

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES**

*Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“BIODEGRADACIÓN DE PARTÍCULAS DE MICROPLÁSTICO
DE POLIETILENO A PARTIR DE UN CONSORCIO
MICROBIANO AISLADO DEL CONTENIDO INTESTINAL DE LA
LARVA *Galleria mellonella* L”**

AUTORA:

ANABEL CRISTINA CRESPO SÁNCHEZ

TUTORA:

DRA. MYRIAM XIMENA MANCHENO CÁRDENAS

CUENCA - ECUADOR

2021

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Anabel Cristina Crespo Sánchez con documento de identificación N° 0301999785, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“BIODEGRADACIÓN DE PARTÍCULAS DE MICROPLÁSTICO DE POLIETILENO A PARTIR DE UN CONSORCIO MICROBIANO AISLADO DEL CONTENIDO INTESTINAL DE LA LARVA *Galleria mellonella* L”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, abril del 2021.



Anabel Cristina Crespo Sánchez.

C.I. 0301999785

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“BIODEGRADACIÓN DE PARTÍCULAS DE MICROPLÁSTICO DE POLIETILENO A PARTIR DE UN CONSORCIO MICROBIANO AISLADO DEL CONTENIDO INTESTINAL DE LA LARVA *Galleria mellonella* L”**, realizado por Anabel Cristina Crespo Sánchez, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, abril del 2021.



Dra. Myriam Mancheno Cárdenas

C.I. 0602018160

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Anabel Cristina Crespo Sánchez con documento de identificación N° 0301999785, autora del trabajo de titulación: **“BIODEGRADACIÓN DE PARTÍCULAS DE MICROPLÁSTICO DE POLIETILENO A PARTIR DE UN CONSORCIO MICROBIANO AISLADO DEL CONTENIDO INTESTINAL DE LA LARVA *Galleria mellonella* L”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría

Cuenca, abril del 2021.



Anabel Cristina Crespo Sánchez.

C.I. 0301999785

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	VI
DEDICATORIA	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN.....	X
ANTECEDENTES DEL PROBLEMA DE ESTUDIO	XII
JUSTIFICACIÓN	XIV
OBJETIVOS	XV
CAPÍTULO 1.....	- 1 -
1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	- 1 -
1.1. Antecedentes investigativos.....	- 1 -
1.2. Conceptos.....	- 7 -
Síntesis del polietileno.....	- 7 -
1.3. Problema Ambiental del Polietileno.....	- 8 -
1.4. Degradación del Polietileno de alta y baja densidad.....	- 8 -
1.5. Degradación Catalítica.....	- 9 -
1.6. Degradación fotolítica.....	- 9 -
1.7. Degradación microbiana de PE.....	- 9 -
1.8. Fases en la degradación del plástico por microorganismos.....	- 11 -
1.9. <i>Galleria mellonella</i> L.....	- 11 -
1.9.1. Ciclo de vida:.....	- 12 -
1.10. <i>Galleria mellonella</i> L. en la degradación de polietileno.....	- 13 -
CAPÍTULO 2.....	- 14 -
2. MATERIALES Y MÉTODOS	- 14 -
2.1. Nivel de investigación.....	- 14 -
2.2. Diseño de investigación.....	- 14 -
2.3. Población y muestra.....	- 14 -
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:.....	- 15 -
2.5. Obtención y selección de las larvas de <i>Galleria Mellonella</i> L.....	- 15 -
2.6. Elaboración de los medios de cultivo.....	- 15 -
2.7. Obtención de las Microesferas de Polietileno (PE).....	- 16 -
2.8. Aclimatación de los medios de cultivo.....	- 16 -
2.9. Test de biodegradación.....	- 17 -
2.10. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	- 18 -

CAPÍTULO 3.....	- 19 -
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 19 -
3.1. Observación del proceso de aclimatación.....	- 19 -
3.2. Observación del test de degradación.....	- 19 -
3.3. Análisis mediante Espectroscopia – Infrarroja.....	- 20 -
3.4. Análisis estadístico de la diferencia de masa.....	- 25 -
3.5. Análisis por microscopía electrónica de barrido.....	- 27 -
CAPÍTULO 4.....	- 32 -
4. CONCLUSIONES.....	- 32 -
CAPÍTULO 5.....	- 34 -
5. RECOMENDACIONES.....	- 34 -
REFERENCIAS.....	- 35 -
ANEXOS.....	- 41 -
6. ANEXOS.....	- 41 -
6.1. ANEXO A: REGISTRO FOTOGRÁFICO.....	- 41 -
6.1.1. Cultivo de larvas del lepidóptero <i>Galleria mellonella</i> L.....	- 41 -
6.1.2. Triturado y tamizado del PE de alta y baja densidad.....	- 42 -
6.1.3. Periodo de aclimatación.....	- 42 -
6.1.4. Placas del test de biodegradación 40 días después de iniciada la prueba.....	- 43 -
6.1.5. Peso de las partículas de PE.....	- 45 -
6.2. ANEXO B: GLOSARIO.....	- 48 -
6.3. ANEXO C: REGISTROS SEMANALES DE OBSERVACIONES.....	- 50 -
6.3.1. ANEXO C.1: REGISTRO DEL PERIODO DE ACLIMATACIÓN.....	- 50 -
6.3.1. ANEXO C.2: REGISTRO DE TEST DE BIODEGRADACIÓN.....	- 51 -

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por ser guía de mis actividades a lo largo de toda mi vida.

A mis padres que me han apoyado y enseñado desde mis primeros años.

A mi hermano, quien siempre me dado una mano y lo admiro mucho.

A los docentes desde mi educación primaria hasta universitaria quienes han influido positivamente en mí, pero de manera especial a la Dra. Myriam Mancheno, mi tutora de tesis quien me apoyo a lo largo de este proceso, a la Dra. Inés Malo quien representó para mí una inspiración, al Dr. Pablo Arévalo quien nos apoyó en el desarrollo personal y en todas las actividades extracurriculares, al Ing. Jhison Romero que me enseñó el valor de perfeccionar los trabajos a detalle, a la Dra. Silvia Torres quien hizo de las clases un ambiente muy divertido para mí, y a todos los docentes que hacen parte de la carrera de Biotecnología.

A todos mis compañeros de clase que me acompañaron en este camino.

Anabel Cristina Crespo Sánchez.

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres, hermano, docentes y amigos.

Anabel Cristina Crespo Sánchez.

RESUMEN

La producción actual de plástico se encuentra en alrededor del 150 millones de toneladas; en condiciones naturales la degradación de estos productos es lenta, por lo que se ha convertido en un serio problema ambiental (Zhang et al., 2019), por lo que se busca nuevas estrategias para poder reducir la presencia de este polímero, entre las que se encuentra la biodegradación por microorganismo. El presente trabajo tiene como objetivo verificar la capacidad degradadora de la microbiota de la larva *Galleria mellonella* L. en polietileno de alta y baja densidad, mediante pruebas *in vitro* que incluyen análisis en placa y su evaluación post tratamientos con FT-IR, pesado y comparación con un blanco y microscopía electrónica de barrido para análisis de las superficie de las perlas de polietileno. Se obtuvo como resultado un cambio ligero en la estructura química del polímero de alta densidad con la liberación de subproductos en el medio de cultivo y una disminución de masa, para el caso del polietileno baja densidad no se reportó cambios ni liberación de grupos funcionales, sin embargo, se ha llegado a la conclusión de que esta podría una estrategia para reducir el plástico en los ecosistemas, específicamente las partículas de microplástico de alta densidad.

Palabras clave: biodegradación, polietileno de alta y baja densidad, *Galleria mellonella* L.

ABSTRACT

The current plastic production is around 150 million tons; Under natural conditions, the degradation of these products is slow, which is why it has become a serious environmental problem (Zhang et al., 2019), so new strategies are sought to reduce the presence of this polymer, among which is biodegradation by microorganisms. The present work aims to verify the degrading capacity of the microbiota of the *Galleria mellonella* L. larva in high and low density polyethylene, through *in vitro* tests that include plate analysis and its evaluation after treatments with FT-IR, weighing and comparison. with a blank and scanning electron microscopy for analysis of the surfaces of polyethylene beads. As a result, a slight change in the chemical structure of the high-density polymer was obtained with the release of by-products in the culture medium and a decrease in mass, for the case of low-density polyethylene, no changes or release of functional groups were reported, without However, it has been concluded that this could be a strategy to reduce plastic in ecosystems, specifically high-density microplastic particles.

Keywords: biodegradation, high and low density polyethylene, *Galleria mellonella* L.

INTRODUCCIÓN

El plástico es un polímero derivado del petróleo, que puede ser combinado con una serie de aditivos para darles ciertas características especiales; entre los plásticos más usados encontramos el polietileno de alta y baja densidad (Rojo-Nieto, 2017).

Los productos plásticos son comúnmente utilizados en la vida cotidiana de los seres humanos, como por ejemplo en la agricultura, empaques industriales, etc; Su extendido uso se debe a su bajo costo, fuerza y durabilidad, por lo que su consumo incrementa año a año, y la producción actual se encuentra en alrededor del 150 millones de toneladas; en condiciones naturales la degradación de estos productos es lenta, por lo que se ha convertido en un serio problema ambiental (Zhang et al., 2019). En este sentido se considera microplástico a los que sus dimensiones sean inferiores a cinco milímetros, y se los puede clasificar en microplásticos primarios y secundarios; los primarios son aquellos que son vertidos directamente al ambiente como pequeñísimas partículas y los secundarios se refieren a aquellos que surgen de la degradación de grandes objetos plásticos como bolsas, botellas, etc; debido a su pequeño tamaño estos pueden ser ingeridos por seres vivos, bioacumulándose en los mismos, y pasando a través de las cadenas tróficas (Parlamento Europeo, 2018).

Entre los métodos que se aplican en la disposición de estos polímeros podemos encontrar el quemado, degradación química, entierro en vertederos y son arrojados al mar; este último método ha causado que exista un aproximado de hasta 51.000 millones de partículas microplásticas en el mar (Zhang et al., 2019).

La degradación biológica o biodegradación es el proceso mediante el cual una sustancia es degradada por organismos vivos, comprendiendo como degradación al proceso de

conversión de un compuesto a fragmentos más pequeños; lo ideal es lograr que el compuesto sea reducido a una sustancia orgánica capaz de incorporarse a los ciclos naturales (Plastivida Argentina, 1998). Para esto hace uso de microorganismos como bacterias y hongos que ocupan al polietileno como fuente de carbono (Zhang et al., 2019).

Para el presente estudio se plantea una degradación biológica de polietileno con un consorcio bacteriano aislado del contenido intestinal de la larva *Galleria mellonella* L., misma que ha reportado la biodegradación más rápida de este polímero, y debido a que comúnmente los procesos digestivos de los organismos superiores están relacionados a su microbiota intestinal, es importante comprobar si los mismos son los responsables de esta capacidad degradativa (Bombelli, 2017).

ANTECEDENTES DEL PROBLEMA DE ESTUDIO

De acuerdo al informe emitido por Plastics Europe (2018), indica que la industria plástica europea tenía una balanza comercial de más de 17 mil millones de euros y la producción mundial de plástico alcanzó los 350 millones de toneladas en el año 2017; de este total China es el mayor productor de plásticos, seguido de Europa y NAFTA (North American Free Trade Agreement).

Actualmente la humanidad se encuentra sin la posibilidad de enfrentar la excesiva cantidad residuos de plástico que se produce cada año, debido a que solamente una pequeña fracción es reciclada y aproximadamente 13 millones de toneladas de plástico llegan a los océanos cada año, dañando la biodiversidad, las economías y la salud del hombre (ONU, 2018).

Una vez los objetos de plástico llegan al mar pueden ser ingeridos por la fauna marina y acumularse en su interior, pueden quedarse en suspensión o flotando en la superficie, pueden finalmente hundirse y permanecer en el fondo marino, o incluso pueden quedar atrapados en el hielo del Ártico; los plásticos que encontramos en superficie solo son la punta de iceberg, ya que representan menos del 15% de todos los plásticos que hay en el mar (Greenpeace, 2015).

Ecuador no es ajeno a la presencia de plásticos en sus aguas, afecta de manera especial a zonas sensibles como lo es el archipiélago de Galápagos, donde toda esa contaminación amenaza a las especies del lugar así como representa una amenaza para los residentes que dependen de los recursos marinos para su sustento (ONU, 2018). Debido a que los procesos de degradación del plástico son extremadamente lentos, poniendo de relieve la elevada persistencia de estos materiales en el medio ambiente, el plástico se desintegra en

micropartículas que son imposibles de recolectar, de modo que es inevitable su entrada en la cadena alimenticia (Greenpeace, 2015).

