

Aislamiento y selección de bacterias con capacidad de degradar bolsas compostables a diferentes tratamientos fisicoquímicos

Isolation and selection of bacteria with the capacity to degrade compostable bags to different physical-chemical treatments

Noriega Córdova Huberto Williams¹, Trejo de Ríos Mirtha Sussan², Aguilar Luna Victoria Miguel Angel², Montoya Laos José Arturo³, Pesantes Espinoza Mery Helen³, Durand Meza Miguel Angel⁴

RESUMEN

Objetivo: Evaluar las bacterias pertenecientes a suelos fértiles de cultivos de la zona, que se aislaron y seleccionaron con capacidad de degradar bolsas compostables a diferentes tratamientos fisicoquímicos. **Metodología:** La investigación tuvo un enfoque cuantitativo, diseño pre experimental de corte transversal, tipo aplicada y de nivel explicativo. La población en estudio estuvo conformada por los suelos fértiles de la zona costera de Huaura y Barranca (Lima-Perú), tomándose una muestra de 45 porciones de suelos correspondientes a ocho (8) cultivos representativos de la región mediante el muestreo por conglomerados. La variable en estudio fue el índice de porosidad o degradación medido en micrómetros, obtenido por la siembra de las bacterias en el plástico de bolsas biodegradables. Como técnica estadística se utilizó el ANOVA simple y su posterior prueba de Tukey para conocer las diferencias reales. **Resultados:** Existe diferencia significativa entre los cultivos respecto a las bacterias adheridas en el suelo de la planta que biodegradan el material compostable ($p = .015$) siendo cebolla china y maíz los cultivos con un mayor promedio de degradación y que no difieren significativamente ($p = .161$). La velocidad de biodegradación es alta al primer mes, disminuyendo al llegar a los 4 meses. **Conclusiones:** Luego del análisis fisicoquímico se concluye que las colonias de bacterias que mejor degradan el material compostable son aquellas asociadas al cultivo de cebolla china, dichas cepas son las denominadas E23_1C, E7_2A, E7_2B, E23_1B.

Palabras clave: Colonia, bacterias, porosidad, biodegradación

ABSTRACT

Objective: To evaluate the bacteria belonging to fertile soils of cultivars in the area, which were isolated and selected with the ability to degrade compostable bags to different physical-chemical treatments. **Methodology:** The research had a quantitative approach, cross-sectional pre-experimental design, applied type and explanatory level. The population under study was made up of the fertile soils of the coastal zone of Huaura and Barranca provinces (Lima-Peru), taking a sample of 45 portions of soil corresponding to eight (8) representative cultivars of the region through sampling by conglomerates. The variable under study was the porosity or degradation index measured in micrometers, obtained by planting bacteria in the plastic of biodegradable bags. As a statistical technique, the simple ANOVA and its subsequent Tukey test were used to determine the real differences. **Results:** There's a significant difference between the cultivars regarding the bacteria attached to the soil of the plant that biodegrade the compostable material ($p = .015$); being Chinese onion and corn the cultivars with a higher average of degradation and that do not differ significantly ($p = .161$). The biodegradation speed is high in the first month, decreasing when it reaches 4 months. **Conclusions:** After physical-chemical analysis, it is concluded that the colonies of bacteria that best degrade the compostable material are those associated with growing Chinese onions, these strains are called E23_1C, E7_2A, E7_2B, E23_1B.

Keywords: Colony, bacteria, porosity, biodegradation

Recibido 02/12/2022 Aprobado 16/01/2023

Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)



¹Departamento de Biología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Lima, Perú. <https://orcid.org/0000-0003-0882-092X>. h.noriega@unjfsc.edu.pe

²Departamento de Matemática y Estadística de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Lima, Perú. <https://orcid.org/0000-0002-2755-9950>. mtrejo@unjfsc.edu.pe; <https://orcid.org/0000-0003-1699-1913>. maquilar@unjfsc.edu.pe

³Departamento de Matemáticas. Universidad de Sonora, Sonora, México. <https://orcid.org/0000-0001-6952-0109>. arturo.montoya@unison.mx; <https://orcid.org/0000-0001-8901-2339>. mery.pesantes@unison.mx

⁴CITE agroindustrial-UT-Huaura. <https://orcid.org/0000-0002-1743-0918>. mdurandmeza@gmail.com

INTRODUCCIÓN

A pesar de las múltiples utilidades que tiene el plástico en la vida diaria del hombre, éste también causa uno de los mayores problemas ambientales en el mundo, debido a su composición y al largo tiempo que toma su degradación. Según Greenpeace (2019) el 2015 la producción de plástico alcanzó los 380 millones de toneladas, informa además que cada año se producen 500 mil millones de botellas de plástico y en Europa la producción de plástico alcanzó los 61,8 millones de toneladas en 2018; por otro lado, China es el mayor productor de este material con un 30% de la producción mundial. Un dato importante es que, en el mundo se utilizan 5 billones de bolsas al año, es decir, casi 10 millones de bolsas por cada minuto. Estos son algunos de los índices alarmantes sobre este material, debido a que su demanda es bastante alta y la conciencia ambiental de los habitantes de este es bastante baja.

En el Perú el análisis de la composición de los residuos sólidos domiciliarios señala como segundo componente en importancia a los residuos plásticos el cual registró un incremento del 8,07% en el 2010 a 9,48 % en el año 2011 (MINAM, 2016).

Además de la problemática ambiental, también se descubrió que se está generando un problema de salud, ya que los plásticos de tamaño nanométrico pueden atravesar las membranas celulares y causar: desordenes

de alimentación y reproducción, alteraciones en el metabolismo energético, cambios en la fisiología hepática, acción sinérgica y/o antagonista con otros contaminantes orgánicos, etc. (Anbumani y Kakkar, 2018).

El problema en torno a las bolsas plásticas, motivo de nuestro estudio, tiene que ver con el problema de generación de residuos sólidos. Así tenemos que la producción de residuos sólidos en nuestro país durante el periodo 2014 y 2015, según el Ministerio del Ambiente (MINAM), aumentó en un 1,7% a nivel nacional. Durante estos años se registró que los residuos sólidos se encontraban compuestos en un 6,28% (año 2014) y un 6,78% (año 2015) de plástico PET y bolsas plásticas, observándose un ligero aumento en la generación de este tipo de residuos plásticos (MINAM, 2017).

Reportes actuales indican que los residuos sólidos generados en el Perú durante el año 2016 (7 000 576 t de residuos sólidos municipales urbanos) un total de 708 095.81 t se encontraban compuestas de residuos plásticos, los que representaban un aproximado del 10% del total de los residuos (compuestos a su vez por bolsas plásticas en un 4,3%, plásticos PET 2,5%, poliestireno expandido – tecnopor y similares en un 0,7% y el plástico duro en un 2,5%). Estas cifras evidencian la tendencia de la población hacia la generación de residuos sólidos plásticos.

