

# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **Facultad de ciencias de la vida**

Determinación de las condiciones de un inóculo anaeróbico diseñado para biodegradar películas poliméricas y no poliméricas

### **PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Biólogo**

Presentado por:

René Orlando Molina Barreto, Valeria Katherine Muñoz Cali.

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

**Año: 2019**

## DEDICATORIA

Le dedico este proyecto a Dios, por brindarme los dones, fortaleza y sabiduría necesaria para lograr llevar a término este proyecto y mi vida universitaria a pesar de todas las adversidades. Le dedico el trabajo también a mi madre, mi padre y mi hermana por acompañarme y apoyarme durante el desarrollo de este proyecto y carrera. Le dedico también este trabajo a mi tutora Marynes Montiel Romero por sus enseñanzas y guía brindadas.

Dedico este proyecto a mi padre, que en paz descansa, a mi madre, a mis hermanas y a mi prima, que fueron quienes siempre me apoyaron a lo largo de mi carrera y me dieron las fuerzas para seguir adelante y nunca rendirme.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar a Dios por haberme brindado la fortaleza y sabiduría necesaria para poder afrontar este reto y por haberme sostenido en los momentos difíciles afrontados durante el desarrollo del Proyecto. Agradezco a mis padres y a mi hermana por el apoyo que siempre me brindaron durante toda mi vida estudiantil. Agradezco también a mi tutora Marynes Montiel Romero y los docentes de la Facultad de Ciencia de la Vida por su guía y enseñanzas brindadas durante todo el desarrollo del proyecto y carrera. Quiero agradecer a mis amigos y compañeros por hacer más amena la vida estudiantil y por tantas anécdotas compartidas.

Agradezco a mi tutora Marynes Montiel Romero por las enseñanzas compartidas a lo largo del proyecto, a los docentes de la facultad de ciencias de la vida por sus enseñanzas a lo largo de la carrera, también agradezco a mi padre, que en paz descansa, que fue una de las personas que me ayudo a salir adelante.

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Valeria Katherine Muñoz Cali y René Molina y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

---

Molina Barreto  
René Orlando

---

Muñoz Cali  
Valeria Katherine

# EVALUADORES

.....  
**Mgs. Diego Gallardo Polit**

PROFESOR TUTOR

.....  
**PhD. Marynes Montiel Romero**

PROFESOR DE LA MATERIA

## RESUMEN

Actualmente, la acumulación de desechos plásticos en el ambiente es un problema que se agrava cada día, debido tiempo que les toma degradarse y su perduración en el ambiente. Para aplacar este problema, en la ciudad de Guayaquil se emitió la ordenanza AG-2018-24410 que entró en vigor el 18 de septiembre del 2018 y da un plazo de 36 meses para que las empresas pongan un alto a producir, comercializar o utilizar plásticos de un solo uso. Para lograr este cometido, la empresa Sigmplast, encargada de diseñar empaques para grandes empresas multinacionales, requiere que se ponga a prueba la biodegradación de los materiales alternativos al plástico a través de un método de biodegradación en condiciones anaerobias. Para ello se requiere diseñar de un inóculo anaeróbico que cumpla con los parámetros establecidos en el método estándar, ASTM D5511-02. El presente proyecto tiene como objetivo determinar las condiciones óptimas de crecimiento de un inóculo anaeróbico diseñado para biodegradar películas poliméricas y no poliméricas, para lo cual se colocó MO (lodo de manglar) en botellas hermetizadas y se incubó durante 34 días a diferentes temperaturas (37°C y 52°C). Se determinó una variación morfología bacteriana los 19 días de estudio siendo las bacterias Gram – las que predominaron sobre las Gram +, en contraste con T0. Los parámetros de biogás, ST y SV medidos LM cumplen con el método estándar en que se basó la investigación. El inóculo anaerobio obtenido es un potencial candidato con bacterias facultativas que tiene la capacidad de degradar plásticos.

**Palabras Clave:** Inóculo, biodegradación, polímeros, morfología.

## **ABSTRACT**

*Currently, the accumulation of plastic waste in the environment is a problem that is getting worse every day, due to the time it takes to degrade and its endurance in the environment. To alleviate this problem, the AG-2018-24410 ordinance was issued in the city of Guayaquil, which entered into force on September 18, 2018 and allows 36 months for companies to stop producing, marketing or using plastics. single use only. To achieve this, the company Sigmplast, responsible for designing packaging for large multinational companies, requires that the biodegradation of alternative materials to plastic be tested through a biodegradation method under anaerobic conditions. This requires the design of an anaerobic inoculum that meets the parameters established in the standard method, ASTM D5511-02. This project aims to determine the optimal growth conditions of an anaerobic inoculum designed to biodegrade polymeric and non-polymeric films, for which MO (mangrove mud) was placed in sealed bottles and incubated for 34 days at different temperatures (37 ° C and 52 ° C). A bacterial morphology variation was determined the 19 days of study being the Gram bacteria - those that predominated over the Gram +, in contrast to T0. The parameters of biogas, ST and SV measured LM comply with the standard method on which the research was based. The anaerobic inoculum obtained is a potential candidate with facultative bacteria that has the ability to degrade plastics.*

*Keywords: Inoculum, biodegradation, polymers, morphology.*

# ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	V
RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i> .....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
CAPÍTULO 1.....	1
1.    Introducción.....	1
1.1    Descripción del problema.....	3
1.2    Justificación del problema.....	3
1.3    Objetivos.....	3
1.3.1    Objetivo General.....	3
1.3.2    Objetivos Específicos.....	3
1.4    Marco teórico.....	4
CAPÍTULO 2.....	6
2.    Metodología.....	6
2.1    Selección de muestras.....	6
2.2    Medición de Sólidos Totales y Volátiles.....	6
2.3    Siembra por extensión.....	8
2.4    Montaje del inóculo y medición de gas.....	8
2.5    Cuantificación, selección y tinción de colonias.....	9
CAPÍTULO 3.....	12

3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	12
3.1	Lodos de Manglar .....	13
3.2	Estiércol de vaca .....	15
3.2.1	Condiciones mesofílicas (37°C).....	16
3.2.2	Condiciones termofílicas (52°C) .....	17
3.3	UFC de materia orgánica (Lodo de Manglar y estiércol de vaca) .....	20
CAPÍTULO 4.....		22
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	22
4.1	Conclusiones .....	22
4.2	Recomendaciones .....	22
BIBLIOGRAFÍA.....		23

## **ABREVIATURAS**

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
ASTM	American Society for Testing and Materials
UFC	Unidades formadoras de colonias
PCA	Plate count agar
PDA	Potato dextrose agar
ST	Sólidos Totales
SV	Sólidos volátiles

## SIMBOLOGÍA

mg	Miligramo
pH	Potencial de Hidrógeno
ml	mililitros
ul	microlitros
C	Carbono
Na(OH)	Hidróxido de sodio
H <sub>2</sub> S <sub>03</sub>	Ácido sulfuroso

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Fórmula para el cálculo de sólidos totales.....	7
Figura 2.2: Fórmula para el cálculo de sólidos volátiles. ....	7
Figura 2.3: Método de extensión por placa.....	8
Figura 2.4: Diseño de montaje del inóculo.....	8
Figura 2.5: Diseño de placas por colonias.....	10
Figura 2.6 Guía para la identificación de morfología bacteriana.....	10
Figura 2.7: Método de tinción de Gram .....	10
Figura 3.1: Porcentaje de bacterias Gram + y - en T0 y en T1.....	14
Figura 3.2: Porcentaje de morfologías presentes en T0 y T1.....	15
Figura 3.3: Producción de gas a condiciones ambiente.....	16
Figura 3.4: Producción de gas a condiciones termofílicas.....	17
Figura 3.5: Porcentaje de bacterias Gram + y -.....	18
Figura 3.6: Frecuencia de las 3 morfologías a los 3 % en las botellas poco alimentadas.....	19
Figura 3.7 Frecuencia de las 3 morfologías a los 3 % en las botellas alimentadas...	20
Figura 3.8: UFC de estiércol y lodo al 25 y 30% en T1 a 52°C...	21
Figura 3.9: morfologías presentes en estiércol y lodo al 25 y 30% en T1 a 52°C...	21