Por lo tanto surge la necesidad de reducir la presencia de partículas de micro plástico presente en los ecosistemas acuáticos.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, los plásticos son el producto más conocido y por ende el más utilizado generalmente en la industria e incluso en la vida diaria, son productos que cuentan con una limitada capacidad de degradación, y en consecuencia cada residuo plástico generado y convertido en desecho es considerado uno de los contaminantes con mayor escala en suelos y océanos. Según Dirección de Medio Ambiente estima que se genera 2.139 toneladas diarias de basura entre las cuales 130 toneladas corresponden a plásticos (Quintana & Rodríguez, 2010).

En el Ecuador el Ministerio del Ambiente (MAE) es el encargado de analizar la producción y la situación actual de nuestras aguas, en este sentido se registró cuatro grandes grupos de desechos que se propagan en los cuerpos hídricos del país: botellas de plástico, tarrinas de comida, tapas plásticas de tarrinas y colillas de cigarrillo; la principal zona afectada es el archipiélago de Galápagos, en este lugar los animales ya han sido afectados, entre ellos los pinzones de Darwin que hacen sus nidos con el polímero de petróleo o las tortugas que lo ingieren como alimento (Noroña, 2018).

Los procesos de degradación química pueden prolongarse por varios meses, además de que es necesario emplear líquidos corrosivos como el ácido nítrico (Pescador, 2013).

Por lo tanto, es indispensable buscar estrategias que permitan limpiar el ambiente de la contaminación por plásticos, y la biodegradación se ha vuelto una opción prometedora, existiendo estudios de hongos y bacterias capaces de utilizar este deshecho como única fuente de carbono (Zhang et al., 2019).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el porcentaje de biodegradación de partículas de microplástico de polietileno (PE MPP) de alta y baja densidad mediante el uso de un consorcio microbiano aislado a partir del contenido intestinal de la larva *Galleria mellonella* L. para una posible aplicación en reducción de PE MPP en ambientes acuático.

Objetivos Específicos

- Obtener el consorcio microbiano de los intestinos de la larva *Galleria mellonella* L mediante un proceso de aclimatación de las larvas, disección y cultivo para el uso de su microbiota como cepas degradadoras.
- Verificar la capacidad degradadora del consorcio microbiano mediante el monitoreo en un periodo de 30 días en placas que usan como fuente única de carbono PE MPP para la determinación del porcentaje de biodegradación.
- Determinar la biodegradación del PE MPP mediante el uso de FT-IR, para caracterización de los grupos funcionales y microscopía óptica para el análisis del cambio en la superficie de las partículas.
- Interpretar los datos obtenidos mediante una prueba estadística para la emisión de resultados y de un informe.
- Elaborar una propuesta de artículo científico respetando los formatos internacionales para la posible divulgación de los resultados obtenidos.

CAPÍTULO 1

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. Antecedentes investigativos.

La contaminación del plástico, específicamente del polietileno, en el ecosistema marino está en un estado alarmante, porque estos son omnipresentes dentro del entorno natural teniendo efectos nocivos sobre la biota marina y terrestre, transfiriéndose así a lo largo de la cadena trófica y suponiendo entonces un tema de importante preocupación (Chatterjee & Sharma, 2019).

En un artículo publicado por Van Cauwenberghe et al., (2015) “Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects”; señala la necesidad de entender la dinámica de colonización y la composición taxonómica de los microorganismos marinos que se hallan asociados con los plásticos poder llegar a la comprensión de las consecuencias ecológicas y económicas evaluando como este polímero se integra a la cadena trófica e influye en la salud humana.

Por ello Chatterjee & Sharma (2019) en su artículo “Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review”; exponen que es de relevante importancia que la sociedad tome conciencia respecto a la contaminación producida por microplásticos, para fomentar la reducción en el consumo del mismo, esto lo hace acentuando los efectos nocivos de la contaminación, muchos de los cuales son aún ignorados por la población.

Es así que para poder abordar el tema de la biodegradación de partículas de microplástico de polietileno, es indispensable condensar información relevante de estudios previos, como se expone a continuación:

Patel et al., (2017) en su artículo “Biodegradation of LDPE with Mixed Consortium in presence of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION) as the Enhancer for Biodegradation by Accelerating Growth Profiling of Microbes”: recalcan la capacidad del óxido de hierro súper paramagnético (SPION) para aumentar la tasa de degradación de LPDE actuando sinérgicamente con un consorcio microbiano, alcanzando la degradación máxima en un periodo de 50 días.

Kunlere et al., (2019) presentan “Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by certain indigenous bacteria and fungi” presentan aislados bacterianos y fúngicos como *Pseudomonas sp.* MMP1, *Acinetobacter sp.* MGP1, *Bacillus sp.* MMP10, *Bacillus sp.* MGP1, *Staphylococcus sp.* MMP10, *Bacillus sp.* MGP1 y *Aspergillus flavus* MCP5 que son capaces de emplear el LDPE como fuente de energía y por lo tanto someterlo a procesos de biodegradación, esto lo hacen con o sin presencia de una fuente de carbono secundaria.

Además R. Torres & Macol, (2018) abordan el tema de tesis “Eficiencia del homogenizado proveniente del tracto digestivo de la *Galleria mellonella* L. en la biodegradación de dos tipos de polietileno de baja densidad, lima – 2018 “ y logran demostrar su hipótesis, la cual plantea que homogenizado proveniente del tracto digestivo de *Galleria mellonella* L. tiene eficiencia en la biodegradación del polietileno de baja densidad, obteniendo como resultados en una eficiencia del 17.49% correspondiente al aplicar 10 mL de homogeneizado.

Otros como Vertus et al., (2017) presentan su artículo “Biodegradación bacteriana de polietileno y propuesta de aplicación para Cerro Patacón”: mediante el cual dan a conocer recopilaciones de investigaciones en torno a la biodegradación bacteriana de polietileno y su

efectividad en la lucha con la disposición de los plásticos a través de bacterias como *Pseudomonas*, *Streptomyces sp.*, *Brevibacillus borstelensis*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus cerus*, *Serratia marscence*, *Rhodococcus ruber*.

Vargas (2013) en su tesis “Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina”: realiza un test de degradación de 35 días con *hummus* de caballo, al finalizar este tiempo se verificó una biodegradación de un 10,89% de polietileno tereftalato, siendo este el valor máximo alcanzado entre los tres humus; respecto al porcentaje de biodegradación del oxopolietileno, este se degradó en un 39,99% empleando *hummus* de lombriz, siendo el que mayor diferencia muestra respecto a los otros dos tratamientos

Vimala & Mathew (2016), en su estudio “Biodegradation of Polyethylene using *Bacillus subtilis*” hizo uso de la luz UV como tratamiento físico a los polímeros de PE y para posterior test de degradación, y descubrieron la mejora de la capacidad de los microbios para asimilar películas de PE; además, las películas de PE (18u) inoculadas con *Bacillus subtilis* con la adición de un biosurfactante obtuvo un porcentaje de pérdida de peso de 9.26% en 30 días.

Jamil et al. (2017) descubrieron que bacterias aisladas de una cueva de piedra caliza tienen cierta capacidad de biodegradar este polímero sintético, esto se demostró mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopia infrarroja, y se reveló cambios en la estructura del polietileno LDPE y presencia de grupos funcionales en las muestras tratadas en comparación con el grupo control, todo este proceso está detallado en “biodegradation of polyethylene by bacterial strains isolated from kashmir cave, buner, pakistan”:

Kumar & Raut (2015), en su revisión “Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review” concluye:

“Existe un gran potencial para el desarrollo de un proceso para degradar el LDPE en un entorno de compostaje utilizando hongos en el futuro cercano. También que la caracterización de genes responsables de la producción de enzimas degradantes y su regulación mediante el uso de herramientas de ingeniería genética, uno puede modificar genéticamente los microorganismos y usarlos como una súper bacteria para degradar los LDPE recalcitrantes (Kumar & Raut ,2015).” Kumar & Raut (2015).

Yepes (2014) con su tesis “Degradación de Polietileno de Baja Densidad Utilizando Hongos. Revisión Sistemática de la Literatura” da a conocer diferentes métodos y técnicas en la degradación de LDPE a través de hongos del género *Aspergillus*, y concluye que este género es el dominante y predilecto para este proceso, para este estudio se emplea medios líquidos o residuos sólidos.

Según un estudio realizado por Figueroa & Correa (2015) titulado “Degradabilidad de polietileno de baja densidad –LDPE- utilizando *Pycnoporus sanguineus* UTCH 03” destaca que bajo condiciones de laboratorio, el hongo *Pycnoporus sanguineus* UTCH03 se adapta a un sustrato con sorgo y LDPE, siendo capaz de desarrollar de hifas y esporas como proceso biológico natural de colonización de la superficie del sustrato.

Además Gajendiran et al. (2016) señala que la presencia de LDPE en el ambiente es una amenaza grave a los ecosistemas, y encontraron al hongo *A. clavatus* como un potencial candidato para realizar la biodegradación de LDPE debido a que en el estudio *in vitro* luego de

90 días se percibió un 35% de pérdida de peso seco de la masa de LDPE, toda esta información se encuentra resumida en “Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil

Paço et al. (2017) expuso en “Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*” el alto potencial de *Z. maritimum* para responder a la necesidad urgente de reducir la presencia de LDPE como microplásticos en los ecosistemas acuáticos mediante procesos de biodegradación, específicamente en los océanos y mares, obteniendo como resultado una tasa de eliminación del 43%.

En el estudio de Sangale et al. (2019) de los 109 aislamientos fúngicos encontró que las cepas de *Aspergillus terreus* y *Aspergillus sydowii* son los hongos predilectos que poseen la capacidad deteriorante de polietileno más eficiente, para este estudio se analiza la reducción de peso, resistencia a la tracción, análisis SEM y FTIR.

De igual manera Verma & Gupta (2019) demuestra la biodegradación de la película de LDPE por especies de *Aspergillus* aisladas de vertederos de Agra; es así que de los 18 hongos aislados, solo dos pudieron mostrar una tasa de crecimiento alta si se lo compara con el resto de aislados, se identificó *A. flavus* y *A. terreus* como los responsables de este proceso, para la identificación de estos se empleó mecanismos moleculares.

Zhang et al., (2020) Aporta con el tema “Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*” en su estudio, una cepa fúngica, *Aspergillus flavus* PEDX3, que se aisló como microorganismos potenciales degradantes de PE del contenido intestinal de las larvas de *G. mellonella*; de los

veinticinco aislamientos, la cepa de *A. flavus* fue la cepa degradante de PE más eficiente que puede degradar tanto el LDPE como el HDPE.

Considerando la magnitud de artículos o investigaciones que toman en consideración el problema presente del uso excesivo de partículas microplásticas de polietileno procedo a citar varias fuentes desde las cuales se puede tomar como referencia para un análisis más profundo de soluciones alternativas.

Muhonja et al., (2018) “Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya”

Uribe et al., (2011) “Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú”

Shalini & Sasikumar, (2015) “Biodegradation of Low-Density Polythene Materials Using Microbial Consortium – An Overview”

Begum et al., (2015) “Biodegradation of Polythene Bag using Bacteria Isolated from Soil”

Gonzalez, (2019) “Capacidad Biodegradativa de Hongos Filamentosos Frente al Polietileno”

Sáenz De Juano Arbona, (2006) “Contribución al estudio de la degradación ambiental de poliolefinas fotoestabilizadas.”

Ojha et al., (2017) “Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization”

Hussein et al., (2015) “Optimum Conditions for LDPE Strips Biodegradation by Local Bacterial Isolates”

Bombelli et al., (2017) “Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*”

Kong et al., (2019) “The *Galleria mellonella* Hologenome Supports Microbiota-Independent Metabolism of Long-Chain Hydrocarbon Beeswax”

1.2. Conceptos.

Síntesis del polietileno.

Las dos primeras síntesis del Polietileno (PE) ocurrieron de manera fortuita; la primera persona que pudo obtenerlo fue el científico alemán Hans von Pechmann en 1898 cuando obtuvo una cera blanca trabajando en la descomposición del diazometano en éter; años después se lo llamó polietileno al descubrir que este compuesto estaba formado por muchos grupos metilos, Eugen Bamberger y Friedrich Tschirner fueron quienes descubrieron estas cualidades (Packsys,2012); en 1933 los siguientes individuos en sintetizar PE fueron de nacionalidad británica, Erich W. Fawcett y Reginald, ellos investigaban el efecto de las presiones altas (intervalo entre 1000 a 2000 atmosferas) en el etileno, una de las reacciones que emplearon fue con el uso de benzaldehído y etileno, a una presión de 1960 atm a 170°C, obteniendo una sustancia sólida grasosa, la cual fue identificada meses después como PE con un peso molecular de 3700 Da; este resultado fue muy difícil de reproducir por Fawcett y Gibson por lo que esta ruta investigación fue cancelada meses después por la Industria Química Imperial (ICI) en la cual trabajaban, debido a la falta de medidas de seguridad durante el proceso de síntesis (Brunella, 2010).