Tabla 1

Aumento paulatino de generación de residuos sólidos plásticos

Descripción	años		
	2014	2015	2016
Residuos sólidos municipales urbanos generados (en toneladas) en el Perú en total	7 461 627	7 588 646	7 005 576
Residuos sólidos PET y bolsas plásticas en %	6,28	6,78	6,8

En tabla 1 se puede apreciar el aumento en porcentaje de generación de residuos sólidos plásticos (plástico PET y bolsas plásticas) paulatinamente y de forma creciente desde el año 2014 al 2016.

Asimismo, los productos plásticos tienen potenciales impactos negativos sobre la salud como por ejemplo los que están fabricados con espuma de poliestireno que contienen sustancias químicas tóxicas tales como el estireno y benceno. La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) de los Estados Unidos ha clasificado al benceno como una sustancia cancerígena y al estireno como posiblemente cancerígeno, que pueden conllevar riesgos a la salud, pues se señala que las toxinas en los recipientes de espuma de poliestireno se pueden traspasar a los alimentos y las bebidas, y este riesgo aumenta cuando las personas recalientan la comida manteniéndola en el

recipiente (MINAM, 2016).

Estos datos muestran que un porcentaje de residuos sólidos no despreciable está compuesto por plásticos de un solo uso, en específico por bolsas plásticas debido a un alto consumo de éstas a nivel nacional. Esta preocupante situación es una tendencia a nivel mundial, según el portal "The World Counts", en el mundo se viene consumiendo 5 trillones de bolsas plásticas al año y cada segundo 160,000 bolsas son usadas, en promedio 700 bolsas de plásticos al año son utilizadas por cada persona en el planeta y menos del 1% de ellas son recicladas. Se calcula que en el Perú el consumo de plásticos es de 30 kg / persona al año y que solamente se llega a reciclar el 0,3 del total de los residuos sólidos plásticos desechados (Heck, 2018) lo que evidencia que en su mayoría los productos plásticos consumidos van a terminar en el ambiente, en botaderos controlados o en

el mejor de los casos en rellenos sanitarios.

En la actualidad en muchos supermercados Tottus, Plaza Vea, Metro, Wong, etc. han reducido el uso excesivo de bolsas plásticas cumpliendo la Ley N° 30884, Ley que regula el plástico de un solo uso y los recipientes o envases descartables de fecha 18 de diciembre 2018; la misma que entró en vigencia a partir del 1 de agosto 2019, por la cual, las bolsas de plásticos en los supermercados tienen un costo de 0,10 céntimos y este costo va ir incrementándose cada año 0,10 céntimos con el propósito de concientizar y reducir el uso de bolsas plásticas. Estos supermercados venden a sus clientes variedad de bolsas a precios diferentes pero los usuarios ignoramos de qué materiales está fabricado o en qué condiciones lo elaboran y si estos materiales usados para guardar nuestros productos de primera necesidad como carne, pollo, verduras, frutas, etc., no se contaminan, con lo cual correríamos el riesgo de atentar en contra de nuestra salud.

No tenemos pruebas suficientes para otorgar la validez y confiabilidad de los componentes de estas bolsas, las cuales según indican han pasado un control riguroso y exigente que no se divulga; sin embargo, estamos sujetos a su utilización. En ese sentido se desarrolló este trabajo, con la finalidad de reconocer que se debe mejorar en el medio ambiente natural, protegerlo y, en consecuencia, garantizar para el futuro mejores condiciones de vida para la humanidad. Una estrategia seguida por varios países consiste en la sustitución total de los artículos recipientes a base de plástico por otros biodegradables y compostables. Italia fue el primer país europeo que dio pasos en esta dirección, al declarar irregulares las bolsas de la compra a base de plástico no biodegradable desde el 2011.

Además, una agenda de acciones orientada al futuro en relación a los factores económicos, consumidores, ciudadanos y organizaciones de la sociedad civil, tiene como objetivo lograr una economía circular global. Tal condición podría garantizar condiciones de vida más limpias y competitivas, brindando una gama completamente nueva de servicios sostenibles, así como productos de alta calidad, funcionales y seguros que son más eficientes, más baratos, más duraderos y diseñados para su reutilización, reparación, mantenimiento y reciclaje (Bioeconomy, 2018).

Las películas para la fabricación de bolsas de compras regulares que no sean de plástico, aptas como envases de alimentos a granel o con fines higiénicos, deben tener los requisitos más rigurosos, incluidos los fisicoquímicos, como un contenido mínimo de materia prima renovable (PLA) y un espesor determinado.

Así pues, lo más importante del estudio es analizar la asociación de los cultivos (plantas) escogidos con los microorganismos especializados para degradar el almidón de las bolsas compostables, por lo que el objetivo central es quedarse con dos o tres (streaming) de estos e identificarlos para reconocer aquellas colonias de bacterias que saben hacer el trabajo de degradación. Una segunda etapa del estudio es llevar estas colonias a un biorreactor y multiplicarlas, generando una nueva tecnología de degradación para finalmente recolectar todas las bolsas compostables en un lugar y aplicar los

microbios especializados para deshacer rápidamente las bolsas. Esos microbios además pueden producir enzimas, separamos los microbios y nos quedamos con la enzima la cual se autodegrada en el ambiente después de haber degradado las bolsas.

METODOLOGÍA

Zona de estudio

La población objeto de estudio corresponde a los suelos fértiles de la zona costera de la Región Lima-Perú, en las provincias de Huaura y Barranca, considerada conjuntamente con los cultivos para ese suelo. Las localidades escogidas dentro de estas provincias fueron Santa María, Barranca y Carquín; las rizosferas escogidas pertenecen a los cultivos denominados páprika, maíz amarillo duro, papa, cebolla china, maíz, tomate, ají amarillo y alfalfa. Se descartaron los cultivos de papa y tomate por tener pocas realizaciones en ellos. Las muestras fueron recogidas a una altura entre 100 y 200 m.s.n.m. en zonas con gradiente mínima, cuyo relieve del suelo es ligeramente ondulado y en época de primavera durante el mes de octubre, desde las 10 a las 13 h, a una temperatura promedio de 31°C sin sombra sobre los cultivos de la zona.