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Pesos en gramos por crisol.....	7
Tabla 2.2: Cantidad de colonias por dilución y porcentaje.....	9
Tabla 2.3: Características morfológicas por colonia.....	9
Tabla 3.1. Valores medidos para el cálculo de solidos totales.....	12
Tabla 3.2. Ajuste de pH en muestras a ingresar en biodigestor.....	13
Tabla 3.3. Conteo de colonias.....	13
Tabla 3.4. Unidades formadoras de colonias UFC para lodos.....	14
Tabla 3.5: Porcentajes de tinciones de Gram y Morfología en el T0 y T1.....	14
Tabla 3.6: mediciones diarias de biogás.....	15
Tabla 3.7: Conteo de colonias para estiércol a 52°C.....	17
Tabla 3.8: Unidades formadoras de colonias UFC para estiércol.....	18
Tabla 3.9: Total y porcentaje de las tinciones de Gram.....	18
Tabla 3.10: # de tinciones de Gram y # de veces que aparece cada morfología por %.....	19
Tabla 3.11: UFC de lodos y estiércol al 25% y 30% en T1 a 52°C.....	20
Tabla 3.12: Tinción de Gram de lodos y estiércol al 25% y 30% en T1 a 52°C.....	21

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

Los productos plásticos son ampliamente utilizados en la vida cotidiana, principalmente debido a la resistencia y durabilidad que poseen, propiedades que hacen factible su aplicabilidad frente a otros productos elaborados con materiales diferentes. Sin embargo, son estas mismas propiedades las que han provocado una creciente demanda de productos plásticos por parte de la población mundial, haciendo difícil el manejo de los desechos producidos y generando así una gran acumulación de los mismos en el ambiente (Segura, 2017).

De acuerdo con un informe del Banco Mundial, en 2016 se generaron 242 millones de toneladas de desechos plásticos en el mundo y se estima que para el 2050 se generen 3.40 mil millones de toneladas de desechos (Kaza, 2018). El Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) informó que, en el Ecuador, anualmente se producen alrededor de 200 kg de residuos sólidos por persona residente del área urbana, de acuerdo con la Estadística de Información Ambiental Económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales, correspondientes al año 2016 (INEC, 2018).

Una correcta gestión de los desechos plásticos es clave para garantizar la sostenibilidad de las ciudades y construir una economía circular, sin embargo, este aspecto muchas veces es dejado en segundo plano, sobre todo en los países en vías de desarrollo (Kaza, 2018). En la actualidad, las investigaciones relacionadas con el problema de los plásticos buscan generar diferentes alternativas eficientes para generar soluciones óptimas, siendo la biodegradación como una de las más factibles.

La biodegradación es la propiedad que poseen una o más cepas de microorganismos para utilizar un polímero sintético como fuente única de carbono y energía, misma que puede verse afectada por diversos factores en la naturaleza. Existen dos procesos diferentes en cuanto a biodegradación: una de ellas es por acción directa, donde los materiales plásticos otorgan un recurso trófico para el crecimiento de los microorganismos, deteriorándose en el proceso; y otra de ellas es por acción indirecta, en la que los productos generados por los procesos metabólicos de los microorganismos provocan la degradación de los plásticos (Caruso, 2015).

En los últimos años se han realizados investigaciones enfocadas en la acción microbiana capaz de biodegradar diferentes tipos de polímeros. Autores como Grados, 2018 y Uribe, 2010 trabajaron con consorcios microbianos aislados de desechos agrícolas y un relleno sanitario respectivamente, con el objetivo de evaluar su capacidad de biodegradación. Este tipo de microorganismos poseen la propiedad de degradar polímeros naturales o sintéticos, utilizando estos materiales como sustrato para los procesos de crecimiento y desarrollo (Priya, 2016). Existe también plásticos sintéticos cuya dureza y su no solubilidad en agua hace complicada su biodegradación por parte de los microorganismos, por este motivo se están optando por los llamados plásticos naturales o bioplásticos (Alshehrei, 2017).

Recientemente en el Ecuador, se han generado ordenanzas y leyes de manera que las industrias encargadas de la fabricación y distribución de películas poliméricas, materia prima para la elaboración de productos plásticos, ajusten las propiedades de sus polímeros de manera que su tiempo de permanencia en el ambiente sea reducido. Una de ellas es la ordenanza AG-2018-24410, que regula la fabricación y distribución de productos plásticos de un solo uso, cuya emisión ha hecho que varias empresas que forman parte de la industria de plásticos comiencen a buscar alternativas para cumplir con la misma en el tiempo establecido.

Por esta razón, el Grupo Sigmaplast PIFO, convertidores de películas flexibles, busca que sus diferentes opciones de aditivos a ser agregados a los polímeros, cumplan con la propuesta de disminuir el tiempo de degradación de los polímeros de origen fósil. Respondiendo a la necesidad de nuestro cliente de que estos aditivos sean puestos a prueba en cuanto a su degradación en el ambiente y a la petición de que el producto sea evaluado basándose en el método estándar D5511-02, para la biodegradación en sistemas anaerobios, se toma la iniciativa de llevar a cabo el proyecto descrito a continuación.

## **1.1 Descripción del problema**

El tiempo de permanencia de los productos plásticos de un solo uso en el medio ambiente, generados por la industria en la ciudad de Guayaquil requiere ser reducido para el cumplimiento de la ordenanza AG-2018-24410, la cual tiene por objetivo reemplazar los materiales con los que se elabora el plástico de un solo uso por materiales 100% biodegradables en un plazo de 36 meses, luego de emitida la ordenanza. el grupo Sigmaplast PIFO convertidores de películas flexibles, requiere evaluar si los aditivos a utilizar en el mercado nacional reducen considerablemente el tiempo en que se degradan los plásticos de un solo uso.

## **1.2 Justificación del problema**

La importancia de determinar los parámetros óptimos para la biodegradación, a través del uso de microorganismos sembrados en un inóculo compuesto por materia orgánica, radica en buscar procesos sostenibles para el tratamiento de desechos sólidos de manera que el tiempo de permanencia de estos en el ambiente sea mínimo y se reduzca el grado de contaminación generado por estos productos que a largo plazo repercuten en la conservación de ecosistemas y salud humana.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

- Evaluar las características de un inóculo propuesto como una alternativa para la biodegradación de películas poliméricas y no poliméricas.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

1. Elaborar un inóculo anaerobio a partir de diferentes fuentes de materia orgánica.
2. Demostrar si el inóculo elaborado cumple con los parámetros establecidos en la norma ASTM D5511-02 para la biodegradación de plásticos.
3. Caracterizar microbiológicamente el inóculo propuesto mediante la cuantificación e identificación morfológica de los organismos presentes.

#### 1.4 Marco teórico

Un inóculo anaerobio consiste en un conjunto de desechos orgánicos los cuales han sido digeridos anaeróbicamente y contienen una concentración elevada de microorganismos anaerobios que en su mayoría producen metano o dióxido de carbono (INEN, 2012). Un digestor anaerobio se encarga de la descomposición de materia orgánica, este proceso ocurre en cuatro etapas diferentes: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis; mediante este proceso de descomposición de materia orgánica se logra producir biogas el cual esta compuesto por metano, dióxido de carbono y otros gases traza (Insam Franke-whittle, & Goberna, 2010); según el metodo estandar para biodegradación en condiciones anaerobias el inoculo debe derivarse de un biodigestor anaerobio que haya operado correctamente durante cuatro meses y cuya producción de biogas sea de 15 ml por gramo de sólido (ASTM, 2002) para lo cual también debe considerarse la elaboración de un digestor anaerobio que utilice desechos animales como sustrato.

Para el efecto del desarrollo de un inóculo anaerobio se consideran microorganismos reportados como degradadores de productos plásticos a formas no tóxicas, entre los cuales se encuentran *Rhodococcus ruber* el cual es capaz de degradar hasta un 8% del peso seco en plástico en un cultivo in vitro (Das, 2014), bacterias gram positivas pertenecientes al genero *Streptococcus*, *staphylococcus*, *micrococcus*, bacterias gram negativas pertenecientes al genero *pseudomonas* y *moraxella* las cuales fueron reportadas en el suelo de manglar como posibles microorganismos degradadores de plástico (Kathiresan, 2003).

Partiendo desde el punto de vista microbiológico, se puede inferir que el suelo de manglar contiene los organismos necesarios para el desarrollo del inóculo, sin embargo existen otros tipos de fuente de materia orgánica ideales como sustrato para un inóculo anaeróbico a condiciones ambiente o termofílicas, entre los cuales se encuentran los lodos activados desechados de una planta de tratamiento de agua, que contienen bacterias del género *Thermus*, *Bacillus* y *Geobacillus*, que colonizan partículas de microplásticos, degradándolas en un 43,7% en condiciones termofílicas de 70°C (Chen, 2019). Por otro lado, también se puede usar como fuente principal desechos sólidos urbanos los cuales bajo condiciones termofílicas de 52° logran degradar hasta un 0,31%, y un 77,49% el polietileno y una película polimérica de origen vegetal, respectivamente (Camacho, 2014).

En una alta concentración de sólidos totales (más del 20%) la biodegradación de un material de origen vegetal como la celulosa debe ser mayor al 70% en un plazo de 15 días, para considerar al inóculo anaeróbico como efectivo (ASTM, 2002); en cada muestra polimérica o no polimérica el porcentaje de carbono debe ser transformado a carbono gaseoso (CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>), razón por la cual también se considera la naturaleza de la muestra a ser probada. Actualmente existen películas flexibles como el Almidón-poliuretano el cual al ser enterrados durante un plazo de 180 días presentan biodegradación de hasta un 72,50% (Tai, 2019) estos avances en cuanto al desarrollo de nuevos materiales biodegradables serían considerados de gran importancia para la mitigación de la contaminación por plásticos y son un punto de partida para el desarrollo de métodos de biodegradación bajo condiciones aceleradas.

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

La metodología aplicada en este estudio es de tipo experimental, en la cual se modificarán las variables: tipo de sustrato utilizado en el digestor anaerobio, alimentación del digestor anaerobio y temperatura. En la variable tipo de sustrato utilizado en el digestor anaerobio se consideraron tres posibles fuentes: lodos activados de una planta de tratamiento de agua, sedimento de manglar, y estiércol de bovino. En la variable alimentación del digestor anaerobio se utilizó una solución de sacarosa al 10% para el caso del digestor anaerobio diseñado con lodo de manglar como fuente de materia orgánica; y en el caso del digestor anaerobio diseñado con estiércol de bovino como fuente de materia orgánica no se alimentó durante el proceso de digestión. En la variable temperatura se consideraron condiciones termofílicas (52°) y condiciones mesofílicas (37°).

### 2.1 Selección de muestras

Se utilizó el método estándar para biodegradación de plásticos (D5511-02) como referencia para la selección de muestras. En este método se menciona que el inóculo debe utilizar como principal sustrato materia orgánica originada de plantas de tratamiento de residuos, por lo cual inicialmente se consideró el uso de lodos activados derivados de la planta de tratamiento ubicada en el campus Gustavo Galindo de la Escuela Superior Politécnica del litoral detrás del edificio de admisiones. también se consideró el uso de sedimento de manglar debido a que en el mismo se reporta la presencia de potenciales organismos degradadores de plásticos (Kathiresan, 2003).

### 2.2 Medición de Sólidos Totales y Volátiles

Se limpiaron debidamente 10 crisoles, secándolos mediante exposición al calor en una estufa y una vez libres de humedad se procedió a rotularlos de manera que se designó 5 para la muestra de lodos activados y los otros 5 para la muestra de lodos de manglar. Se procedió a pesar cada crisol mediante una balanza analítica y se colocó 25 gr de la muestra respectiva en cada uno para después ponerlos a secar a una temperatura de 105°C por 24 horas para el cálculo de sólidos totales.

Transcurrido ese tiempo, se volvió a pesar los crisoles con la muestra seca para después colocarlos en dos muflas a una temperatura de 550°C durante dos horas siguiendo el método estándar para calcificación de lodos APHA D 2540 realizando un cambio en el tiempo manteniendo la temperatura de 550°C hasta una hora y luego disminuyéndola poco a poco durante la siguiente hora restante. Después se procedió a extraer los crisoles de la mufla dejándolos enfriarse en un desecador durante 30 minutos para evitar que adquieran humedad para finalmente volverlos a pesar para el cálculo de sólidos volátiles. Todos los pesos fueron debidamente anotados siguiendo el modelo de la tabla 2.1 y los cálculos de sólidos totales y volátiles se realizaron mediante las fórmulas especificadas en las figuras 2.1 y 2.2 respectivamente.

**Tabla 2.1: Pesos en gramos por crisol. Fuente: autoría propia.**

Muestra	Rótulo	Crisol	Crisol con muestra	Con secado	Con calcinación
Lodos activados	L1				
	L2				
	L3				
	L4				
	L5				
Lodos de manglar	M1				
	M2				
	M3				
	M4				
	M5				

$$\text{Sólidos totales (\%)} = \frac{b - c}{a - c} \times 100$$

donde:

- a: masa en g del lodo tal como se recibió + recipiente
- b: masa en g del lodo seco a 105°C ± 5°C + recipiente
- c: masa en g del recipiente

**Figura 2.1: Fórmula para el cálculo de sólidos totales. (Zagal,2017)**

$$\text{Sólidos volátiles (\%)} = \frac{a - b}{m} \times 100$$

donde:

- a: masa en g del residuo + recipiente antes de la calcinación
- b: masa en g del residuo + recipiente después de la calcinación
- m: masa en g de lodo tal como se recibió

**Figura 2.2: Fórmula para el cálculo de sólidos volátiles. (Zagal,2017)**

### 2.3 Siembra por extensión

Se realizó una siembra por extensión colocando de la muestra de materia orgánica seleccionada como principal sustrato del digester anaerobio utilizando diluciones seriadas de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ , después se colocó 100 ul en el centro de cada placa Petri con medio de cultivo PCA (plate count agar) y PDA (potato dextrose agar) y, con una varilla de vidrio esterilizada, se extendió la muestra inoculada en la superficie del agar hasta que se secura. Con la muestra extendida, se incuban las placas a  $37^{\circ}\text{C}$  (Bonilla M, 2016) y luego de 24 y 48 h para bacterias y hongos, respectivamente, se seleccionan las placas con un número de colonias de 30 a 300 (Figura 2.3)

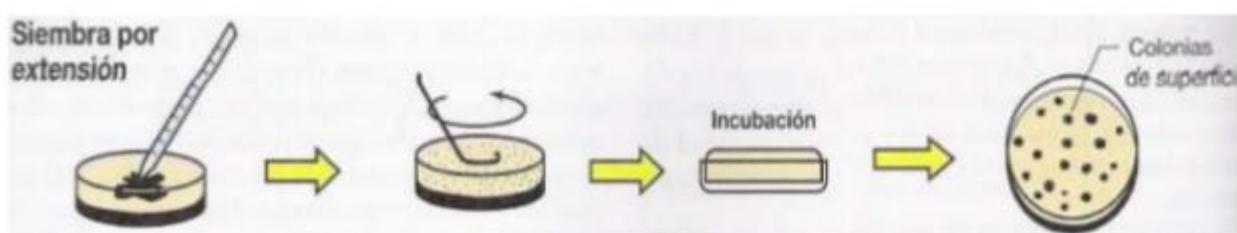


Figura 2.3: Método de extensión por placa. Fuente: Quintana, 2016

### 2.4 Montaje del inóculo y medición de gas

Se ingresaron las muestras seleccionadas en botellas hermetizadas a 2 porcentajes de MO (25% y 30%) considerando dos temperaturas ( $37^{\circ}\text{C}$  y  $52^{\circ}\text{C}$ ), temperaturas que reflejan condiciones mesófilas y termófilas. Para cada % se realizó su respectiva réplica, teniendo un total de 4 botellas (Figura 2.4)

