

CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE *Pseudomonas aeruginosa* FRENTE AL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD

CAPACITY OF BIODEGRADATION OF *Pseudomonas aeruginosa* AGAINST LOW DENSITY POLYETHYLENE

Sandra Beatriz Butrón Pinazo¹

¹Universidad Privada San Carlos, Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, Jr. Conde de Lemus N° 128, Puno, Perú, sandrarp3@gmail.com

RESUMEN

La biodegradación del polietileno de baja densidad por microorganismos, es una alternativa de solución para reducir la contaminación por plásticos; la investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad de biodegradación de *Pseudomonas aeruginosa* frente al polietileno de baja densidad; la bacteria fue aislada de residuos plásticos obtenidos del botadero de Cancharani de la ciudad de Puno, la identificación taxonómica se realizó en base a características macroscópicas de crecimiento en placa y el estudio microscópico empleando la tinción de Gram; la adaptación de la bacteria se realizó en un medio mineral con partículas de polietileno; la capacidad biodegradativa se determinó a temperaturas de 25 y 35 °C con un pH de 5,0 y 7,0, durante 30 días, obteniendo como resultados un porcentaje de 21,7 % y 27,3 % de pérdida de peso a una temperatura de 25 °C y 35 °C respectivamente a un pH de 7,0. Además, se evidenció la viabilidad de la biopelícula con microscopio de fluorescencia.

Palabras Clave: Bacteria, biodegradación, biopelícula, cepa, fluorescencia, medio mineral, polietileno.

ABSTRACT

The biodegradation of low density polyethylene by microorganisms, is an alternative solution to reduce plastic pollution; the objective of the research was to evaluate the biodegradation capacity of *Pseudomonas aeruginosa* against low density polyethylene; the bacterium was isolated from plastic waste obtained from the Cancharani dump in the city of Puno, taxonomic identification was performed based on macroscopic characteristics of plaque growth and microscopic study using Gram staining; the adaptation of the bacteria was carried out in a mineral medium with polyethylene particles; the biodegradable capacity was determined at temperatures of 25 and 35 °C with a pH of 5.0 and 7.0, for 30 days, obtaining as a result a percentage of 21.7 % y 27.3 % weight loss at a temperature of 25 °C and 35 °C respectively at a pH of 7.0. In addition, the viability of the biofilm was evidenced with a fluorescence microscope.

Key Words: Bacteria, biodegradation, biofilm, strain, fluorescence, mineral medium, polyethylene.

*Autor para correspondencia: sandrarp3@gmail.com



INTRODUCCIÓN

Hoy en día los plásticos se han convertido en una parte indispensable de nuestra vida, con el tiempo, la estabilidad y durabilidad de los plásticos han sido mejorado continuamente y es resistente a muchas influencias ambientales (Seymour 1899). A nivel mundial los grandes países generan residuos sólidos de una totalidad de 2 515 millones de toneladas al año provenientes de actividades económicas y hogares con una representación del 9 % (213 millones de toneladas) en plásticos, actualmente existe una gestión inadecuada de estos residuos incinerándolos, con un alto costo de inversión y deterioro directamente al medio ambiente, América latina produjo el 5 % de la producción total (Plastics Europe 2010) siendo el polietileno el de mayor demanda con un 37 % y el 9 % corresponde al LDPE (Tellez 2004); el polietileno representa hasta el 64 % de los plásticos sintéticos que se descartan dentro de un corto período de tiempo después de su uso (Lee *et al.* 1991) el bajo costo, la alta demanda y el prolongado tiempo de permanencia del plástico ha hecho posible que éste sea considerado un contaminante peligroso a nivel mundial.

Los plásticos constituyen el tercer volumen más grande de residuos en lo que respecta a residuos sólidos municipales en el Perú, ya que la industria de productos plásticos ha experimentado un sostenido crecimiento en los últimos años (Apiplast 2012); en el Perú los residuos se dividen como restos orgánicos de cocina y de alimentos, un 47,0 % del total de residuos generados, seguido de los plásticos con un 9,5 %, entre ellos los plásticos no reciclables como el polietileno, en la actualidad, los pobladores de Puno producen entre 92 y 110 toneladas de residuos sólidos y en fechas festivas aumenta en treinta toneladas más, siendo el 19 % residuos plásticos y el 7 % corresponde al PEBD (Municipalidad Provincial de Puno 2019), lo cual representa una amenaza para los ecosistemas.