Variable de estudio

Considerando la dualidad de área y cultivar, se consideró un proceso estocástico definido como $\{Z(s,c):(s,c) \in D \times DC\}$ donde Z es la variable aleatoria de interés, que para nuestro caso, es el diámetro del poro efectuado por hidrólisis del almidón sobre el segmento de plástico compostable, al que hemos denominado porosidad, efectuado por una familia de bacterias en particular, especializada para degradar el almidón de la bolsa compostable y que fueron halladas en el rizoma de la planta perteneciente a un cultivar en particular. S es una zona específica del estudio y C es el tipo de cultivar, D es el conjunto donde van a estar las zonas y DC los diferentes tipos de cultivos.

Muestreo

Para el muestreo de suelos, se tomó como base la cartografía de la zona costera del norte chico brindado por la Región Agraria del Ministerio de Agricultura (MINAM), superponiéndola con la app Google Maps, para reconocer las áreas verdes a nivel macro. Partiendo de estos mapas se particionó mediante clústeres o agrupamientos las zonas con los cultivos indicados, tomándose luego mediante muestreo aleatorio simple, los clústeres al azar. Se ubicó el clúster seleccionado y se pasó a tomar muestras de tierra fértil hasta una profundidad de 15 cm considerando la rizósfera de la planta, zona donde interaccionan las raíces y los microorganismos del suelo, adhiriendo la información correspondiente a la textura del suelo, el cultivar, agricultura orgánica o convencional y otros factores preponderantes de posible influencia al suelo y por ende a los microorganismos al interior del rizoma. El criterio metodológico se dividió en dos etapas:

a) Criterio de búsqueda de las zonas

- Buscar las zonas verdes en el Google Maps.

- Contrastarlas con la cartografía brindada por el MINAM.
- Se establece como lugar de búsqueda de las zonas aquellas que están en la costa y antes de los 500 m. s. n. m.
- Tomar como referencia la carretera Panamericana Norte, 50 m al este en espacios no antrópicos o alejados de actividades contaminantes por el ser humano.

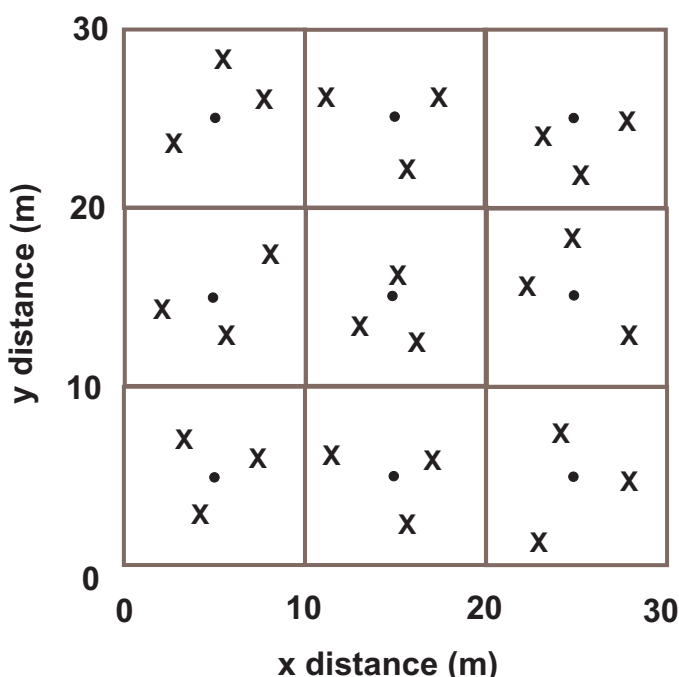
Se utilizó el muestreo por conglomerados de dos etapas, es decir, se formó los conglomerados conteniendo los cultivos como elementos por cada localidad, luego se seleccionó una muestra aleatoria de conglomerados conteniendo a su vez una muestra de cultivos de la zona.

b) Criterio de toma de muestra

- Se tomó como unidad de muestreo a la planta de un mismo cultivar, como unidad de observación, a la porción de tierra conteniendo la rizósfera de la planta perteneciente a un cultivar y suelo en particular y como unidad estadística a la colonia de bacterias aisladas de la cual se hizo inferencia a través de la variable en estudio (porosidad del plástico).
- Se identificaron las zonas de muestreo, para lo cual se determina el número de cuadrados con igual área y longitud, basado en el tamaño y contorno de la parcela, considerando el número de cuadrículas cuadradas sea de 6 a 10, como se muestra a continuación:

Figura 1

Zonas de muestreo por cuadrículas cuadradas



- Luego, se marcó el centro de cada cuadrícula y creó un área de muestreo circular con diámetro igual al lado del cuadrado. El muestreador de pie lanza una piedra con los ojos cerrados de forma aleatoria dentro del cuadrado, si cae ésta fuera del área circular repetir el lanzamiento.

- Para la recolección de la porción de tierra se usó un Soil Auger o instrumento para excavar y recolectar un segmento de suelo que se coloca en una bolsa, siempre en la zona de la rizósfera, asegurándose que cada bolsa deba ser identificada mediante código de lugar, clúster, orden, etc. En muchos de los casos, se repitió esta acción tres veces para tener tres muestras por clúster. Antes de cada muestreo previamente se limpió el instrumento excavador retirando todos los residuos que contengan vegetales y minerales, además de esterilizar con llama de alcohol, rotulando luego los envases según correspondan, transportándose al Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología con mención en Biotecnología de la Facultad de Ciencias - UNJFSC para su análisis, donde se determina la unidad estadística (colonia de bacterias).

- La recolección de porciones de tierra (unidad de observación) se realizó en áreas homogéneas del mismo cultivar, considerando 7 m al interior partiendo del borde del terreno o chacra, para evitar el efecto de borde; y, luego mediante muestreo sistemático, cada 7 plantas (adecuada separación o espaciamiento) se tomó como mínimo 4 unidades de muestreo (plantas) en zig zag. La recolección se hizo con lampa cerca al tallo de la planta a una profundidad de hasta 30 cm, con dos lampas en un ángulo de 45° formando un triángulo de tierra al igual que un barreno.

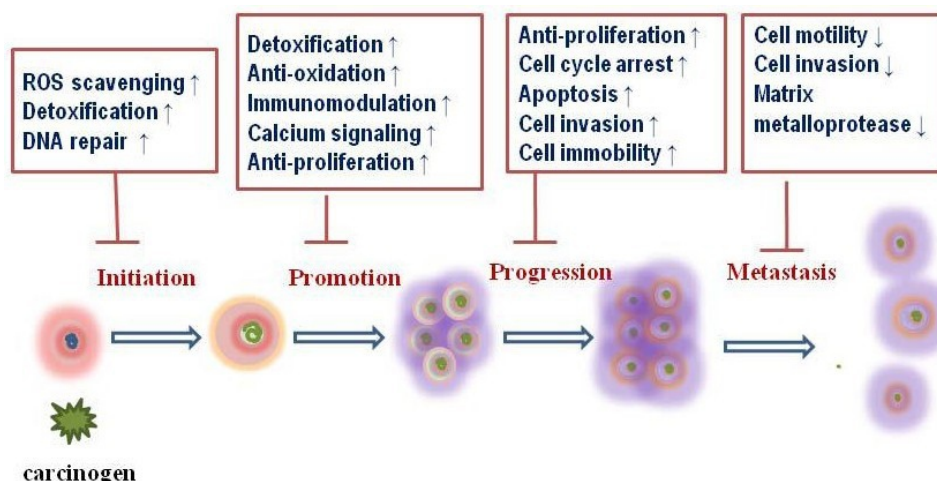
- Las porciones de tierra fueron previamente fichadas y catalogadas (localidad, especie de cultivar, agricultura convencional o no, etc.) llevándose al Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología con mención en Biotecnología de la Facultad de Ciencias - UNJFSC para su análisis y donde se determinó la unidad muestral de laboratorio, se hizo el análisis sustrayendo aquellas bacterias que dieron buenos resultados, las mismas que fueron enviadas a identificar (género, especie, etc.), luego de identificadas se retomó el análisis del punto de muestreo dándole sentido a la autocorrelación entre bacterias.

- Previamente en el laboratorio se halló mediante muestreo piloto que las colonias de bacterias son las mismas para el cultivar así se encuentren distanciadas. Asimismo, se extrajo las porciones de tierra fértil de aquellos campos que fueron arados, para que haya homogeneidad del suelo y con plantas que ya están con fruto o cerca a la floración para asegurar que estas ya tienen microbios asociados a ellas por el tiempo que están en ese sustrato y no por el abono o fertilizante dado a la planta.

- Finalmente, el proceso de trabajo llevado a cabo desde el fichaje de las porciones de tierra, cultivar, cepas, selección, etc., sigue el flujo mostrado a continuación:

Figura 2

Flujo del proceso de trabajo



Material en estudio

El material utilizado fueron las bolsas denominadas compostables obtenidas en los supermercados de Plaza Vea y Tottus de la ciudad de Huacho, las cuales supuestamente son biodegradables por la acción de un agente biológico como son las bacterias para posteriormente transformarse en sustancias nutrientes o compuestos inocuos para nuestro medio.

Las bolsas se cortaron en segmentos cuadrados de 1,5 cm², para la posterior aplicación de las bacterias previamente clasificadas y catalogadas, con la finalidad de observar si efectivamente las bacterias degradan el plástico tomando como indicador la porosidad de los mismos.

Tamaño de muestra

Considerando que la variable en estudio es la porosidad, es decir el diámetro obtenido por hidrólisis efectuado por una colonia de bacterias las cuales a su vez pertenecen a un cultivar en particular y por no conocer la cantidad de bacterias en cada segmento de tierra colectada, estamos hablando de un muestreo para una población infinita. Luego, para encontrar el tamaño de la muestra mediante muestreo aleatorio simple se tiene:

$$n = \frac{Z^2 PQ}{e^2}$$

Z : Es el valor de corte crítico en una distribución normal para un nivel de confianza dado.

P : Proporción estimada de biodegradación.

Q : Proporción estimada de no biodegradación.

e : Error máximo de estimación permitido (error de muestreo).

Conociendo por antecedentes que el porcentaje de biodegradación de la bolsa compostable según estudios está alrededor del 90% (Quirós de Bache & López, 2014)

para la presente investigación se tiene:

$z = 1,96$ para un nivel de significancia del 5%, en la distribución normal

$p = .85$, 85% de biodegradación

$Q = .15$, 15% de no biodegradación

$e = .10$, 10% de margen de error muestral

$$n = \frac{Z^2 PQ}{e^2} = \frac{1,96^2 (0,85) (0,15)}{0,10^2} = 0,10^2$$

En el presente estudio, por motivos de manejo y contaminación de bacterias, nos quedamos con 46 colonias.

Recolección de los datos

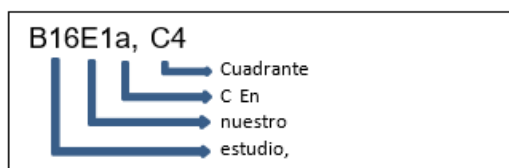
Previo a la toma de datos se cortó el plástico de la bolsa compostable en segmentos de 1,5 cm² y se le agregó la bacteria previamente sembrada en un agar XXX, este segmento se dividió en 4 partes, cada uno denominado cuadrante; luego se analizó la variable en estudio, para lo cual obtuvo mediante análisis microscópico, la porosidad del plástico, el cual es un indicador de la degradación del almidón, hubo algunas que degradaron más que otras. Finalmente, por motivos de manejo y contaminación de los cuadrantes de plástico, nos quedamos con 46 colonias de bacterias analizadas bajo microscopio.

Asimismo, con la finalidad de no escoger la porosidad manualmente y así evitar la intervención de los investigadores, se pasó por microscopio cada uno de los cuadrantes del segmento de bolsa compostable, para visualizar las regiones comunes, siendo el software del microscopio Olympus, el que generó automáticamente los valores referentes a la porosidad como son el área (en μm²), perímetro (en μm), radio medio (en μm), color, escala de gris, etc. De esta manera se han obtenido 46 colonias x 4 cuadrantes = 184 archivos de datos en Excel cada uno con cientos de esos registros y que se muestra

en el anexo 1.

Debido a que la variable porosidad expresada en porcentajes presenta muchos decimales, se transformó a logaritmos sobre todo con la finalidad de que la distribución normal a utilizar describa adecuadamente los datos observados, validando así el análisis estadístico asociado a los mismos (Lu y otros, 2014).

Luego, para facilitar la identificación de las bacterias se tomó como nomenclatura la especificación de la cepa, el exponente de dilución, la colonia a la cual pertenece la bacteria y el cuadrante del segmento de bolsa compostable visualizado bajo microscopio, quedando:



La base de datos concerniente a la unidad estadística en estudio se clasificó bajo características como lugar y cultivar, de donde se extrajo el criterio de excavación, dilución, colonia, color, % de porosidad (transformado a log.), hidrólisis, clasificación de porosidad, aspecto, crecimiento, borde, exudado y finalmente contaminación; que se presenta en el anexo 2.

Técnica estadística a utilizar

Como el objetivo general es evaluar las bacterias que se aíslan y seleccionan con capacidad de degradar bolsas compostables a diferentes tratamientos fisicoquímicos; se utilizó como tratamiento físico la misma temperatura evaluada para todas las colonias y en cuanto al tratamiento químico, igual para todas se les aplicó ácido clorhídrico y lejía. Con lejía se desorganizó el plástico en escamas de 1 mm x 1.5 mm y con ácido clorhídrico se liberó el almidón, pero no se desorganizó el plástico; y, siendo que estas bacterias han sido recolectadas de tierra fértil de diferentes cultivos, en primer lugar se buscó a través del análisis de la varianza si las bacterias de los diferentes cultivos se comportaron de la misma manera en cuanto a la degradación, por lo cual se realizó un ANOVA simple respondiendo al siguiente modelo:

$$\text{donde } Y_{ij} = \mu + C_i + e_{ij}$$

Y_{ij} :degradación en % de porosidad evaluado en el i-ésimo cultivar j-ésima planta de ese cultivar

μ :Degradación promedio en % de porosidad

C_i :Efecto del i-ésimo cultivar sobre la degradación

e_{ij} :Error experimental

Protocolo de siembra de la bacteria en el plástico compostable

Se realiza el aislamiento de las bacterias en agar nutritivo. Las extracciones de microorganismos se realizan en condiciones asépticas. Se toma 5 g del

material, se diluye en 45 ml de agua estéril y se agita mecánicamente durante 30 min. Se filtra por gasa y se toma una alícuota de 1 ml de la suspensión. Se hacen tres extracciones por placa y se efectúan diluciones hasta 10-11 en solución salina. La siembra se lleva a cabo en placas Petri (100x25 mm.), en un medio en el que la única fuente energética es el almidón (tryptona 10g/l, NaCl 5g/l, almidón soluble 10g/l). Se utiliza como criterio de selección el aislamiento de las cepas con características culturales diferentes y que crezcan en las mayores diluciones.

Para aislar bacterias se incuban durante 72 h a 30 °C. Las cepas se cultivan por agotamiento en el mismo medio de cultivo. Se comprueba la pureza mediante tinción Gram a través del microscopio óptico compuesto a un aumento total de 1000 X. De cada colonia, con características distintivas, se obtiene un cultivo puro en el mismo medio de selección. Posteriormente, para observar la morfología de ellas (Valiño y otros, 1992) las cepas se pasan a medio agar nutritivo, enriquecido con 2% de almidón (Peltier y otros, 1959) en el caso de las bacterias. Se les aplica como criterio taxonómico importante la tinción de Gram (Martínez et al. 1985), determinación cualitativa de la capacidad amilolítica. Se utiliza el medio agar nutritivo, modificado por Peltier y otros (1959). A éste se le añadió 0,05% de carboximetilcelulosa para lograr una mejor definición de los halos de digestión. Se mide la capacidad de formar halos después de realizar la reacción cromógena del almidón con el lugol a 0.05%, durante 2 min. La determinación del índice de potencia, se obtiene al calcular la relación entre el diámetro de degradación y el diámetro de la colonia (Valiño 1999). Se utilizan como criterios de selección final escoger las cepas con mayores índices de potencia y que hubiesen crecido en elevadas concentraciones en el sustrato original.

Las bacterias degradadoras de almidón fueron preseleccionadas para ser evaluadas respecto a su capacidad de biodegradar las bolsas de plástico compostables de almidón procedentes del centro comercial Plaza Ve a y Tottus, para esto se siembran las bacterias solas y realizando sucesivas combinaciones sobre agar nutritivo por extensión, y sobre este se colocan porciones de un centímetro de lado de las bolsas para determinar qué bacterias o consorcio tiene la mayor velocidad de biodegradar el plástico compostable, se incuban a 23 °C±1 °C, 24 a 72 h; se realizan cuatro registros fotográficos (8 am., 12 pm., 4 pm. y 8 pm.).

Las bacterias seleccionadas y en consorcio son expuestas a tratamientos de variación de condiciones de pH (5, 6, 7, 8 y 9), los que se logran sumergiendo el plástico compostable de 1 cm de lado por cinco minutos en agua destilada ajustada a los pH respectivos y luego se colocan en agar nutritivo sembrado con las bacterias solas y en consorcio, se incuban a 23 °C±1 °C, 24 a 72 h.

También se evalúa el tratamiento físico de la variación de superficie del plástico compostable en cinco tratamientos de corte 2 mm, 4 mm, 6 mm, 8 mm y 1 cm.

Con respecto al tratamiento químico, el plástico biodegradable de 1 cm de lado se sumerge en aceite vegetal, detergente, lixiviado de compost estéril y lixiviado de humus estéril a cuatro diluciones 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 concentraciones, los que según tratamiento se colocan en agar nutritivo sembrado con las bacterias solas y en consorcio se incuban a $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 24, a 72 h.

En cada tratamiento mencionado anteriormente se consideran variaciones del tamaño de inóculo, réplicas del tratamiento en caldo nutritivo y repeticiones por triplicado, con la finalidad de visualizar el grado de dificultad para biodegradar la bolsa compostable de almidón.

Las bacterias especializadas se les promueve su crecimiento en medio líquido a partir de lixiviado de humus esterilizado suplementado con almidón al 0,1% en un biorreactor de burbujeo entre 24 a 48h, con la finalidad de preparar un inoculante que sirva de aplicación en sistemas de compostaje y de biodegradación de bolsas compostables de almidón derivados de un sistema de colecta y segregación de estas bolsas biodegradables, con la finalidad de monitorizar eficiencia de la velocidad de biodegradación.

Se realizan análisis de imágenes del proceso de biodegradación a diferentes tiempos, condiciones, por análisis de probabilidades, modelamiento matemático y variación de superficies, así mismo, observación de microscópica empleando el software Olympus stream, para rastrear el grado de formación de porosidad en función del tiempo como indicador del avance de biodegradación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fueron escogidas en total 45 plantas cuyas colonias de

bacterias fueron obtenidas de tierra fértil a una profundidad de 30 cm tanto alrededor de la raíz como entre plantas. Los cultivares a las cuales pertenecen las plantas escogidas para el estudio fueron páprika (7), maíz amarillo duro (5), papa (1), cebolla china (11), maíz (12), tomate (1), ají amarillo (3) y alfalfa (5). Luego de haber encontrado que las colonias de bacterias de los cultivares de tomate y papa no tienen mayor preponderancia sobre la porosidad, éstos fueron descartados.

El porcentaje de biodegradación durante los 30 días de exposición en laboratorio, indicado por la porosidad dentro de los segmentos de plástico tuvo un rango de 0,64% hasta 50%. Las familias de bacterias que lograron la biodegradación por sobre el 20% fueron las identificadas como B23E_1D, B8E_1B, B23E_1B, B7E_2B, B7E_2A y B23E_1C con 28,31%, 36,67%, 38,21%, 42,61% 47,80% y 50% respectivamente; correspondientes mayormente a los cultivares de cebolla china y maíz (Ver Anexo 3.1) Las colonias de bacterias encontradas para el cultivo de cebolla china (en raíz o entre plantas) fueron las que más degradaron al plástico compostable (Ver Anexo 3.2).

Luego de escoger las familias de bacterias con mayor degradación a los 30 días, se las evaluó nuevamente a los 60, 90 y 120 días, (Anexo 3.3), observando una velocidad de degradación intensa en todas las colonias al inicio, luego va decayendo hasta casi tener la misma a los 120 días para cada una de ellas, como se observa en la siguiente figura donde el ratio promedio de biodegradación del paso de 30 a 60 días fue de 10,26%, de 60 a 90 días fue de 4,26% y de 90 a 120 días fue de solo 1,01%.

Figura 3

Porcentaje de degradación de las colonias que respondieron mejor al experimento

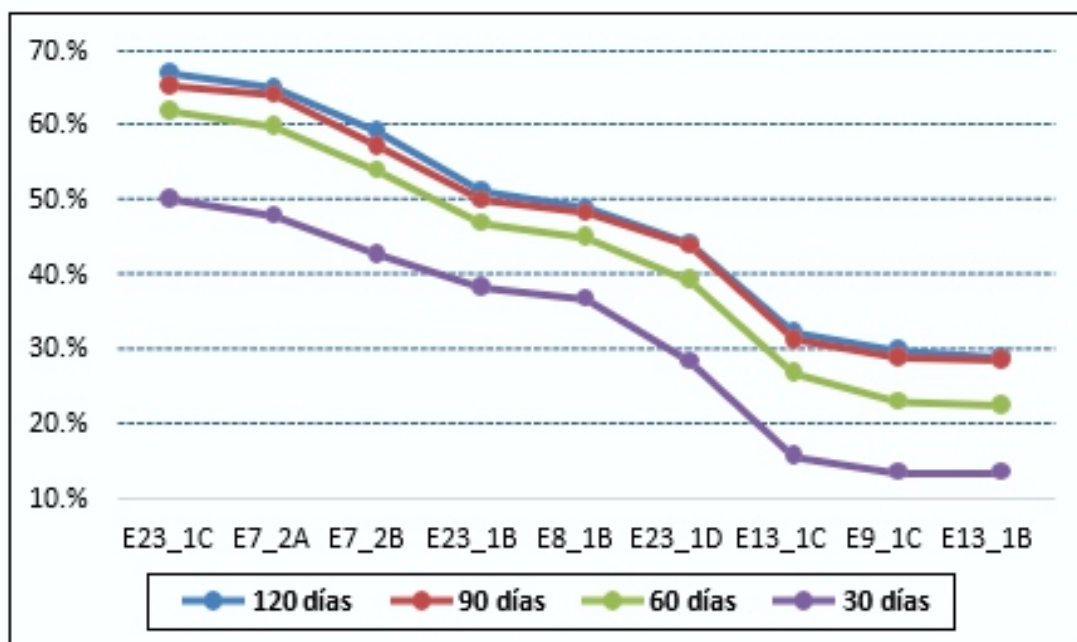
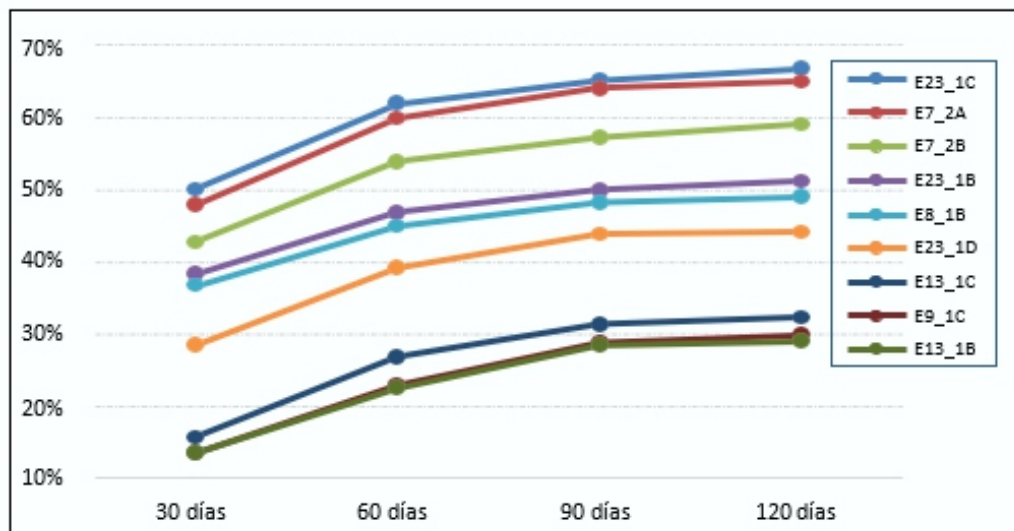


Figura 4

Porcentaje de degradación de las colonias evaluadas en cuatro meses



Como se explicó en la metodología, los datos sobre la variable porosidad se transformaron a logaritmos por ser porcentajes con varios decimales y con la finalidad de utilizar las pruebas paramétricas correspondientes, por

lo que los valores se transformaron a negativos, encontrándose los descriptivos más importantes de la variable transformada y que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

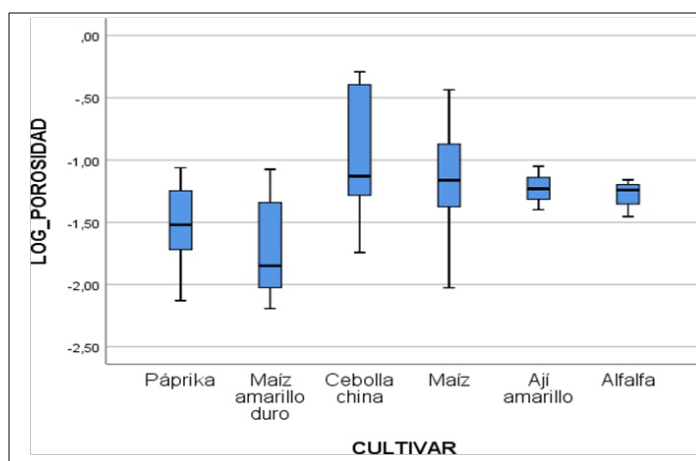
Descriptivos sobre porosidad efectuados por colonias de bacterias de los cultivos en estudio

Cultivar	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	Desv. Est.	I.C. 95%
Páprika	-2,13	-1,06	-1,519898	-1,5206	0,37862	-1,870731, -1,170407
Maíz amarillo duro	-2,19	-1,08	-1,849401	-1,6968	0,47163	-2,282453, -1,111231
Cebolla china	-1,74	-0,29	-1,129534	-0,9104	0,52618	-1,263927, -0,556937
Maíz	-2,03	-0,44	-1,162453	-1,1520	0,40918	-1,411995, -0,892037
Ají amarillo	-1,40	-1,05	-1,230836	-1,2268	0,17437	-1,659934, -0,793605
Alfalfa	-1,45	-1,16	-1,241569	-1,2810	0,12089	-1,431102, -1,130882

Mediante el gráfico de cajas de Tukey se corrobora que las mejores colonias que degradaron el material compostable son aquellas que pertenecen a los cultivos de cebolla china y maíz.