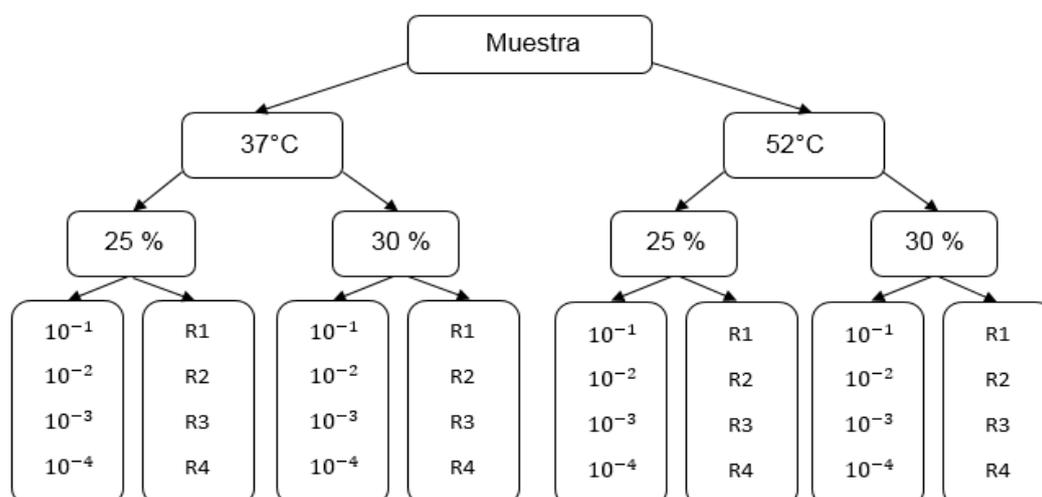


Figura 2.4: Diseño de montaje del inóculo. (Autoría propia, 2019)

La medición de gas diaria se realizó insertando una jeringa de 20 ml en el tapón de cada botella, esperando a que el émbolo ascendiera por sí solo debido a la salida del biogás interno. Este proceso se repetía las veces que fuera necesario hasta que terminara de salir el total de biogás de cada botella. Se procuró que las mediciones se realizaran a una misma hora del día (11:30 am). Los valores fueron anotados en una base de datos de Excel para su posterior análisis.

## 2.5 Cuantificación, selección y tinción de colonias

Al término de la incubación, cada placa se colocó en un cuantificador de colonias y con un marcador se fueron señalando una a una las colonias visualizadas. La cantidad total se anotó siguiendo el modelo de la tabla 2.2.

**Tabla 2.2: Cantidad de colonias por dilución y porcentaje**

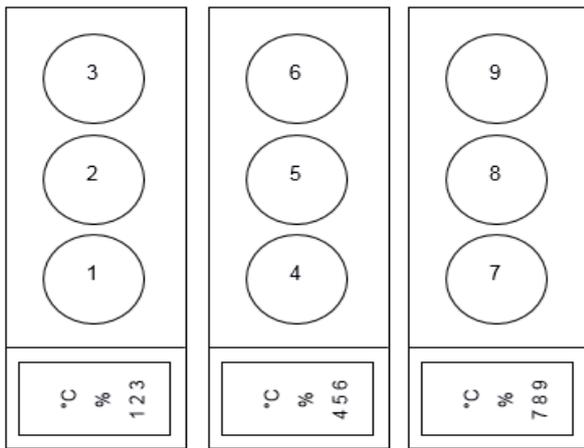
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	R1	R1	R1	R1
25%								
30%								

Para la selección de colonias a ser sometidas a tinción de Gram se consideró el 10% de las colonias totales cuantificadas formadas en cada placa, seleccionando las diferentes morfologías de acuerdo con las siguientes características físicas: forma, elevación, margen y coloración. Los datos fueron anotados en la tabla 2.3.

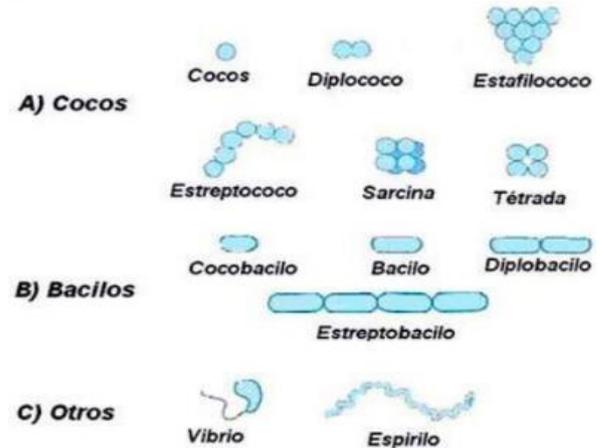
**Tabla 2.3: Características morfológicas por colonia.**

# colonia	Forma	Elevación	Margen	Color	Observación
1					
2					

Como preparación de las colonias seleccionadas para la tinción de Gram, en una placa portaobjetos rotulada se colocaron tres gotas de agua destilada, con un asa esterilizada al fuego se tomó un poco de la colonia 1 y se frotó en la placa esparciendo la muestra en las gotas, se esterilizó el asa y se volvió a realizar el mismo proceso con las demás colonias de todas las placas. Se dejó secar cada frotis y luego se pasó la placa 3 veces cerca del fuego para fijar todo. Como resultado del proceso anterior se obtiene un modelo parecido al ilustrado en la figura 2.5 donde se indica su debida rotulación hecha con cinta, anotando la temperatura y porcentaje correspondientes a la placa, así como también el número y distribución de los frotis en la misma.



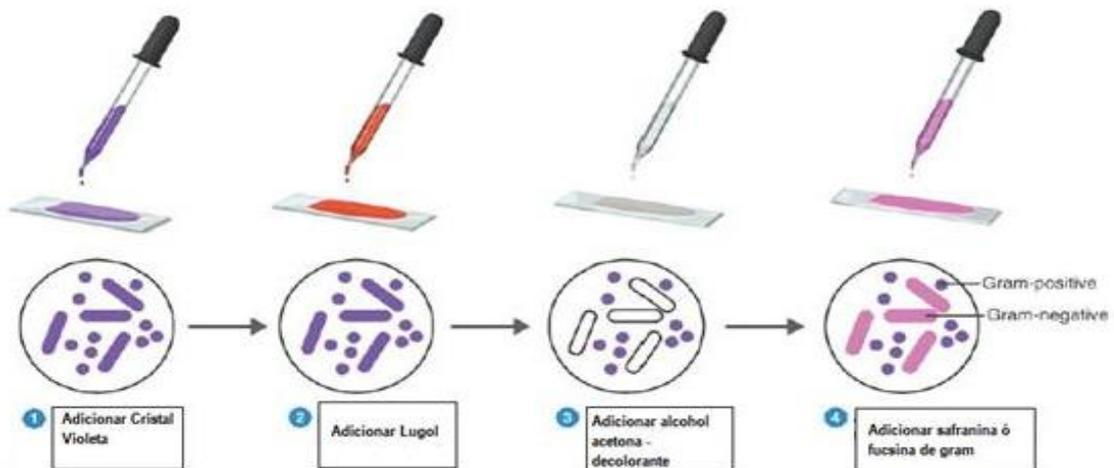
**Figura 2.5: Diseño de placas por colonias (Autoría propia, 2019).**



**Figura 2.6 Guía para la identificación de morfología bacteriana (Morales, 2014)**

A cada frotis de las placas portaobjetos se le añadió una gota de cristal violeta, se dejó actuar por un minuto y se lavó con agua destilada. A continuación, se colocó una gota de lugol, se dejó actuar por un minuto y se enjuagó con agua destilada. Después se colocó una gota de alcohol acetona, se dejó actuar por 8 segundos y se lavó con agua destilada. Finalmente, se colocó una gota de safranina en cada frotis, se dejó actuar por 1 minuto y se lavó con agua destilada (Figura 2.7).

Una vez listas las placas, se las observó al microscopio para su debida identificación morfológica, colocando una gota de aceite de inmersión para una mejor visualización con el lente de 100X. Considerando la guía morfológica indicada en la figura 2.6 y la coloración que se indica en la figura 2.7, se determinó la forma de la bacteria y también si era de tipo Gram + o Gram -. Los datos obtenidos fueron anotados en la columna observación de la tabla 2.3.



**Figura 2.7: Método de tinción de Gram (Gram, 1884)**

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Al inicio del experimento se cuantificó sólidos totales y sólidos volátiles de lodos activados de una planta de tratamiento de agua y de lodos del fondo de un manglar. Se calculó el porcentaje de sólidos totales y sólidos volátiles (Tabla 3.1) y se seleccionó el tipo de materia orgánica que cumpla las condiciones correctas para su ingreso en el biodigestor (sólidos totales mayores a 50%).

**Tabla 3.1. Valores medidos para el cálculo de sólidos totales.**

Lodos activados	Peso crisol (g)	Peso muestra húmeda (g)	Peso crisol + muestra seca (g)	Porcentaje sólidos totales (%)
1	39.8613	25.1019	44.5226	18.5695
2	40.7670	25.1404	45.5791	19.1490
3	34.6671	25.0010	39.0389	17.4865
4	28.5805	25.1070	33.7948	20.7683
5	37.6955	25.0966	42.3187	18.4216
Lodo manglar				
1	40.3855	25.0496	54.5811	56.6699
2	30.3656	25.1700	45.3688	59.6074
3	29.8569	25.1873	43.921	55.8400
4	37.9270	25.1875	52.3537	57.2772
5	36.1867	25.1103	51.2390	59.9447

Como se puede observar en la tabla 3.1 el porcentaje de sólidos totales en las 5 muestras de 25g fue de un 57.86784% y en el porcentaje de sólidos totales en lodos activados se obtuvo un promedio de 18.87898%. Este valor es muy bajo, por lo cual se eligió el lodo de manglar (el cual cumple con el estándar) como sustrato principal del biodigestor. Una vez que el tipo de sustrato es seleccionado, se procede a calcular el peso en gramos de la muestra a ser ingresada en botellas hermetizadas de 500ml para mantener las mismas a una concentración de 25% de ST y 30% de ST.

La muestra por ingresar es diluida en 250ml de agua destilada para todos los casos, por lo cual se calculó que, para mantener las botellas a concentraciones de 30% de ST, se ingresa 129,623 g de muestra de lodos de manglar y, para mantener a 25% ST, se ingresa 108,02g de muestra.

De acuerdo con el método estándar, el pH del sustrato debe mantenerse en un rango de 7,5 a 8,5 para lo cual se realizó un ajuste de pH como se observa en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2. Ajuste de pH en muestras a ingresar en biodigestor.**

Concentración de solidos	pH inicial	Ajuste (Na (OH) o H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> )	pH final
25% a 37°C	7,78	no	7,78
25% a 52°C	7,88	no	7,88
30% a 37°C	7,23	si	7,82
30% a 52°C	7,43	si	7,75

### 3.1 Lodos de Manglar

En la tabla 3.3 se muestra la cantidad de colonias contadas por cada dilución y su respectiva réplica, para ambos porcentajes (25% y 30%) y para las dos temperaturas (37°C y 52°C) en los tiempos 0 y 1.

**Tabla 3.3. Conteo de colonias**

Tiempo	Temperatura	Porcentaje	Rótulo				
			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	R2	10 <sup>-3</sup>	R3
T <sub>0</sub>	37°C	25%	Incontable	152	261	83	86
		30%	Incontable	191	232	270	145
	52°C	25%	Incontable	270	163	171	159
		30%	Incontable	119	121	124	117
T <sub>1</sub>	37°C	25%	Incontable	156	117	84	57
		30%	Incontable	66	71	21	20
	52°C	25%	Incontable	159	129	30	31
		30%	Incontable	167	76	11	17

Para el cálculo de UFC se tomó en cuenta la dilución 10<sup>-2</sup> con su respectiva réplica, obteniendo un promedio de ambos valores y usándolo en el número de colonias por placa. Se obtuvo los valores detallados en la Tabla 3.4, utilizando la fórmula descrita a continuación:

$$UFC/g = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias por placa} * \text{recíproco del factor de dilución}}{g \text{ de la muestra sembrada}}$$

**Tabla 3.4. Unidades formadoras de colonias UFC para lodos**

Tiempo	Temperatura	Porcentaje	UFC
T <sub>0</sub>	37°C	25%	2,0x10 <sup>5</sup>
		30%	2,1x10 <sup>5</sup>
	52°C	25%	2,2 x10 <sup>5</sup>
		30%	1.2 x10 <sup>5</sup>
T <sub>1</sub>	37°C	25%	1,4 x10 <sup>5</sup>
		30%	6,9 x10 <sup>4</sup>
	52°C	25%	1,4 x10 <sup>5</sup>
		30%	1,2 x10 <sup>5</sup>

Para T<sub>0</sub> se realizaron un total de 129 tinciones de Gram y para T<sub>1</sub>, se efectuaron 111 como se indica en la Tabla 3.5. Del valor total en T<sub>0</sub>, un 59% corresponden a bacterias Gram + y un 41% a bacterias Gram -. Dichos valores contrastan con los obtenidos en T<sub>1</sub>, donde las bacterias Gram – prevalecieron con un 68% y a las bacterias Gram + solo les correspondió un 32%,

**Tabla 3.5: Porcentajes de tinciones de Gram y Morfología en el T<sub>0</sub> y T<sub>1</sub>**

Tiempo	# Tinciones (100%)	Tinción de Gram		Morfología		
		+	-	Cocos	Cocobacilos	Bacilos
T <sub>0</sub>	129	59%	41%	3%	12%	85%
T <sub>1</sub>	111	32%	68%	10%	26%	64%

Esto nos indica que a medida que se fue desarrollando el inóculo en el biodigestor y se fue reduciendo la cantidad de oxígeno, las bacterias Gram – predominaron sobre las bacterias Gram +, que eran más abundantes al principio de la digestión (Figura 3.1).



**Figura 3.1: Porcentaje de bacterias Gram + y - en T<sub>0</sub> y en T<sub>1</sub>**

En cuanto a morfología de colonias se observó un 85% de bacilos al inicio del experimento, un valor considerablemente alto; y para las morfologías de cocobacilos y cocos se observó valores de 12% y 3% respectivamente. A medida que se desarrolló el experimento, se visualizó un ligero aumento de cocos y cocobacilos (26% y 10%) y una reducción de la cantidad de bacilos a un 64% sin embargo, se mantuvo con el mayor porcentaje con respecto a las demás morfologías en T1 (Figura 3.2)



Figura 3.2: Porcentaje de morfologías presentes en T0 y T1.

### 3.2 Estiércol de vaca

Se midió diariamente el volumen de biogás producido por las 5 botellas al cabo de 34 días y se logró cuantificar que, a medida que la carga bacteriana continuaba en crecimiento, el volumen de biogás aumentaba. Para que la carga bacteriana se mantenga en crecimiento, se agregó una solución de sacarosa al 10% cada 3 días como fuente de carbono para la alimentación de las bacterias. La medición de gases se realizó a 2 condiciones, termofílicas (52°) y ambiente (37°) y se reportan como se observa en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6: mediciones diarias de biogás.

% sólidos y temperatura	6/12/19	7/12/19	8/12/19	9/12/19	10/12/19	11/12/19	12/12/19	13/12/19
25%-37°	0	40	80	25	16	40	76	50
30%-37°	0	101	80	33	12	57	84	53
25%-52°	0	107	60	54	20	57	70	65
30%-52°	0	109	40	59	13	60	80	60
30%-52**	0	127	40	34	0	100	85	32

A condiciones termofílicas la producción de gas fue mayor que a condiciones mesofílicas luego de suplementar la solución de sacarosa, lo cual posiblemente se atribuya a que la temperatura funciona como un factor catalizador del crecimiento de ciertas bacterias metanogénicas, por lo que el suplemento se agotaba en menor tiempo que a 37°C y el crecimiento microbiano decrecía, así mismo lo hacía la producción de gas a condiciones termofílicas. En las Figuras 3.3 y 3.4 se pueden observar las tendencias de la producción de gas según el tipo de tratamiento.

