

EVALUACIÓN DE *Bacillus sp.* ANTÁRTICOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO PET

Sállury Gema Álava Cevallos¹, Claribel Accidalia Velásquez Catagua¹,
María Fernanda Pincay Cantos¹

¹Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix
López” (ESPAM “MFL”) - Carrera de Ingeniería Ambiental, Campus
Politécnico Sitio El Limón vía a la Pastora. Calceta, Manabí, Ecuador.

Email: sallury.alava@espam.edu.ec, claribel.velasquez@espam.edu.ec,
maria.pincay@espam.edu.ec

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar la biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por medio de *Bacillus sp.* aislados de la Antártida. Esta investigación fue de tipo experimental, enfoque científico sobre un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) unifactorial y tres bloques (15, 30 y 45 días). Como tratamientos se consideraron cinco cepas del género *Bacillus sp.* (DEE-71, T-29, T-13, GA-52, T-21) y control. El material principal fueron las láminas de PET que se sometieron a tratamiento con las bacterias en medio enriquecido y mineral en condiciones de temperatura ambiente de 20°C y a 180 rpm. La biodegradación se evaluó mediante el porcentaje de pérdida de peso y observación por microscopía óptica durante los 3 periodos de tiempo anteriormente mencionados / bloques. Del mismo modo, los datos se llevaron a un análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey con 95% de confianza. El porcentaje de biodegradación del PET que se determinó después de 45 días fue 0.4000%; 0.4250%; 0.0750%; 0.3250%; 0.2750%; 0.0000%, respectivamente, para las cepas anteriormente mencionadas y el control. Asimismo, se comprobó indicios de biodegradación en las muestras de PET, tales como: deterioro, fisuras y surcos. Finalmente, los resultados del presente estudio revelaron cambios sobre la estructura polimérica mediante la capacidad biodegradadora de las bacterias.

Palabras clave: Polietileno tereftalato, *Bacillus sp.*, biodegradación, estructura polimérica.

Introducción

En el transcurso de las últimas décadas, la creciente producción y el uso de plásticos alrededor del mundo han ido en aumento de manera alarmante, siendo un recurso esencial dentro de la sociedad dado las diferentes aplicaciones que este presenta (Soriano, 2020), convirtiéndose en una de las industrias más grandes que alcanzó a nivel mundial una producción de 370 millones de toneladas de plástico para el año 2019 (Espinoza, 2018; Mena, 2021; Plastics Europe, 2020). No todo el plástico se puede reciclar, por lo que tan solo el 9% de toda la producción anual es aprovechable y el 91% restante son incinerados o reposan en vertederos, mares, ríos, entre otros (Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA], 2019).

En 2019, la generación de residuos plásticos del Ecuador fue de 528,000 t lo que equivale al 11% de todos los residuos que se generan, producto de la utilización diaria de por lo menos dos elementos plásticos desechables (López et al., 2020) a base de PET que son los de mayor generación en la fabricación de envases de agua, refrescos, y de líquidos en general (Ormaza et al., 2020).

A partir de ello, las investigaciones se han encaminado en hallar alternativas de reducción, reutilización y reciclaje (López et al., 2020), además de los procesos de degradación como: mecánicos, químicos, térmicos, fotoquímicos y biodegradación (Herrera y Ospina, 2019). De modo particular, este último ha adquirido importancia debido a que no necesita un elevado consumo energético y tampoco emite altos niveles de concentración de metano y etileno.

Considerando lo anteriormente expuesto, la biodegradación es un proceso viable capaz de combatir la contaminación por plástico (Ávila y Morán, 2021). Específicamente, los estudios incitan al uso de bacterias por lo que favorecen a la capacidad de biodegradar estos polímeros de forma rápida y efectiva (Flashman, 2018). Se ha demostrado que, las bacterias psicrófilas favorecen a la biodegradación de plástico, pues su enfoque radica en aprovechar los compuestos biológicos y enzimas, producidas por estas que actúan en ambientes fríos y que han desarrollado mecanismos de adaptación y una bioquímica adecuada (Barbarán et al., 2018; Moreno, 2017).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la biodegradación de polietileno PET por medio de *Bacillus sp.* aislados de la Antártida.

Metodología

Esta investigación se realizó en el laboratorio de biología molecular de la ESPAM MFL, la cual se encuentra situada en el sitio “El Limón” del cantón Bolívar, provincia de Manabí (figura1). Específicamente, con las coordenadas geográficas 0°49'8.87" latitud sur y 80°10'53.03" longitud oeste.

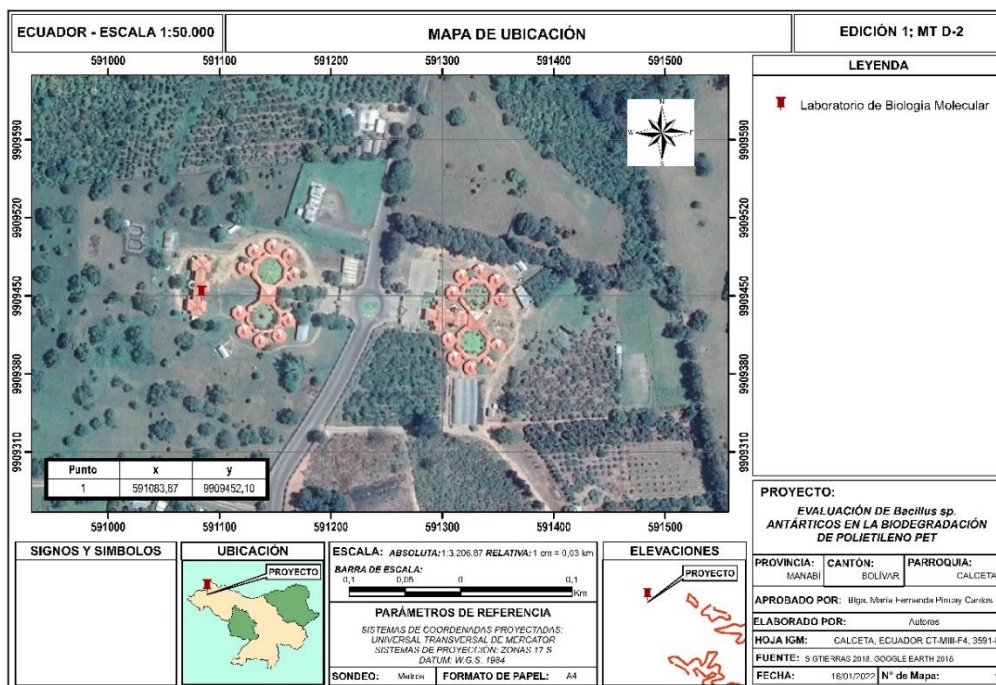


Figura 1. Laboratorio de Biología Molecular ESPAM MFL.

Es importante recalcar que, los datos de la “identificación de bacterias *Bacillus sp.* presentes en muestras de suelo de la Antártida por medio de un análisis metagenómico”, fueron extraídos del proyecto institucional titulado: “Bioprospección de microorganismos extremófilos provenientes de muestras de suelo de la Antártida”. A continuación, se detalla brevemente el procedimiento:

Obtención de muestras

Las muestras se tomaron del banco de muestras presentes en la ESPAM MFL, de la expedición realizada en el año 2014. Se consideraron cuatro islas donde se realizó el muestreo: Greenwich; Dee; Barrientos y Torres. El muestreo realizado fue en zig-zag tomándose 25 submuestras en cada isla, luego se

homogenizó la muestra para obtener una muestra compuesta, obteniendo 5 muestras compuestas.

Extracción ADN

La extracción de ácidos nucleicos se realizó acorde a las instrucciones del Kit Mag-Bind Environmental DNA 96, se tomó 10-250 mg de muestra de suelo, se agregó tampón para la lisis y degradación de ARN (SLX-Mlus-RNasa), se realizó lavados consecutivos con DS Buffer y se procedió a separar con partículas Mag-Bind® RQ. Finalmente, se transfirió el sobrenadante que contiene ADN purificado a una microplaca limpia, para luego almacenar el ADN a -20 ° C.

Amplificación del ADNr 16S mediante PCR

La amplificación del ADN bacteriano se realizó mediante PCR, usando oligonucleótidos universales 27F y 1492R. El PCR fue acorde a las siguientes condiciones: 45s para la desnaturalización del ADN a 94o C, 30s de acoplamiento entre los cebadores y el ADN diana a 54 °C, y 90s de extensión a 72 °C. Se realizó 30 ciclos con una extensión final de 10 min a 72 °C. El resultado de la PCR se visualizó mediante electroforesis.

Reactivación de bacterias y tinción de Gram / Identificación molecular de las *Bacillus sp.*

Para llevar a cabo la presente fase se consideró bacterias del género *Bacillus sp.*, presentes en el banco de muestras de la ESPAM MFL obtenidas a partir de la expedición realizada a la Antártida, específicamente de las islas: DEE (DEE-71), GREENWICH (GA- 52) y TORRES (T-13, T-21, T-29), en el año 2014 y conservadas a una temperatura de -20°C.

Seleccionadas las cepas se sembró utilizando Agar Nutritivo para luego llevarlas a incubación a 37 °C por un periodo de 72 horas, posterior a ello se aplicó la prueba de tinción de Gram.

Luego de haber cumplido con todos los pasos se visualizó las muestras con el objetivo de identificar si eran bacterias Gram positivas o Gram negativas.

Selección de muestras de PET

Como material sujeto a biodegradación, se tomó en cuenta botellas plásticas sin uso de la categoría PET con codificación 1 y sin coloración, dado que los aditivos que se adicionan para dar color en botellas de algunos refrescos pueden interferir en el desarrollo del experimento (Bermúdez, 2021), por ello se consideraron específicamente botellas de agua de 500 ml, al ser las de mayor uso en el consumo de esta bebida.

Preparación de polvo PET

Para la obtención de polvo plástico, se procedió a retirar el pico y la base de la botella este se cortó a lo largo y posteriormente a la mitad, cada mitad fue doblada e introducida en el conducto de alimentación de un extractor Hamilton que procesó el material hasta lograr el polvo PET. El polvo obtenido fue pasado por un tamiz de 0.5 mm de diámetro (Peraza, 2017). El tamizado fue pesado y luego esterilizado con radiación UV por un periodo de 30 minutos (Gómez y Oliveros, 2018). El polvo se conservó en placas Petri estériles hasta ser utilizado.

Preparación de láminas

La preparación de las láminas se llevó a cabo cortando las botellas en rectángulos de 1x2 cm, que posteriormente fueron pesadas con el uso de una balanza analítica (MKLAB, modelo MA-2204N) para la obtención del peso inicial (Peraza, 2017) y luego esterilizados donde se lavaron las láminas con agua destilada y se sometieron a radiación UV por un periodo de 30 minutos (Gómez y Oliveros, 2018). Se conservaron las láminas para su posterior uso en el proceso de biodegradación.

Elaboración del medio de sales minerales

Se preparó un medio de crecimiento que estuvo provisto de sales minerales. El medio mineral para 1 litro de agua destilada estuvo formado por los siguientes compuestos (g): KH_2PO_4 , 0.7; NH_4NO_3 , 1; $\text{FeSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$, 0.002; NaCl , 0.005; $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$, 0.7; $\text{MnSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$, 0.001; $\text{ZnSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$, 0.002.

Todos los medios se esterilizaron mediante el uso de autoclave a 121°C por 15 minutos (Crespo, 2021).

Adaptación de *Bacillus sp.* en medio enriquecido con PET

Se requirieron cinco matraces estériles de 250 ml que fueron debidamente rotulados de acuerdo a las 5 cepas de *Bacillus sp.* (DEE-71, T-29, T-13, GA-52, T-21) que se utilizaron en el experimento.

Para mantener la esterilidad del proceso se trabajó dentro de una cabina de flujo laminar, donde a cada matraz se añadió 150 ml del medio de sales minerales que fue enriquecido con 0.3 g del polvo de PET previamente preparado y esterilizado, convirtiéndose la única fuente de carbono para cada cepa, posteriormente se procedió a inocular las cepas de *Bacillus sp.* a razón de 1 ml por cepa en cada matraz del medio enriquecido con PET, se controló el pH y se llevó a incubación por un periodo de 15 días a 37° C y 150 rpm (Meza, 2013; Palacios y Prado, 2018). Cumplidos los 15 días de adaptación se realizó un frotis para comprobar el crecimiento de la bacteria en el medio de MSM.

Biodegradación de PET por *Bacillus sp.*

Concluido el periodo de adaptación de las bacterias *Bacillus sp.*, se procedió hacer la prueba de biodegradación, para lo que se usaron 72 tubos de ensayo y 72 láminas de PET que fueron anteriormente recortadas y esterilizadas.

Se mantuvo la esterilidad del proceso trabajando dentro de una cabina de flujo laminar, en cada tubo de ensayo se añadieron 12 ml del medio de sales minerales, luego con ayuda de una pinza se colocó dentro una lámina de PET, posteriormente se inocularon 2 UFC/ml del medio enriquecido con las bacterias adaptadas lo que completó un total de 14 ml en cada tubo de ensayo, para el caso del control no se añadieron las bacterias, finalmente se llevaron a incubación a temperatura ambiente de 20°C controlando el pH y con agitaciones de 180 rpm durante 15, 30 y 45 días (Meza, 2013; Palacios y Prado, 2018), que fueron los periodos en el que las bacterias mostraron formación de biopelícula y turbidez del medio de cultivo.

Porcentaje de biodegradación por pérdida de peso

Cumplido los diferentes periodos de prueba 15, 30 y 45 días se procedió a la toma de datos, para lo cual se retiraron las láminas de PET del medio mineral esto con ayuda de una pinza, posteriormente se pasaron por un proceso de desinfección retirando el biofilm generado en la superficie del plástico. Se limpió con alcohol al 70% durante 30 minutos, luego por un tiempo de 10 minutos se realizó un lavado con agua destilada y se secaron con papel filtro (Butron, 2020). Las láminas de los tubos de ensayo controles recibieron el mismo tratamiento de desinfección (Peraza, 2017).

Una vez que las láminas de PET estuvieron completamente secas se procedió a tomar el peso final de cada una, incluyendo las láminas de los controles, esto se realizó mediante el uso de una balanza analítica para evaluar la pérdida de peso con respecto a su peso inicial, posteriormente se realizó el cálculo del porcentaje de biodegradación para ello se utilizó las siguientes ecuaciones (Bermúdez y Sandoval, 2021; Crespo, 2021):

$$P_p = P_i - P_f \text{ [2.1.]}$$

Ecuación 1. Diferencia de masas.

$$\%P_p = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100 \text{ [2.2.]}$$

Ecuación 2. Porcentaje de pérdida de peso.

Donde:

P_p : Pérdida de peso (mg).

P_i : Peso inicial (mg).

P_f : Peso final (mg).

$\%P_p$: Porcentaje de pérdida de peso (%).

Observación en microscopio óptico

Posterior al proceso de biodegradación al que fueron sometidas las láminas se procedió a su visualización en un microscopio óptico en campo claro y una magnificación de 100X de manera que permita ver algún desgaste o modificación en la estructura de cada lámina de PET (Gómez y Oliveros, 2018).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para comparar los diferentes tratamientos y prueba de Tukey ($p < 0.05$) utilizando el programa InfoStat. Cabe destacar que

se aplicó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) unifactorial, donde el único factor fueron las cepas, es decir, 6 tratamientos (considerando el control), 4 repeticiones durante 3 periodos de tiempos diferentes (15, 30 y 45 días).

Adicionalmente, se aplicó una transformación a los datos con la finalidad de alcanzar la normalidad y homogeneidad de varianza de la variable respuesta. La ecuación que se empleó fue (Rodríguez y Morales, 2020):

$$y' = \sqrt{y} ; y' = \sqrt{y+c} ; y' = \sqrt{y+1}$$

Ecuación 3. Transformación de raíz cuadrada (Aplicada en el estudio). Estabilización de la varianza de Poisson.

Donde:

$y = \%P_p$: Variable respuesta.

c : valor adicional de la raíz cuadrada, como, 1/10 (0.1); 3/8 (0.375); 1/2 (0.5); 1.

$y' = \%P_{p_Trans}$: Variable respuesta transformada [Porcentaje de pérdida de peso (%)].

Resultados y Discusión

Se observó que todas mostraron morfología de *Bacillus*; además, presentaron tinción de Gram positivas, endospora central y con forma elipsoidal.

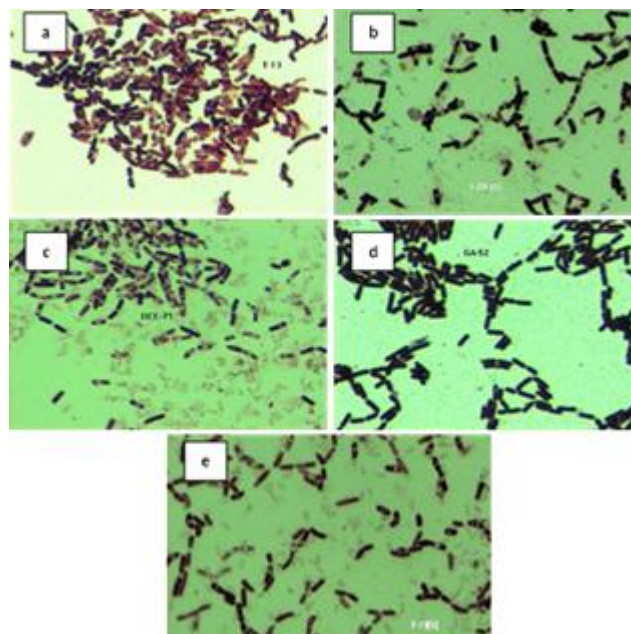


Figura 2. Morfología de *Bacillus* sp. a) T-13, b) T-29, c) DEE-71, d) GA-52, e) T-21.

Como parte del proyecto de investigación institucional “Bioprospección de microorganismos extremófilos provenientes de muestras de suelo de la Antártida”, se contó con la secuenciación molecular de las 5 cepas, en estudio (Tabla 1.):

Tabla 1. Identificación molecular de las *Bacillus* sp.

CEPAS	ESPECIE
DEE-71	<i>Bacillus paramycooides</i>
T-29	<i>Bacillus paramycooides</i>
	<i>Bacillus tropicus</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Bacillus anthracis</i>
T-13	<i>Bacillus anthracis</i>
GA-52	<i>Bacillus wiedmannii</i>
	<i>Bacillus proteolyticus</i>
	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Bacillus albus</i>
T-21	<i>Bacillus cereus</i>

Elaborado por: las autoras.

El grupo *Bacillus cereus* sensu estricto (s. s.) es un grupo muy diverso, que en realidad está compuesto por ocho especies: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* y *B. toyonensis* (Cardoso, 2019).

Tabla 2. Características Macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas de *Bacillus* sp.

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS					CARACTERÍSTICA MICROSCÓPICAS	
	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	COLOR	GRAM	FORMA
DEE-71	Irregular	Ondulado	Plana	Suave	Blanco	+	Bacilos Estreptobacilus
T-29	Irregular	Ondulado	Plana	Suave	Blanco	+	Bacilos
T-13	Puntiforme	Enteros	Elevada	Suave	Blanco	+	Bacilos Estreptobacilus
GA- 52	Irregular	Ondulado	Plana	Suave	Blanco	+	Bacilos
T-21	Circular	Enteros	Plana	Suave	Blanco	+	Bacilos
	Irregular						

Elaborado por: las autoras.

Para Guarderas (2022), las bacterias *Bacillus sp.* muestran una gran variedad entre sus características macroscópicas como su forma, borde y elevación; en cuanto al color se presenta entre crema o blanco, y con superficie suave.

El género *Bacillus sp.* generalmente se encuentra por bacilos Gram positivos y su capacidad de producir endosporas (Chiluisa et al., 2020).

Adaptación de *Bacillus sp.* en medio enriquecido con PET

En el transcurso del proceso de adaptación de las cinco cepas de *Bacillus sp.* que duró un periodo de 15 días en incubación a 37°C y 150 rpm se visualizaron cambios en el medio de sales minerales que poseía polvo de PET, siendo esta la única fuente de carbono durante esta etapa. A continuación, se detalla el comportamiento en el Anexo 1 y Anexo 2.

Biodegradación de PET por *Bacillus sp.*

En un tiempo de 45 días se llevó a cabo la observación del proceso de biodegradación en láminas de PET, tomando datos que se registraron en el Anexo 3., evaluando así tres periodos de tiempo comprendidos en 15, 30 y 45 días.

Tabla 3. Caracterización macroscópica en MSM (15 días).

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS A LOS 15 DÍAS			
	BIOPELÍCULA	SEDIMENTO		TURBIDEZ EN AGITACIÓN
		CANTIDAD	CONSISTENCIA	
DEE-71	Membranosa	Escaso	Granular	Ligera
T-29	Membranosa	Escaso	Granular	Ligera
T-13	Membranosa	Escaso	Granular	Ligera
GA- 52	Membranosa	Escaso	Granular	Ligera
Control	-	Escaso	Granular	-

Elaborado por: las autoras.

A los 15 días las réplicas de las 5 bacterias en estudio mostraron una ligera turbidez que en reposo se volvió casi nula dado que se precipitaron sedimentos de características granulares blanco y escaso, lo que concuerda con el estudio de Arotoma y Apacilla (2021); Uribe et al. (2013) quienes observaron la

aparición de biopelículas muy ligeras en el desarrollo de sus ensayos con polietileno de baja densidad, esto como evidencia de un ataque microbiano (Anexo 3.).

Tabla 4. Caracterización macroscópica en MSM (30 y 45 días).

CEPAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS A LOS 30 y 45 DÍAS			
	BIOPELÍCULA	SEDIMENTO		TURBIDEZ EN AGITACIÓN
		CANTIDAD	CONSISTENCIA	
DEE-71	Membranosa y anillada	Abundante	Grumoso	Ligera
T-29	Membranosa y anillada	Abundante	Grumoso	Ligera
T-13	Membranosa y anillada	Abundante	Grumoso	Ligera
GA- 52	Membranosa y anillada	Abundante	Grumoso	Ligera
T-21	Membranosa y anillada	Abundante	Grumoso	Ligera
Control	-	Escaso	Granular	-

Elaborado por: las autoras.

Mientras que, a los 30 y 45 días Se mantuvo una ligera turbidez en todas las réplicas que fueron inoculadas con *Bacillus sp.*, sin embargo, en estado de reposo la turbidez fue mayor que en el periodo de los 15 días. El sedimento tuvo un cambio en la consistencia siendo este grumoso y abundante con una coloración cremosa, lo que tiene relación a lo expuesto por Crespo (2021) quien observó en su investigación, el crecimiento de bacterias en las muestras de polietileno de baja y alta densidad con aspecto similar al requesón (Anexo 3.).

Porcentaje de biodegradación por pérdida de peso

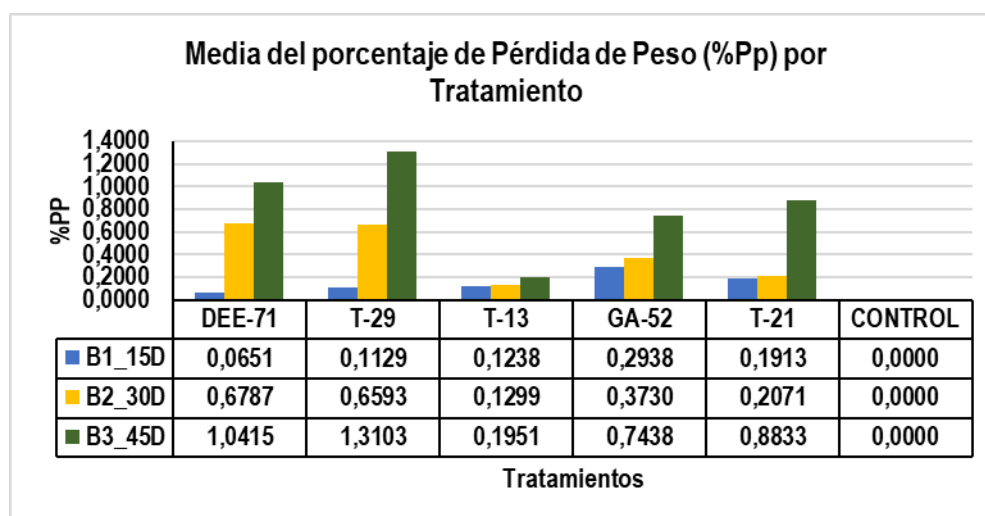


Gráfico 1. Media del porcentaje de Pérdida de Peso (%Pp) por Tratamiento.

Se analizó la capacidad biodegradadora en función de los tres diferentes periodos de tiempo (15, 30 y 45 días). Los valores representativos con mayor

pérdida de peso durante los tres periodos de evaluación fueron: GA-52 (0.2938%); DEE-71 (0.6787%); T-29 (1.3103%).

Para Arefian et al. (2020), los primeros días de evaluación se consideran como el resultado de adaptabilidad frente al entorno de eliminación del plástico. Además, diversos estudios sobre biodegradación del PET han reportado especies bacterianas con capacidad enzimática para degradar el PET, como *Bacillus sp.* y específicamente el grupo *Bacillus cereus* sensu estricto (s. s.) (Papadopoulou et al., 2019; Roager y Sonnenschein, 2019; Taghavi, 2021; Toren et al., 2021).

Observación en microscopio óptico

Las láminas bajo el microscopio presentaron una apariencia desgastada, con grietas y surcos similares a rayones como se muestra (Anexo 4.), lo que puede ser un indicio de algún ataque por parte de las bacterias, dado que la visualización de una lámina que no fue sometida a tratamiento no mostró estas características, lo que dificultó la observación, por su transparencia y superficie lisa. Asimismo, se observaron restos de la biopelícula adherida al plástico y pequeños fragmentos de PET (Anexo 5.).

Arias (2018) indica haber visualizado cambios notorios observados en la superficie del material plástico, tales como grietas, que señala ser una evidencia de biodegradación.

Análisis estadístico

Seguidamente, se efectuó el análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para la caracterización de las diferencias significativas presentadas.

Asimismo, cuando los datos de las medias son próximos a cero, el valor del coeficiente de variación tiende a elevarse (Lohr, 2021). Por tal motivo, se realizó una transformación de datos (Ecuación 3.) hacia la variable respuesta (porcentaje de pérdida de peso promedio). Cabe recalcar que, este último resultado (%PP_{Trans}) se obtuvo con la finalidad de reducir el coeficiente de variación y conservar una distribución normal de los datos.

Sin embargo, en los bloques se mostraron dos grupos (A y B) (Anexo 6.), donde el que destacó fue el bloque tres a los 45 días (B3_45D), mientras que, el bloque uno a los 15 días (B1_15D) fue el que menor representatividad tuvo. Por lo tanto, existe diferencia estadística y se acepta la hipótesis alternativa (p -valor < 0.05). Contreras y Cubas (2020), llegaron a la resolución de que los periodos de incubación y/o evaluación no se interrelacionan con la pérdida de peso, sin embargo, afirman que el grupo *B. cereus* posee capacidad biodegradadora de PS, PE, PVC y PET.

Del mismo modo, se presentó un coeficiente de variación (C.V.) del 8.75 %, donde se ratificó la homogeneidad de los datos. Moscote y Quintana (2018) señalan que, si el C.V. < 0.15 (15%) la dispersión es muy reducida. Asimismo, Sucasaire (2021) indica que, si el C.V. < 0.30 (30%) la (s) media (s) es representativa y se muestra homogeneidad en los datos.

Conclusiones

- Se identificaron las 5 cepas seleccionadas del género *Bacillus sp.* de la expedición realizada en el 2014 a la Antártida, cultivándolas en Agar nutritivo presentando un crecimiento óptimo, clasificándolas como bacterias Gram positivas observando la presencia de endosporas central, con forma elipsoidal resultado de la tinción Gram.
- De acuerdo al tiempo de adaptación de las bacterias se visualizó cambios en el medio de sales minerales y en la lámina de PET como única fuente de carbono. En los periodos de evaluación determinados existió aumento en la turbidez del MSM, formación de biopelícula y cambios estructurales en el PET.
- Las cepas representativas con mayor porcentaje de biodegradación fueron T-29 (1.31%) y DEE-71 (1.04%), en el periodo de 45 días. Evidenciando que la degradación de plástico se ve fuertemente vinculada a cambios en la superficie de sus polímeros, como grietas, porosidades, pero especialmente formación de biofilms; mostrando la generación de productos enzimáticos en la superficie del plástico, pudiendo estas bacterias ser utilizadas a futuro como una estrategia en la reducción de microplástico.

Bibliografía

- Arefian, M., Tahmourespour, A. y Zia, M. (2020). Polycarbonate biodegradation by newly isolated *Bacillus* strains. *Archives of Environmental Protection*, 46(1), 14–20. <https://doi.org/10.24425/aep.2020.132521>
- Arias, C. y Vásquez, A. (2018). Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de plásticos oxodegradables de mayor uso en Colombia. En *Universidad Autónoma Metropolitana*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Arotoma, F. y Apacclla, A. (2021). *Biodegradación del polietileno de baja densidad (LPDE) con Staphylococcus sp aislado del botadero de Ascensión - Huancavelica*.
- Ávila, S. y Morán, H. (2021). *Estudio comparativo de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos como es Aspergillus y Penicillium*.
- Barbarán, H., Cabanillas, L. y Rubio, Y. (2018). *Biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por acción de Pseudomona aeruginosa, en condiciones de laboratorio*. Universidad César Vallejo (UCV).
- Bermúdez, D. (2021). *Evaluación de microorganismos (Trichoderma spp. y Pseudomona aeruginosa) para la degradación del PET*. Universidad de América (Colombia).
- Bermúdez, D. y Sandoval, J. (2021). *Degradación del polietileno tereftalato por medio de microorganismos*.
- Butron, S. (2020). Capacidad de Biodegradación de Pseudomonas aeruginosa frente al polietileno de baja densidad. *Revista De Investigaciones De La Escuela De Posgrado*, 9(3), 1671–1684.
- Cardoso, P. de F. (2019). Diversity and functional analysis of Rap-Phr systems from *Bacillus cereus* group. En *Universidade Estadual de Londrina (Paraná, Brasil)*.
- Chiluisa, V., Campaña, M. y Acurio, R. (2020). Determinación microbiológica y molecular mediante PCR en tiempo real de dos bacterias del género *Bacillus* de interés agrobiotecnológico. *Bionatura*, 5(2), 1106–1110.

<https://doi.org/10.21931/rb/2020.05.02.4>

- Contreras, S. y Cubas, M. (2020). *Bioteconologías bacterianas para la biodegradación de polímeros. Una revisión sistemática y metaanálisis, 2020*. Universidad César Vallejo.
- Crespo, A. (2021). *Biodegradación de partículas de microplástico de polietileno a partir de un consorcio microbiano aislado del contenido intestinal de la larva Galleria mellonella L.*
- Espinoza, L. (2018). *Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos*. Universidad San Francisco de Quito (USFQ).
- Flashman, E. (2018). *Cómo funcionan realmente las bacterias que comen plástico*.
- Gómez, J. y Oliveros, C. (2018). *Biodegradación de polietileno de tereftalato por microorganismos aislados de sitios de disposición final de residuos sólidos, Táchira, Venezuela*.
- Guarderas, D. (2022). Antagonismo in vitro de bacterias y hongos endófitos y de la rizosfera de banano contra *Fusarium oxysporum*. En *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Herrera, R. y Ospina, D. (2019). Propuesta de un proceso para el tratamiento biológico del PEBD utilizando bacterias u hongos, a partir de una revisión sistemática. En *Universidad del bosque*. Universidad El Bosque.
- Lohr, S. (2021). *Sampling: Design and Analysis (Advanced Series) 3rd Edition*. Chapman & Hall.
- López, J., