

Universidad Católica De Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas.

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica.



“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR 16S rRNA DE CEPAS
BACTERIANAS CON CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE PEAD
(POLIETILENO DE ALTA DENSIDAD) MICRO CONTAMINANTE EN AGUAS
SINTÉTICAS A ESCALA LABORATORIO.”

Tesis presentada por la Bachiller:
Arenas Delgado, Analucia

Para optar al Título Profesional de:
Ingeniera Biotecnóloga

Asesor: Dr. Ing. Javier Roque Rodríguez

Arequipa - PERU

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 15040069
N° Trámite en Fac. 251-2015
Fecha Recep. Fac. 24-09-2015

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: ARENAS DELGADO, Analucia

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"EVALUACION DE SISTEMAS DE BIO-PROCESAMIENTO DE RESIDUOS ANTROPOGENICOS DE POLIETILENO UTILIZANDO RE-DIRECCIONAMIENTO DEL METABOLISMO BACTERIANO CON CAPACIDAD DE DIGESTION DE POLIMEROS DE ALTO PESO MOLECULAR"

DICTAMINADORES: 1) Mgter. Roxana Bardales Alvarez 2) Mgter. Jaime Barreda del Carpio

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos revisado el Plan de Tesis intitulado: "EVALUACION DE LA CAPACIDAD REMEDIADORA DE MICROORGANISMOS BACTERIANOS EN UN SISTEMA DE BIOPROCESAMIENTO DE RESIDUOS DE PEAD MEDIANTE EL REDIRECCIONAMIENTO DEL METABOLISMO BIOLOGICO" informando que: formuladas y corregidas las observaciones, consideramos que se encuentra APTO para continuar con el trámite estipulado en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

FIRMAS: (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA

ASESOR: Mgter. Francisco Roque Rodríguez

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: "SECUENCIAMIENTO MOLECULAR 16SRNA DE CEPAS BACTERIANAS NATIVAS CON ALTA CAPACIDAD DE REMOCION Y BIODEGRADACION DE POLIETILENO DE ALTA DENSIDAD (PEAD) MICRO SUSPENDIDO EN CUERPOS ACUOSO EMERGENTEMENTE IMPACTADOS", considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad
Atentamente

FIRMA FECHA 22/06/2018

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) Dr. José Villanueva Salas 3) Mgter. Jaime Barreda del Carpio
2) Mgter. Roxana Bardales Álvarez

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION MOLECULAR 16SRNA DE CEPAS BACTERIANAS CON CAPACIDAD DE BIODEGRADACION DE PEAD (POLIETILENO DE ALTA DENSIDAD) MICRO CONTAMINANTE EN AGUAS SINTETICAS A ESCALA LABORATORIO" y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

FIRMA (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 12/09/18

JURADOS: PRESIDENTE Ing. Eugenia Zeballos Delgado
VOCAL Mgter. Roxana Bardales Alvarez
SECRETARIO Mgter. Jaime Barreda del Carpio

FECHA Jueves 04/10/18 HORA 7:00 p.m. LOCAL SUM FCFB y B

FIRMA DEL DECANO FECHA 27/09/18



Dedicatoria

*A mi padres pilar y fortaleza de mi vida y Dios que nos
acompaña en cada paso.*

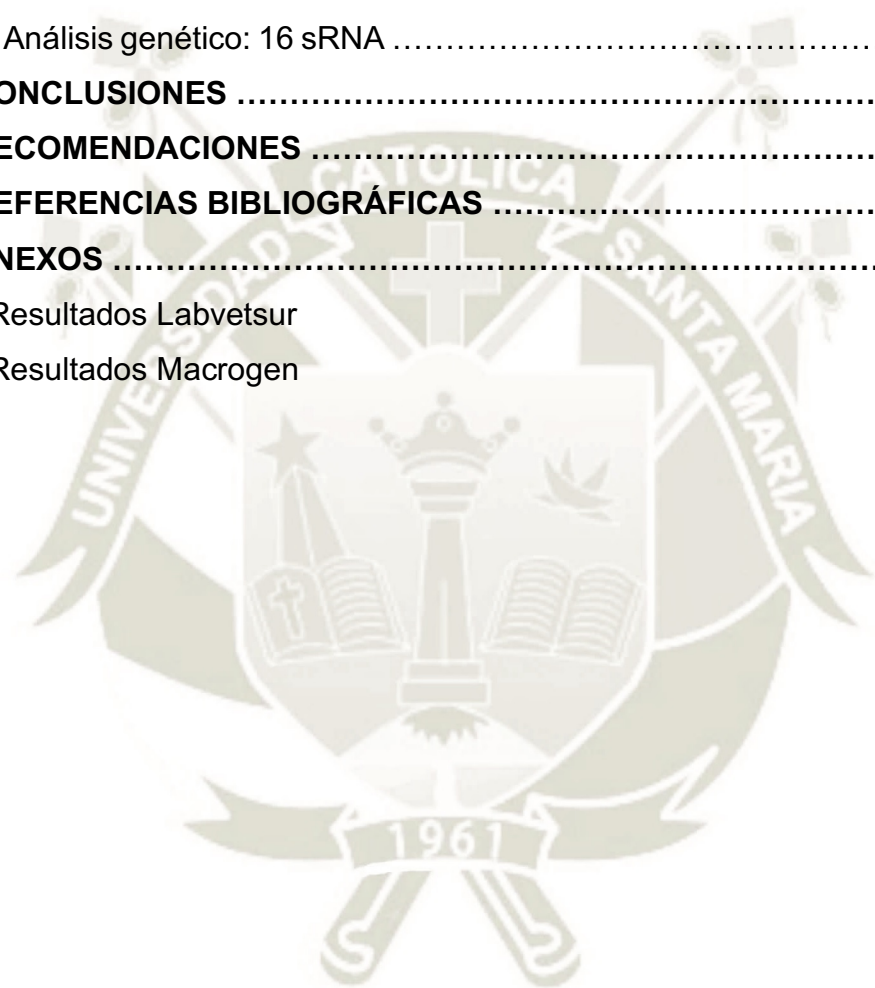
AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerles a mis padres, por su soporte y apoyo, en todo el camino hasta concluir con satisfacción mi carrera universitaria. Quiero también agradecer a mis docentes, por el conocimiento impartido, ami asesor el Dr. Ing. Javier Roque Rodriguez por la paciencia, el apoyo y los consejos en todo el proceso de experimentación y redacción de este proyecto, al Dr. José Villanueva por los consejos y la orientación al escoger el proyecto y durante puntos clave de su desarrollo; a la Dra. Mercedes Jave por su constante guía en el área microbiológica; a la Dra. Milagros Terán por su colaboración y guía en el proceso de identificación bioquímica y procesos de conservación; al personal encargado de los laboratorios por las facilidades y la paciencia a la hora de brindarme las instalaciones; a mis amigos, familiares y personas cercanas por tanto apoyo, y por último a Dios, porque sin él nada esto sería posible.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	
HIPÓTESIS	
OBJETIVOS	
General	
Específicos	
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	1
1.1 Especies microbiológicas con capacidad depuradora de Polietileno de alta Densidad y otros polímeros sintéticos	1
1.2 Microorganismos emergentes con capacidad bioactiva de remoción de micro-plásticos en aguas	8
1.3 Rutas bioquímicas	11
1.4 Micro plásticos y PEAD: Comportamiento en aguas	14
1.5 Tratamiento de remoción de micro-plásticos en cuerpos acuíferos	23
1.6 Perspectivas Futuras en el área	29
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1 Lugar de ejecución	30
2.2 Materiales	31
2.3 Métodos	32
2.4 Flujograma de actividades	50
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1 Obtención y preparación de muestras de plásticos ambiental	51
3.2 Estabilización con suero fisiológico	53
3.3 Sembrado en placa y evaluación de crecimiento microbiano	54
3.4 Siembra en medios diferenciales	56
3.5 Evaluación Morfológica del crecimiento Microbiano	59

3.6 Pruebas Bioquímicas y tinción Gram	64
3.7 Crioconservación	66
3.8 Estandarización de PEAD en caldo de cultivo BHI	69
3.9 Adaptación de las cepas al medio enriquecido con PEAD	73
3.10 Evaluación y Recopilación de datos Gravimétricos	75
3.11 Metalización de la Muestra	78
3.12 Microscopía Electrónica de Barrido	79
3.13 Análisis genético: 16 sRNA	84
4. CONCLUSIONES	91
5. RECOMENDACIONES	92
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
7. ANEXOS	
7.1 Resultados Labvetsur	
7.2 Resultados Macrogen	



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos degradadores de polietileno. Biosprospección de la degradación de polietileno	7
Tabla 2. Diversas rutas de degradación de polímeros	8
Tabla 3. Resumen de estudios sobre la degradación microbiana del plástico (mezclado y no mezclado)	10
Tabla 4. Resumen de los métodos para el estudio de la biodegradación	13
Tabla 5. Agar Nutritivo. (31g por litro de agua destilada)	34
Tabla 6. Agar Müeller Hinton. (37g por litro de agua destilada)	34
Tabla 7. Siembra por estría en Agar Nutritivo	35
Tabla 8. Siembra por estría en Agar Mueller Hinton	35
Tabla 9. Agar sangre (Medio de Cultivo Diferencial)	36
Tabla 10. Agar Mac Conkey (Medio de Cultivo Diferencial)	37
Tabla 11. Componentes y concentraciones para Agar Sabouraud	37
Tabla 12. Agar Sangre: Pruebas diferenciales	38
Tabla 13. Agar Mac Conkey: Pruebas diferenciales	38
Tabla 14. Sabouraud: Pruebas diferenciales	38
Tabla 15. Caldo BHI (Cultivo Líquido)	41
Tabla 16. Medio de Crecimiento: Medio Sintético	42
Tabla 17. Medio de Cultivo Sintético Enriquecido con PEAD	42
Tabla 18. Primers utilizados e información de la muestra a analizar	49
Tabla 19. Temperaturas de muestreo in situ	53
Tabla 20. Temperaturas de estabilización con suero fisiológico	53
Tabla 21. Evaluación microscópica y de crecimiento en medios generales	55
Tabla 22. Evaluación microscópica y de crecimiento en medios diferenciales	59
Tabla 23. Evaluación del crecimiento en el tiempo	59
Tabla 24. Características macroscópicas de las colonias obtenidas	61
Tabla 25. Resultados de pruebas bioquímicas realizadas en Labvetsur	65
Tabla 26. Establecimiento de consorcios bacterianos	67
Tabla 27. Pesos de papel filtro seco	69
Tabla 28. Pesos de papel filtro desecado con PEAD y caldo BHI estéril	70
Tabla 29. Diferencia de pesos, consumo de PEAD	70
Tabla 30. Peso de papel filtro seco por semana	75

Tabla 31. Peso de papel filtro en contacto con consorcio bacteriano en caldo BHI.	76
Tabla 32. Consumo de PEAD en gramos	77
Tabla 33. Comparación de consumo de ambos consorcios	77
Tabla 34. Especies identificadas genéticamente	84



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Configuración sp ³ para átomos de carbono de la cadena principal 2 de la molécula de Polietileno	
Figura 2. Adhesión de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> a láminas de polietileno 5 (PE) con aditivos de Fe (A) y Mn (B)	
Figura 3. Penetración de hifas de <i>Aspergillus Terreus</i> (C) y <i>Aspergillus 6 Fumigatus</i> (D)	
Figura 4. Reportes y artículos en revistas científicas en pellets plásticos y 18 micro plásticos desde la década de 1970	
Figura 5. Valores de LOEC informados para micro-partículas de plástico y 25 minerales	
Figura 6. Diagrama de flujo de actividades del proyecto	50
Figura 7. Fotografía de geo localización en Google Earth sobre el punto toma 51 de muestra	
Figura 8. Fotografía de registro de siembra en placa en medio Müeller Hinton, 54 5to día de crecimiento	
Figura 9. Fotografía de registro de siembra en placa en Agar Sangre.....	56
Figura 10. Fotografía de registro de crecimiento y características 57 macroscópicas en Agar Sangre	
Figura 11. Fotografía de Vista Microscópica 100X	58
Figura 12. Forma y elevación de las colonias	60
Figura 13. Borde de las colonias	62
Figura 14. Optimización de reacción enzimática por variación de la 63 temperatura	
Figura 15. Comparación de la reacción enzimática por según la naturaleza de 64 los microorganismos	
Figura 16. Fotografía de pruebas Bioquímicas realizadas en las instalaciones 65 de Labvetsur Arequipa	
Figura 17. Fotografía de Inóculos en cultivos líquidos	69
Figura 18. Pesos de papel filtro en contacto con caldo BHI	71
Figura 19. Promedio de pesos de papel filtro en contacto con caldo BHI	71
Figura 20. Fotografía de Molienda de PEAD	72

Figura 21. Fotografía de registro del contacto del Grupo 2 con el medio sintético de PEAD	76
Figura 22. Comparativo de consorcios bacterianos en consumo de PEAD	78
Figura 23. Fotografía de registro de metalización de las muestras – Laboratorio de Microscopia UNSA	79
Figura 24. Fotografía de PEAD puro, como blanco comparativo	80
Figura 25. Fotografía de la 2da semana de contacto del consorcio mixto con el medio sintético enriquecido con PEAD	80
Figura 26. Fotografía de la 2da semana de contacto de las cepas de <i>Pseudomonas</i> con el medio sintético enriquecido con PEAD	81
Figura 27. Fotografía de la 3ra semana de contacto de las cepas de <i>Pseudomonas</i> con el medio sintético enriquecido con PEAD	82
Figura 28. Fotografía de la 3ra semana de contacto de las cepas del consorcio mixto con el medio sintético enriquecido con PEAD	83
Figura 29. Fotografía de la 4ta semana de contacto de las cepas de <i>Pseudomonas</i> con el medio sintético enriquecido con PEAD	84
Figura 30. Fotografía del procedimiento de selección de las secuencias para iniciar en alineamiento por ClustalW.	87
Figura 31. Fotografía del procedimiento de construcción del árbol filogenéticos de las bacterias muestra en el programa MEGA PRO 5.10	87
Figura 32. Árboles Filogenéticos sobre 32 especies de <i>Bacillus</i> basadas en el análisis 16 S rRNA(a) gyrB (b) secuencias genéticas	88
Figura 33. Árbol Filogenético para la sub especie <i>Bacillus dakarensis</i> 'Marseille-P3515T y ' <i>Bacillus sinesaloumensis</i> ' Marseille-P3516T en comparación con otros miembros de la misma familia filogenética.	89
Figura 34. Árbol Filogenético "Neighbor-joining tree" basado en 16S rRNA (1600) secuencias	90

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. $T_m = \Delta H / \Delta S$ (1)	20
Ecuación 2. Velocidad de aumento de células = $\mu \cdot N^\circ$ o masa de células	55
Ecuación 4. $dZ = \mu \cdot Z dt$	55



LISTA DE ABREVIATURAS

PEAD	Polietileno de Alta Densidad
HDPE	High Density Polyethylene
RSU	Residuos sólidos municipales
CPCB	Junta Central de Control de la Contaminación
PEBD	Polietileno de baja densidad
PE	Polietileno
UV	Ultravioleta
PAHs	Hydrocarburos aromáticos policíclicos
GPC	Cromatografía de permeación en gel
PVC	Policloruro de vinilo
PBS	Polibutileno succinato
PBSA	Polibutileno coadipato
PHA	Poli-3- hidroxialcanoatos
PHB	Poli-bhidroxibutirato
PS-PUR	Poliéster-poliuretano
MSW	Medio de cultivo
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy

PUR	Poliuretano de poliéster
DSC	Calorimetría de barrido diferencial
DMR	Análisis Mecánico Dinámico
HT-GPC	Cromatografía de permeación en gel a alta temperatura
GC	Cromatografía de gases
RMN	Resonancia magnética nuclear
GC-MS	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
FDA	Diacetato de fluorescentes
PPL	Polipropiolactona
PCL	Policaprolactona
PLA	Ácido poliláctico
UV	Ultravioleta
MPPs	Microplásticos primarios
Tm	Temperatura de fusión
ΔH	Cambio de entalpía en la fusión
ΔS	Cambio de entropía en la fusión
MF	Micro filtración

OI	Ósmosis inversa
NF	Nano filtración
UF	Ultrafiltración
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
PCR	Polymerasa Chain Reaction
UTM	Universal Transversal de Mercator
BHI	Brain and heart infusion agar
rpm	Revoluciones por minuto
MEB	Microscopio Electrónico de Barrido
NCBI	National Center for Biotechnology Information
A	Amstrong
ECA	Estándar de Calidad Ambiental
pH	Potencial de Hidrógeno
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
µm	Micrometros
TSI	Agar Triple Hierro
MINCETUR	Ministerio de Comercio Exterior y Turismo

CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Símbolos

CO₂ Dioxido de carbono

CH₄ Metano

Alk n-alcanos

Nah Naftaleno

Xyl Tolueno

O₂ Oxígeno

NPK Acrónimo: Nitrógeno-Fósforo-Potasio

P Fosforo

H₂O Agua

(NH₄) SO₄ Sulfato de amonio

NaNO₃ Nitrato de sodio

K₂HPO₄ Fosfato dipotásico

KCL Cloruro de potasio

MgSO₄ Sulfato de magnesio

ATP Trifosfato de adenosina

RESUMEN

Existe un contaminante silencioso y que muy poco consideran, los micros plásticos que se encuentran en aguas y suelos en cantidades más que considerables que afectan de manera directa a la flora y fauna que habitan en el ecosistema impactado. Los resultados de la presente tesis demuestran que las cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus* tienen la capacidad de degradar micro-partículas de Polietileno de Alta Densidad (PEAD). Estas cepas fueron aisladas de una muestra de rafia foto-impactada y sensible al tacto, de un basurero doméstico, estabilizadas en suero fisiológico, cultivadas en primera instancia en agar Nutritivo, y Mueller Hinton. Se replicaron en medios diferenciales (Agar Sangre, MacConkey y Sabouraud) y el medio utilizado para la degradación del PEAD fue un medio sintético mineral enriquecido con micro-partículas de PEAD. La secuenciación de los consorcios encontrados dio a conocer la presencia de cepas de *Pseudomonas* y nuevas cepas de *Bacillus* para la degradación de PEAD, las que mediante las técnicas de gravimetría y microscopía electrónica de barrido confirmaron degradar estas micro-partículas. Este trabajo se llevó a cabo a escala de laboratorio ofreciendo una alternativa innovadora y fácil de aplicar en ecosistemas impactados de forma amigable con el medio ambiente.

Palabras Clave: Medio ambiente, plásticos, micro-plásticos, bacterias nativas, polietileno de alta densidad.

ABSTRACT

Innumerable public and private entities concerned about climate change and the environment, they constantly present alternatives to counteract or mitigate the damage by fighting the overproduction of polluting materials such as Plastics. However, a silent pollutant that is less considered, are micro plastics found in water and soil in in very substantial quantities that directly affect animal, plants and microorganisms that inhabit the impacted ecosystem. The results of this thesis show that the strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* have the capacity to degrade micro-particles of High Density Polyethylene (HDPE). These strains were isolated from a raffia photo-impacted and sensitive to the touch, from a domestic dump, stabilized in physiological saline, cultured in the first instance on Nutritive agar, and Mueller Hinton. They were replicated in differential mediums (Blood Agar, MacConkey and Sabouraud) and the medium used for the degradation of HDPE was a synthetic mineral medium enriched with HDPE micro-particles. With the sequencing of the consortiums was found the presence of strains of *Pseudomonas* and new strains of *Bacillus* for the degradation of HDPE, which by gravimetric techniques and scanning electron microscopy confirmed to degrade these micro-particles. This work was carried out on a laboratory scale offering an innovative and easy to apply alternative in ecosystems impacted in an environmentally friendly way.

Keywords: Environment, plastics, micro-plastics, native bacteria, high density polyethylene.

INTRODUCCIÓN

El mundo enfrenta hoy una de sus etapas más críticas, con un avance descontrolado en todos los aspectos posibles de las industrias, se ha vuelto común escuchar o hablar de contaminación, efecto invernadero, cambio climático, etc. que afectan en general a todos los ecosistemas y vienen causando daños progresivos que se han tornado en destrucción. Nuevas industrias de derivados del petróleo como diésel, gasolina, detergentes, plásticos, etc. se han desarrollado generando nuevos productos y con ello nuevas amenazas para nuestro planeta. La industria de los plásticos es una industria relativamente nueva, pero con una amplia gama de productos empleados en ambientes domésticos en industriales. Cepillos y cremas dentales, tuberías, y empaques para alimentos son solo algunos de los principales productos de esta industria. El plástico es uno de los principales enemigos de la naturaleza al ser un material sintético derivado de hidrocarburos 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. Sin embargo, el mayor problema no radica en los envases, fibras y productos plásticos fabricados, radica en los “micro-plásticos”, que al ser partículas con un tamaño menor o igual a 5mm representan un grupo de agentes contaminantes imposible de detener por ser poco perceptibles a la vista, volviéndose así el asesino silencioso de ríos, lagos y océanos. Los micro-plásticos no se generan solo por el deterioro de los macro plásticos en suelos y aguas, muchas de estas pequeñas perlas forman parte de productos de nuestro uso diario como cosméticos, pastas dentífricas, exfoliantes, etc. Resulta ser completamente imposible remover totalmente este material con los conocimientos actuales sobre el tema. Lagunas, ríos y hasta bahías están impregnadas con este material,

generando contaminación en océanos y arrecifes, y cuando los plásticos son ingeridos por las distintas especies ocasionan daños irreversibles generando un ciclo de contaminación repetitivo y sin aparente solución.

El llevar a cabo una degradación completa, donde el polímero “blanco” se reduce a moléculas orgánicas menos complejas como CO_2 o CH_4 , el proceso es denominado mineralización, el cual requiere de grandes esfuerzos y de diversos grupos de microorganismos. En el caso de bacterias podríamos hablar de varios grupos como las metanogénicas, entre las que se encuentran las arqueobacterias como *Methanosaeta* y *Methanospirillum*, las fermentativas hidrolíticas o eubacterias como *Chlorobium* o las acetogénicas como es el caso de *Desulfovibrio* y *Desulfomatumculum*. Todas estas especies vinculadas al tema presentan condiciones muy difíciles de cultivo debido a sus asociaciones sintróficas, entonces, podemos decir que obtener cultivos puros en el caso de estas asociaciones es difícil y que ha generado varios errores en la correcta clasificación de todos sus elementos.

Sin embargo, existen otras 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 los más conocidos y estudiados son: los géneros *Pseudomona* y *Bacillus*., cuyas características de adaptabilidad a tan variadas condiciones incrementan su interés por encima de otras especies para utilizarlas como herramientas biotecnológicas. Muchas soluciones podrán ser planteadas con el tiempo y los avances de la ciencia, sin embargo, la raíz del problema es la falta de información que refiere de manera directa a la educación en nuestro país. Debemos replantear

y empezar a formar a las nuevas generaciones con otro pensamiento y nuevos hábitos. Por otro lado, potenciar el ámbito de la investigación en entidades educativas aumenta considerablemente las posibilidades de encontrar soluciones y, de forma innegable, mejora nuestra educación.

Por lo antes mencionado, se planteó la realización del trabajo de investigación titulado: “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR 16S rRNA DE CEPAS BACTERIANAS CON CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE PEAD (POLIETILENO DE ALTA DENSIDAD) MICRO CONTAMINANTE EN AGUAS SINTETICAS A ESCALA LABORATORIO.”



HIPOTESIS

Dado el crecimiento desmesurado de la industria de polímeros derivados de petróleo y el consumo masivo de productos altamente contaminantes que convertidos en desechos urbanos comunes forman parte de un proceso de descomposición de muchos años, es posible aislar e identificar microorganismos que formen parte del proceso tradicional de descomposición y que de forma individual tengan la capacidad de degradar polímeros de alto peso molecular como el polietileno de alta densidad.



OBJETIVOS

General

Aislar y caracterizar molecularmente mediante la secuencia 16s rRNA de cepas bacterianas con capacidad de biodegradación de PEAD (polietileno de alta densidad) micro contaminante en aguas sintéticas a escala laboratorio.

Específicos

1. Hallar e identificar fragmentos de plásticos como desechos urbanos con signos visibles y tangibles de degradación con alta probabilidad de contener cepas bacterianas con capacidad de degradación de PEAD.
2. Aislar, identificar y caracterizar molecularmente mediante el segmento 16s rRNA bacterias nativas con capacidad de degradación de PEAD.
3. Conformar asociaciones y consorcios bacterianos con alta capacidad de degradación de micro partículas de PEAD.
4. Adaptar y re-direccionar el metabolismo de cepas puras y consorcios conformados en medios sintéticos contaminados con micro partículas de PEAD comercial.
5. Evaluar morfológicamente el ataque y degradación biológica del PEAD comercial por cepas puras y consorcios conformados.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Especies microbiológicas con capacidad depuradora de Polietileno de alta Densidad y otros polímeros sintéticos.

Primero que nada, debemos saber que son los plásticos, su composición química y su comportamiento frente a diversos agentes que encontramos en la naturaleza de forma cotidiana. El primer material sintético creado por el hombre fue el plástico, no obstante, antes de su aparición otras resinas naturales ya eran utilizadas por el hombre, como la goma, laca, betún, ámbar, gutapercha, etc ^[1].

Se define polímeros como aquel compuesto de elevado peso molecular constituido por unidades estructurales repetitivas que se componen básicamente de C, H, O ^[2]. El polietileno como su nombre lo refiere es la unión de varios monómeros (polímero) de etileno que al polimerizar se unen mediante dobles enlaces generando una larga cadena de carbonos unidos mediante enlaces simples. Existen varios tipos de polietileno que se diferencian entre sí por su estructura y configuración. El PEAD o polietileno de alta densidad es un polímero no ramificado, de configuración lineal, cuyos ángulos formados por los enlaces que lo conforman miden aproximadamente 109° , por lo que su estructura se torna tetraédrica en la cadena principal ^[3], (**Figura 1**).

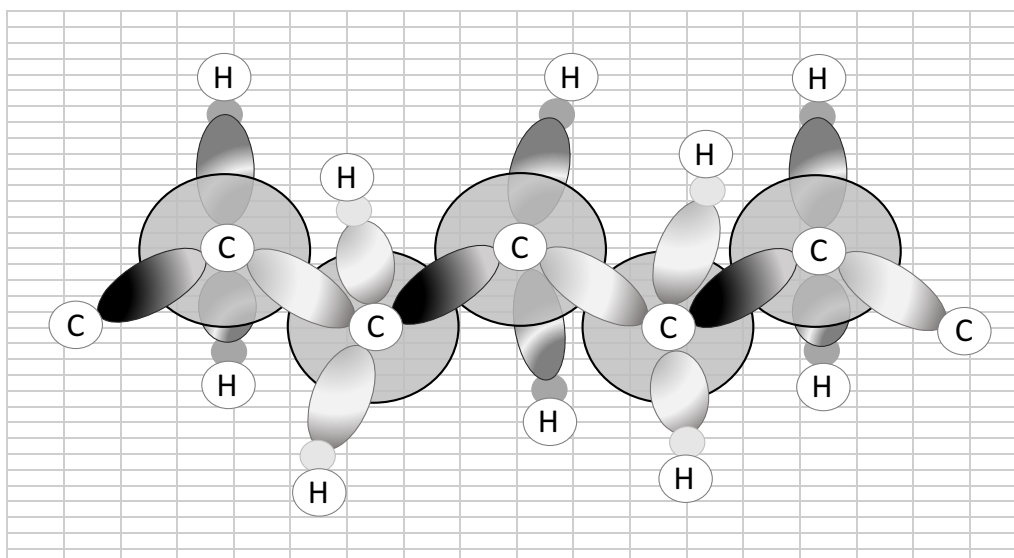


Figura 1. Configuración sp^3 para átomos de carbono de la cadena principal de la molécula de Polietileno [3].

Desde hace tres décadas, el uso descontrolado de los plásticos para el empaquetado (por ejemplo, comida rápida), el transporte, la industria y la agricultura en zonas rurales y urbanas, ha elevado el grave problema de la eliminación de residuos de plástico y su contaminación. Ligero, inerte, duradero, resistente y de bajo costo son las principales ventajas del plástico, mientras que tiene desventajas como ser recalcitrante para la biodegradación y es difícil de degradar de forma natural. El uso mundial de plásticos está creciendo a una tasa del 12% anual y, alrededor de 0.15 mil millones de toneladas de polímeros sintéticos se producen en todo el mundo cada año [4]. La tasa de acumulación de residuos de plástico en el medio ambiente es de 25 millones de toneladas/año y por consiguiente, se considera un grave peligro ambiental [5; 6]. Se estima que el plástico es un 20% de residuos sólidos municipales (RSU) en los Estados Unidos y Alemania [6], el 7,5% de los RSU en Europa occidental y el 25% en Australia. En

Turquía, se desecharon 11 millones de toneladas de plástico por año ^[7]. En el año 1999-2000, India importó más de 120,000 toneladas de plástico ^[8]. Anualmente, India genera 5,6 millones de toneladas métricas de desechos de plástico, y Delhi representa unas impactantes 689,5 toneladas métricas por día. Según la Junta Central de Control de la Contaminación (CPCB) de la India, el total de desechos plásticos que se recolectan y reciclan en el país es de 9,205 toneladas por día (aproximadamente el 60% del total de desechos de plástico) y 6,137 toneladas siguen sin recogerse y ensuciarse. Los infractores principales en la generación de tales desechos son cuatro, Delhi que aporta 689,5 toneladas por día, seguido de Chennai (429,4 toneladas), Kolkata (425,7 toneladas) y Mumbai (408,3 toneladas) ^[9].

Microorganismos como bacterias y hongos están envueltos en el proceso de degradación de plásticos tanto los naturales como sintéticos ^[10]. La biodegradación de plásticos procede de manera activa en diferentes condiciones y tipos de suelo o entorno, esto debido a que los microorganismos responsables de dicha acción difieren entre sí, y cada uno de ellos tiene un mecanismo de crecimiento ideal para las condiciones en las que se encuentren. Todos los polímeros y en especial los plásticos son sustratos potenciales para microorganismos heterotróficos ^[11].

Las bacterias reportadas por la literatura con capacidad de metabolizar polietileno pertenecen a los géneros: *Burholderia*, *Pseudomona*, *Bacillus*, *Brevibacillus borstelensis*, *Arthobacter*, *Antrhobacter paraffineus* y algunas especies aisladas en ambientes marinos. En el caso de los hongos se reporta el género *Asperrgillus*, *A. fumigatus* y *A. terreus* son los más mencionados por la bibliografía, también los géneros *Curvulari*, *Penicillum* y *Fusarium*, específicamente *Fusarium*

solani. Las Archaeas también se encuentran dentro de los microorganismos con capacidad de degradar polímeros en este caso el microorganismo más representativo es *Nitrosopomilus maritimus*. Algunos de estos microorganismos prefieren trabajar en grupos, por lo que se han establecido consorcios microbianos indefinidos que también participan en la degradación de plásticos [12].

Algunas especies del género *Bacillus* fueron encontradas al revisar el proceso de degradación de ciertas películas de polietileno de baja densidad (PEBD) en las que se encontró también estearato de cobalto como catalizador pro-oxidante [13]. En este caso se utilizaron compuestos oxigenados y no oxigenados de bajo peso molecular extraídos del polímero y se reportaron pérdidas del 8% de su peso original [14]. Otro caso similar se dio en India con especies del mismo género, pero con un porcentaje de pérdida mucho mayor al presentado en el caso anterior, esta vez la pérdida sería del 19%. Al trabajar con el género *Pseudomona* con moléculas de polietileno de alta densidad (PEAD) se obtiene un resultado muy similar, donde la pérdida es de 15% del peso original [15].

Existen otros géneros como los *Actinomycetes* que son capaces de degradar polímeros de la naturaleza del PEBD. *Rhodococcus* sp. Es quizá la especie que mejor los representa ya que se ha reportado que tienen la capacidad de formar biopelículas en la superficie de láminas de PEBD con un alto contenido de pro-oxidantes como aditivos, que se presume quizás hayan podido ser absorbidos o asimilados por el microorganismo. El microorganismo *Rhodococcus ruber* se ha visto implicado en procesos de degradación mediante la adhesión a láminas de polímeros [16], mientras que a *Rhodococcus rhodochrous* se le atribuye la capacidad

de adherirse y utilizar el polietileno con aditivos (hierro y manganeso) como fuente de carbono ^[17], **(Figura 2)**.

Por aproximadamente tres años y medio se estudió la degradación termo-oxidativa del polietileno, reportando que el proceso da como resultado residuos ácidos orgánicos, que al adicionar *Arthrobacter paraffineu* desaparecían, lo que significaba que este los estaba utilizando ^[18].

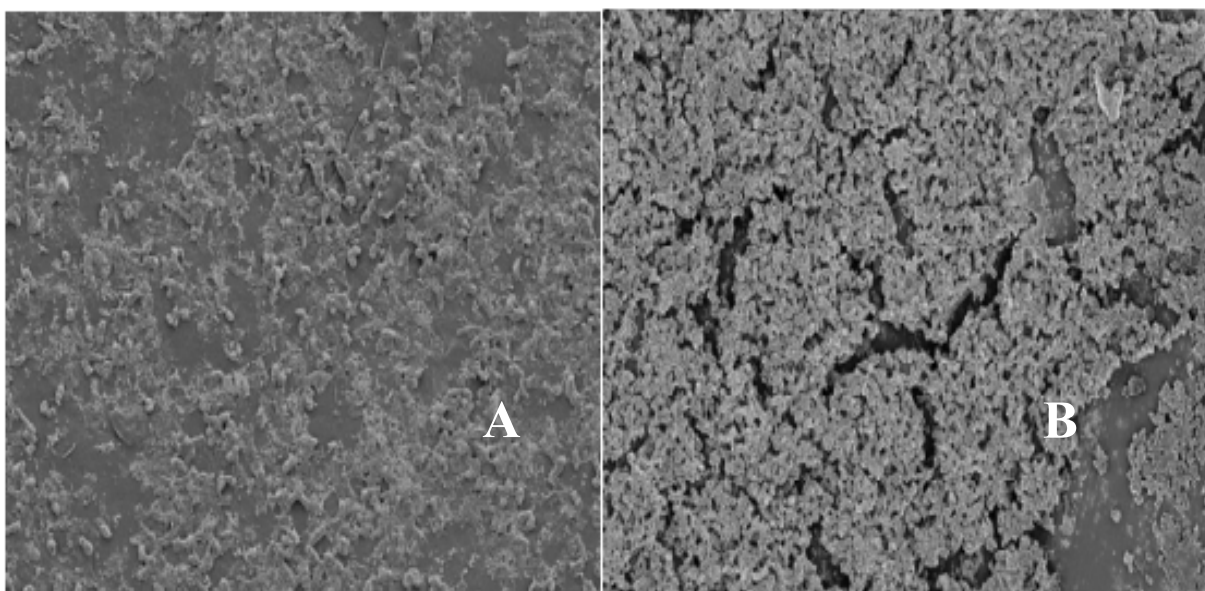


Figura 2. Adhesión de *Rhodococcus rhodochrous* a láminas de polietileno (PE) con aditivos de Fe (A) y Mn (B) ^[17].

Las especies de microorganismos fueron identificadas, aunque no fueron nombradas. ^[19] Durante nueve semanas se puso en contacto el género *Curvularia* con láminas de polietileno y fue hasta el final de esta novena semana que se observó penetración en las láminas de PEAD. El género *Aspergillus* reporta capacidad para degradar el polietileno como también lo hacen hongos del género *Penicillium* ^[134]. *A. fumigatus* y *A. terrius* presentaron acciones similares ^[20], **(Figura 3)**.

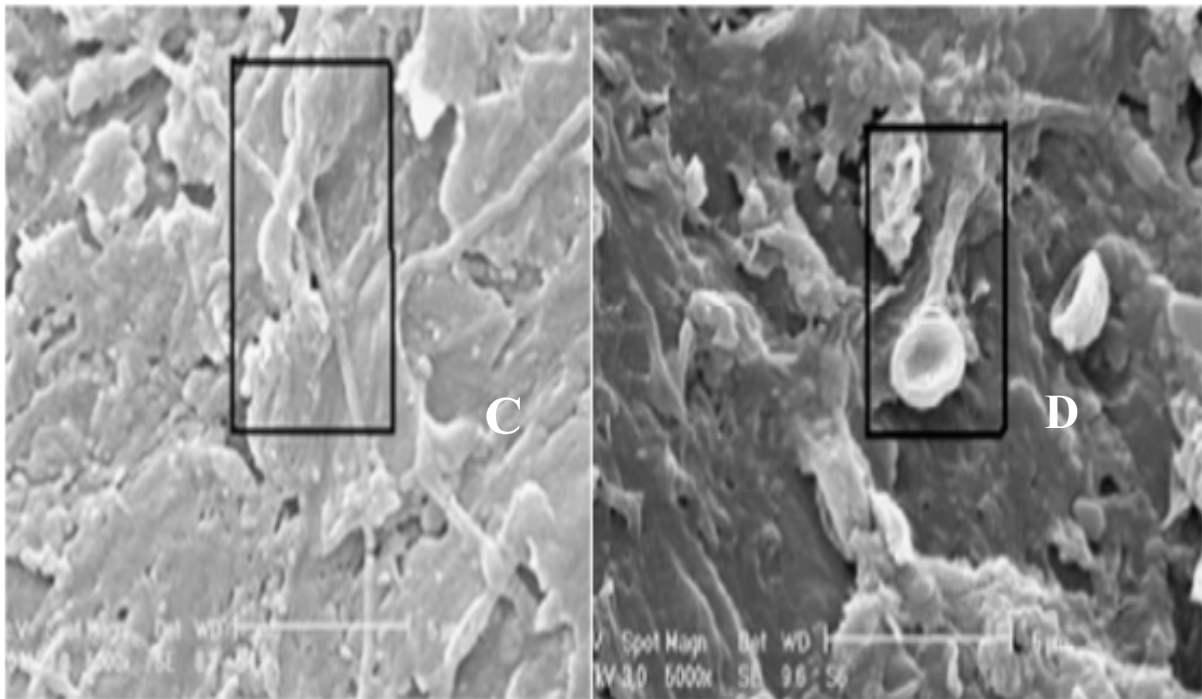


Figura 3. Penetración de hifas de *A. terrius* (C) y *A. fumigatus* (D) [21].

Es evidente que existen innumerables especies y consorcios microbianos con capacidad de degradar PEAD y otros polímeros de alto peso molecular, pero muchas de estas especies aún no han sido identificadas, por lo que estamos frente a una brecha de información.

Los microorganismos degradadores de polietileno y las enzimas que producen son considerados únicamente cuando son poblaciones sobresalientes en número. Los microorganismos hasta ahora reportados son los que se mencionan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Microorganismos degradadores de polietileno. Bioprospección de la degradación de polietileno [22].

Grupo	Microorganismo	Pretratamiento	Tipo de tratamiento biológico	Referencia	
Bacterias	Bacillus cereus	Termo-oxidación	Cultivo sumergido, con medio de cultivo agua de mar a 30°C durante 12 meses.	Shudhakar et al., 2008	
		Sin pretratamiento	Cultivo sumergido, con medio de cultivo agua de mar a 30°C durante 12 meses.		
	Bacillus sphericus	Termo-oxidación	Cultivo sumergido, con medio de cultivo agua de mar a 30°C durante 12 meses.		
		Sin pretratamiento	Cultivo sumergido, con medio de cultivo agua de mar a 30°C durante 12 meses.		
	Bacillus sp.	sin pretratamiento	Fermentación sólida: suelo, durante 7 meses y medio.		Nowak et al., 2011
	Pseudomonas sp.	sin pretratamiento	Cultivo sumergido con medio mineral, durante 1 mes.		Balasubramanian et al., 2010
	Arthrobacter sp.	sin pretratamiento	Cultivo sumergido con medio mineral, durante 1 mes.		
Hongos	Curvularia sp.	Oxidación por un agente químico específico	Cultivo en medio sólido sabouraud, durante 2 meses y una semana.	Motta et al., 2009	
	Aspergillus sp.	Exposición a condiciones medioambientales	Fermentación sólida: compost y suelo, durante 12 meses.	Ojeda et al., 2009	
	Penicillium sp.	Exposición a condiciones medioambientales	Fermentación sólida: compost y suelo, durante 12 meses.		
	Aspergillus fumigatus	Foto-oxidación	Fermentación sólida: compost, durante 3 meses y 10 días.		
	Aspergillus terreus	foto-oxidación	Fermentación sólida: compost, durante 3 meses y 10 días.	Zahara, 2010	
	Fusarium solani	foto-oxidación	Fermentación sólida: compost, durante 3 meses y 10 días.	Santa et al., 2012	
	Rhodococcus ruber	sin pretratamiento	Cultivo sumergido con medio sintético, (tiempo no especificado).		
	Rhodococcus sp.	foto-oxidación	Medio básico de sales minerales con tween 80, durante 1 mes.		
Arqueas	Nitrosopumilus maritimus	termo-oxidación	Fermentación sólida: compost, durante 20 meses, siete días y suelo, durante 20 meses.	Jakubowicz et al., 2011	
Consortios no definidos	Consortio I de suelo y compost	termo-oxidación	Fermentación sólida: compost, durante 15 meses, diez días y suelo, durante 16 meses.	Husarova et al., 2010	
	Consortio II de suelo y compost	termo-oxidación	Fermentación sólida: suelo, durante 24 meses.	Mumtaz et al., 2009	
	Consortio III de suelo y compost	termo-oxidación	Cultivo líquido con caldo mínimo David con dextrosa, durante 10 días.	Soni et al., 2009	
Actinomicetes	Rhodococcus rhodococcus	foto-oxidación	Fermentación sólida: compost y suelo, durante 10 meses siete días y el suelo durante 11 meses.	Fontanella et al., 2010.	

Todos estos microorganismos tienen diversas rutas metabólicas para degradar el polietileno, algunas de las cuales pueden ser las que se mencionan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Diversas rutas de degradación de polímeros [23].

Factores (Requerimiento/ actividad)	Foto-degradación	Degradación Termo-oxidativa	Biodegradación
Agente Activo	Luz UV o Radiación de alta energía	Calor y Oxígeno	Agentes Microbiológicos
Requerimiento de Calor	Negativo	Mayor a la temperatura ambiental	Negativo
Rango de Degradación	Inicialmente lento/ Rápida propagación	Rápido	Moderado
Otras Consideraciones	Amigable con el medio ambiente si la radiación con alta carga energética no se usa.	No es eco amigable	Eco amigable
Límite de Aceptación	Aceptable y costoso	No es aceptable	Barato y bastante aceptable

1.2 Microorganismos emergentes con capacidad bioactiva de remoción de micro-plásticos en aguas.

La capacidad bio-activa de remoción de micro-plásticos o degradación de estos varía de acuerdo a la fuente de donde provienen, ya sean aceites o petróleo, el mar con residuos microscópicos de desechos urbanos, lodos, etc. Por lo que es necesario estudiar las diferentes bacterias que participan en la degradación de polímeros contaminantes. Generalmente los procesos de digestión de polímeros se dan por adhesión a la superficie de los mismos, generando colonización masiva de microorganismos en estas. De todas las bacterias con capacidad degradadora de polímeros sintéticos mencionadas antes hay algunas con mayor potencial degradador, mejores capacidades y por ende mejores resultados. Como es el caso del género *Pseudomona*, el más mencionado en investigaciones sobre el tema.

Las *Pseudomonas* son bacilos curvados y alargados ligeramente cuya versatilidad metabólica, productividad y adaptabilidad son sorprendentes. Estas especies se caracterizan por la presencia de plásmidos con genes para la codificación de enzimas que participan en una amplia variedad de reacciones degradando

compuestos que no son metabolizados fácilmente casi por ningún grupo de bacterias. Estas juegan un papel catabólico en las reacciones y participan también en sistemas de control biológico [24]. Todas estas características aumentan el interés por estos microorganismos desde el punto de vista biotecnológico. Varias especies del género *Pseudomonas* participan activamente en el ciclo de carbono de la naturaleza, por lo que se les considera entre los microorganismos aerobios más versátiles en la degradación de muchos compuestos orgánicos de alto peso molecular. Estos compuestos se encuentran como tales en el medioambiente o como unidades de compuestos de alto peso molecular. Otra característica importante para la investigación es su capacidad de crecer en medios de cultivo que contienen cadenas de carbono como única fuente de energía [25].

Los microorganismos que biodegradan hidrocarburos de petróleo tales como hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (PAH's) incluyendo naftaleno, hidrocarburos aromáticos como tolueno, o hidrocarburos alifáticos como n-alcano, son aislados del medioambiente, particularmente de sitios contaminados con petróleo. Algunas de las rutas metabólicas microbianas responsables de la degradación son las alk (C_6 a C_{12} n-alcanos), nah (naftaleno) y xyl (tolueno) han sido ampliamente caracterizadas (**Tabla 3**); están generalmente relacionadas con plásmidos catabólicos encontrados en *Pseudomonas* spp., por ejemplo, los plásmidos OCT, NAH y TOL [26].

El PEAD como cualquier polímero pertenece al grupo de derivados de petróleo, y representa químicamente a uno de los más simples, un alcano. Los n-alcanos son el grupo más abundante de compuestos encontrados en el petróleo crudo y estos compuestos pueden ser biodegradados

Tabla 3. Resumen de estudios sobre la degradación microbiana del plástico (mezclado y no mezclado) [30].

Sr No	Plástico usado	Microorganismos / Metodo de Cultivo	Evaluación de biodegradación (Técnica/Observación)	Resultados obtenidos / Máxima degradación obtenida	Referencia	Sr No	Plástico usado	Microorganismos / Metodo de Cultivo	Evaluación de biodegradación (Técnica/Observación)	Resultados obtenidos / Máxima degradación obtenida	Referencia
1	Películas de PVC mezcladas con Celulosa	Phanerochaete chrysosporium PV1 Tratamiento del entierro del suelo y tratamiento del matraz agitado	FTIR (Cambios visibles en el polímero). Ensayo de placa y producción de CO2	La superficie de la película de mezcla de PVC celulosa se decoloró, algunas grietas y la erosión de la película también fue visible. FTIR confirmó que el acortamiento del pico se debió a la degradación del polímero. El CO2 (10.21 g / l) producido después de 30 días mostró una degradación significativa del polímero.	Ali et al. 2009	11	Plástico y polietileno	Fadama Soil (Bacteria-S. Aureus, Micrococcus, S. Pyogens,	Pérdida de peso y análisis fisicoquímico del suelo	La pérdida máxima en peso de bolsas de plástico y polietileno fue del 18.1% (estiércol de Saidu 2013	Abdullhi and Saidu 2013
2	Copolyesters film	Compostaje utilizando materia prima para el cultivo de mushroom. Cultivo de placa de agar (cepas Pleurotus Ostreatus, Inonotus hispidus, Phanerochaete chrysosporium, Irpex lacteus, Agaricus bisporus, Stropharia rugosoannulata, Polyporus squamosus) Compostaje bajo condiciones controladas	SEM, cromatografía de permeación en gel (GPC). Reducción de la viscosidad	El estudio SEM reveló l. Hispidus, causó la perforación del filamento y su destrucción parcial entre varios hongos estudiados. La disminución significativa de la viscosidad reducida durante la degradación indicó la participación activa de la hidrólisis en la escisión de la cadena principal del polímero. Se observó una degradación intensiva de copoliésteres aromático-alifáticos.	Sasek et al. 2006	11	Plástico y polietileno	Fadama Soil (Bacteria-S. Aureus, Micrococcus, S. Pyogens, Pseudomona aerogenosa, B. subtilis, B. Cereus, E. Coli, Klebsella Pneumonia. Fungi-A. niger, A. fumigates, A. flavus, Fusarium, Mucor, Penicillium, Candida) emmendado con excrementos de aves de corral, estiércol de vaca y fertilizante inorgánico (NPK) Tratamiento de entierro del suelo	Pérdida de peso y análisis fisicoquímico del suelo	La pérdida máxima en peso de bolsas de plástico y polietileno fue del 18.1% (estiércol de Saidu 2013 vaca) y del 6% (caída de aves de corral) después de nueve meses. Los resultados de las propiedades fisicoquímicas del suelo Fadama mezclado con fertilizantes orgánicos e inorgánicos después de 9 meses del análisis mostraron un aumento en el pH. El nitrógeno total disminuyó y el P disponible aumentó.	Abdullhi and Saidu 2013
3	Poli (butilenos succinato) emulsionado PBS) y poli (butilenos co adipato) emulsionado (PBSA)	Aspergillus oryzae RIB40 (ATCC-42149) Tratamiento de matraz en agitación	Despeje del sobrenadante de cultivo.	La enzima de degradación de PBA se identificó como cutinasa. Se observó que el ácido butírico y el n-hexanol eran el sustrato más preferido para la enzima degradadora de plástico biodegradable.	Maeda et al. 2005	12	Poliuretano de poliéster (PUR)	Los hongos endófitos aislados de plantas leñosas de diversas familias fueron recolectados en el Bosque Nacional Yasuni en la selva amazónica ecuatoriana.	FTIR	El organismo de aclarado en agar sólido se identificó como Lasiodiplodia spp. (cepa E2611A). Cuatro organismos activos pertenecían al género Pestalotiopsis, con una alta relación a nivel de especie con Pestalotiopsis microspora. Los seis organismos totales eliminaron PUR de manera más eficiente que el hongo control positivo Aspergillus niger. A Lasiodiplodia spp. (cepa E2611A) fue el organismo más activo en la pantalla de eliminación del medio líquido, junto con un Pleosporales spp. (cepa E2812A) y una Bionectria spp. (cepa E2910B), seguido de Pestalotiopsis microspora (E3317B). Según el estudio FTIR, una pérdida completa del pico de absorción a 1.735 cm-1 que corresponde al enlace éster C (O) -O en el polímero de poliuretano. Se descubrió que la serina hidrolasa es responsable de la degradación del PUR. Tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, se encontró que dos aislamientos de Pestalotiopsis microspora tienen una capacidad única para crecer en PUR como el único carbono	Russell et al. 2011
4	Poli-3-hidroxicanoatos (PHA), poli-b-hidroxibutirato (PHB), es decir, BIODOLTM	134 cepas puras de hongos marinos o aislados fúngicos marinos (Colección de cultivos del Instituto Botánico, Universidad de Ratisbona). Penicillium simplicissimum (IMI 300465) como cultivo de referencia Ensayo de placa de agar	Zona clara formada en el medio turbio en placas de agar o la profundidad de la limpieza	De las 32 cepas de levaduras marinas y 102 cepas de hongos marinos, solo alrededor del 4% de las cepas degradaron BIODOLTM y aproximadamente el 6% de homopolímero de PHB puro despolimerizado.	Matavuly and Molitoris 2009	13	Película de polietileno de baja densidad	Se tomaron muestras de suelo de desechos sólidos municipales (Aspergillus spp. (FSM-3,5,6,8) y Fusarium spp. (FSM-10) Pérdida de peso de tiras plásticas en el matraz en agitación	SEM, FTIR Pérdida de peso, cambio en el pH y prueba de evolución de CO2	Pérdida de peso máxima del 9% registrada con Fusarium spp. FSM-10, mientras que la tasa más alta de evolución de CO2 (20.26 g / L) y nivel de mineralización (10.3%) se observó con Aspergillus spp. Se observaron cambios químicos en la superficie de FSM-3 y se confirmaron mediante FTIR. En todos los casos, los medios se volvieron ácidos. En el estudio SEM, apareció una película de control con una superficie lisa sin grietas ni ninguna partícula unida en su superficie mientras estaba en tratamiento, se observó la unión de hongos en la superficie de LDPE y la formación de varios agujeros e irregularidades. En el estudio FTIR, se observó un aumento en la banda de 1079 cm-1 y 2418 cm-1 debido a la formación de estiramiento C = O y O-H. El tratamiento de los aislados fúngicos dio como resultado la distorsión del pico a 2920 cm-1. FSM-10,3,6 aislado encontró más eficiente que los otros hongos.	Das and Kumar 2014
5	PHB (ácido poli-3-hidroxibutírico)	Hongos aislados de líquenes en hábitats naturales y compost de suelo. (Aspergillus fumiga, Penicillium spp., Protozoos, Cultivo de placa de agar	Zona clara en medio de prueba	De 15 hábitats naturales y 8 líquenes, se aislaron 105 hongos totales, de los cuales 41 cepas mostraron degradación de PHB. En el degradador de PHB se descubrió que Penicillium y Aspergillus son especies comunes que pertenecen a los deuteromicetos (hongos imperfectos). De 67 aislamientos, 31 cepas bacterianas mostraron degradación de PHB confirmada por zonas claras en medio de ensayo. Los protozoos también se encontraron en varias muestras, como estanques, tierra, heno, estiércol de caballo y líquenes con potencial de degradación de PHB.	Lee et al. 2005	14	Película de polietileno de baja densidad	Aspergillus Versicolor y Aspergillus spp. (Aislado del agua de mar) Ensayo en placa para estudiar la colonización, matraz en agitación.	Prueba de Evolución del CO2	LDPE totalmente degradado a dióxido de carbono con una evolución máxima de 4 g / l de CO2 después de 1 semana durante la biodegradación de LDPE por Aspergillus spp.	Sindujaa et al. 2011
6	Poliéster-poliuretano (PS-PUR)	Hongos aislados del suelo, pintura de pared (látex) recubierta con poliuretano y residuos plásticos de diferentes hábitats en Jordania. Cultivo de placas de agar, matraz de agitación líquida	Zona clara en medio de prueba, pérdida de peso de PS-PUR	4 aislamientos (Fusarium solani, Spicaria spp., Alternaria solani y Aspergillus flavus) arrojaron resultados positivos de biodegradación, indicados por zonas despejadas creadas debido a la hidrólisis de PS-PUR en medio de placa de cultivo de agar de 2 capas. Fusarium solani mostró una pérdida de peso del 100% en los bloques de PS-PUR en los cultivos sacudidos.	Ibrahim et al. 2011	15	Low Density Polyethylene Film	Bacterial Consortial-Microbacterium spp. Strain MK (DQ31 8884), Pseudomonas putida cepa MK4 (DQ31 8885) y PW1 (EU741 798), Bacteria Te68R cepa PN1 2 (DQ423487) Pseudomonas aeruginosa strain PS1 (EU741 797) & C1 (EU753182) Estudio de biodegradación in situ en laboratorio y en condiciones naturales	SEM, FTIR, DSC (calorimetría de barrido diferencial)	FTIR, SEM y DSC revelaron que los consorcios causaron una importante degradación superficial de la película de LDPE y también un cambio en las características estructurales de la masa. Factores ambientales como la luz solar, la temperatura y la precipitación pueden tener un papel en el aumento de la biodegradación. Se estudiaron mediante estudio comparativo in situ.	Negi et al. 2011
7	Poliuretano	Trichoderma DIA-T spp. Matraz en agitación	Proteasa, esterasa y lacasa	95%, 86%, 50%, 36% de las cepas mostraron actividad de ureasa, proteasa, esterasa y lacasa. Durante la biodegradación	Loredo-Trevin et al. 2011	16	Bolsa de polietileno	Bacillus subtilis, Bacillus amylolyticus, Arthobacter defluvi Método de cultivo líquido (agitador)	Estudio de pérdida de peso	30% y 20% de pérdida de peso / mes observado en cultivo líquido por Bacillus amylolyticus y Bacillus subtilis res.	Thakur 2012
8	HDPE, LDPE y bolsa de MSW	MSW El 50% (p / pl) de MSW y película madura se enterró durante 15 meses a temperatura ambiente en frascos desecadores de 2 l.	FTIR	El espectro FTIR reveló varios tipos de productos de oxidación formados durante la biodegradación del polietileno. Se observó una pérdida de peso del 2,1% (LDPE) y del 1,3% (HDPE) y del 36% (NP). En NP, HDPE y LDPE se registraron 82,76%, 5,33% y 13,04% de pérdida de resistencia a la tracción. La tasa más alta de evolución de CO2 de 46.2 mg / L registrada dentro de 28 días en NP.	Orhan et al.	17	Poliuretano	Sitio de eliminación de residuos arrojado con bolsas de polietileno (Brevibacillus, Pseudomonas y Rhodococcus spp.) Estudio de Matraz en agitación	Estudio de pérdida de peso	Pseudomonas, Brevibacillus y Rhodococcus degradaron el polietileno a 40.5%, 37.5%, 33% respectivamente en términos de pérdida de peso.	Nanda and Sahu 2010
9	Polythene Bag	Brevibacillus, Pseudomonas y Thodococcus spp. del drenaje del efluente textil suelo, lodo de alcantarillado y vertedero de basura doméstica Matraz en agitación	Weight loss	Pseudomonas spp. de los lodos de aguas residuales se encontró que era más eficiente en biodegradabilidad @ 46.2% para polietileno natural y 29.1% para polietileno sintético, respectivamente, en comparación con las cepas de otras fuentes.	Abdullhi and Saidu 2013	18	Películas de plástico desechables	Streptomyces spp., Mucor rouxii 1835, Aspergillus flavus	Pérdida de peso promedio, cambio en la resistencia a la tracción y elongación porcentual	La reducción en el% de elongación con cultivos bacterianos y fúngicos se registró como 28.5% y 1998 46.5% respectivamente.	El-Shafei et al. 1998
10	Poliuretano	Trichoderma DIA-T spp. Matraz en agitación	Proteasa, esterasa y lacasa	95%, 86%, 50%, 36% de las cepas mostraron actividad de ureasa, proteasa, esterasa y lacasa. Durante la biodegradación	Loredo-Trevin et al. 2011	19	Poliuretano (baja densidad)	Aspergillus fumigatus y Penicillium spp. Estudio de matraz agitado en cultivo líquido	Estudio de pérdida de peso	Penicillium spp. Se encontró que era más eficaz para degradar el LDPE con una degradación del 6,58%	Singh et al. 2012
11	Poliuretano	Hongos aislados del suelo, pintura de pared (látex) recubierta con poliuretano y residuos plásticos de diferentes hábitats en Jordania. Cultivo de placas de agar, matraz de agitación líquida	Zona clara en medio de prueba, pérdida de peso de PS-PUR	4 aislamientos (Fusarium solani, Spicaria spp., Alternaria solani y Aspergillus flavus) arrojaron resultados positivos de biodegradación, indicados por zonas despejadas creadas debido a la hidrólisis de PS-PUR en medio de placa de cultivo de agar de 2 capas. Fusarium solani mostró una pérdida de peso del 100% en los bloques de PS-PUR en los cultivos sacudidos.	Ibrahim et al. 2011	20	Hojas de polietileno de baja densidad (LDPE)	Soil Sample from plastic waste disposable site (Fusarium spp., Penicillium spp., Mucor spp., Aspergillus niger, A. japonicas and A. flavus) Cultivo de placa de agar	Estudio de pérdida de peso	Cepa Aspergillus japonica F3 (36%), Fusarium spp. F6 (32%), Aspergillus flavus F1 (30%) encontró eficiente en la biodegradación de lplastic en 4 semanas en comparación con el resto de hongos en términos de peso loss.	Singh and Gupta 2014

aeróbicamente por diferentes rutas. La degradación de n-alcenos de cadena media por *Pseudomonas putida*, la cual contiene al plásmido OCT, es iniciada por alcano hidroxilasa. La oxidación del grupo metilo de n-alcenos por alcano hidroxilasa produce n-alcenoles que son posteriormente oxidados por alcohol deshidrogenasa unida a la membrana, a n-alcenoles los cuales son subsecuentemente transformados a ácidos grasos y a acetil-CoA por aldehído deshidrogenasa y acetil-CoA sintetasa, respectivamente. Se ha reportado también una ruta de degradación de n-alcenos produciendo alcoholes secundarios en la cual los n-alcenos son oxidados por monoxigenasa a alcoholes secundarios, después a cetonas y finalmente a ácidos grasos [27]. Algunas cepas de *Aspergillus* spp. Y especies de *Fusarium* revelaron que la biodegradación del plástico se debía a las enzimas activas producidas por esta cepa fúngica [28]. Polietileno y plástico degradados en diversa medida por *Pseudomonas* spp. (37.09% y 28.42%), *Streptomyces* spp. (46.16% y 35.78%) y *Aspergillus* spp. (20,96% y 16,84%) en un período de 6 meses en cultivo líquido (agitador) [29].

Por otro lado, existen también bacterias participantes en estos procesos sobre las cuales hay información escasa, entre estas se encuentran algunas especies de *Bacillus* como: *B. amyloliquefaciens*, *B. tequilensis*, *B. subtilis*, *B. humi*, *B. sinesaloumensis*.

1.3 Rutas Bioquímicas

La degradación microbiana de los plásticos es causada por ciertas actividades enzimáticas que conducen a una división de la cadena del polímero en oligómeros y monómeros. Estos productos hidrolíticamente solubles en agua son absorbidos por las células microbianas y son metabolizados. El metabolismo aeróbico produce

dióxido de carbono y agua ^[118], mientras que el metabolismo anaeróbico da como resultado el dióxido de carbono, el agua y el metano como productos finales, respectivamente ^[119].

La biodegradabilidad del polímero se puede caracterizar por el control de la tasa de evolución de CO₂, la absorción de O₂, el cambio en las propiedades del polímero (químico y físico), la tasa de crecimiento de los organismos. Se deben seguir múltiples pruebas para evaluar la degradación del plástico debido a las siguientes razones ^[120]:

1. La pérdida de peso puede deberse a la lixiviación de aditivos, incluidos los plastificantes.
2. La producción de dióxido de carbono podría ser el resultado de la degradación de la fracción de bajo peso molecular del polímero, sin degradación de las cadenas más largas.
3. La pérdida de aditivos o un cambio muy pequeño en el plástico de maquillaje químico pueden afectar la resistencia del plástico ^[30]. Existen varias técnicas disponibles para verificar el grado y la naturaleza de la degradación (**Tabla 4**).

La literatura muestra que el gas CO₂ es un producto importante emitido durante la biodegradación de polietileno ^[31]. La generación de aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos se registró en el humo de la extrusión de película de PEBD en un proceso de revestimiento por extrusión ^[32]. El caucho de *Rhodococcus* (C208) produjo polisacáridos y proteínas mediante el uso de polietileno como fuente de carbono. ^[33] En otro informe, *R. rhodochrous* ATCC29672 (Bacterium) y *Cladosporium cladosporoide* ATCC 20251 (Fungus) utilizaron un proceso de revestimiento por extrusión ^[32]. El caucho de *Rhodococcus* (C208) produjo polisacáridos y proteínas mediante el uso de polietileno como fuente de carbono

[33]. En otro informe, *R. rhodochrous* ATCC29672 (Bacterium) y *C. cladosporioide* ATCC 20251 (Hongo) usaron polietileno con producción de polisacáridos y proteínas, mientras que los asteroides *Nocardia* GK911 (Bacterium) produjeron solo proteínas [34].

Tabla 4. Resumen de los métodos para el estudio de la biodegradación [31].

Tabla 3: Técnicas existentes para la evaluación de la degradación del plástico

SN	Cambios en las propiedades del polímero	Tipo de técnica	Referencia
1	Mecánico: Resistencia a la tracción - Elongación en caso de falla y módulo del polímero	DMR (Análisis Mecánico Dinámico)	Huang et al. 2005; Kathiresan 2003
2	Físico: Morfología-microfisuras	SEM	Da Luz et al. 2013; Sasek et al. 2006
	Densidad, ángulo de contacto, viscosidad, distribución del peso molecular '1	HT-GPC (cromatografía de permeación en gel a alta temperatura)	Kathiresan 2003
	Temperatura de transición de fusión y vidrio	Análisis termogravimétrico, DSC	Ramis et al. 2004; Zuchoswka et al. 1999
	Región cristalina y amorfa	Difracción de X, Dispersión de rayos X de ángulo pequeño y grande	Albertson et al. 1995
3	Propiedades químicas	Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)	Da Luz et al. 2013; Doble et al. 2008
4	Peso molecular	Cromatografía de capa fina (TLC), Cromatografía de gases (GC), Resonancia magnética nuclear (RMN), Ionización por desorción láser asistida por matriz: tiempo de vuelo, quimioluminiscencia, Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (GC-MS).	Deguchi et al. 1997; Albertson et al. 1995; Cacciari et al. 1993
5	Prueba de evolución de CO ₂	GC	Seneviratne et al. 2006; Albertson et al. 1995
6	Actividad metabólica de la célula	Trifosfato de adenosina (ATP), diacetato de fluorescentes (FDA), análisis de proteínas	Kouny et al. 2006; Gilan et al. 2004

En general, la adherencia de microorganismos en la superficie de los plásticos seguida de la colonización de la superficie expuesta es el principal mecanismo involucrado en la degradación microbiana de los plásticos. La degradación enzimática de los plásticos por hidrólisis es un proceso de dos pasos: primero, la enzima se une al sustrato del polímero y luego cataliza una escisión hidrolítica. Los polímeros se degradan en oligómeros, dímeros y monómeros de bajo peso molecular y finalmente se mineralizan en CO₂ y H₂O.

Por otro lado, el método de zona transparente con placas de agar es una técnica ampliamente utilizada para seleccionar degradadores de polímeros y para evaluar el potencial de degradación de diferentes microorganismos frente a un polímero. Las placas de agar que contienen polímeros emulsionados se inoculan con microorganismos y la presencia de microorganismos degradadores de polímeros se puede confirmar mediante la formación de zonas de halo claro alrededor de las colonias. Esto sucede cuando los microorganismos que degradan el polímero excretan enzimas extracelulares que se difunden a través del agar y degradan el polímero en materiales solubles en agua. Usando esta técnica, se confirmó que los degradadores de polihidroxibutirato (PHB), polipropiolactona (PPL) y policaprolactona (PCL) están ampliamente distribuidos en diferentes [35].

La mayoría de las cepas que pueden degradar PHB pertenecen a diferentes taxones, tales como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, *Streptomyces* y hongos [37]. Se ha informado que 39 cepas bacterianas de las clases Firmicutes y Proteobacteria pueden degradar PHB, PCL y polibutileno succinato (PBS), pero no ácido poliláctico (PLA) [36]. Solo unos pocos microorganismos degradadores de PLA han sido aislados e identificados. La población de microorganismos degradadores de polímeros alifáticos en diferentes ecosistemas se encontró en el siguiente orden: PHB = PCL > PBS > PLA [39].

1.4 Micro plástico y PEAD: Comportamiento en aguas

PEA ($[-OCH_2CH_2OOC(CH_2)_4CO-]_n$) es un precursor de poliuretano. A menudo se mezcla con otros poliésteres para obtener propiedades deseables específicas, como segmentos blandos [38]. Los microorganismos que degradan polímeros

electro-activos (PEA) se cribaron y aislaron usando PEA (Mn 3.000) como única fuente de carbono. Entre los microorganismos aislados que degradan PEA, *Penicillium* sp. La cepa 14-3 exhibió la actividad más fuerte. La PEA se degradó en 120 horas a altas concentraciones de células. Esta cepa puede degradar no solo PEA sino también poliésteres alifáticos tales como PES, PBS y PBA [40].

La enzima responsable de la degradación de PEA se ha purificado y se considera que es un tipo de lipasa con amplia especificidad de sustrato. La enzima purificada tiene un peso molecular de 25kDa y podría degradar varios tipos de poliésteres alifáticos, como poli (β -propiolactona) (PPL) y poli (ϵ -caprolactona) (PCL), pero no poli (dl-3-metilpropiolactona) o poli (dl-3-hidroxibutirato) [41]. Esta enzima también puede hidrolizar aceites vegetales, triglicéridos y ésteres metílicos de ácidos grasos. Dado que la enzima purificada de *Penicillium* sp. La cepa 14-3 tiene propiedades similares a la lipasa, algunas lipasas comercialmente disponibles y esterasas se usaron para confirmar si eran capaces de degradar la PEA. Los resultados mostraron que las lipasas de *R. arrizus*, *R. delemar*, *Achromobacter* sp. Y *Candida cylindracea* y *C. esterasa* del hígado de cerdo mostraron actividades en PEA y PCL [42]. La degradación de plásticos deriva en micro-plásticos cuya presencia es muy alta en aguas. Las condiciones y el tiempo de degradación son generadas por el ambiente que lo rodea (luz solar (UV), agentes mecánicos, oxígeno, etc.). Los microplásticos primarios (MPPs), son partículas cuya composición química es variable y cuyo tamaño oscila entre los 0.1 μ m y los 5mm [43]. El llamado “material crudo” constituye parte de este, es decir, la materia prima de la industria plástica, otra es utilizada por parte de la industria cosmética y farmacéutica, como exfoliantes en productos de aseo personal y como medios de

liberación de fármacos, así como en procesos industriales de *sandblasting*, en el cual los pellets, son lanzados, contra una superficie, causando abrasión; especialmente en procesos industriales por parte de las industrias aeronáutica y naviera. Estos contaminantes han sido reportados en las aguas oceánicas y playas alrededor del mundo ^[44], generando un grave problema ambiental, debido en parte, a que en el ambiente acuático marino la degradación química y erosión mecánica son mínimas, factores que contribuyen a su persistencia. Es por ello que estos materiales pueden interactuar con una gran variedad de organismos; por otra parte, si se depositan por acción de las corrientes oceánicas y/u otros factores climáticos sobre las playas, estos quedan expuestos a procesos degradativos de mayor intensidad como la radiación ultravioleta, temperaturas altas, abrasión y otros procesos físicos que incrementan su fragmentación. Cuando se trata en microplásticos en el mar, se dice que la degradación es más lenta, esto es porque la degradación de estos se debe en su mayoría a los rayos UV procedentes de la luz solar que de manera conjunta con el oleaje marino golpean y van fragmentando los macroplásticos y convirtiéndolos en trozos más pequeños. Aproximadamente 300 millones de toneladas de plástico se producen de forma anual a nivel global y es alarmante mencionar que tan solo el 20% procede a ser reciclado. El porcentaje restante termina en los grandes botaderos que se generan en la tierra y en el mar, algunos contaminando incluso hasta el aire. De todas las muestras recabas, el 83% contenía microplásticos. Por lo que se pudo concluir que incluso el agua potable contiene microplásticos.

En 1970 salieron a la luz los primeros informes que reportaban partículas pequeñas de plásticos como poliestireno y polipropileno en los océanos. Sin embargo, fue recién para mediados del año 2000 que el término “micro plásticos” fue acuñado y

aceptado. Hoy en día este concepto se utiliza para describir partículas de plásticos de hasta 5 mm de tamaño [45].

Muchos de estos micro plásticos no son producto del proceso degradativo de sus polímeros macromoleculares, sino que son parte de la fabricación de productos de la industria cosmética para el cuidado personal. Este es el caso de las esferas de polietileno que son empleadas en la fabricación de cremas faciales, maquillajes y productos cosméticos, exfoliantes y hasta en pastas de dientes y muchos de nosotros como consumidores potenciales no somos conscientes de esto. Se han reportado casos en los que algunas veces micro partículas de polímeros han reemplazado algunos ingredientes en productos naturales como conchas de piedra pómez o semillas. El mayor problema radica en que ninguna de estas partículas es filtrada en el proceso de tratamiento de aguas residuales, muy por el contrario, suelen ser liberadas directamente a ríos, lagos o al mar. La industria textil también ha empleado estas partículas en la elaboración de sus textiles sintéticos como camisas o fibra polar o micro polar. El lavado de estas prendas y de otras prendas sintéticas genera aguas residuales con alta carga de fibras plásticas (más de 100 fibras por litro de agua) [46].

Según estudios realizados por investigadores y colaboradores se pueden liberar aproximadamente 1.900 fibras de micro plástico por cada lavada. La cantidad de fibras encontradas en efluentes, varía de acuerdo a la ubicación geográfica y también la cantidad de población cercana, por lo que se han observado en efluentes de aguas residuales y lodos. Los desechos de cualquier tipo se encuentran en mayor abundancia cerca al punto de emisión u origen, y esto suele ser en lugares cercanos a centros poblados o urbanos. Sin embargo, se han

examinado diversas partes del océano desde el fondo hasta la superficie y también las partes más remotas como los polos y se ha logrado determinar que la cantidad de micro plásticos habría aumentado significativamente a lo largo de las cuatro últimas décadas, esto sucede porque las aguas de los océanos circulan por todo el mundo y con el paso del tiempo se producen zonas de convergencia que es en donde los micro plásticos tienden a acumularse. Estos giros oceánicos subtropicales a gran escala ocurren en el Océano Índico Norte, el Atlántico Norte y Sur, y el Pacífico Norte y Sur. Los desechos plásticos son un problema transfronterizo clásico que se puede pensar en solucionar con la limpieza de playas en las costas. Sin embargo, el problema más grande se encuentra al cruzar el área visible del océano porque la tecnología desarrollada por el ser humano aun no es capaz de eliminar micro plásticos del océano ^[47], **(Figura 4)**.

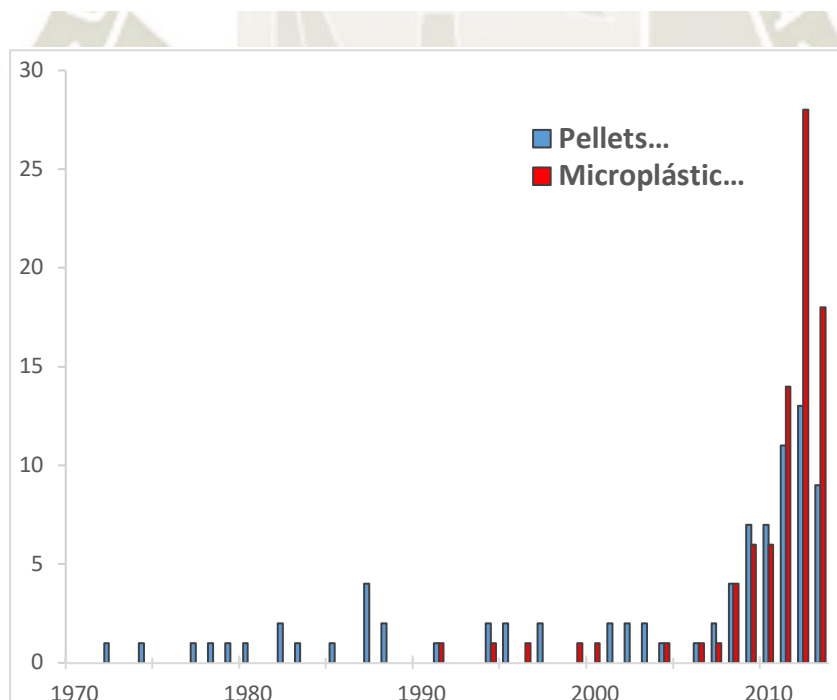


Figura 4. Reportes y artículos en revistas científicas en pellets plásticos y micro plásticos desde la década de 1970 ^[48].

Cualquier tipo de actividad desarrollada por la raza humana es un foco probable de contaminación, tanto en la tierra como en el mar, pero entre estos dos el mar es el que se ve más afectado ya que cualquier tipo de contaminación en la tierra puede resultar en basura marina. La fragmentación de plásticos de mayor tamaño es otra de las fuentes importantes de origen de los microplásticos secundarios. Las condiciones en las que se desarrollan la fragmentación de estos materiales, influyen mucho en la velocidad y en el tiempo que demora el proceso de degradación, condiciones importantes como temperatura, exposición a luz ultravioleta, etc. [49].

Los desechos plásticos pueden entrar al océano directamente o pueden llegar a él a través de otros cuerpos de agua o atmósfera. La clave para detener el ingreso de basura plástica al océano es evitar que entren dichos desechos al medio ambiente en primer lugar. Los objetos más grandes, la “macro basura”, son mucho más fáciles de identificar y controlar que los objetos más pequeños. Alrededor de la mitad de la población mundial vive a menos de 100 km de la costa, con un aumento creciente de la población en dicha zona. Esto significa que es probable que la cantidad de desechos plásticos que entren en el océano desde fuentes terrestres aumente, si no se hacen cambios significativos en la de gestión de estos residuos [50].

Las propiedades de los plásticos están asociadas a su biodegradabilidad. Las propiedades químicas y físicas de los plásticos influyen en el mecanismo de biodegradación. Las condiciones de superficie (superficie específica, propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas), las estructuras de primer orden (estructura química, peso molecular y distribución del peso molecular) y las estructuras de alto orden

(temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión, módulo de elasticidad, cristalinidad y estructura cristalina) de polímeros juegan un papel importante en los procesos de biodegradación.

En general, los poliésteres con cadenas laterales están menos asimilados que aquellos sin cadenas laterales ^[51]. El peso molecular también es importante para la biodegradabilidad porque determina muchas propiedades físicas del polímero. El aumento del peso molecular del polímero disminuyó su degradabilidad. PCL con mayor peso molecular ($M_n > 4.000$) se degradó lentamente por *Rhizopus delemar* lipasa (endo-escote tipo) que con baja M_n ^[52]. Además, la morfología de los polímeros afecta en gran medida sus tasas de biodegradación. El grado de cristalinidad es un factor crucial que afecta la biodegradabilidad, ya que las enzimas atacan principalmente los dominios amorfos de un polímero. Las moléculas en la región amorfa están empaquetadas de manera suelta y, por lo tanto, la hacen más susceptible a la degradación. La parte cristalina de los polímeros es más resistente que la región amorfa. La velocidad de degradación del PLA disminuye con un aumento en la cristalinidad del polímero ^[53]. Como se muestra en la ecuación, la temperatura de fusión (T_m) de los poliésteres tiene un fuerte efecto sobre la degradación enzimática de los polímeros. Cuanto mayor es la T_m , menor es la biodegradación del polímero ^[54]. En general, T_m está representado por la siguiente fórmula:

$$T_m = \Delta H / \Delta S \quad (1)$$

Donde ΔH era el cambio de entalpía en la fusión y ΔS es el cambio de entropía en la fusión. Es bien sabido que las interacciones entre las cadenas de polímero afectan principalmente al valor de ΔH y que las energías de rotación interna

correspondientes a la rigidez (la flexibilidad) de la molécula de polímero afectan notablemente al valor de ΔS .

Estos materiales representan un riesgo inminente para la salud de todos los seres vivos. Esto debido a la particularización en fragmentos más pequeños que pasan desapercibidos y son ingeridos de manera continua, lo cual representa una grave amenaza contra la salud de seres humanos, aun así, el polietileno de alta densidad no es considerado como “Producto Químico Peligroso” según la definición del Estándar de Comunicación de Riesgos de la OSHA 29. CFR 1910.1200. Los efectos se detallan en la siguiente lista:

Contacto con los Ojos: Tanto el sólido como el polvo del producto pueden producir irritación o lesión en la córnea, por acción mecánica. Temperaturas elevadas pueden generar vapores en concentraciones suficientes para causar irritación en los ojos. Los efectos pueden incluir malestar ^[55].

Contacto con la Piel: El contacto prolongado no produce irritación en la piel. Lesión mecánica solamente. En condiciones de proceso normales, el material se calienta a elevadas temperaturas; el contacto con el material puede causar quemaduras ^[55].

Absorción por la Piel: No se prevén efectos nocivos por la absorción a través de la piel ^[55].

Inhalación: No es probable que una única exposición al polvo cause efectos adversos. Los vapores/humos liberados durante el procesado térmico pueden causar irritación respiratoria. Ingestión: Toxicidad por vía oral muy baja. No se

prevén efectos nocivos por ingestión de cantidades pequeñas. Puede causar una obstrucción en caso de ingestión ^[55].

Hablar sobre su comportamiento frente a diferentes agentes es también muy importante. En el caso de los plásticos, estos rara vez se usan solos, generalmente las resinas son mezcladas con otros materiales llamados aditivos, para realzar sus propiedades. Entre estos químicos encontramos a los plastificantes, los cuales constituyen el grupo principal y son utilizados para incrementar el aprovechamiento del material y aumentar su flexibilidad ^[56]. Otros materiales incluyendo orgánicos como carbón y sílice para refuerzo, estabilizadores térmicos para permitir que el plástico pueda procesarse a altas temperaturas, retardadores de fuego para disminuir la inflamabilidad, pigmentos y estabilizadores UV para prevenir la degradación al ser expuestos a la luz, además de colorantes, agentes opacantes y de brillo. Un amplio rango de sustancias que son utilizadas en la manufactura de los plásticos, son resinas tóxicas, y se encuentran ampliamente distribuidas en la población humana ^[57]. Los ftalatos, por ejemplo, pueden constituir hasta un 50-60 % del peso total en la fabricación del PVC ^[58].

Otro aditivo de importancia toxicológica es el Bisfenol A, caracterizado por ser un estrógeno agonista y un andrógeno antagonista, siendo sus niveles correlacionados con efectos adversos en humanos y otras especies animales, incluyendo problemas cardiacos, cáncer, diabetes, alteraciones en los niveles de circulación de ciertas hormonas, obesidad, y anormalidades reproductivas ^[59]. También metales pesados como el plomo y compuestos como el tributil estaño son usados en la producción de PVC ^[60]. Los bifenilos policlorados o PCBs y los bifenilos polibrominados o PBDEs han sido empleados como plastificantes, para

incrementar el plegamiento y la suavidad, y como retardantes de fuego ^[61]. Por su parte, el nonilfenol, utilizado como antioxidante y considerado como un disruptor endocrino, puede generar efectos biológicos negativos dentro de un rango bajo de concentraciones ^[62].

1.5 Tratamiento de remoción de micro-plásticos en cuerpos acuíferos.

Evidentemente los micro-plásticos no son contaminantes sencillos de remover de aguas en general. Esta remoción puede darse utilizando diferentes técnicas y herramientas, por lo que podemos disgregar 3 grandes grupos de tratamientos de remoción:

Mecánica/Física

Por remoción mecánica nos referimos básicamente a operaciones de membrana, micro filtración, ultrafiltración, nano filtración y osmosis reversa.

Para el tamaño de partícula vendrían a ser Micro filtración y Ultrafiltración.

La micro filtración (MF) es la más antigua de las cuatro tecnologías de membrana actuadas por presión, que también incluyen la ósmosis inversa (OI), nano filtración (NF) y ultrafiltración (UF). Los primeros microfiltros fueron los del tipo de filtro en profundidad, utilizado principalmente para propósitos de laboratorio e industrial. En la filtración en profundidad, las partículas y microorganismos son atrapados en el interior de la estructura interna del micro filtro. Después de la colmatación total de partículas o de una caída específica de presión, los microfiltros se cambian. A causa de la necesidad de un reemplazo regular de filtros, los micro-filtros de filtrado en profundidad han tenido límite de aplicación para tratamiento primario de agua

potable, excepto en sistemas a muy pequeña escala o como pre-tratamiento para OI. En contraste con el concepto de eliminación relativa por filtración profunda, las membranas de MF consiguen la eliminación absoluta de contaminantes de una corriente de alimentación por un proceso de separación basado en la retención de contaminantes sobre una superficie de membrana. Es el más «libre» de los procesos de membrana, teniendo un tamaño de poro desde 0,05 a 5mm. A consecuencia de su gran tamaño de poro, se utiliza principalmente para eliminación de partículas y microbios y se puede operar bajo condiciones de ultra baja presión. Sin embargo, debería notarse que la MF no elimina contaminantes basados estrictamente en el tamaño del poro de membrana en todos los casos una capa de torta, consistente en los materiales presentes en el agua de alimentación, puede formarse sobre la superficie de la membrana y suministrar capacidades adicionales de eliminación [63].

Biológica

En el área biológica no se han encontrado reportes de tratamiento en campo solamente en aguas sintéticas y a escala laboratorio. Como es el caso de la industria química orgánica, es decir farmacéutica, textil, petroquímica, etc. Cuyo objetivo fue determinar las mejores condiciones para llevar a cabo el tratamiento biológico de un efluente de la industria química de fabricación de plásticos y resinas [64].

Química

La remoción con productos químicos no presenta resultados. Sin embargo, los efectos de la exposición a partículas no son exclusivos de las partículas de micro-

plásticos, ya que la mayoría de los organismos acuáticos pueden ingerir microplásticos [65]. Los estudios de efectos se han centrado principalmente en organismos a niveles tróficos inferiores, es decir, zooplancton y vertebrados bentónicos [66], porque se han identificado como particularmente susceptibles a la ingestión de micro-plásticos. La comparación de los efectos informados de los micro-plásticos y los sedimentos suspendidos en diversos organismos de prueba y en los diferentes niveles de organización biológica sugiere que las concentraciones de efectos a menudo son comparables [121], **(Figura 5)**.

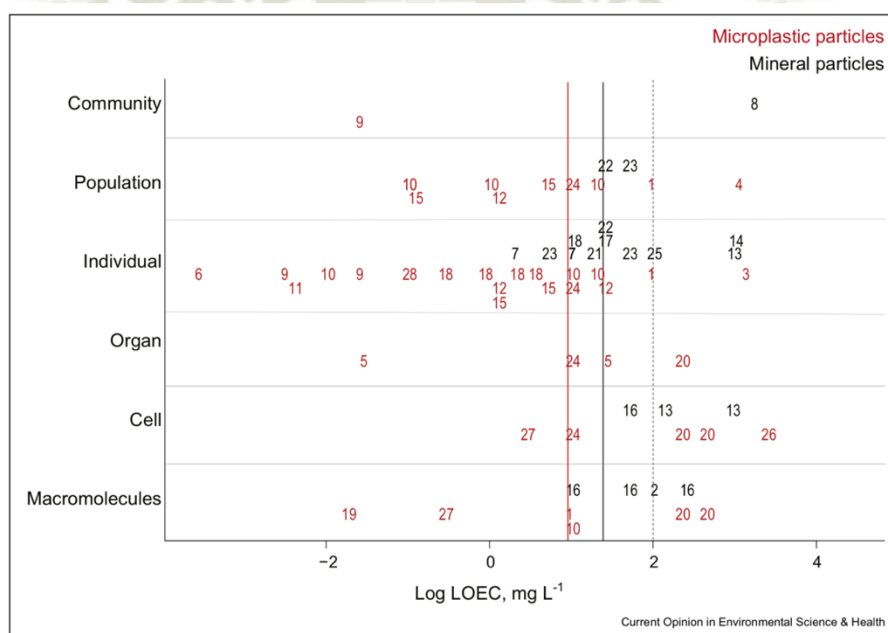


Figura 5. Valores de LOEC informados para micro-partículas de plástico y minerales [121].

Log¹⁰ transformó la concentración más baja del efecto observado (LOEC, mgL⁻¹) en varias especies expuestas a una suspensión de micro-plásticos o partículas minerales; los valores se resumen usando 28 estudios experimentales. Las respuestas se midieron en diferentes niveles de organización biológica (macromoléculas, células, órganos, individuos, población y comunidad) en

diferentes condiciones de exposición. Los valores informados se trazan como un número de referencia del estudio (Información de apoyo, Tabla S1). Como la concentración LOEC, usamos la concentración de prueba más baja que dio como resultado una respuesta significativamente diferente (en cualquier dirección) en comparación con un control libre de partículas. Las líneas verticales sólidas muestran valores medianos para cada grupo. Observe que la mayoría de los valores, independientemente del tipo de partícula, están por debajo del límite de descarga diaria aceptable para sólidos suspendidos totales (TSS; 100mgL^{-1}) en aguas pluviales que se muestran como la línea punteada vertical ^[121].

Además, los microplásticos utilizados en tales experimentos tienen partículas más pequeñas y más uniformes en comparación con los espectros de tamaño del sedimento natural ^[67]. Esto último implica que, según el recuento de partículas, las concentraciones micro-plásticas experimentales serían más altas que las de las partículas de sedimentos. Como la tasa de eliminación en la mayoría de los alimentadores no selectivos es una función de la abundancia de partículas, ^[122] el número de partículas en un volumen de búsqueda es más importante que las concentraciones basadas en masa. En consecuencia, se necesitan experimentos controlados para concluir si los micro-plásticos tienen de hecho valores de LOEC (concentración más baja a la cual se observa efecto) más bajos y, por lo tanto, mayor toxicidad en comparación con las partículas naturales.

Los mecanismos de efecto de los microplásticos varían a través de escalas biológicas. Las partículas que son demasiado grandes ($> 5\text{mm}$) para translocarse a órganos sistémicos, en su mayoría pueden causar efectos letales, por ejemplo, alimentación comprometida, alteración de la condición y la fecundidad ^[68]. A nivel

macromolecular / celular, exposición micro-plástica se ha relacionado con una serie de biomarcadores, como el estrés oxidativo y la expresión de genes relacionados con el estrés [69]; [70].

Los valores de LOEC varían mucho tanto para micro-plásticos como para sedimentos, sin diferencias significativas entre los tipos de partículas (figura 1, tabla de información complementaria S4a). Sin embargo, las respuestas de mayor nivel se producen a concentraciones significativamente menores de micro-plásticos en comparación con las partículas minerales (Tabla de información complementaria S4b), aunque es probable que los mecanismos de efectos sean similares y estén relacionados con la alimentación. De hecho, Newcombe y MacDonald [71] revisaron los efectos biológicos de los sedimentos suspendidos en >70 estudios e informaron efectos negativos sobre, por ejemplo, supervivencia de alevines en peces salmónidos, obstrucción de apéndices de alimentación en zooplancton, alimentación reducida y capacidad reproductiva junto con una mayor mortalidad y disminución de la población en invertebrados bentónicos y pelágicos. Además, el aumento de cargas de sólidos en suspensión se ha relacionado con cambios distintos en la estructura de la comunidad (figura 1, tabla de información de apoyo S1). Los efectos micro-plásticos también están relacionados con los alimentos.

Los efectos de la exposición a micro-plásticos a menudo se relacionan con la ingestión de material no apto para consumo humano y, por lo tanto, con la disminución de la ingesta calórica [72]. La adición de micro-plásticos a la suspensión de alimentación o al sedimento rico en compuestos orgánicos causa la dilución de la fuente de alimentación para los alimentadores no selectivos [73]; [74], Otro mecanismo que se ha sugerido es la adherencia de los micro-plásticos a los

apéndices de alimentación de los copépodos que dificultan la eficacia de la filtración [75]. Los estudios que emplean biomarcadores del estrés han informado de cambios en el estado oxidativo y la expresión génica inducida por la exposición de microplástico [70]. Además, no puede descartarse que tales respuestas de biomarcadores reflejen una menor ingesta calórica en lugar de una toxicidad directa del microplástico *per se*. De hecho, los cambios en la ingesta calórica y el estado metabólico han demostrado que afectan a varios biomarcadores, como los marcadores de estrés oxidativo [76].

De manera similar, la regulación al alza de genes de resistencia al estrés (por ejemplo, HSP60, HSP70 y FOXO) también se ha relacionado con un estado nutricional comprometido en insectos [77]. El agua natural no está libre de partículas como erróneamente se cree, entonces, la necesidad de controlar las partículas se hace inminente ya que la presencia de cualquier partícula puede afectar la ingesta de alimentos, y las micro-partículas tanto naturales como antropogénicas tienen la capacidad de causar efectos adversos a altas concentraciones, ha hecho que muchos estudios no sean informativos o al menos, difíciles de usar en la evaluación de riesgos. Por lo tanto, es crucial utilizar entornos relevantes para el medio ambiente cuando se prueban los efectos micro-plásticos y se controlan los factores de confusión, como la ingesta de alimentos. Para implementar esto, las partículas no alimentarias deben usarse en los tratamientos de control. Los desafíos en la evaluación de los efectos de partículas, incluido el uso de partículas de referencia, se han discutido en el contexto de las pruebas de toxicidad de nano-partículas [78]. La complejidad de los materiales de polímeros plantea desafíos particulares para el experimentador, ya que varios factores, como la forma, el tamaño, las propiedades fisicoquímicas, los lixiviados, etc., deben ser considerados. Por lo

tanto, la elección del material de referencia no es directa; sin embargo, los requisitos previos generales son tanto la referencia como que las partículas de prueba están bien caracterizadas, lo cual es un caso raro en los estudios de efectos micro-plásticos [79].

1.6 Perspectivas Futuras en el área

Una de las mejores noticias en cuanto a proyección a futuro de esta importante industria es que esta es muy diversa y versátil, en cuanto a la variedad de productos que fabrica como en los usos que podemos darles. Esto ha permitido el amplio desarrollo de esta industria con el paso del tiempo, pero también nos abre la puerta hacia la formulación de nuevos materiales fabricados con herramientas biotecnológicas que tengan características potenciadas y más amigables con el medio ambiente. Pudiendo desarrollar nuevos procedimientos con la aparición de especies identificadas, pero sin relación alguna en estos procedimientos.

Por otro lado, el desarrollo trajo consigo investigación y esto nuevas posibles soluciones para combatir tanto macro plásticos como micro-plásticos en nuestro ecosistema en general, mediante diversos microorganismos, que a su vez también pueden ser potenciados con herramientas genéticas y biotecnológicas para degradar con mayor eficacia y en menor tiempo este tipo de materiales.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló de forma parcial en los siguientes ambientes:

- Laboratorios designados H-101, H-301 y H-401 para el desarrollo de proyectos de investigación del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica de la universidad Católica de Santa María en la ciudad de Arequipa, Perú. Brindando instalaciones adecuadas para el desarrollo y el equipamiento de laboratorio.
- Laboratorios del Hospital de la Policía ubicado en Avenida Bolognesi N° 602 Urbanización La Marina. Arequipa, Perú.
- Laboratorios de Labvetsur ubicado en Av. Alfonso Ugarte Nro. 500a Z.I. Arequipa, Perú.
- Laboratorios de BIOAL S.A.C ubicado en Av. Tomas Marsano Nro. 3664 Lima, Perú.
- Laboratorios de MacroGen, USA.

2.2 MATERIALES

- Material Biológico:
 - Microrganismos aislados de rafia en proceso de degradación.
- Material de laboratorio:
 - Tubos de ensayo
 - Matraces Erlenmeyer (250, 500mL)
 - Pipetas (1, 5, 10mL)
 - Probetas (10, 20, 200mL)
- Reactivos y Material Químico:
 - $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$ (qp)
 - NaNO_3 (qp)
 - K_2HPO_4 (qp)
 - KCL (qp)
 - MgSO_4 (qp)
 - Levadura (qp)
 - Medio Agar Nutritivo
 - Medio Agar Mueller Hinton
 - Medio Agar Sangre
 - Medio Caldo Nutritivo
 - Medio Caldo BHI
- Instrumentación y Equipos:
 - Microscopio
 - Incubadora
 - Mecheros Bunsen

Placas Petri

Autoclave

Batería Gram

Equipo de mineralización *Denton Vacuum Desk II*

Microscopio electrónico de barrido Tescan Modelo Vega II

Secuenciador *Metagenome Secuencing*

PCR

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Obtención y preparación de muestras de plásticos ambiental

La presente investigación se llevó a cabo mediante los procedimientos que se detallan a continuación: La muestra fue hallada en la provincia Jorge Basadre en el departamento de Tacna, Perú (UTM) Latitud: -17.3000, Longitud: -70.64978. Se delimitó un área de 1m², con mayor presencia del “analito” de interés, para llevar a cabo el muestreo correspondiente.

Se determinó y se tomó nota de los parámetros y condiciones ambientales en las que se encontró la muestra: temperatura 21°C y humedad relativa promedio 55.15%. Se recolectaron con la ayuda de guantes y en una bolsa ZipLock. Las muestras fueron rotuladas y empaquetadas en las mismas bolsas, en el rótulo se consideró las condiciones ambientales en las que fue encontrada y la hora de toma de muestra. Se trasladaron a la ciudad de Arequipa para su posterior análisis.

2.3.2 Estabilización con Suero Fisiológico

Las partículas de plástico fueron estabilizadas con suero fisiológico en placas Petri de 20ml cada una, previamente esterilizadas. Se separaron en 2 grupos para evaluar el tiempo de exposición o de contacto.

- Placa 1: 24 horas en contacto con suero fisiológico: Se depositaron los fragmentos de plástico recolectados y 10mL de suero fisiológico.
- Placa 2: 48 horas en contacto con suero fisiológico: Se depositaron los fragmentos de plástico recolectados y 10mL de suero fisiológico.

Ambas placas fueron incubadas a temperatura ambiente. Luego de ser correctamente cerradas y rotuladas se pusieron a buen recaudo y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 24 y 48 horas respectivamente.

2.3.3 Preparación de Medios de Cultivo Microbiológico generales y enriquecidos

Se prepararon 2 placas de Agar nutritivo y Mueller Hinton. Para el medio sólido Agar nutritivo (**Tabla 5**), se mezcló y dejó reposar por 5 minutos, se calentó ligeramente hasta ebullición en agitación constante, dejándolo hervir por aproximadamente 2 minutos. Se llevó al autoclave y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Se dejó enfriar hasta 45°C aproximadamente y se colocó 20 ml de medio por placas Petri de vidrio de 9cm de diámetro previamente esterilizadas. Se esperó a que las placas enfriaran por completo y se almacenaron a temperaturas de 2°C a 8°C.

Tabla 5. Agar Nutritivo. (31g por litro de agua destilada.)

Fórmula (en gramos por litro)	
Infusión de carne	300g
Peptona ácida de caseína	17.5g
Almidón	1.5g
Agar	15g
pH final: 7.3 +/- 0.1	

Para la adecuada preparación del medio sólido Agar Mueller Hinton (**Tabla 6**), se dejó embeber por 15 minutos y se calentó hasta ebullición en agitación constante, dejándolo hervir por aproximadamente un minuto.

Tabla 6. Agar Müller Hinton. (37g por litro de agua destilada.)

Fórmula (en gramos por litro)	
Pluripeptona	5g
Extracto de carne	3g
Cloruro de sodio	8g
Agar	15g
pH final: 7.3 +/- 0.2	

Seguidamente se llevó al autoclave y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar hasta 45°C aproximadamente y se colocaron 20mL de medio por placas Petri de vidrio de 9cm de diámetro previamente esterilizadas.

Se esperó a que las placas enfriaran por completo y se almacenaron correctamente a temperaturas de 2°C a 8°C.

2.3.4 Sembrado en placa

Luego del tiempo de enfriamiento de las placas de ambos medios de cultivo, se tomó un inóculo del suero fisiológico con bacterias liberadas y estabilizadas

recuperadas de los fragmentos de rafia del botadero domestico de ambas placas (24 y 48 horas) que fueron sembrados por estría en las placas de medio Nutritivo (**Tabla 7**) inicialmente, para así poder establecer un primer conteo.

Tabla 7. Siembra por estría en Agar Nutritivo.

Muestra	Temperatura: T1	Temperatura: T2
Placa A: 24h	Ambiente 25°C aprox.	Incubadora: 37°C
Placa B: 48h	Ambiente 25°C aprox.	incubadora: 37°C

Observamos en la Tabla 7 los datos de la primera placa para la siembra en medio Mueller Hinton, el tiempo y las temperaturas de incubación.

Tabla 8. Siembra por estría en Agar Mueller Hinton.

Muestra	Temperatura: T1	Temperatura: T2
Placa A: 24 h	Ambiente 25 °C aprox.	Incubadora: 37 °C
Placa B: 48 h	Ambiente 25 °C aprox.	incubadora: 37 °C

De la misma forma se realizó para la segunda placa para la siembra por estría en medio Mueller Hinton (**Tabla 8**) y se incubo tanto a 25°C como a 37°C.

2.3.5 Evaluación de crecimiento microbiano

Posterior a la siembra se seleccionaron las bacterias con potenciales características macroscópicas como color y tamaño, bordes irregulares, textura de la colonia, etc. Se dejaron por el mismo lapso de tiempo que los cultivos generales. Luego se seleccionaron 7 colonias a las que se les realizaron repiques hasta que

se obtuvieron cepas puras en placas diferenciadas facilitando su posterior identificación.

2.3.6 Preparación de medios diferenciales

Se preparó 2 placas de Agar Sangre, McConkey y Sabouraud. El medio sólido Agar Sangre (Medio de cultivo Enriquecido), 40g por litro de agua destilada (**Tabla 9**). Se mezcló hasta lograr una suspensión homogénea y se calentó en agitación constante hasta la ebullición y se dejó hervir por un minuto.

Tabla 9. Agar Sangre (Medio de Cultivo Diferencial)

Fórmula (en gramos por litro)	
Infusión de músculo de corazón	375g
Peptona	10g
Cloruro de sodio	5g
Agar	15g

pH final: 7.3 +/- 0.2

Se dejó enfriar hasta 45°C aproximadamente y se colocaron 20mL de medio por placas Petri de vidrio de 9cm de diámetro previamente esterilizadas. Posteriormente se esperó a que las placas enfriaran por completo fueron correctamente almacenadas en un ambiente con temperaturas de 2°C a 8°C.

Se preparó también medio sólido Agar McConkey Medio de Cultivo Diferencial con la concentración de 50g por litro de agua destilada (**Tabla 10**).

Tabla 10. Agar MacConkey (Medio de Cultivo Diferencial).

Fórmula (en gramos por litro)	
Peptona	17g
Pluripeptona	3g
Lactosa	10g
Mezcla de sales biliares	1.5g
Cloruro de sodio	5g
Agar	13.5g
Rojo neutro	0.03g
Cristal violeta	0.001g

pH final: 7.1 +/- 0.2

Posteriormente se esperó a que las placas enfriaran y fueron almacenadas en un ambiente con temperaturas de 2°C a 8°C. Luego se preparó el medio sólido Agar Sabouraud (**Tabla 11**). Medio de Cultivo Diferencial. Se suspendió 65g de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se calentó y agitó frecuentemente y se dejó hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes.

Tabla 11. Componentes y concentraciones para Agar Sabouraud.

Formula en gramos por litro.	
Digerido enzimático de caseína	10,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Se evitó la ebullición y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, se distribuyó y se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización. Posteriormente fueron almacenadas en un ambiente con temperaturas de 2°C a 8°C.

2.3.7 Sembrado en medios diferenciales

Una vez enfriadas comprobada la esterilidad de los medios de cultivo se procedió a la siembra en estos medios. La siembra en Agar Sangre (**Tabla 12**) se realizó por estría y se incubó a 25 y 37°C.

Tabla 12. Agar Sangre: Pruebas diferenciales

Muestra	Temperatura: T1	Temperatura: T2
Placa A: 24h	Ambiente 25°C aprox.	Incubadora: 37°C
Placa B: 48h	Ambiente 25°C aprox.	Incubadora: 37°C

En McConkey (**Tabla 13**) se realizó el mismo procedimiento con los repiques obtenidos de los medios generales y enriquecidos.

Tabla 13. Agar Mc Conkey: Pruebas diferenciales

Muestra	Temperatura: T1	Temperatura: T2
Placa A: 24h	Ambiente 25°C aprox.	Incubadora: 37°C
Placa B: 48h	Ambiente 25°C aprox.	Incubadora: 37°C

Los repiques obtenidos en las primeras siembras se hicieron por estría, de la misma forma que los 2 anteriores, incubando a 25 y 37°C.

Tabla 14. Sabouraud: Pruebas diferenciales

Muestra	Temperatura: T1	Temperatura: T2
Placa A: 24h	Ambiente 25°C aprox.	Incubadora: 37°C
Placa B: 48h	Ambiente 25°C aprox.	Incubadora: 37°C

Por último, en el medio Sabouraud, también se evaluó el crecimiento de cada colonia en los medios diferenciales (**Tabla 14**).

Se seleccionó cepas por caracterización macroscópica referenciadas bibliográficamente para posible degradación de PEAD.

2.3.8 Tinción Gram

Se agregó Cristal Violeta hasta cubrir el frotis y se dejó actuar por un minuto. Se lavó con agua corriente, y se retiró solamente el exceso de colorante. Seguidamente se agregó el mordiente Lugol de la misma forma hasta cubrir la muestra y se dejó actual por un minuto. Se lavó con agua corriente. Luego se decoloraron todas las muestras con alcohol acetona y se lavó con agua corriente.

Después se agregó Zafranina hasta cubrir la muestra por completo y se dejó actuar también por un minuto. Transcurrido el tiempo se lavó con agua corriente. Se dejaron secar todas las muestras a temperatura ambiente. Se observaron las muestras a 40X y con aceite de inmersión a 100X.

2.3.9 Características Microscópicas

Mediante Tinciones Gram se determinó características microscópicas en las primeras siembras. Para ello se utilizaron los siguientes procedimientos:

Se tomaron portaobjetos nuevos y se lavaron de 2 a 3 veces con jabón carbólico, se enjuagaron bien y se lavaron nuevamente con alcohol de 95° varias veces, posteriormente fueron flamearlos y se dejaron secar.

Una vez limpios se rotularon en uno de los extremos con letras desde la A hasta la G. Se prepararon los Frotis bacterianos con las colonias de cada una de las placas y agua estéril y se fijaron con calor.

2.3.10 Purificación de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se repicaron en placas estériles con medio fresco hasta obtener colonias totalmente puras.

2.3.11 Identificación y Caracterización Bioquímica

Las colonias puras fueron llevadas al centro de control de investigación científica y diagnóstico "LABVETSUR" donde se identificaron bioquímicamente. Algunos de los medios utilizados fueron: TSI, Urea, Gelatina, Oxidasa, y medios selectivos de cultivo en placa.

2.3.12 Crio-conservación en glicerol

Se inocularon en el caldo BHI y fueron envasadas para ser conservadas con Glicerol. Por cada 100mL de muestra se utilizó 3mL de glicerol. Se tomó 1mL por cada matraz y se trasladaron a tubos Eppendorf estériles. A cada tubo con 1mL de inóculo se adicionó 0.3mL de glicerol para su conservación. Para culminar con el proceso de conservación los 5 tubos Eppendorf fueron refrigerados a -40°C.

Preparación de Cultivos Líquidos

Se seleccionaron las de interés para la investigación y se preparó medio de cultivo para posteriores siembras. Previo a esto se autoclavaron 5 matraces y se rotularon con las letras de las cepas seleccionadas. Se prepararon 50ml de caldo BHI (**Tabla 15**) y se esterilizó el ambiente donde se realizó la inoculación. Se limpió el mesón del laboratorio con alcohol de 95% y se garantizó la esterilidad del ambiente con el mechero Bunsen encendido. Luego se colocó 5ml de caldo en los matraces de 10mL y con la ayuda de un asa de Kolle se tomó una colonia de cada placa y se

inoculó en cada matraz, se agitó y mezcló bien, se cerró el matraz utilizando Parafilm y se colocaron en el *Shaker* a 30rpm y con el *Hot Plate* a 37°C de temperatura por 7 días o hasta notar turbidez. Una vez generada turbidez se sembró en medios sólidos facilitando también su conservación.

Tabla 15. Caldo BHI (Cultivo Líquido)

Caldo BHI (Cerebro-Corazón)	
Infusión de cerebro y corazón (sólidos)	8.0 g
Digerido péptico de tejido animal	5.0 g
Digerido pancreático de caseína	16.0 g
Cloruro sódico	5.0g
Glucosa	2.0 g
Fosfato disódico de hidrógeno	2,5 g

Preparación del inóculo líquido. Se tomaron 5mL de Caldo BHI fresco y estéril en un matraz, con un asa de Kolle se tomó una colonia de cada bacteria purificada y se disolvió en el medio. Se puso a incubar en el *Shaker* a 7 grados y 30rpm.

Posteriormente y por similitud en los géneros reportado bioquímicamente se realizó una asociación de las mismas en dos grupos. Luego se sometió el PEAD a tratamientos mecánicos de molienda que facilitaron su biodegradación. El PEAD fue lijado hasta obtener polvo fino de PEAD. Se purificó la muestra con imanes para evitar restos de lijar.

2.3.13 Estandarización de PEAD

El PEAD puro se distribuyó en matraces de 10mL previamente esterilizados y rotulados con números del 1 al 4. Se añadió 1g de PEAD por matraz y luego se le agregó a cada uno caldo BHI sin inóculo alguno, recién esterilizado. Estos matraces también fueron colocados en el *Shaker* a 30rpm y 37°C de temperatura en el *Hot*

Plate. Se tomaron muestras del PEAD en contacto con el caldo BHI cada semana durante 1 mes. Cada uno de los matraces fue filtrado para eliminar el medio y tomar únicamente el peso del PEAD.

Primero se pesó cada papel filtro seco, luego se pesó el papel filtro con el PEAD que estuvo en contacto con el caldo BHI. Se puso cada papel filtro en el desecador por 4 semanas y se tomaron datos de peso cada semana.

2.3.14 Preparación del medio Sintético PEAD

Una vez estandarizado el peso del PEAD, se empezó con la preparación de medio sintético para la degradación. Se utilizaron materiales de laboratorio químicamente puros (**Tabla 16**).

Tabla 16. Medio de Crecimiento: Medio Sintético

Medio de crecimiento	1 Lt
(NH ₄) SO ₄	0.10%
NaNO ₃	0.10%
K ₂ HPO ₄	0.10%
KCL	0.10%
MgSO ₄	0.20%
Levadura	0.10%

Luego de haber preparado el medio de crecimiento, se le añadió el PEAD para generar el medio enriquecido (**Tabla 17**).

Tabla 17. Medio de Cultivo Sintético Enriquecido con PEAD

Medio enriquecido	
Medio de crecimiento	100mL
Polietileno en polvo	0.2g

2.3.15 Adaptación de las cepas al medio sintético o enriquecido

Se separaron en 2 grupos para evaluar su capacidad degradadora de PEAD. Luego se esterilizaron 16 matraces de 10mL y se rotularon de la siguiente manera: GP1, GP2, GP3, GP4, GP5, GP6, para el conjunto de *Pseudomonas* y para el consorcio bacteriano: GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6. Los 2 matraces restantes, se utilizaron como blancos.

- Grupo 1: *Pseudomonas* spp.

Se preparó caldo BHI fresco y estéril para iniciar con el proceso de adaptación.

Las 2 variedades de *Pseudomonas* se inocularon en el matraz GP1 de 10mL de capacidad con 5mL de caldo BHI en su interior, se colocó en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 1 semana. Transcurrido el tiempo de crecimiento, se tomaron 4mL del matraz GP1 y se colocaron en el matraz GP2 que contenía 1 ml de caldo de crecimiento y 0.002g de PEAD. Este nuevo matraz se colocó nuevamente en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 1 semana. Transcurrido el tiempo de incubación del matraz GP2 en el shaker, se tomó una alícuota de 3mL y se inoculó en el matraz GP3 que contenía 2 ml de caldo de crecimiento y 0.004g de PEAD. Este matraz se colocó nuevamente en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 1 semana. Al cabo de 7 días el matraz GP3 estaba listo para una nueva toma de muestra por lo que se tomaron 2mL del GP3 y se inocularon en el nuevo matraz GP4 con 3mL de medio de crecimiento y 0.006g de PEAD. Este se colocó nuevamente en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 1 nueva semana. Una vez cumplidos los 7 días de incubación, se tomó una alícuota de 1ml del GP4 y se colocó en un nuevo matraz GP5 con 4mL de medio de crecimiento con 0.008g de

PEAD. Este nuevo matraz se colocó nuevamente en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 1 semana. Finalmente se tomó una alícuota de 0.5mL del matraz GP5 y se colocó en el GP6 con 4.5ml de medio de crecimiento con 0.009g de PEAD. Este matraz se colocó nuevamente en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 2 semanas más y se observó el crecimiento y la turbidez cada 3 días. Los matraces GP1, GP2, GP3, GP4 y GP5 fueron guardados en refrigeración.

- Grupo 2: Consorcio Bacteriano

En simultáneo se realizó el mismo procedimiento con los matraces GC1-GC6. Se preparó caldo BHI fresco y estéril para iniciar con el proceso de adaptación. Las 5 variedades de bacterias identificadas bioquímicamente se inocularon en el matraz GC1 de 10ml de capacidad con 5mL de caldo BHI en su interior, se colocó en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 1 semana. Transcurrido el tiempo de crecimiento, se tomaron 4mL del matraz GC1 y se colocaron en el matraz GC2 que contenía 1mL de caldo de crecimiento con 0.002g de PEAD. Este nuevo matraz se colocó nuevamente en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 1 semana.

Transcurrido el tiempo de incubación del matraz GC2 en el *Shaker*, se tomó una alícuota de 3ml y se inoculó en el matraz GC3 que contenía 2mL del medio de crecimiento con 0.004g de PEAD. Este matraz se colocó nuevamente en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 1 semana. Al cabo de 7 días el matraz GC3 estaba listo para una nueva toma de muestra por lo que se tomaron 2mL del GC3 y se inocularon en el nuevo matraz GC4 con 3mL de medio de crecimiento con 0.006g de PEAD. Este se colocó nuevamente en el *Shaker* a

30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 1 nueva semana. Una vez cumplidos los 7 días de incubación, se tomó una alícuota de 1mL del GC4 y se colocó en un nuevo matraz GC5 con 4ml de medio de crecimiento con 0.008g de PEAD. Este nuevo matraz se colocó nuevamente en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 1 semana. Finalmente se tomó una alícuota de 0.5mL del matraz GC5 y se colocó en el GC6 con 4.5ml de medio de crecimiento con 0.009g de PEAD. Este matraz se colocó nuevamente en el *Shaker* a 30rpm y a 37°C de temperatura en el *Hot Plate* por 2 semanas más y se observó el crecimiento y la turbidez cada 3 días. Los matraces GC1, GC2, GC3, GC4 y GC5 también fueron guardados en refrigeración. Durante el tiempo de evaluación transcurrido se trabajó con 2 blancos, uno para el caldo BHI y otro para el medio enriquecido con PEAD. Transcurridas las 2 semanas de cultivo de los matraces GP6 y GC6 se tomaron 2mL de cada matraz y se inocularon con 10mL de medio de crecimiento fresco con 0.02g de PEAD en nuevos matraces estériles. El matraz GP' para el GP6 y el GC' para el GC6 que se dejaron incubar en las mismas condiciones por 2 semanas.

2.3.16 Evaluación de la capacidad de degradación de ambos grupos.

Al cabo de 2 semanas de incubación se tomaron alícuotas de cada matraz para conformar el sistema de evaluación a mini-escala. Se autoclavaron 14 nuevos matraces con 10mL de capacidad y se rotularon teniendo en cuenta el grupo al que pertenecían y el tiempo de incubación de cada uno. Además de los matraces se cortaron, pesaron y rotularon 12 papeles filtro para la evaluación correspondiente. Se rotuló y peso cada uno de los matraces. Se tomó nota de los cada uno de los

pesos. Posteriormente se tararon y se agregó 0.01g de PEAD a cada matraz y finalmente se agregó 4mL de medio por cada uno quedando listos para inocular.

Grupo 1: *Pseudomonas* spp. (GP'): Se inoculó en cada uno de los matraces pertenecientes al grupo 1, 1mL de GP'. Matraces GP1', GP2', GP3', GP4', GP5' y GP6' el matraz blanco fue rotulado como GPB'. Los 7 matraces fueron puestos en el Shaker a 37°C de temperatura y a 30rpm por un periodo de 6 semanas.

Grupo 2: Consorcio Bacteriano (GC'): En simultáneo se inoculó en cada uno de los matraces pertenecientes al grupo 1, 1mL de GC'. Matraces GC1', GC2', GC3', GC4', GC5' y GC6' el matraz blanco fue rotulado como GCB'. Los 7 matraces también fueron puestos en el Shaker a 37°C de temperatura y a 30rpm por un periodo de 6 semanas.

2.3.17 Evaluación y recopilación de datos.

Grupo 1: *Pseudomonas* spp. (GP') y Grupo 2: Consorcio Bacteriano (GC')

Para esta etapa se esterilizaron 2 embudos, 2 baguetas y 2 beakers de 10mL cada semana, además de 12 placas Petri de 20mL. Al cabo de la primera semana se retiró del Shaker el matraz GP1' y GC1', ambos contenidos en absolutas condiciones de esterilidad fueron filtrados. Al término de la filtración cada papel fue pesado obteniendo un dato inicial y fue llevado al desecador. En la segunda semana se repitió el procedimiento con los matraces GP2' y GC2'. Fueron filtrados y pesados. Además de tomar el peso de los matraces de la segunda semana se registró un nuevo dato de peso de las muestras de la primera semana. Ambas muestras son puestas en el desecador. En la tercera semana los matraces GP3' y

GC3' también fueron filtrados y pesados, adicionalmente se registraron nuevamente pesos de las muestras de la primera y segunda semana y se colocaron las 3 muestras en el desecador. En la cuarta semana se repite el proceso de filtración con los matraces GP4' y GC4'. Luego, se registraron pesos de las muestras de la semana 1, 2 y 3. Las 4 muestras recopiladas se colocaron en el desecador. En la quinta semana se filtró con el material estéril las muestras GP5' y GC5' y se registró el peso de las muestras de la semana 1, 2, 3 y 4. Luego se colocaron nuevamente en el desecador. En la sexta semana de incubación los matraces GP6' y GC6' fueron filtrados y posteriormente se registraron los pesos de las muestras de las semanas 2, 3, 4, y 5. Las 4 muestras fueron colocadas nuevamente en el desecador. Luego de las 6 semanas de incubación solo se tomaron datos de peso. En la semana 7 se registraron únicamente datos de peso de las muestras de las semanas 3, 4 y 5. Luego, se mantuvieron en el desecador. En la semana 8 se registraron los pesos de las muestras de la semana 4 y 5 y se colocaron nuevamente en el desecador. Para la semana nueve solamente se registró el peso de las muestras de la semana 5. Todos los matraces se enjuagaron con agua destilada y se volvieron a filtrar para evitar resultados erróneos. La turbidez se midió en base al blanco. Cada una de las muestras tuvo 5 datos de peso. Los papeles filtros fueron cuidadosamente guardados en placas Petri estériles, selladas y guardadas para los posteriores procedimientos.

2.3.18 Metalización de las muestras

La metalización se llevó a cabo en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad nacional de San Agustín, a cargo de la Ing. Violeta. Las muestras fueron llevadas en placas Petri previamente esterilizadas y totalmente selladas a

los laboratorios de Microscopía. Para la metalización las partículas de PEAD fueron fijadas con una cinta de carbono, posteriormente fueron sometidas a un bombardeo de partículas de Oro conocido como “Sputtering” por un lapso de 60 segundos utilizando un metalizador de vacío marca Denton Vacuum Desk II el cual le proporcionó un recubrimiento de grano fino (100Å) uniforme y con la conductividad necesaria para ser observado por MEB con solo un ciclo de revestimiento. Finalmente fueron colocadas en porta muestras especiales y guardadas para su visualización en el MEB.

Microscopía Electrónica de Barrido. Las muestras ya metalizadas se trasladaron en cajas herméticas hasta el laboratorio de Microscopía Electrónica en la facultad de metalurgia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grogman. En el cual fueron analizadas utilizando el Microscopio Electrónico de Barrido Marca Tescan Modelo Vega II con un aumento 1.00 y 5.00 kx.

2.3.19 Secuenciamiento 16s RNA

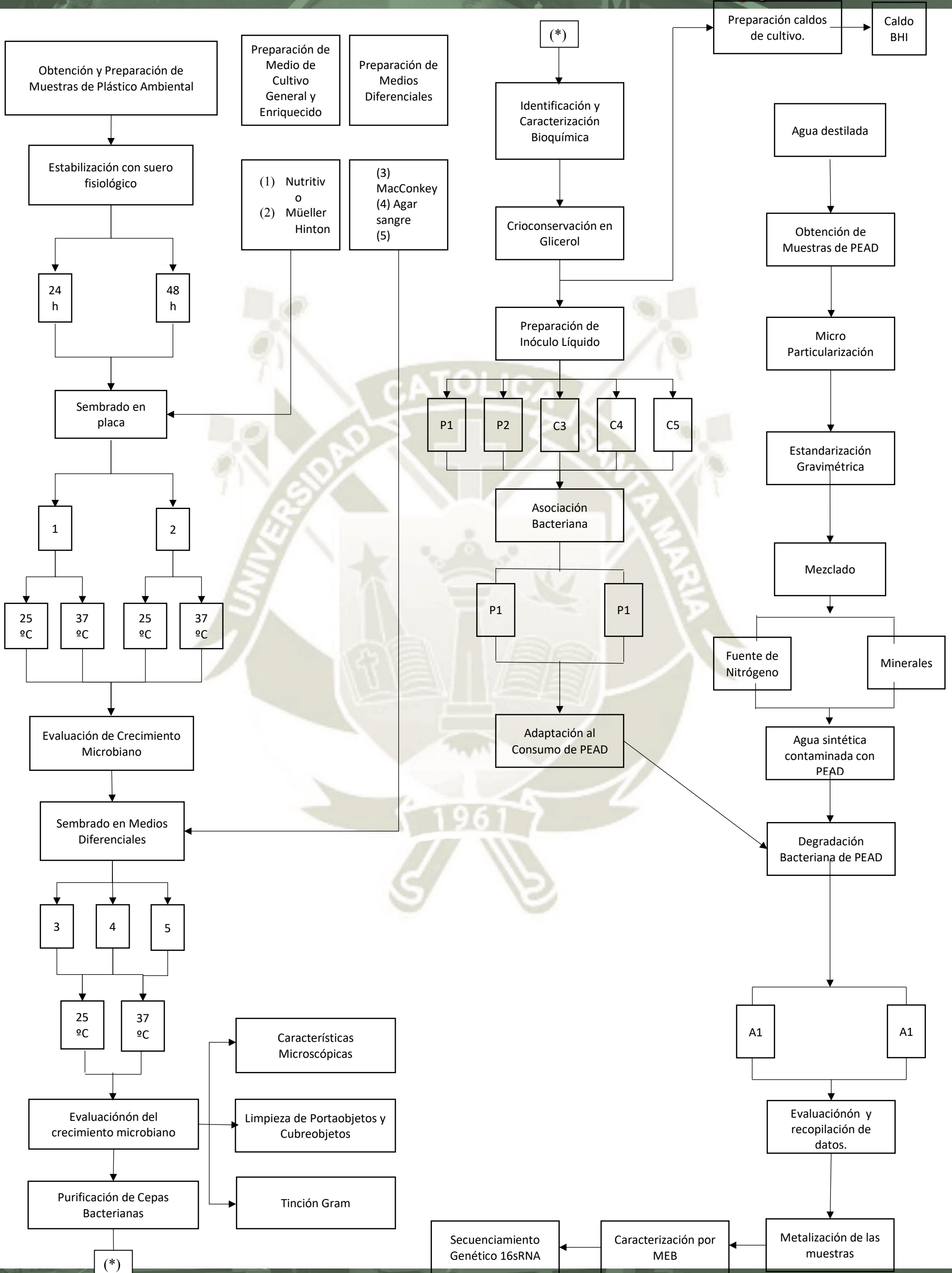
Las colonias bacterianas se procesaron utilizando determinados kits de secuenciación y un protocolo validado para MacroGen, todo esto luego del haber sido repicado, purificado y sembrado, para la posterior extracción de DNA de bacterias en fase potencial mediante PCR (**Tabla 18**). Los datos de secuencia se analizaron y utilizaron las bases de datos NCBI y BLAST, y la identificación se asignó utilizando las pautas del protocolo establecido por MacroGen. Asignó utilizando las pautas del protocolo establecido por MacroGen.

Tabla 18. Primers utilizados e información de la muestra a analizar.

#	Sample Name	Primer Name	product size (bp)	Plate Name	Well Position	Primer Sequence (5 to 3)	Primer Concentration (pmol/ul)
81	P aeruginosa	27F	aprox. 1300	17-108 P5	G9	AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG	5
82	P spp	27F	aprox. 1300	17-108 P5	G10	AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG	5
177	P aeruginosa	1492R	aprox. 1300	17-108 P5	G9	GGTTACCTTGTTACGACTT	5
178	P spp	1492R	aprox. 1300	17-108 P5	G10	GGTTACCTTGTTACGACTT	5

2.4 FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES

La **Figura 6** presenta el diagrama de flujo de actividades ejecutado en el proyecto de acuerdo a la metodología presentada para la obtención de los objetos.



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Obtención y preparación de muestras de plásticos ambiental.

Se obtuvieron pequeños fragmentos de rafia débiles al tacto. Se identificaron fácilmente por la abundancia de estos en el área (zona urbana). El material fue hallado en botaderos urbanos localizados en el departamento de Tacna (**Figura 7**) en avanzado proceso de foto-degradación (luz UV). Se tomó en cuenta, la temperatura como único parámetro ambiental relevante para el cultivo de los microorganismo en laboratorio.



Figura 7. Fotografía de geo localización en Google Earth sobre el punto toma de muestra.

Para la obtención y preparación de la muestra se utilizó una variación de la Guía de Muestreo de Suelos En el marco del Decreto Supremo N° 002-2013-MINAM, Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo. El muestreo elegido fue el de identificación, definido básicamente por la inspección de la zona. En este caso la data histórica sobre contaminación de la zona nos expuso una gran cantidad de extensión de terreno muy contaminada, debido en su mayoría a un marco complejo del ámbito social, político, económico y por consecuencia ecológico ^[81]. Las variaciones también fueron dadas por el objetivo general de la investigación, orientado hacia el descubrimiento de especies nativas con alta probabilidad de ser encontradas en estos polímeros. Ya que los posibles microorganismos aislados de un determinado polímero, pueden servir para degradar ^[82], existen muchas investigaciones sobre “biodegradación de plásticos” y se utilizan actualmente muchos microorganismos para lograr el cometido.

De esta manera la identificación se dio de forma en la que el único requisito fue la presencia del material de interés.

La principal característica en este caso fue la fragilidad del material dada por un proceso de foto degradación, Este proceso se basa en que la energía de la luz ultravioleta procedente de la luz solar es mayor que la energía de unión de los enlaces moleculares C-C y C-H y por lo tanto rompen las cadenas moleculares reduciendo su peso molecular y propiedades mecánicas ^[83]. Los fragmentos de plástico fueron recuperados con la guía de protocolos estándar de toma de muestra, rotulados, empaquetado y traslado para laboratorio, utilizando materiales estériles.

Los parámetros ambientales manejados en laboratorio, fueron dados por las condiciones en las que se encontraron ^[84]. Entre los más relevantes para el manejo inicial de la muestras se encuentran la temperatura (**Tabla 19**) y la humedad relativa.

Tabla 19. Temperaturas de muestreo in situ.

	Temperatura Máxima	Temperatura Mínima
Fragmentos de Rafia	25°C	8°C

3.2 Estabilización de la muestra con Suero Fisiológico

Tiempo: Tanto la placa A como la placa B presentaron crecimiento de varias colonias. Sin embargo, se observó mayor crecimiento con inóculo de la placa A (24 horas).

Temperatura: Las placas que fueron llevadas a la incubadora presentaron menor crecimiento que las que crecieron a temperatura ambiente.

Tabla 20. Temperaturas de estabilización con suero fisiológico.

	Temperatura 37°C	Temperatura Amb.
Placa A 24 horas	Crecimiento normal	Mayor Crecimiento
Placa B 48 horas	Crecimiento normal	Crecimiento normal

En esta etapa el suero fisiológico fue utilizado como un diluyente isotónico para las células bacterianas con el fin de conservarlas y lavarlas para una adecuada

preparación para su posterior estudio (**Tabla 20**), esto en base a los parámetros, temperatura (ambiental) y tiempo de desprendimiento promedio (24 horas), sin embargo se plantea el uso de caldo pre-enriquecido (Trypticase de Soya) con los nutrientes y las condiciones necesarias para su recuperación de microorganismos [85].

3.3 Sembrado en placa y evaluación de crecimiento microbiano.

Los resultados de la siembra en medios generales y enriquecidos se desarrollaron casi de la misma manera, la diferencia más tangible estuvo en el aumento de la velocidad de crecimiento de las cepas en el medio Mueller Hinton. La **Figura 8** muestra el crecimiento en medio Mueller Hinton en su 5 día a 37°C, en comparación con el Agar nutritivo, donde se desarrolló de forma más rápida y pronunciada. Esto debido a que en una población de bacterias que se encuentren en crecimiento equilibrado (medio adecuado, parámetros nutricionales y ambientales constantes) todos los constituyentes aumentan de manera proporcional en la unidad de tiempo.

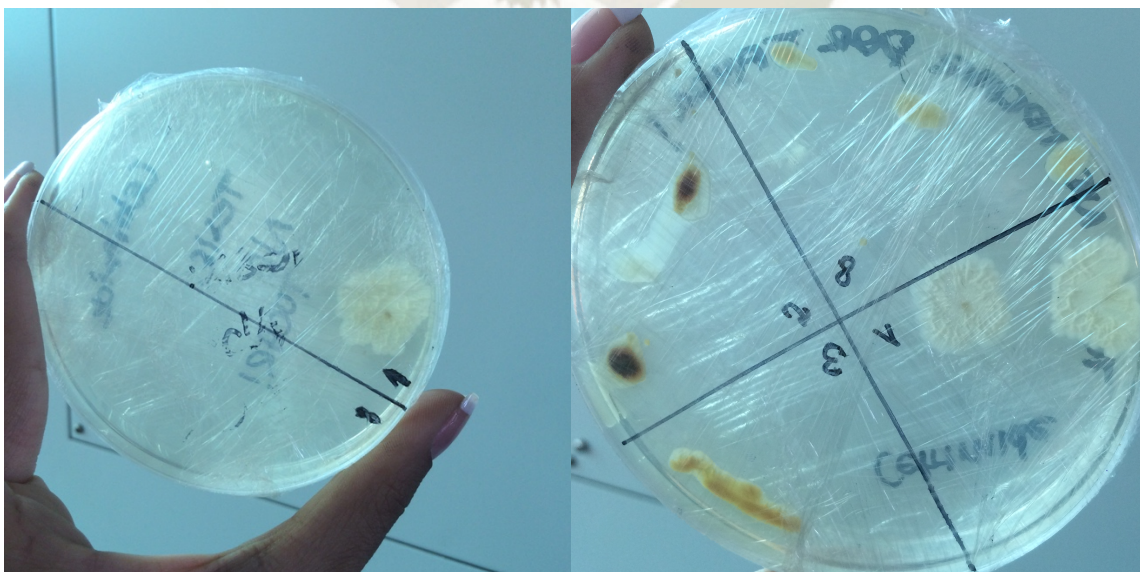


Figura 8. Comparativo de crecimiento bacteriano con respecto al tiempo en medio

(A) Agar Nutritivo y (B) Müeller Hinton.

Por lo que cuando se da el cambio de una cantidad de nutrientes a una cantidad de mayor, se genera mayor crecimiento y proliferación de las especies. Esto queda demostrado en la siguiente ecuación (2) ^[123].

Velocidad de aumento de células = μ . N° o masa de células

M: velocidad específica de crecimiento

Por lo que en términos matemáticos la velocidad de crecimiento de cualquier componente en un tiempo corto puede expresarse como la siguiente ecuación (3) ^[124].

$$dZ = \mu \cdot Z dt$$

La tinción Gram (**Tabla 21**) realizada sirvió como primer análisis microscópico de las cepas obtenidas y también permitió obtener detalles sobre su estructura interna, además de algunas funciones fisiológicas ^[125].

Tabla 21. Evaluación microscópica y de crecimiento en medios generales.

Cepa	Agar Nutritivo	Agar Mueller Hinton	Gram (+)	Gram (-)
M1	√	√		√
M2	√	√		√
M3	√	√	√	
M4	√	√	√	
M5	√	√		√
M6	√	√	√	
M7	√	√	√	
M8	√	√		√
M9	√	√		√

3.4 Siembra en medios diferenciales.

Los resultados de la siembra en Agar sangre, de los repiques obtenidos del medio Mueller Hinton, fueron importantes en cuanto a características morfológicas, como se puede apreciar en la **Figuras 9 y 10**. Se lograron aislar 9 cepas diferentes. En 1 muestra se observó ligera hemólisis Beta (Colonia 6), en las 9 restantes hemólisis Gamma.

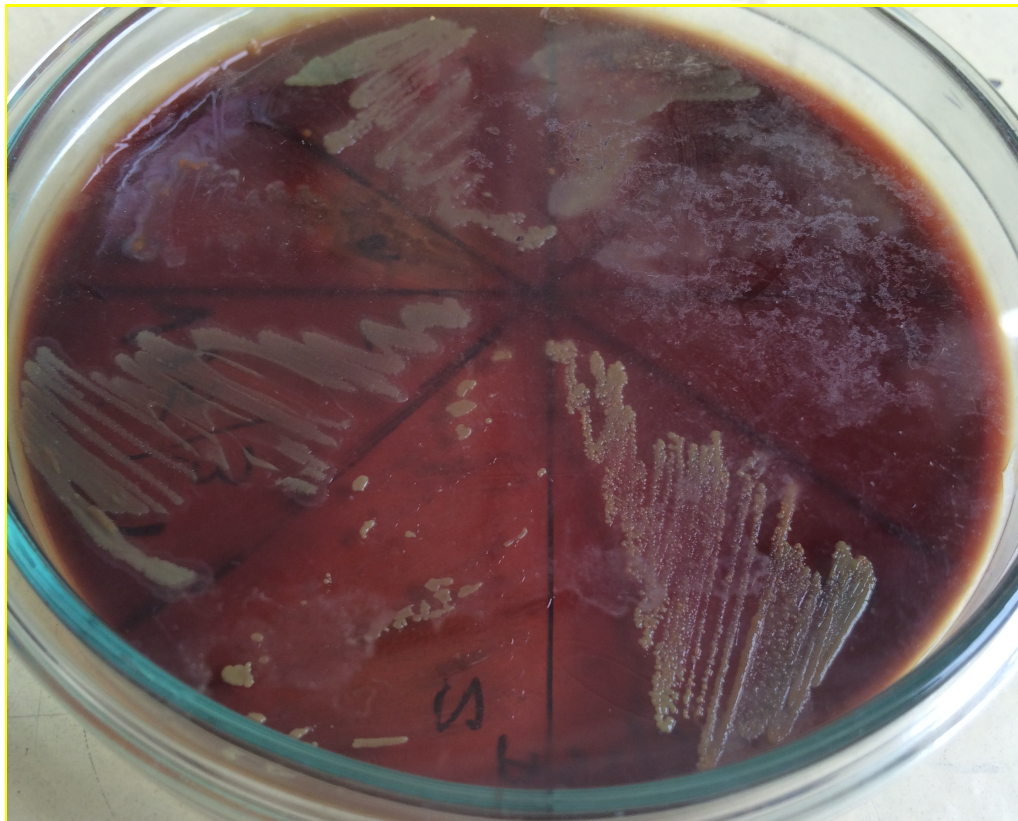


Figura 9. Fotografía de registro del crecimiento bacteriano en Agar Sangre.

Uno de los motivos principales por los que se sembró en Agar sangre, es porque este le brinda soporte de nutrientes necesarios para un óptimo crecimiento tanto a bacterias aerobias de fácil desarrollo como a bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales. Lo que nos asegura abarcar un mayor rango de posibles microorganismos creciendo en Agar Sangre ^[126].



Figura 10. Fotografía de registro de crecimiento y características macroscópicas en Agar sangre.

Los resultados de la última observación al microscopio bajo la técnica de tinción Gram, nos dieron como resultado diversas formas, cocos y bacilos Gram (+) y bacilos Gram (-).

La **Figura 11**, muestra bacilos curvos Gram (-) cuyas características macroscópicas se complementan con las descripciones ^[127], quien indica que este tipo de características corresponden al tipo *Pseudomona Aeruginosa*.

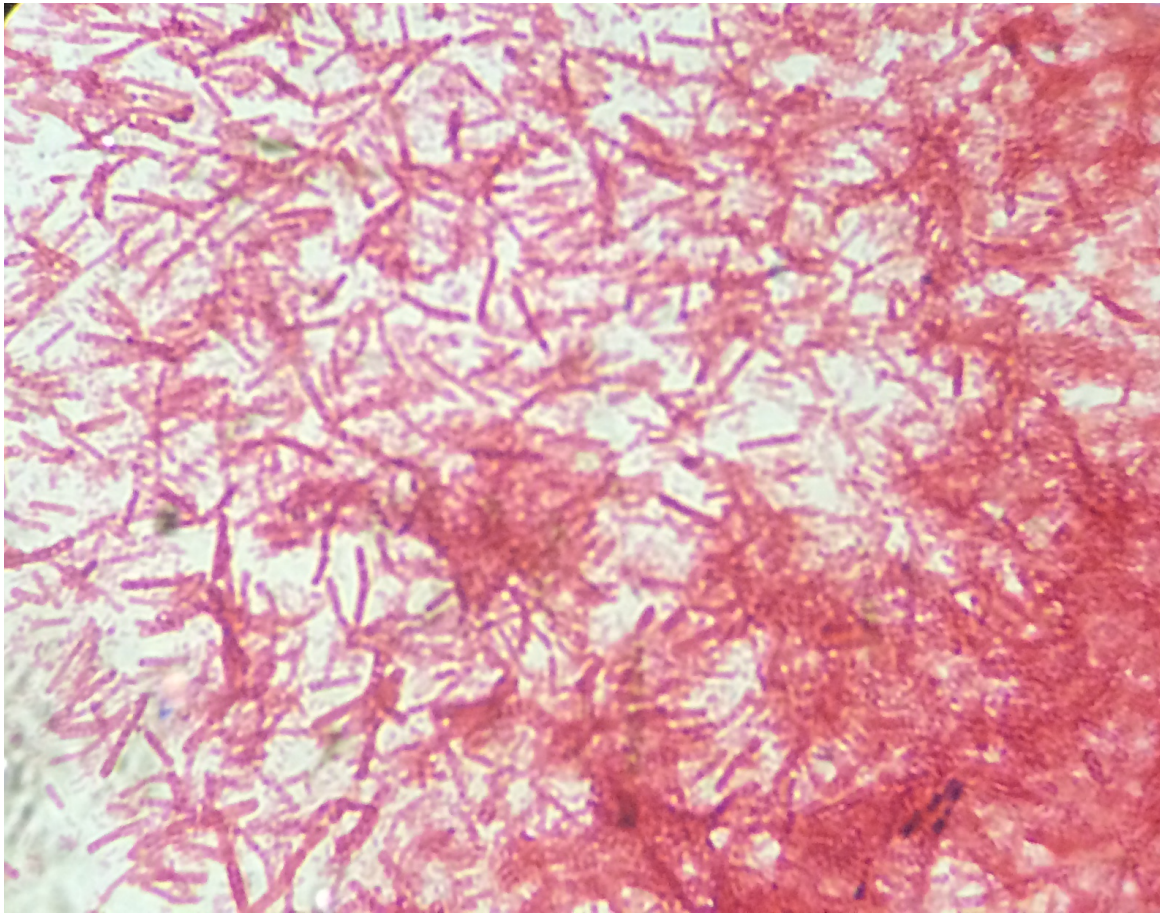


Figura 11. Fotografía de Vista Microscópica 100X.

Los resultados de la tinción Gram (**Tabla 22**) corroboraron la pureza de las cepas y las características físicas vistas al microscopio al mostrar los mismos resultados que la tinción anterior.

Por otro lado, se evaluó la velocidad de crecimiento de cada cepa por separado, teniendo en cuenta los factores ambientales como temperatura y los medios de siembra utilizados.

Tabla 22. Evaluación microscópica y de crecimiento en medios diferenciales.

Cepa	Agar Sangre	Agar Mac Conkey	Gram (+)	Gram (-)
C1	√	√		√
C2	√	-		√
C3	√	√	√	
C4	√	-	√	
C5	√	√		√
C6	√	√	√	
C7	√	-	√	
C8	√	-		√
C9	√	√		√

Los resultados (**Tabla 23**) mostraron mayor crecimiento a 37°C y evidenciaron mayor velocidad en la cinética de crecimiento bacteriana al encontrar mayor porcentaje de nutrientes en el medio, es decir en medio específicos o enriquecidos.

Tabla 23. Evaluación del crecimiento en el tiempo. (P): (-) / (M): (+) / (A): (++)

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
25°C	+	-	+	-	+	+	-	+	+
37°C	++	+	++	+	++	++	++	++	++

3.5 Evaluación Morfológica y de crecimiento Microbiano

Las características morfológicas obtenidas a lo largo de las siembras y los repiques en los diferentes medios utilizados fueron recopilados para otorgar un resumen de

las características físicas más resaltantes de las colonias (**Tabla 24**). Esta información comparada con la bibliografía de identificación ofrece una mejor visión de las posibles especies y sub especies presentes en la placa.

Las características morfológicas de las colonias como forma, tamaño, coloración, tipo de bordes, y textura ya sea mucoide o no, se determinaron de acuerdo a lo reportado [86] para el género *Staphylococcus* y *Pseudomona*.

La identificación macroscópica de una determinada bacteria, actualmente se realiza bajo métodos y técnicas más convencionales, basándose en características (**Figura 12**), como forma, color, textura, bordes, etc [87]. Y fue tal cual este método que se identificó morfológicamente las cepas bacterianas, según el texto de Morfología y Estructura bacteriana – 8 U.T. 12-1, las características dependen mucho del medio de cultivo, sus componentes, y aditivos. Además otro factor importante radica en las condiciones de incubación.

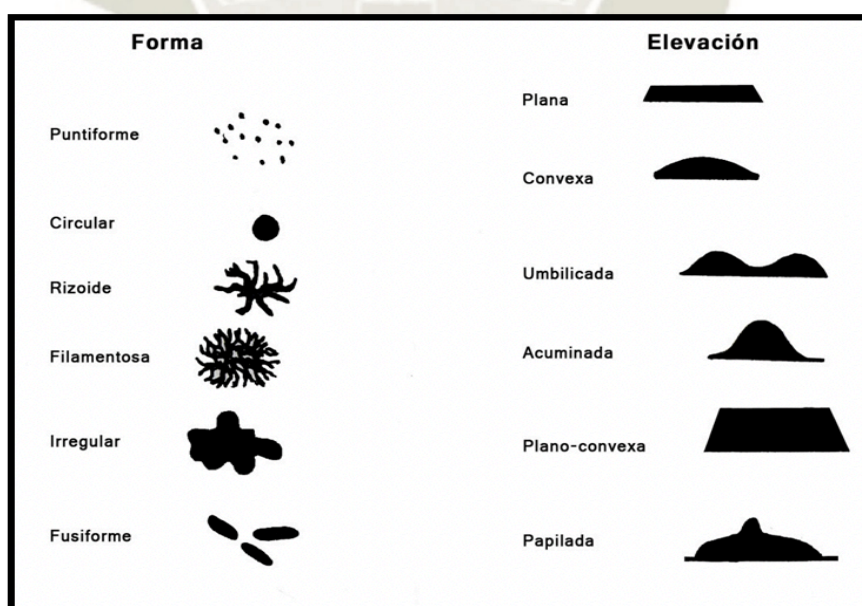


Figura 12. Forma y elevación de las colonias ()

Tabla 24. Características macroscópicas de las colonias obtenidas.

Cepa T°
37°C

	M4	M5	M6
Características	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidad de crecimiento lenta/moderada. • Aerobia • Cocos Gram (+) • Creció en agar Nutritivo, Mueller Hinton y Agar sangre. • Colonias amarillentas, de bordes regulares circulares pequeñas”.. 	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidad de crecimiento lenta/moderada. • Aerobia • Creció en agar Nutritivo, Mueller Hinton y Agar sangre. • Bacilos pequeños Gram (-) • Colonias de tamaño medio, beige , de bordes semitransparentes e irregulares. 	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidad de crecimiento moderada/rápida • Aerobia • Colonia medianas semi-transparente. • Bacilos pequeños curvos Gram (+) • Creció en agar Nutritivo, Mueller Hinton y Agar sangre.
	M1	M2	M3
Características	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidad de crecimiento lenta/moderada. • Aerobia • Creció en agar Nutritivo, Mueller Hinton y Agar sangre. • Bacilos pequeños Gram (-) • Colonias medianas marron oscuro con bordes semi transparentes, e irregulares. (agar sangre). 	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidad de crecimiento lenta/moderada. • Aerobia • Cocos Gram (+) • Creció en agar Nutritivo, Mueller Hinton y Agar sangre. • Colonias circulares pequeñas blanquecinas y de bordes regulares”. 	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidad de crecimiento lenta/moderada. • Aerobia • Colonia medianas semi-transparente . • Bacilos Gram (+) • Creció en agar Nutritivo, Mueller Hinton y Agar sangre.
	M7	M8	M9
Características	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidad de crecimiento lenta/moderada. • Aerobia • Bacilo Gram (+) • Creció en agar Nutritivo, Mueller Hinton y Agar sangre. • Colonias medianas color beige , de bordes irregulares semi-transparente 	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidad de crecimiento lenta/moderada. • Aerobia • Creció en agar Nutritivo, Mueller Hinton y Agar sangre. • Bacilos pequeños Gram (-) • Colonias de tamaño medio, marrón cremoso (agar sangre). 	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidad de crecimiento lenta/moderada. • Aerobia • Colonias de tamaño medio, beige , de bordes semitransparentes e irregulares. • Bacilos pequeños curvos Gram (-) • Creció en agar Nutritivo, Mueller Hinton y Agar sangre.

La forma de las colonias es una característica determinante e indispensable en las bacterias para poder iniciar con la identificación de forma correcta. Las características morfológicas más importantes de una colonia bacteriana aislada sobre un medio de cultivo sólido son [88]:

- Tamaño
- Morfología
- Superficie
- Consistencia
- Pigmentación
- Hemólisis
- Olor

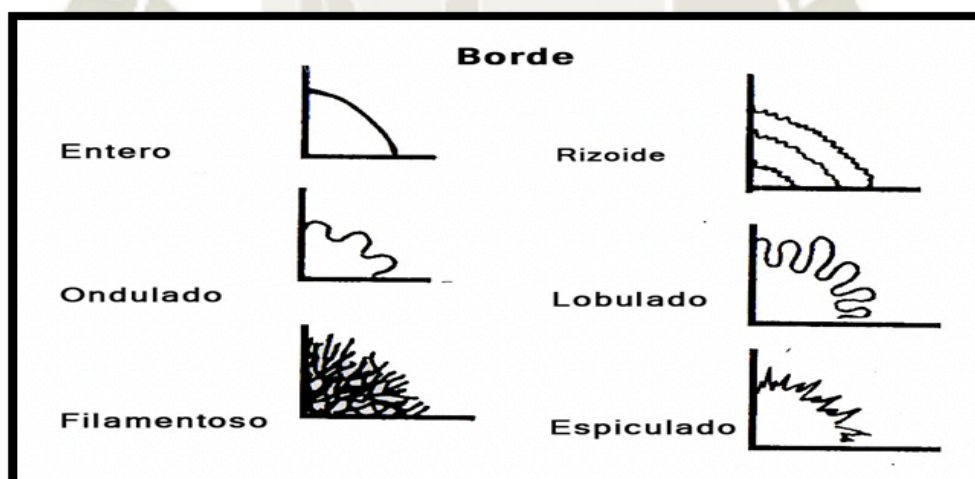


Figura 13. Borde de las colonias.

Las bacterias halladas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Bacillus*, fueron identificadas en primera instancia mediante la información proporcionada por la bibliografía. En el caso de los *Bacillus* algunas de las especies se determinaron únicamente por tinción Gram [89], cuyo aporte en la

confirmación fue importante. Para *Pseudomonas* [90], la temperatura inicial al momento del muestreo fue de 25°C, temperatura con la cual también se trabajó al momento de estabilizar las bacterias [91].

Sin embargo, nos muestran dos gráficas en las que el aumento hacia la temperatura máxima genera una reacción enzimática en su máximo potencial [128], **(Figura 14)**. Por la temperatura en la cual fueron encontradas las muestras, pudimos determinar que se trataba de un pull de bacterias mesófilas, que según ICMSF, 2000, son todas aquellas con la capacidad para desarrollarse en rangos de temperatura inferiores o superiores a los 30°C, normalmente entre los 15 y 40°C [129], **(Figura 15)**.

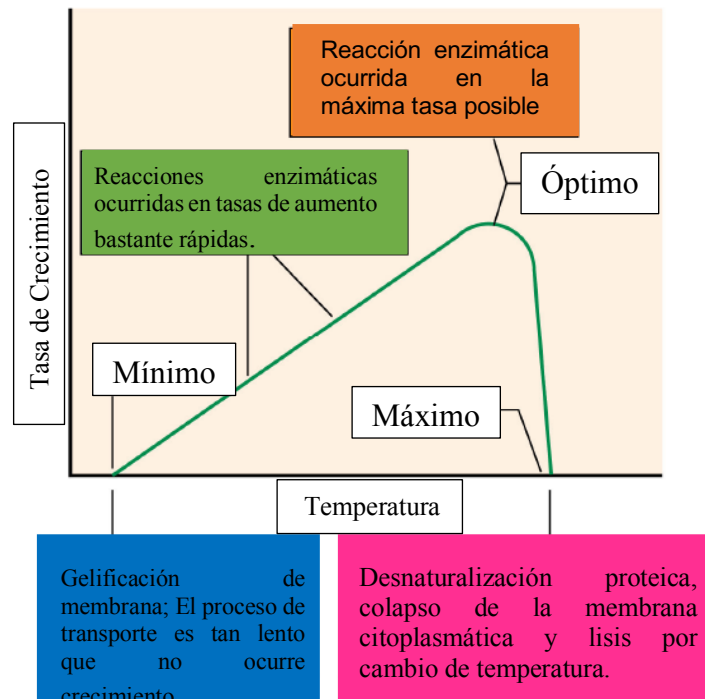


Figura 14. Optimización de reacción enzimática por variación de la temperatura [128].

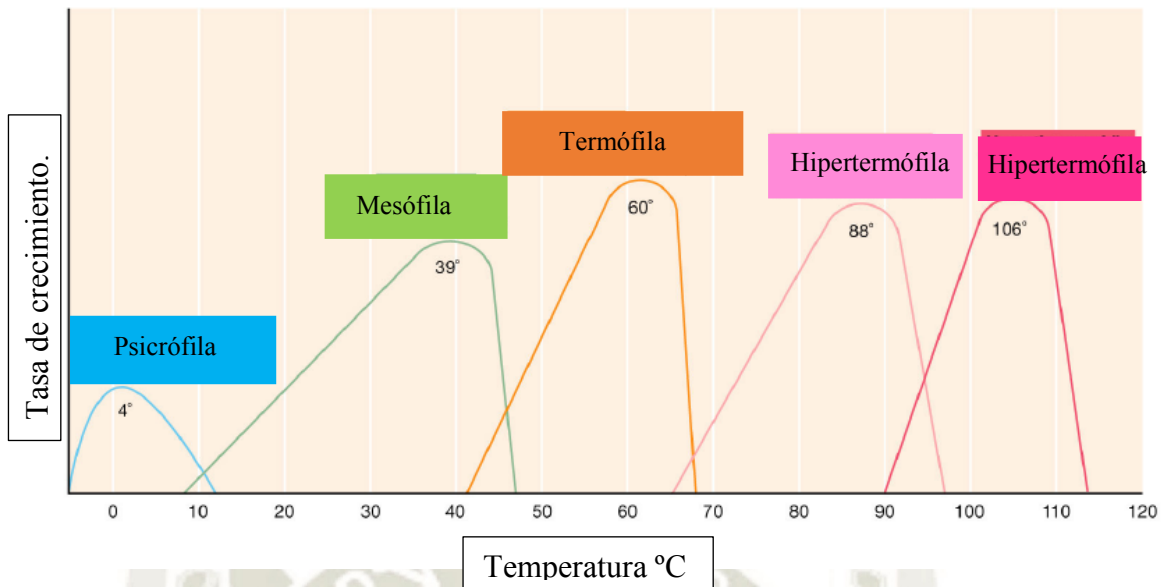


Figura 15. Comparación de la reacción enzimática según la naturaleza de los microorganismos [129].