### 3.2.1 Condiciones mesofílicas (37°C)

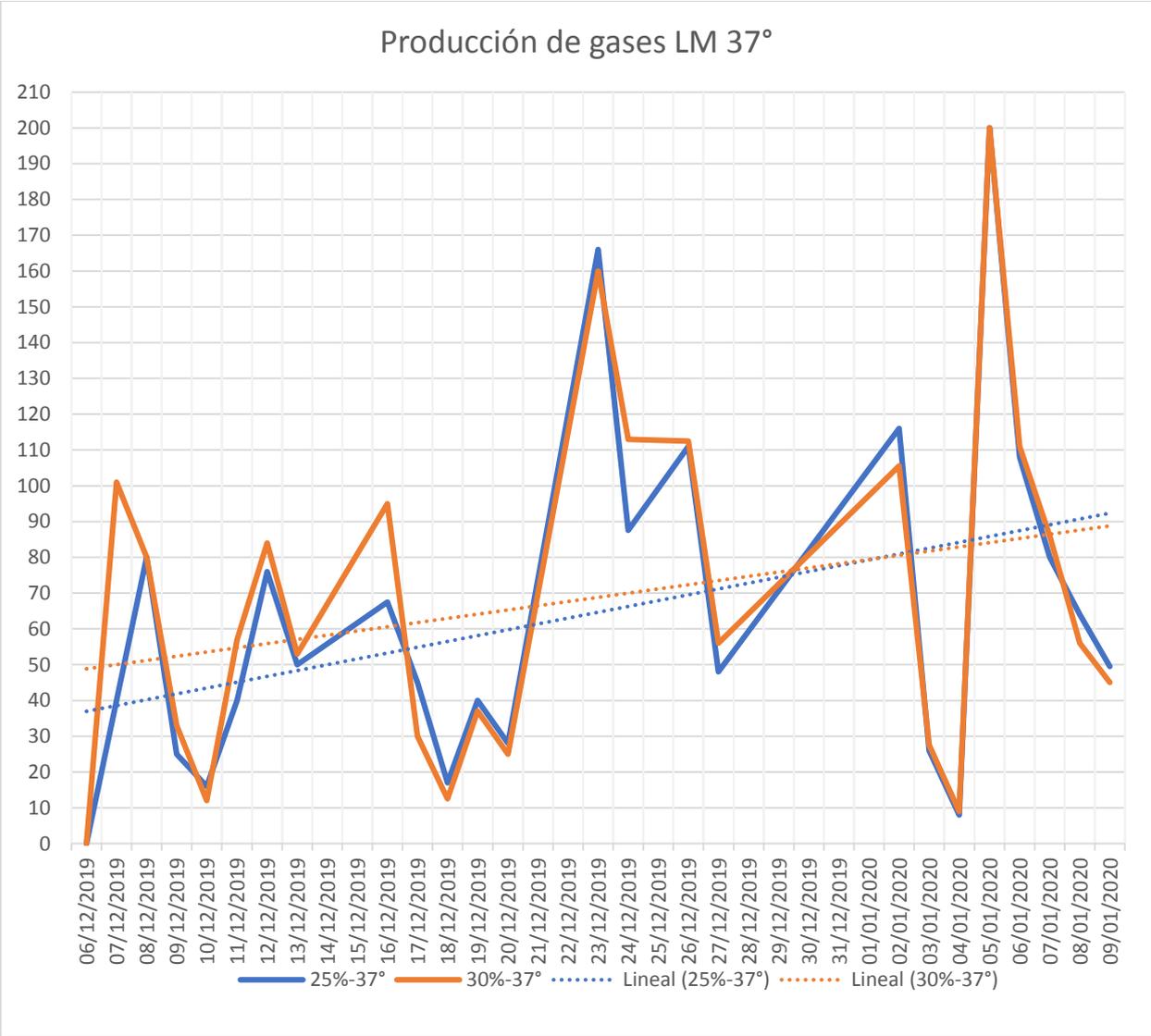
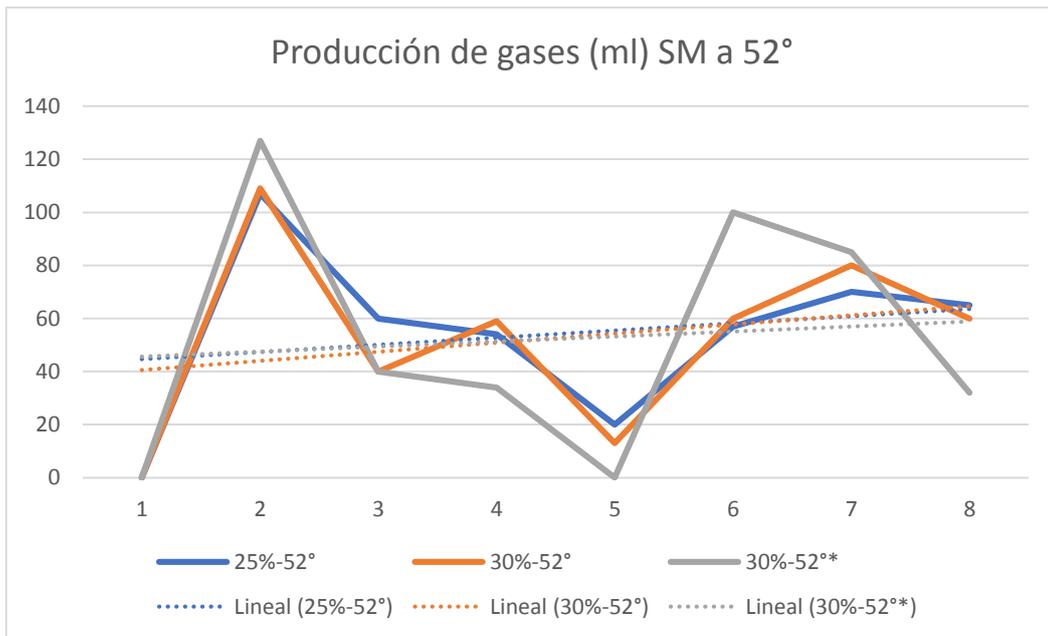


Figura 3.3: Producción de gas a condiciones ambiente.

El valor promedio de producción de gas al cabo de 34 días a una concentración del 25% de sólidos totales de lodo de manglar fue de 64,54 ml (Figura 3.3).

### 3.2.2 Condiciones termofílicas (52°C)



**Figura 3.4: Producción de gas a condiciones termofílicas.**

Al cabo de 8 días a condiciones termofílicas el valor promedio de producción de gas fue de 52,625 para la concentración del 30% de sólidos totales (Figura 3.4).

**Tabla 3.7: Conteo de colonias para estiércol a 52°C**

Rótulo/Porcentaje	20% Blanco	20%	25% Blanco	25%	30% Blanco	30%
10 <sup>-2</sup>	143	214	146	129	Incontable	144
R2	208	175	167	138	133	159
10 <sup>-4</sup>	9	7	4	11	29	65
R4	20	20	10	10	54	13
10 <sup>-5</sup>	3	7	0	1	5	1
R5	3	6	2	1	5	0
10 <sup>-6</sup>	2	0	2	1	0	0
R6	6	2	3	0	3	0

En la tabla 3.7 se muestran los valores del conteo de colonias con los diferentes porcentajes 20, 25 y 30%, con su respectivo blanco (poco alimentadas) y para diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ , cada una de ellas con su pertinente réplica.

Para el cálculo de UFC se eligió la dilución  $10^{-2}$  y su réplica, obteniendo un promedio usado en el N° de colonias por placa a excepción de 30% blanco, cuyo valor superó las 300 colonias/placa, para lo cual se optó por  $10^{-4}$  y su réplica. Aplicando la fórmula mencionada anteriormente, se obtuvieron los valores detallados en la tabla 3.8.

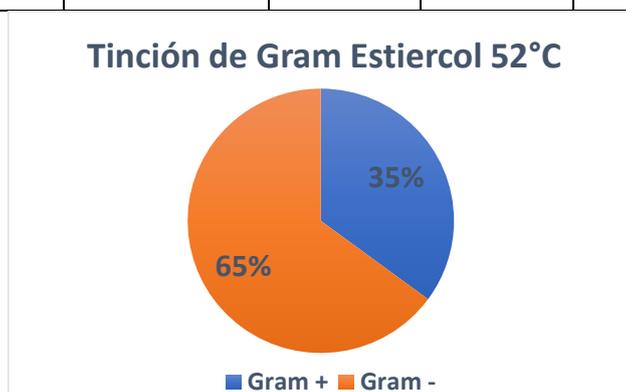
**Tabla 3.8: Unidades formadoras de colonias UFC para estiércol**

Porcentaje	UFC
20% Blanco	$1,8 \times 10^5$
20%	$1,9 \times 10^5$
25% Blanco	$1,6 \times 10^5$
25%	$1,3 \times 10^5$
30% Blanco	$4,2 \times 10^6$
30%	$1,5 \times 10^5$

Para las botellitas de estiércol se realizaron 242 tinciones de Gram de las cuales 157 dieron como resultado bacterias Gram – representando un 65% del total, a diferencia de las bacterias Gram – que aparecieron solo en 85 tinciones, valor que corresponde al 35%, ver Tabla 3.9. Estos valores indican una predominancia de las bacterias Gram – sobre las bacterias Gram + (Gráfico 3.5).

**Tabla 3.9: Total y porcentaje de las tinciones de Gram**

	# Tinciones		Total	Porcentaje
	Alimentadas	Blanco		
Gram +	42	43	85	35%
Gram -	66	91	157	65%
Total	108	134	242	100%



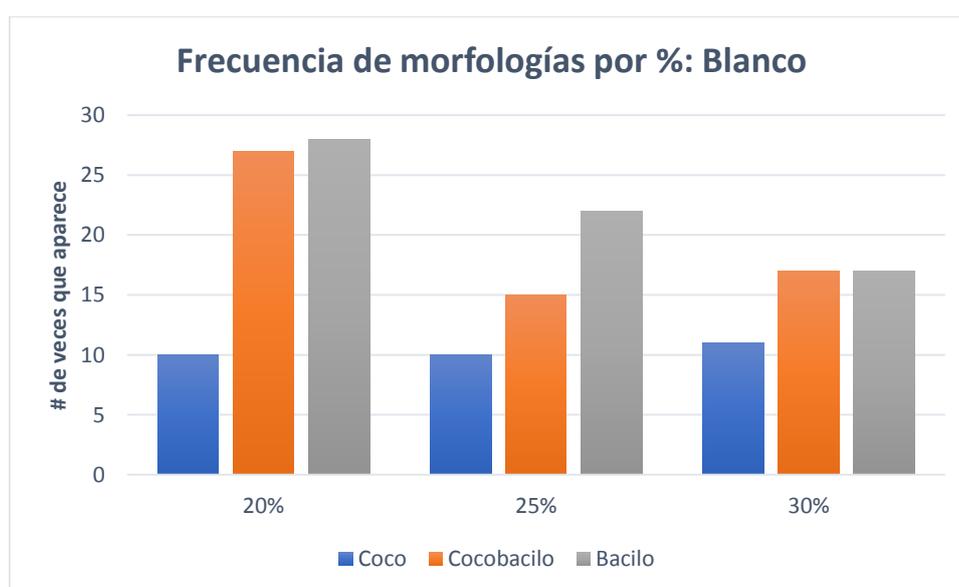
**Figura 3.5: Porcentaje de bacterias Gram + y -**

En la tabla 3.10 se muestra la cantidad de tinciones de Gram que se realizaron para las botellas alimentadas regularmente y el blanco (poco alimentadas) con sus respectivos porcentajes (20, 25 y 30%), así como también la cantidad de veces que aparecen cada una de las 3 morfologías (coco, cocobacilo y bacilo). Se observó que la morfología predominante es el Bacilo seguido de los cocobacilos y por último los cocos.

**Tabla 3.10: # de tinciones de Gram y # de veces que aparece cada morfología por %**

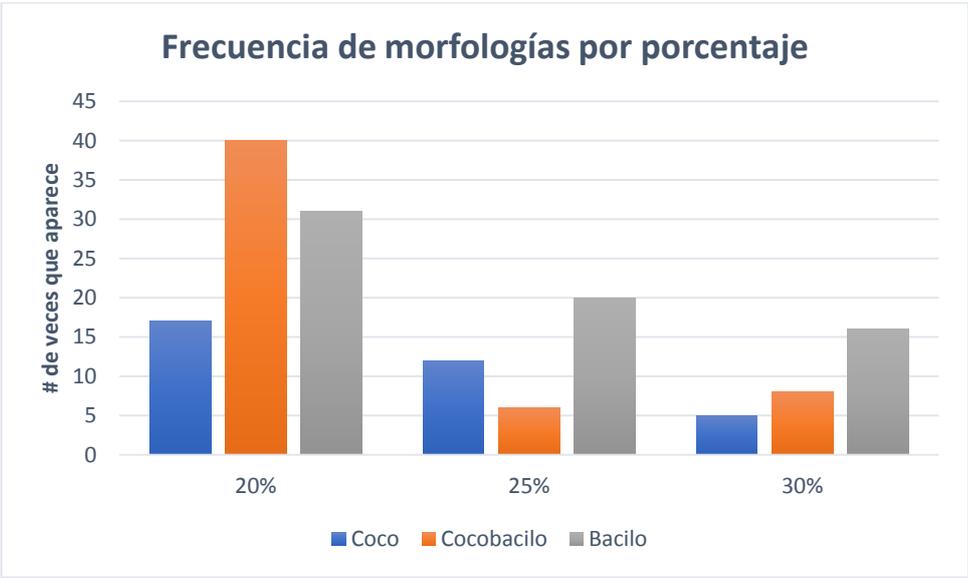
		Alimentadas			Blanco			Total
		20%	25%	30%	20%	25%	30%	
# Tinciones realizadas	Gram +	15	14	13	13	16	14	85
	Gram -	41	14	11	38	25	28	157
Morfología (# veces que aparece)	Coco	17	12	5	10	10	11	65
	Cocobacilo	40	6	8	27	15	17	113
	Bacilo	31	20	16	28	22	17	134

La morfología bacilo fue mayormente vista en los 3 porcentajes continuando con los cocobacilos y los cocos al final. Se observó una disminución constante de bacilos y un ligero aumento de cocos a medida que aumenta el porcentaje, en cambio los cocobacilos se presentan en mayor cantidad al 20%, disminuyen drásticamente al 25% y tienen un ligero aumento al 30%. En 20% se observó que la cantidad de cocobacilos y bacilos era similar al igual que en 30% (ver Figura 3.6).



**Figura 3.6: Frecuencia de las 3 morfologías a los 3 % en las botellas poco alimentadas**

En el caso de las botellas regularmente alimentadas se observó cocobacilos una gran cantidad de veces al 20%, dicha cantidad disminuyó drásticamente al 25% y al 30% aumentó un poco, pero se mantuvo baja. La cantidad de veces que aparecían los bacilos y cocos fue disminuyendo a medida que aumentaba el porcentaje. Los cocobacilos fueron más vistos al 20% en cambio al 25% y al 30% fueron los bacilos quienes predominaba sobre las otras morfologías (ver Figura 3.7)



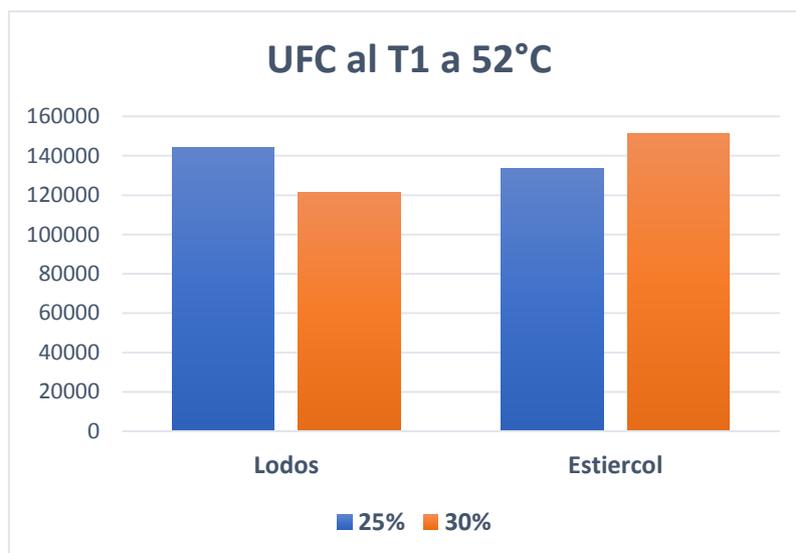
**Figura 3.7 Frecuencia de las 3 morfologías a los 3 % en las botellas alimentadas**

**3.3 UFC de materia orgánica (Lodo de Manglar y estiércol de vaca)**

Los valores de UFC fueron parecidos para el 25% en el caso de ambos sustratos, sin embargo, es el lodo el que tiene la mayor cantidad de UFC en ese porcentaje. La situación cambia en el caso del 30%, donde el estiércol de vaca tiene mayores UFC en comparación al lodo de manglar (Figura 3.8). Los valores de UFC se pueden observar con más detalle en la tabla 3.11.

**Tabla 3.11: UFC de lodos y estiércol al 25% y 30% en T1 a 52°C**

	Lodos	Estiércol
25%	$1,44 \times 10^{-5}$	$1,335 \times 10^{-5}$
30%	$1,215 \times 10^{-5}$	$1,515 \times 10^{-5}$

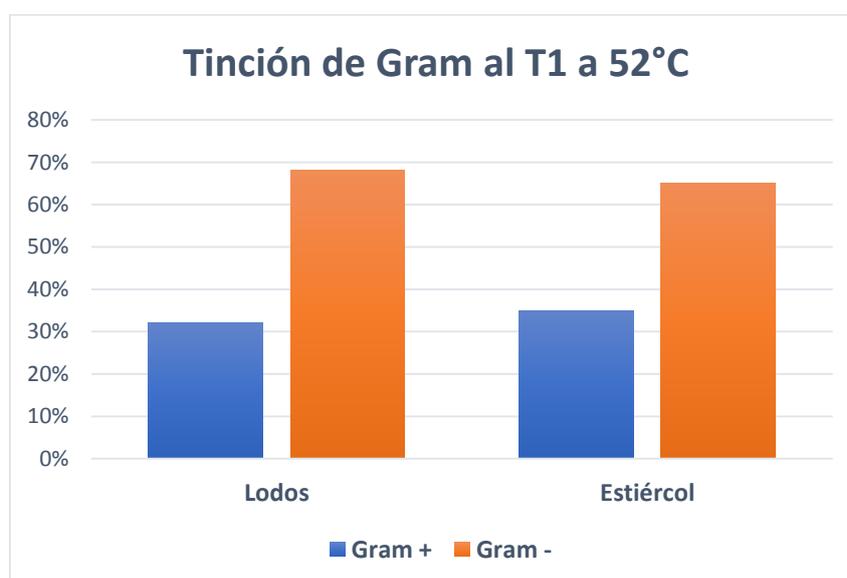


**Figura 3.8: UFC de estiércol y lodo al 25 y 30% en T1 a 52°C**

Se observaron porcentajes similares en la cantidad de bacterias Gram + y – tanto para estiércol como para lodos (Tabla 3.12). En ambos casos prevalecen las bacterias Gram –, haciendo a ambos grupos bacterianos potenciales candidatos con microorganismos degradadores de plásticos (ver figura 3.9).

**Tabla 3.12: Tinción de Gram de lodos y estiércol al 25% y 30% en T1 a 52°C**

	Lodos	Estiércol
Gram +	32%	35%
Gram -	68%	65%



**Figura 3.9: morfologías presentes en estiércol y lodo al 25 y 30% en T1 a 52°C**

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

- Se cuantificó las unidades formadoras de colonias en cada una de las botellas demostrando que la carga bacteriana de ciertas morfologías aumentó con respecto al tiempo de operación del biodigestor.
- Los parámetros producción de biogás, sólidos totales y sólidos volátiles medidos en la muestra sedimento de manglar de 30% a condiciones termofílicas cumplen con el método estándar en el que se basó la investigación.
- Se logró cuantificar parámetros como: sólidos totales, sólidos volátiles, producción de biogás, los cuales son parámetros importantes detallados en el método estándar que se utilizó como base del proyecto.
- Las bacterias Gram – predominaron por sobre las Gram + al T1, son facultativas ya que crecieron en ausencia y presencia de oxígeno y presentan morfología de tipo bacilo.

### 4.2 Recomendaciones

- Se recomienda utilizar una cámara de anaerobiosis al momento de la incubación de las placas inoculadas para obtener mejores resultados en cuanto al aislamiento de colonias que crecen en condiciones sin oxígeno.
- Utilizar medios selectivos para *Pseudomonas* ya que se reporta en investigaciones previas que estas son capaces de biodegradar el polietileno en un 20,54% al cabo de 180 días.
- Mantener los biodigestores con una producción de gas constante al cabo de 4 meses, alimentando el sustrato con fuentes de carbono alternativas como la glicerina.
- Utilizar técnicas moleculares para el aislamiento y reconocimiento de microorganismos a nivel de especie.

# BIBLIOGRAFÍA

- Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 8-19.
- Bonilla M, P. S. (2016). *Manual de prácticas de microbiología básica*. Cuajimalpa: Universidad Autónoma metropolitana
- Camacho, h. (2014). biodegradación anaerobia de un material biodegradable bajo digestión anaerobia termófila. *biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 20-29.
- Caruso, G. (2015). Plastic Degrading Microorganisms as a Tool for Bioremediation of Plastic Contamination in Aquatic Environments. *Journal of Pollution Effects & Control*, 3: e112.
- Chen, Z. X. (2019). Enhanced in situ biodegradation of microplastics in sewage sludge using hyperthermophilic composting technology. *Journal of hazardous materials*, 1-24.
- Daniel Segura, R. N. (2017). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología V 14*, 361-371.
- Das. (2014). Microbial biodegradation and bioremediation. En *Das, Microbial biodegradation and bioremediation*. (págs. 9-10). Rourela odisha: Elsevier.
- Desarrollo Urbano; Washington, DC: Banco Mundial. © Banco Mundial. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317> Licencia: CC BY 3.0 IGO.
- Diego Uribe, D. G. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 133-136.
- Grados Torrez, R., Álvarez Aliaga, M. T., Giménez Turba, A., & Mattiasson, B. (2008). Degradación anaeróbica de desechos agrícolas por consorcios microbianos para la producción de polihidroxialcanoatos. *Biofarbo*, 16, 28.
- INEC. (2018). Ecuador - Censo de Información Ambiental Económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Provinciales 2017. Obtenido de INEC Instituto Nacional de Estadísticas y Censos: <https://anda.inec.gob.ec/anda/index.php/catalog/695>

- INEN. (2012). método de ensayo para determinar la biodegradación anaeróbica de materiales plásticos bajo condiciones aceleradas de relleno sanitario. Quito: NTE.
- Kathiresan. (2003). Polythene and plastic-degrading microbes in an indianmangrove soil. *tropical biology*, 629-633.
- Kaza, Silpa; Yao, Lisa C.; Bhada-Tata, Perinaz; Van Woerden, Frank. 2018. *What a Waste 2.0: una instantánea global de la gestión de residuos sólidos para 2050*.
- Priya Trivedi, A. H. (2016). Role of microbes in degradation of synthetic plastics and manufacture of bioplastics. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 211-216.
- Ricardo Grados Torrez, M. T. (2008). Degradación anaeróbica de desechos agrícolas por consorcios microbianos para la producción de polihidroxicanoatos. *BIOFARBO*.
- ASTM. (2002). Standard test method for determining anaerobic biodegradation of plastic materials under high-solids anaerobic digestion conditions. Pennsylvania: ASTM international.
- Tai, A. S. (2019). Aerobic biodegradation of starch-polyurethane flexible films under soil burial condition: changes in physical structure and chemical composition. *International biodeterioration and biodegradation*, 145-156.
- Zagal, E., & Sadzawka, A. (2007). *Protocolo de métodos de análisis para suelos y lodos*. Universidad de Concepción, Servicio Agrícola y Ganadero: Santiago,