1.3. Problema Ambiental del Polietileno.

La Agencia de Protección Ambiental en Estados Unidos (EPA) informa que, en el mundo, cada persona usa seis bolsas de polietileno por semana, 24 al mes y 288 al año, y el plástico genera amenazas físicas y químicas, y si bien existen manchas en los ecosistemas que son los que más polémica generan, también son de vital importancia los bloques pequeños de polietileno, y el problema surge que a diferencia otros residuos antropocéntricos, es que los polímeros de PE persisten en el medio ambiente conservando la biodisponibilidad, con el tiempo se fraccionan en partículas más pequeñas pero químicamente no se generan otros productos secundarios (EPA, 2017). Datos del IFAW y de Greenpeace señalan que cada persona usa la bolsa de plástico un promedio de 12 minutos y sólo el 1% se recicla. Cuando se termina la vida útil del plástico, es desechado. Estos desechos de PE no se descomponen en vertederos de basura o en la naturaleza, causando un problema ambiental serio debido a que ocupan un gran espacio (Greenpeace, 2015). Además, de poner en riesgo la vida de 260 animales marinos que podrían comerse los desechos de polietileno o enredarse sus cuellos con ellos (Alcantára, 2009).

1.4. Degradación del Polietileno de alta y baja densidad.

Las cadenas de polietileno se atraen entre sí por fuerzas intermoleculares tipo London, que hacen al PE una molécula simple y no polar, lo cual lo hace ser, un polímero muy estable en la naturaleza (Suasnavas, 2017). Existen diversas técnicas para provocar la degradación química del PE, entre las que destacan la pirólisis, oxidación y degradación catalítica (Posada, 1994). Algunas de las investigaciones usando esta metodología son las siguientes: Howard, (2001) se adentró en la degradación de HDPE al emplear un horno a 700 °C, lo que indujo una

descomposición bastante acelerada, generando como subproductos a gases y a compuestos sólidos, encontrándose alcanos y alquenos lineales.

De acuerdo a Mastral (2006) la temperatura y el tiempo de exposición del plástico al calor tienen una influencia importante sobre la pirólisis del polietileno de alta densidad, para este estudio se empleó un reactor denominado de caída libre en serie, arrojando como resultado que la eficiencia de la degradación aumenta en función de la temperatura, específicamente a temperatura mayor a 800°C y cuando se incrementa el tiempo de exposición se generan más compuestos aromáticos.

1.5. Degradación Catalítica.

Consiste, como su nombre lo indica, en acelerar la degradación de las partículas de PE mediante catalizadores, en este sentido, Murata (2009) investigó el papel de la sílica-alumina como catalizador respecto a la degradación térmica de PE empleando una temperatura de 420 °C, y sus resultados fueron la generación de hidrocarburos con menos de cuatro carbonos. Manos (2015) emplea a las zeolitas como material catalizador, y este obtuvo principalmente alcanos de entre tres y 15 carbonos.

1.6. Degradación fotolítica.

Cuando un polímero es sometido a radiación UV se generan una gran cantidad de radicales libres, que reaccionan con el oxígeno y se generan reacciones de auto oxidación (Posada, 1994).

1.7. Degradación microbiana de PE.

Ramírez et al. (2010) señala que hasta hace no mucho tiempo se pensaba que los plásticos no eran susceptibles a biodegradación microbiana, sus características sugerían que eran inertes y resistentes a dicho ataque, pero en las últimas décadas los estudios sobre degradación microbiana han incrementado y se han identificado ciertas especies que poseen estas cualidades, las mismas que van a variar en función de factores propios del microorganismo como especie, factores ambientales como pH, temperatura, disponibilidad de minerales y fuente carbono, concentración de sales, agua, humedad y el tipo de plástico; de cualquier modo el tiempo que tarda en degradarse el polímero es largo, y progresivamente un microorganismo desarrolla la capacidad de alimentarse de diferentes fuentes de carbono como sustrato.

Lynd (2001) expone que el proceso de biodegradación potencialmente puede generar daño de tipo mecánico sobre los componentes del plástico porque los microorganismos crecen en la superficie del plástico y las enzimas y subproductos de su metabolismo como enzimas pueden llegar a cambiar el pH o las condiciones redox, afectando al polímero.

Entre ejemplos destacables que poseen las características de degradación de PE encontramos bacterias aerobias y anaerobias (actinobacterias), *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Halobacter*, *Natranobacter*, *Halococcus*, *Natranomonas* y *Clostridium*, y hongos (Gillow J, 2003)

Ramírez et al. (2010) recopila información sobre microorganismos degradadores de PE que se hallan resumidos en la tabla 2.

Tabla 2. Microorganismos degradadores de diferentes polímeros sintéticos

Plástico	Microorganismo degradador
Poliiolefinas	Bacterias: <i>Streptomyces spp</i> , <i>Brevibacillus borstelensis</i> . Hongos: <i>Mucor rouxi</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Thermomonospora fusca</i> .
Poliéster	Hongos: <i>Trichosporum</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Thermomonospora fusca</i> .
Poliuretano	Hongos: <i>Curvularia Senegalensis</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Cladosporium sp</i> , <i>Camomonas acidovorans</i> , <i>Pseudomonas chiororaphis</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> . Bacterias: <i>Alicyclophilus sp</i> .
Polietilenglicol.	Bacterias: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pelobacter venetianus</i> , <i>Baceroides</i> .

Fuente: (Ramírez, et al. 2010).

1.8. Fases en la degradación del plástico por microorganismos.

El proceso de biodegradación de estos polímeros inicia en la biodeterioración e implica la acción de los consorcios microbianos sobre la superficie del plástico teniendo como consecuencia procesos de deterioro y desgaste, cambiando sus propiedades físicas, químicas y mecánicas; posteriormente viene la etapa de biofragmentación, donde los polímeros pasan a compuestos más sencillos como oligómeros, dímeros e incluso monómeros por acción sustancias secretadas por los microorganismos; el penúltimo paso es la asimilación, que implica la integración de los compuestos derivados del plástico al metabolismo celular del microorganismo y finalmente la mineralización que implica el proceso de excreción de metabolitos completamente oxidados, como nitrógeno molecular, dióxido de carbono y agua (Dussud et al., 2014).

1.9. *Galleria mellonella* L.

La especie *Galleria mellonella* L. son comúnmente llamadas polillas, mariposas nocturnas, de hábito nocturno pertenecen al Lepidóptera y familia Pyralide, y en el estado de larva, usualmente vive como parásito de los panales de las abejas (Elías et al., 2008).

Taxonomía de la larva *Galleria mellonella* L (Zurovec. & Sehnal, 2002).

- Dominio: *Eukaryota*.
- Reino: *Metazoa*.
- Super Filum: *Ecdysozoa*.
- Filum: *Arthropoda*.
- Subfilum: *Hexapoda*.
- Clase: *Insecta*.
- Subclase: *Pterygota*.
- Infraclase: *Neoptera; Holometabola*;
- Orden: *Lepidoptera*.
- Suborden: *Glossata. Ditrysia*.
- Superfamilia: *Pyraloidea*.
- Familia: *Pyralidae*.
- Subfamilia: *Galleriinae*;
- Especie: *Galleria mellonella*.

1.9.1. Ciclo de vida:

Una vez que las hembras son fecundadas están realizan la puesta en fisuras de colmenas o cualquier otra zona que no se encuentre protegida por las abejas; se producen aproximadamente de 400 a 1800 huevos, en grupos de cinco a 30, tardando de ocho a diez días

en eclosionar si la temperatura es óptima, (aprox. 30 -32°C) y los daños son ocasionados por las larvas de esta polilla, quienes se alimentan de la cera, miel y ensucian los panales (Elías et al., 2008).

1.10. *Galleria mellonella* L. en la degradación de polietileno.

En el año 2017 Paolo Bombelli, Christopher J. Howe y Federica Bertocchini realizaron un estudio sobre la biodegradación de polietileno con larvas del gusano de cera (*Galleria mellonella* L.) donde se reportó una rápida biodegradación de polietileno, de 2.2 ± 1.2 de agujeros por larva en bolsas comunes de polietileno luego de la exposición directa a la larva durante 40 minutos; los exámenes gravimétricos indicaron una pérdida del 13% de la masa total luego de 14 horas, que corresponde a un rango de $0,23 \text{ mg/cm}^2 \text{ h}$, además se realizó una prueba de FTIR lo que indicó la presencia de etilenglicol, y mediante cromatografía acoplada a masas (HPLC–MS) se detectaron otros subproductos que hasta el momento no fueron identificados, no obstante, confirmaban la biodegradación y surge la interrogante de saber si la degradación es debida a la microbiota de la larva o a actividad enzimática de la misma (Bombelli et al., 2017).

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se indica el diseño experimental aplicado, identificando las variables cuantitativas y cualitativas para contribuir así a la validez interna del estudio

Se muestra la metodología aplicada y como se desarrolló el experimento, que variables se tomaron en consideración. Además de los instrumentos para recopilar datos empleados, y los equipos necesarios para la culminación de este trabajo.

2.1. Nivel de investigación.

Investigación exploratoria: sobre un tema u objeto desconocido o poco estudiado, por lo que sus resultados constituyen una visión aproximada de dicho objeto, esto sirve para familiarizar al investigador con un objeto que hasta el momento le era totalmente desconocido, se utiliza como base para la posterior realización de una investigación descriptiva, puede crear en otros investigadores el interés por el estudio de un nuevo tema o problema.

2.2. Diseño de investigación.

Diseño experimental: diseño pretest-posttest con dos grupos equivalentes.

2.3. Población y muestra.

Población: Polietileno de alta y baja densidad.

Muestra: macropartículas de polietileno.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

Tabla 2: Instrumentos de recolección de datos.

Fuente: Elaboración propia

Técnica	Instrumento
Observación	Estructurada: diario.
	No estructurada: uso de cámara fotográfica.
Documental	Fichas Computadora y sus unidades de almacenaje

2.5. Obtención y selección de las larvas de *Galleria Mellonella* L.

Para la obtención de las larvas se recogió una población adulta del lepidóptero *Galleria Mellonella* L. en la parroquia Ricaurte del cantón Cuenca Ecuador, las mismas fueron criadas durante un período de 3 meses a temperatura ambiente (10 – 20° C) con 4 horas diarias de exposición indirecta a la luz, y empleando una mezcla de salvado de trigo, miel, glicerina agua a una proporción 3:2:1, tiempo en el que estas se reprodujeron y dieron lugar a la obtención del estado larvario de *Galleria Mellonella* L. (Anexo A: Galería Fotográfica).

Quince días antes de la selección de las larvas, estas fueron alimentadas añadiendo a la mezcla esferas de polietileno, de este grupo se eligieron 50 larvas de tamaño similar.

2.6. Elaboración de los medios de cultivo.

Se prepara un medio basal que ocupa como única fuente de carbono al polietileno de alta y baja densidad, este medio está compuesto por 0.7 g de KH_2PO_4 , 0.7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g de NH_4NO_3 , 0.005 g de NaCl, 0.002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g de $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2$, y 0.001

g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, todo esto por 1000 mililitros de muestra; el medio que no tiene una fuente de carbono se prepara añadiendo 15 g de agar - agar por cada 1000 mL de medio basal (Ren et al.2019).

Se emplea agar nutritivo como medio nutritivo de cultivo (Uribe et al., 2010).

Se elabora solución salina fisiológica disolviendo 8,5 g de NaCl en 1000 mL de agua des ionizada, ajustando el pH a 7 (Ren et al.2019).

Todos los medios deben ser esterilizados mediante auctoclave a 121°C a 15 libras.

2.7. Obtención de las Microesferas de Polietileno (PE).

Las esferas de polietileno de alta y baja densidad fueron adquiridas de un proveedor local de plástico, estas fueron trituradas y pasadas por un tamiz de 2 mm de diámetro (Anexo A: Galería Fotográfica). Estas esferas sirvieron para la elaboración de los medios de cultivo Basal con PE como única fuente de carbono y el medio sólido con PE como única fuente de carbono, para tal efecto se las lavó con etanol al 70% e irradió con luz UV durante 30 minutos.

2.8. Aclimatación de los medios de cultivo.

Empleando la metodología descrita por Ren et al. (2019), las larvas de *Galleria Mellonella* L. fueron esterilizadas con alcohol al 70% durante 60 segundos, para luego ser trituradas con un mortero, el contenido obtenido se lava con solución salina y es centrifugado con 50 mL de la misma. El líquido obtenido se diluye en disolución 1/100 e incula en el medio basal líquido con PE de alta y baja densidad como única fuente de carbono, el cual debe ser incubado durante 40 días a 30 °C con 200 revoluciones por minuto (rpm) (Anexo A: Galería

Fotográfica). Pasado este tiempo la solución obtenida se inocula por agotamiento en agar nutritivo durante 24 horas, estas colonias son las consideradas las de screening primario.

2.9. Test de biodegradación.

De acuerdo a lo expuesto por Zhang et al. (2019) y a Ren et al. (2019), las colonias del screening primario se vuelven a inocular en el medio líquido basal con PE como única fuente de carbono durante 24 horas, transcurrido este tiempo se procede a centrifugar a 12 rpm y lavar con solución salina, la suspensión obtenida se inocula en el medio basal sólido que emplea PE como única fuente de carbono, se realizaron dos medios basales, uno con PE alta densidad y otro con PE de baja densidad, se incubaron durante 40 días conjuntamente con los dos blancos que también fueron testeados.

Pasado este periodo se procedió a lavar las perlas de PE con alcohol y posteriormente con solución salina sodio dodecil sulfato para eliminar los films del consorcio en la superficie de las perlas de PE, las mismas fueron centrifugadas a 10 000 rpm y secadas a 60 grados°C Se empleó el equipo de espectroscopia infrarroja para identificación de grupos funcionales característicos en comparación con el blanco.

Además se verifica la pérdida de masa de PE en las muestras y se realiza un análisis estadístico y se aplicará la fórmula 1:

Fórmula 1: porcentaje masa.

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\text{masa antes de la incubación} - \text{masa después de la incubación}}{\text{masa antes de la incubación}} \times 100\%$$

Finalmente se analiza la superficie de las partículas de polietileno de alta y baja densidad mediante microscopía electrónica de barrido y se lo compara con los blancos.

2.10. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Según lo expuesto por Vizuite (2021), laboratorista del Taller de Nano materiales de ESPE Innovativa, el tratamiento que se le dio a las perlas de PE de alta y baja densidad consistió en un proceso de metalización con oro en un evaporador de metales pesados debido a que las muestras no son conductoras, las mismas se fijan con una cinta de carbono doble faz y una cinta de plata; se corrieron las cuatro muestras y a cada una se le tomó fotografías para ser sometidas a análisis.

CAPÍTULO 3.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La presente sección contiene la información referente a los análisis realizados en FT-IR, microscopía electrónica de barrido, y análisis de masa. Los resultados tienen un análisis estadístico y evidencia fotográfica.

3.1. Observación del proceso de aclimatación.

Durante el proceso de aclimatación que duró 40 días se pudo visualizar un ligero aumento en la turbidez del medio basal líquido con PE de alta y baja densidad, como única fuente de carbono de polietileno, esto nos permitió verificar que existió un crecimiento de biomasa dentro del caldo, para mayor detalle puede dirigirse al Anexo C: Registros Semanales.

3.2. Observación del test de degradación.

Por 40 días se visualizó el test de degradación, a los tres primeros días no se observó mayor crecimiento, a los siete días se pudo observar el crecimiento de colonias en las muestras que contenían PE de alta y baja densidad, estas tenían un aspecto similar al requesón, a lo largo de tres semanas las colonias se extendieron hasta formar una sola unidad, y esta permaneció sin mayores variaciones hasta el final del test de degradación, mayor información se encuentra en el Anexo C: Registros Semanales, estos resultados coinciden con Ren, et al. (2020), que verifican un aumento de la turbidez y crecimiento en la superficie de las placas analizadas lo que implica la capacidad de los microorganismos presentes en las mismas de poder desarrollarse en ambientes con PE como única fuente de carbono.

3.3. Análisis mediante Espectroscopia – Infrarroja.

El uso de espectroscopia infrarroja permite identificar dos zonas de vital importancia en el estudio de polímeros, la primera es la región de los grupos funcionales que va desde 1200 a 3600 cm^{-1} y la otra es la zona de huella digital, donde los picos para un polímero son invariables a menos que haya sido sometido a algún ataque químico, físico o biológico, esta región comprende desde los 600 a 1200 cm^{-1} (Uribe et al., 2010) es así que en nuestro caso se reportó para la zona de grupos funcionales tres picos importantes para PE de alta densidad que no se encontraron en el blanco respectivo, estos se hallan en la zona de 2300 a 1900, siendo los picos más significativos los de 2159,85 cm^{-1} , 2014,90 cm^{-1} y 1977,54 cm^{-1} , que revelan los grupos funcionales tipo tiocianato alifático, acetileno, alenos, y ceteno como subproductos de un proceso de biodegradación, esto se visualiza en la figura 1, y para la zona de huella digital una variación importante en la región de 1200 – 1000 cm^{-1} si lo comparamos con el blanco, figura 2; así se verifica la presencia de un pico en el rango de 1500 – 1000 cm^{-1} , lo que nos revelaría un estiramiento del grupo C-H, caso que coincide con Ren, et al. (2020) quien indica que la presencia de todos estos grupos funcionales está relacionada con el proceso de biodegradación.

Además se puede observar una reducción y estiramiento de los grupos carbonilos presentes en la muestra, que Espinoza (2018) señala como el indicador más importante de biodegradación. Se muestra también la presencia de alcanos de 3 a 15 carbonos como lo señala Manos (2015) que son subproductos de los procesos de biodegradación.

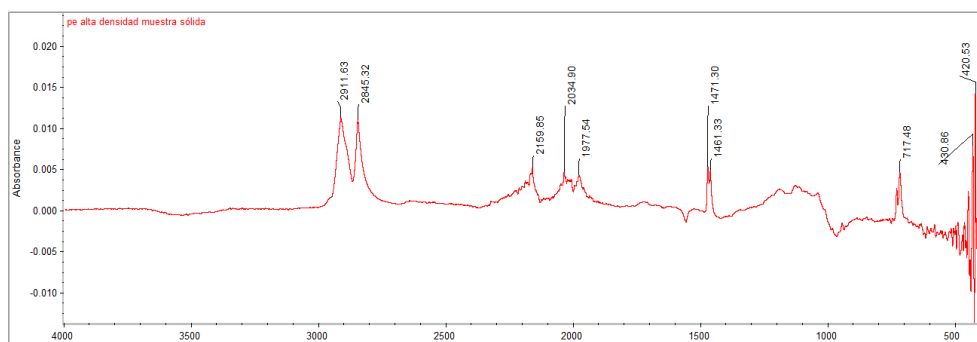


Figura 1: Muestra de PE de alta densidad sometido a test de biodegradación. Se observa la presencia de picos en la región de 2300-1900 cm⁻¹, los picos más significativos son de 2159,85 cm⁻¹, 2014,90 cm⁻¹ y 1977,54 cm⁻¹, que revelan los grupos funcionales, tiocianato alifático y del grupo ceteno.

Fuente: Elaboración propia.

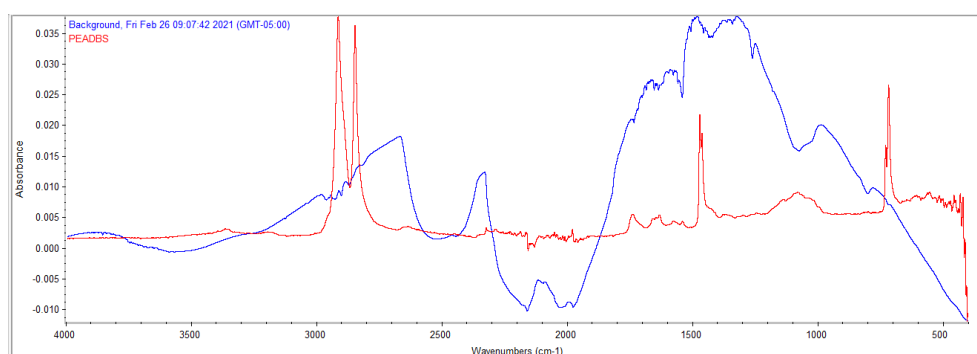


Figura 2: Espectro IR de blanco de PE de alta de alta densidad. Se visualiza el espectro de PE antes de ser sometido a un ataque por agentes biológicos.

Fuente: Elaboración propia.

Para el caso de la muestra de PE de baja densidad, el espectro que se comparó con el blanco no presentó diferencias significativas en lo que respecta a la presencia de grupos funcionales, figura 3.

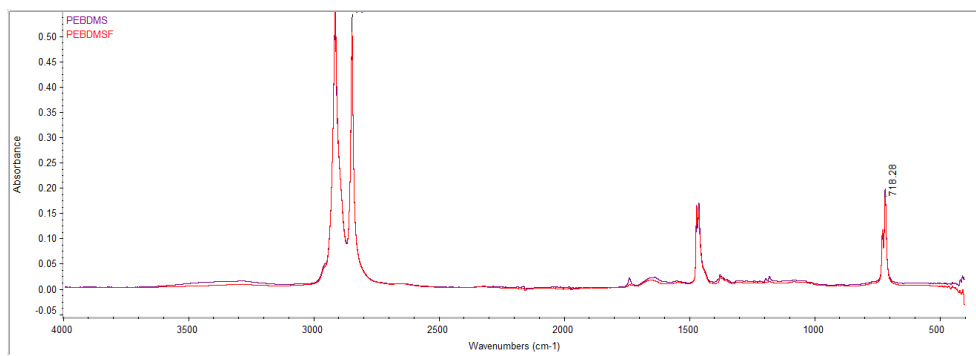


Figura 3: Comparación del espectro de la muestra y el blanco de PE de baja densidad luego del test de biodegradación. Los espectros generados luego del test de biodegradación en PE de baja densidad son prácticamente idénticos entre sí, blanco y muestra, y al superponerlos no se notan diferencias significativas.

Fuente: Elaboración propia.

Además Bombelli et al. (2017) reporta la presencia de etilenglicol en la degradación realizada por la larva *Galleria mellonella* L. generado como subproducto del proceso de biodegradación, esto coincide con el espectro que arrojó el medio de cultivo en el que se trató el PE de alta densidad, donde se lo comparó con el espectro de etilenglicol presente en la biblioteca del software, además este espectro también revela la presencia de nuevos grupos funcionales, estos se hallan en el rango de 3000-2500 cm^{-1} , y se dan por la presencia de grupos C-H, los cuales no se hallan el blanco inicial, y las señales en la región de 2000 – 1500 cm^{-1} también indican la presencia del grupo carbonilo ausente en el blanco inicial como se puede

comprobar en las figuras 4 y 5. Estos productos según Ren et al, (2019), están relacionados con la formación de nuevos compuestos a raíz de ruptura de las cadenas originales del polímero.

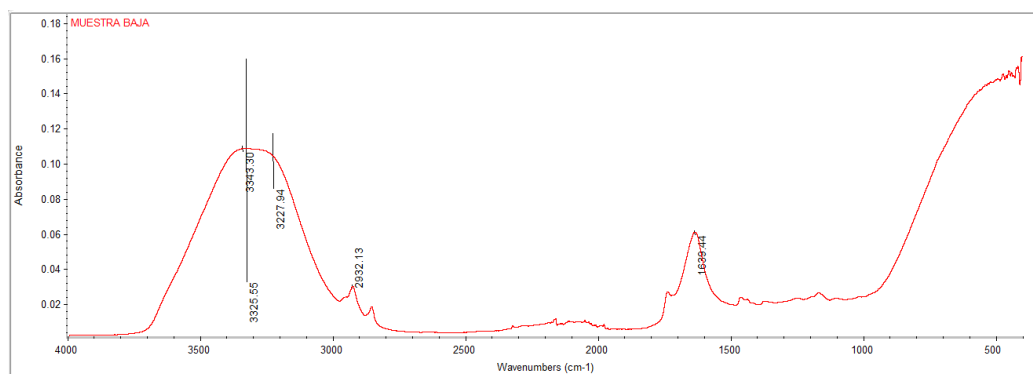


Figura 4: Espectro IR de la muestra de medio de cultivo empleado en el test de biodegradación. Se observa en el rango de 3500 a 3000 cm⁻¹ que indican presencia de grupo OH, además un pico significativo en 2932,13 cm⁻¹ para C-H y otro pico en la región de 1750 – 1700 que revela un grupo carbonilo que tiene origen en el estiramiento del carbonilo, lo que indica que sus cadenas poliméricas se separaron de manera forzada, este proceso se lo conoce como degradación de un material (Espinoza, 2018).

Fuente: Elaboración propia.

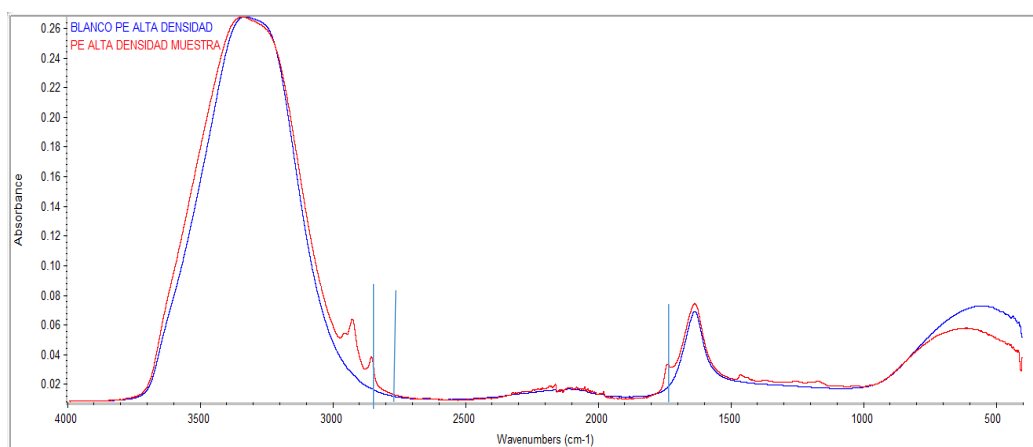


Figura 5: Espectro IR del medio de cultivo empleado en el test de biodegradación comparado con el blanco. Se visualiza el espectro del blanco en color azul y el espectro de la muestra en color rojo. La muestra revela la presencia de nuevos grupos funcionales en las regiones $3000-2500\text{ cm}^{-1}$ y de $2000 - 1500\text{ cm}^{-1}$ indicando grupos funcionales C-H y el grupo carbonilo respectivamente.

Fuente: Elaboración propia.

En el caso de la muestra analizada del medio de cultivo de PE de baja densidad no se reporta ninguna variación significativa entre el líquido del blanco y la muestra, tal como se observa en la figura 6 y 7 del blanco y la muestra respectivamente donde los espectros generados son prácticamente idénticos.

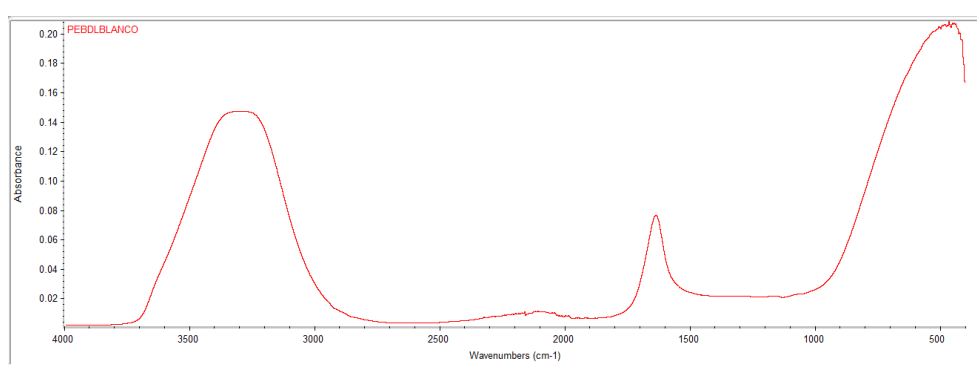


Figura 6: Espectro IR del medio de cultivo del blanco de PE de baja densidad.

Fuente: Elaboración propia.

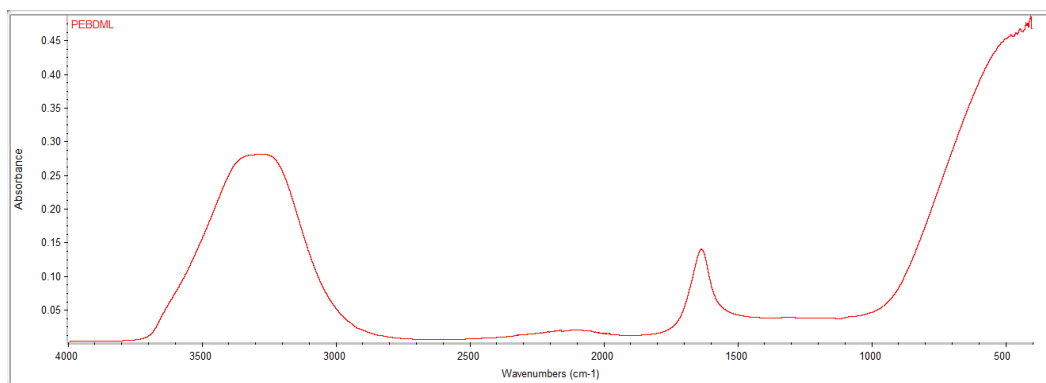


Figura 7: Espectro IR del medio de cultivo de la muestra de PE de baja densidad.

Fuente: Elaboración propia.

3.4. Análisis estadístico de la diferencia de masa.

El porcentaje de pérdida de masa es un indicador importante de la degradación de un polímero, es así que luego de 40 días las muestras tratadas mostraron una variación de masa de 0,002 g y 0,00 g en PE de alta densidad y baja densidad respectivamente, lo que nos dio como resultado una disminución de 1,1% y de 0% de acuerdo a la fórmula 1. Este resultado especialmente el de PE de baja densidad puede deberse a la falta de sensibilidad de la balanza analítica empleada, este valor es similar al reportado por Zhang et al. (2019).

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\text{masa antes de la incubación} - \text{masa después de la incubación}}{\text{masa antes de la incubación}} \times 100\%$$

Porcentaje de pérdida de masa de PE de alta densidad:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{0,2g - 0,198g}{0,2} \times 100\% = 1\%$$

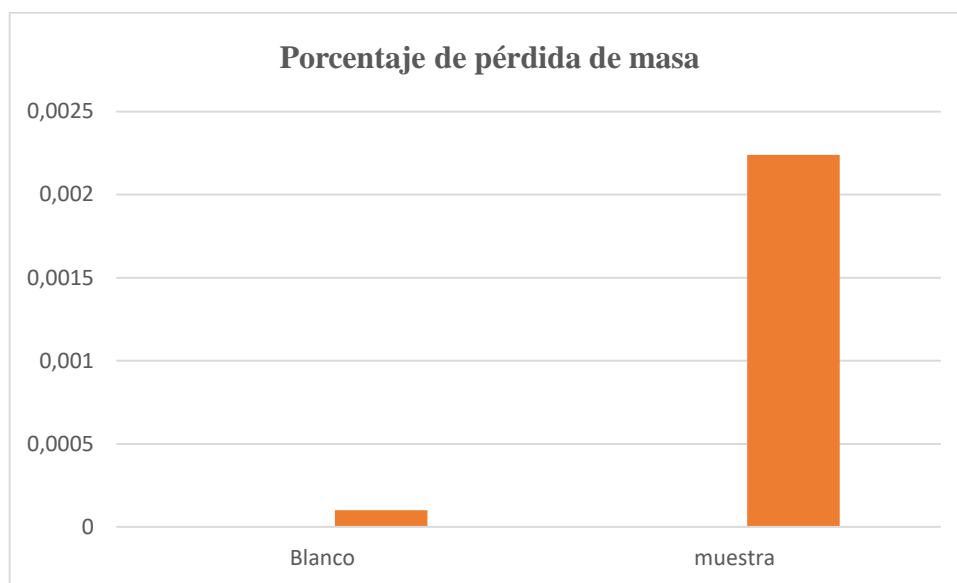


Figura 8: Gráfica de barras comparando el porcentaje de biodegradación de PE entre las muestras y los blancos.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 8 se puede observar la diferencia de masas existente entre las muestras tratadas y el blanco, esto se debe a que en la muestra de PE de alta densidad perdió 0.00224 g y el blanco se mantuvo en las mismas condiciones. Para el caso de PE de baja densidad el blanco mostró una ligera pérdida de masa, esto se atribuye a pérdidas no relacionadas al tratamiento de biodegradación, si no a los microgramo de PE que quizá se perdieron con los lavados debido a que es mínima.

Para poder realizar el análisis estadístico se tomó un intervalo de confianza del 95%, y un nivel de significancia α de 0,05, de tal manera los valores $p\text{-valor} < 0,05$ permiten rechazar la hipótesis según Cedeño & Merino (2020).

El análisis se realizó mediante Excel, y en la tabla 3 es claro tanto en las muestras de una y dos colas que el estadístico t es inferior al valor crítico de una cola, por lo que

estadísticamente estos valores son iguales, es decir la diferencia de masa no es significativa entre el blanco y muestra.

Tabla 3: Análisis estadístico mediante prueba t-student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales.

	Muestra	blanco
Media	0,0112	0,00005
Varianza	0,00025088	5E-09
Observaciones	2	2
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	0,99552579	
P(T<=t) una cola	0,25071369	
Valor crítico de t (una cola)	6,31375151	
P(T<=t) dos colas	0,50142737	
Valor crítico de t (dos colas)	12,7062047	

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos son lógicos considerando que el método de determinación de peso no es un método sensible para el estudio de estos fenómenos de biodegradación (Ren, et al, 2020) debido a que estos incluso pueden aumentar su masa debido a la formación de films y acumulación de agua (Espinoza, 2018).

3.5. Análisis por microscopía electrónica de barrido.

Al comparar la superficie del blanco del polietileno de baja densidad con el tratado biológicamente se puede visualizar una diferencia una ligera alteración en la estructura,

especialmente en el aumento de las porosidades y la presencia de ciertas grietas superficiales que sugieren una actividad biológica en la superficie del plástico, este resultado es similar al expuesto por Espinoza (2018) con la excepción de que no se reportó la presencia de hifas, esto debido a que el pH de los medios estaba en siete y por lo tanto no eran las condiciones idóneas para el crecimiento de hongos, además Zhang et al. (2019) coincide en que si bien las diferencias no son significativas, el ligero aumento en las rugosidades de las muestras tratadas son un indicador de procesos biodegradativos, tal como se muestra en las figuras 9 y 10.

En el caso de las figuras 11 y 12 que corresponden a las muestras de PE de alta densidad, se visualiza grietas en el grupo tratado que no se observan el blanco, esto explica los grupos funcionales reportados en el FT-IR, además Zhang et al. (2019) señala la presencia de grietas en PE de alta densidad como principal resultado de SEM al analizar las muestras con el blanco.

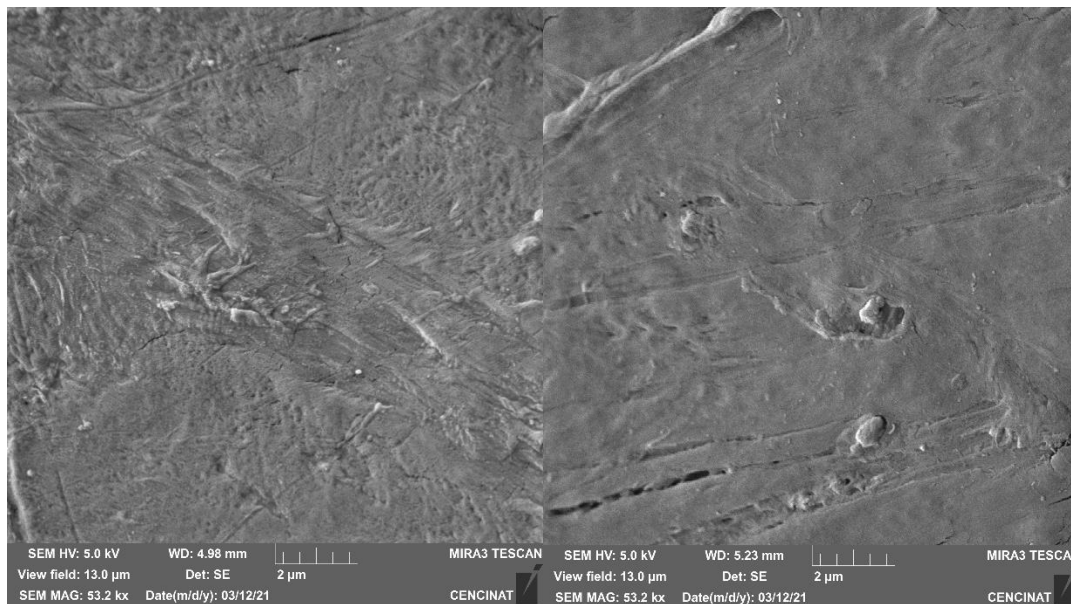


Figura 9: Fotografía 1 de la superficie de del blanco de PE de baja densidad mediante un Microscopía Óptica de Barrido. En un cuadro de 13,0 x13, 0 μm a escala de 2 μm con una magnitud de 53,2 kx.

Fuente: Elaboración propia.

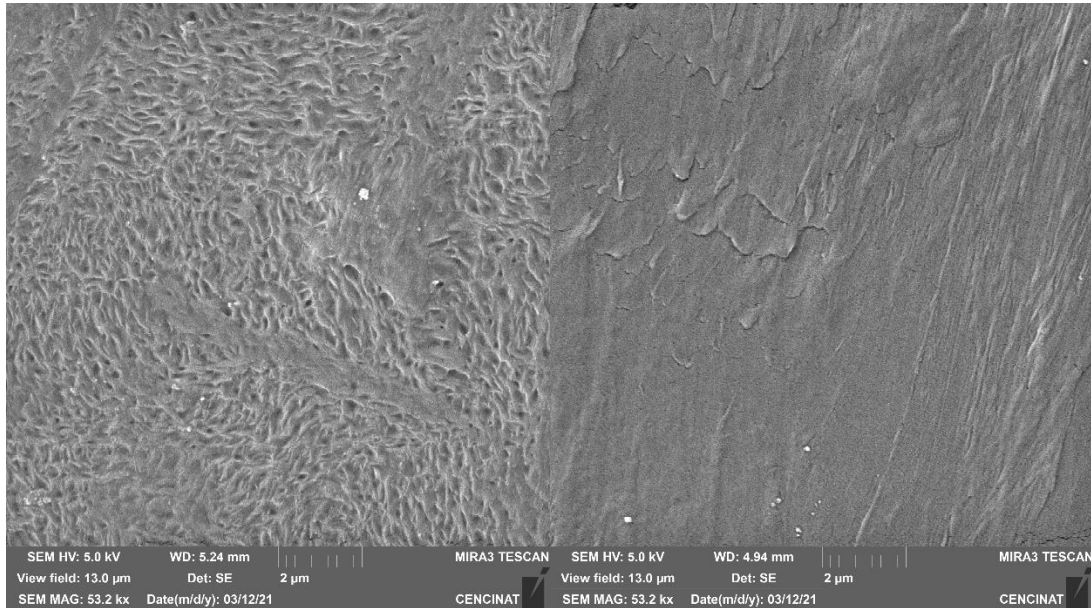
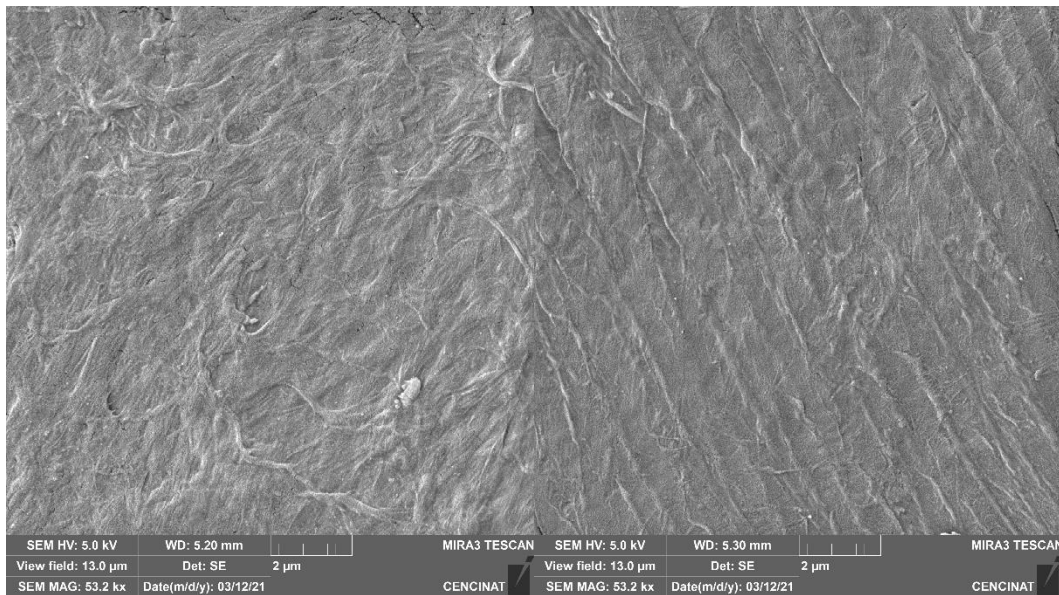


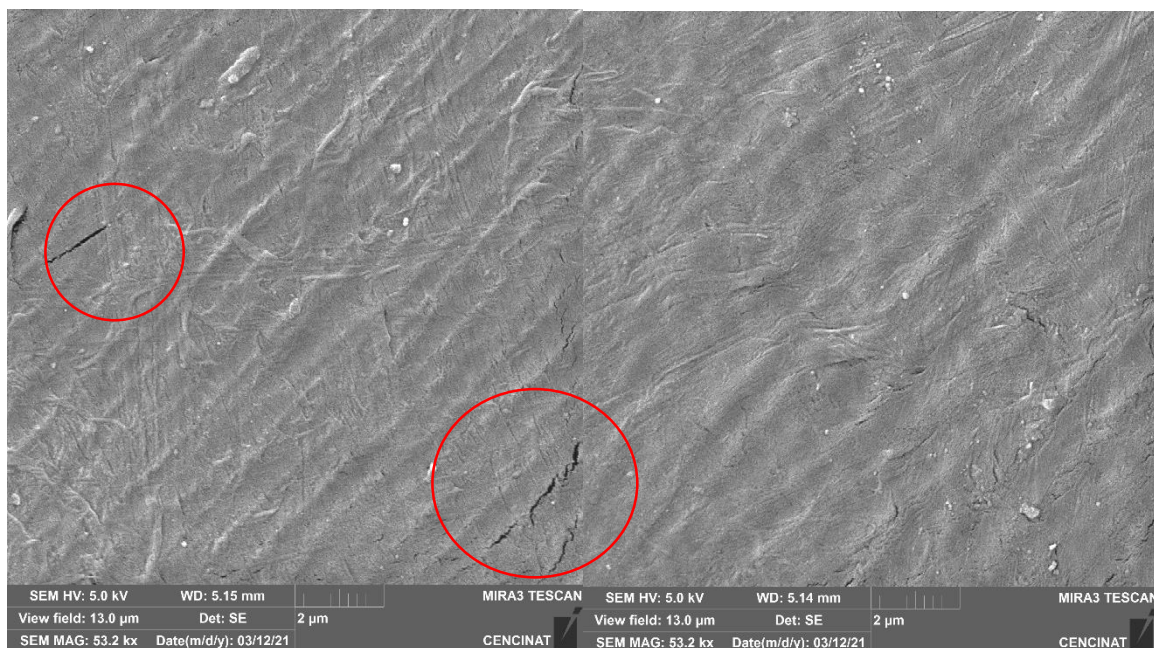
Figura 10: Fotografía 2 de la superficie de PE de baja densidad tratada biológicamente mediante el uso de Microscopio Óptico de Barrido (SEM): En un cuadro de 13,0 x13,0 μm a escala de 2 μm con una magnitud de 53,2 kx.

Fuente: Elaboración propia.



Fotografía 11: Fotografía 3 de la superficie de del blanco de PE de alta densidad mediante el uso de Microscopio Óptico de Barrido. En un cuadro de 13,0 x13,0 μm a escala de 2 μm con una magnitud de 53,2 kx.

Fuente: Elaboración propia.



Fotografía 12: Fotografía 4 de la superficie de PE de alta densidad tratada biológicamente mediante el uso de Microscopio Óptico de Barrido. En un cuadro de 13,0 x13,0 μm a escala de 2 μm con una magnitud de 53,2 kx.

Fuente: elaboración propia.

CAPÍTULO 4.

4. CONCLUSIONES

En el presente estudio, los consorcios microbianos aislados del contenido intestinal de la larva *Galleria mellonella* L. fueron empleados para verificar la degradación de polietileno de alta y baja densidad, y se pudo verificar que efectivamente existía un proceso de crecimiento microbiano en medios que empleen únicamente el PE de alta y baja densidad como única fuente de carbono, esto indica la capacidad de los microorganismos de desarrollarse y sobrevivir por un periodo de tiempo bajo estas condiciones, como se puede verificar en el Anexo A.

La microbiota aislada del contenido intestinal de la larva *Galleria mellonella* L. obtenidas a partir de la reproducción de especies adultas de la mariposa del cantón Ricaurte, tiene la capacidad de biodegradar el PE, especialmente el de alta densidad, esto se observa al analizar el porcentaje de biodegradación, que si bien es bajo, apenas del 1%, este coincide con lo reportado por Zhang et al. (2019) además que el espectro infrarrojo reveló estiramiento de carbonilo, propio de un proceso de degradación de un material.

En el caso de PE baja densidad no se encontró diferencia significativa entre el espectro IR ni tampoco en una variación de masa, además Espinoza (2018) indica que la masa no es el principal indicador de un proceso de bioasimilación, debido a que influyen factores como erosión de superficie, formación de biofilms, restos de metabolitos, entre otros.

El consorcio de la larva *Galleria mellonella* L. parece tener más afinidad al PE de alta densidad debido a que fue este quien perdió masa además de presentar variaciones en el

espectro IR, y por lo tanto existe una relación directamente proporcional al aumento o desaparición de grupos funcionales en función de la pérdida de masa.

La degradación de plástico se ve fuertemente vinculada a cambios en la superficie de los polímeros de polietileno, por lo tanto para poder verificar efectivamente un proceso de biodegradación es fundamental estudiar su estructura para emitir un criterio si se realiza la metodología SEM. Las fotografías de microscopía electrónica de barrido permiten visualizar cambios estructurales, desde los más importantes hasta los más ligeros, como grietas, porosidades, pero especialmente la formación de films que indicaría el aumento del contacto de los productos enzimáticos con la superficie del plástico, como lo señala Espinoza (2020) lo que implica un aumento en la rapidez de degradación.

Por lo tanto la comprensión de la biodegradación de PE de alta densidad mediante la microbiota de *Galleria mellonella* L. proporciona una visión del proceso que sufre este polímero al ser degradado, para ser empleado a futuro como una estrategia en la reducción de microplásticos que se encuentran contaminando el medio ambiente.

CAPÍTULO 5

5. RECOMENDACIONES

La alta capacidad de degradar plástico de la larva *Galleria mellonella* L. puede estar vinculada a la sinergia entre la actividad enzimática propia de la larva sumada a su microbiota, por lo tanto se sugiere profundizar en estudios que combinen estas dos variables.

Además es recomendable aumentar el número de muestras y variables como temperatura, pH, condiciones aerobias y anaerobias, además de la composición de los medios basales y de aclimatación para aumentar la sensibilidad del estudio.

Es necesario aislar diferentes especies de microorganismos de este consorcio para poder realizar experimentos específicos con cada uno de ellos para identificar cuál es el que mejores cualidades biodegradativas tiene, al mismo tiempo para observar cómo trabajan solos y compararlo a como se comportar al estar en simbiosis con otros microorganismos.

Para facilitar los procesos de análisis del SEM, se recomienda aplicar radiofrecuencia al polímero tratado cuando se realice los lavados, para tratar de eliminar toda la capa biológica que se forma a partir del test de biodegradación.

Por otro lado sería interesante realizar un estudio filogenético de las larvas empleadas para estos estudios, para determinar características importantes que influyan en los procesos de biodegradación.

REFERENCIAS

Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica, 2015. Amenazas Toxicológicas del Polietileno. <https://espanol.epa.gov/espanol/amenazas-toxicologicas-del-plastico>

Alcantára, L. (2009). Recuperado el 2 de Febrero de 2020, de Google: <http://www.eluniversal.com.mx/notas/577100.html> 18/08/2010

Allinger, N. L. (1978). Química Orgánica, Química. En N. L. Allinger, Química Orgánica, Química (pág. 1512). Reverté.

Gonzalez Alcos, Cristina V. C. G. (2019). Capacidad Biodegradativa de Hongos Filamentosos Frente al Polietileno. 85.

Brunella, T. L. (8 de 19 de 2010). Polyethylene: discovery and growth. Recuperado el Febrero de 2020, de <http://www.uhmwpe.unito.it/2003/Trossarelli.pdf> 19/08/2010.

Begum, M. A., Varalakshmi, B., & Uma Magheswari, K. (2015). Biodegradation of Polythene Bag using Bacteria Isolated from Soil. 8.

Bombelli, P., Howe, C. J., & Bertocchini, F. (2017). Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth *Galleria mellonella*. *Current Biology*, 27(8), R292-R293. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.060>

Carraher, R. B. (1997). Introducción a la Química de los Polimeros. En R. B. Carraher, Introducción a la Química de los Polimeros (pág. 713). SA Barcelona : Reverté.

Castillo, R., Escobar, E., Fernández, D., Gutiérrez, R., Morcillo, J., Núñez, N., & Peñaloza, S. (2015). BIOPLÁSTICO A BASE DE LA CÁSCARA DEL PLÁTANO. *Revista de Iniciación Científica*, 1(1), 34-37.

Cedeño Juan & Merino Gabriel. Valoración in vitro de la biodegradación de polietileno de baja densidad mediante hongos filamentosos aislados del relleno sanitario de Pichacay. 2020. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18821/1/UPS-CT008788.pdf>

Chatterjee, S., & Sharma, S. (2019). Microplastics in our oceans and marine health. *Field Actions Science Reports. The Journal of Field Actions*, Special Issue 19, 54-61.

Elías, M., Lozano, M., Maldonado, M., Castro, M., Meza, J., & García, M. (2008). Introducción de la cría masiva de *Galleria mellonella* para el aislamiento de hongos entomopatógenos y reproducción de nemátodos en la ciudad de Monterrey Nuevo León. *Uanl*, 479-482. Retrieved from <http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2008/CB/479-482.pdf>

Espinoza, Moises. Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos. 2018. <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7410/1/139174.pdf>

Figueroa, A. M. Q., & Correa, S. M. (2015). Degradabilidad de Polietileno de Baja Densidad -LDPE- Utilizando *Pycnoporus sanguineus* UTCH 03.

Gajendiran, A., Krishnamoorthy, S., & Abraham, J. (2016). Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. 3 Biotech, 6(1), 52. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0394-x>

Gillow J., Francis A. J., Microbial Gas generation under Expected Waste Isolation Pilot Plant Repository Conditions, ERMS 532877 Docket A-98-49 Item II-B2-35, 2003.

Greenpeace. (2015). Greenpeace España. Recuperado el 12 de Febrero de 2020, de Google: <https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/consumismo/plasticos/como-llega-el-plastico-a-los-oceanos-y-que-sucede-entonces/>

Greenpeace. (2015). Greenpeace España. Recuperado el 12 de Febrero de 2020, de Google: <https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/consumismo/plasticos/datos-sobre-la-produccion-de-plasticos/>

Hakkarainen. (2004). Environmental Degradation of Polyethylene. Adv Polym Sci, 1, 177-199. doi:169

Howard, L.-P. C. (2001). Ludlow-Palafox C. y Chase Howard A. doi:4749-4756

Hachi Quintana, J. G., & Rodríguez Mejía, J. D. (2010). Estudio de Factibilidad para Reciclar Envases Plásticos de Polietileno Tereftalato (PET), en la Ciudad de Guayaquil. 237.

Hussein, A. A., Khudhair, S. H., & Al-Mayaly, I. K. (2015). Optimum Conditions for LDPE Strips Biodegradation by Local Bacterial Isolates. 10, 9.

Huidobro Pahisha, (2003). Introducción. RUA. https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/9907/6/Huidobro-Pahissa-Ana_2.pdf

Jamil, S. U. ullah, Zada, S., Khan, I., Sajjad, W., Rafiq, M., Shah, A. A., & Hasan, F. (2017). Biodegradation of polyethylene by bacterial strains isolated from Kashmir Cave, Buner, Pakistan. Journal of Cave and Karst Studies, 79(1), 73-80. <https://doi.org/10.4311/2015MB0133>

Klug Michael (2012). Pirólisis, un proceso para deterretir la biomasa.Revista Química PUCP. file:///C:/Users/Anabell/Downloads/5547-Texto%20del%20art%C3%ADculo-21359-2-10-20130828.pdf

Kong, H. G., Kim, H. H., Chung, J., Jun, J., Lee, S., Kim, H.-M., Jeon, S., Park, S. G., Bhak, J., & Ryu, C.-M. (2019). The *Galleria mellonella* Hologenome Supports. Microbiota-

Independent Metabolism of Long-Chain Hydrocarbon Beeswax. *Cell Reports*, 26(9), 2451-2464.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.018>

Kumar Sen, S., & Raut, S. (2015). Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 462-473. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003>

Kunlere, I. O., Fagade, O. E., & Nwadike, B. I. (2019). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by certain indigenous bacteria and fungi. *International Journal of Environmental Studies*, 76(3), 428-440. <https://doi.org/10.1080/00207233.2019.1579586>

Liu Ren, Lina Men, Zhiwei Zhang, Feifei Guan, Jian Tian, Bin Wang 4, Jihua Wang 1, Yuhong Zhang y Wei Zhang. (2019). Biodegradation of Polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the Guts of Wax Moth *Galleria mellonella*. doi:10.3390/ijerph16111941

Lopez Mateos, F. y. (1988). Biodegradabilidad e inhibicion de los polielectrolitos floculantes, *Ingenieria Quimica*. No 232, Julio.

Lopez Carrasquero, Francisco (2005). Fundamentos de los polímeros. VI Escuela Venezonala para la enseñanza de la Química. <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/16743/polimeros.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Los%20pol%C3%ADmeros%20son%20un%20tipo,e1%20pol%C3%ADmero%20se%20denominan%20mon%C3%B3meros.>

Lynd Lee R., W. P. (2001). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577. doi:10.1128

Manos George, G. A. (2000). Catalytic Degradation of High-Density Polyethylene over Different Zeolitic Structures. *American Chemical Society*, 39(5), 1198 - 1202. doi:10.1021

Madigan, T. M. E. al. (2014). Biología de los miccroorganismos. In Broc, Biología de los microorganismos (pp. 2–22). Madrid.

Mastral José F., B. C. (30 de Junio de 2006). ACS Publications. doi:10.1021

Mastral José F., B. C. (2006). Mastral José F., Berrueco Cesar y Ceamanos Jesús. *Energy & Fuels*, 20. doi: 1365-1371

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

Murata Katsuhide, B. M. (2009). Thermal degradation of polyethylene into fuel oil over silica–alumina by acontinuous flow reactor. *Elsevier*, 354-359. Recuperado el 12 de Febrero de 2020

Noroña, k. (14 de Septiembre de 2018). ¿Cuáles son los desechos que más contaminan el mar en Ecuador? El Comercio. Recuperado el 20 de Febrero de 2020, de <https://www.elcomercio.com/tendencias/desechos-plasticos-oceanos-ecuador-ministeriodelambiente.html>

Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Shrivastava, A., Khatua, P., Rai, V., & Bose, S. (2017). Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports*, 7(1), 39515. <https://doi.org/10.1038/srep39515>.

Organización de las Naciones Unidad (ONU) Programa para el Medio Ambiente (9 de Septiembre de 2018). Organización de las Naciones Unidas. Recuperado el 2 de Febrero de 2020, de Google: <https://www.unenvironment.org/es/noticias-y-reportajes/video/salvar-las-islas-galapagos-de-la-contaminacion-por-plasticos>

Organización de las Naciones Unidas (ONU). (14 de marzo de 2018). ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS. Recuperado el 12 de Febrero de 2020, de GOOGLE: <https://www.unenvironment.org/es/noticias-y-reportajes/comunicado-de-prensa/ecuador-y-onu-medio-ambiente-lanzan-un-llamado-terminar>

Parlamento Europeo. (11 de Noviembre de 2018). Parlamento Europeo. doi:https://www.europarl.europa.eu/pdfs/news/expert/2018/11/story/20181116STO19217/20181116STO19217_es.pdf.

Patel, K. M., Tiwari, D. A., & Yadav, D. M. (2017). Biodegradation of LDPE with Mixed Consortium in presence of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION) as the Enhancer for Biodegradation by Accelerating Growth Profiling of Microbes. 14.

Packsy Academy, (2012) Breve Historia del Polietileno. <http://www.packsys.com/blog/breve-historia-del-polietileno/>

Pescador, J. G. G. (2013). Biodegradación de Polietileno de Baja Densidad por Consorcios Microbianos. 59.

Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (2018). Organización de las Naciones Unidas. doi: 978-92-807-3705-9.

Plastivida Argentina. (1998). La Relación entre la Biodegradación y los Residuos Plásticos. Boletín Informativo, 8, 19. Retrieved from <http://www.ingenieroambiental.com/4012/8.pdf>

Posada Bustamante Beatriz (1994). La Degradación de Plásticos. Revista Universidad Eafit.

Rojo-Nieto, E. &. (2017). Basuras marinás, plásticos y microplásticos. *Ecologistas en acción*. Recuperado el 12 de Febrero de 2020, de <https://spip.ecologistasenaccion.org/IMG/pdf/informe-basuras-marinas.pdf>

Ramírez Aurelio, Navarro Moreno Leticia. Universidad Del Papaloapan Campus Tuxtepec (2010). *El polietileno. síntesis y degradación*: AlephZero-Comprendamos No.57. <http://www.comprendamos.org/alephzero/57/polietileno.html>

Schnable, W. (1981). *Polymer Degradation*. Munchen, Hanser International.

Sáenz De Juano Arbona, V. (2006). Contribución al estudio de la degradación ambiental de poliolefinas fotoestabilizadas. [Universitat Politècnica de València]. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/2909>

Sangale, M. K., Shah Nawaz, M., & Ade, A. B. (2019). Potential of fungi isolated from the dumping sites mangrove rhizosphere soil to degrade polythene. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41448-y>

Shalini, R., & Sasikumar, C. (2015). Biodegradation of Low Density Polythene Materials Using Microbial Consortium – An Overview. 4, 8.

Suasnavas Fores Darwin (2017) Pontificia Universidad Católica del Ecuador. . Degradación de materiales plásticos “PET” (polyethylene terephthalate), como alternativa para su gestión.

Torres, M. F. S. (2015). Ecología política y geografía crítica de la basura en el Ecuador. *Letras Verdes. Revista Latinoamericana de Estudios Socioambientales*, 17, 4-28. <https://doi.org/10.17141/letrasverdes.17.2015.1259>

Torres, R., & Macol, S. (2018). Eficiencia del homogenizado proveniente del tracto digestivo de la *Galleria Mellonella* en la biodegradación de dos tipos de polietileno de baja densidad, Lima—2018. Universidad César Vallejo. <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/UCV/20217>

Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2011). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 17(1), 133-136. <https://doi.org/10.15381/rpb.v17i1.62>

Valencia, A. (1993). EL impacto del ambiente sobre la degradacion de materiales. En A. Valencia, Seminario sobre la declaracion y evaluacion del impacto ambiental. Medellin.

Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., & Janssen, C. R. (2015). Microplastics in sediments: A review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research*, 111, 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.007>

Vargas Meza, F. M. (2013). Biodegradabilidad de Polietileno Tereftalato y de Oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballo y gallina. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/6261>

Verma, N., & Gupta, S. (2019). Assessment of LDPE degrading potential *Aspergillus* species isolated from municipal landfill sites of Agra. SN Applied Sciences, 1(7), 701. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0746-3>

Vertus, D., Henriquéz, J., & Ruiz, M. (2017). Biodegradación bacteriana de polietileno y propuesta de aplicación para Cerro Patacón.

Vimala, P. P., & Mathew, L. (2016). Biodegradation of Polyethylene Using *Bacillus Subtilis*. Procedia Technology, 24, 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.031>

Vizuite Karla (2020). Laborista del taller de Nanomateriales de ESPE INNOVATIVA.

Yepes Aguirre, L. M. (2014). Degradación de polietileno de baja densidad utilizando hongos. Revisión sistemática de la literatura. <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/16184>

Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Li, L., Lin, H., Bi, Q., & Zhao, Y. (2020). Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. Science of The Total Environment, 704, 135931. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135931>.

Zurovec, M. and Sehnal, F. (2002). *Galleria mellonella* heavy-chain fibroin (Fib-H) gene, partial cds. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AH009792.2>

ANEXOS

6. ANEXOS.

6.1. ANEXO A: REGISTRO FOTOGRÁFICO.

6.1.1. Cultivo de larvas del lepidóptero *Galleria mellonella* L.



ANEXO A.1: Cultivo de la larva *Galleria mellonella* L. en un sustrato de salvado de trigo, miel y glicerina.



Anexo A.2: Recolección de las larvas de *Galleria mellonella* L.

6.1.2. Triturado y tamizado del PE de alta y baja densidad.



Anexo A.3: Triturado del PE de alta y baja densidad mediante un molino con una rejilla de 2mm.

6.1.3. Periodo de aclimatación.

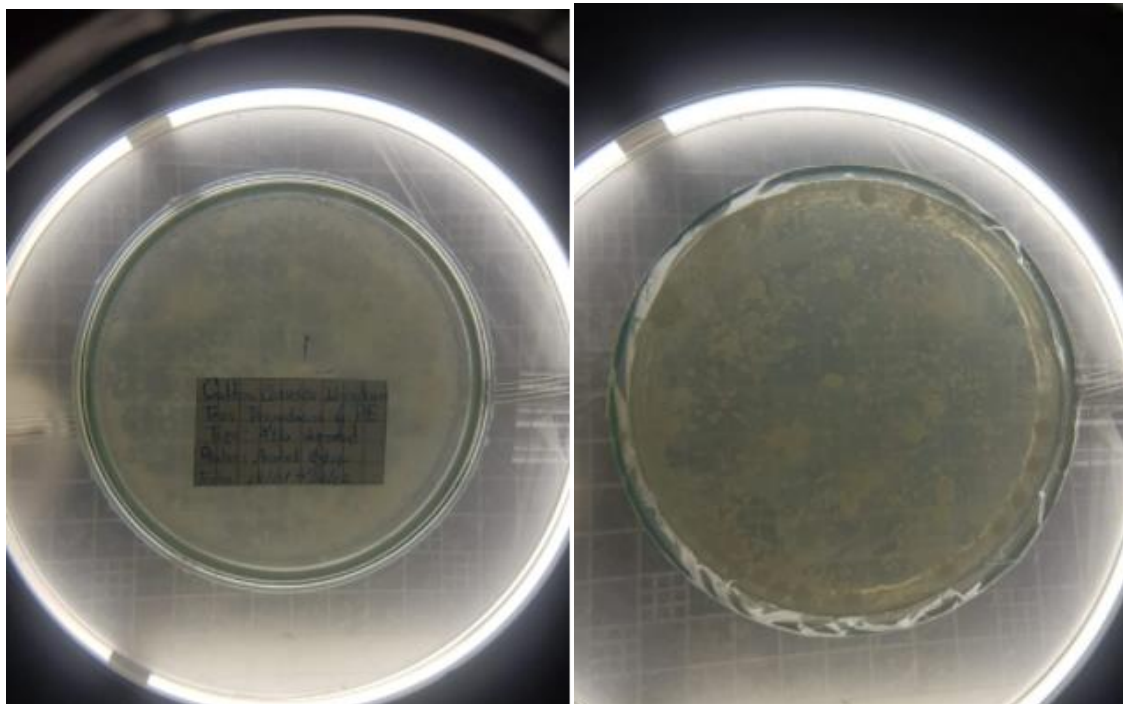


Anexo A.4: selección de larvas de *Galleria mellonella* L.

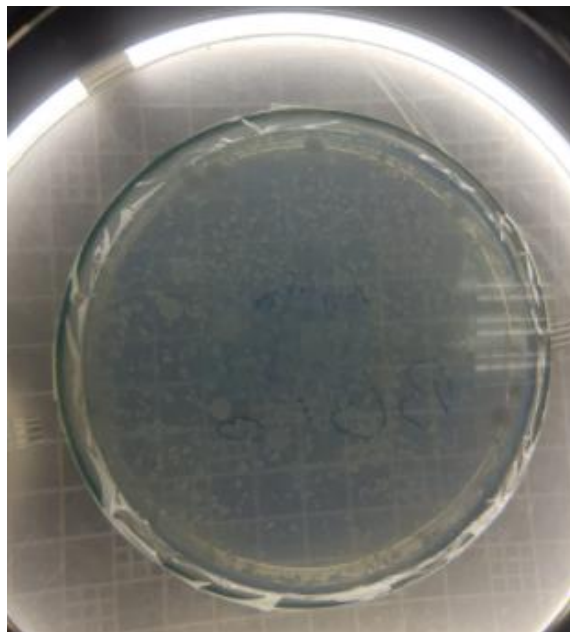


Anexo A.5: Matraces de PE de alta y baja densidad en el orbital con agitación de 200 rpm.

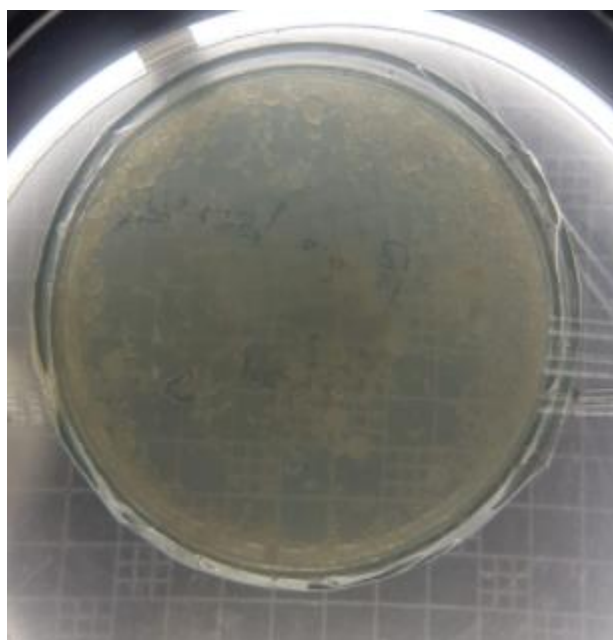
6.1.4. Placas del test de biodegradación 40 días después de iniciada la prueba.



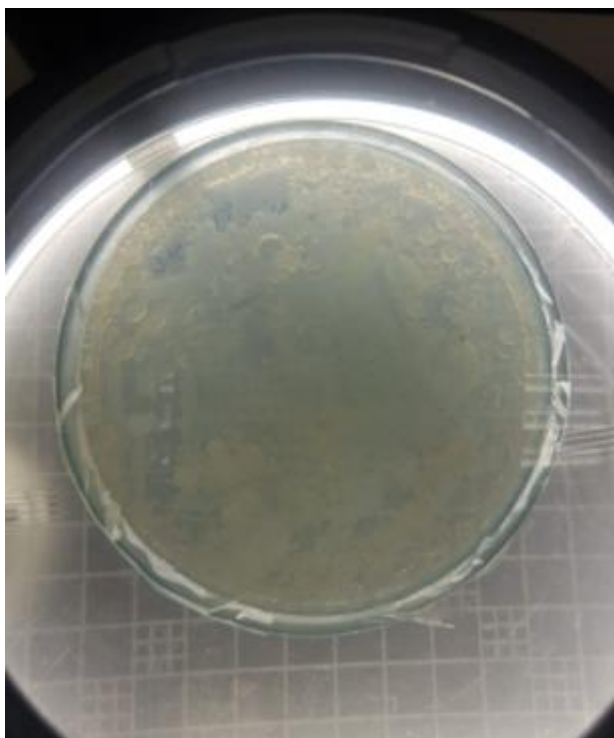
Anexo A.6: Placas con una muestra de PE de alta densidad, se observa crecimiento microbiano alrededor de la placa.



Anexo A.7. Placa blanco de PE de alta densidad.



Anexo A.8: Placa blanco de PE de baja densidad.



Anexo A. 9: Placa de PE de baja densidad con la muestra inoculada con consorcio microbiano.

6.1.5. Peso de las partículas de PE.



Anexo A.10. Peso del blanco de PE de alta densidad.



Anexo A.11: Peso de la muestra de PE de alta densidad sometido a biodegradación.



Anexo A.12: Blanco de PE de baja densidad.



Anexo A.13: Muestra de PE de baja densidad sometida al test de biodegradación.

6.2. ANEXO B: GLOSARIO.

Pirólisis: Se define como pirolisis el proceso de descomposición térmica que se da cuando no existe oxígeno, es decir, anaerobia (Klug, 2012).

Polímero: Un polímero es un tipo de macromolécula que se caracteriza por la repetición de una unidad, estas unidades se llaman monómeros (Lopez, 2005).

Elastómeros: polímeros que poseen una gran elasticidad parecida al del caucho, y se usan para hacer gomas, mangueras y neumáticos (Lopez, 2005)

Fibras: se orientan en filamentos largos para adoptar un aspecto similar al del hilo, y su uso más extendido es en la industria textil (Lopez, 2005).

Espectroscopia infrarroja (Fourier Transform Infra-Red): estudia la interacción entre la materia y las onda de energía infrarrojo, específicamente la radiación infrarroja a través de diversas longitudes de onda que son absorbidas por una molécula que se encuentra en su estado basal a una longitud de onda igual de la radiación incidente lo que conlleva a un cambio en las vibraciones (Mondragón, 2017).

Microscopia electrónica de barrido (SEM): es una técnica de análisis que se basa en un haz de luz de electrones de alta intensidad sobre una superficie sólida para producir una serie de señales, las mismas que van a brindar información sobre su estructura, morfología externa, orientación de sus componentes y cambios en el mismo (Espinoza, 2018).

Biodegradación: proceso de descomposición causada por microorganismos que se transforman en sustancias más simples (Espinoza, 2018).

Catalizador: una sustancia que acelera la velocidad de una reacción química sin afectar su situación de equilibrio (Pahissa, 2003).

6.3. ANEXO C: REGISTROS SEMANALES DE OBSERVACIONES.

6.3.1. ANEXO C.1: REGISTRO DEL PERIODO DE ACLIMATACIÓN.

PERIODO DE ACLIMATACIÓN		
FECHA: 4/12/2020	AUTOR: ANABEL CRESPO.	
MEDIO	TIPO	OBSERVACIONES
BASAL LÍQUIDO DE PE ALTA DENSIDAD.	MUESTRA	Color blanco traslúcido con pequeñas perlas que se suspenden en la superficie al estar en reposo.
BASAL LÍQUIDO DE BAJA DENSIDAD	MUESTRA	Color blanco traslúcido con pequeñas perlas que se suspenden en la superficie al estar en reposo.
MEDIO	FECHA	OBSERVACIONES
BASAL LÍQUIDO DE PE ALTA DENSIDAD	11/12/2020	A 200 rpm y 30°C se observa un ligero incremento de la turbidez, casi imperceptible.
BASAL LÍQUIDO DE PE DE BAJA DENSIDAD.	11/12/2020	A 200 rpm y 30°C se observa un ligero incremento de la turbidez, casi imperceptible.
MEDIO	FECHA	OBSERVACIONES
BASAL LÍQUIDO DE ALTA DENSIDAD.	18/12/2020	Aumenta la turbidez de la muestra ligeramente. No se observan la formación de films ni suspensión de hongos.
BASAL LÍQUIDO DE BAJA DENSIDAD.	18/12/2020	Aumenta la turbidez de la muestra ligeramente. No se observan la formación de films ni suspensión de hongos.
MEDIO	FECHA	OBSERVACIONES
BASAL LÍQUIDO DE ALTA DENSIDAD	14/1/2021	Día final del proceso de aclimatación, la turbidez ha aumentado, se observa el blanco más sólido. Algunas partículas de PE ya no se hallan suspendidas, si no reposan al fondo del matraz.
BASAL LÍQUIDO DE BAJA DENSIDAD.	14/1/2021	Día final del proceso de aclimatación, la turbidez ha aumentado, se observa el blanco más sólido. Algunas partículas de

		PE ya no se hallan suspendidas, si no reposan al fondo del matraz.
--	--	--

6.3.1. ANEXO C.2: REGISTRO DE TEST DE BIODEGRADACIÓN.

PERIODO DE ACLIMATACIÓN		
FECHA: 15/1/2021	AUTOR: ANABEL CRESPO.	
MEDIO	TIPO	OBSERVACIONES
BASAL SÓLIDO DE PE ALTA DENSIDAD.	M1UESTRA	Se siembra por agotamiento, se observa un medio traslúcido con pequeñas incrustaciones de PE-AD.
BASAL SÓLIDO DE PE BAJA DENSIDAD	MUESTRA	Se siembra por agotamiento, se observa un medio traslúcido con pequeñas incrustaciones de PE-AD.
BASAL SÓLIDO DE PE ALTA DENSIDAD.	BLANCO	Se siembra por agotamiento, se observa un medio traslúcido con pequeñas incrustaciones de PE-BD.
BASAL SÓLIDO DE PE BAJA DENSIDAD.	MUESTRA	Se siembra por agotamiento, se observa un medio traslúcido con pequeñas incrustaciones de PE-BD.
MEDIO	TIPO	OBSERVACIONES
FECHA	19/01/2021	
BASAL SÓLIDO DE PE ALTA DENSIDAD.	MUESTRA	Se evidencia el desarrollo de las primeras colonias.
BASAL SÓLIDO DE PE ALTA DENSIDAD.	MUESTRA	Se evidencia el desarrollo de las primeras colonias.
BASAL SÓLIDO DE PE ALTA DENSIDAD.	BLANCO	Se observa un medio traslúcido con pequeñas incrustaciones de PE-AD.
BASAL SÓLIDO DE PE BAJA DENSIDAD.	BLANCO	Se observa un medio traslúcido con pequeñas incrustaciones de PE-BD.
MEDIO	TIPO	OBSERVACIONES
FECHA	29/01/2021	
BASAL SÓLIDO DE PE ALTA DENSIDAD.	MUESTRA	Las colonias formadas se unieron un solo cuerpo que se extiende por toda la placa.

BASAL SÓLIDO DE PE BAJA DENSIDAD.	MUESTRA	Las colonias formadas se unieron un solo cuerpo que se extiende por toda la placa.
BASAL SÓLIDO DE PE ALTA DENSIDAD.	BLANCO	Se observa un medio traslúcido con pequeñas incrustaciones de PE-AD.
MEDIO	TIPO	OBSERVACIONES
FECHA	23/02/2021	
BASAL SÓLIDO DE PE ALTA DENSIDAD.	MUESTRA	Las colonia se mantuvo con las mismas características visibles hasta el final del periodo de test.
BASAL SÓLIDO DE PE BAJA DENSIDAD.	MUESTRA	Las colonia se mantuvo con las mismas características visibles hasta el final del periodo de test.
BASAL SÓLIDO DE PE ALTA DENSIDAD.	BLANCO	Se observa un medio traslúcido con pequeñas incrustaciones de PE-AD.
BASAL SÓLIDO DE PE BAJA DENSIDAD.	BLANCO	Se observa un medio traslúcido con pequeñas incrustaciones de PE-BD.