Figura 5

Cajas de Tukey de las colonias evaluadas en cuatro meses por cultivar



Luego de corroborar la normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro Wilk y Bartlett ($p > .05$) (Ver Anexos 3,4 y 3,5), se contrastó la hipótesis para conocer si existe diferencia significativa entre los cultivares para la variable porosidad, encontrándose que hay suficiente evidencia estadística para aceptar que al menos un cultivar difiere significativamente de los demás (ANOVA con $\alpha = .05$, $p = .03$). Luego utilizando la prueba de Tukey se corroboró

la descripción del gráfico anterior; es decir, se concluye que los cultivares que realmente difieren son cebolla china con maíz amarillo duro ($p = .015$), pues en promedio la mayor degradación de la cebolla china con $- .914$ contra maíz amarillo duro con $-1,6968$, siendo las colonias de bacterias de cebolla china las que dan una mayor degradación al plástico compostable y que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Cultivares homogéneos para la variable porosidad

Cultivar	N	Subconjuntos homogéneos	
		1	2
Maíz amarillo duro	5	-1,6968*	
Páprika	7	-1,5206	-1,5206
Alfalfa	5	-1,2810	-1,2810
Ají amarillo	3	-1,2268	-1,2268
Maíz	12	-1,1520	-1,1520
Cebolla china	11		-0,9104*
(**) p -valor =		.262	.161

(**) promedios en negrilla difieren significativamente ($p = .015$)

(*) promedios en la misma columna no difieren significativamente ($p > .05$)

Luego de encontrar qué cultivares han sido los que contienen las mejores colonias especializadas para degradar la bolsa compostable, se ha realizado a su vez el análisis inferencial para conocer cuáles de estas tienen la misma capacidad y cuáles son las mejores,

realizando un ANOVA simple, encontrando que existe evidencia estadística para afirmar que hay diferencia altamente significativa entre las colonias respecto al porcentaje de porosidad (degradación) del plástico compostable al hallar un p -valor = .000.

Tabla 4

ANOVA sobre diferenciación de colonias

Fuente de Variación	S.C.	gl	C.M.	F calc	p-valor.
Entre colonias	0,972	8	0,121	11,268	.000
Error	0,291	27	0,011		
Total	1,263	35			

Asimismo, se realizó la prueba de Tukey para conocer cuáles de las colonias son las que realmente difieren y son las que aportan mayor degradación y que se muestra en la Tabla 4, donde se observa claramente que E23_1B, E7_2B, E7_2A y E23_1C son las colonias favoritas para la degradación y que se encuentran en la raíz y entre las plantas de cebollita china, pues no difieren significativamente ($p = .187$), además de ser las de mayor

promedio de degradación (% de porosidad) y que se visualiza mejor en la Figura 6, es necesario indicar también que para este grupo de colonias la variabilidad es menor por tener una curtosis leptocúrtica.

Tabla 5*Descriptivos de porosidad por colonias a los 120 días de estudio*

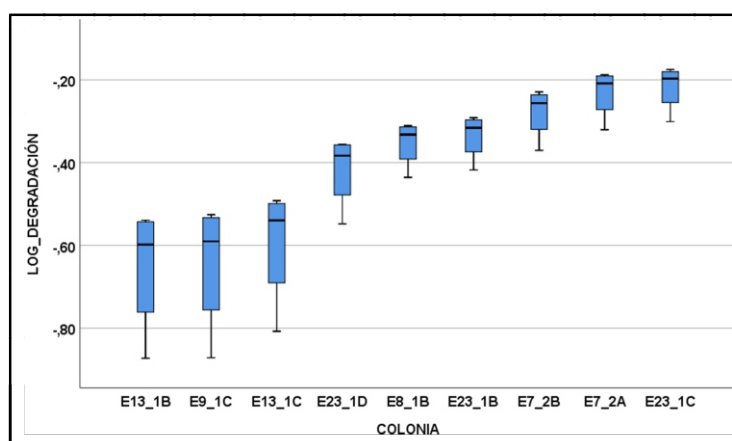
Colonia	Media	DE	I.C. 95%	Curtosis
E13_1B	-0,652108	0,077802	(-0,899708, -0,404507)	1,640933
E9_1C	-0,644539	0,079834	(-0,898605, -0,390473)	1,751513
E13_1C	-0,594797	0,073165	(-0,827640, -0,361955)	1,704774
E23_1D	-0,417493	0,045142	(-0,561156, -0,273830)	2,425203
E8_1B	-0,352772	0,028801	(-0,444431, -0,261113)	2,259519
E23_1B	-0,335264	0,028676	(-0,426524, -0,244003)	2,317041
E7_2B	-0,278055	0,031908	(-0,379600, -0,176509)	2,614110
E7_2A	-0,231362	0,030733	(-0,329169, -0,133555)	2,599877
E23_1C	-0,217579	0,028660	(-0,308788, -0,126369)	2,787900

Tabla 6*Valores promedios de biodegradación para las colonias en estudio*

Colonia	(*) Subconjuntos homogéneos			Cultivar	Extracción
	1	2	3		
E13_1B	-0,65210775				
E9_1C	-0,64453912				
E13_1C	-0,59479742	-0,59479742			
E23_1D	-0,41749267	-0,41749267	-0,41749267		
E8_1B	-	-0,35277171	-0,35277171		
E23_1B			-0,33526392	cebolla china	entre plantas
E7_2B			-0,27805452	cebolla	raíz
E7_2A			-0,23136156	cebolla	raíz
E23_1C			-0,21757882	cebolla china	entre plantas
p-valor	.072	.058	.187		

(*) promedios en la misma columna no difieren significativamente ($p > .05$)**Figura 6**

Cajas de Tukey de las colonias por cultivar evaluadas en cuatro meses



Finalmente, haciendo la transformación correspondiente (de log a sus valores reales) y calculando los porcentajes correspondientes, mediante: $\%Degrada = 10^x \times 100\%$.

Donde x son los valores de la tabla anterior, se tiene la

Tabla 7

Porcentajes promedios de biodegradación para las colonias en estudio

Colonia	(*) Subconjuntos homogéneos			Cultivar	Extracción
	1	2	3		
E13_1B	22,28%				
E9_1C	22,67%				
E13_1C	25,42%	-25,42%			
E23_1D	38,24%	38,24%	38,24%		
E8_1B	-	44,38%	44,38%		
E23_1B			46,21%	cebolla china	entre plantas
E7_2B			52,72%	cebolla china	raíz
E7_2A			58,70%	cebolla china	raíz
E23_1C			60,59%	cebolla china	entre plantas
p-valor	.072	.058	.187		

Respecto al tratamiento químico, a medida que se incrementa el pH a 14 se libera almidón (reacción al Lugol: positivo) del bioplástico, mientras que al disminuir el pH a 1 no se libera almidón (reacción al Lugol negativo) y el bioplástico se fracciona en escamas pequeñas de 1 a 2 mm.

Los resultados son evidentes luego de ser analizado el material de plástico compostable durante 4 meses de exposición a las colonias de bacterias para la degradación del este material. Finalmente, luego de 120 días, se observó que aquellas que pertenecen al cultivar cebolla china llegaron hasta cerca del 60%, lo que dista de la información que muestran los supermercados indicando que sus bolsas son totalmente compostables.

A pesar que la producción de las bolsas biodegradables empiezan con el almidón que se extrae del maíz, luego los microorganismos lo transforman en una molécula más pequeña de ácido láctico que sirve como base para la elaboración de cadenas poliméricas de ácido poliláctico (PLA) la que forma un plástico biodegradable (González y otros, 2013), en la experimentación se vio que son las colonias de la cebolla china las que mejor degradan tales bolsas (60%), actuando mejor que las colonias del propio maíz (44%) y con menor degradación los otros cultivares.

La perforación del plástico de las bolsas compostables formando porosidades fue relativamente rápida a los 30 días, parece ser porque las bacterias inmediatamente “comen” el almidón, pero dejan ver que el plástico subyace, lo cual indica que todo el material no es compostable, se siguió el estudio hasta los 120 días observando los ratios de velocidad entre las etapas en

nueva tabla con los porcentajes a los 120 días del estudio. Se observa que las bacterias provenientes del cultivar cebolla china llegan a degradar entre 46 % y 60% del material compostable.

estudio que fueron en promedio de 10,26% al pasar de 30 a 60 días, de 4,26% de 60 a 90 días y de solo 1,01% de 90 a 120 días; y en el mejor de los casos como máximo llegó al 60%, tendiendo a estabilizarse la biodegradación no cumpliendo con los estándares (Australia, 2010), los cuales indican que se deben de tener valores esperados de biodegradación alrededor del 90%; en ese sentido, nuestra investigación coincide con la investigación de Solano y otros (2022), quienes indican que sus resultados contrastan con la información dada para los materiales plásticos y agregan que cualquier declaración de compostabilidad o biodegradabilidad debe estar claramente indicada y relacionada con las condiciones bajo las cuales se aplican las propiedades.

Lo interesante es que, siendo las colonias de bacterias pertenecientes al cultivar de cebolla china, además de ser las de más alta biodegradación, también es rescatable que la variabilidad de ellas es menor; es decir la porosidad observada está muy bien representada por el promedio, llegando a tener una curtosis alta (leptocúrtica).

CONCLUSIONES

Luego del análisis fisicoquímico se concluye que las colonias de bacterias que mejor degradan el material compostable son aquellas asociadas al cultivar cebolla

china y dichas cepas son las denominadas E23_1C, E7_2A, E7_2B, E23_1B.

Se infiere por los resultados que las bolsas plásticas compostables efectivamente tienen almidón atrapado en la red polimérica del plástico, pero el tratamiento ácido acelera el fraccionamiento del plástico a escamas, por lo que se concluye que no es un compostable como se promociona.

El plástico de las bolsas compostables se fracciona a escamas milimétricas a microscópicas, queriendo decir que si entra en un sistema de compostaje se acumula y así podría ser empleado en fondos, viveros, etc.

Se recomienda que se fabriquen bolsas a partir de bioplásticos producidos por bacterias y así asegurar el completo compostaje.

REFERENCIAS

- Anbumani, S., & Kakkar, P. (2018). Ecotoxicological effects of microplastics on biota: a review. *Environ Sci Pollut Res.*, 25, 14373–14396. doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1999-x>
- Asalde Alvarez, C. J. (2018). *Regulación de bolsas plásticas de un solo uso en el Perú*. Lima: Repositorio Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Australia, S. (2010). *Standards Australia*. Obtenido de AS5810-2010 Biodegradable plastics-Biodegradable plastics suitable for home composting: www.standards.org.au
- Bioeconomy, S. (2018). *A Sustainable Bioeconomy for Europe: Strengthening the Connection between Economy, Society and the Environment*. European Commission, Brussels, Belgium. Obtenido de <https://ec.europa.eu/knowledge4policy/publication/sustainable-bioeconomy-europe-strengthening-connection-between-economy-societyen>
- Fernando, A., Quirós de Bache, J., & López, V. (2014). *Análisis de la biodegradabilidad de una bolsa ISO 15985:2004*. Madrid, España: Universidad Politécnica de Madrid.
- González, Y., Meza, J., González, O., & Córdova, J. (Feb de 2013). Síntesis y Biodegradación de ploidroxialcanoatos plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 29(1).
- Greenpeace, (2019). *GreenPeace International*. <https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/consumismo/plasticos/datos-sobre-la-produccion-de-plasticos/>
- Heck, C. (2018). Plásticos: ¿Solución o problema? *Panel Por un Perú sin contaminación: Iniciativas para reducir el uso del plástico*.
- Lu, N., Lu, Y., & Feng, C. (2014). Log-transformation and its implications for data analysis. *Biostatistics in psychiatry* 26(2), 105-109. doi: 10.3969/j.issn.1002-0829.2014.02.009 Source: PubMed
- MINAM. (2016). Ministerio del Ambiente. *Ellen MacArthur Foundation*. <https://www.minam.gob.pe/menos-plastico-mas-vida/cifras-del-mundo-y-el-peru/>
- Solano, G., Rojas-Gätjens, D., Rojas-Jimenez, K., & Chavarria, M. (July de 2022). Biodegradation of plastics at home composting conditions. *Environmental Challenges*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envc.2022.100500>