | 98 |
| 5.3 | Preparación de reactivo de Bradford. _____ | 98 |
| 5.4 | Curva de calibración y concentraciones de BSA para el ensayo de Bradford. _ | 98 |
| | _____ | 98 |
| 5.5 | Análisis estadístico _____ | 99 |
| 5.6 | Diseño de experimento _____ | 99 |
| 5.7 | Modelo matemático _____ | 101 |
| 5.8 | Panel fotográfico _____ | 102 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabla 1. | Medio de cultivo utilizado para la biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE). | 43 |
| Tabla 3. | Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL – 1) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 1. | 48 |
| Tabla 4. | Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL – 1) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 1. | 50 |
| Tabla 5. | Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL – 1) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 1. | 50 |
| Tabla 6. | Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL – 1) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 1. | 52 |
| Tabla 7. | Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL – 1) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 1. | 52 |
| Tabla 8. | Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL – 1) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 1. | 54 |
| Tabla 9. | Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL – 1) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 2. | 54 |

| | |
|--|----|
| Tabla 10. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* $mL - 1$) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 2. | 56 |
| Tabla 11. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* $mL - 1$) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 2. | 56 |
| Tabla 12. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* $mL - 1$) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 2. | 58 |
| Tabla 13. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* $mL - 1$) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 2. | 58 |
| Tabla 14. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* $mL - 1$) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 2. | 60 |
| Tabla 15. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* $mL - 1$) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 3. | 60 |
| Tabla 16. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* $mL - 1$) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 3. | 62 |
| Tabla 17. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* $mL - 1$) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 3. | 62 |

| | |
|--|----|
| Tabla 18. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas *mL ⁻¹ | 63 |
| Tabla 19. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL – 1) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 3. | 64 |
| Tabla 20. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL – 1) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 3. | 64 |
| Tabla 21 Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL – 1) de <i>Aspergillus niger</i> en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 3. | 66 |
| Tabla 22. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos.Repetición 1 Réplica 1. | 67 |
| Tabla 23. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos.Repetición 2 Réplica 1. | 68 |
| Tabla 24. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos.Repetición 3 Réplica 1..... | 69 |
| Tabla 25. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos.Repetición 1 Réplica 2. | 70 |
| Tabla 26. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos.Repetición 2 Réplica 2. | 71 |
| Tabla 27. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos.Repetición 3 Réplica 2. | 72 |
| Tabla 28. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos.Repetición 1 Réplica 3. | 73 |
| Tabla 29. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos.Repetición 2 Réplica 3. | 74 |
| Tabla 30. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos.Repetición 3 Réplica 3. | 75 |
| Tabla 31. Observación con estereoscopio de la superficie de las láminas de LDPE y la fuerte adherencia de <i>Aspergillus niger</i> en la | |

| | |
|--|----|
| superficie luego de 35 días de incubación a 37°C. En donde se revela la ausencia de biofilm en el control (j) y la presencia del hongo sobre los tratamientos y en cada réplica..... | 78 |
| Tabla 32. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de <i>Aspergillus niger</i> . Réplica1 y las 3 repeticiones..... | 80 |
| Tabla 33. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de <i>Aspergillus niger</i> . Réplica 2 y las 3 repeticiones..... | 81 |
| Tabla 34. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de <i>Aspergillus niger</i> . Réplica 3 y las 3 repeticiones..... | 81 |
| Tabla 35. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de <i>Aspergillus niger</i> . Réplica1 y las 3 repeticiones..... | 82 |
| Tabla 36. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de <i>Aspergillus niger</i> . Réplica 2 y las 3 repeticiones..... | 82 |
| Tabla 37. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de <i>Aspergillus niger</i> . Réplica 3 y las 3 repeticiones..... | 83 |
| Tabla 38. Promedio de peso perdido de los 3 tratamientos de la réplica 1. | 83 |
| Tabla 39. Promedio de desviación estándar de los 3 tratamientos de la réplica 1..... | 83 |
| Tabla 40. Donde el coeficiente de variación de T1 que es 0.38892 es el más disperso o más heterogéneo y el menos heterogéneo o más homogéneo es de T1 que es 0.20830..... | 84 |
| Tabla 41. Promedio de peso perdido de los 3 tratamientos de la réplica 2. | 84 |
| Tabla 42. Promedio de desviación estándar de los 3 tratamientos de la réplica 2..... | 84 |
| Tabla 43. Donde el coeficiente de variación de T3 que es 0.57282 es el más disperso o más heterogéneo y el menos heterogéneo o más homogéneo es de T1 que es 0.57282..... | 84 |
| Tabla 44. Promedio de peso perdido de los 3 tratamientos de la réplica 3. | 85 |
| Tabla 45. Promedio de desviación estándar de los 3 tratamientos de la réplica 3..... | 85 |
| Tabla 46 Donde el coeficiente de variación de T1 que es 0.57282 es el más disperso o más heterogéneo y el menos heterogéneo o más homogéneo es de T2 que es 0.49487..... | 85 |

| | |
|--|----|
| Tabla 47. Desviación estándar y promedios. Cálculo de barras de error..... | 85 |
| Tabla 48. Barras de error de cada tratamiento en relación al tiempo de las 3 concentraciones. | 86 |
| Tabla 49. Tratamiento de la concentración 10^8 esporas \times ml $^{-1}$. Concentración de proteínas, biomasa y peso LDPE en relación al tiempo..... | 86 |
| Tabla 50 Tratamiento de la concentración 10^5 esporas \times ml $^{-1}$. Concentración de proteínas, biomasa y peso LDPE en relación al tiempo..... | 87 |
| Tabla 51 Tratamiento de la concentración 10^3 esporas \times ml $^{-1}$. Concentración de proteínas, biomasa y peso LDPE en relación al tiempo..... | 88 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Propiedades generales del LDPE..... | 29 |
| Figura 2. | Microorganismos empleados en pruebas de biodegradabilidad de polímeros sintéticos..... | 30 |
| Figura 3. | Técnicas y métodos disponibles para el estudio de la degradación del LDPE (M. Kamboj et al.,2016)..... | 36 |
| Figura 4. | Ruta de degradación natural del LDPE | 37 |
| Figura 5. | Procedimiento para el aislamiento de <i>Aspergillus niger</i> : (a) Las muestras tomadas se homogenizaron (b) posteriormente se hicieron diluciones seriadas, para luego sembrar en placas Petri, (c) Finalmente luego de 5 días se asilaron en tubos de ensayo luego en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA y Czapek Dox..... | 46 |
| Figura 6. | Observación de la presencia de hongo en el centro de la placa en cultivo en medio Czapek Dox: (a) Presencia de hongo en la placa sin características de <i>Aspergillus niger</i> , (b) La presencia de distintos hongos, (c) Presencia de hongo con distintas características. | 47 |
| Figura 7. | Observación e identificación microscópica y macroscópica del <i>Aspergillus niger</i> | 48 |
| Figura 8. | Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 1 de réplica 1. | 49 |
| Figura 9. | Gráfico de las concentraciones de <i>Aspergillus niger</i> en relación al tiempo. | 49 |
| Figura 10. | En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Réplica 1 | 50 |
| Figura 11. | Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 2 de réplica 1. | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 12. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas *mL ⁻¹ | 51 |
| Figura 13. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 2 Réplica 1..... | 52 |
| Figura 14. Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 3 de réplica 1. | 53 |
| Figura 15. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas *mL ⁻¹ | 53 |
| Figura 16. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Réplica 1. | 54 |
| Figura 17. Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 1 de réplica 2. | 55 |
| Figura 18. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas *mL ⁻¹ | 55 |
| Figura 19. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 1 Réplica 2..... | 56 |
| Figura 20. Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 2 de réplica 2. | 57 |
| Figura 21. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas *mL ⁻¹ | 57 |
| Figura 22. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y | |

| | | |
|--------------------|--|----|
| | 10 ³ para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 2 Réplica 2..... | 58 |
| Figura 23. | Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 3 de réplica 2. | 59 |
| Figura 24. | Gráfico concentración en relación al tiempo de 10 ⁸ (T1), 10 ⁵ (T2), 10 ³ (T3) esporas *mL ⁻¹ | 59 |
| Figura 25. | En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10 ⁸ se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10 ⁵ y 10 ³ para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 3 Réplica 2..... | 60 |
| Figura 26. | Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 1 de réplica 3. | 61 |
| Figura 27. | Gráfico concentración en relación al tiempo de 10 ⁸ (T1), 10 ⁵ (T2), 10 ³ (T3) esporas *mL ⁻¹ | 61 |
| Figura 28. | En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10 ⁸ se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10 ⁵ y 10 ³ para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 1 Réplica 3..... | 62 |
| Figura 29 . | Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 2 de réplica 3. | 63 |
| Figura 30. | En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10 ⁸ se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10 ⁵ y 10 ³ para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 2 Réplica 3..... | 64 |
| Figura 31 . | Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 3 de réplica 3. | 65 |
| Figura 32. | Gráfico concentración en relación al tiempo de 10 ⁸ (T1), 10 ⁵ (T2), 10 ³ (T3) esporas *mL ⁻¹ | 65 |
| Figura 33. | En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10 ⁸ se da una mayor concentración de | |

| | |
|--|----|
| proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 3 Réplica 3..... | 66 |
| Figura 34. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 1 Réplica 1..... | 67 |
| Figura 35. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 2 Réplica 1 | 68 |
| Figura 36 . Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 3 Réplica 1 | 69 |
| Figura 37 . Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 1 Réplica 2..... | 70 |
| Figura 38. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 2 Réplica 2..... | 71 |
| Figura 39. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 3 Réplica 2..... | 72 |
| Figura 40. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 1 Réplica 3..... | 73 |
| Figura 41. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. Repetición 2 Réplica 3..... | 74 |
| Figura 42. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. Repetición 3 Réplica 3..... | 75 |
| Figura 43. Dato experimental del modelo matemático ajustado a la cinética de Monod en el programa Wolfram mathematic , para obtener biomasa requerida. Réplica 1 | 76 |
| Figura 44. Dato experimental del modelo matemático ajustado a la cinética de Monod en el programa Wolfram mathematic, para obtener biomasa requerida. Réplica 2..... | 76 |
| Figura 45. Dato experimental del modelo matemático ajustado a la cinética de Monod en el programa Wolfram mathematic. Réplica 3..... | 77 |
| Figura 46. Dato experimental del modelo matemático ajustado a la ecuación de Gompertz en el programa Wolfram mathematic. Réplica 1 | 77 |

| | |
|--|----|
| Figura 47. La observación en el microscopio a 40 X revela la presencia del hongo sobre las láminas y esporas sobre la superficie. (a) 10^8 esporas* mL^{-1} , (b) 10^5 esporas* mL^{-1} , (c) 10^3 esporas* mL^{-1} | 79 |
| Figura 48. Biodegradación de <i>Aspergillus niger</i> , concentración 10^8 espora* ml^{-1} . Concentración de proteínas, biomasa y peso de LDPE..... | 86 |
| Figura 49. Biodegradación de <i>Aspergillus niger</i> , concentración 10^5 esporas* ml^{-1} . Concentración de proteínas, biomasa y peso de LDPE..... | 87 |
| Figura 50. Biodegradación de <i>Aspergillus niger</i> , concentración 10^3 esporas* ml^{-1} . Concentración de proteínas, biomasa y peso de LDPE..... | 88 |

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Fórmula para determinar el porcentaje de la pérdida de peso. ... 44

Ecuación 2. Aplicando la fórmula de porcentaje de degradación de LDPE. ... 80

RESUMEN

El polietileno de baja densidad (LDPE) es el material de embalaje más utilizado principalmente debido a sus excelentes propiedades mecánicas, propiedades de barrera contra el agua, peso ligero, bajo costo y alta eficiencia energética. Sin embargo, debido a su naturaleza omnipresente y resistencia a la biodegradabilidad, las estrategias de eliminación son cruciales y necesitan atención.

La biodegradación de polietileno de baja densidad puede ser una solución a la acumulación y aumento de desechos plásticos en el medio ambiente. En el presente estudio se muestran los resultados de la capacidad degradante del hongo *Aspergillus niger* sobre muestras de polietileno de baja densidad (bolsa plástica común) bajo condiciones 10^8 esporas \times mL $^{-1}$, 10^5 esporas \times mL $^{-1}$ y 10^3 esporas \times mL $^{-1}$, controladas de laboratorio, donde este material fue expuesta a un tratamiento térmico; la biodegradación de las muestras se midió usando la determinación de enzimas y/o proteínas con el método de Bradford 35 días después de agregar el inóculo se encontró la preferencia de *Aspergillus niger*, en la que presentaron biopelículas de hifas penetrando la superficie de las láminas de polietileno de baja densidad. Teniendo en cuenta la capacidad biodegradativa de las láminas de LDPE en el medio de cultivo Czapek-Dox se tuvo en cuenta la disminución de pH del medio de cultivo.

El hongo fue asilado del botadero “La carbonera”, en medios de cultivo Agar Papa Dextrosa y Czapeck Dox, de acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas, además usando la técnica de microcultivo

La degradación del LDPE se determinó por pérdida de peso de la muestra, la concentración de proteínas y/o enzimas en el medio de fermentación. Usando la técnica de Bradford, se determinó la concentración de proteínas obteniendo como mejor resultado la concentración de 10^8 esporas \times mL $^{-1}$, la cual fue de e 3.821 mg/ml. Además de la técnica de pérdida de peso y cambios morfológicos. El cambio de pH del medio de cultivo, obteniendo un mejor resultado en la tercera

réplica, en el primer tratamiento de 10^8 esporas* mL^{-1} con un pH final de 3.96. Se mostró en relación al modelo matemático de Monod, el cual se determinó usando el método de peso seco, donde se obtuvo la mayor biomasa en la repetición 2 de la réplica 1 que fue de 4.5 g/L a la concentración de 10^8 esporas* mL^{-1} .

Palabras clave: Polietileno de baja densidad, *Aspergillus niger*, biodegradación, Bradford.

ABSTRACT

Low Density Polyethylene (LDPE) is the most widely used packaging material mainly due to its excellent mechanical properties, water barrier properties, light weight, low cost, and high energy efficiency. However, due to its ubiquitous nature and resistance to biodegradability, disposal strategies are crucial and need attention.

The biodegradation of low-density polyethylene can be a solution to the accumulation and increase of plastic waste in the environment. This study shows the results of the degrading capacity of the *Aspergillus niger* fungus on low-density polyethylene samples (common plastic bag) under conditions of 10^8 spores \times mL $^{-1}$, 10^5 spores \times mL $^{-1}$ and 10^3 spores \times mL $^{-1}$, controlled laboratory, where this material was exposed to a heat treatment; The biodegradation of the samples was measured using the determination of enzymes and/or proteins with the Bradford method. 35 days after adding the inoculum, the preference of *Aspergillus niger* was found, in which they presented biofilms of hyphae penetrating the surface of the sheets of low-density polyethylene. Taking into account the biodegradative capacity of the LDPE sheets in the Czapek-Dox culture medium, the pH decrease of the culture medium was taken into account.

The fungus was isolated from the "La Carbonera" dump, in culture media Agar Potato Dextrose and Czapeck Dox, according to the macroscopic and microscopic characteristics, also using the microculture technique.

The degradation of the LDPE was determined by weight loss of the sample, the concentration of proteins and/or enzymes in the fermentation medium. Using the Bradford technique, the protein concentration was determined, obtaining the best result in the concentration of 10^8 spores \times mL $^{-1}$, which was 3.821 mg/ml. In addition to the technique of weight loss and morphological changes. The pH changes of the culture medium, obtaining a better result in the third replicate, in the first treatment of 10^8 spores \times mL $^{-1}$ with a final pH of 3.96. It was shown in relation to the Monod mathematical model, which was determined using the dry

weight method, where the highest biomass was obtained in replicate 2 of replicate 1, which was 4.5 g/L at a concentration of 108 spores*mL⁻¹.

Keywords: Low density polyethylene, *Aspergillus niger*, biodegradation, Bradford.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Durante la última década, los materiales de polietileno han ganado un amplio uso en diversos campos que son indispensables. Ofrecen una serie de ventajas sobre otros materiales que son versátiles, ligeros, de bajo costo, fuertes y potencialmente transparentes y son ideales para una variedad de aplicaciones. Sin embargo, los materiales plásticos tienen varias desventajas, el criterio más importante es su persistencia a largo plazo en el medio ambiente y su resistencia a la degradación. Una estimación general de la generación mundial de residuos plásticos es de aproximadamente 57 millones de toneladas (Kumar et al., 2007).

El plástico degradable es un plástico diseñado para sufrir cambios significativos en su estructura química en condiciones ambientales específicas, dando como resultado la pérdida de algunas de sus propiedades (Albertsson et al., 1987). Las características poliméricas tales como el peso molecular, la cristalinidad, los grupos funcionales, la movilidad, el sustituyente presente en la estructura y los aditivos añadidos a los polímeros juegan un papel significativo en su degradación (Gu et al., 2000). El destino de estos polímeros orgánicos en el medio ambiente y el tiempo requerido para su mineralización total a dióxido de carbono todavía no se han entendido completamente. Para aliviar la circulación anormal, hay dos formas, una es desarrollar la capacidad latente de los microorganismos para degradar los plásticos utilizados actualmente y la otra es desarrollar polímeros sintéticos susceptibles de degradación (Hiroyuki et al., 1978). El polietileno de baja densidad puede degradarse en varios métodos como sigue: degradación química, fotodegradación y degradación biológica (Da Luz et al., 2014). Las especies microbianas asociadas con los polímeros, se identificaron como bacterias (*Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*), hongos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus* y *Trichoderma*) (Swift 1997). Hay muchos investigadores en todo el mundo que investigan la capacidad de las enzimas liberadas por los microbios en la oxidación del polímero. Las enzimas microbianas inducen la tasa de biodegradación del LDPE muy eficazmente sin

causar daño al medio ambiente. Las enzimas extracelulares son demasiado grandes para penetrar profundamente en el material polimérico, y por lo tanto, actúan sólo sobre la superficie del polímero, por lo tanto la biodegradación de los plásticos suele ser un proceso de erosión superficial.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la capacidad biodegradativa de *Aspergillus niger* sometido a distintas concentraciones 10^8 , 10^5 , 10^3 esporas $\times mL^{-1}$ sobre el polietileno de baja densidad en la modalidad de cultivo por lote.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar *Aspergillus niger* por características microscópicas macroscópicas.
- Evaluar la degradación de polietileno (LDPE) haciendo uso de métodos y técnicas para el estudio de la biodegradación.
- Determinar la concentración de proteínas en el medio de cultivo para medir la biodegradación.
- Determinar los parámetros cinéticos del proceso de biodegradación de láminas de LDPE.

HIPÓTESIS

- La capacidad biodegradativa de *Aspergillus niger* sobre el polietileno de baja densidad, en la modalidad de cultivo por lote, es mayor a una concentración de 10^8 esporas $\times mL^{-1}$.

JUSTIFICACIÓN

El plástico es un material derivado del petróleo, casi indispensable en la vida cotidiana, pero la producción desmesurada ha llevado a la acumulación de aproximadamente 1.000 millones de toneladas de plásticos en el planeta, causando un impacto ecológico en suelos y océanos (ECOMUNDO,2011).

Se calcula que un 70% de la basura se encuentra en el fondo del océano es decir que más de 13 000 piezas de desperdicios de plástico están flotando en cada kilómetro cuadrado del océano (GREENPEACE,2011).

La biodegradación es aceptada por la comunidad científica por su eficiencia ya que los microorganismos atacan la superficie del plástico y lo utilizan como fuente de carbono para su crecimiento y a su vez degradándolo tanto de forma aeróbica como anaeróbica (Arutchelvi et al., 2008).

En la mayoría de los estudios, los hongos fueron considerados para la degradación del LDPE debido a su capacidad de formar proteínas hidrófobas que se pueden unir a la superficie del polímero, su generación de enzimas degradantes que están bien adaptadas al LDPE, el crecimiento más rápido de la biomasa fúngica en el suelo en comparación con las bacterias y la extensión del crecimiento y la penetración en otros lugares a través de la distribución de hifas. Además, los hongos sobreviven en ambientes con bajos nutrientes, pH y disponibilidad de humedad. Sin embargo, todavía hay muchas áreas de investigación no exploradas en la degradación de LDPE por hongos. La caracterización de la degradación de LDPE por hongos de origen sólido es uno de estos temas atractivos debido a su compatibilidad con un ambiente rico en residuos (como el relleno sanitario y el compostaje) que contiene una variedad de polímeros descartados. Entre varias técnicas de optimización estadística para componentes de medios junto con parámetros ambientales, la metodología de superficie de respuesta (RSM) se ha empleado ampliamente en la optimización de diversos procesos biológicos. Las propiedades a largo plazo de los polímeros sintéticos y naturales han atraído más interés durante la última década debido a

que las preocupaciones ambientales con respecto a la eliminación de estos plásticos han aumentado. (*Shah AA, Hasan F, Hamed A, Ahmed S et al., 2008*).

Esta investigación se elabora de la necesidad de buscar una solución biológica al problema ambiental que genera la acumulación de residuos plásticos en el país, ya que está dando lugar a problemas en el manejo de la gestión ambiental y de residuos sólidos, especialmente los polietilenos de baja densidad (LDPE).

De acuerdo a ello es que en el presente trabajo de investigación se aisló *Aspergillus niger*, microorganismo presente en residuos de bolsas de plásticos, a diferentes profundidades, con lo que se pretende dar solución a la presencia de estos contaminantes que actualmente son un gran problema ambiental.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Plásticos

Son polímeros generalmente de naturaleza química hidrófoba, que normalmente poseen una alta durabilidad, suelen no tener un punto de fusión fijo y poseen en determinado intervalo de temperaturas características flexibles y moldeables. Se calcula que pueden tardar entre 100 y 1000 años para degradarse dependiendo del tipo de polietileno. La *American Society for testing materials (ASTM)* define plástico como: "Cualquier material de un extenso y variado grupo que contiene como elemento esencial una sustancia orgánica de gran peso molecular, siendo sólida en su estado final; ha tenido o puede haber tenido en alguna etapa de su manufactura (fundido, cilindrado, prensado, estirado, moldeado, etc.) diferentes formas de fluidificación, junta o separada, de presión o calor" (Lemus, 1997).

2.2. Polietileno:

El polietileno (PE) es el termoplástico más utilizado en la actualidad, su producción anual está estimada en aproximadamente 80 millones de toneladas métricas (Pacheco, 2010).

2.3. Polietileno de baja densidad (LDPE)

Estos polímeros fueron creados para ser utilizados como aislamiento eléctrico, pero debido a sus propiedades se les encontró diversas aplicaciones especialmente como películas y envases (Amo, et al., 2002). El PE puede clasificarse según su grado de densidad: Polietileno de baja densidad, cuando la densidad se encuentra entre 0.915 - 0.925 g/cm, el cual se produjo comercialmente por primera vez en el Reino Unido en 1939; de Media Densidad con densidad entre 0.926 - 0.940 g/cm; y de Alta Densidad con densidad entre

0.941 - 0.960 g/cm (Ecopetrol, sf). Algunas de las propiedades que hacen del polietileno una materia prima tan utilizada son: su estabilidad, ya que son inertes a una gran variedad de compuestos químicos, su resistencia a oxidantes suaves y agentes reductores, la flexibilidad, tenacidad y propiedades eléctricas sobresalientes (Amo et al., 2002).

| Propiedad | |
|--|-----------------------------------|
| Densidad (g/cm ³) | 0.91 – 0.93 |
| Resistencia a la tensión | 600 – 2300 psi 4.1 – 15.8 (Pa) |
| Elongación (%) | 90 –800 |
| Resistencia al impacto (ft-lb/in de corte) | >16 |
| Constante dieléctrica (1000 ciclos) | 2.25-2.35 |
| Absorción de agua (1/8 in, 24 h, %) | <0.015 |

Figura. 1 Propiedades generales del LDPE

Fuente: *Billmeyer, 1971*

2.4. Biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE)

En un sentido estricto el LDPE se degrada por lo tanto es biodegradable, pero de acuerdo a (Ohtake et al 1998) ; una lámina de LDPE de 60µm se tarda completamente en degradar 300 años, y de acuerdo a muchas publicaciones esta estimación implica una tasa constante de biodegradación que es poco realista , por lo que se puede considerar prácticamente no biodegradable, sin embargo si se modifica su estructura, o se dan las condiciones óptimas, utilizando microorganismos aptos para su degradación es posible disminuir su tiempo de vida drásticamente.

Microorganismos tales como bacterias y hongos juegan un papel importante en la descomposición de diferentes materiales, sin embargo el mayor obstáculo en la biodegradación del LDPE es la resistencia a los ataques biológicos debido a que es un compuesto altamente hidrofóbico, tiene un alto peso molecular, y carece de grupos funcionales reconocidos por la mayoría de las enzimas de los microorganismos (Shah,A. et al., 2008). Por estas razones se

suelen utilizar tratamientos previos como la foto- oxidación, la termo-oxidación y la oxidación química con el fin de aumentar los grupos funcionales y la tasa de degradación (Yamada-Onodera, K. et al., 2001; Shah, A. et al.,2008; Zahra, S. et al., 2010; Mathur et al., 2011; Nowak et al., 2011; Santo et al., 2012; Harshvardhan & Jha, 2013; Restrepo-Flórez et al., 2014;).

| | |
|-------------|---|
| Hongos | <i>Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Chaetomium globosum, Penicillium funiculosum, Pullularia pullulans.</i> |
| Bacterias | <i>Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Coryneformes bacterium, Bacillus sp.</i> |
| Actinomyces | <i>Streptomyces sp.</i> |

Figura 2. Microorganismos empleados en pruebas de biodegradabilidad de polímeros sintéticos

Fuente: Schnabel, 1981

La biodegradación se rige por diferentes factores como, el tratamiento previo, el tipo de microorganismo y las características del polímero tales como: cristalinidad, tautilidad, peso molecular, grupos funcionales y plastificantes o aditivos añadidos al polímero (Shah, A. et al., 2008).

2.5. Mecanismo de biodegradación del LDPE

El proceso de degradación consiste en el paso de polímeros a monómeros, para que estos pueden ser mineralizados, debido al tamaño de la mayoría de los polímeros y a que un aumento en el peso molecular significa una menor tasa de degradación del polímero por parte de los microorganismos, ya que no pueden pasar a través de las membranas celulares. Los polímeros deben ser despolimerizados a monómeros dímeros y oligómeros para poder ser absorbidos o biodegradados dentro de células microbianas más fácilmente (Shah, A. et al., 2008; Restrepo-Flórez et al., 2014).

Se ha encontrado la presencia de dos enzimas activamente implicadas en la degradación biológica de polímeros: despolimerasas extracelulares e intracelulares. Otras enzimas también fueron reportadas por estar implicadas en

el proceso de biodegradación del polietileno como: la enzima alcano monoxigenasa (Uribe et al, 2011), las enzimas oxidasas y catalasas y la enzima lacasa extracelular. En otros estudios se menciona degradación catalizada por enzimas, pero no se especifican cuáles. Estas enzimas ayudan a descomponer polímeros complejos en moléculas más pequeñas de cadena corta, haciéndolas lo suficientemente pequeñas para pasar por las membranas bacterianas exteriores semipermeables, para posteriormente ser utilizados como fuentes de carbono y de energía. (Yamada-Onodera,2011; Harshvardhan & Jha, 2013)

Este proceso de degradación enzimática de polímeros se da por hidrólisis en dos pasos: primero la enzima se une al sustrato del polímero para posteriormente catalizar un rompimiento hidrolítico; como se dijo el LDPE puede ser degradado ya sea por la acción de enzimas despolimerasas extracelulares e intracelulares. La degradación intracelular es la hidrólisis de un depósito de carbono endógeno debido a la acumulación de los propios microorganismos, mientras que la extracelular consiste en utilizar una fuente de carbono exógeno y no necesariamente necesita la acumulación de los microorganismos (Shah, A. et al., 2008).

Cuando los productos finales son CO_2 , H_2O y CH_4 la degradación es llamada mineralización y ya que la degradación de este sustrato rara vez llega al 100%, una pequeña parte del polímero se incorpora en la biomasa microbiana, humus u otros productos naturales (Shah, A. et al., 2008).

Los grupos dominantes de los microorganismos y las vías degradadoras asociadas con la degradación del polímero son determinadas por las condiciones ambientales y la tasa hidrofóbica de los microorganismos. Respecto a la primera cuando hay O disponible en el ambiente los microorganismos aerobios serán los principales responsables de la destrucción de materiales complejos, generando CO_2 , H_2O y biomasa microbiana como productos finales. Por otra parte en condiciones anóxicas, los microorganismos anaerobios serán los responsables de la degradación del polímero y en condiciones metanogénicas los productos

primarios serán el CO₂, H₂O y CH₄ y la biomasa microbiana (*Shah, A. et al., 2008*).

En cuanto a la tasa hidrofóbica debido a que el polietileno es un material altamente hidrofóbico no es fácil la formación de biopelículas, por lo que un microorganismo con una alta hidrofobicidad de la superficie celular podrá adherirse mejor a la superficie del plástico y formar una biopelícula (*Mathur et al., 2011*).

2.6. Tipos de degradación:

La degradación de los polímeros es causada principalmente, por reacciones que producen el rompimiento de los enlaces en las macromoléculas.

Según el modo de iniciación de los procesos está el que sea de diferente índole, por lo que la degradación puede ser:

- Física: mecánica, térmica, por efecto de radiaciones de energía alfa y fotodegradación.
- Química
- Ambiental o por intemperismo.
- Biológica o biodegradación

2.6.1. Degradación mecánica.

Cuando se producen cambios macroscópicos por efecto de fuerzas de corte, si se aplica una tensión suficientemente elevada al material polimérico, se pueden producir rupturas en los enlaces de las cadenas moleculares, que inician las reacciones de degradación (*Sáenz, 2006*).

2.6.2. Degradación térmica

Se presenta cuando el polímero experimenta cambios químicos, después de ser sometido a temperaturas altas sin la intervención simultánea de otro compuesto. Sin embargo, suelen ser los aditivos o impurezas presentes en material, los que se descomponen por efecto de la temperatura y reaccionan con la matriz (Limón, 2001; Sáenz, 2006). Es difícil distinguir entre una degradación térmica y una termoquímica, debido a que los materiales poliméricos son raramente "químicamente puros" (Limón, 2001).

2.6.3. Degradación por radiación de energía alfa.

Es inducida por radiación electromagnética (rayos γ o x) o radiación de partículas (alfa, neutrones, productos de fusión) y no es específica de la absorción (Limón, 2001). Las radiaciones son capaces de generar reactivos intermedios, generalmente iones y radicales libres en el sustrato polimérico, que producen alteraciones significativas en la matriz del material (Sáenz, 2006). La existencia de grupos cromóforos, no es un pre-requisito, como en el caso de la fotodegradación, ya que todas las moléculas son capaces de interactuar con la radiación (Limón, 2001). La extensión y el carácter de los cambios químicos y físicos que se producen, dependen de la composición química del material irradiado e indudablemente de la naturaleza de la radiación.

En muchas ocasiones, las reacciones químicas que tienen lugar cuando se somete un determinado material polimérico a un tipo de radiación, son reacciones intermoleculares, mediante las cuales el material se entrecruza formando nuevos enlaces entre las macromoléculas individuales. Este proceso puede ser considerado como opuesto a la degradación, ya que conduce a un incremento en el tamaño de las macromoléculas (Imbuga, 2018).

2.6.4. Fotodegradación.

Se refiere a los cambios físicos y químicos producidos por la radiación con luz UV o visible. Para que el grado de conversión sea realmente significativo y la luz ultravioleta o visible sea absorbida por el material, debe poseer grupos cromóforos; es decir, capaces de absorber dicha radiación. Estos grupos pueden formar parte de la propia molécula o permanecer en el sustrato en forma de aditivos (Sáenz, 2006). Generalmente dichos grupos absorben radiación, en una escala de longitudes de onda menores de 400 nm.

2.6.5. Degradación química.

Es inducida por reactivos químicos (ácidos, bases y disolventes). En muchos casos, se observa una serie de conversiones químicas de los compuestos presentes en el material (Limón, 2001); sin embargo, este modo de iniciación del proceso de degradación, necesita una energía de activación muy alta por lo que, generalmente, sólo se observan grados de conversión significativos, si el proceso se produce a temperaturas elevadas (Sáenz, 2006)

2.6.6. Degradación ambiental.

Los materiales poliméricos sufren un deterioro cuando están expuestos a la acción de la luz solar, en combinación con otras variables climáticas como cambios de temperatura, humedad ambiental, viento, contaminación, etc. Este deterioro puede manifestarse superficialmente por modificaciones tanto del color como de pérdida de brillo, pero, generalmente, afecta también a las cadenas moleculares. Debido a esto, se producen modificaciones en las características mecánicas tales como la resistencia a golpes y rotura, reduciendo estas propiedades iniciales, para los que fueron diseñados. Se trata de un ejemplo típico de participación o acción conjunta, de varios modos de degradación, que actúan en sinergia para producir la degradación final. Ésta degradación es, por tanto, el resultado de la acción simultánea de la radiación solar, oxígeno, temperatura, viento y erosión por las partículas en suspensión (Sáenz, 2006).

2.6.7. Degradación biológica o biodegradación.

Es la transformación bioquímica de los compuestos por la acción de microorganismos. La biodegradación de un compuesto ocurre debido a la actividad de varias enzimas, que son producidas por los microorganismos (Limón, 2001). El material polimérico sirve como fuente para la obtención de carbono. Sin embargo, el ataque microbiano sólo se produce en determinados intervalos de temperaturas, por lo que este tipo de proceso de degradación, es muy poco frecuente (Sáenz, 2006). Las enzimas pueden atacar los segmentos más pequeños, generando productos intermediarios de bajo peso molecular que serían incorporados a la biomasa celular o ser mineralizados, es decir, completamente degradados hasta bióxido de carbono y agua en condiciones aeróbicas, o metano y bióxido de carbono en condiciones anaeróbicas (Limón, 2001).

2.7. Técnicas y métodos utilizados en el estudio de la biodegradación del LDPE

Existe una gran variedad de técnicas que permiten analizar la biodegradación del polietileno de baja densidad LDPE, desde múltiples perspectivas, todas se basan en principios fisicoquímicos y permiten estudiar variables específicas, que en conjunto proporcionan un amplio y profundo panorama sobre su degradación a través del tiempo.

Todas las técnicas están adaptadas en métodos específicos, mucho de los cuales están estandarizados, facilitando de esa manera determinar la validez y la reproducibilidad de los experimentos. Muchas de las técnicas permiten analizar los cambios ocurridos en el material, por efecto de los microorganismos o los factores abióticos, en estos últimos se incluyen los pre tratamientos y los aditivos, el rango de posibilidades de estudio es muy amplio, abarcando desde: el daño superficial, el cambio químico, la variación del peso molecular y de sus propiedades físicas, etc. la selección de las técnicas depende de factores como: costos, sensibilidad, necesidades, tiempo, etc. A continuación, en la figura se dividen de acuerdo al tipo de cambio, principio y propiedades estudiadas.

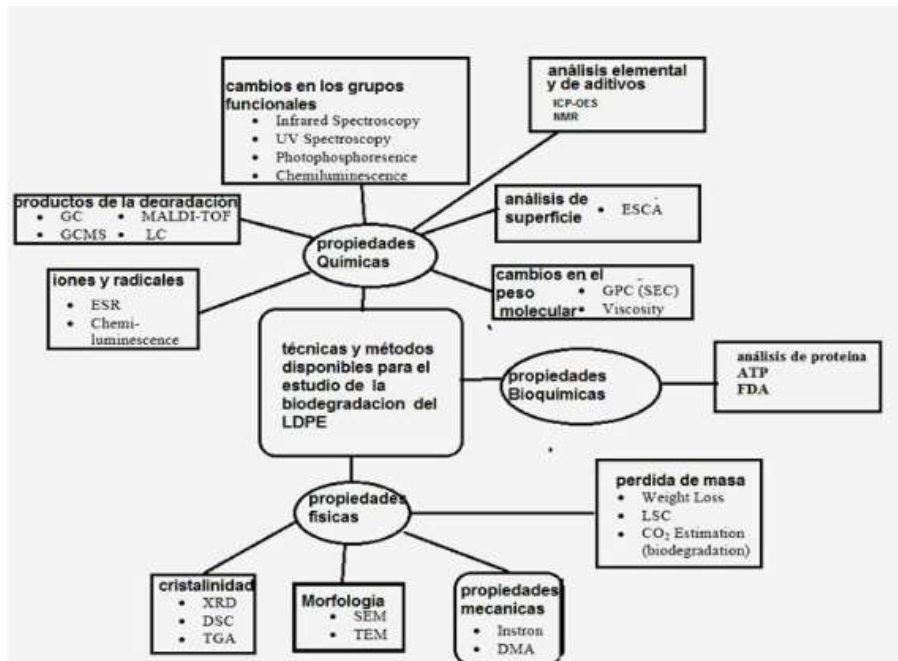


Figura 3. Técnicas y métodos disponibles para el estudio de la degradación del LDPE (M. Kamboj et al.,2016).

2.8. Ciclo de vida de los plásticos

Una vez desechados, los plásticos pueden persistir en el medio durante cientos e incluso miles de años a diferencia de la gran mayoría de polímeros naturales. La baja velocidad del proceso se debe en parte, a su complejidad. En general, los residuos de plástico desechados son de un tamaño demasiado elevado como para que pueda actuar ningún proceso biodegradativo en ellos, por tanto, es habitual que haya un paso previo en el que los polímeros se rompen por mecanismos físicos para formar partículas más pequeñas conocidas como microplásticos (>5mm) y nanoplásticos (>100µm). Aunque la forma en la que esto ocurre es distinta para cada polímero, de forma general, se puede decir que la luz solar al incidir sobre los plásticos es capaz de provocar la ruptura de los enlaces del esqueleto de carbono del plástico formando radicales libres que pueden reaccionar con el O₂ dando lugar a fragmentos menores que contendrá en sus extremos distintos grupos funcionales como grupos ceto, hidroxilo o carboxilo. Aunque es un proceso necesario para el proceso de degradación natural, la

formación de microplásticos acarrea por sí mismo otros problemas ecológicos, principalmente la ingestión de estos por accidente por parte de pequeños organismos que pueden incorporarlos en sus tejidos. De esta forma la concentración de microplásticos en tejidos se hace cada vez mayor conforme escalamos en la cadena trófica, por lo cual, algunos animales, como las aves marinas son especialmente sensibles. Además, pueden estar presentes en pescado de consumo habitual humano, cuya ingesta tiene todavía consecuencias desconocidas para la salud. Una vez son lo suficientemente pequeños, los fragmentos son capaces de atravesar las membranas de algunas bacterias que son capaces de incorporarlos al metabolismo central por distintas rutas metabólicas como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos o el ciclo del glioxilato tal como se muestra en la figura (Alberto Pires et al.,1999).

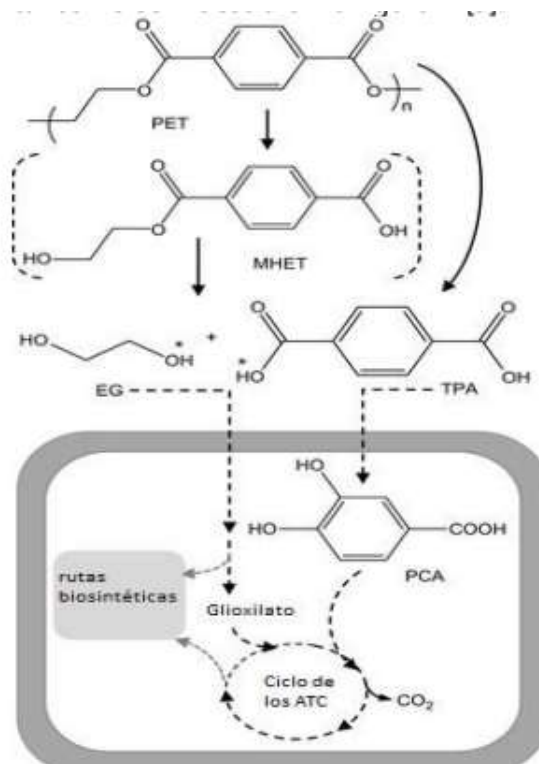


Figura 4. Ruta de degradación natural del LDPE

2.9. Antecedentes

Bhone Myint Kyaw et al. (2011), investigaron el grado de biodegradabilidad de LDPE por cuatro diferentes cepas de *Pseudomonas* a bacterias *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15729), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15692), *Pseudomonas putida* (KT2440 ATCC 47054) y *Pseudomonas syringae* (DC3000 ATCC 10862) . La degradación del LDPE se determinó por pérdida de peso de la muestra, cambios morfológicos, variaciones mecánicas y espectroscópicas. Los compuestos eluidos después de la degradación se analizaron por cromatografía de gases acoplados con espectroscopia de masas. Los resultados muestran que *Pseudomonas* spp. puede degradar LDPE.

Diana Catalina Múnera et al. (2014), muestra los resultados de la capacidad degradante del hongo *Aspergillus niger* sobre dos tipos de muestras de polietileno de baja densidad, donde la mitad de estos materiales fue expuesto a rayos UV por un tiempo de 13 horas; la biodegradación de las muestras se monitoreó con microscopía electrónica. Se realizaron observaciones de las muestras antes de ser expuestas a cualquier tratamiento, luego de la irradiación UV, dos meses después de haber sido inoculadas con el microorganismo. Después de dos meses se presentaron hifas penetrando la superficie de este material además de una pérdida de dureza y cambios macroscópicos. Finalmente, aunque la irradiación UV facilita inicialmente la degradación del polietileno, en la microscopía electrónica no se observaron diferencias en la acción de *Aspergillus niger* sobre las muestras expuestas y no expuestas a rayos UV.

Diego Uribe y Daniel Giraldo (2010), describieron el aislamiento y la actividad de biodegradación de microorganismos sobre polietileno de baja densidad. Los microorganismos fueron aislados de materiales plásticos con evidencias de deterioro procedentes de un relleno sanitario de Lima. Las muestras fueron filtradas y preseleccionadas en medio de sales minerales a pH 5,5 y 7, para hongos y bacterias respectivamente. Se aislaron 6 cepas, identificadas como *Pseudomonas* sp. MP3a y MP3b, *Penicillium* sp. MP3a, *Rhodotorula* sp. MP3b, *Hyalodendron* sp. MP3c y una levadura no identificada. La

acción degradativa del consorcio microbiano aislado fue evidenciada por variaciones en el espectro infrarrojo del polietileno con respecto al polímero sin tratamiento, observándose la reducción del índice de carbonilo (83,89% a pH 7 y 4,08% a pH 5,5). Finalmente se determinó el porcentaje de peso perdido por el polietileno sometido a las cepas aisladas, observándose una disminución de 5,4% a pH 7 y 4,8% a pH 5,5.

Merina Paul Das y Santosh Kumar (2013), analizaron la degradación microbiana en el cual se aislaron dos aislamientos bacterianos *Bacillus amyloliquefaciens* (BSM-1) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BSM-2), mediante la reducción en peso seco de la película de LDPE, cambio en el pH de los medios de cultivo, CO₂ estimación, microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía FTIR de infrarrojo por transformada de Fourier de la superficie de la película. El análisis SEM reveló que ambas cepas exhiben adherencia y crecimiento con LDPE que se usaba como única fuente de carbono mientras que las imágenes FTIR mostraron diversos cambios químicos superficiales después de 60 días de incubación. Los aislamientos bacterianos mostraron la despolimerización de productos biodegradados en los medios extracelulares que indican el proceso de biodegradación. BSM-2 exhibió una mejor degradación que BSM-1 que demuestra la potencialidad de estas cepas para degradar las películas LDPE en un corto período de tiempo.

Gutierrez Pescador Jazmin (2013), utilizó medios de cultivo selectivos utilizando estos mismos plásticos como única fuente de carbono. Los materiales utilizados para el aislamiento de microorganismos con potencial para degradar estos materiales, fueron plásticos enterrados por más de veinte años. A través del cultivo en medios líquidos y sólidos, así como a la observación al microscopio óptico y electrónico de barrido, se detectó el crecimiento de las colonias, de los consorcios microbianos. Se pudo apreciar la gran capacidad que tienen estos microorganismos para adherirse al polietileno y formar una biopelícula. La actividad degradadora de los consorcios, se definió por el aspecto físico de las muestras de polietileno, observadas al microscopio electrónico de barrido y por la pérdida de peso del material plástico luego del periodo de incubación, después de

haber sido utilizado como única fuente de carbono en el medio de cultivo. La evidencia de una mayor capacidad para biodegradar el polietileno, se detectó con el consorcio microbiano conformado por hongos y levaduras, en un medio de cultivo líquido a pH 5 con agitación constante. Se concluye que los consorcios microbianos aislados de fragmentos de polietileno (PEBD) de baja densidad presentan capacidad biodegradadora.

Alok K. Sil (2012) estudió la degradación del polietileno de baja densidad por *Pseudomonas sp.* AKS2. A diferencia de los informes anteriores, la degradación por *Pseudomonas sp.* AKS2 es relativamente rápido ya que puede degradar $5 \pm 1\%$ del material de partida en 45 días. Esta degradación puede ser alterada por agentes que modulan la interacción hidrofóbica entre el polietileno y el microbio. Como el aceite mineral promueve interacciones hidrofóbicas, mejora la unión bacteriana a la superficie del polímero. Esto da como resultado una mayor formación de biopelícula y una mayor degradación del polímero. Por el contrario, Tween 80 reduce la unión bacteriana a la superficie del polímero disminuyendo las interacciones hidrofóbicas y, por lo tanto, reduce la degradación del polímero. Por lo que establece una relación entre la interacción hidrofóbica y la degradación del polímero y también relaciona la capacidad de formación de biopelículas de las bacterias con el potencial de degradación del polímero.

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA.

Se extrajeron muestras de suelos y de bolsas plásticas del botadero “La carbonera”, de Nuevo Chimbote - Ancash donde haya presencia de plásticos que presenten biopelículas visibles o algún tipo de deterioro, se recolectan y se almacenan en un recipiente transparente; las que están enterradas a una profundidad de 20 a 30 cm. aproximadamente, adicionando un poco de suelo húmedo del mismo sitio (15 g. aproximadamente), para tratar de conservar la humedad original de los materiales.

3.2. AISLAMIENTO DE *ASPERGILLUS NIGER*.

La muestra se recoge de un botadero en la ciudad de Nuevo Chimbote. El aislamiento de colonias fúngicas se realiza usando el método de dilución en serie (10^{-4}). Se prepara 50ml de Agar papa dextrosa y 50 ml de Agar Czapek Dox (para 4 placas Petri, 25 ml cada placa), colocar en ebullición por 10 min y esterilizar a 121°C por 15 min, para el aislamiento. Al medio de cultivo se adicionó 0,5 g/L de cloranfenicol, para evitar el crecimiento de bacterias. Las placas se incubaron durante 4 días, a 30°C. Las distintas colonias de hongos fueron seleccionadas y subcultivadas para su caracterización posterior.

3.3. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE *ASPERGILLUS NIGER*.

Luego de las 36 horas, se observó el hongo en la placa el cual se debe notar que los conidios de *Aspergillus niger* son de color negro.

Para la identificación de *Aspergillus niger* se realiza una tinción con azul de lactofenol para su observación en el microscopio. Colonia lanosa, al principio blanca, esta se va tornando color negro. En su reverso es amarillento. Las cabezas de los conidios tienen forma de globo. Se identifica el microorganismo

aislado en base a su morfología microscópica como macroscópica siguiendo a Koneman et al., (1985) y Frutis, et al., (2009).

3.4. ESTUDIO MICROSCÓPICO DE *ASPERGILLUS NIGER*.

Se realizó el procedimiento de microcultivo para la identificación de estructuras fúngicas para así poder observar el micelio.

Dentro de la cámara de extracción se cortó la placa con medio PDA con un bisturí estéril, en cuadraditos de 0.5 centímetros. Con la misma hoja de bisturí se coloca el cuadradito en el portaobjetos que está en la placa con el equipo de microcultivo. Luego se sembró el hongo y finalmente se coloca el cubreobjetos sobre el bloque de PDA.

3.5. PREPARACIÓN DE LAS PELÍCULAS DE POLIETILENO.

Se cortan trozos de LDPE en tiras de 2 cm x 2 cm, pesando 0,4 gr y se transfieren a una solución que contiene 1,4 ml Tween 80, 196,6 ml de agua estéril y 2 ml de lejía a una concentración de 4%, se agitó durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, luego se transfiere a un vaso de precipitado esterilizado con agua destilada y se agita durante 1 hora. Además, se trasladaron asépticamente a una solución de etanol al 70% v/v durante 30 minutos. Posteriormente se transfiere a un vaso precipitado, se cubre con papel y se incuban a temperatura de 30 °C durante la noche.

Luego se exponen a rayos UV por 15 minutos en la cámara y finalmente se exponen al medio de cultivo caldo 75 ml de caldo Czapek-Dox sin sacarosa, en cada matraz (Alok K. Sil et al., 2012) , 8 matraces de 250 mL.

| Composición | Concentración (gr) |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| C ₂ H ₄ | 0.5 |
| NaNO ₃ | 0.0728 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.0067 |
| KCl | 0.0029 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.0092 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.0030 |

Tabla 1. Medio de cultivo utilizado para la biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE).

3.6. ACTIVIDAD DE *ASPERGILLUS NIGER* SOBRE EL POLIETILENO, EVALUADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES (10^3 , 10^5 y 10^8 esporas $\times mL^{-1}$)

Para obtener el inóculo se cosecharon esporas con un asa bacteriológica a partir de cultivos en PDA en placas de 4 días de crecimiento utilizando 10 mL de solución Tween 80 al 0,1%. Se realiza recuento en la cámara de Neubauer hasta obtener las concentraciones finales requeridas de 10^3 , 10^5 y 10^8 esporas $\times mL^{-1}$ para el medio mínimo mencionado en el punto anterior.