Los cultivos realizados en agar, las pruebas bioquímicas como Oxidasa, TSI, urea y gelatina, son los protocolos establecidos por Labvetsur. Sin embargo, existen otros protocolos como los planteados [88], que constituye pruebas preliminares que se utilizan en la identificación y la inmediata lectura de catalasa y oxidasa, además, plantea que existen otras pruebas rápidas con resultados para lectura en un máximo de 6 horas, luego de realizado el test, tales como la β -galactosidasa, la ureasa y el indol, etc.

3.6 Pruebas Bioquímicas y tinción Gram

Todas las cepas obtenidas fueron sometidas a tinción Gram y a determinadas pruebas bioquímicas. Estas fueron realizadas en las instalaciones de Labvetsur (Anexo X) y los resultados se muestran en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Resultados de pruebas bioquímicas realizadas en Labvetsur.

Muestra	Nombre
M1	<i>Pseudomona flourescens</i>
M2	<i>Staphylococcus spp.</i>
M3	<i>Bacillus spp.</i>
M4	<i>Staphylococcus spp.</i>
M5	<i>Pseudomona flourescens</i>
M6	<i>Bacillus spp.</i>
M7	<i>Bacillus spp</i>
M8	<i>Pseudomona spp.</i>
M9	<i>Pseudomona aeruginosa</i>

Al tener 2 especies de *Pseudomonas*, varias de *Bacillus* y algunas de *Staphylococcus*, se formaron consorcios de trabajo, según los reportes bibliográficos sobre las especies, con referencia al trabajo y al material (PEAD), fundamento que sirvió también para ubicar las especies de *Pseudomonas* de forma individual en matraces diferenciados.

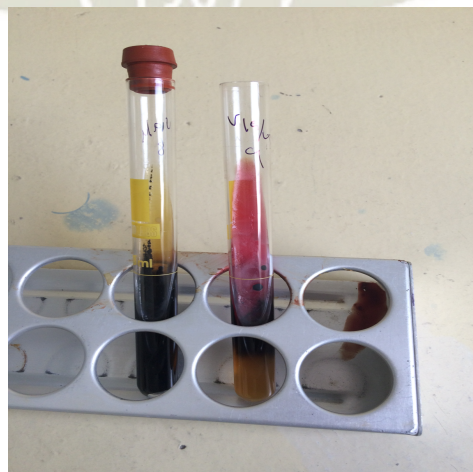


Figura 16. Fotografía de pruebas Bioquímicas realizadas en las instalaciones de Labvetsur Arequipa.

Cabe resaltar que existen innumerables sistemas y equipos multipruebas que nos proporcionan mayor rapidez, seguridad y eficacia en los resultados sobre algunas bacterias como los utilizados al realizar la identificación en los laboratorios de Labvetsur en Arequipa como muestra la **Figura 16**.

3.7 Crio conservación

Se trabajó con glicerol como medio de preservación por largos periodos de tiempo [93], recomienda la liofilización y crio conservación como métodos efectivos que aseguran la viabilidad, la pureza, tanto como la estabilidad fenotípica y genotípica de las cepas estudiadas. Para la congelación corresponde un método común y bastante simple, utilizado en su mayoría por la accesibilidad del mismo, capaz de detener la actividad metabólica y el crecimiento microbiano logrando reducir en un gran porcentaje variaciones en los cultivos, contaminación de los mismos y mutaciones. Pueden usarse las temperaturas de congelación de -20°C ó -40°C o bien la ultra congelación a -70°C ó -90°C [94].

Para la estabilización de microorganismo orientada a largos periodos de preservación, trabajo inicialmente con levaduras en una solución de Sacarosa al 10% logrando como plantea la preservación de las levaduras por un periodo de 8 años, pero como consecuencia tubo la disminución irreversible de su metabolismo [95].

Existen diversas formas de realizar una observación de microorganismos frente al microscopio, incluso se pueden observar vivos directamente bajo los aumentos ópticos. Sin embargo, casi siempre es necesario teñirlos utilizando colorantes para

facilitar su identificación y la morfología de ciertas estructuras que posiblemente compongan la muestra ^[96]. Se encontraron 2 tipos de bacilos Gram positivos rectos y curvados con un tamaño de 0.5- 1.0 x 1.5-5.0 μm ; ^[97], este tipo de microorganismos perteneciente al género de *Bacillus* o *Pseudomonas* dentro de sus principales características no presentan formación de esporas y son aerobias. Para el género *Bacillus* sp. Es un grupo de bacilos Gram positivos rectos con un tamaño de 0.5- 2.5 x 1.2-10 μm aerobios o anaerobios facultativos cuya prueba catalasa dio positivo ^[130], refiere gran cantidad de especies y áreas de ubicación de este microorganismo.

La identificación microscópica se realizó mediante la técnica de Tinción Gram diferencial. Este tipo de tinción es considerada como la básica y elemental para la valoración inicial de muestras para análisis bacteriológico y de identificación ^[98]. La tinción Gram realizada a las colonias con potencial para degradar PEAD nos dio como resultado tantas bacterias bacilos Gram negativos como cocos Gram positivos. Los resultados fueron corroborados ^[99].

Tabla 26. Establecimiento de consorcios bacterianos.

Matraz 1 (1P)	Matraz 2 (1C)
<i>Pseudomona flourescens</i>	<i>Pseudomona flourescens</i>
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Pseudomona aeruginosa.</i>
	<i>Bacillus</i> spp.
	<i>Staphylococcus</i> spp.
	<i>Bacillus</i> spp.

La asociación de especies se dio por afinidad, basada en los reportes bibliográficos encontrados, que señalan al género *Pseudomona* como degradador de polímeros como el PEAD, y al encontrar 2 sub-especies del mismo género, las agrupamos en consorcios (**Tabla 26**). Según bibliografía, estos consorcios tienen la capacidad de degradar diferentes compuestos y tener mayor resistencia a factores externos o ambientales con mucha mayor facilidad en grupo que de manera individual. Esto como una consecuencia de la cooperación que actúa como un mecanismo de protección frente a factores hostiles, agentes antimicrobianos, etc ^[100]. En resumen, forman una población con alta densidad de biomasa que hace las funciones de escudo permitiendo el crecimiento y desarrollo constante de la población.

Sin embargo, cuando la población bacteriana es mixta, es decir, que lo conforman bacterias que pertenecen a distintos géneros, es posible que en conjunto puedan realizar actividades o funciones que de manera individual será muy difícil o hasta imposible, ya que trabajan en equipo pero dividen sus funciones para potenciar el desarrollo en conjunto de los diferentes tipos de microorganismos. Pero cuando la cantidad de nutrientes en el medio empieza a escasear, empiezan a competir entre ellas y, debido a la diversidad de rutas metabólicas presentes, solo algunas pueden sobrevivir en la comunidad, convirtiendo a la minoría en una población importante ^[101], (**Figura 17**).



Figura 17. Fotografía de Inóculos en cultivos líquidos.

3.8 Estandarización de PEAD en caldo de cultivo BHI

La estandarización del PEAD se realizó con el fin de recopilar los datos necesarios para que una vez puesto en contacto con las cepas bacterianas, mediante técnicas gravimétricas o toma de pesos (**Tabla 27**) se pueda comprobar el consumo de polietileno de alta densidad luego de tomados los datos de este material sumergido en medio líquido y posteriormente desecado (**Tabla 28**).

Tabla 27. Pesos de papel filtro seco previo a ser sumergido en caldo BHI + PEAD

Pesos de Papel Filtro.	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Muestra 1	0.9867g	0.9835g	0.9975g	0.9688g
Muestra 2	0.9780g	0.9892g	0.9932g	0.9855g
Muestra 3	0.9934g	0.9847g	0.9890g	0.9976g
Muestra 4	0.9976g	0.9891g	0.9944g	0.9921g

Los papeles filtros recién obtenidos y pesados en la balanza analítica, arrojaban pesos bastante más elevados que los originales, evidentemente por la absorción

de líquido del papel, y manteniendo en incógnita el porcentaje de absorción del material.

Tabla 28. Pesos de papel filtro desecado con PEAD post sumergidos en caldo BHI estéril.

Peso PEAD + Papel Filtro	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Muestra 1	1.9977	1.9947	2.0093	1.9803
Muestra 2	1.9831	1.9950	1.9981	1.9971
Muestra 3	2.0056	1.9987	1.9994	2.0067
Muestra 4	1.9956	1.9998	2.0073	2.0086

Los resultados de las técnicas gravimétricas generaron datos comparativos entre el peso de los papeles filtro secos y los desecados bastante similares (**Tabla 29**), por lo que podemos entender que no es material con capacidad de absorción de líquidos o de humedad, por otro lado, esto nos ofrece la posibilidad de trabajar con el PEAD obteniendo datos con menos porcentaje de error.

Tabla 29. Diferencia de pesos, estandarización de peso de PEAD.

Diferencia de Pesos	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Promedio
1 semana	1.0093	1.0097	1.0083	1.0088	1.0090
2 semanas	1.0097	1.0092	1.0086	1.0087	1.0091
3 semanas	1.0096	1.0095	1.0088	1.0088	1.0092
4 semanas	1.0095	1.0093	1.0090	1.0084	1.0091

De la misma forma y con los mismos datos se elaboraron 2 figuras comparativas que corroboran los resultados obtenidos y organizados en las tablas previas. La

Figura 18, hace una comparación de los pesos a lo largo de las 4 semanas del proceso de contacto con el medio estéril y también de la toma de datos.

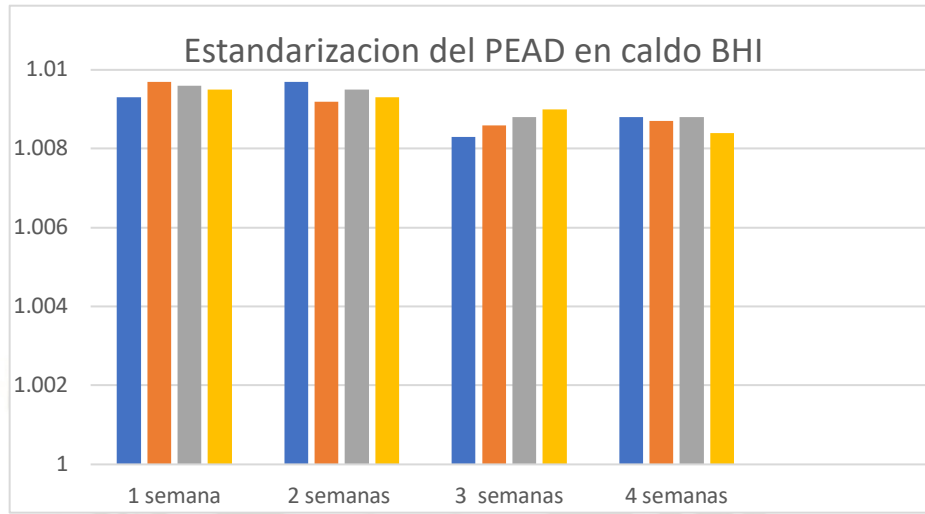


Figura 18. Pesos de papel filtro en contacto con caldo BHI.

Mientras que la **Figura 19** compara el promedio de cada semana para poder tener un dato más exacto de la variación total y global del peso de las micropartículas de PEAD en contacto con el calo BHI estéril.

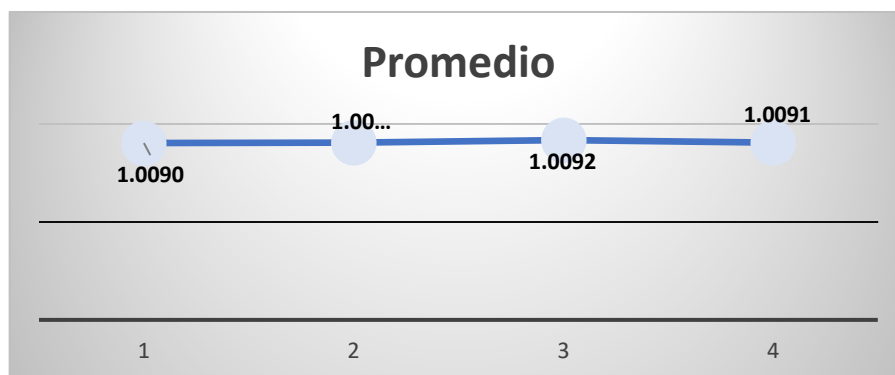


Figura 19. Promedio de pesos de papel filtro en contacto con caldo BHI.

Una parte importante del procedimiento, corresponde al tratamiento de PEAD previo al contacto con el medio a trabajar, trabajos de investigación relacionados como sugerían incineración del material para reducir el volumen aumentando la superficie de contacto [22]. Se reemplazó este procedimiento por molienda o trituración a partículas finas para no alterar la estructura ni propiedades del material **(Figura 20)**.

El polietileno está considerado como resina no higroscópica, es decir que tiene buena protección contra la humedad y el agua según la densidad utilizada [102]. La humedad que recogen se adsorbe sobre la superficie del granulado. En este tipo de resinas, la recolección típica de humedad se debe a la condensación [103], por lo que la técnica gravimétrica no se vio afectada luego del contacto con los inóculos líquidos.



Figura 20. Fotografía Molienda de PEAD en laboratorio.

3.9 Adaptación de las cepas al con PEAD

Las cepas encontradas en su medio natural, poco a poco se fueron adaptando a las condiciones de laboratorio. Pasaron de suero fisiológico a medio de cultivo sintético con PEAD, en períodos determinados de tiempo, la adaptabilidad no sólo la otorga la versatilidad de la cepa bacteriana, el ser mesófila permite trabajar en un rango amplio de temperatura y potenciar los resultados [104]. Sin embargo una alternativa novedosa basada en la identificación del mecanismo por el cual las bacterias logran adaptarse a los cambios ambientales [105]. Según este estudio las bacterias cuya pared celular es la primera en tener contacto con el nuevo entorno, produce D-aminoácidos un tipo de molécula que al ser liberada es capaz de modular la síntesis de peptidoglicanos que son el principal componente de esta.

Al ser el primer contacto, permite a la bacteria protegerse y comunicarse con su entorno, es por eso que la adaptación se llevó a cabo por fases, en períodos moderados de tiempo, La envoltura o pared celular de la bacteria 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, la bacteria detiene su crecimiento automáticamente. Por lo que una falta de comunicación y adaptación con el entorno por parte de la síntesis de peptidoglicanos pondría en riesgo la supervivencia de la cepa en general, según el investigador del CSIC Felipe Cava, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

Los microorganismos que biodegradan hidrocarburos de petróleo tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), incluyendo naftaleno, hidrocarburos aromáticos como tolueno, o hidrocarburos alifáticos como n-alcanos, son aislados del medioambiente, particularmente de sitios contaminados con petróleo. Algunas de las rutas metabólicas microbianas responsables de la degradación son las alk

(C6 a C12 n-alcanos), nah (naftaleno) y xyl (tolueno) han sido ampliamente caracterizadas; están generalmente relacionadas con plásmidos catabólicos encontrados en *Pseudomonas* spp., por ejemplo, los plásmidos OCT, NAH y TOL [106].

Las cadenas de alto peso molecular son muy difíciles de digerir para los microorganismos, esto debido a que por su longitud no son capaces de atravesar la membrana celular de los microorganismos, es por eso que durante el proceso de degradación primero se procede a despolimerizar o digerir este hasta su forma más simple, es decir, hasta sus monómeros, que posteriormente son mineralizados. El primer paso en el desglosamiento de las cadenas en monómeros se da por una variedad de fuerzas físicas y biológicas [107]. Fuerzas físicas como enfriamiento/calentamiento, congelación/descongelación y humidificación/secado, que pueden generar daño en el polímero y sus propiedades y como consecuencia su fractura en monómeros [108], y las fuerzas biológicas representadas únicamente por enzimas encargadas de cortar estas largas cadenas poliméricas, denominadas depolimerazas, que no son más que hidrolasas que realizan la degradación en dos simples pasos, el primero es la ya conocida unión enzima sustrato, para luego catalizar la ruptura hidrolítica. Esta reacción puede realizarse de manera extracelular e intracelular dependiendo del microorganismo. Cuando se realiza de manera intracelular, hablamos de la hidrólisis de un depósito de carbono endógeno acumulado por las mismas bacterias, mientras que la extracelular emplea una fuente de carbono exógeno no necesariamente acumulado por las mismas bacterias [109]. Durante la degradación las enzimas extracelulares de los microorganismos rompen los diversos polímeros complejos convirtiéndolos en

moléculas más pequeñas como: monómeros, dímeros, etc. Con el tamaño adecuado para atravesar la membrana semi-permeable de las bacterias.

Una vez dentro del microorganismo todas las reacciones que se llevan a cabo presentan enzimas. También los monómeros o moléculas pequeñas son mineralizados o degradados para convertirse en CO₂, H₂O O CH₄, que posteriormente serán utilizados como fuente de carbono y energía ^[110].

3.10 Evaluación y Recopilación de datos Gravimétricos

El procedimiento, fue pensado para 4 semanas de incubación, en donde los matraces en simultáneo facilitaron el muestreo de cada semana.

La primera y la segunda semana, los datos obtenidos de las pesadas de cada papel filtro mantenían valores elevados, mas al ser desecado regresaban casi en el 100% de los casos al peso original del PEAD solo y seco (**Tabla 30**).

Tabla 30. Peso de papel filtro seco por semana.

Pesos de Papel Filtro.	1P	1C	2P	2C	3P	3C	4P	4C	5P	5C
1 Semana	0.9217	0.9836	0.9486	0.9827	0.9132	0.9361	0.9375	0.9153	0.8664	0.9265
2 Semanas	0.9463	0.9738	0.9357	0.9926	0.9379	0.9371	0.9816	0.8863	0.9163	0.9306
3 Semanas	0.953	0.9716	0.9398	0.979	0.9454	0.9394	0.9825	0.8926	0.965	0.9332
4 semanas	0.9539	0.9692	0.9763	0.9592	0.9475	0.9621	0.935	0.9173	0.9403	0.9391

Los datos obtenidos de las pesadas, generaron pesos menores a los de ingreso, como se puede apreciar en la **Tabla 31**, la medición de pesos cae aproximadamente en 0.0010 g. Resultado que se mantuvo contante con el tiempo.

Tabla 31. Peso de papel filtro en contacto con consorcio bacteriano en caldo BHI.

Peso PEAD + P. Filtro	1P	1C	2P	2C	3P	3C	4P	4C	5P	5C
1										
Semana 1	1.9883	2.0827	2.0192	2.0443	1.9655	2.0032	1.9983	1.9396	1.9891	1.9503
Semana 2										
Semana 3	2.0089	2.066	1.9804	2.0537	1.9947	1.98	2.0401	1.9086	1.9571	1.9451
Semana 4										
Semana 5	2.0121	2.0428	1.9828	2.0366	1.9895	1.9753	1.9989	1.9089	1.9867	1.9453
Semana 6										
Semana 7	2.0075	2.035	2.0121	1.9938	1.9631	1.9975	1.9503	1.9304	1.9506	1.9406

Por otro lado la turbidez presentada semana a semana dejaba ver un incremento de la población bacteriana, llegando a su punto máximo al cabo de 4 semanas, como muestra la **Figura 21**, durante las 4 semanas de incubación de los matraces en el shaker en agitación constante.



Figura 21. Fotografía de registro del contacto del Grupo 2 con el medio sintético de PEAD.

Los datos de la **Tabla 32** fueron bastante concluyentes para determinar el consumo del polímero por las cepas con las que se le puso en contacto. En la tabla se puede observar la diferencia de pesos entre los datos de ingreso al sistema de incubación y los datos de salida, justo después del proceso de desecación.

Tabla 32. Consumo de PEAD en gramos.

	1 P	1 C	2 P	2 C	3 P	3 C	4P	4 C	5P	5C
Semana 1	1.0666	1.0991	1.0706	1.0616	1.0523	1.0671	1.0608	1.0243	1.1227	1.0238
Semana 2	1.0626	1.0922	1.0447	1.0611	1.0568	1.0429	1.0585	1.0223	1.0408	1.0145
Semana 3	1.0591	1.0712	1.043	1.0576	1.0441	1.0359	1.0164	1.0163	1.0217	1.0121
Semana 4	1.0536	1.0658	1.0358	1.0346	1.0156	1.0354	1.0153	1.0131	1.0103	1.0015
Cons. Neto	0.013	0.0333	0.0348	0.027	0.0367	0.0317	0.0455	0.0112	0.0524	0.0223

Entonces se pudo establecer una comparación entre los consumos reales de PEAD por semana para los 2 consorcios establecidos previamente, tanto los que corresponden únicamente al género *Pseudomona* como el consorcio mixto (**Tabla 33**).

Tabla 33. Comparación de consumo de ambos consorcios.

	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
Consumo Pseudomona	1.0536	1.0358	1.0156	1.0153	1.0103
Consumo Consorcio	1.0658	1.0346	1.0354	1.0131	1.0015

Lo cual ayudó también a representar la cinética bacteriana (**Figura 22**) que en ambos casos se mantiene ascendente en el tiempo, mientras que conforme este

avanza la cantidad de PEAD en gramos se reduce en el caso del consorcio de forma gradual y el caso de las Pseudomonas con un consumo acelerado al inicio y manteniéndose de la semana 3 en adelante.

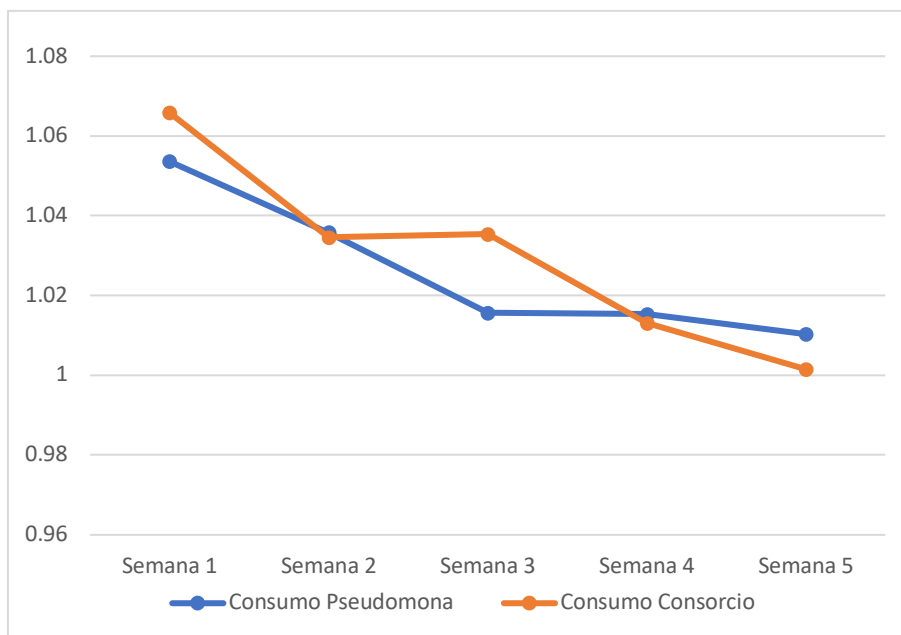


Figura 22. Comparativo de consorcios bacterianos en consumo de PEAD.

3.11 Metalización de la Muestra

El bombardeo con partículas de oro para un recubrimiento de grano fino (100Å) de la muestra (**Figura 23**), se realizó para poder tener la conductividad necesaria para poder ser observado bajo técnicas de microscopía electrónica.

Las muestras fueron analizadas con aumentos de 1.00 y 5.00 kx, obteniendo imágenes sobre la superficie del PEAD procesado. El procedimiento estuvo basado en los protocolos generales para este tipo de equipos, como respalda ^[111], obteniendo señales mediante la detección del procesamiento de las señales que resultaron del impacto de un haz de electrones con gran carga de energía. Esta interacción es la que nos permite visualizar la topografía y composición de la

estructura según los ejes XYZ en los que se le oriente en los 2 ejes de rotación. Para poder transmitir estas señales, las cámaras están equipadas con detectores especiales que permiten registrar las diferentes señales que emite la muestra.

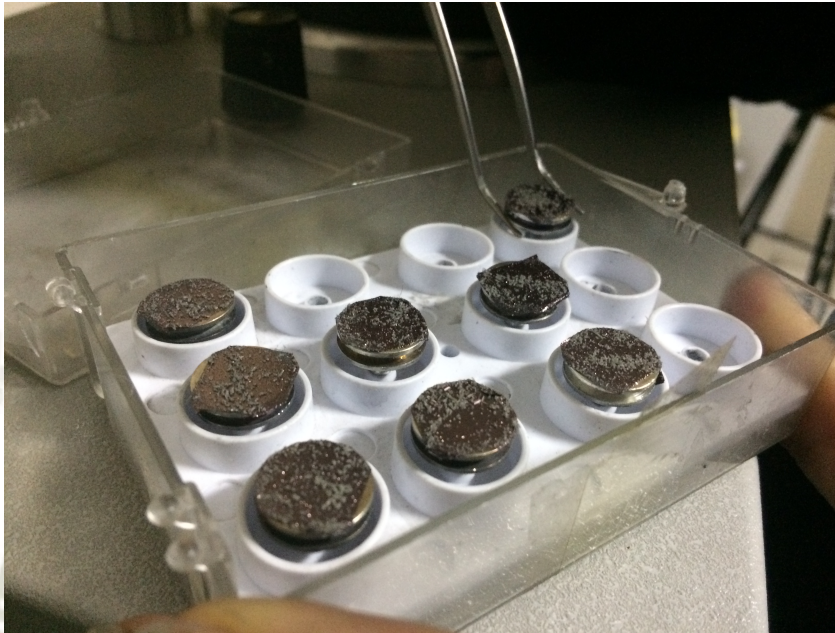


Figura 23. Fotografía de registro de metalización de las muestras – Laboratorio de Microscopía UNSA

3.12 Microscopía Electrónica de barrido

Las muestras fueron analizadas con aumentos de 1.00 y 5.00 kx, obteniendo imágenes sobre la superficie del PEAD procesado. El procedimiento estuvo basado en los protocolos generales para este tipo de equipos ^[111], obteniendo señales mediante la detección y procesamiento de las señales que resultaron del impacto en un haz de electrones con gran carga de energía, interacción que nos permite visualizar la topografía y composición de la estructura según los ejes XYZ en los que se le oriente en los 2 ejes de rotación. Para poder transmitir estas señales las cámaras están equipadas con detectores especiales que permiten registrar las

diferentes señales que emite la muestra, como se puede observar en las **Figuras 24 a la 29.**

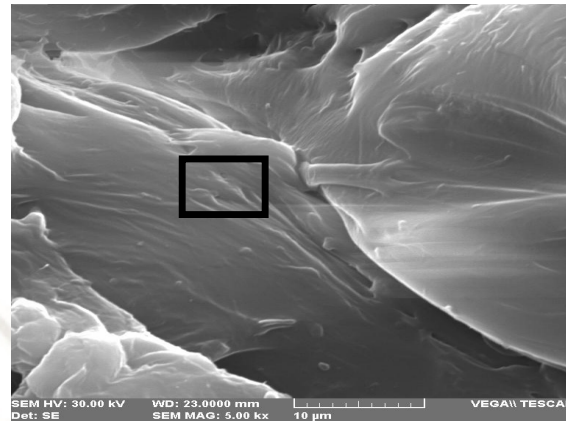


Figura 24. Fotografía de PEAD puro, como blanco comparativo.

La **Figura 24** muestra un microfragmento de PEAD puro, es decir que no fue puesto en contacto con los 2 consorcios bacterianos establecidos, presenta algunos pliegues por el mismo método de fraccionamiento a micro partículas. Esta muestra trabajó como blanco comparativo.

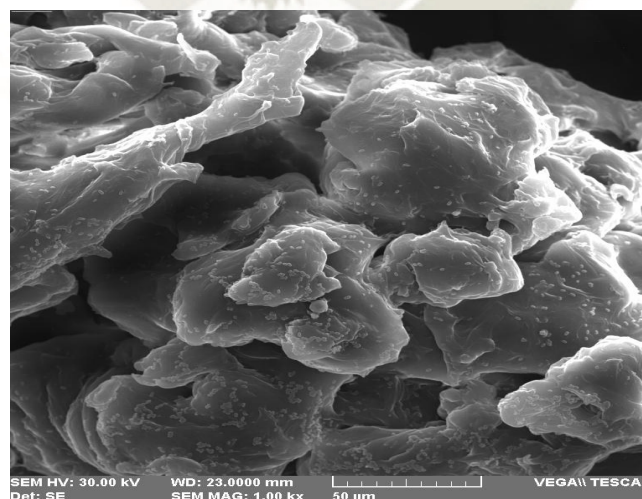


Figura 25. Fotografía de la 2da semana de contacto del consorcio mixto con el medio sintético enriquecido con PEAD

La muestra correspondiente a consorcio mixto, para la segunda semana de incubación del material con las cepas y a 1.00 kx (**Figura 25**) proporciona una imagen más global sobre el ataque bacteriano, al verlas adheridas a la superficie en aproximadamente el 90% del cuadrante total de la imagen captada.

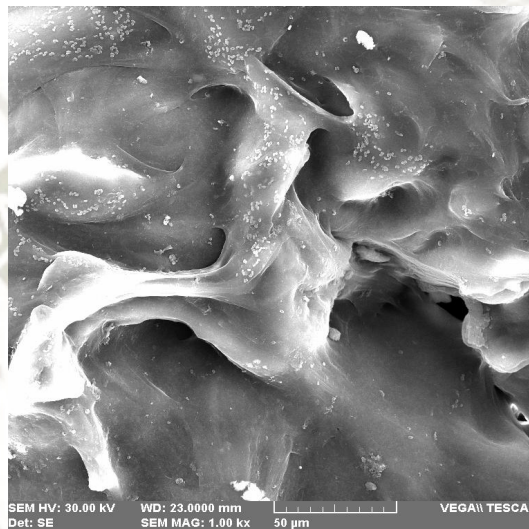


Figura 26. Fotografía de la 2da semana de contacto de las cepas de *Pseudomonas* con el medio sintético enriquecido con PEAD

Para este caso en específico el pull bacteriano aumento su acción sobre el PEAD de manera inicial, mas al igual que en la figura anterior, se sigue considerando despreciable al no mostrar disminución en los datos de peso correspondientes. No son visibles vestigios de corrosión más si cúmulos de bacterias distribuidos de forma aleatoria.

La muestra correspondiente a consorcio mixto, para la segunda semana de incubación del material con las cepas y a 1.00 kx (**Figura 26**) proporciona una imagen más global sobre el ataque bacteriano, al verlas adheridas a la superficie en aproximadamente el 90% del cuadrante total de la imagen captada. Para este

caso en específico el pull bacteriano aumento su acción sobre el PEAD de manera inicial, mas al igual que en la figura anterior, se sigue considerando despreciable al no mostrar disminución en los datos de peso correspondientes, ya que incluso en comparación con el consorcio de Pseudomonas, la cantidad de bacterias en superficie es menor. No son visibles vestigios de corrosión más si cúmulos de bacterias distribuidos de forma aleatoria.

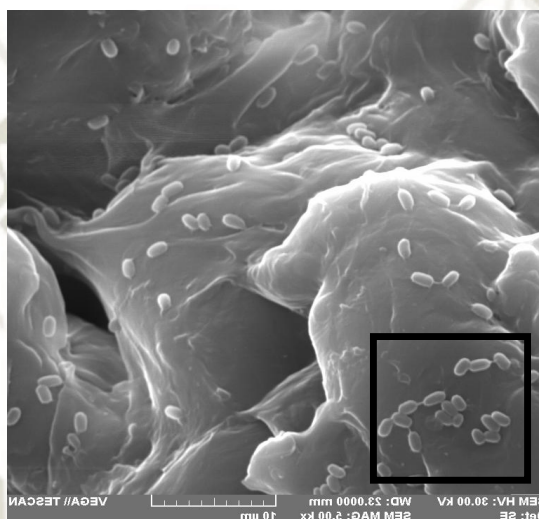


Figura 27. Fotografía de la 3ra semana de contacto de las cepas de Pseudomonas con el medio sintético enriquecido con PEAD

Las fotografía tomada con 5.00 kx corresponde a la tercera semana de incubación del material con las cepas y proporciona la imagen las bacterias adheridas a la superficie, mostradas en el recuadro negro de la **(Figura 27)** forman parte del biofilm formado por las Pseudomonas para la degradación de PEAD. El número de bacterias en superficie aumentó de forma exponencial mas se sigue considerando despreciable al no mostrar disminución en los datos de peso correspondientes. No son visibles vestigios de corrosión del material por la acción enzimática de las cepas.

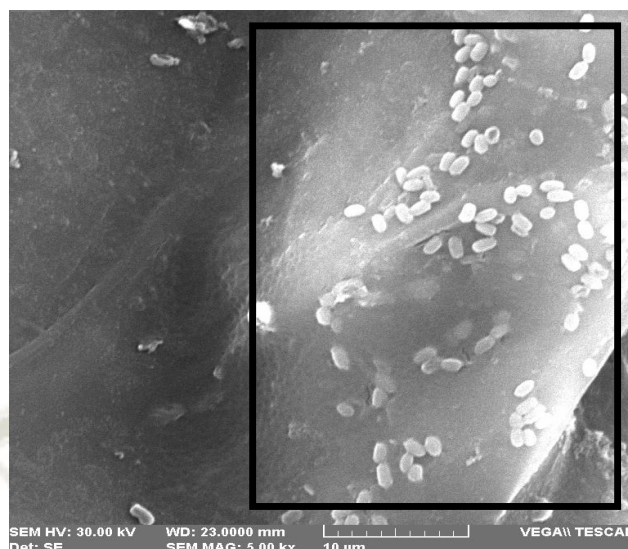


Figura 28. Fotografía de la 3ra semana de contacto de las cepas del consorcio mixto con el medio sintético enriquecido con PEAD.

Las fotografía tomada con 5.00 kx corresponde a la tercera semana de incubación del material con las cepas del consorcio mixto y proporciona la imagen las bacterias adheridas a la superficie, mostradas en el recuadro negro de la derecha (**Figura 28**). Se conserva la forma de biofilm bacteriano, conformado en este caso únicamente por las Pseudomonas. El número de bacterias en superficie aumentó de forma exponencial más se sigue considerando despreciable al no mostrar disminución en los datos de peso correspondientes. No son visibles vestigios de corrosión del material por la acción enzimática de las cepas.

Las fotografía tomada con 5.00 kx corresponde a la última semana de incubación del material con las cepas y proporciona una imagen clara del PEAD corroído, y de gran cantidad de bacterias aglutinadas alrededor de la zona de mayor impacto en el cuadrante enfocado (**Figura 29**).

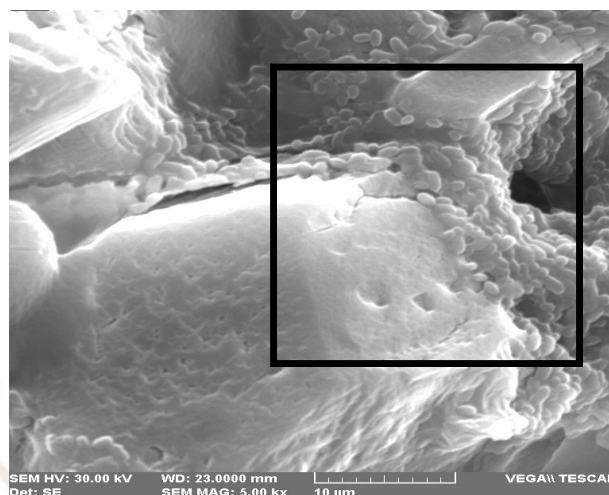


Figura 29. Fotografía de la 4ta semana de contacto de las cepas de *Pseudomonas* con el medio sintético enriquecido con PEAD

Se perdió en el gran del biofilm de bacterias y de forma proporcional los datos de peso pasaron a ser directamente proporcionales con la disminución en gramos de PEAD microparticulado.

3.13 Análisis genético: 16 S rRNA

Se realizaron 2 procedimientos de Análisis genético, con diferentes muestras.

La primera únicamente con *Pseudomonas* (**Anexo 1**) y la segunda con 5 cepas de interés que no fueron completamente identificadas bioquímicamente, cuyos resultados fueron los siguientes (**Tabla 34**):

Tabla 34. Especies identificadas genéticamente.

Género	Sub- especie
<i>Bacillus</i>	<i>humi</i>
<i>Bacillus</i>	<i>sinesaloumensis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>tequilensis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>amylliquefaciens</i>

Los resultados mostraron 5 especies nuevas de bacillus (**Anexo 4 y 5**). Sin embargo, las pruebas bioquímicas realizadas, fueron insuficientes para determinar la sub especie de algunas cepas bacterianas presentes en el consorcio por lo cual la alternativa con respuestas definitivas es la del análisis molecular. Esto debido a que una misma cepa es capaz de generar distintos resultados en el mismo ensayo repetido ^[112]. Por consecuencia, limitaciones en la base de datos de los mismos microorganismos. Por eso se plantea que los estudios genéticos son la mejor opción para obtener resultados fiables. En estos procedimientos han sido utilizados muchos genes como dianas moleculares que en síntesis constituyen las bases del análisis del 16 S rRNA, que representa según Gürtler el marcador inicial y en la mayoría de los casos el único necesario para realizar una identificación precisa ^[113].

El secuenciamiento de nueva generación (*Next Generation Sequencing*, NGS), el cual permite el secuenciamiento en paralelo de genomas enteros o genes particulares (marcador/marcadores) para todas las especies albergadas en la muestra (metagenómica), es uno de los métodos más avanzados en la identificación taxonómica de orden molecular y la determinación de abundancias relativas de estas unidades dentro de la muestra examinada ^[131].

Actualmente, la identificación por este método comprende el secuenciamiento masivo y en paralelo de fragmentos de PCR del gen 16S de una o varias muestras de comunidades bacterianas, permitiendo dar cobertura total a las unidades taxonómicas que allí existan sin importar su grado de abundancia.

Este método, a diferencia del anterior, no requiere pasos de clonación o crecimiento de bacterias recombinantes, sino el uso directo de la PCR en el secuenciamiento, el cual incluye métodos internos de separación de fragmentos clonales y su

secuenciamiento en paralelo para cada una de las especies o unidades taxonómicas que se encuentren representadas en la PCR por su gen 16S.

Dentro de las principales aplicaciones de la metagenómica de 16S rRNA, el estudio de composición de microbiotas ha tenido gran relevancia en áreas como las microbiotas intestinales ^[132], bucales ^[133], de piel y suelo ^[134], entre otros, los cuales han permitido aportar nueva información, antes desconocida para la ciencia, en relación a la composición taxonómica de comunidades bacterianas ancestrales vivientes y no vivientes, de restos fósiles del ambiente y de museo, de personas con patologías y sin patologías o con hábitos alimenticios y estilos de vida contrarios.

Finalmente, es posible concluir que los métodos moleculares de identificación en la era genómica incrementa sosteniblemente su uso en microbiología.

Macrogen retorna como feedback los resultados gráficos (**Anexo 2, 3 y 4**) y data para posteriores análisis, que fue utilizada para realizar un análisis filogenético, corroborar las especies y la relación entre las mismas.

Las secuencias entregadas en formato .fasta fueron analizadas en el programa MEGA PRO 5.10 en el que las secuencias en formato .fasta fueron analizadas mediante la herramienta BLAST del NCBI para compararla en línea con diferentes secuencias similares en línea y hallar el porcentaje de similitud más alto para determinar la especie.

En el mismo programa se realizó el alineamiento de las secuencias por ClustalW (**Figura 30**).

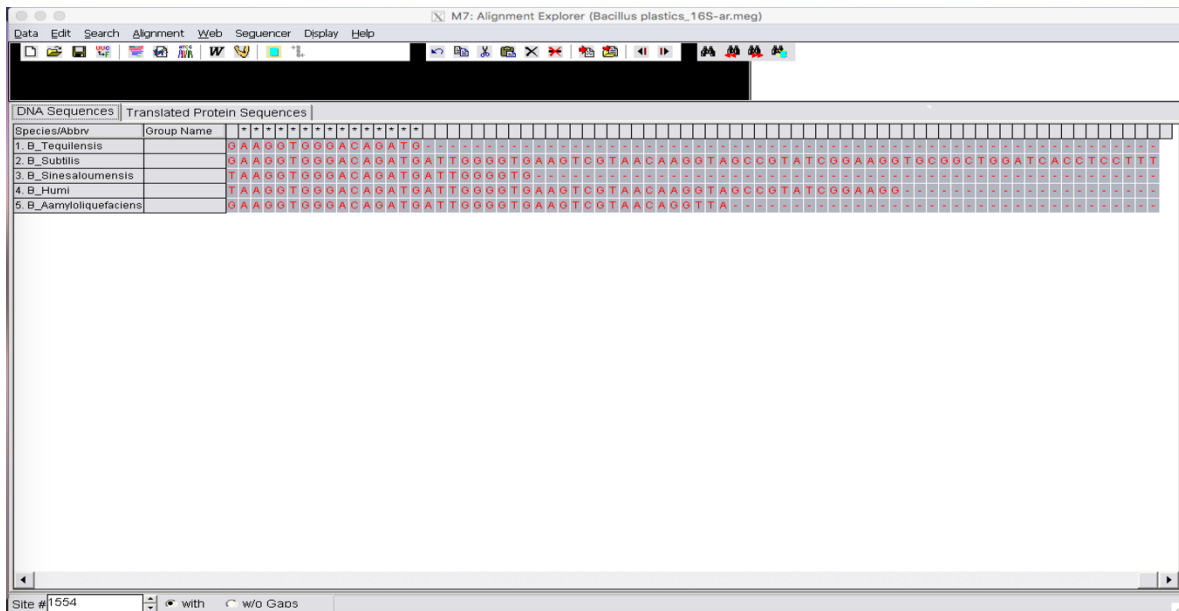


Figura 30. Fotografía del procedimiento de selección de las secuencias para iniciar en alineamiento por ClustalW.

Los resultados del alineamiento sirven como base para la construcción de un árbol filogenético de máxima asociación de parentescos entre las secuencias seleccionadas. El resultado se muestra en la Figura 31.

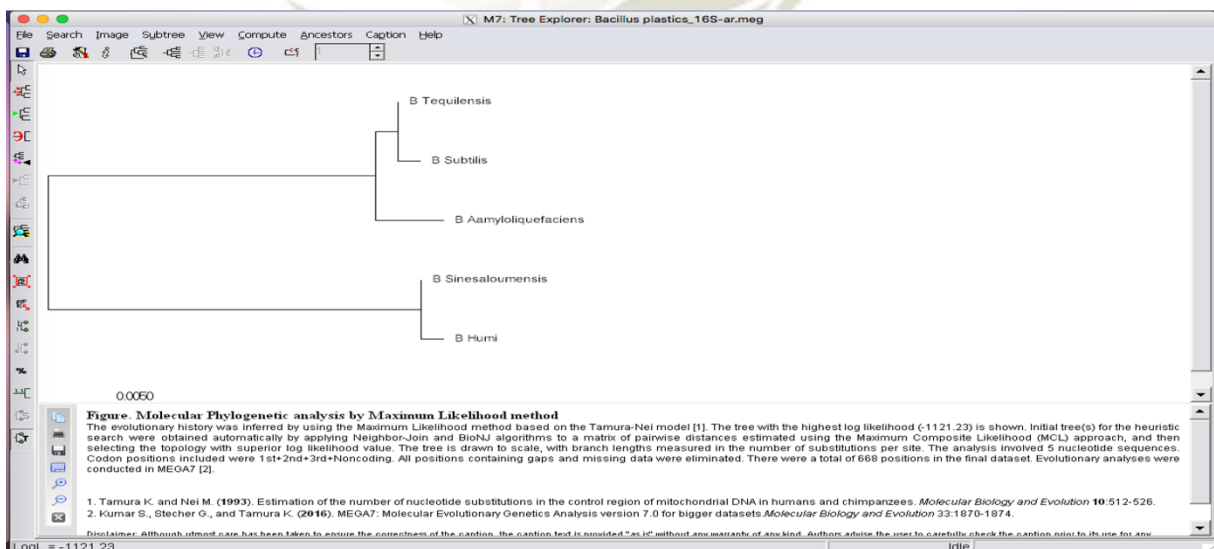


Figura 31. Fotografía del procedimiento de construcción del árbol filogenético de las bacterias muestra en el programa MEGA PRO 5.10

En cuanto a la filogenética de las 5 especies comparadas con otras halladas en la bibliografía, encontramos los siguientes datos que corroboran lo ejecutado con las secuencias para la construcción del árbol filogenético. Se observa que *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* conservan relación (**Figura 31**).

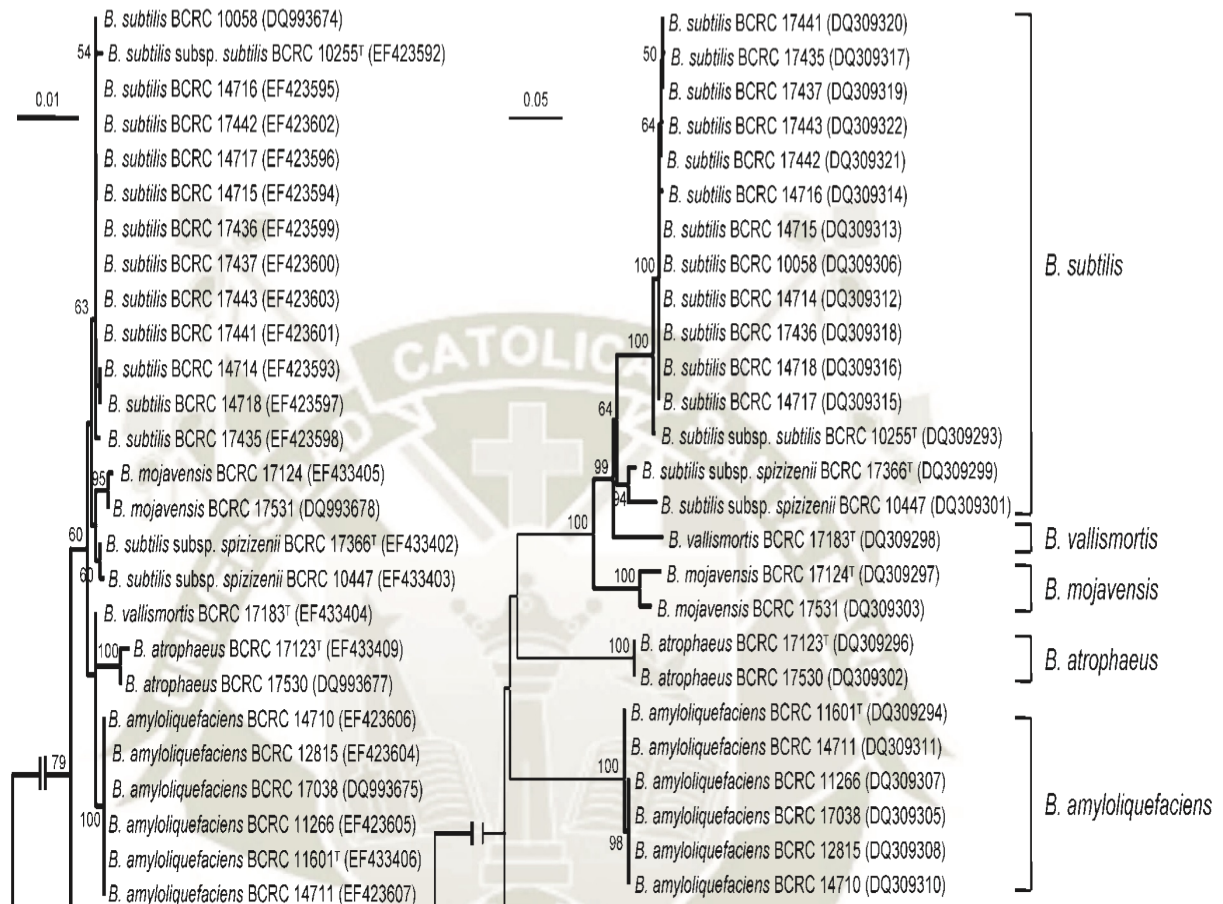


Figura 32. Árboles Filogenéticos sobre 32 especies de *Bacillus* basadas en el análisis 16 S rRNA(a) *gyrB* (b) secuencias genéticas.

Estos árboles filogenéticos fueron construidos con el método “neighbour-joining method”. Las distancias genéticas fueron medidas y parametradas mediante el Sistema de parámetros “Kimura’s two-parameter model”. *E. coli* K-12 fue incluida.

Sólo porcentajes sobre el 505 fueron mostrados (basados en 1000 replicaciones) Bars, 0.01 (a) ó 0.05 (b) sustituciones por posiciones nucleotídicas. De la misma manera *B. sinesaloumensys* y *B. humi* también se encuentran emparentados (**Figura 32**).

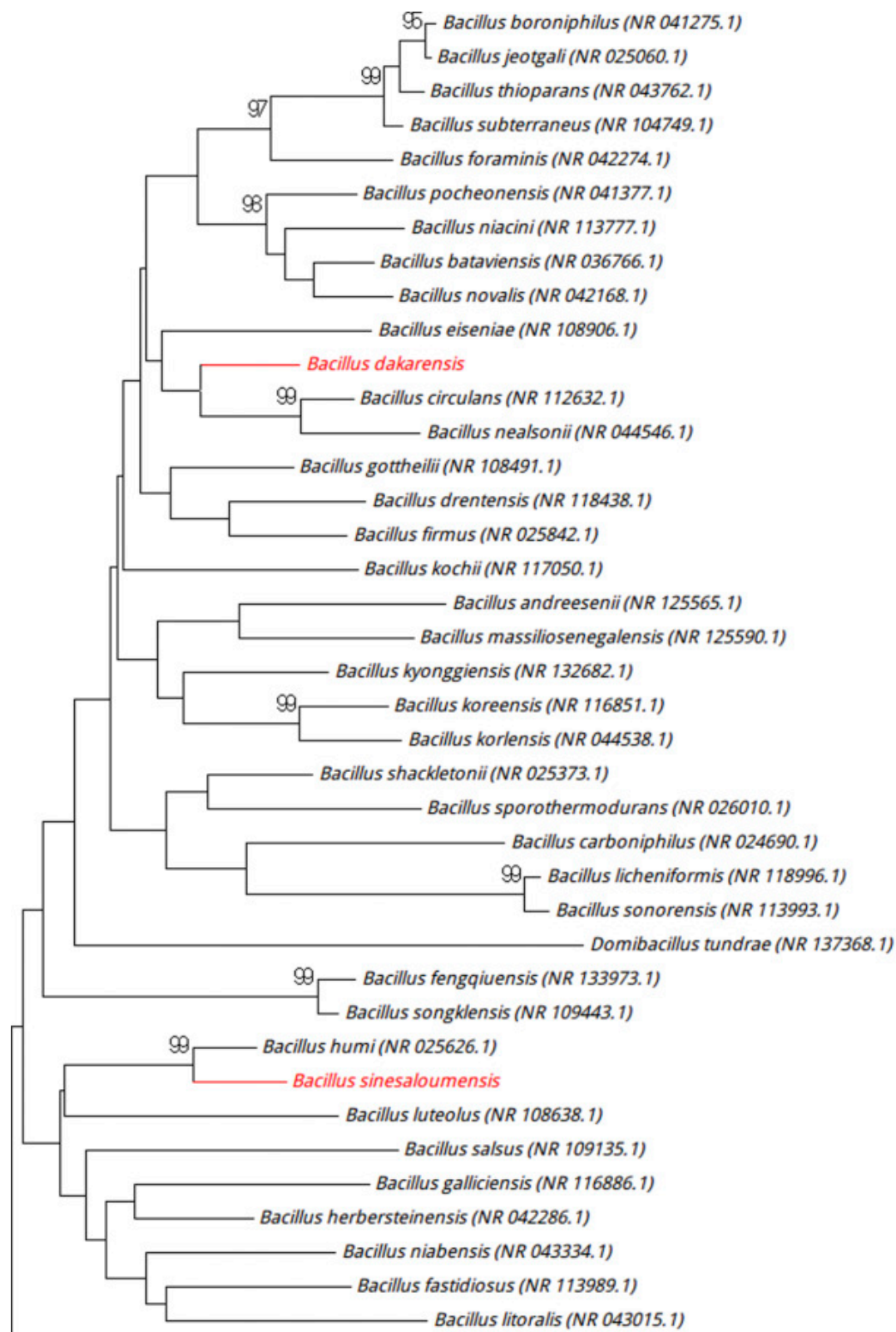


Figura 33. Árbol Filogenético para la sub especie *Bacillus dakarensis*'Marseille-P3515^T y '*Bacillus sinesaloumensis*' Marseille-P3516^T en comparación con otros miembros de la misma familia filogenética.

Los secuenciamientos fueron alineados utilizando CLUSTALW, y la inferencias genéticas fueron obtenidas utilizando el sistema “Maximum-likelihood method” con el soporte del software MEGA.

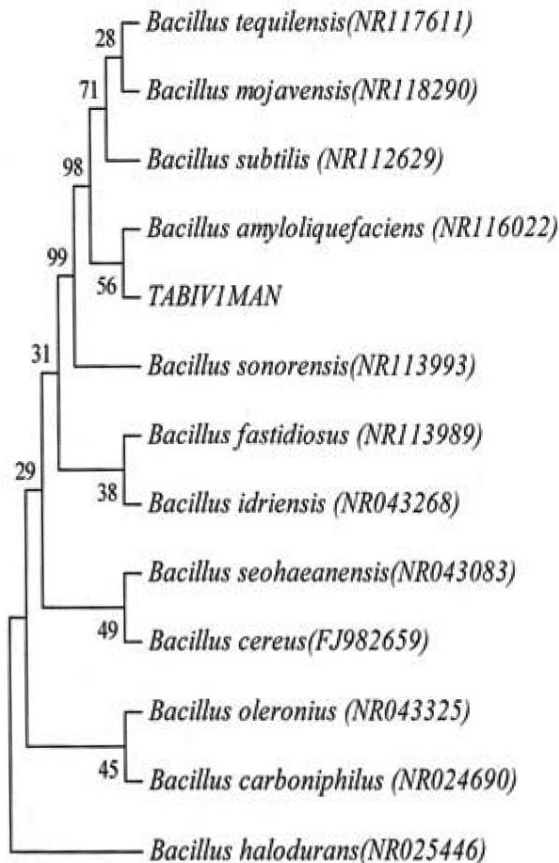


Figura 34. Árbol Filogenético “Neighbor-joining tree” basado en 16S rRNA (1600) secuencias.

Las **Figuras 33 y 34** muestran la relación entre bacterias desconocidas y aisladas y otras directamente relacionadas con el género *Bacillus*.

4. CONCLUSIONES

1. Se hallaron de muestras de rafia en proceso de degradación y proveniente de esta muestra se secuenció molecularmente bacterias del tipo *Pseudomonas Aeruginosa* y *P. Fluorescens* y *Bacillus Humi*, *B. Amyloliq uefaciens*, *B. Subtilis*, *B. Sinesaloumensys* y *B. Tequilensis*, con alta capacidad de remoción y degradación biológica de Polietileno de Alta Densidad (PEAD) micro-suspendidos en cuerpos acuosos contaminados.
2. Se seleccionó y caracterizó bioquímicamente y molecularmente *Pseudomonas Aeruginosa* y *P. Fluorescens* y *Bacillus Humi*, *B. Amyloliq uefaciens*, *B. Subtilis*, *B. Sinesaloumensys* y *B. Tequilensis*, cepas microbianas nativas con capacidad de degradación de PEAD's.
3. Se logró adaptar y re-direccionar el metabolismo de cepas puras de tipo *Pseudomonas Aeruginosa* y *P. Fluorescens* y *Bacillus Humi*, *B. Amyloliq uefaciens*, *B. Subtilis*, *B. Sinesaloumensys* y *B. Tequilensis*, conformando consorcios bacterianos sometidos a la presencia de PEAD comercial en medio sumergido.
4. Se pudo evaluar y morfológicamente y mediante técnicas de microscopia electrónica el ataque y degradación biológica del PEAD comercial por cepas puras de *Pseudomonas Aeruginosa* y *P. Fluorescens* y *Bacillus Humi*, *B. Amyloliq uefaciens*, *B. Subtilis*, *B. Sinesaloumensys* y *B. Tequilensis* en los consorcios establecidos.

5. RECOMENDACIONES

1. Determinar los métodos instrumentales de análisis para demostrar la remoción del PEAD.
2. Definir la aproximación a las bases filogenéticas de las cepas nuevas encontradas, de acuerdo a los bancos de datos bioinformáticos.
3. Aplicar en forma individual o en consorcio las cepas bacterianas aisladas e identificadas molecularmente en tecnologías eficientes para la remoción de microplásticos base PEAD en cuerpos acuosos.
4. Aplicar un análisis de costos para definir procesos de ingeniería para la descontaminación de estos contaminantes emergentes en la actualidad.



6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Cusa, Juan. Montilla Córdoba, 1997. Pag.12
- [2] William D. Callister Cuarta edición. Ed. Prentice Hall 1998
- [3] Ciencia UANL. Vol. 2. Abril 2003, Callister, W.D. Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales. Barcelona. Editorial Reverté, S.A. 113p
- [4] Premraj y Doble 2005; Leja y Lewandowicz 2010; Das y Kumar 2014
- [5] Orhan y Buyukgungor 2000; Nayak y Tiwari 2011; Baruah 2011; Kaseem et al., 2012
- [6] Sivan et al. 2011 New perspectives in plastic biodegradation. *Curr Opin Biotechnol* 22(3):422–426.
- [7] Leja, K., & Lewandowicz, G. 2010. Polymer biodegradation and biodegradable polymers—a review. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19 (2): 255-266.
- [8] Orhan et al., 2004
- [9] Tiwari D.C., Ejaz Ahmad, Kumar Singh K.K. *International Journal of Chemical Research*, ISSN: 0975-3699, Volume 1, Issue 2, 2009, pp-31-36
- [10] Gu JD. 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: Recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52: 69–91.
- [11] Glass JE, Swift G. *Agricultural and Synthetic Polymers, Biodegradation and Utilization*, ACS Symposium Series, 433. Washington DC: American Chemical Society; 1989. p. 9–64.
- [12] Artham T, Doble M. *Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Polycarbonates. Macromol Biosci* 2008;8(1):14–24 January.
- [13] Roy P.K., Titus S., Surekha P., Tulsi E., Deshmukh C., and Rajagopal C. (2008) Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polym Degrad Stab* 93: 1917–1922.
- [14] M. Sudhakar, M. Doble, P.S. Murthy, R. Venkatesan Marine microbe-mediated biodegradation of low-and high-density polyethylenes *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61 (2008), pp. 203-213
- [15] Balasubramanian, N., Bernard Black, and Vikramaditya S. Khanna (2009), “Firm Level Corporate Governance in India”, working paper, at <http://ssrn.com/abstract=992529>.

[16] Santo M., Weitsman R., and Sivan A. (2013) The role of the copper-binding enzyme - laccase - in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *Int Biodeterior Biodegradation* 84: 204–210.

[17] Fontanella S., Bonhomme S., Koutny M., Husarova L., Brusson J.-M., Courdavault J.-P., et al (2010) Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. *Polym Degrad Stabil* 95: 1011–1021.

[18] Albertsson AC, Barenstedt C, Karlsson S, Lindberg T. Degradation product pattern and morphology changes as means to differentiate abiotically and biotically aged degradable polyethylene. *Polymer* 1995; 36, 3075-3083.

[19] Corti A, Muniyasamy S, Vitali M, Imam SH, Chiellini E. Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects of sunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. *Polymer Degradation and Stability* 2010; 95, 1106-1114.

[20] Ojeda TFM, Dalmolin E, Forte MMC, Jacques RJS, Bento FM, Camargo FAO. Abiotic and biotic degradation of oxo-biodegradable polyethylenes. *Polymer Degradation and Stability* 2009; 94, 965-970.

[21] Zahra S, Abbas SS, Mahsa M-T, Mohsen N. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *36 Waste Management* 2010; 30, 396-401.

[22] Biosprospección de la degradación de polietileno, Karen F. Martin C, Bogotá D.C, 2012

[23] *ICPE* 2006;4(4); 1-12

[24] Jacoby GA (1986) Resistance plasmids of *Pseudomonas*. In: So- katch JR (Ed) *The Bacteria. A Treatise on Structure and Function. Volume X. The Biology of Pseudomonas* (pp 265- 293) Academic Press Inc., Orlando.

[25] Palleroni NJ & Doudoroff M (1971) Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* 107:690-696.

[26] Saylor GS, Hooper SW, Layton AC & King JMH (1990) Catabolic plasmids of environmental and ecological significance (Mini Review). *Microb. Ecol.* 19:1-20.

[27] Whyte, L.G., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonnière, L., Inniss, W.E. and Greer, C.W. (1998) Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2578±2584.

[28] Konduri MKR., Koteswarareddy G., Kumar DBR., Reddy BV., and Narasu ML., (2011), Effect of Pro-Oxidants on Biodegradation of Polyethylene (LDPE) by

Indigenous Fungal Isolate, *Aspergillus oryzae*, Journal of Applied Polymer Science, 120,pp 3536-3545.

[29] Usha, R., Sangeetha, T., Palaniswamy, M. 2011. Screening of Polyethylene Degrading Microorganisms from Garbage Soil. Libyan Agric Res Center J Internati 2 (4): 200-204

[30] Swapnil K. Kale, Amit G. Deshmukh*, Mahendra S. Dudhare, Vikram B. Patil Microbial degradation of plastic: a review, Journal of Biochemical Technology, 2015.

[31] Seneviratne G, Tennkoon N S, Weerasekara M L M A W & Nandasena K A (2006) Polythene biodegradation by a developed *Penicillium*- *Bacillus* biofilm. Curr Sci 90: 20-21

[32] Andersson T, Wesslen B, Sandstrom J (2002) J App Polym Sci 86:1580-1586.

[33] Sivan A, Szanto M, Pavlov V (2006) Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. Appl Microbiol Biotechnol 72:346–352 doi 10.1007/s00253-005- 0259.

[34] Bonhomme S, Cuer A, Delort A-M, Lemaire J, Sancelme M, Scott G (2003) Environmental biodegradation of polyethylene. Polym Degrade Stab 81:441-452.

[35] Nishida H, Tokiwa Y. Distribution of poly(β -hydroxybutyrate) and poly(ϵ -caprolactone) aerobic degrading microorganisms in different environments. J Environ Polym Degrad. 1993;1:227–233.

[36] Suyama T, Hosoya H, Tokiwa Y. Bacterial isolates degrading aliphatic polycarbonates. FEMS Microbiol Lett. 1998;161:255–261.

[37] Mergaert J, Swings J. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. J Ind Microbiol. 1996;17:463–469.

[38] Suyama, T., T. Shigematsu, S. Takaichi, Y. Nodasaka, S. Fujikawa, H. Hosoya, Y. Tokiwa, T. Kanagawa, and S. Hanada. *Roseateles depolymerans* gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll a-containing obligate aerobe belonging to the β subclass of the Proteobacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., in press.

[39] Pranamuda H, Tokiwa Y, Tanaka H. Microbial degradation of an aliphatic polyester with a high melting point, poly(tetramethylene succinate) Appl Environ Microbiol. 1995;61:1828–1832.

[40] Tokiwa Y, Suzuki T. Degradation of poly(ethylene glycol) adipate by a fungus. J. Ferm. Technol. 1974;52:393–398.

[41] Tokiwa Y, Suzuki T. Purification of polyethylene adipate-degrading enzyme produced by *Penicillium* sp. strain 14–3. Agric. Biol. Chem. 1977a;41:265–274.

[42] Tokiwa, Y; Suzuki, Nature 1977b, Hidrolisis of polyesters by lipases, Nature, 270, 76-78.

- [43] www.noaa.gov; Thompson et al., 2004; Frías et al., 2010
- [44] Gregory, 1983; Khordagui y Abuhilal, 1994; Barnes, 2002
- [45] Brown, M.A., et al., 2011 Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks.
- [46] Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment.
- [47] CBD y STAP/FMAM 2012. Impacts of marine Debris on biodiversity Current Status and Potential Solutions
- [48] Gall SC, Universidad de Plymouth. Mar Pollut Bull. 2015 Mar 15;92(1-2):170-179. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.12.041. Epub 2015 Feb 10. The impact of debris on marine life.
- [49] CBD y STAP/FMAM 2012. Impacts of marine Debris on biodiversity. Current Status and Potential Solutions
- [50] Fossi, M.C., Panti, C., Guerranti, C., Coppola, D., Giannetti, M., Marsili, L., Minutoli, R., 2012. Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the Mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). Mar. Pollut. Bull. 64, 2374e2379.
- [51] Tokiwa Y, Ando T, Suzuki T. Degradation of polycaprolactone by a fungus. J. Ferm. Technol. 1976;54:603–608.
- [52] Tokiwa Y, Suzuki T. Hydrolysis of polyesters by *Rhizopus delemar* lipase. Agric. Biol. Chem. 1978;42:1071–1072.
- [53] Iwata, T; Doi, Y. 1998, 31, 2461–2467; Tsuji, H; Miyauchi, Morphology and enzyme degradation of poly(L-lactic acid) single crystals macromolecules S. 2001, 71, 415–424
- [54] Perrez et al, 2013; Escobedo ,2015
- [55] The Dow Chemical Company, Annual Reports 2008.
- [56] Teuten E. L., et al. 2009 Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. Phil. Trans. R. Soc. B 364, 2027–2045
- [57] Talsness C. E., Andrade A. J. M., Kuriyama S. N., Taylor J. A., vom Saal F. S. 2009 Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. Phil. Trans. R. Soc. B 364, 2079–2096
- [58] Bauer y Herrmann, Estimation of the environmental contamination by phthalic acid esters leaching from household wastes, 1997.

- [59] Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B., Melzer, D., 2008. Association of urinary Bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Journal of the American Medical Association* 300, 1303–1310.
- [60] Meeker J. D., Sathyanarayana S., Swan S. H. 2009 Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364, 2097–2113
- [61] Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P., Peck, B.B., 1972. Polystyrene spherules in coastal waters. *Science* 178, 749–750.
- [62] Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerk, K., Janssen, C.R., 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2199–2204.
- [63] Joseph G. Jacangelo; Montgomery Watson Herndon; Virginia Chris A. Buckley 1996
- [64] Moreno G. y Buitrón G. (1998) Influence of So/Xo ratio and medium composition on anaerobic biodegradability test, 52th Industrial Waste Conference, Purdue University, Section 4, chapter 14, 125- 133, Ed. Ann Arbor Press, Chelsea Michigan ISBN 1-57504-098-0, ISSN 0073-7682.
- [65] Ogonowski et al. (2016) Ogonowski M, Schür C, Å Jarsén, Gorokhova E. The effects of natural and anthropogenic microparticles on individual fitness in *Daphnia magna*. *PLOS ONE*. 2016;11:e0155063 doi: 10.1371/journal.pone.0155063.
- [66] von Moos N, Burkhardt-Holm P, Köhler A 2012, 46:11327–11335; Sussarellu R, Suquet M, Thomas Y, Lambert C, Fabioux C, Pernet MEJ, Goïc NL, Quillien V, Mingant C, Epelboin Y, et al 2016, 113:2430–2435) y larvas de peces (Mazurais D, Ernande B, Quazuguel P, Severe A, Huelvan C, Madec L, Mouchel O, Soudant P, Robbens J, Huvet A, et al. 2015, 112(Part A):78–85; Jovanovic B 2017, 13:510–515
- [67] Lenz R, Enders K, Nielsen TG 2016, 113: E4121 – E4122; Wilber DH, Clarke DG 2001, 21:855 – 875 Best MA, Thorpe JP 1983, 77:85–92
- [68] Cole M, Lindeque P, Fileman E, Halsband C, Galloway TS 2015, 49:1130–1137; Au SY, Bruce TF, Bridges WC, Klaine SJ 2015, 34:2564–2572; Mazurais D, Ernande B, Quazuguel P, Severe A, Huelvan C, Madec L, Mouchel O, Soudant P, Robbens J, Huvet A, et al, 2015, 112(Part A):78–85; Kaposi KL, Mos B, Kelaher BP, Dworjanyn SA 2013, <https://doi.org/10.1021/es404295e>
- [69] von Moos N, Burkhardt-Holm P, Köhler A 2012, 46:11327–11335; Browne MA, Dissanayake A, Galloway TS, Lowe DM, Thompson RCI 2008, 42:5026–5031; Paul-Pont I, Lacroix C, González Fernández C, Hégaret H, Lambert C, Le Goïc N, Frère L, Cassone A-L, Sussarellu R, Fabioux C, et al. 2016, 216:724–737

- [70] von Moos N, Burkhardt-Holm P, Köhler A 2012, 46:11327–11335; Paul-Pont I, Lacroix C, González Fernández C, Hégaret H, Lambert C, Le Goïc N, Frère L, Cassone A-L, Sussarellu R, Fabioux C, et al 2016, 216:724–737; Heindler FM, Alajmi F, Huerlimann R, Zeng C, Newman SJ, Vamvounis G, van Herwerden L 2017, 141:298–305
- [71] Newcombe, C.P., and D.D. MacDonald. 1991. Effects of suspended sediments on aquatic ecosystems. *North American Journal of Fisheries Management*. 11:72-82.
- [72] Connors KA, Dyer SD, Belanger SE 2017, 36:1697–1703; Galloway TS, Cole M, Lewis C 2017, 1:0116
- [73] Ogonowski M, Schür C, Jarsén Å, Gorokhova E 2016, 11, e0155063; Besseling E, Wegner A, Foekema EM, van den Heuvel-Greve MJ, Koelmans AA 2013, 47:593–600; Van Cauwenberghe L, Claessens M, Vandegehuchte MB, Janssen CR 2015, 199:10–17
- [74] Ogonowski M, Schür C, Jarsén Å, Gorokhova E 2016, 11, e0155063; Au SY, Bruce TF, Bridges WC, Klaine SJ 2015, 34:2564–2572; Welden NAC, Cowie PR 2016, 218:895–900
- [75] Cole M, Lindeque P, Fileman E, Halsband C, Goodhead R, Moger J, Galloway TS 2013, 47:6646–6655
- [76] Sies H, Stahl W, Sevanian A 2005, 135:969–972; Furuhausen S, Liewenborg B, Breitholtz M, Gorokhova E: Feeding activity and xenobiotics modulate oxidative status in *Daphnia* 2014, 48:12886–12892
- [77] Sørensen JG, Loeschcke V 2001, 47:1301–1307), larvas de erizo de mar (Carrier TJ, King BL, Coffman JA 2015, 228: 171 – 180) y aves (Herring G, Cook MI, Gawlik DE, Call EM 2011, 25:682–690
- [78] Handy RD, van den Brink N, Chappell M, Mühlhling M, Behra R, Dusinská M, Simpson P, Ahtiainen J, Jha AN, Seiter J, et al, 2012, 21:933 – 972; Stone V, Nowack B, Baun A, van den Brink N, von der Kammer F, Dusinska M, Handy R, Hankin S, Hassellöv M, Joner E, et al, 2010, 408: 1745 – 1754
- [79] Connors KA, Dyer SD, Belanger SE 2017, Advancing the quality of environmental microplastic 36:1697–1703
- [80] Potthoff A, Oelschlägel K, Schmitt-Jansen M, Rummel CD, Kühnel D 2017, 13: From the sea to the laboratory: Characterization of microplastics as prerequisite for the assessment of ecotoxicological impact. *integrated environmental assessment and Management*. 500 – 504
- [81] Bikiaris DN, Papageorgiou GZ, Achilias DS. Synthesis and comparative biodegradability studies of three poly(alkylene succinate)s. *Polym. Degrad. Stab.* 2006;91:31–43.

- [82] Méndez F.C.R.1998. Micromicetos en arenas costeras de Lima. Tesis. Magíster en Microbiología. Fac. Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima-Perú
- [83] Zheng Y. Experimental study of polyurethane biodegradation using *Pseudomonas chlororaphis*. M.E.Sc Thesis, University of Western Ontario, London, OntarioCanada2004
- [84] Orhan Y., 1996. The degradation of polyolefines. Ph.D Thesis Ondokuz Mayıs University Samsun Turkey.
- [85] Koch, A.L. (with P. Gerhardt). 1994., Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006 M7-A7, M2-A9). Sin embargo, García y Ordoñez (2003)
- [86] tablas de la Rev. Cubana de investigaciones biomédicas. MSc. Dennis Someillan Iglesias, DrC. Raisa Zhurbenko, DrC. Claudio Rodríguez Martínez. Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). Bejucal. Mayabeque, Cuba. 2015;34(4)
- [87] Clinical Microbiology Procedures Handbook, American Society for Microbiology, pp. 3213-3323
- [88] Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3.a ed.
- [89] Manual of clinical microbiology. Seventh edition. Washington, D.C.: ASM Press; 1999. p. 357-69
- [90] ASM MicrobeLibrary.org, y para *Staphylococcus*, Sheagren J. and Schaberg D.
- [91] Michael T. Madigan, John M. Martinko. Brock Biology of Microorganisms, 11th ed. 2004
- [92] Lopez NI, Floccari ME, Garcia AF, Steinbüchel A, Mendaz BS (1995) Effect of polu-3-hidroxybutirate content of the starvation survival of bacteria in natural waters. FEM Microbiol Ecol 16:95 - 102
- [93] García MD, Uruburu F. García-López, M. D., Uruburu-Fernández, F. 2000. La conservación de cepas microbianas. Actualidad SEM 30: 12-16.
- [94] Witt U, Muller RJ, Deckwer WD. Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance. J Environ Poly Degrad 1997;15:81–9.
- [95] Ronay V, Attin T. Black stain –a review. Oral Health Prev Dent. 2011; 9: 37-45
- [96] Rodriguez, H., Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17, 319-339.

- [97] Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología Luis Esaú López-Jácome, Melissa Hernández-Durán, Claudia Adriana Colín-Castro, Silvestre Ortega-Peña, Guillermo Cerón-González, Rafael Franco-Cendejas
- [98] Guía de Identificación de Bacterias y la Tabla Modificada de Cowan's & Steel para Identificación de Bacterias Heterótrofas.
- [99] Según Atlas et al, 2002
- [100] G. Garrity, D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second ed.), Springer-Verlag, New York (2005).
- [101] MINCETUR, IV. Materiales para envase y embalaje
- [102] Plastics Technology México 2017
- [103] Michael T. Madigan, John M. Martinko. 2004. Brock Biología de los Microorganismos 10ed y potenciar los resultados, Sin embargo Felipe Cava, Miguel A. de Pedro, Hubert Lam, Brigid M Davis, Matthew K. Waldor 2011
- [104] CSIC Felipe Cava, del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.
- [105] Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Marine Pollution Bulletin 62, 2588–2597.
- [106] Swift G. Non-medical biodegradable polymers: environmentally degradable polymers. In: Domb AJ, Kost J, Wiseman DM, editors. Handbook of Biodegradable Polymers. Amsterdam: Harwood Academic; 1997. p. 473–511.
- [107] Kamal MR, Huang B. Natural and artificial weathering of polymers. In: Hamid SH, Ami MB, Maadhan AG, editors. Handbook of Polymer Degradation. New York, NY: Marcel Dekker; 1992. p. 127–68.
- [108] Doi Y, Kumagai Y, Tanahashi N, Mukai K. Structural effects on biodegradation of microbial and synthetic poly(hydroxyalkanoate). In: Vert M, Feijen J, Albertsson A, Scott G, Chiellini E, editors. Biodegradable Polymers and Plastics. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1992.
- [109] Frazer AC. O-methylation and other transformations of aromatic compounds by acetogenic bacteria. In: Drake HL, editor. Acetogenesis. New York: Chapman & Hall; 1994. p. 445–83.
- [110] Goldstein J.I., Newbury D.E., Joy D.C., Lyman C.E., Echlin P., E.Lifshin, Sawyer L., Michael J. (2007)
- [111] Gürtler, V. and Stanisich V. A. (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology, 142, 3-16.

- [112] D.E. Hunt,V. Klepac-Ceraj,S.G. Acinas,C. Gautier,S. Bertilsson,M.F. Polz Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity.2006
- [113] Gu JD. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *Int Biodeterior Biodegrad* 2003;52:69–91.
- [114] Brock. *Biología de los Microorganismos*. Madigan – Martinko – Dunlap - Clark (12a. ed, 2009 y posteriores) Editorial Pearson.
- [115] *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes* by David White, James Drummond and Clay Fuqua (4a. Ed, 2011).
- [116] T Stuart Waiker, Me Graw Hill, Mexico-2000-Editores S.A-Microbiología.
- [117] Starnecker y Menner, *Fungi in Biogeochemical Cycles*, 2006
- [118] Gu JD. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *Int BiodeteriorBiodegrad* 2003;52:69–91.
- [119] Mohan, S.K., Srivastava, T., 2010. Microbial deterioration and degradation of polymeric materials. *J. Biochem. Technol.* 2, 210–215.
- [120] U.S. EPA (MSGP). US EPA; 2015
- [121] Best MA, Thorpe JP 1983, 77:85–92
- [122] Brock. *Biología de los Microorganismos*. Madigan – Martinko – Dunlap - Clark (12a. ed, 2009 y posteriores) Editorial Pearson
- [123] *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes* by David White, James Drummond and Clay Fuqua (4a. Ed, 2011)
- [124] T. Stuart Waiker, Me Graw Hill, Mexico-2000-Editores S.A-Microbiología
- [125] Forbes, sahm and Weissfeld (ed.). 1998. *Bailey & scott's diagnostic microbiology*, 10th ed. Mosby, Inc., st. Louis, Mo
- [126] Hancock REW, Brinkman FSL. Function of Pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 17-38
- [127] Brock *Biología de los Microorganismos* 10ed
- [128] Robinson, R. W., D. E. Akin, R. A. Nordstedt, M. V. Thomas, and H. C. Aldrich. 1984. Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:127-136.

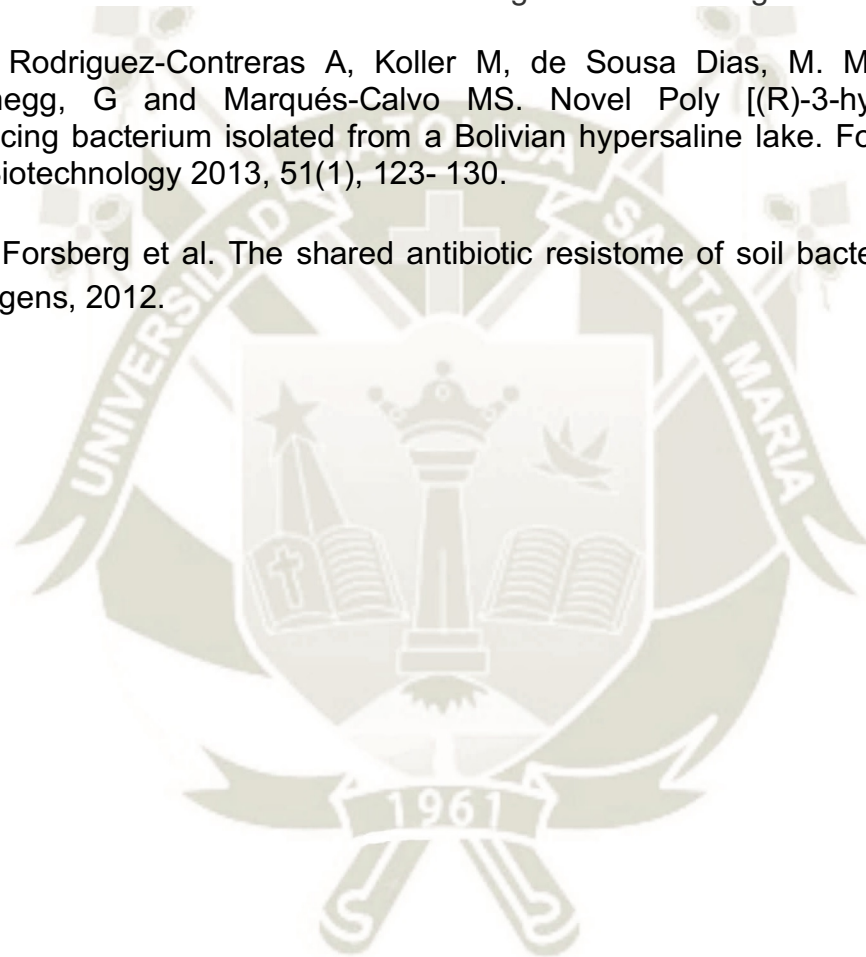
[129] Zielinski, N. A., R. Maharaj, S. Roychoudhury, C. E. Danganan, W. Hendrickson, and A. M. Chakrabarty. 1992. Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: environmental regulation of the algC promoter. *J. Bacteriol.* 174:7680-7688.

[130] Obregon-Tito et al. Bifidobacteria and their role in the human gut microbiota pg. 41 -2015

[131] Yatsunencko et al. 2012; Clemente et al. 2015; Obregon-Tito et al. Bifidobacteria and their role in the human gut microbiota. Pg. 41 - 2015

[132] Rodriguez-Contreras A, Koller M, de Sousa Dias, M. M., Calafell, M., Braunegg, G and Marqués-Calvo MS. Novel Poly [(R)-3-hydroxybutyrate]-producing bacterium isolated from a Bolivian hypersaline lake. *Food Technology and Biotechnology* 2013, 51(1), 123- 130.

[133] Forsberg et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens, 2012.



7. ANEXOS





Laboratorio Veterinario del Sur

ENVIADO POR: Srta. Ana Lucía Arenas	FECHA DE INFORME: 31/03/2016
	Nro. DE DIAG: 199
	REFERENCIA: V15/3
DIRECCION:	FECHA DE ENVIO: 21/03/2016
	FECHA DE RECIBIDO: 21/03/2016

REPORTE DE EXAMENES

PROPIETARIO: Srta. Ana Lucía Arenas	
DIRECCION: Los Gladiolos	
LOCALIDAD: Yanahuara	
PROVINCIA: Arequipa	
DPTO: Arequipa	

HISTORIA

PRUEBAS REALIZADAS:

Laboratorio	Muestras	Total	Prueba
Microbiología	Cultivos	5	Identificación

MUESTRA	IDENTIFICACIÓN
N° 1	<i>Pseudomona fluorescens</i>
N° 2	<i>Staphilococcus spp.</i>
N°3	<i>Bacillus spp.</i>
N° 4	<i>Staphilococcus spp.</i>
N° 5	<i>Pseudomona fluorescens</i>

MÉTODOS EMPLEADOS:

Cultivos en agar, pruebas bioquímicas específicas.

RESPONSABLE: QF. Claudia Choque Málaga.



Jorge Manrique Meza
Mg. MVZ JORGE MANRIQUE MEZA
C.M.V.P. - 803
GERENTE

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A
Teléfonos: 054-213677 - 232175
e-mail: labvetsur@hotmail.com
e-mail: labvetsur.acreditación@gmail.com
Arequipa - Perú



Laboratorio Veterinario del Sur

ENVIADO POR: Srta. Ana Lucía Arenas	FECHA DE INFORME: 20/04/2016
	Nro. DE DIAG: 260
	REFERENCIA: V19/4
DIRECCION:	FECHA DE ENVIO: 14/04/2016
	FECHA DE RECIBIDO: 14/04/2016

REPORTE DE EXAMENES

PROPIETARIO: Srta. Ana Lucía Arenas	
DIRECCION: Los Gladiolos 207 Dpto. 204	ESPECIE/LAB.: Varios
LOCALIDAD: Yanahuara	
PROVINCIA: Arequipa	
DPTO: Arequipa	

HISTORIA

PRUEBAS REALIZADAS:

Laboratorio	Muestras	Total	Prueba
Bacteriología	Cultivos	2	Identificación

**RESULTADOS
IDENTIFICACIÓN**

MUESTRA	RESULTADOS IDENTIFICACIÓN
Colonia amarilla (Muestra N° 8)	<i>Pseudomona spp.</i>
Colonia Transparente (Muestra N° 9)	<i>Pseudomona aeruginosa</i>

MÉTODOS EMPLEADOS:

Cultivos en agar. Pruebas bioquímicas: Oxidasa, TSI, Urea, gelatina.

RESPONSABLE: QF.Claudia Choque Málaga.



LABVETSUR
Dr. JORGE MANRIQUE MEJÍA
CMVP - 803
GERENTE

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A
Teléfonos: 054-213677 - 232175
e-mail: labvetsur@hotmail.com
Arequipa - Perú

INFORME DE ENSAYO N° 17-145 M1

1. INFORMACIÓN GENERAL:

Orden de análisis	: 17-145
Cliente	: Universidad Católica de Santa María
Domicilio Legal	: S/N Urb. San José (UMACOLLO), Arequipa, Perú.
Persona de contacto	: Analucía Arenas / Tesista.
Especificación de la muestra	: Cepas bacterianas en caldo TSP y TSB.
Designación por el cliente	: Pseudomona spp
Cantidad de la muestra	: 1 placa petri con colonias crecidas.
Observaciones	: Muestra enviada al laboratorio.
Código asignado a la muestra	: UC401-171107-01
Ensayos encargados	: Análisis genético usando marcadores moleculares.
Fecha de recepción de la muestra	: 20-nov-17.
Fecha de inicio del análisis	: 20-nov-17.
Fecha de término del análisis	: 13-dic-17.
Fecha de emisión dei informe	: 16-dic-17.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS Y RESULTADOS:

CÓDIGO	MÉTODO	FECHA
5.4.1_03POS - 12	Extracción de ADN - Lisis térmica	27-nov-17
Método de referencia:	M. Bazzicalupo and S. Fancelli in Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. Maria R. Micheli, Rodolfo Bova (eds.). Springer Lab Manual. 1997. (mar/17)	
Parámetro:	ADN genómico.	
5.4.1_04POS - 002	Amplificación de ADN por PCR de punto final.	28-nov-17
Método de referencia:	Taq polimerasa.	
Parámetro:	16S rDNA.	
5.4.1_05POS - 01b	Electroforesis de ácidos nucleicos - cuantitativa.	28-nov-17
Método de referencia:	Gel de agarosa. (jul/13)	
Parámetro:	Ácidos nucleicos.	
5.4.1_05POS - 03	Limpieza de productos de PCR para secuenciación.	5-dic-17
Método de referencia:	Exonucleasa / fosfatasa alcalina (jun/16)	
Parámetro:	Ácidos nucleicos.	
5.4.1_07POS - 06	Secuenciación Sanger (múltiples primes / placa de 96).	11-dic-17
Método de referencia:	Macrogen USA.	
Parámetro:	Productos de PCR.	
5.4.1_09POS - 01	Análisis bioinformático	13-dic-17
Método de referencia:	Sequencher / NCBI BLAST Tool (nov/17)	
Parámetro:	Data análisis.	

INFORME DE ENSAYO N° 17-145 M1

3. RESULTADOS

Género	Sub-especie	Sequence ID	E-VALUE
<i>Bacillus</i>	<i>humi</i>	≥ 98%	0.0
<i>Bacillus</i>	<i>sinesaloumensis</i>	≥ 98%	0.0

Todos los ensayos fueron realizados en las instalaciones permanentes de BIOAL S.A.C., a menos que se indique lo contrario.

Los resultados sólo están relacionados con los ítems ensayados; estos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este informe se desarrolla en conformidad con las norma NTP- ISO/IEC 17025:2006. **NO REPRODUCIR ESTE INFORME DE MANERA PARCIAL SIN LA APROBACIÓN ESCRITA DE BIOAL S.A.C.**

Mónica Santa María Fuster, PhD.

Director Técnico.

Nro. de colegiatura CBP 11079



-- FINAL DEL INFORME --

INFORME DE ENSAYO N° 17-145 M2

1. INFORMACIÓN GENERAL:

Orden de análisis	: 17-145
Cliente	: Universidad Católica de Santa María
Domicilio Legal	: S/N Urb. San José (UMACOLLO), Arequipa, Perú.
Persona de contacto	: Analucía Arenas / Tesista.
Especificación de la muestra	: Cepas bacterianas en caldo TSP y TSB.
Designación por el cliente	: Pseudomona aeruginosa
Cantidad de la muestra	: 1 placa petri con colonias crecidas.
Observaciones	: Muestra enviada al laboratorio.
Código asignado a la muestra	: UC401-171107-02
Ensayos encargados	: Análisis genético usando marcadores moleculares.
Fecha de recepción de la muestra	: 20-nov-17.
Fecha de inicio del análisis	: 20-nov-17.
Fecha de término del análisis	: 13-dic-17.
Fecha de emisión del informe	: 16-dic-17.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS Y RESULTADOS:

CÓDIGO	MÉTODO	FECHA
5.4.1_03POS - 12	Extracción de ADN - Lisis térmica	27-nov-17
Método de referencia:	M. Bazzicalupo and S. Fancelli in Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. Maria R. Micheli, Rodolfo Bova (eds.). Springer Lab Manual. 1997. (mar/17)	
Parámetro:	ADN genómico.	
5.4.1_04POS - 002	Amplificación de ADN por PCR de punto final.	28-nov-17
Método de referencia:	Taq polimerasa.	
Parámetro:	16S rDNA.	
5.4.1_05POS - 01b	Electroforesis de ácidos nucleicos - cuantitativa.	28-nov-17
Método de referencia:	Gel de agarosa. (jul/13)	
Parámetro:	Ácidos nucleicos.	
5.4.1_05POS - 03	Limpieza de productos de PCR para secuenciación.	5-dic-17
Método de referencia:	Exonucleasa / fosfatasa alcalina (jun/16)	
Parámetro:	Ácidos nucleicos.	
5.4.1_07POS - 06	Secuenciación Sanger (múltiples primers / placa de 96).	11-dic-17
Método de referencia:	Macrogen USA.	
Parámetro:	Productos de PCR.	
5.4.1_09POS - 01	Análisis bioinformático	13-dic-17
Método de referencia:	Sequencher / NCBI BLAST Tool (nov/17)	
Parámetro:	Data análisis.	

INFORME DE ENSAYO N° 17-145 M2

3. RESULTADOS

Género	Sub-especie	Sequence ID	E-VALUE
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	≥ 98%	0.0
<i>Bacillus</i>	<i>amylliquefaciens</i>	≥ 98%	0.0
<i>Bacillus</i>	<i>tequilensis</i>	≥ 98%	0.0

Nota: No se pudo ensamblar un 'contig' con las secuencias 'forward' y 'reverse'. El 'BLAST alignment' se realizó para las secuencias 'forward' y 'reverse' de manera independiente.

Todos los ensayos fueron realizados en las instalaciones permanentes de BIOAL S.A.C., a menos que se indique lo contrario.

Los resultados sólo están relacionados con los ítems ensayados; estos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este informe se desarrolla en conformidad con las norma NTP- ISO/IEC 17025:2006. **NO REPRODUCIR ESTE INFORME DE MANERA PARCIAL SIN LA APROBACIÓN ESCRITA DE BIOAL S.A.C.**

Mónica Santa María Fuster, PhD.
Director Técnico.
Nro. de colegiatura CBP 11079



-- FINAL DEL INFORME --