El plástico es uno de los principales enemigos de la naturaleza al ser un material sintético que tarda más de 400 años en degradarse (dependiendo de su estructura), por lo que se le podría considerar acumulable y un contaminante que, aunque no parezca, causa daños irreversibles; (Thompson *et al.* 2004), debido a la insuficiente cantidad de rellenos sanitarios, muchos de los residuos plásticos son llevados al mar, originando de esta manera la muerte de incontables especies. Sin embargo, el mayor problema radica en los microplásticos, que al ser partículas con un tamaño menor o igual a 5 mm representan un grupo de agentes contaminantes imposible de detener por ser poco perceptibles a la vista (Huerta 2018); en el dossier de prensa llamado Plásticos en los océanos datos comparativos e impactos, menciona que 8 millones de toneladas de plásticos tienen como destino final los mares y océanos cada año y representa 60 – 80 % de la basura marina (Greenpeace 2019); lagunas, ríos y bahías están impregnadas con este material, generando contaminación en océanos y arrecifes, y cuando los plásticos son ingeridos por las





distintas especies ocasionan alteraciones en la cadena alimenticia generando un ciclo de contaminación repetitivo y sin aparente solución.

La fuente primaria de estas partículas es la entrada directa a los ambientes marinos de microesferas de plástico (Wu *et al.* 2017); el impacto negativo de los desechos plásticos en los organismos vivos puede estar relacionado con el enorme potencial de daño mecánico de los microplásticos en los tractos gastrointestinales de los organismos que los ingieren (Ivleva *et al.* 2017); los animales que ingieren gran cantidad de plásticos, mueren por inanición (Cole *et al.* 2013); un segundo aspecto, relacionado con la ingesta de microplásticos es la adsorción de todo este tipo de toxinas en los tejidos animales (Engler 2012); en el ser humano pueden producir mutaciones graves a nivel celular en ambos sexos donde los niños y los fetos son susceptibles, observándose las enfermedades como el cáncer de mama, ovarios, vagina cérvix, cáncer del cerebro y sistema nervioso, leucemias, cáncer de pulmón y del sistema respiratorio, cáncer de próstata y testículos, obesidad, diabetes es decir casi todas las dolencias (González 2019).

Las investigaciones más recientes proponen una solución a este problema basada en la biodegradación, utilizando para ello cepas microbianas seleccionadas (Paço *et al.* 2017); en la degradación biológica o biodegradación intervienen diferentes microorganismos, entre los que existe una gran diversidad catabólica, que son capaces de degradar, transformar o acumular, de forma natural, un amplio rango de compuestos: desde ligninas, almidón, celulosa y hemicelulosa (Shalini *et al.* 2015), hasta hidrocarburos, fármacos y metales (Kannahi & Sudha 2013); estos microorganismos, además, pueden asociarse para formar consorcios que degradan los compuestos poliméricos por cometabolismo (Skariyachan *et al.* 2015); dependiendo del tipo de proceso se generan diferentes productos finales, así, en el caso de un ambiente aeróbico, sólo se registran como productos finales la formación de agua, CO₂ y masa microbiana, mientras que en condiciones anaeróbicas se registran, además de los productos señalados, otros como metano y ácido sulfhídrico, como resultado de metabolismos metanogénicos y sulfidogénicos (Shah *et al.* 2019).

Algunos científicos han señalado que la biodegradación del polietileno por microorganismos, podría ser una solución para disminuir la contaminación por plásticos (Méndez *et al.*, 2007); existen especies de bacterias cuya versatilidad metabólica es muy amplia y son capaces de adaptarse y sobrevivir en una gran variedad de condiciones y parámetros, en este grupo, encontramos diversos géneros de los cuales uno de los más conocidos y estudiados son los géneros *Pseudomonas*, cuyas características de adaptabilidad a tan variadas condiciones incrementan su interés por encima de otras especies para utilizarlas como herramientas biotecnológicas.



MATERIALES Y MÉTODOS

Ámbito o lugar de estudio

La investigación fue realizada en el botadero de Cancharani, ubicado en el Departamento, Provincia y distrito de Puno, ubicado en el sur oeste de la comunidad campesina de Cancharani. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Humana y en el Megalaboratorio de la Universidad Nacional del Altiplano.

Descripción de métodos

Identificación de bacterias con capacidad de biodegradación del polietileno de baja densidad

Para el aislamiento y la identificación se trasladaron las muestras en recipientes estériles, se lavaron con solución salina al 0,85 % quitando todos los residuos posibles hasta que quede sin adherencias, se enjuagó con agua destilada estéril, luego se fraccionaron y fueron enjuagadas con agua destilada estéril durante 20 minutos, se fraccionaron las muestras en cuadrados de 1cm x 1cm previamente secadas y se sembraron en placas con agar MacConkey (AM), se incubó a 37 °C por 7 días (González 2019). Se tomó una muestra de colonias de bacterias y se realizaron repiques en agar cetrímide (AC) se incubaron a 37 °C por 48 horas, para obtener cultivos puros. Después se realizó la identificación con la tinción de Gram (Koneman & Allen 2008). Las cepas axénicas se mantuvieron viables para su posterior utilización (Kyaw *et al.* 2012)

Para las lecturas finales y de confirmación, se utilizó el kit de pruebas bioquímicas (TSI, LIA, CITRATO, SIM). Posteriormente se llevó la muestra al hospital ESSALUD Puno, y con ayuda del instrumento WalkAway 96 plus se sometió a una prueba de análisis final para comprobar y validar la cepa. A la muestra sometida al análisis de identificación de bacterias, se le asignó por nombre cepa pura (Begum *et al.* 2015).

Adaptación del metabolismo de cepas puras en medios sintéticos con polietileno de baja densidad

Se inoculó en un matraz (P1) de 10ml de capacidad con 5ml de caldo nutritivo más medio mineral (CNMM) compuesto de 3,8 g Na₂HPO₄.12H₂O, 1,8 g KH₂PO₄, 0,02 g MgSO₄.7H₂O, 0,03 g Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O, 0,01 g CaCl₂.2H₂O, 0,5 g NaCl, 0,3 g NH₄Cl y 1 ml de solución de oligoelementos por litro: 0,20 g MnSO₄, 0,029 g H₃BO₃, 0,022 g ZnSO₄.7H₂O, 1,0 g Na₂MoO₄, trazas de Co(NO₃)₂ y trazas de CuSO₄ disueltos en 500 ml de agua (Fontanella *et al.* 2013) a 37 °C por 72 horas. Se tomaron 4ml de P1 y se colocaron en el matraz P2 que contenía 1 ml de CNMM + 0.002g de PEBD, se tomó una alícuota de 3ml y se inoculó en el matraz P3 que contenía 2 ml

de CNMM + 0,004g, 2ml del P3 y se inocularon en el P4 con 3ml de CNMM + 0,006g, 1ml del P4 y se colocó en el P5 con 4ml de CNMM + 0,008g. Finalmente se tomó una alícuota de 0.5ml del P5 y se colocó en el P6 con 4.5ml de CNMM con 0,009g de PEBD. Este matraz se colocó nuevamente a 37 °C por 72 horas y se observó la turbidez cada día. Del último ensayo se tomó una alícuota de 1ml para las siembras en agar nutritivo, se incubó a 37 °C por 72 horas.

Determinación de las condiciones de temperatura y pH donde *Pseudomonas aeruginosa* logra mayor actividad biodegradativa frente al polietileno de baja densidad

La prueba cuantitativa de la biodegradación del PEBD consistió en pesar con una balanza analítica el material antes y después de realizar una prueba de cultivo (Acuña 2017). Se procedió nuevamente a inocular la cepa adaptada en CNMM a 37 °C por 1 semana. Se procedió a fraccionar el PEBD en cuadrados de 2cm x 2cm y se pesaron en balanza analítica (peso inicial), se colocaron los cuadrados en 12 matraces que contenían CNMM con la suspensión bacteriana y se ajustó el pH a 5,0 y a 7,0, como controles se utilizaron matraces sin polietileno con cepas bacterianas y matraces con polietileno sin cepas bacterianas, se llevó a incubación a 25 °C y 35 °C durante 30 días, periódicamente se fueron agitando y observando el ataque bacteriano (que significa actividad biodegradadora) (González 2019; Mumtaz *et al.* 2006).

Después de los 30 días de incubación se separó el material plástico del CNMM, en una cámara de flujo laminar se desinfectaron los cuadrados de PEBD para eliminar la película o biofilm generado en la superficie con etanol al 70 % durante 30 minutos, luego se lavaron con agua destilada estéril por 10 minutos, fueron secados con papel filtro y colocados a la estufa a 40 °C por 15 minutos (Das & Brar 2013). Para obtener el porcentaje de pérdida de peso se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%p\acute{e}rdida = \frac{(W_{inicial} - W_{final})}{W_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Kyaw } et al. 2012)$$

Se aplicó el diseño estadístico del modelo de efectos fijos, para demostrar la eficacia de *Pseudomonas aeruginosa* frente al polietileno a 25 °C – 35 °C y pH de 5,0 – 7,0. Seguidamente se realizó la prueba de comparación de medias y así demostrar si los dos factores presentan diferencia significativa (0,05:5 %).

Para la prueba cualitativa de la biodegradación del PEBD, se separó el material plástico del CNMM, observando al estereoscopio y microscopio los cambios que presento en cuanto refiere a la pérdida de color, brillo, presencia de porosidad, fisuras o grietas en las superficies crecimiento

sobre y debajo de la superficie, presencia de biopelículas, biocapas o biofilms (Acuña 2017). La viabilidad de la biopelícula bacteriana (biofilm) fue determinada con el microscopio de fluorescencia con Rodamina B (Chavant *et al.* 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias con capacidad de biodegradación frente al polietileno

Se registró crecimiento de colonias por 24, 48 y 72 horas en AM y AC, se seleccionó las placas con mejores características morfológicas y de color para la identificación de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados obtenidos de las pruebas de reconocimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* por medio de tinción de Gram y pruebas bioquímicas de TSI, LIA, CITRATO y SIM confirmaron el tipo de cepa, la cual posee características de ser bacterias Gramnegativas (Ruíz 2007; Ortiz *et al.* 2004); (Pramila *et al.* 2012); (Begum *et al.* 2015), la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* con coloración amarillo-verdosa por la producción de pioverdina, se considera como sideróforo (Revelles *et al.* 2005).

La validación de la cepa se realizó con el instrumento WalkAway 96 Plus (Hussein, Al-Mayaly, & Khudeir 2015).

Adaptación del metabolismo de cepas puras en medios sintéticos con polietileno de baja densidad

La adaptación se desarrolló de forma gradual, las colonias en CNMM con diferentes concentraciones de polietileno de baja densidad fueron incubadas en un periodo de 24 - 72 horas, el matraz P6 desarrollo crecimiento bacteriano en un tiempo de 24 - 72 horas a 37 °C. En períodos determinados de tiempo, la adaptabilidad no sólo le otorga la versatilidad a la cepa bacteriana, el ser mesófila permite trabajar en un rango amplio de temperatura y potenciar los resultados (Cava *et al.* 2009).

Las bacterias cuya pared celular es la primera en tener contacto con el nuevo entorno que es fundamental para su supervivencia, cuando las condiciones ambientales no son favorables, ya sea por falta de nutrientes o por algún tipo de estrés al que se le someta (Cava *et al.* 2011); al ser la pared celular el primer contacto, le permite a la bacteria protegerse y comunicarse con su entorno, la adaptación se llevó en períodos moderados de tiempo añadiendo distintas concentraciones de PEBD (Singh *et al.* 2015; Pramila *et al.* 2012; Rajandas *et al.* 2012; Nanda *et al.* 2010).

Condiciones de temperatura y pH donde *Pseudomonas aeruginosa* logra mayor actividad biodegradativa frente al polietileno

Después de 30 días de incubación en el CNMM, se realizó la comparación de pérdida de peso, en la table se puede observar el promedio de los pesos inicial y final del polietileno de baja densidad, la biodegradación a temperaturas de 25 °C y 35 °C a un pH de 5,0 y 7,0, lo cual refleja que la temperatura óptima de biodegradación es a un rango de temperatura de 25 °C a 35 °C a un pH de 7,0., el pH tiene efectos significativos en la variación del peso, existe diferencias a un nivel de (0,05) 5 % de significancia entre los valores del pH, por lo tanto podemos afirmar que la degradación es más significativa en un pH de 7,0., el porcentaje de biodegradación para las temperatura de 25 °C y 35 °C a un pH 5.0 los valores de 4.5 % y 8,7 %; para las temperaturas de 25 °C y 35 °C a un pH 7,0 los valores de 21,7 % y 27,3 % respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de temperatura y pH donde *Pseudomonas aeruginosa* logra mayor actividad biodegradadora.

| Medio de cultivo | T° | pH | \bar{X}_{PI} | \bar{X}_{PF} | % |
|------------------|----|-----|----------------|----------------|--------|
| CNMM | 25 | 5,0 | 0,022 | 0,021 | 4,5 % |
| | | 7,0 | 0,023 | 0,018 | 21,7 % |
| | 35 | 5,0 | 0,023 | 0,021 | 8,7 % |
| | | 7,0 | 0,022 | 0,016 | 27,3 % |

Estos resultados concuerdan con (Ren *et al.* 2018) la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* crece en un rango de temperatura de 10 y 42 °C, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 35 – 37 °C, con una actividad biodegradativa superior a un pH neutro, a pH extremadamente alcalinos o extremadamente ácidos la biodegradación se hace lenta, el rango óptimo para la biodegradación está entre 6 – 8 pH. Sin embargo, para mantener una mejor capacidad degradante, por periodos de tiempo prolongados, el pH debe ser neutro, entre 7,4 – 7,8 (Romero *et al.* 2008; Jailawi *et al.* 2015).

La biodegradabilidad o biodegradación es un proceso metabólico y enzimático realizado por los microorganismos como bacterias y algunos hongos, los cuales secretan enzimas que se encargan de romper la estructura molecular del plástico reduciéndolo (degradando) en su peso a través del tiempo (Tokiwa *et al.* 2009); en 4 semanas obtuvo un 21 % de degradación a 30 °C por *Pseudomonas aeruginosa* (Kumari *et al.* 2009); *Pseudomonas alcaligenes* con un 20,1 % a los 30 días a 37 °C (Begum *et al.* 2015); demostraron que *Brevibaccillus borstelensis* en 30 días, 50 °C redujo sus pesos gravimétricos en 30 % (Hadad 2005).

Para lograr un porcentaje de biodegradación mayor sería necesario realizar el proceso en un tiempo más prolongado y a una mayor temperatura, *Pseudomonas* logró una biodegradabilidad

del 40,5 % en 8 semanas a 40 °C (Nanda *et al.* 2010); *Pseudomonas sp.* del vertedero de lodos degrada el polietileno de manera eficiente con 46.2%, *Pseudomonas sp.* del basurero del hogar 31,4 %. y *Pseudomonas sp.* aislado del sitio de drenaje de efluentes textiles dio una biodegradabilidad intermedia de 39,7 % en 8 semanas a 40 °C (Nanda & Sahu 2010); *P. aeruginosa* degradó 50,5 % en 2 meses (Rajandas *et al.* 2012). Estos resultados difieren de (Nanda & Sahu 2010) el porcentaje de degradación de *Pseudomonas* fue del 40,5 % en 3 semanas a 40 °C, estos resultados se debieron a que las cepas fueron previamente adaptadas.

La prueba cualitativa confirma los cambios visibles en el polietileno de baja densidad, los efectos utilizados para describir la biodegradación incluyen corrosión de la superficie, la formación de agujeros y grietas, la fragmentación e inclusive la decoloración así como la formación de biopelículas o biofilms en la superficie, los cambios superficiales del PEBD observados con un microscopio compuesto evidencian la presencia de grietas y fisuras (B) a diferencia de la muestra control (A) que no presenta cambios superficiales (figura 1).

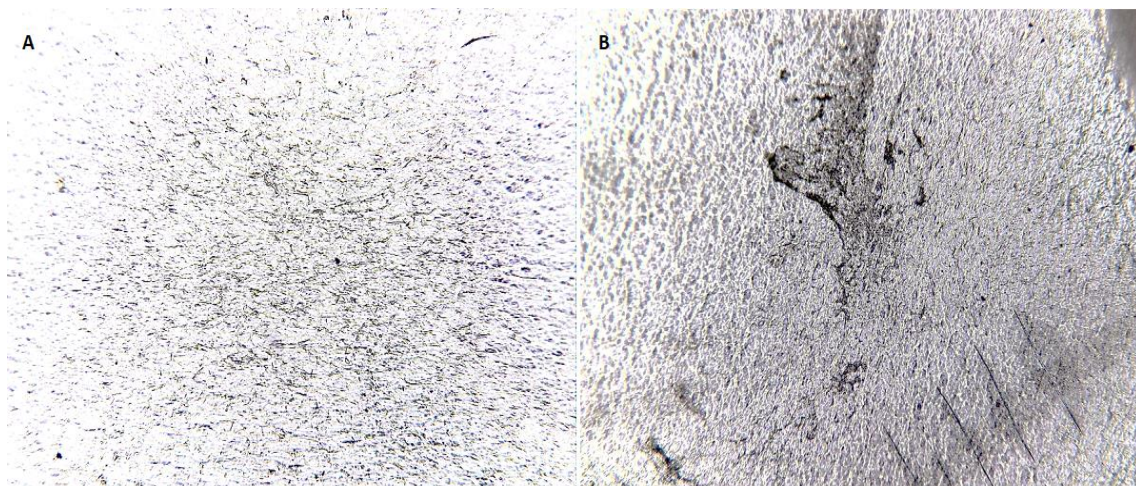


Figura 1. Cambios superficiales en la superficie del PEBD.

Estos cambios demuestran un proceso metabólico de biodegradación, el parámetro de cambios en la observación puede ser utilizado como un primer indicador de ataque bacteriano, este método también puede ser utilizado para obtener resultados cualitativos (Ishigaki *et al.* 2000), para evidenciar con más claridad estos cambios es necesario el uso del microscopio electrónico de barrido (Bhatia *et al.* 2014; Anwar *et al.* 2013).

Dado que la biodegradación y la utilización de polietileno es un proceso lento, requiere que la biopelícula esté activa durante un período de tiempo, esto se evidencia con el número de organismos vivos en el PEBD que se observan como manchas amarillo verdosas (B) en comparación con el PEBD control (A), donde no se observa crecimiento bacteriano (figura 2).

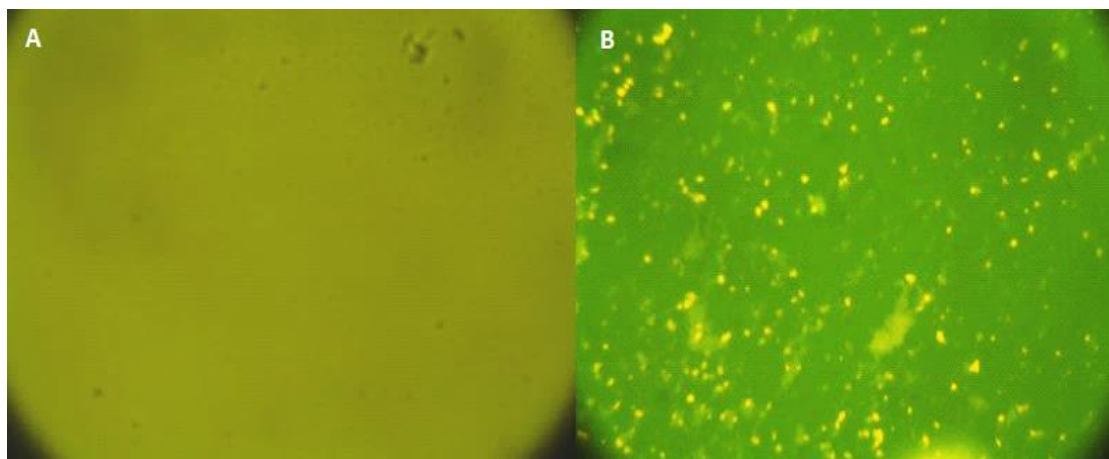


Figura 21. Viabilidad de la formación del biofilm (biopelícula) bacteriano.

Así lo afirma Tribedi, Gupta & Sil (2015); Yang *et al.* (2014); Tribedi & Sil (2013) Para verificar la actividad metabólica de la biopelícula en la superficie de polietileno se utiliza el microscopio de fluorescencia para evidenciar la viabilidad de células en la superficie mediante la tinción de bacterias con fluorocromos (Tribedi *et al.*, 2015; Yang *et al.* 2014; Tribedi & Sil 2013).

CONCLUSIONES

La bacteria aislada del botadero de Cancharani se identificó como *Pseudomonas aeruginosa*, la cual tiene capacidad de biodegradación frente al polietileno de baja densidad. El proceso de adaptación de la cepa identificada como *Pseudomonas aeruginosa* es una alternativa para potenciar la capacidad y actividad biodegradativa. Según las condiciones de temperatura y pH, *Pseudomonas aeruginosa* es un buen biodegradador de polietileno a temperaturas de 25 y 35 °C a un pH de 7,0 formando biopelícula gruesa con aspecto gelatinoso y tiene capacidad para adherirse al polietileno de baja densidad.

CONFLICTO DE INTERÉS

La autora (SBBP), no tiene conflictos de intereses con otros autores.

REFERENCIAS

- Acuña N. R. 2017. *Revisión Bibliográfica sobre los Microorganismos Biodegradadores de Polietileno de Baja Densidad LDPE y sus Efectos en el Material* [Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá]. <http://repository.udistrital.edu.co/handle/11349/5608>
- Anwar M., Negi H., Zaidi M., Haider G., Gupta S., Goel R. 2013. Biodeterioration studies of thermoplastics in nature using indigenous bacterial consortium. *Brazilian Archives of*

Biology and Technology, 56(3), 475–484. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300016>

Apiplast 2012. *Situación de la industria plástica en el Perú*.

Begum N., Stephens, S., Schoeman O., Franschke A., Kirsch B., Briere J.-B., Verheugt F. W. A., van Hout B. A. 2015. Cost-effectiveness Analysis of Rivaroxaban in the Secondary Prevention of Acute Coronary Syndromes in Sweden. *Cardiology and Therapy*, 4(2), 131–153. <https://doi.org/10.1007/s40119-015-0041-3>

Bhatia R., Ortega L., Dash A. P., Mohamed A. J. 2014. Vector-borne diseases in South-East Asia: burdens and key challenges to be addressed. *WHO South-East Asia Journal of Public Health*, 3(1), 2–4. <https://doi.org/10.4103/2224-3151.115828>

Cava F., de Pedro M. A., Lam H., Davis B. M., Waldor M. K. 2011. Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *The EMBO Journal*, 30(16), 3442–3453. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.246>

Cava F., Hidalgo A., Berenguer J. 2009. *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles : Life under Extreme Conditions*, 13(2), 213–231. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0226-6>

Chavant P., Martinie B., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M.-N., Hebraud M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 728–737. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.728-737.2002>

Cole M., Lindeque P., Fileman E., Halsband C., Goodhead R., Moger J., Galloway T. S. 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental Science & Technology*, 47(12), 6646–6655. <https://doi.org/10.1021/es400663f>

Das R. K., rar S. K. 2013. Plant mediated green synthesis: modified approaches. *Nanoscale*, 5(21), 10155–10162. <https://doi.org/10.1039/C3NR02548A>

Engler R. E. 2012. The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean. *Environmental Science & Technology*, 46(22), 12302–12315. <https://doi.org/10.1021/es3027105>

Fontanella S., Bonhomme S., Brusson J. M., Pitteri S., Samuel G., Pichon G., Delort A. M. 2013. Comparison of biodegradability of various polypropylene films containing pro-oxidant additives based on Mn, Mn/Fe or Co. *Polymer Degradation and Stability*, 98(4 SRC-BaiduScholar FG-0), 875–884. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.01.002>

González V. 2019. *Capacidad biodegradativa de hongos filamentosos frente al polietileno*. [Universidad Nacional del Altiplano]. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/12254>

- Greenpeace 2019. Plásticos en los océanos. Datos, comparativas e impactos. In *Dossier de prensa España Disponible en greenpeace.org*. www.greenpeace.org
- Hadad D., Geresh S., Sivan A. 2005. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1093–1100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x>
- Huerta E. 2018. El plástico y su impacto ambiental. In *El comercio Lima* <https://elcomercio.com.pe>
- Hussein A. A., Al-Mayaly I. K., Khudeir S. H. 2015. Isolation, Screening and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) degrading bacteria from contaminated soil with plastic wastes. *Mesopotamia Environ J*, 1(4 SRC-BaiduScholar FG-0), 1–14. <https://www.iasj.net/iasj?func=article&aId=171203>
- Ishigaki T., Sugano W., Ike M., Fujita M. 2000. Enzymatic degradation of cellulose acetate plastic by Novel degrading bacterium *Bacillus* sp. S2055. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(4), 400–405. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80008-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80008-6)
- Ivleva N. P., Wiesheu A. C., Niessner R. 2017. Microplastic in Aquatic Ecosystems. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 56(7), 1720–1739. <https://doi.org/10.1002/anie.201606957>
- Jailawi M. H. A., Ameen R. S., Saraf A. A. A. 2015. Polyethylene degradation by *Pseudomonas putida* S3A. *Int J Adv Res Biol Sci*, 2(1 SRC-BaiduScholar FG-0), 90–97. https://www.researchgate.net/publication/283459113_Polyethylene_degradation_by_Pseudomonas_putida_S3A
- Kannahi M., Sudha P. 2013. Screening of polythene and plastic degrading microbes from Muthupet mangrove soil. *Pharm Res*, 5(8), 122–127. www.jocpr.com
- Koneman E. W., Allen S. 2008. *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto En Color/Text and Color Atlas*. https://books.google.com.pe/books/about/Koneman_Diagnostico_Microbiologico_Micro.html?id=jyVQueKro88C
- Kumari K., Aanad R. C., Narula, N. 2009. *Microbial degradation of polyethylene (PE)*. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*. 27(1 SRC-BaiduScholar FG-0), 66–70. <https://doi.org/10.1071/SP09012>
- Kyaw B. M., Champakalakshmi R., Sakharkar M. K., Lim C. S., Sakharkar K. R. 2012. Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3), 411–419. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0250-6>
- Lee B., Pometto A. L., Fratzke A., Bailey T. B. 1991. Biodegradation of degradable plastic

- polyethylene by phanerochaete and streptomyces species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3), 678–685. <http://www.ncbi.n>
- Méndez C. R., Vergaray G., Béjar V. R., Cárdenas K. J. 2007. Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Peruana de Biología*, 13(3 SRC-BaiduScholar FG-0), 203–206. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v13n3/v13n03a08.pdf>
- Mumtaz T., ParvinNur H., Khan M. R., Bangladesh J. 2006. Susceptibility of low density polyethylene films to pond water microflora. *Bot*, 35(1 SRC-BaiduScholar FG-0), 31–37. https://www.researchgate.net/profile/Tabassum_Mumtaz/publication/255983611_Susceptibility_of_low_density_polyethylene_films_to_pond_water_microflora/links/0c96052144afe50212000000/Susceptibility-of-low-density-polyethylene-films-to-pond-water-microflora.p
- Municipalidad Provincial de Puno 2019. *Estudio de caracterización de residuos sólidos municipales del distrito de Puno-2019*. www.munipuno.gob.pe
- Nanda, S., Sahu, S., Abraham, J., & Sahu, S. S. (2010). Studies on the biodegradation of natural and synthetic polyethylene by *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 14(2 SRC-BaiduScholar FG-0), 95–98. <https://doi.org/10.4314/jasem.v14i2.57839>
- Nanda S., Sahu S. S. 2010. Biodegradability of polyethylene by *Brevibacillus Pseudomonas* and *Rhodococcus* spp. *New York Science Journal*, 3(7), 95–98. <https://www.semanticscholar.org/paper/Biodegradability-of-polyethylene-by-Brevibacillus%2C-Nanda-Sahu/a33b3c8541c3387b2c27be1a2f68a43d1d529a2e>
- Ortiz H., Cuevas S., Coria J. 2004. Caracterización por RAPDPCR de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *A F Prez F L R C*, 46(2 SRC-BaiduScholar FG-0), 149–157. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342004000200009
- Paço, A., Duarte, K., da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Pereira, R., Pereira, M. E., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *The Science of the Total Environment*, 586, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.017>
- Plastics Europe. 2010. *Plastics*. http://www.plasticseurope.org/Documents/Document/20100226115604- Full_Spain.pdf
- Pramil R., Padmavathy K., Ramesh K. V., Mahalakshmi K. 2012. *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas citronellolis*-Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE). *African Journal of Bacteriology Research*, 4(1 SRC-BaiduScholar FG-0), 9–14. <https://doi.org/10.5897/JBR12.003>

- Rajandas H., Parimannan S., Sathasivam K., Ravichandran M., Yin L. S. 2012. A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. *Polymer Testing*, 31(8 SRC-BaiduScholar FG-0), 1094–1099. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2012.07.015>
- Ren J., Lin W. T., Shen Y. J., Wang J. F., Luo X. C., Xie M. Q. 2018. Optimization of fermentation media for nitrite oxidizing bacteria using sequential statistical design. *Bioresource Technology*, 99(17), 7923–7927. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.027>
- Revelles O., Espinosa-Urgel M., Fuhrer T., Sauer U., Ramos J. L. 2005. Multiple and interconnected pathways for L-lysine catabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7500–7510. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7500-7510.2005>
- Romero S. E. G., Bustos D. C. G., Casallas M. L., Vargas P. C. M. 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, 6(9 SRC-BaiduScholar FG-0), 76–84. <https://doi.org/10.22490/24629448.398>
- Ruíz M. L. 2007. *Pseudomonas aeruginosa: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos* [Universidad de Barcelona]. <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42532>
- Seymour R. B. 1899. Polymer science before and after : notable developments during the lifetime of Maurits Dekker. *Journal of Macromolecular Science Chemistry*, 26(8 SRC-BaiduScholar FG-0), 1023–1032. <https://doi.org/10.1080/00222338908052032>
- Shah S. R., Najim N. I., Shah Nawaz W., Jangda A. A. 2019. Comments on: “High ankle-brachial index and risk of cardiovascular or all-cause mortality: A meta-analysis”. *Atherosclerosis*, 284, 267. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.028>
- Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., Kumar, S. 2015. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 22(4), 526–539. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216>
- Singh J., Gupta, K. C., Shrivastava A. 2015. Isolation and identification of low density polyethylene (LDPE) degrading bacterial strains from polythene polluted sites around GWALIOR CITY (M.P.). *Journal of Global Biosciences*, 4(8 SRC-BaiduScholar FG-0), 3220–3228. <https://www.mutagens.co.in/jgb/vol.04/8/040829.pdf>
- Skariyachan S., Megha M., Kini M. N., Mukund K. M., Rizvi A., Vasist K. 2015. Selection and screening of microbial consortia for efficient and ecofriendly degradation of plastic garbage collected from urban and rural areas of Bangalore, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(1), 4174. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4174-y>
- Tellez A. 2004. *La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una*

aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá (Vol. 304, Issues 5672 SRC-BaiduScholar FG-0) [Universidad de Bogotá].

<http://bdigital.unal.edu.co/7080/1/905077.2012.pdf>

Thompson R. C., Olsen Y., Mitchell R. P., Davis, A., Rowland S. J., John A. W., Russell, A. E. (2004). Lost at sea: where is all the plastic? *Science*, 304(5672), 838–838.

www.sciencemag.org/cgi/content/full/304/5672/838/%0ADC1

Tokiwa Y., Calabia B. P., Ugwu, C. U., Aiba S. 2009. Biodegradability of plastics.

International Journal of Molecular Sciences, 10(9), 3722–3742.

<https://doi.org/10.3390/ijms10093722>

Tribedi P., Gupta A. D., Sil A. K. 2015. Adaptation of *Pseudomonas* sp. AKS2 in Biofilm on Lowdensity Polyethylene Surface an Effective Strategy for Efficient Survival and Polymer Degradation *Bioresources and Bioprocessing* 14, 2(1 SRC-BaiduScholar FG-0).

<https://doi.org/10.1186/s40643-015-0044-x>

Tribedi P., Sil A. K. 2013. Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(6), 4146–4153.

<https://doi.org/10.1007/s11356-012-1378-y>

Wu T., Jahan S. A., Zhang Y., Zhang J., Elmounayri H., Tovar, A. 2017. Design optimization of plastic injection tooling for additive manufacturing. *Procedia Manufacturing*, 10, 923–

934. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2017.07.082>

Yang J., Yang Y., Wu W.-M., Zhao J., Jiang L. 2014. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environmental Science &*

Technology, 48(23), 13776–13784. <https://doi.org/10.1021/es504038a>