Teniendo en cuenta 4 montajes: 1. Control: medio sin inóculo 2. Medio a la concentración de 10^3 esporas $\times mL^{-1}$. 3. Medio a la concentración de 10^5 esporas $\times mL^{-1}$. 4. Medio a la concentración de 10^8 esporas $\times mL^{-1}$. con 3 tratamientos. Finalmente se dejó en incubación por 35 días, de los cuales se tomaron muestras cada 13 horas.

3.7. OBSERVACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD DEGRADATIVA DE *ASPERGILLUS NIGER*.

3.7.1 Prueba cuantitativa de degradación de LDPE

Medidas de pérdida de peso:

Luego de 35 días de incubación, se extraen las muestras de polietileno de los matraces de cada montaje, luego de autoclavar y se lavan durante 30 minutos con etanol al 96% para eliminar los organismos adheridos y se lavan minuciosamente con dodecilsulfato sódico al 2% durante 4 horas en agitación a 150 rpm y se secan a 39 °C en la estufa durante la noche; luego se determinó el porcentaje de la pérdida de peso utilizando la siguiente fórmula (Bhone Myint Kyaw et al., 2012):

$$Weight (\%) = \frac{initial\ weight - final\ weight}{initial\ weight} \times 100$$

Ecuación 1. Fórmula para determinar el porcentaje de la pérdida de peso.

3.7.2 Cambio de pH:

Se evalúa el medio de cultivo donde está el hongo y en el control, ya que durante el proceso de biodegradación se da la mineralización con formación de agua y biomasa. El estudio del cambio de pH se medirá mediante una sonda que se inserta en el caldo, para medir el pH (Merina D. et al., 2014).

3.7.3 Observación en estereoscopio y microscopio:

Usando un estereoscopio, ya que con este método se podrá notar la adherencia que habrá en el LDPE por acción de *Aspergillus niger*, donde también se podrán observar pequeñas grietas sobre el LDPE ya tratado por el hongo, mientras que se observará en el matraz control. Se observa en el microscopio a 40X.

3.7.4 Estimación de biomasa a partir del medio:

La densidad de la población de *Aspergillus niger* en la superficie de film de LDPE se determina mediante la técnica de peso seco, extrayendo 3 mL de muestra de cada matraz cada 13 horas, y se almacenan en viales para luego usando la técnica de peso seco y recuento de esporas, donde la suspensión microbiana proveniente del proceso se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se elimina el sobrenadante y se resuspende en agua destilada lo centrifugado y nuevamente llevar a centrifugar y luego se elimina el sobrenadante. Luego se vierten en los capachos hechos con papel aluminio, los cuales previamente fueron secados en estufa a 108°C por 8 horas y nuevamente con la muestra llevar a estufa a 108°C por 8 horas, siempre usando pinzas y se coloca en la campana o un desecador y se lleva a la balanza analítica y pesar.

3.7.5 Estimación de concentración de proteínas a partir del medio:

Usando el ensayo de Bradford para determinar las concentraciones de proteínas extracelulares de *Aspergillus niger* en la superficie de film de LDPE, Para extraer la proteína del hongo que se adhiere a los films de LDPE, se extraen 400 uL de muestras cada 7 días de cada matraz erlenmeyer ,donde la suspensión se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos y se recoge el sobrenadante para analizar la concentración de proteína extracelular total utilizando el ensayo de Bradford, en el cual se agrega 2 mL del reactivo de Bradford, luego se lleva al vórtex y se deja reposar por 20 minutos, para finalmente llevar al espectrofotómetro usando una longitud de onda de 595 nm (Sangeeta R. et al., 2015).

La concentración de proteína se determina por el método de Bradford con albúmina de suero bovino como estándar a diferentes concentraciones para la preparación de la curva de calibración.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLAMIENTO DE *ASPERGILLUS NIGER*:

- Se tomaron 3 muestras de suelo del botadero “La carbonera”, se homogenizaron con agua destilada estéril, para luego hacer diluciones seriadas y sembrar en placas con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa en el cual se adicionó cloranfenicol 500 mg lo cual es 0,5 g/L de cloranfenicol, una cápsula de cloranfenicol 500 mg en un litro de agua destilada esteril, para evitar el crecimiento de bacterias. Y posteriormente se pusieron en tubos con Czapek para ir adecuando el microorganismo en el medio de cultivo donde será la biodegradación.



Figura 5. Procedimiento para el aislamiento de *Aspergillus niger*: (a) Las muestras tomadas se homogenizaron (b) posteriormente se hicieron diluciones seriadas, para luego sembrar en placas Petri, (c) Finalmente luego de 5 días se asilaron en tubos de ensayo luego en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA y Czapek Dox.

- Identificación de morfología macroscópica en placa, luego de las diluciones en serie en placas con Agar Papa Dextrosa. De la placa con presencia de hongo con parecido macroscópico se aisló en una placa con medio Czapek Dox.

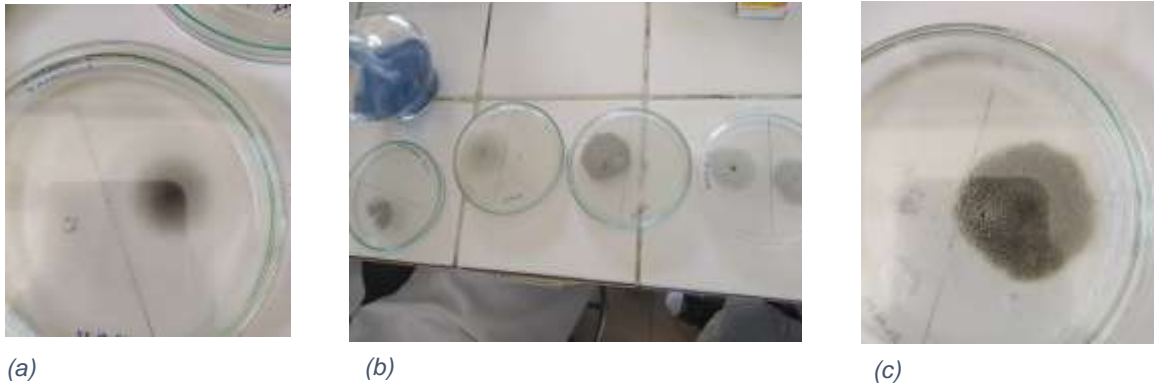




Figura. 6. Observación de la presencia de hongo en el centro de la placa en cultivo en medio Czapek Dox: (a) Presencia de hongo en la placa sin características de *Aspergillus niger*, (b) La presencia de distintos hongos, (c) Presencia de hongo con distintas características.

- Observación microscópica usando azul de lactofenol para observar la morfología microscópica. Donde se observaron los conidios que son de color son negro y radiales y tienden a separarse en columnas. Siendo las características macroscópicas del hongo filamentoso de color negro con aspecto polvoso, opaca de bordes irregulares (Pérez M. et al., 2016) .

| CARACTERÍSTICA | LABORATORIO | TEÓRICO |
|----------------------------------|---|---|
| Morfología macroscópica en placa |  <p>Se observó el crecimiento en medio PDA y Czapek Dox. Filamentoso de color negro con aspecto polvoso, opaca de bordes irregulares.</p> |  |

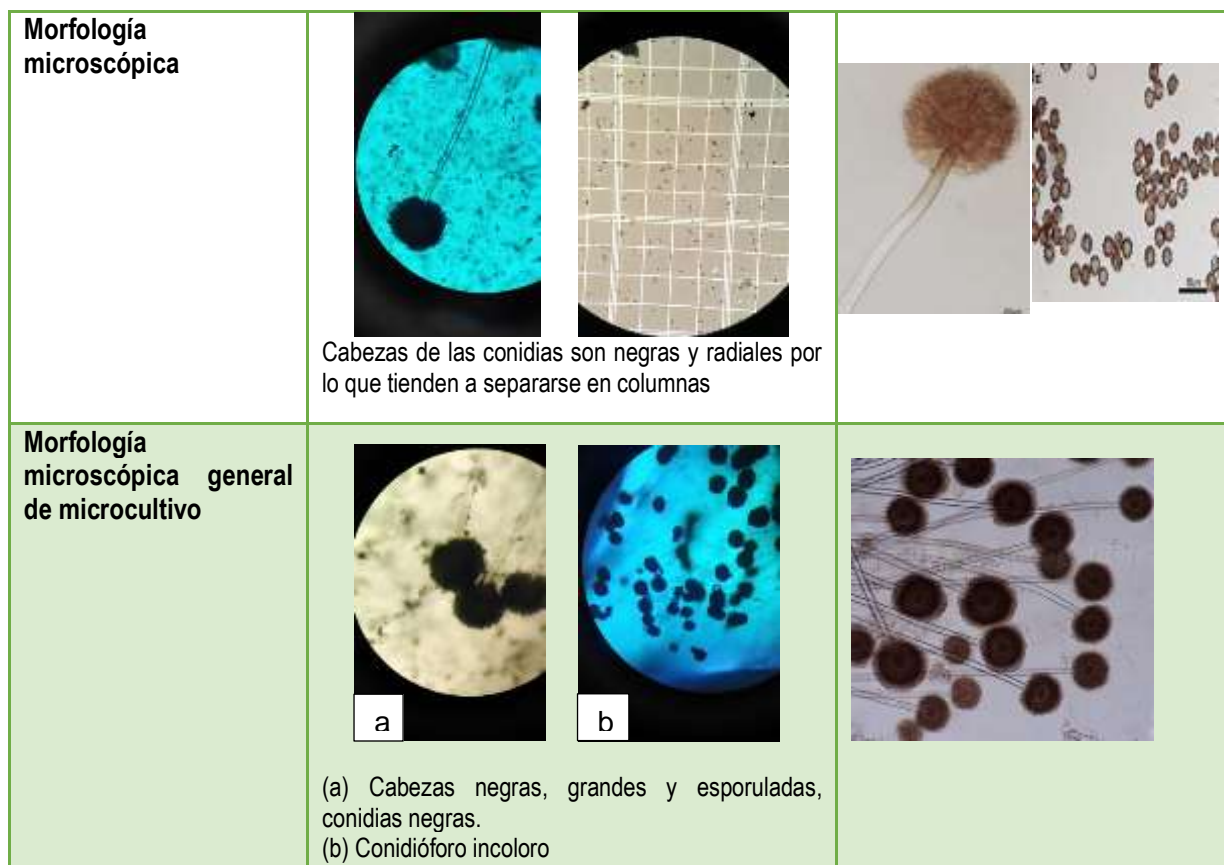


Figura 7. Observación e identificación microscópica y macroscópica del *Aspergillus niger*.

4.2. Estimación de concentración de proteínas

- Se determinó la concentración de proteínas basándose en el método desarrollado por Bradford (Bradford, 1976).

| Tiempo(días) | 10 ⁸ (Abs) | concentración(mg/ml) | 10 ⁵ (Abs) | concentración(mg/ml) | 10 ³ (Abs) | concentración(mg/ml) |
|--------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 0 | 0.001 | -0.001 | 0.004 | 0.018 | 0.002 | 0.005 |
| 7 | 0.112 | 0.692 | 0.091 | 0.561 | 0.090 | 0.555 |
| 14 | 0.173 | 1.073 | 0.115 | 0.711 | 0.111 | 0.686 |
| 21 | 0.343 | 2.135 | 0.195 | 1.210 | 0.180 | 1.117 |
| 28 | 0.543 | 3.384 | 0.239 | 1.485 | 0.226 | 1.404 |
| 35 | 0.613 | 3.821 | 0.257 | 1.598 | 0.215 | 1.335 |

Tabla 2. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL⁻¹) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 1.

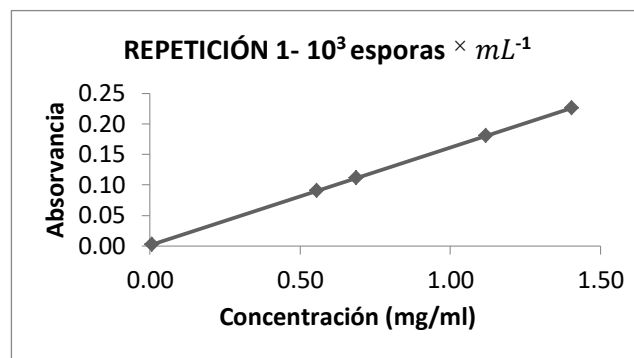
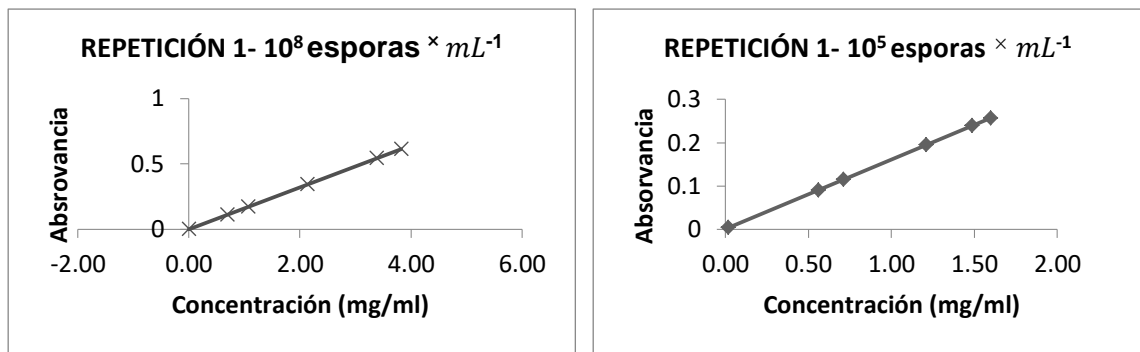


Figura 8. Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 1 de réplica 1.

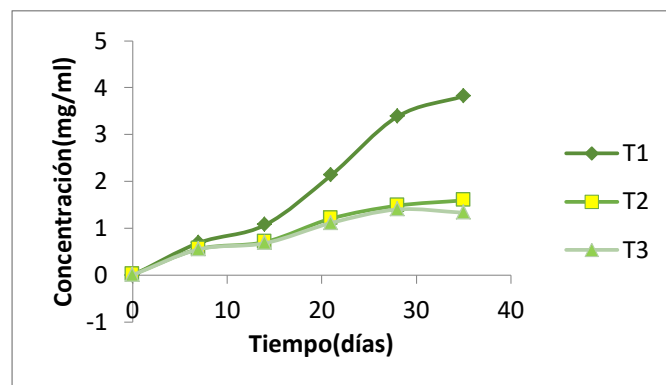


Figura 9. Gráfico de las concentraciones de *Aspergillus niger* en relación al tiempo.

| Tratamiento | Concentración de proteínas(mg/ml) |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| 10^8 esporas $\cdot mL^{-1}$ | 3.8208 |
| 10^5 esporas $\cdot mL^{-1}$ | 1.5976 |
| 10^3 esporas $\cdot mL^{-1}$ | 1.3353 |

Tabla 3. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas $\cdot mL^{-1}$) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 1.

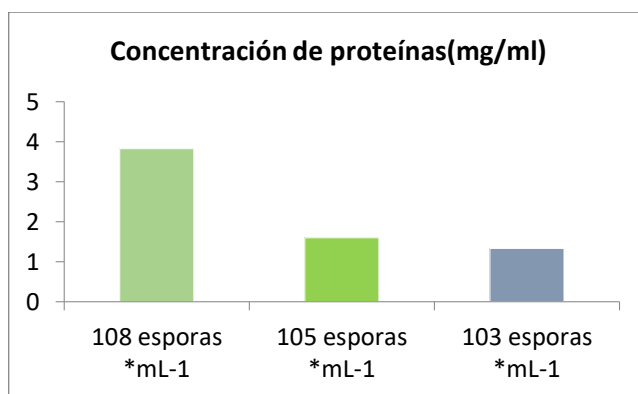


Figura 10. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Réplica 1

| Tiempo(días) | 10^8 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^5 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^3 (Abs) | concentración(mg/ml) |
|--------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
| 0 | 0.004 | 0.018 | 0.005 | 0.024 | 0.004 | 0.018 |
| 7 | 0.131 | 0.811 | 0.088 | 0.542 | 0.090 | 0.555 |
| 14 | 0.193 | 1.198 | 0.098 | 0.605 | 0.192 | 1.192 |
| 21 | 0.340 | 2.116 | 0.140 | 0.867 | 0.222 | 1.379 |
| 28 | 0.420 | 2.616 | 0.221 | 1.373 | 0.321 | 1.997 |
| 35 | 0.492 | 3.065 | 0.212 | 1.317 | 0.315 | 1.960 |

Tabla 4. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas $\cdot mL^{-1}$) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 1.

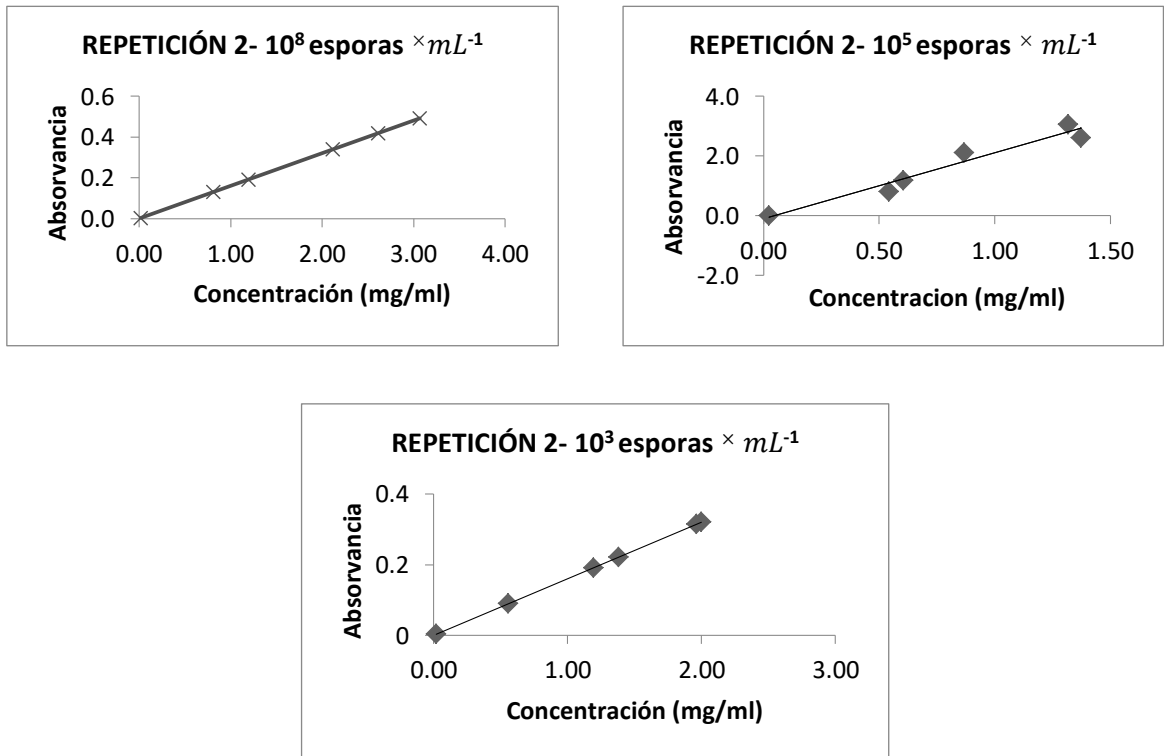


Figura 11. Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 2 de réplica 1.

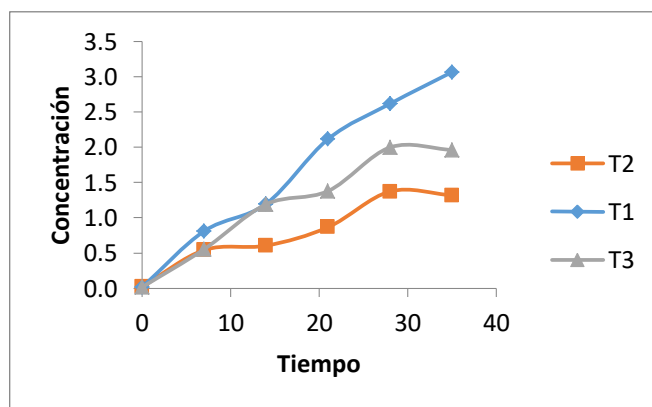


Figura 12. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas $\times mL^{-1}$.

| Tratamiento | Concentración de proteínas (mg/ml) |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 10^8 esporas mL^{-1} | 3.0652 |
| 10^5 esporas mL^{-1} | 1.3166 |
| 10^3 esporas mL^{-1} | 1.9598 |

Tabla 5. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 1.

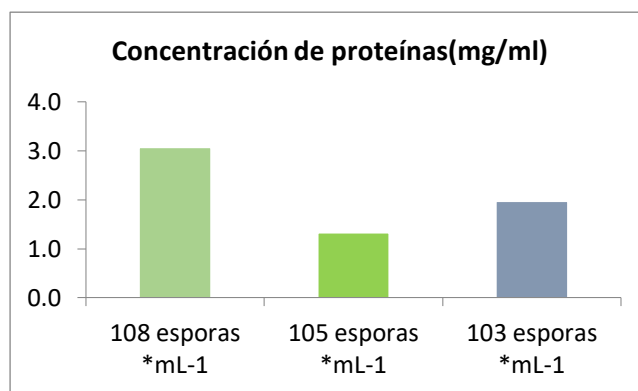


Figura 13. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 2 Réplica 1.

| Tiempo(días) | 10^8 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^5 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^3 (Abs) | concentración(mg/ml) |
|--------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
| 0 | 0.000 | -0.007 | 0.003 | 0.011 | 0.002 | 0.005 |
| 7 | 0.104 | 0.642 | 0.112 | 0.692 | 0.067 | 0.411 |
| 14 | 0.113 | 0.698 | 0.273 | 1.698 | 0.088 | 0.542 |
| 21 | 0.211 | 1.310 | 0.322 | 2.004 | 0.094 | 0.580 |
| 28 | 0.273 | 1.698 | 0.452 | 2.815 | 0.188 | 1.167 |
| 35 | 0.554 | 3.452 | 0.432 | 2.690 | 0.342 | 2.128 |

Tabla 6. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 1.

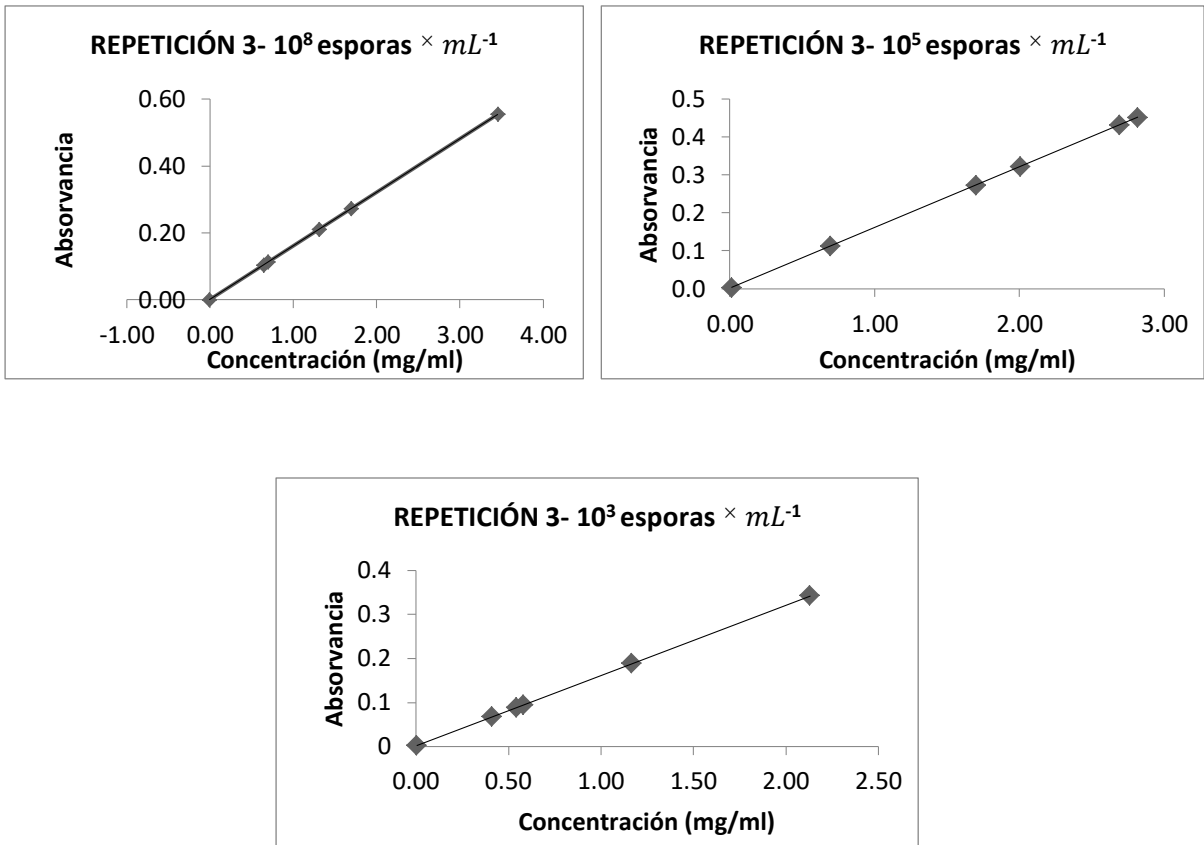


Figura 14. Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 3 de réplica 1.

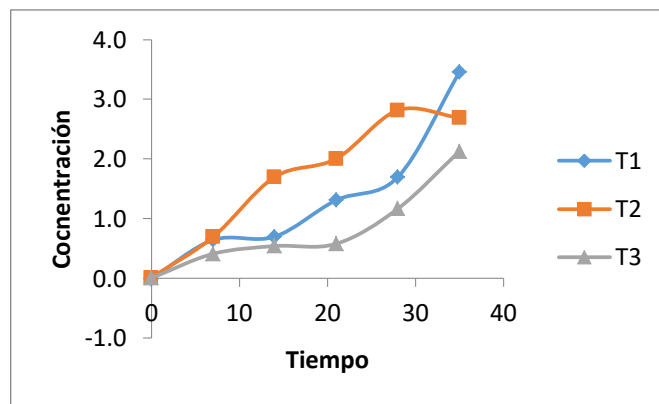


Figura 15. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas $\times mL^{-1}$.

| Tratamiento | Concentración de proteínas (mg/ml) |
|---------------------------------|------------------------------------|
| 10^8 esporas mL^{-1} | 3.4524 |
| 10^5 esporas mL^{-1} | 2.6905 |
| 10^3 esporas mL^{-1} | 2.1284 |

Tabla 7. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 1.

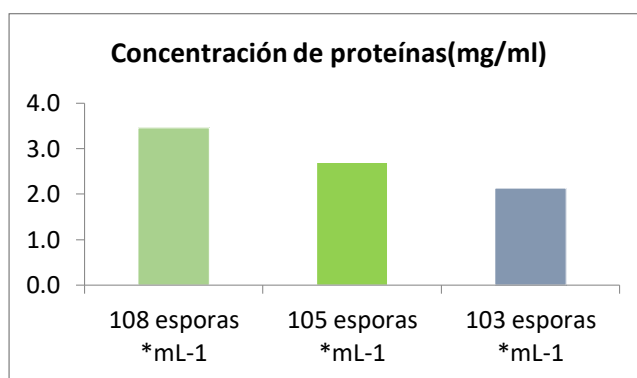


Figura 16 .En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Réplica 1.

| Tiempo(días) | 10^8 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^5 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^3 (Abs) | concentración(mg/ml) |
|--------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
| 0 | 0.000 | -0.007 | 0.002 | 0.005 | 0.001 | -0.001 |
| 7 | 0.101 | 0.623 | 0.076 | 0.467 | 0.053 | 0.324 |
| 14 | 0.185 | 1.148 | 0.131 | 0.811 | 0.111 | 0.686 |
| 21 | 0.401 | 2.497 | 0.198 | 1.229 | 0.193 | 1.198 |
| 28 | 0.551 | 3.434 | 0.227 | 1.410 | 0.205 | 1.273 |
| 35 | 0.611 | 3.808 | 0.333 | 2.072 | 0.241 | 1.498 |

Tabla 8. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 2.

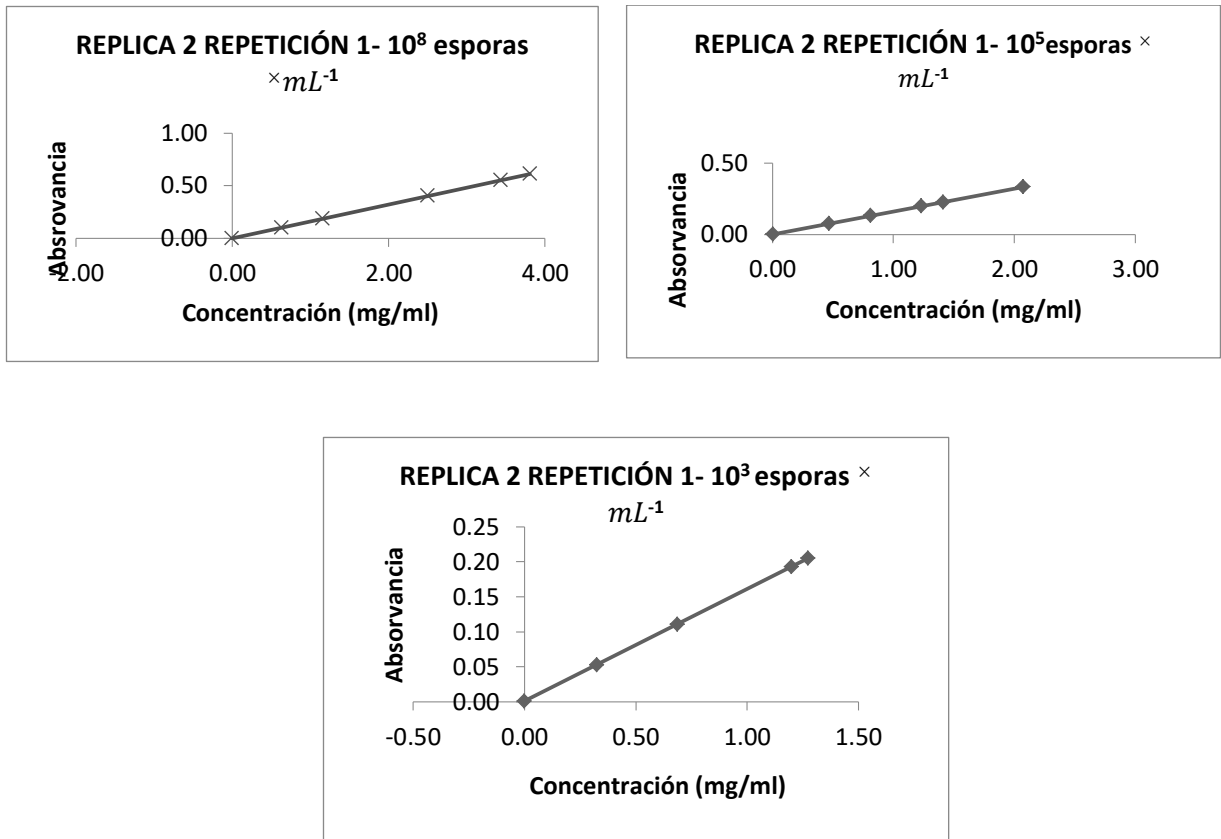


Figura 17. Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 1 de réplica 2.

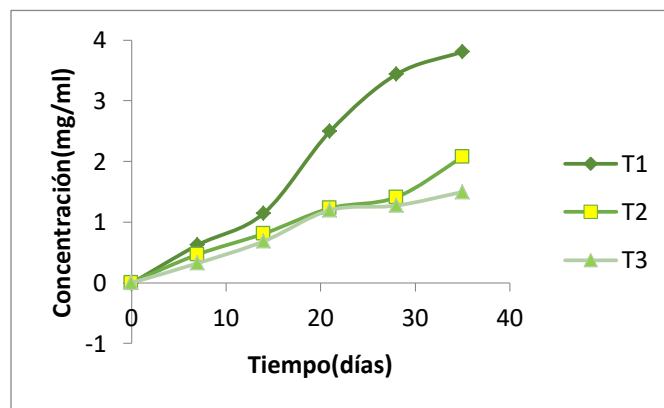


Figura 18. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas $\times mL^{-1}$.

| Tratamiento | Concentración de proteínas(mg/ml) |
|---------------------------|-----------------------------------|
| 10^8 esporas $*mL^{-1}$ | 3.8083 |
| 10^5 esporas $*mL^{-1}$ | 2.0722 |
| 10^3 esporas $*mL^{-1}$ | 1.4977 |

Tabla 9. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 2.

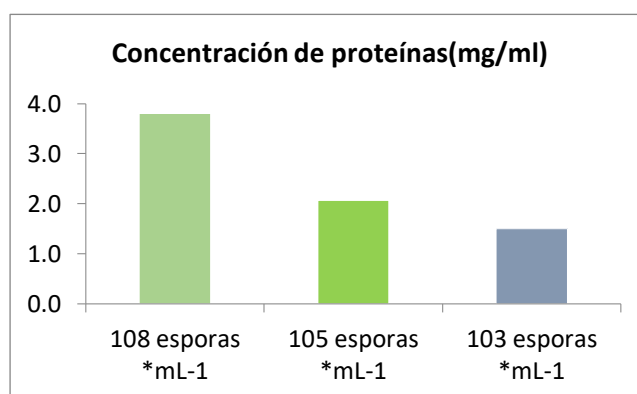


Figura 19 .En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 1 Réplica 2.

| Tiempo(días) | 10^8 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^5 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^3 (Abs) | concentración(mg/ml) |
|--------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
| 0 | 0.004 | 0.018 | 0.003 | 0.011 | 0.004 | 0.018 |
| 7 | 0.136 | 0.842 | 0.081 | 0.499 | 0.071 | 0.436 |
| 14 | 0.191 | 1.185 | 0.136 | 0.842 | 0.110 | 0.680 |
| 21 | 0.356 | 2.216 | 0.281 | 1.748 | 0.141 | 0.873 |
| 28 | 0.455 | 2.834 | 0.298 | 1.854 | 0.264 | 1.641 |
| 35 | 0.533 | 3.321 | 0.272 | 1.691 | 0.336 | 2.091 |

Tabla 10. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 2.

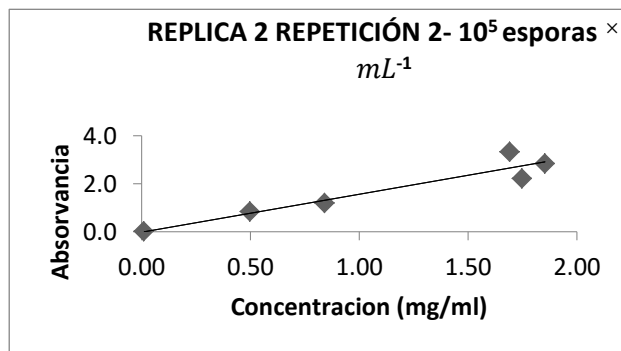
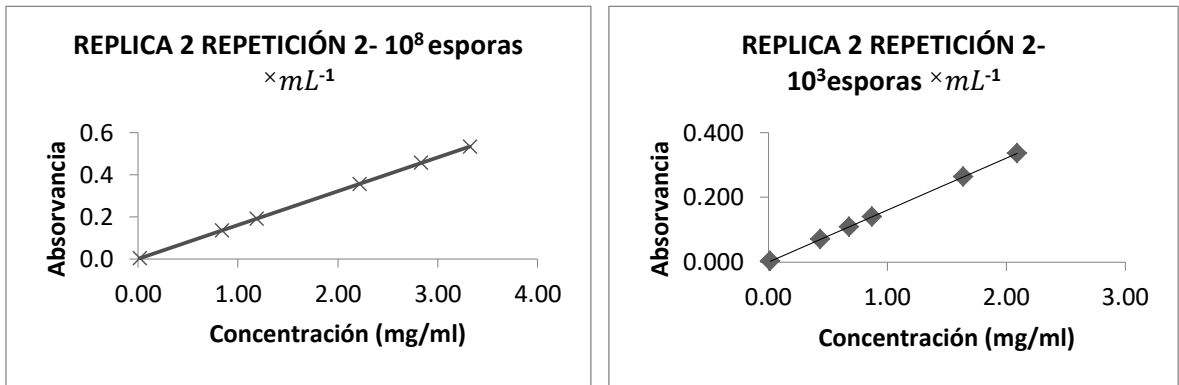


Figura 20. Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 2 de réplica 2.

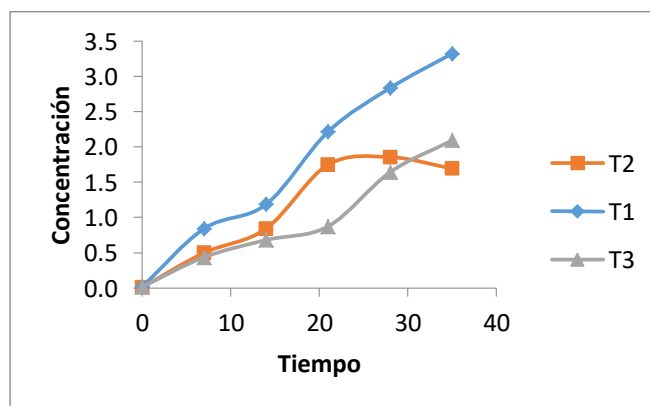


Figura 21. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas $\times mL^{-1}$.

| Tratamiento | Concentración de proteínas(mg/ml) |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 10^8 esporas mL^{-1} | 3.3212 |
| 10^5 esporas mL^{-1} | 1.6913 |
| 10^3 esporas mL^{-1} | 2.0910 |

Tabla 11. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 2.

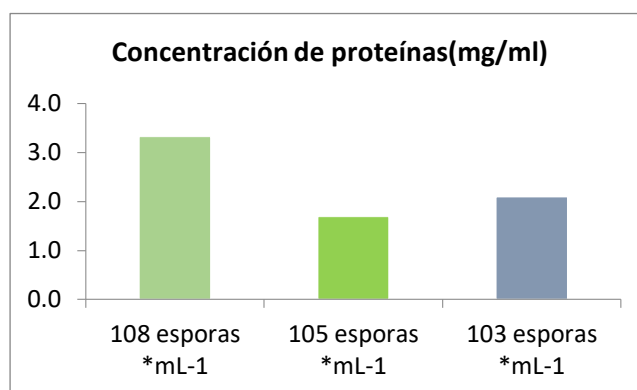


Figura 22. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 2 Réplica 2.

| Tiempo(días) | 10^8 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^5 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^3 (Abs) | concentración(mg/ml) |
|--------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
| 0 | 0.003 | 0.011 | 0.000 | -0.007 | 0.000 | -0.007 |
| 7 | 0.132 | 0.817 | 0.105 | 0.648 | 0.050 | 0.305 |
| 14 | 0.200 | 1.242 | 0.180 | 1.117 | 0.088 | 0.542 |
| 21 | 0.332 | 2.066 | 0.245 | 1.523 | 0.100 | 0.617 |
| 28 | 0.413 | 2.572 | 0.354 | 2.203 | 0.184 | 1.142 |
| 35 | 0.626 | 3.902 | 0.501 | 3.121 | 0.390 | 2.428 |

Tabla 12. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 2.

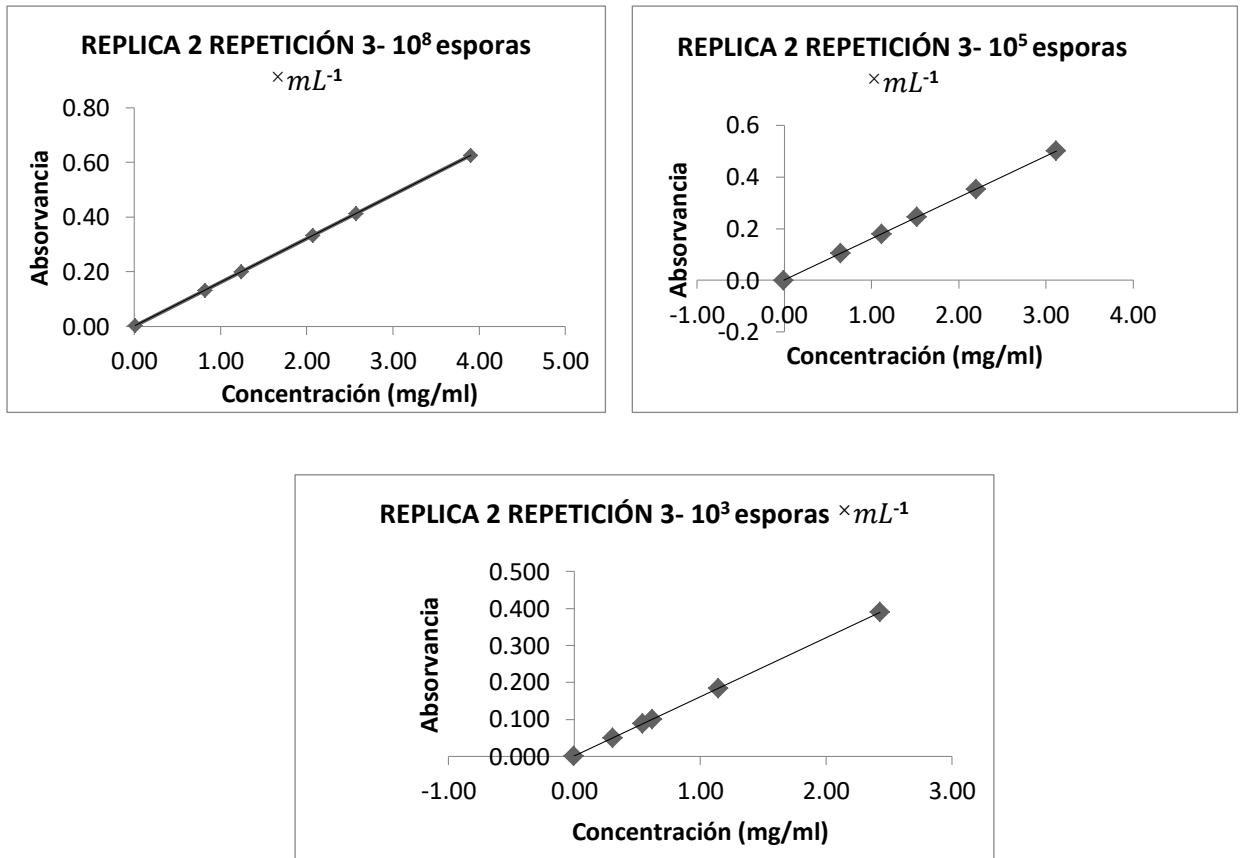


Figura 23. Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 3 de réplica 2.

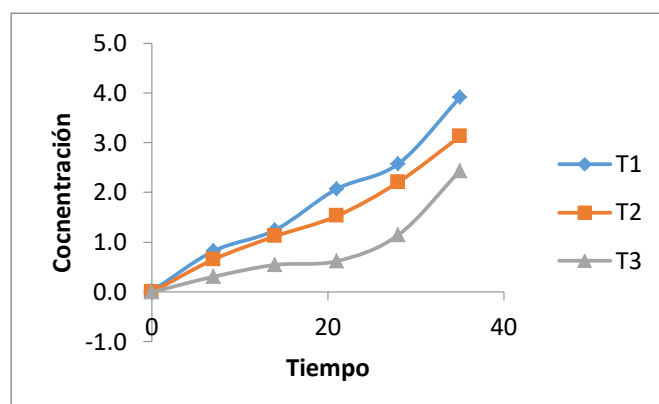


Figura 24 .Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas $\times mL^{-1}$.

| Tratamiento | Concentración de proteínas(mg/ml) |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| 10^8 esporas mL^{-1} | 3.9020 |
| 10^5 esporas mL^{-1} | 3.1214 |
| 10^3 esporas mL^{-1} | 2.4282 |

Tabla 13. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 2.

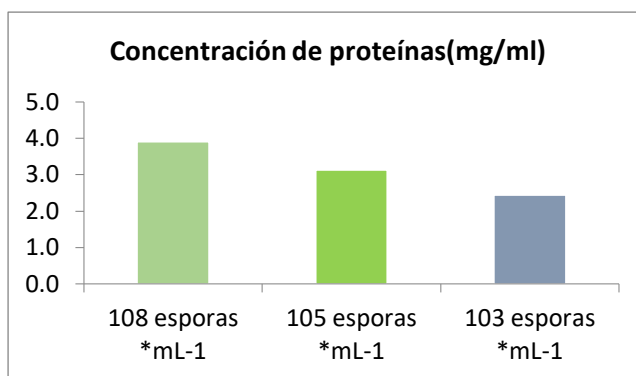


Figura 25. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 3 Réplica 2.

| Tiempo(días) | 10^8 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^5 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^3 (Abs) | concentración(mg/ml) |
|--------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
| 0 | 0.001 | -0.001 | 0.004 | 0.018 | 0.002 | 0.005 |
| 7 | 0.122 | 0.755 | 0.111 | 0.686 | 0.091 | 0.561 |
| 14 | 0.164 | 1.017 | 0.115 | 0.711 | 0.101 | 0.623 |
| 21 | 0.322 | 2.004 | 0.225 | 1.398 | 0.224 | 1.392 |
| 28 | 0.420 | 2.616 | 0.239 | 1.485 | 0.214 | 1.329 |
| 35 | 0.501 | 3.121 | 0.315 | 1.960 | 0.351 | 2.185 |

Tabla 14. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 3.

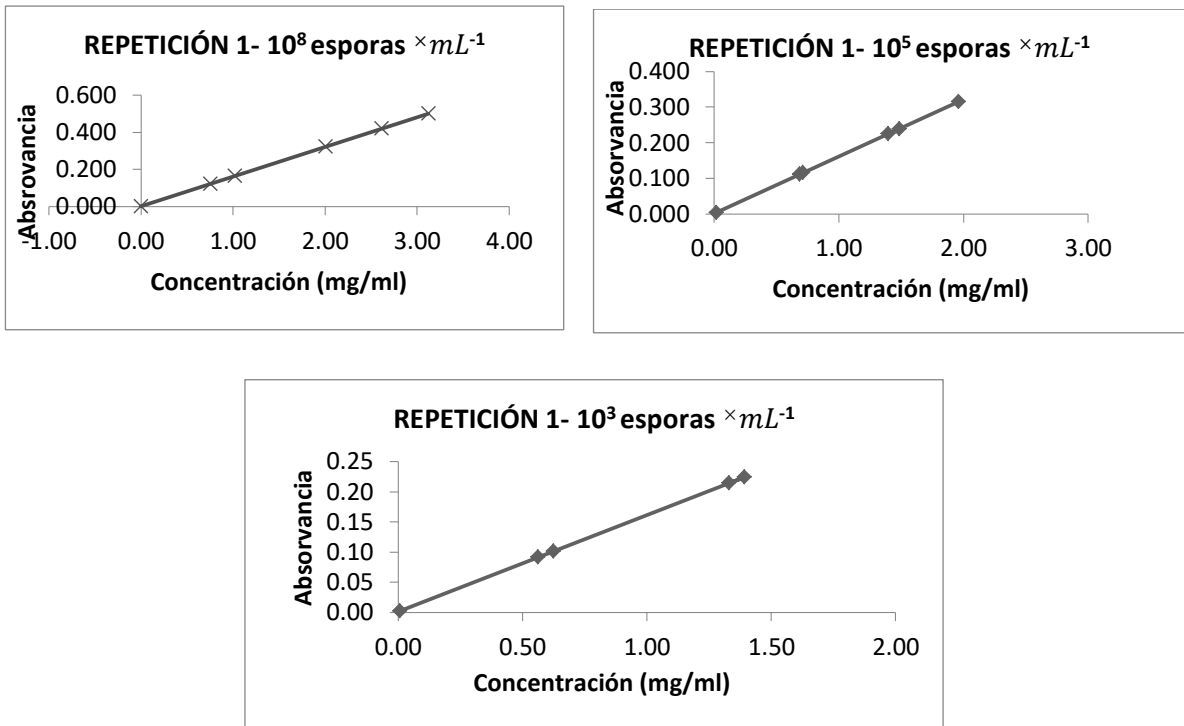


Figura 26. Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 1 de réplica 3.

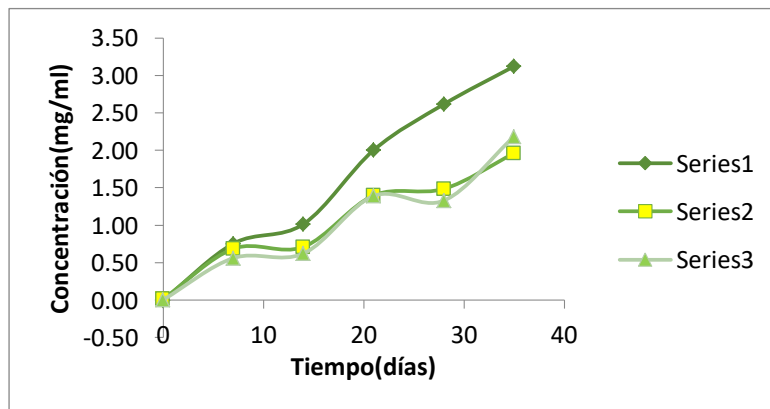


Figura 27. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas $\times mL^{-1}$.

| Tratamiento | Concentración de proteínas(mg/ml) |
|-------------|-----------------------------------|
| 10^8 | 3.1214 |
| 10^5 | 1.9598 |
| 10^3 | 2.1846 |

Tabla 15. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 1 de réplica 3.

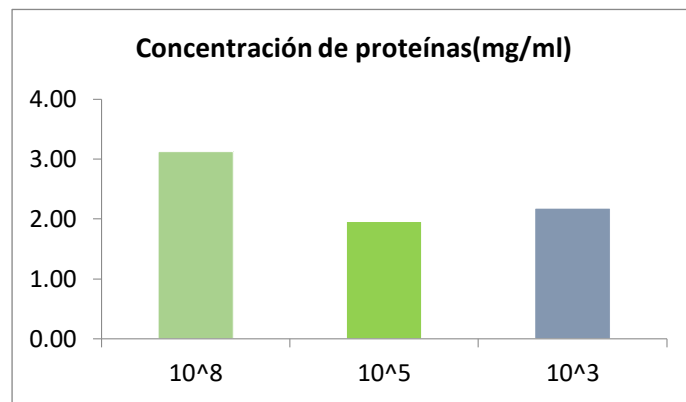


Figura 28. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 1 Réplica 3.

| Tiempo(días) | 10^8 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^5 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^3 (Abs) | concentración(mg/ml) |
|--------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
| 0 | 0.004 | 0.0177 | 0.005 | 0.0239 | 0.004 | 0.0177 |
| 7 | 0.131 | 0.8108 | 0.088 | 0.5423 | 0.090 | 0.5547 |
| 14 | 0.193 | 1.1980 | 0.098 | 0.6047 | 0.192 | 1.1917 |
| 21 | 0.340 | 2.1160 | 0.140 | 0.8670 | 0.222 | 1.3791 |
| 28 | 0.420 | 2.6155 | 0.221 | 1.3728 | 0.321 | 1.9973 |
| 35 | 0.492 | 3.0652 | 0.212 | 1.3166 | 0.315 | 1.9598 |

Tabla 16. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 3.

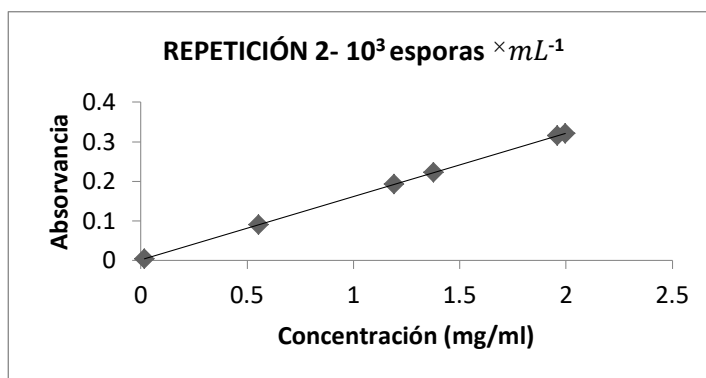
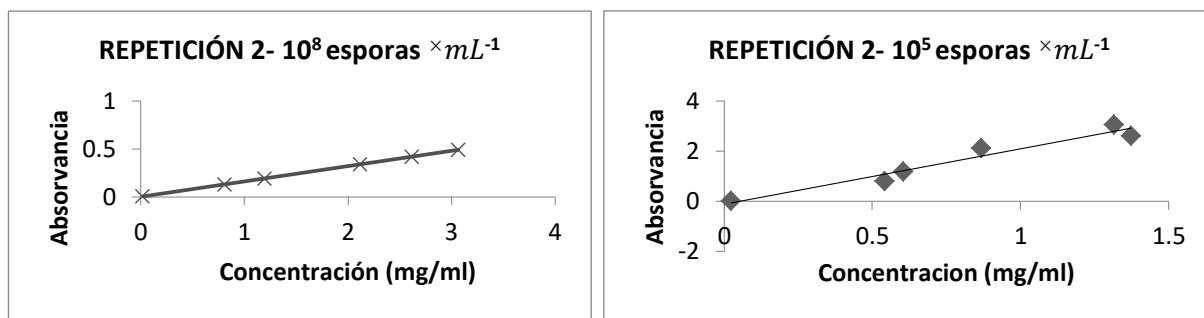


Figura 29 .Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 2 de réplica 3.

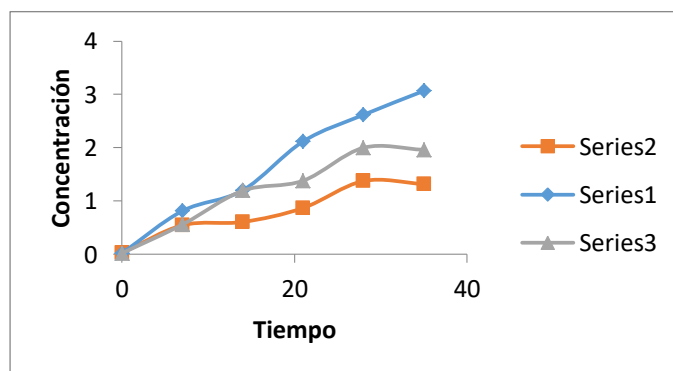


Tabla 17. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas $\times mL^{-1}$.

| Tratamiento | Concentración de proteínas(mg/ml) |
|-------------|-----------------------------------|
| 10^8 | 3.0652 |
| 10^5 | 1.3166 |
| 10^3 | 1.9598 |

Tabla 18. Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 2 de réplica 3.

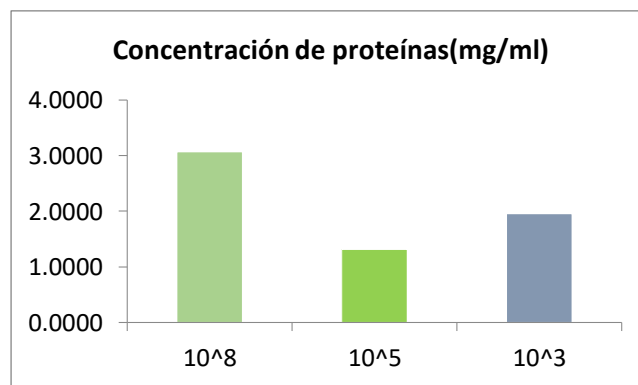


Figura 30. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 2 Réplica 3.

| Tiempo(días) | 10^8 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^5 (Abs) | concentración(mg/ml) | 10^3 (Abs) | concentración(mg/ml) |
|--------------|-----------------|----------------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------|
| 0 | 0 | -0.0073 | 0.003 | 0.0114 | 0.002 | 0.0052 |
| 7 | 0.107 | 0.6609 | 0.101 | 0.6234 | 0.12 | 0.7421 |
| 14 | 0.165 | 1.0231 | 0.144 | 0.8920 | 0.136 | 0.8420 |
| 21 | 0.198 | 1.2292 | 0.135 | 0.8358 | 0.148 | 0.9169 |
| 28 | 0.261 | 1.6226 | 0.198 | 1.2292 | 0.225 | 1.3978 |
| 35 | 0.282 | 1.7538 | 0.233 | 1.4478 | 0.228 | 1.4165 |

Tabla 19. Concentración de proteínas usando el método Bradford, de muestras cada 7 días a una longitud de onda de 595nm, para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 3.

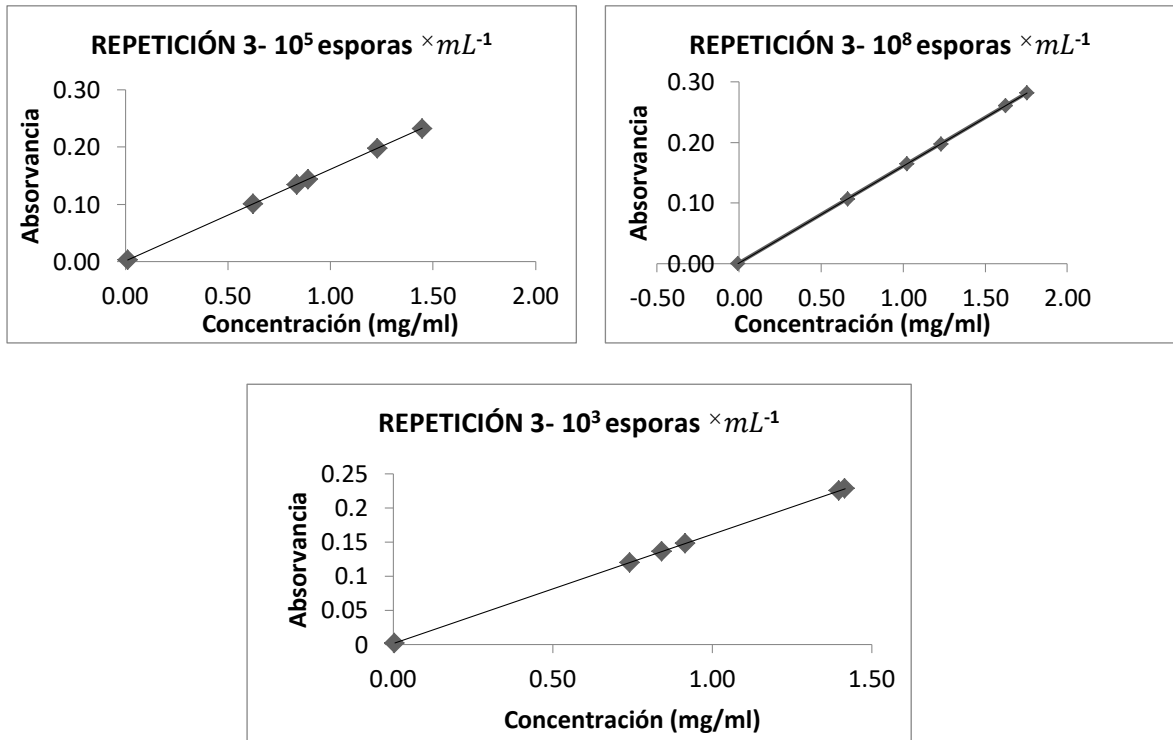


Figura 31 .Gráfico de la absorbancia leída con la concentración de proteínas. Repetición 3 de réplica 3.

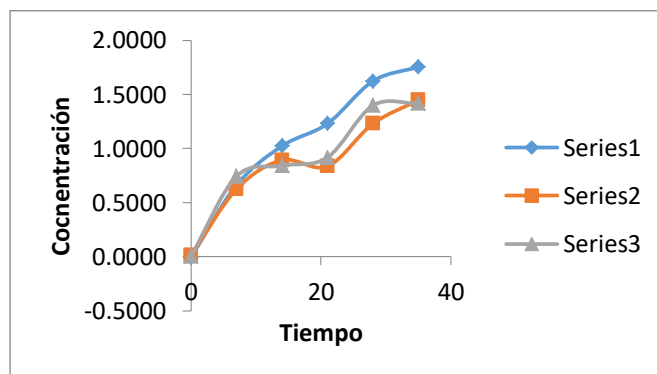


Figura 32. Gráfico concentración en relación al tiempo de 10^8 (T1), 10^5 (T2), 10^3 (T3) esporas $\times mL^{-1}$.

| Tratamiento | Concentración de proteínas(mg/ml) |
|-------------|-----------------------------------|
| 10^8 | 1.7538 |
| 10^5 | 1.4478 |
| 10^3 | 1.4165 |

Tabla 20 Concentración final de proteínas para distintas concentraciones (esporas* mL^{-1}) de *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad. Repetición 3 de réplica 3.

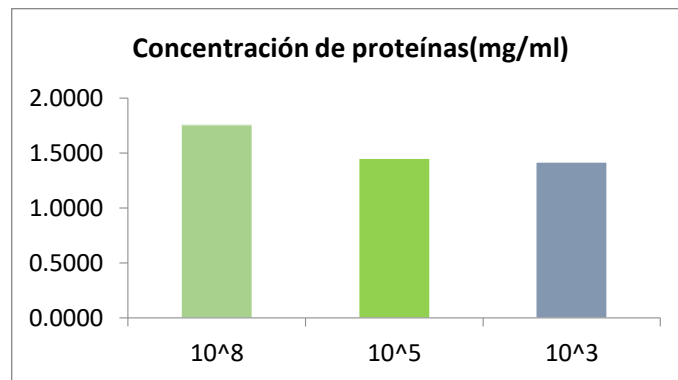


Figura 33. En la primera réplica se observó que a una mayor concentración de 10^8 se da una mayor concentración de proteínas al final en comparación que con el tratamiento 10^5 y 10^3 para el tratamiento de las láminas de polietileno de baja densidad (LDPE). Repetición 3 Réplica 3.

4.3. Cinética de crecimiento de *Aspergillus niger*

Se observó el crecimiento en el medio de Czapek Dox, usando como fuente de carbono las láminas de LDPE; esto se debe a que *Aspergillus niger* es capaz de usar las láminas de polietileno de baja densidad como fuente de carbono. Se encontró que el crecimiento del hongo sobre las láminas aumentaba constantemente los días 7 y 9 en comparación con los primeros días.

| 10^8 esporas $\cdot\text{mL}^{-1}$ (g/L) | 10^5 esporas $\cdot\text{mL}^{-1}$ (g/L) | 10^3 esporas $\cdot\text{mL}^{-1}$ (g/L) |
|---|---|---|
| 0.2 | 0.1 | 0 |
| 0.6 | 0.6 | 0.2 |
| 1.2 | 1.4 | 0.8 |
| 2.5 | 3.1 | 1.4 |
| 4.1 | 3.3 | 2.8 |
| 4.3 | 3.3 | 2.9 |

Tabla 21. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos. Repetición 1 Réplica 1.

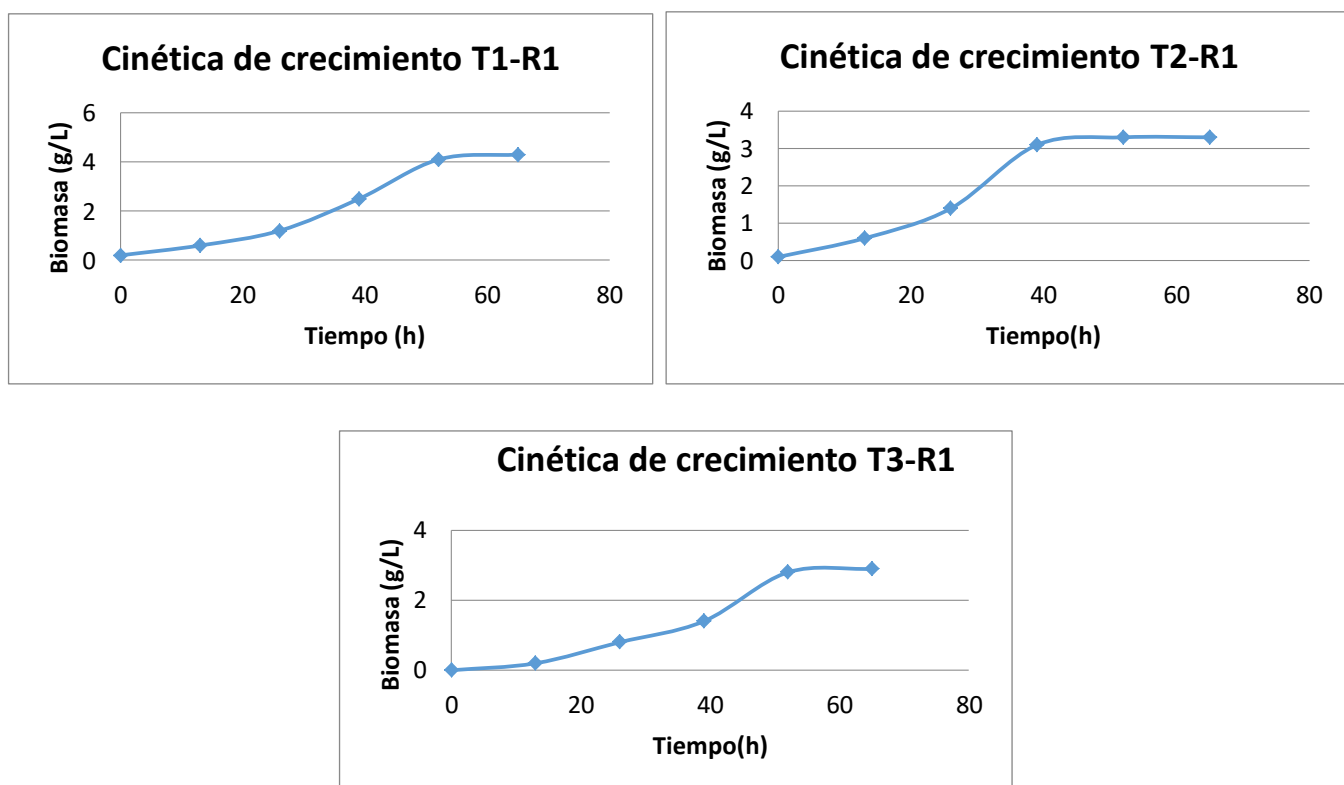


Figura 34. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 1 Réplica 1.

| 10^8 esporas \times mL^{-1} (g/L) | 10^5 esporas \times mL^{-1} (g/L) | 10^3 esporas \times mL^{-1} (g/L) |
|---|---|---|
| 0.1 | 0.5 | 0 |
| 0.5 | 0.5 | 0.2 |
| 1.1 | 1.1 | 0.9 |
| 3.5 | 3.2 | 3.6 |
| 4.1 | 3.3 | 4 |
| 4.5 | 2.9 | 4 |

Tabla 22. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos. Repetición 2 Réplica 1.

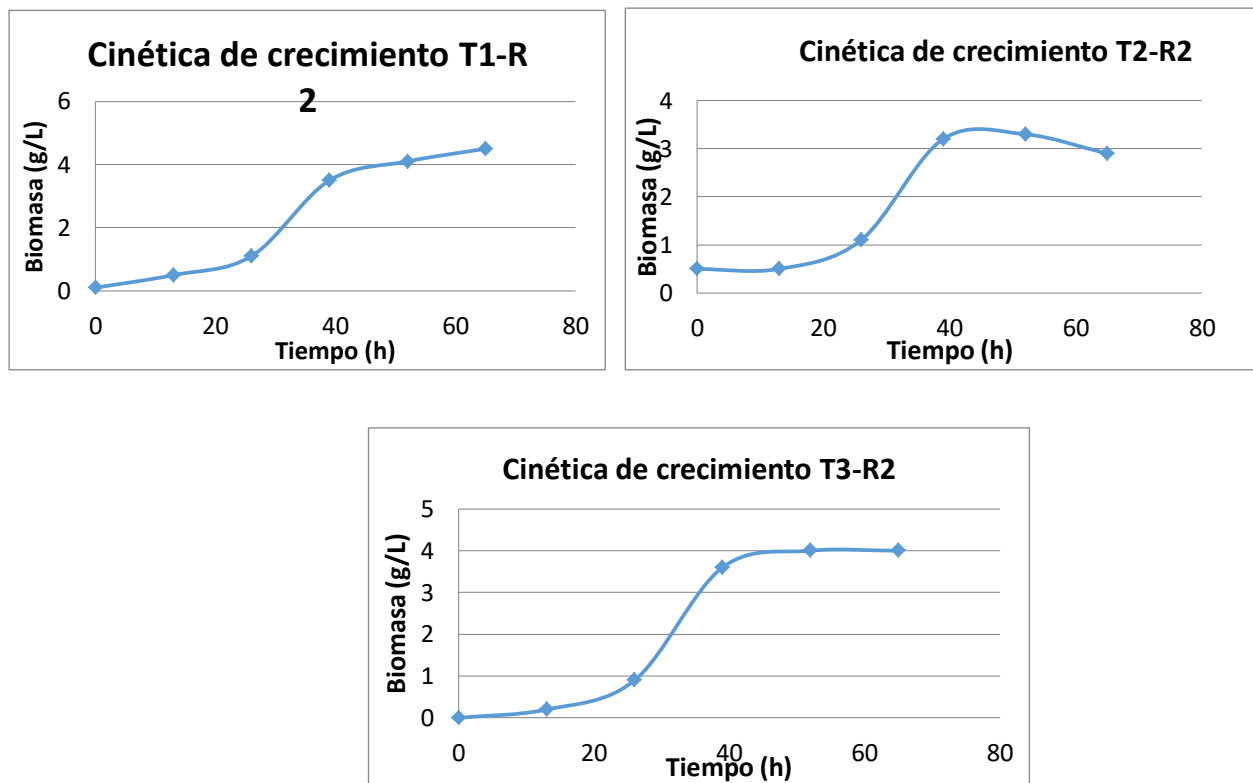


Figura 35. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 2 Réplica 1

| 10^8 esporas \times mL^{-1} (g/L) | 10^5 esporas \times mL^{-1} (g/L) | 10^3 esporas \times mL^{-1} (g/L) |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 |
| 0.1 | 0.1 | 0.2 |
| 0.4 | 0.8 | 0.7 |
| 1.6 | 3.3 | 2.6 |
| 3.5 | 4.1 | 3.1 |
| 4.4 | 3.7 | 3.7 |

Tabla 23. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos. Repetición 3 Réplica 1.

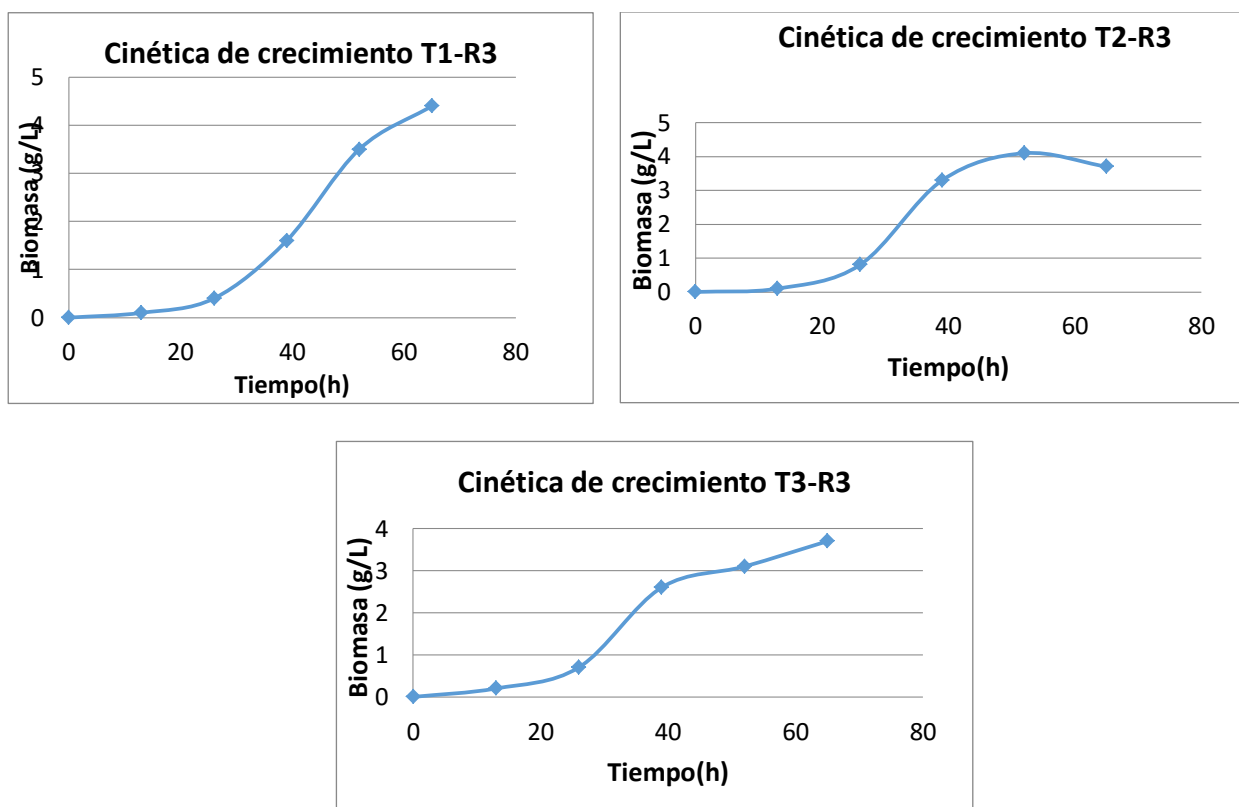


Figura 36 .Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 3 Réplica 1

| 10^8 esporas \times mL $^{-1}$ (g/L) | 10^5 esporas \times mL $^{-1}$ (g/L) | 10^3 esporas \times mL $^{-1}$ (g/L) |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 |
| 0.1 | 0 | 0.1 |
| 1.3 | 0.2 | 0.2 |
| 3.3 | 1 | 0.7 |
| 4.3 | 3 | 1.9 |
| 4.4 | 4.2 | 2.1 |

Tabla 24. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos. Repetición 1 Réplica 2.

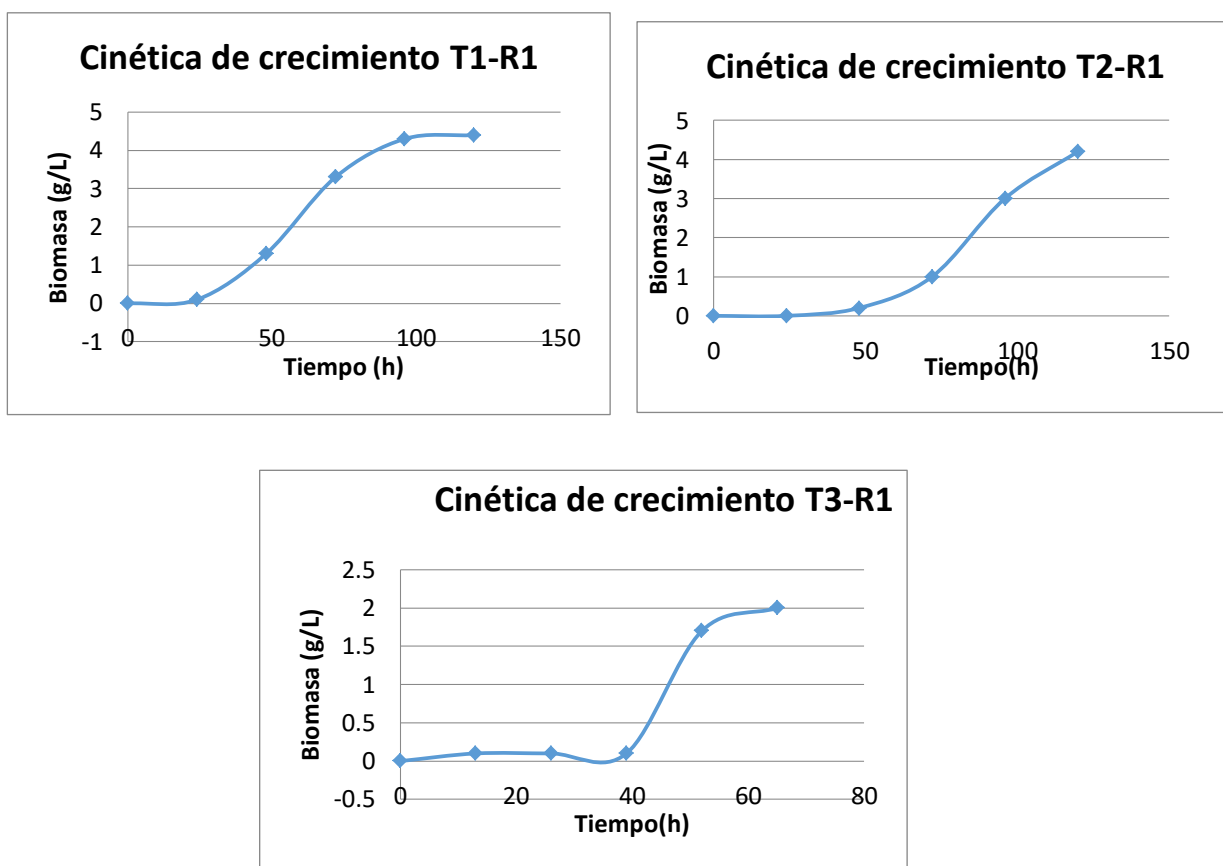


Figura 37 .Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 1 Réplica 2.

| 10^8 esporas \times mL ⁻¹ (g/L) | 10^5 esporas \times mL ⁻¹ (g/L) | 10^3 esporas \times mL ⁻¹ (g/L) |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0.1 |
| 0.2 | 0.1 | 0.5 |
| 0.9 | 0.2 | 1.4 |
| 1.44 | 0.2 | 1.4 |

Tabla 25. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos. Repetición 2 Réplica 2.

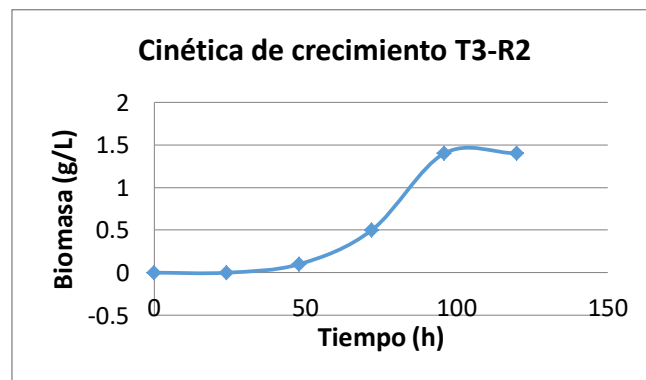
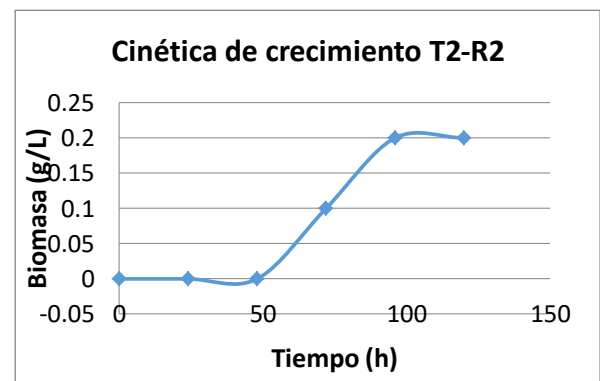
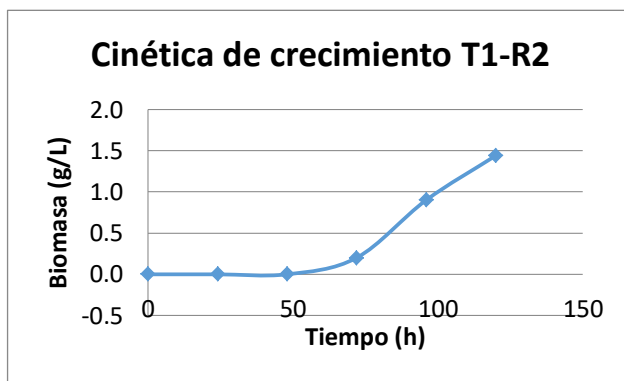


Figura 38. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 2 Réplica 2.

| 10^8 esporas $\times mL^{-1}$ (g/L) | 10^5 esporas $\times mL^{-1}$ (g/L) | 10^3 esporas $\times mL^{-1}$ (g/L) |
|--|--|--|
| 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 |
| 0.1 | 0.2 | 0.1 |
| 0.3 | 0.6 | 0.4 |
| 0.8 | 1 | 0.7 |
| 1.2 | 1.2 | 0.8 |

Tabla 26. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos. Repetición 3 Réplica 2.

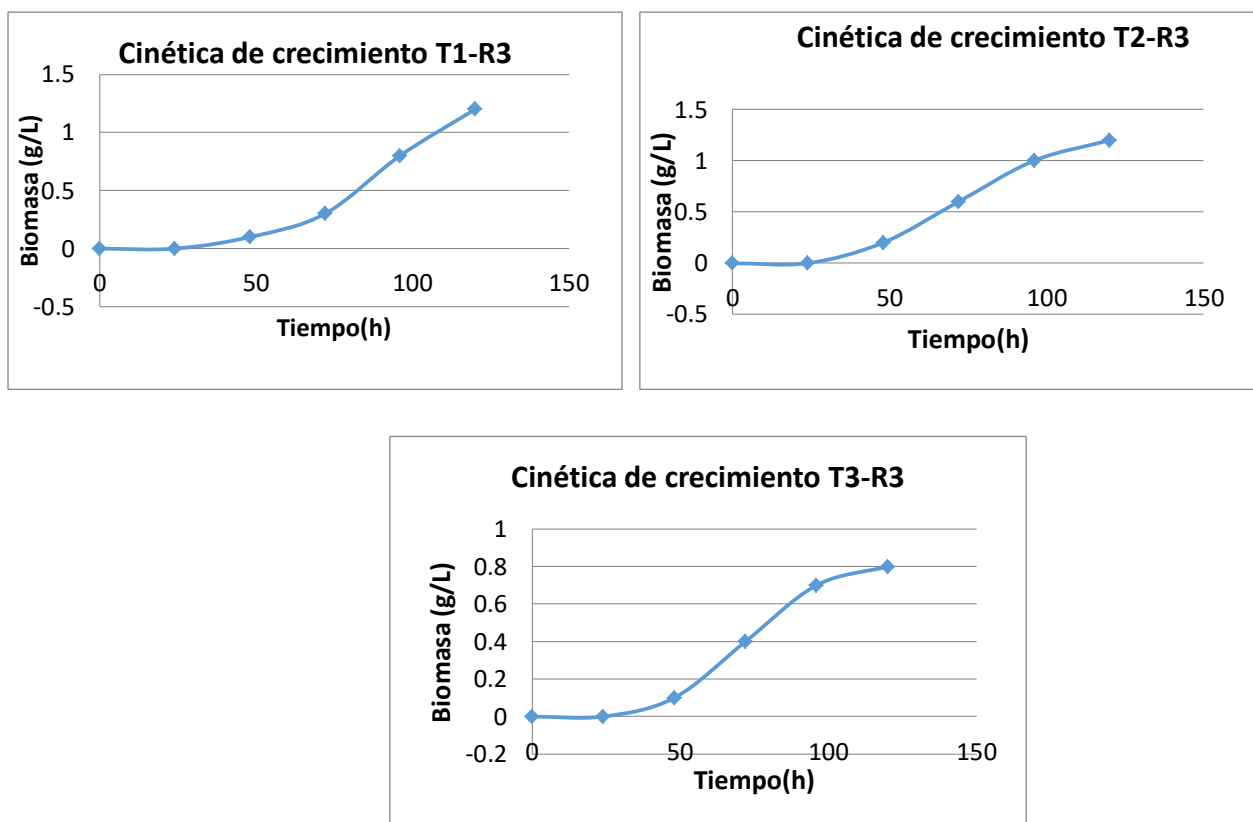


Figura 39. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. . Repetición 3 Réplica 2.

| 10^8 esporas $\times mL^{-1}$ (g/L) | 10^5 esporas $\times mL^{-1}$ (g/L) | 10^3 esporas $\times mL^{-1}$ (g/L) |
|--|--|--|
| 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 |
| 0.1 | 0.1 | 0.3 |
| 1.3 | 1 | 0.9 |
| 2 | 1.7 | 1.5 |
| 2.3 | 2.1 | 1.6 |

Tabla 27. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos. Repetición 1 Réplica 3.

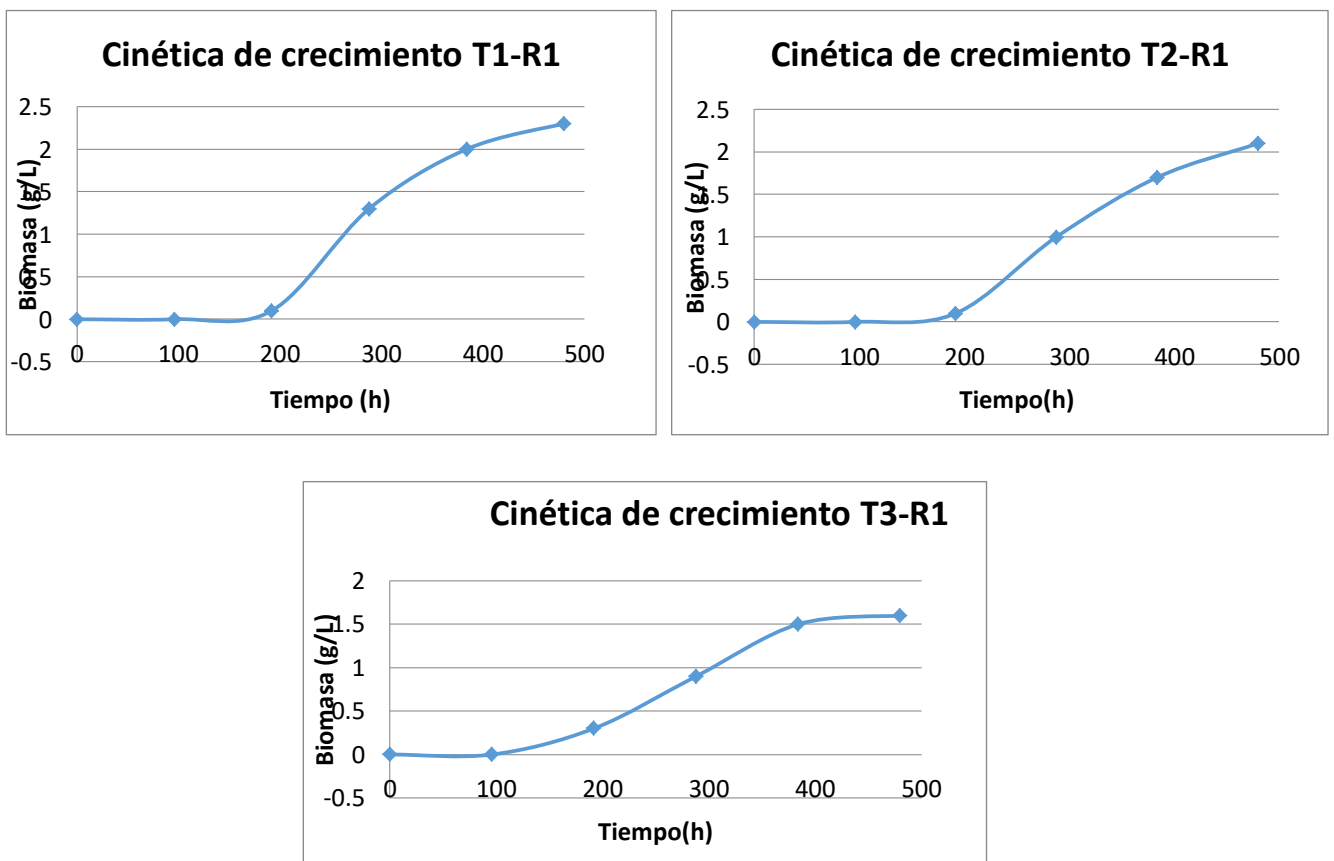


Figura 40. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. .Repetición 1 Réplica 3.

| 10^8 esporas \times mL ⁻¹ (g/L) | 10^5 esporas \times mL ⁻¹ (g/L) | 10^3 esporas \times mL ⁻¹ (g/L) |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 |
| 0.4 | 0 | 0.2 |
| 1.4 | 0.4 | 0.5 |
| 2 | 1.2 | 0.8 |
| 2.5 | 1.7 | 0.8 |

Tabla 28. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos. Repetición 2 Réplica 3.

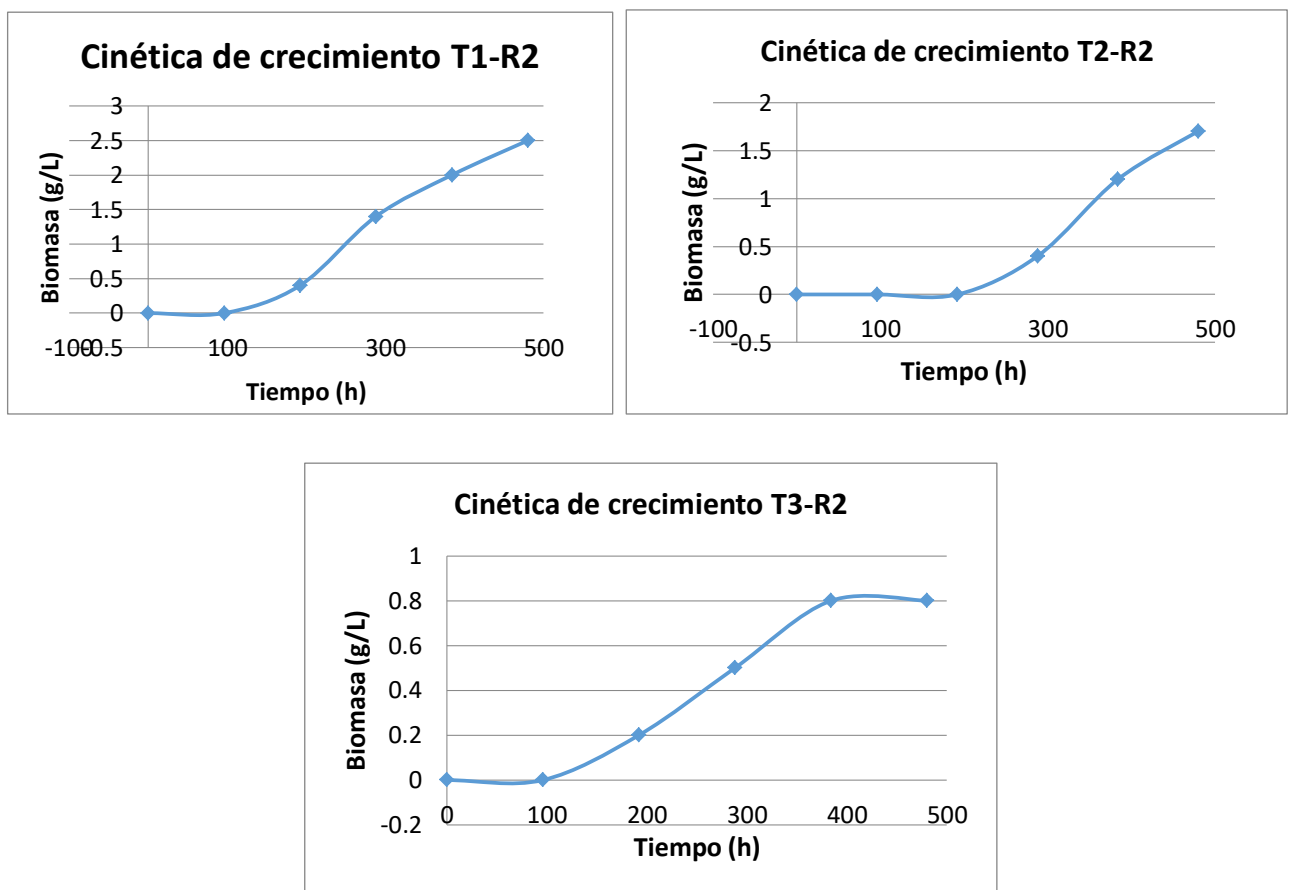


Figura 41. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. Repetición 2 Réplica 3.

| 10^8 esporas \times mL ⁻¹ (g/L) | 10^5 esporas \times mL ⁻¹ (g/L) | 10^3 esporas \times mL ⁻¹ (g/L) |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0.1 | 0.1 |
| 0.7 | 0.5 | 0.4 |
| 1.8 | 0.8 | 0.9 |
| 2.2 | 1.1 | 1.1 |
| 2.4 | 1.4 | 1.1 |

Tabla 29. Datos obtenidos del procedimiento de peso seco y obtención de biomasa de los 3 tratamientos. Repetición 3 Réplica 3.

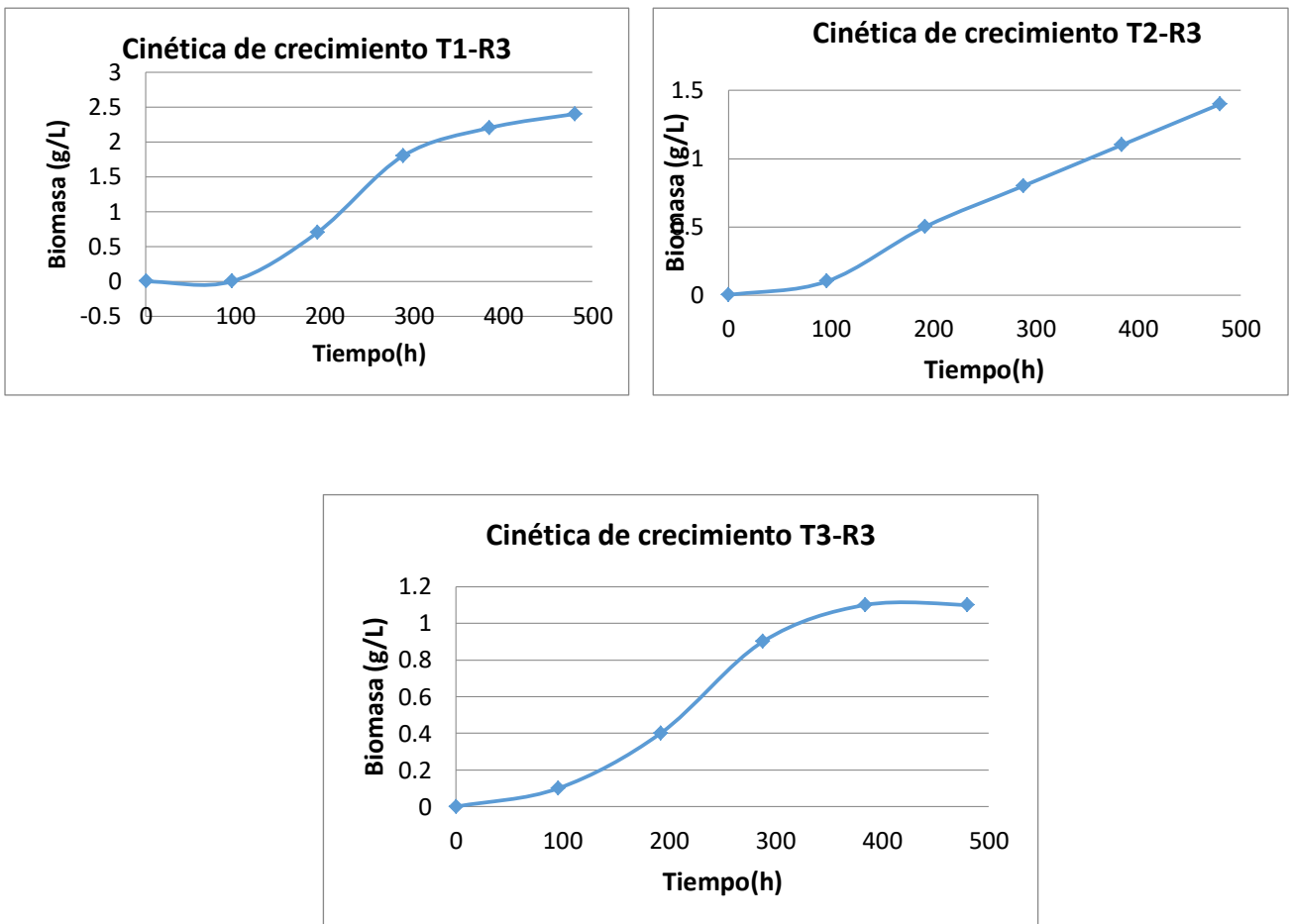


Figura 42. Curvas de crecimiento de los 3 tratamientos. Repetición 3 Réplica 3.

- Usando programa Wolfram mathematica 10.4 para la cinética de **Aspergillus niger** en la biodegradación de polietileno de baja densidad LDPE.

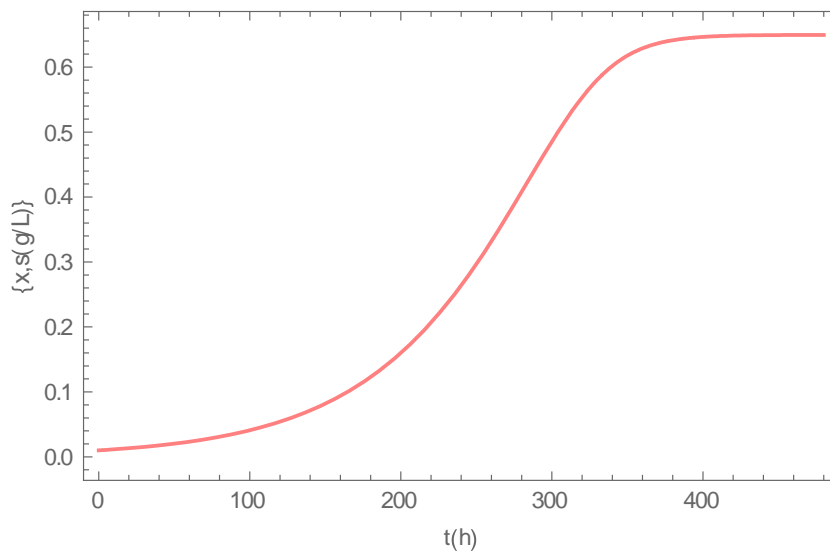


Figura 43. Dato experimental del modelo matemático ajustado a la **cinética de Monod** en el programa Wolfram mathematic , para obtener biomasa requerida. Réplica 1

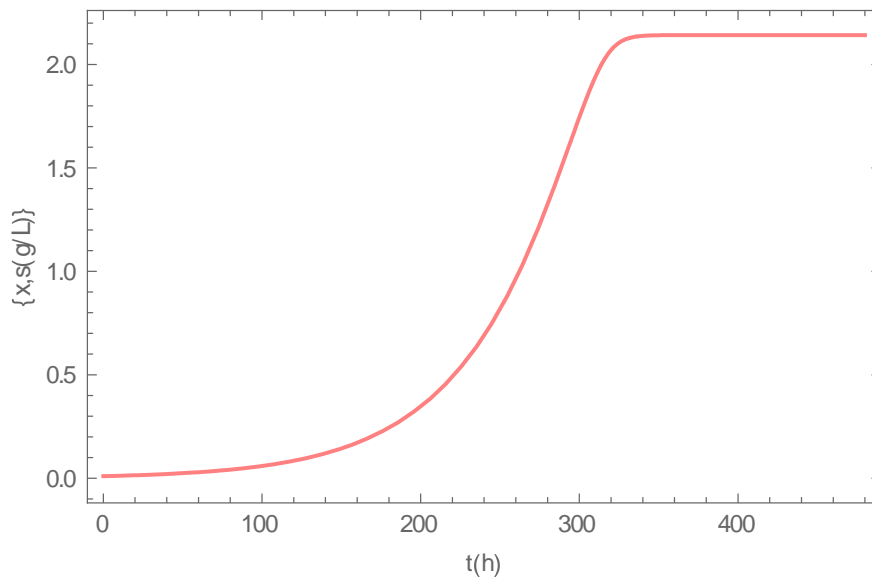


Figura 44. Dato experimental del modelo matemático ajustado a la **cinética de Monod** en el programa Wolfram mathematic, para obtener biomasa requerida. Réplica 2

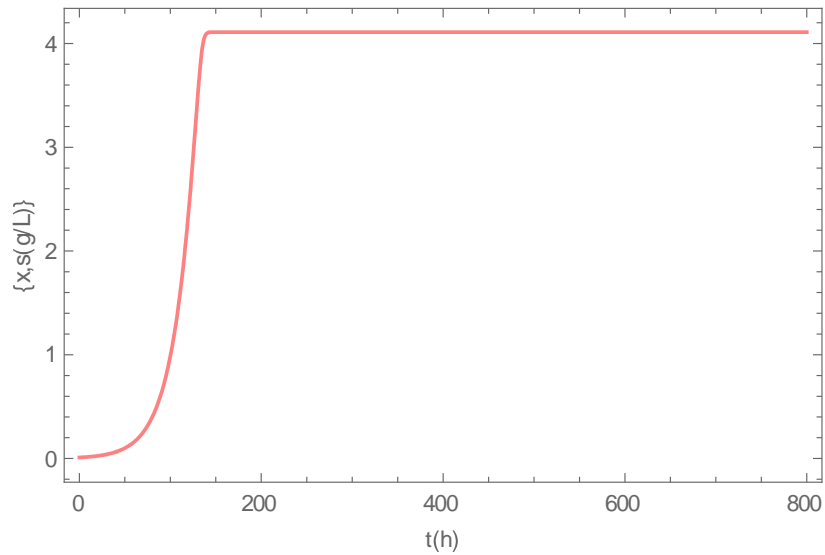


Figura 45. Dato experimental del modelo matemático ajustado a la **cinética de Monod** en el programa Wolfram mathematic. Réplica 3.

CINETICA DE BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO POR ASPERGILLUS NIGER. EC. GOMPERTZ;

```
In[151]:= r = SurvivalFunction[GompertzMakehamDistribution[λ, ξ], t];
          |función de supervivencia |distribución Gompertz Makeham
```

```
rs = r r;
```

```
rp = 1 - (1 - r) (1 - r);
```

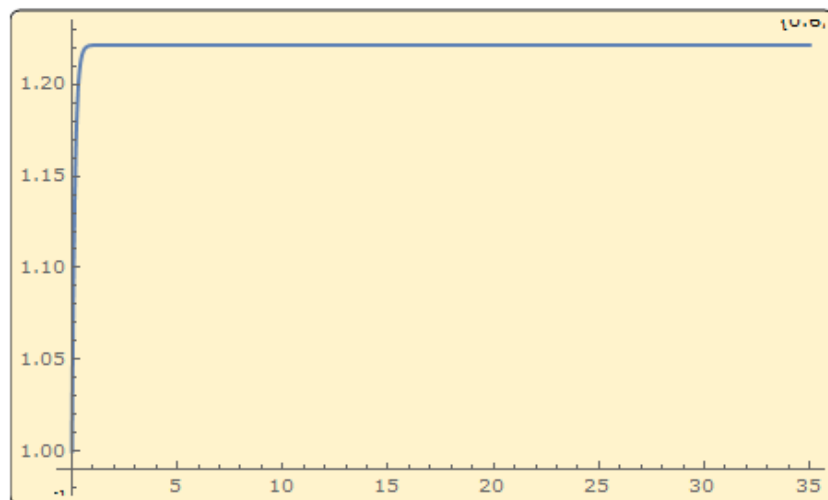


Figura 46. Dato experimental del modelo matemático ajustado a la **ecuación de Gompertz** en el programa Wolfram mathematic. Réplica 1

4.4. Cambios morfológicos


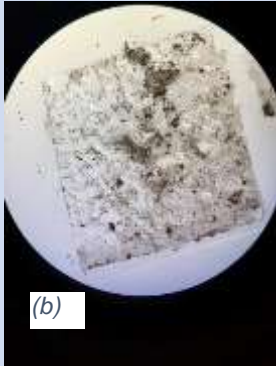


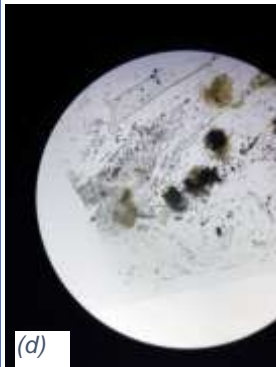





| | R1 | R2 | R3 | CONTROL |
|--------|---|---|--|---|
| 10^8 |  |  |  |  |
| 10^5 |  |  |  | |
| 10^3 |  |  |  | |

Tabla 30. Observación con estereoscopio de la superficie de las láminas de LDPE y la fuerte adherencia de *Aspergillus niger* en la superficie luego de 35 días de incubación a 37°C. En donde se revela la ausencia de biofilm en el control (j) y la presencia del hongo sobre los tratamientos y en cada réplica.

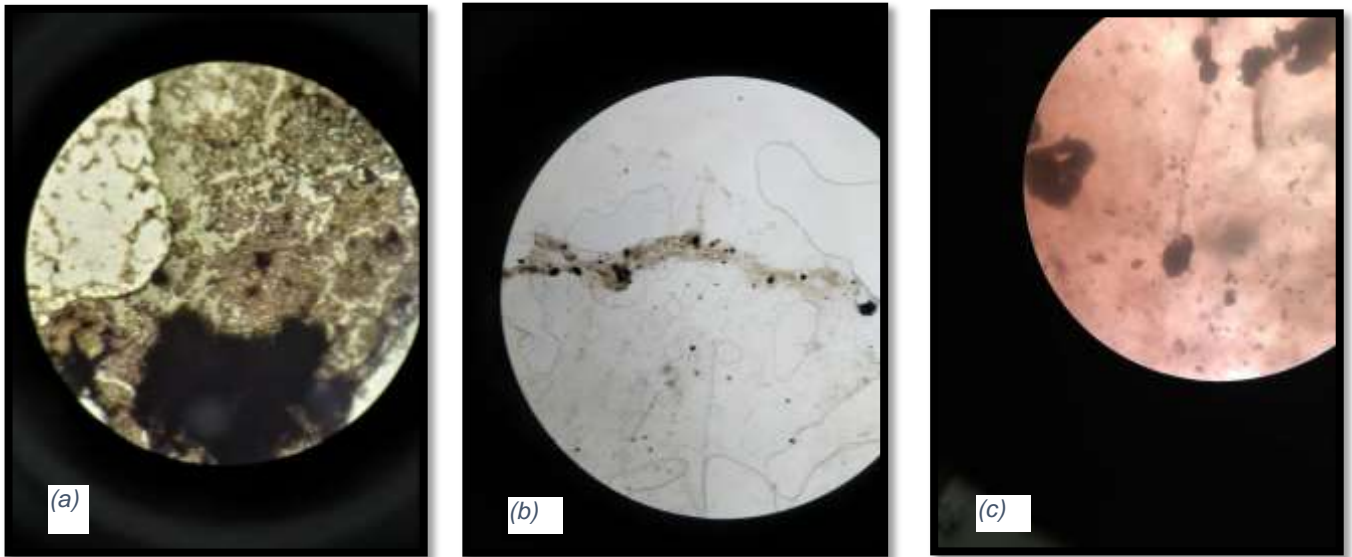


Figura 47. La observación en el microscopio a 40 X revela la presencia del hongo sobre las láminas y esporas sobre la superficie. (a) 10^8 esporas*mL⁻¹, (b) 10^5 esporas*mL⁻¹, (c) 10^3 esporas*mL⁻¹.

4.5. Medidas de pérdida de peso

Luego de los 35 días de incubación, el porcentaje de reducción de peso fue determinado con la ecuación. Donde los cultivos se establecieron bajo las mismas condiciones, en cuanto fuente de carbono e inóculo. Los resultados de este experimento muestran valores de porcentaje de degradación mayor en cuanto a cada tratamiento con *Aspergillus niger* por cada réplica, mas no son tan notables en cuanto a lo planteado.

| Repetición 1 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|--------|--------|--------|
| PO(g) | 0.4000 | 0.4000 | 0.4000 |
| Pf(g) | 0.3940 | 0.3986 | 0.3991 |
| Pp(g) | 0.0060 | 0.0014 | 0.0009 |
| %Degradación | 1.5 | 0.35 | 0.225 |

| Repetición 2 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|--------|--------|--------|
| P0(g) | 0.4000 | 0.4000 | 0.4000 |
| Pf(g) | 0.3971 | 0.3982 | 0.3989 |
| Pp(g) | 0.0029 | 0.0018 | 0.0011 |
| %Degradación | 0.73 | 0.45 | 0.28 |

| Repetición 3 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|--------|--------|--------|
| P0(g) | 0.4000 | 0.4000 | 0.4000 |
| Pf(g) | 0.3933 | 0.3988 | 0.3994 |
| Pp(g) | 0.0067 | 0.0012 | 0.0006 |
| %Degradación | 1.68 | 0.30 | 0.15 |

Dónde: P0=peso inicial, Pf=peso final, Pp=peso perdido, durante 35 días.

Tabla 31. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de *Aspergillus niger*. Réplica1 y las 3 repeticiones.

Aplicando la fórmula:

$$Weight (\%) = \frac{0.4000 - 0.3940}{0.4000} \times 100 = 1,5\%$$

Ecuación 2. Aplicando la fórmula de porcentaje de degradación de LDPE.

| Repetición 1 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|--------|--------|--------|
| P0(g) | 0.4000 | 0.4000 | 0.4000 |
| Pf(g) | 0.3985 | 0.3988 | 0.3992 |
| Pp(g) | 0.0015 | 0.0012 | 0.0008 |
| %Degradación | 0.38 | 0.3 | 0.2 |

| Repetición 2 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|--------|--------|--------|
| P0(g) | 0.4000 | 0.4000 | 0.4000 |
| Pf(g) | 0.3995 | 0.3997 | 0.3998 |
| Pp(g) | 0.0005 | 0.0003 | 0.0002 |
| %Degradación | 1.25 | 0.75 | 0.5 |

| Repetición 3 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|--------|--------|--------|
| P0(g) | 0.4000 | 0.4000 | 0.4000 |
| Pf(g) | 0.3985 | 0.3990 | 0.3994 |
| Pp(g) | 0.0015 | 0.0010 | 0.0006 |
| %Degradación | 0.375 | 0.25 | 0.15 |

Dónde: P0=peso inicial, Pf=peso final, Pp=peso perdido, durante 35 días.

Tabla 32. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de *Aspergillus niger*. Réplica 2 y las 3 repeticiones.

| Repetición 1 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|--------|--------|--------|
| P0(g) | 0.4000 | 0.4000 | 0.4000 |
| Pf(g) | 0.3989 | 0.3991 | 0.3995 |
| Pp(g) | 0.0011 | 0.0009 | 0.0005 |
| %Degradación | 0.28 | 0.23 | 0.13 |

| Repetición 2 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|--------|--------|--------|
| P0(g) | 0.4000 | 0.4000 | 0.4000 |
| Pf(g) | 0.3989 | 0.3989 | 0.3995 |
| Pp(g) | 0.0011 | 0.0011 | 0.0005 |
| %Degradación | 2.75 | 2.75 | 1.25 |

| Repetición 3 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|--------|--------|--------|
| P0(g) | 0.4000 | 0.4000 | 0.4000 |
| Pf(g) | 0.3985 | 0.3989 | 0.3990 |
| Pp(g) | 0.0015 | 0.0011 | 0.0010 |
| %Degradación | 0.38 | 0.28 | 0.25 |

Dónde: P0=peso inicial, Pf=peso final, Pp=peso perdido, durante 35 días.

Tabla 33. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de *Aspergillus niger*. Réplica 3 y las 3 repeticiones.

4.6. Cambio de pH:

El estudio del cambio de pH se adoptó para asegurarse de que cualquier actividad metabólica del hongo *Aspergillus niger* en el medio, como el metabolismo demostrado por algunas células microbianas puede apoyar en gran medida a la evidencia de la degradación. El pH de cada tratamiento se midió con una sonda de pH que se insertó en el caldo, según Dey et al., 2012.

| Repetición 1 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|------|------|------|
| pH inicial | 7.45 | 7.45 | 7.44 |
| pH final | 3.96 | 3.95 | 4.04 |

| Repetición 2 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|------|------|------|
| pH inicial | 7.45 | 7.45 | 7.44 |
| pH final | 3.93 | 3.97 | 4.09 |

| Repetición 3 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|------|------|------|
| pH inicial | 7.47 | 7.47 | 7.47 |
| pH final | 3.95 | 3.97 | 4.02 |

Tabla 34. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de *Aspergillus niger*. Réplica 1 y las 3 repeticiones.

| Repetición 1 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|------|------|------|
| pH inicial | 7.44 | 7.45 | 7.44 |
| pH final | 3.98 | 3.99 | 4.02 |

| Repetición 2 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|------|------|------|
| pH inicial | 7.45 | 7.45 | 7.44 |
| pH final | 3.95 | 3.98 | 4.03 |

| Repetición 3 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|------|------|------|
| pH inicial | 7.48 | 7.49 | 7.39 |
| pH final | 3.97 | 3.98 | 4 |

Tabla 35. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de *Aspergillus niger*. Réplica 2 y las 3 repeticiones.

| Repetición 1 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|------|------|------|
| pH inicial | 7.45 | 7.45 | 7.44 |
| pH final | 3.96 | 3.95 | 4.04 |

| Repetición 2 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|------|------|------|
| pH inicial | 7.45 | 7.45 | 7.44 |
| pH final | 3.93 | 3.97 | 4.09 |

| Repetición 3 | T1 | T2 | T3 |
|--------------|------|------|------|
| pH inicial | 7.47 | 7.47 | 7.47 |
| pH final | 3.95 | 3.97 | 4.01 |

Tabla 36. Degradación de LDPE a diferentes concentraciones de *Aspergillus niger*. Réplica 3 y las 3 repeticiones.

4.7. Cálculo de desviación estándar

Donde se observa que en la réplica 3 hubo una variación más alta y un coeficiente de variación más disperso y heterogéneo.

| Etiquetas de fila | Promedio de Pp(g) |
|----------------------|--------------------|
| T1 | 0.00520 |
| T2 | 0.00147 |
| T3 | 0.00087 |
| Total general | 0.002511111 |

Tabla 37. Promedio de peso perdido de los 3 tratamientos de la réplica 1.

| Etiquetas de fila | Desvest de Pp(g) |
|----------------------|------------------|
| T1 | 0.00202 |
| T2 | 0.00031 |
| T3 | 0.00025 |
| Total general | 0.000860 |

Tabla 38. Promedio de desviación estándar de los 3 tratamientos de la réplica 1.

| | Promedio | Desviación estándar | Coficiente de Variación |
|----|----------|---------------------|-------------------------|
| T1 | 0.00520 | 0.00202 | 0.38892 |
| T2 | 0.00147 | 0.00031 | 0.20830 |
| T3 | 0.00087 | 0.00025 | 0.29038 |

Tabla 39. Donde el coeficiente de variación de T1 que es 0.38892 es el más disperso o más heterogéneo y el menos heterogéneo o más homogéneo es de T1 que es 0.20830.

| Etiquetas de fila | Promedio de Pp(g) |
|----------------------|-------------------|
| T1 | 0.00117 |
| T2 | 0.00083 |
| T3 | 0.00053 |
| Total general | 0.000844 |

Tabla 40. Promedio de peso perdido de los 3 tratamientos de la réplica 2.

| Etiquetas de fila | Desvest de Pp(g) |
|----------------------|------------------|
| T1 | 0.00058 |
| T2 | 0.00047 |
| T3 | 0.00031 |
| Total general | 0.000452 |

Tabla 41. Promedio de desviación estándar de los 3 tratamientos de la réplica 2.

| | Promedio | Desviación estándar | Coficiente de Variación |
|----|----------|---------------------|-------------------------|
| T1 | 0.00117 | 0.00058 | 0.49487 |
| T2 | 0.00083 | 0.00047 | 0.56710 |
| T3 | 0.00053 | 0.00031 | 0.57282 |

Tabla 42. Donde el coeficiente de variación de T3 que es 0.57282 es el más disperso o más heterogéneo y el menos heterogéneo o más homogéneo es de T1 que es 0.49487.

| Etiquetas de fila | Promedio de Pp(g) |
|----------------------|-------------------|
| T1 | 0.0012 |
| T2 | 0.0010 |
| T3 | 0.0007 |
| Total general | 0.0010 |

Tabla 43. Promedio de peso perdido de los 3 tratamientos de la réplica 3.

| Etiquetas de fila | Desvest de Pp(g) |
|----------------------|------------------|
| T1 | 0.0002 |
| T2 | 0.0001 |
| T3 | 0.0003 |
| Total general | 0.0002 |

Tabla 44. Promedio de desviación estándar de los 3 tratamientos de la réplica 3.

| | Promedio | Desviación estándar | Coefficiente de Variación |
|----|----------|---------------------|---------------------------|
| T1 | 0.00117 | 0.00058 | 0.49487 |
| T2 | 0.00083 | 0.00047 | 0.56710 |
| T3 | 0.00053 | 0.00031 | 0.57282 |

Tabla 45 Donde el coeficiente de variación de T1 que es 0.57282 es el más disperso o más heterogéneo y el menos heterogéneo o más homogéneo es de T2 que es 0.49487.

| Tiempo (h) | PROMEDIOS | | | DESVIACIÓN ESTÁNDAR | | |
|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 10 ⁸ [g/L] | 10 ⁵ [g/L] | 10 ³ [g/L] | 10 ⁸ [g/L] | 10 ⁵ [g/L] | 10 ³ [g/L] |
| 0 | 0.0003 | 0.0000 | 0.0000 | 0.00031 | 0.00006 | 0.00000 |
| 96 | 0.0004 | 0.0002 | 0.0001 | 0.00038 | 0.00035 | 0.00010 |
| 192 | 0.0007 | 0.0005 | 0.0003 | 0.00061 | 0.00076 | 0.00044 |
| 288 | 0.0015 | 0.0015 | 0.0008 | 0.00087 | 0.00146 | 0.00067 |
| 384 | 0.0027 | 0.0023 | 0.0022 | 0.00118 | 0.00089 | 0.00057 |
| 480 | 0.0028 | 0.0025 | 0.0023 | 0.00127 | 0.00070 | 0.00052 |

Tabla 46. Desviación estándar y promedios. Cálculo de barras de error

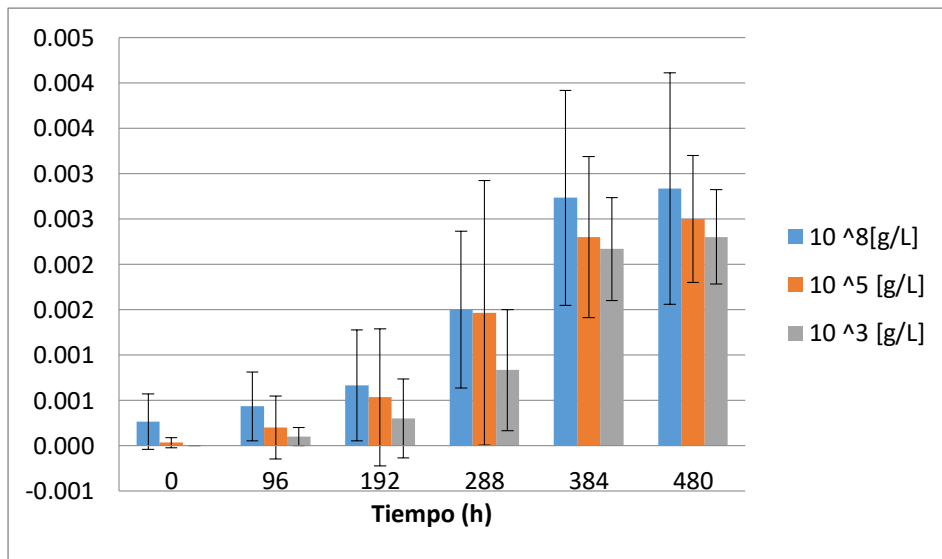


Tabla 47. Barras de error de cada tratamiento en relación al tiempo de las 3 concentraciones.

| Tiempo | concentración de proteínas (mg/ml) | Biomasa | Peso LDPE gr |
|--------|------------------------------------|---------|--------------|
| 0 | 0.001 | 0.2 | 0.400 |
| 7 | 0.692 | 0.6 | 0.394 |
| 14 | 1.073 | 1.2 | - |
| 21 | 2.135 | 2.5 | - |
| 28 | 3.384 | 4.1 | - |
| 35 | 3.821 | 4.3 | - |

Tabla 48. Tratamiento de la concentración 10⁸ esporas × ml⁻¹. Concentración de proteínas, biomasa y peso LDPE en relación al tiempo.

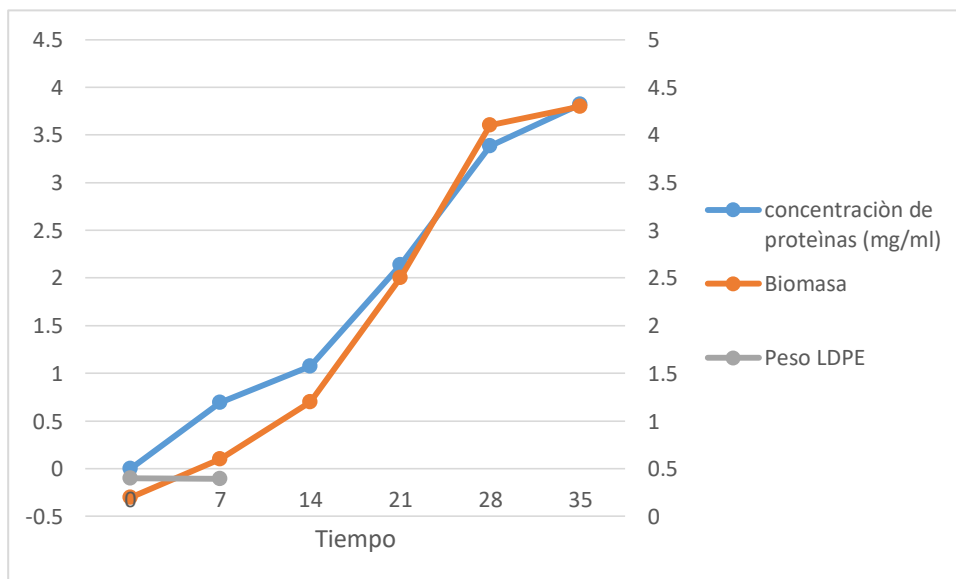


Figura 48. Biodegradación de *Aspergillus niger*, concentración 10⁸ espora × ml⁻¹. Concentración de proteínas, biomasa y peso de LDPE.

| Tiempo | concentraciòn de proteïnas (mg/ml) | Biomasa | Peso LDPE |
|--------|------------------------------------|---------|-----------|
| 0 | 0.018 | 0.1 | 0.4000 |
| 7 | 0.561 | 0.6 | 0.3986 |
| 14 | 0.711 | 1.4 | |
| 21 | 1.210 | 3.1 | |
| 28 | 1.485 | 3.3 | |
| 35 | 1.598 | 3.3 | |

Tabla 49 Tratamiento de la concentraciòn 10^5 esporas \times ml⁻¹. Concentraciòn de proteïnas, biomasa y peso LDPE en relaciòn al tiempo.

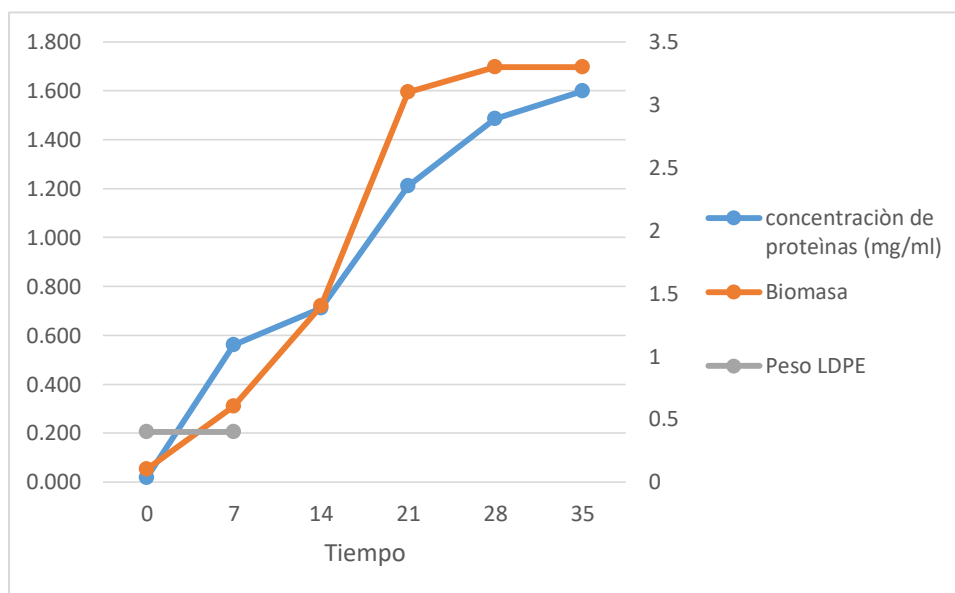


Figura 49. Biodegradaciòn de *Aspergillus niger*, concentraciòn 10^5 esporas \times ml⁻¹. Concentraciòn de proteïnas, biomasa y peso de LDPE.

| Tiempo | concentración de proteínas (mg/ml) | Biomasa | Peso LDPE |
|--------|------------------------------------|---------|-----------|
| 0 | 0.005 | 0 | 0.4000 |
| 7 | 0.555 | 0.2 | 0.3991 |
| 14 | 0.686 | 0.8 | |
| 21 | 1.117 | 1.4 | |
| 28 | 1.404 | 2.8 | |
| 35 | 1.335 | 2.9 | |

Tabla 50 Tratamiento de la concentración 10^3 esporas \times ml $^{-1}$. Concentración de proteínas, biomasa y peso LDPE en relación al tiempo.

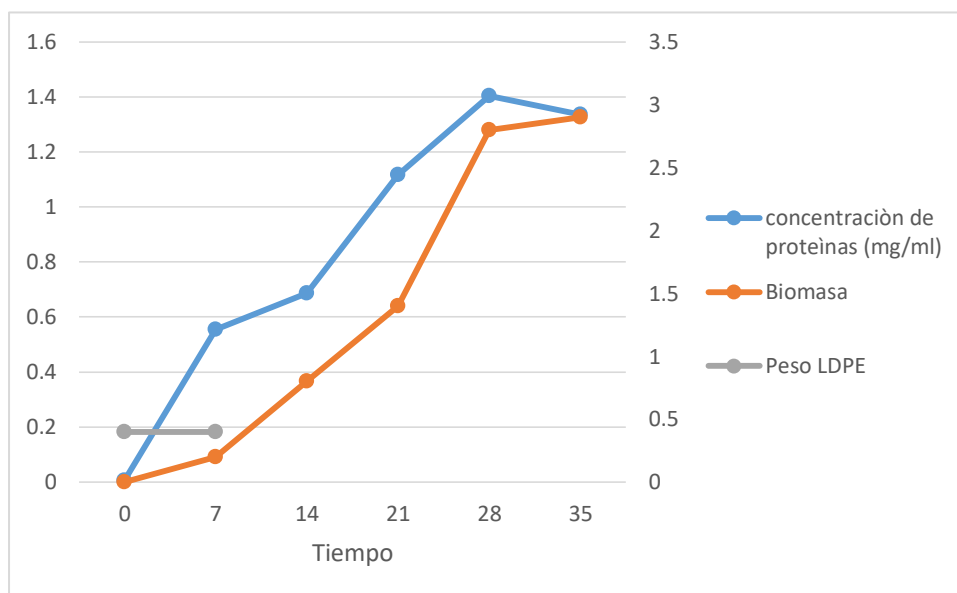


Figura 50. Biodegradación de *Aspergillus niger*, concentración 10^3 esporas \times ml $^{-1}$. Concentración de proteínas, biomasa y peso de LDPE.

DISCUSIÓN

Bajo condiciones de laboratorio se observó cómo *Aspergillus niger* tiene la capacidad para degradar polietileno de baja densidad. Sin embargo los resultados en la pérdida de peso mostraron como la degradación fue mayor de 1,65% en la primera réplica, en la segunda réplica 1,25 % y en la tercera réplica 2.75% en las muestras con la concentración de 10^8 esporas* mL^{-1} , donde también se observó como las hifas logran penetrar en menos tiempo y a partir de ellos crecer sobre las láminas, signos que se han encontrado previamente en otros estudios como indicadores de biodegradación (Zahra et al., 2010; Mathur, G., et al. 2011; Nowak, B., et al. 2011).

El valor del pH es un factor importante para la supervivencia y actividad del microorganismo por lo que al principio se obtuvo un pH de 7.47 en donde se observa una disminución del pH de 3.95 a 4.00, lo cual nos indica la metabolización del hongo ya que, según referencias, la variación en el pH están al principio de 6 a 8 y resultan en una disminución de 3 a 5 en las suspensiones microbianas durante y después de la biodegradación. Los microorganismos secretan una variedad de enzimas en el agua del suelo, que comienzan la descomposición de polímeros. Las exoenzimas de los microorganismos descomponen primero los polímeros complejos que dan cadenas cortas o monómeros que son lo suficientemente pequeños para permear a través de las paredes celulares para ser utilizados como fuentes de carbono y energía por un proceso de despolimerización según Dey et al., 2012.

Es importante resaltar que las muestras de la réplica 1 y 2 no fueron tratadas al final con una solución de SDS, lo cual pudo haber perjudicado en el peso final de las láminas de polietileno de baja densidad en el tratamiento 3 de la réplica 2 donde se obtuvo un porcentaje de degradación de 0.475% y en el tratamiento 3 de la réplica 3 con un porcentaje de 2.625%, debido a que se reemplazó por una solución de Tween 80, para posteriormente ser pesadas, en donde no se eliminó por completo el microorganismo que estaba fuertemente adherido a las láminas, como lo recomiendan en su estudio , comparado con la

réplica 3 que se obtuvieron mejores resultados a lo que según referencias se obtiene que *Aspergillus niger* degradó un 5,8% en el mes de incubación, usando SDS como tensioactivo que desnaturaliza las células y se lava por completo la superficie (P. Tribedi et al.2012, Alok K. et al. 2011).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

El método usado en el aislamiento fue efectivo para *Aspergillus niger*, usando medio Czapeck Dox, donde se identificó la morfología macroscópica en placa, luego de las diluciones en serie en placas con Czapek Dox. Se observó en el microscopio usando azul de lactofenol para observar la morfología microscópica directo, donde se observaron las cabezas de los conidios son negras y radiales y tienden a separarse en columnas. Siendo las características macroscópicas del hongo filamentoso de color negro con aspecto polvoso, opaca de bordes irregulares, donde la placa con presencia de hongo con parecido macroscópico se aisló en una placa con medio PDA.

Se produjo una concentración de proteínas extracelulares de acuerdo a los días y las diferentes concentración de *Aspergillus niger*, obteniendo una concentración de 3.821 mg/ml en el primer tratamiento de 10^8 esporas* mL^{-1} , en cuanto al segundo tratamiento una concentración final de 1,598mg /ml para 10^5 esporas* mL^{-1} y una concentración final de 1.335 mg/ml para 10^3 esporas* mL^{-1} , Teniendo como resultado la misma relación en cuanto a la segunda y tercera réplica. A la vez la mayor concentración de proteínas fue 3.902 mg/ml de la repetición 3 de réplica 2. Es recomendable aplicar el diseño de medio para poder obtener unos resultados relacionados a lo diseñado.

Usando las técnicas de la medida de la pérdida de peso y los cambios morfológicos se confirmó la biodegradabilidad de *Aspergillus niger*, en donde la superficie de las láminas de LDPE se desarrolla el hongo sin embargo el tiempo fue corto en las concentraciones de 10^3 esporas* mL^{-1} en las réplicas, a su vez el microorganismo usa en el medio como fuente de carbono este polímero, Sin embargo también se pudo obtener la biomasa y determinar la cinética del crecimiento de *Aspergillus niger*, obteniendo un poco cantidad de biomasa de 3.9 g/l en la réplica 3, la cual está relacionada con el diseño de medio debido al tiempo de adaptación de *Aspergillus niger*.

Se obtuvo una variación en los medios de biodegradación de LDPE en los 3 tratamientos con *Aspergillus niger*, por lo que se deduce que hubo una secreción de una variedad de enzimas en el medio para así pueda comenzar la descomposición del polímero complejo de cadenas cortas, las cuales son suficientemente pequeños para permear a través de las paredes celulares y ser utilizados como fuente de carbono. Obteniendo un mejor resultado en la tercera réplica, en el primer tratamiento de 10^8 esporas* mL^{-1} con un pH final de 3.96, en el segundo tratamiento de 10^5 esporas* mL^{-1} con un pH final de 3.95, en el tercer tratamiento de 10^3 esporas* mL^{-1} con un pH final de 4.04.

La biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE) por *Aspergillus niger* se mostró en relación al modelo matemático de monod, el cual se determinó usando el método de peso seco, donde se obtuvo la mayor biomasa en la repetición 2 de la réplica 1 que fue de 4.5 g/L a la concentración de 10^8 esporas* mL^{-1} y una menor cantidad de biomada de 1.1 g/L a la concentración de 10^3 esporas* mL^{-1} en la repetición 3 de la réplica 3, lo cual se puede evidenciar a la vez en los gráficos de la cinética de crecimiento en relación de biomasa con respecto al tiempo.

RECOMENDACIONES

- Realizar un adecuado lavado de las láminas de LDPE al terminar el proceso usando dodecilsulfato de sodio al 2% como tensioactivo para desnaturalizar las células y lavar por completo la superficie.
- Evaluar la evolución teórica del dióxido de carbono para la biomineralización de LDPE a través de dióxido de carbono y así mostrar la potencialidad del microorganismo que apoya el hecho de la biodegradación.
- Identificar molecularmente las cepas seleccionadas y contrastar con la identificación bioquímica y morfológica realizada.
- Determinar el análisis de microscopía electrónica de barrido para confirmar que la superficie de LDPE se vuelve físicamente débil después del tratamiento biológico.
- Preparar el medio de biodegradación y someter a altas temperatura para un tratamiento térmico de las láminas de LDPE.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

- Bhone Myint Kyaw;Ravi Champakalakshmi;Meena Kishore Sakharkar;Chu Sing Lim;Kishore R. (9 de Enero de 2012). *Biodegradación de Polietileno de Baja Densidad (LDPE) por Especies de Pseudomonas*. Obtenido de National Center for Biotechnology Information:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3460136/>
- Das, M. P. (28 de Octubre de 2013). *Un enfoque de la biodegradación de polietileno de baja densidad por Bacillus amyloliquefaciens*. Obtenido de National Center for Biotechnology Information:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4327746/>
- Agamuthu, P., & Faizura, P. N. (20 de Septiembre de 2005). *Biodegradabilidad de los residuos plásticos degradables* . Obtenido de National Center for Biotechnology Information:
http://www.bra.com.ar/Spanish/AreasNegocio/Documents/WasteManagementResearch-Biodegradabilidad_de_residuos_plasticos.pdf.
- Aislamiento y conservación* . (19 de Abril de 2013). Obtenido de <https://es.scribd.com/>:
<https://es.scribd.com/presentation/209563308/Aislamiento-y-conservacion-de-Aspergillus-niger>
- Méndez, C. R., Vergaray, G., & J., V. R. (3 de Julio de 2007). *Isolation and characterization of polyethylene- biodegrading mycromycetes*. Obtenido de Revista peruana de biología :
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000100008
- Osuna, C., Ramírez, F., Alonso, L. A., Delgado, P., Cinthya, S. P., & Escárrega, S. (19 de Abril de 2013). *Aislamiento y conservación de Aspergillus niger*. Obtenido de <https://es.scribd.com/>: <https://es.scribd.com/presentation/209563308/Aislamiento-y-conservacion-de-Aspergillus-niger>

- P., T. M., M., J. C., & M., S. M. (4 de Febrero de 2015). *Biodegradation of films of low density polyethylene (LDPE), poly(hydroxybutyrate-covalerate) (PHBV), and LDPE/PHBV (70/30) blend with Paecilomyces variotii*. Obtenido de <http://www.scielo.br>:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282015000100004
- S. Łabużek, B. N. (31 de Marzo de 2003). *The Susceptibility of Polyethylene Modified with Bionolle to Biodegradation by Filamentous Fungi*. Obtenido de <http://www.pjoes.com>: <http://www.pjoes.com/abstracts/2004/Vol13/No01/08.html>
- Singh, V., & Bhadauria, M. D. (19 de Mayo de 2002). *Biodeterioration of Polyethylene High Density by Aspergillus Versicolor and Aspergillus* . Obtenido de www.sospublication.co.in: <https://e-journal.sospublication.co.in/index.php/jalrb/article/download/101/84/>
- Tribedi, P., & Sil, A. K. (9 de Agosto de 2012). *Low-density polyethylene degradation by Pseudomonas sp.AKS2 biofilm*. Obtenido de National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242625>
- A., L. M. (13 de Julio de 2014). *Degradación de Polietileno de Baja Densidad Utilizando Hongos. Revisión Sistemática de la Literatura*. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/>:
<https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/16184>
- Hadad, D., & Sivan, S. a. (22 de Octubre de 2004). *Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium Brevibacillus borstelensis*. Obtenido de National Center for Biotechnology Information: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15836478>
- G., M. L. (12 de Junio de 2011). *Biodegradación de polietileno de baja densidad por hongos filamentosos*. Obtenido de Registro en la Red Mexicana de Repositorios Institucionales: <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/asp/tesis/presentaciones.php?recno=4248&docs=UAM4248.PDF>
- Q., A. M., & C., S. M. (23 de Agosto de 2015). *DEGRADABILIDAD DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD –LDPE- UTILIZANDO Pycnoporus*

sanguineus UTCH 03. Obtenido de Doc Player:
<https://www.acofipapers.org/index.php/eiei2015/2015/paper/view/1393/499>

A., N. R. (17 de Marzo de 2017). *REVISIÓN BIBLIOGRAFICA SOBRE LOS MICROORGANISMOS BIODEGRADADORES DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD Y SUS EFECTOS EN EL MATERIAL*. Obtenido de repository.udistrital.edu.co:
repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/.../AcuñaMolinaNelsonRicardo2017.pdf

Konduri, M. K., Koteswarareddy, G., Kumar, D. R., & Reddy, B. V. (14 de Febrero de 2011). *Effect of Pro-Oxidants on Biodegradation of Polyethylene (LDPE) by Indigenous Fungal Isolate, Aspergillus oryzae* . Obtenido de Wiley Online Library:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.33517/abstract>

Raut, S. . (20 de Marzo de 2015). *Mejora de la degradación de películas de polietileno de baja densidad por Curvularia lunata SG1 utilizando la estrategia de optimización de enjambre de partículas*. Obtenido de www.ncbi.nlm.nih.gov:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4456507/>

5. ANEXO:

5.1 . Formulación de medio de cultivo para *Aspergillus niger*.

| ELEMENTO | FUENTE | % CELULA | % NUTRIENTE | $\dot{Y}_{X/s}$ | SO | g/L |
|----------|--------------------------------------|----------|-------------|-----------------|-----------|-----------|
| C | C ₂ H ₄ | 47 | 42.814 | 0.5465617 | 7.3184784 | 0.5488859 |
| N | NaNO ₃ | 4 | 16.48 | 4.12 | 0.9708738 | 0.0728155 |
| P | K ₂ HPO ₄ | 0.4 | 17.781 | 44.453 | 0.0899827 | 0.0067487 |
| K | KCl | 0.5 | 52.444 | 104.888 | 0.0381359 | 0.0028602 |
| - | - | - | 13.006 | 32.515 | 0.1230201 | 0.0092265 |
| Mg | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.3 | 13.006 | 43.353 | 0.0922658 | 0.0069199 |
| Fe | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2 | 20.086 | 100.43 | 0.0398287 | 0.0029872 |

| | |
|-------|-----|
| F= | 0.6 |
| Xg/L= | 4 |

| ELEMENTO | |
|----------|--------|
| C | 12.011 |
| H | 1.008 |
| O | 15.999 |
| N | 14.007 |
| Cl | 35.453 |
| K | 39.098 |
| P | 30.974 |
| Mg | 24.305 |
| S | 32.06 |
| Fe | 55.85 |

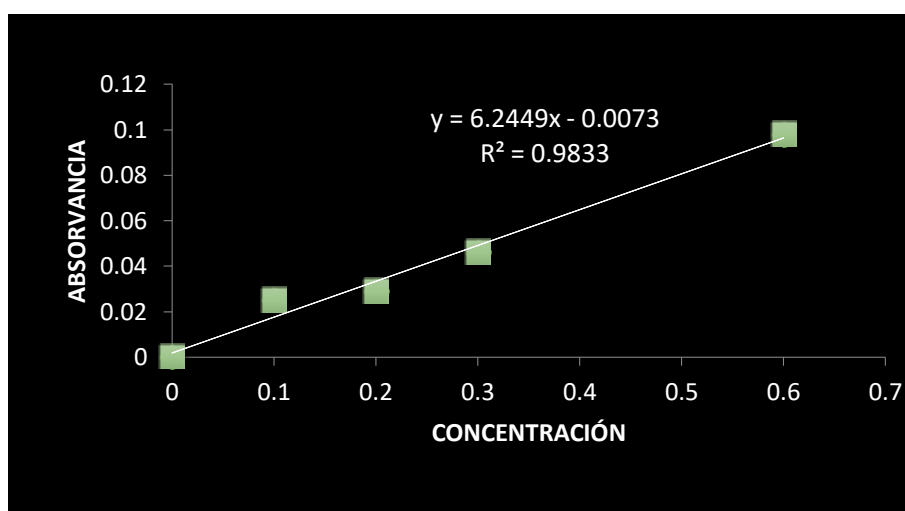
5.2 Medio de biodegradación para *Aspergillus niger*.

| Composición | Concentración (gr) |
|--------------------------------------|--------------------|
| C ₂ H ₄ | 0.5489 |
| NaNO ₃ | 0.0728 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.0067 |
| KCl | 0.0029 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.0069 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0.0030 |

5.3 Preparación de reactivo de Bradford.

| | |
|---|--------|
| Reactivo de Bradford: Se ajusta el volumen a 1 litro con agua y se filtra y se almacena en un recipiente oscuro. Estable por 2 meses. | |
| Coomassie Brilliant Blue G-250 | 100 mg |
| etanol al 70% | 50 ml |
| ácido fosfórico al 85%. | 100 ml |

5.4 Curva de calibración y concentraciones de BSA para el ensayo de Bradford.



5.5 Análisis estadístico

| RESUMEN | | | | |
|---------|--------|--------|----------|-------------|
| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
| T 1 | 3 | 0.0086 | 0.0029 | 7.40333E-06 |
| T 2 | 3 | 0.0035 | 0.0012 | 6.33333E-08 |
| T 3 | 3 | 0.0022 | 0.0007 | 4.33333E-08 |

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-----------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 7.6289E-06 | 2 | 3.8144E-06 | 1.5237461 | 0.29165478 | 5.1432528 |
| Dentro de los grupos | 1.502E-05 | 6 | 2.5033E-06 | | | |
| Total | 2.2649E-05 | 8 | | | | |

Si valor P < alfa rechaza Ho

Si valor P > alfa acepto Ho

- A una concentración de (10^3 , 10^5 y 10^8) de *Aspergillus niger* la biodegradación del polietileno de baja densidad será mayor con respecto al tiempo y mayor a la concentración del 10^8 . Réplica 1.

5.6 Diseño de experimento

| Tratamiento | Repeticiones | | |
|-------------|--------------|-----|-----|
| | I | II | III |
| T1 | Y11 | Y12 | Y13 |
| T2 | Y21 | Y22 | Y23 |
| T3 | Y31 | Y32 | Y33 |

Tabulación de datos, teniendo las condiciones controladas en las unidades experimentales, donde se tiene los tres tratamientos o concentraciones 10^3 , 10^5 y 10^8 esporas/mL donde se hicieron 3 repeticiones, con un nivel de confianza del 95% en un cuadro de doble entrada. Donde Y_{ij} es la observación de la respuesta en el i-ésimo (1; 2 o 3) repetición y bajo el j-ésimo (T1, T2 o T3) tratamiento.

Réplica 1

| Réplicas | T1 | T2 | T3 |
|----------|--------|--------|--------|
| R1 | 0.0060 | 0.0014 | 0.0009 |
| R2 | 0.0015 | 0.0012 | 0.0008 |
| R3 | 0.0011 | 0.0009 | 0.0005 |

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| T 1 | 3 | 0.0086 | 0.0029 | 7.40333E-06 |
| T 2 | 3 | 0.0035 | 0.0012 | 6.33333E-08 |
| T 3 | 3 | 0.0022 | 0.0007 | 4.33333E-08 |

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------|---------------------|-----------------------------|
| | | | | 1.5237461 | | 5.1432528 |
| Entre grupos | 7.6289E-06 | 2 | 3.8144E-06 | 2 | 0.29165478 | 5 |
| Dentro de los grupos | 1.502E-05 | 6 | 2.5033E-06 | | | |
| Total | 2.2649E-05 | 8 | | | | |

El valor que se obtiene para P es ≤ 0.05 , entonces si hay diferencia estadística significativa.

Réplica 2

| Réplicas | T1 | T2 | T3 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|
| R1 | 0.0029 | 0.0018 | 0.0011 |
| R2 | 0.0005 | 0.0003 | 0.0002 |
| R3 | 0.0011 | 0.0011 | 0.0005 |

RESUMEN

| <i>Grupos</i> | <i>Cuenta</i> | <i>Suma</i> | <i>Promedio</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------|
| T 1 | 3 | 0.0045 | 0.0015 | 0.00000156 |
| T 2 | 3 | 0.0032 | 0.0010 | 5.6333E-07 |
| T 3 | 3 | 0.0018 | 0.0006 | 2.1E-07 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| <i>Origen de las variaciones</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>F</i> | <i>Probabilidad</i> | <i>Valor crítico para F</i> |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------|---------------------|-----------------------------|
| | | | | 0.7814285 | 0.4993396 | 5.1432528 |
| Entre grupos | 1.2156E-06 | 2 | 6.0778E-07 | 7 | 6 | 5 |
| Dentro de los grupos | 4.6667E-06 | 6 | 7.7778E-07 | | | |
| Total | 5.8822E-06 | 8 | | | | |

El valor que se obtiene para P es ≤ 0.05 , entonces si hay diferencia estadística significativa

Réplica 3

| Réplicas | T1 | T2 | T3 |
|----------|--------|--------|--------|
| R1 | 0.0067 | 0.0012 | 0.0006 |
| R2 | 0.0015 | 0.0010 | 0.0006 |
| R3 | 0.0015 | 0.0011 | 0.0010 |

RESUMEN

| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
|--------|--------|--------|------------|------------|
| T 1 | 3 | 0.0097 | 0.00323333 | 9.0133E-06 |
| T 2 | 3 | 0.0033 | 0.0011 | 1E-08 |
| T 3 | 3 | 0.0022 | 0.00073333 | 5.3333E-08 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-----------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 1.0936E-05 | 2 | 5.4678E-06 | 1.8071979 | 0.2430455 | 5.1432528 |
| Dentro de los grupos | 1.8153E-05 | 6 | 3.0256E-06 | 4 | 9 | 5 |
| Total | 2.9089E-05 | 8 | | | | |

El valor que se obtiene para P es ≤ 0.05 , entonces si hay diferencia estadística significativa.

5.7 Modelo matemático

```

sum = 0.05; h = 1;
ka = 4.2; g/L;
Yas = 0.082; g/g;
su = sum * s[t] / (ka + s[t]);
qs = su / Yas;
b = NDSolve[{x'[t] == su * x[t], s'[t] == -qs * s[t], x[0] = 0.01, s[0] = 50}, {x, s}, {t, 0, 800}]

```

```

Plot[Evaluate[{x[t], s[t]} /. b], {t, 0, 800}, PlotRange -> All, Frame -> True, PlotStyle -> {Pink, Green}, FrameLabel -> {"t(h)", {"x, s(g/L)"}}]

```

5.8 Panel fotográfico



Peso de láminas de LDPE
Fuente: Elaboración propia



Elaboración de reactivo de Bradford
Fuente: Elaboración propia



Determinación de proteínas
Fuente: Elaboración propia



Aspergillus niger adherido a las láminas de LDPE
Fuente: Elaboración propia



Determinación de proteínas
Fuente: Elaboración propia

| Sample name | 595.0nm |
|-------------|---------|
| Sample-1 | 0.5510 |
| Sample-2 | 0.2270 |
| Sample-3 | 0.2050 |
| Sample-4 | 0.4550 |
| Sample-5 | 0.2981 |
| Sample-6 | 0.2641 |
| Sample-7 | 0.4132 |
| Sample-8 | 0.3545 |
| Sample-9 | 0.1840 |
| Sample-10 | |
| Sample-11 | |

Determinación de proteínas, en espectrofotómetro a 595 nm
Fuente: Elaboración propia



Dodecilsulfato de sodio (SDS)
Fuente: Elaboración propia



Observación de láminas de LDPE en microscopio a 40X
Fuente: Elaboración propia

| | | |
|----|--|------|
| 10 | docplayer.es Fuente de Internet | 1 % |
| 11 | repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet | 1 % |
| 12 | rinacional.tecnm.mx Fuente de Internet | <1 % |
| 13 | repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet | <1 % |
| 14 | www.scielo.org.co Fuente de Internet | <1 % |
| 15 | Submitted to Corporación Universitaria del Caribe Trabajo del estudiante | <1 % |
| 16 | link.springer.com Fuente de Internet | <1 % |
| 17 | es.scribd.com Fuente de Internet | <1 % |
| 18 | dspace.esPOCH.edu.ec Fuente de Internet | <1 % |
| 19 | repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet | <1 % |
| 20 | www.forosecuador.ec Fuente de Internet | <1 % |
| 21 | Submitted to Universidad Cesar Vallejo | |

Trabajo del estudiante

<1 %

22

www.coursehero.com

Fuente de Internet

<1 %

23

buleria.unileon.es

Fuente de Internet

<1 %

24

Submitted to Universitat Politècnica de València

Trabajo del estudiante

<1 %

25

patents.google.com

Fuente de Internet

<1 %

26

repositorio.unal.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

27

es.slideshare.net

Fuente de Internet

<1 %

28

www.actaodontologica.com

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo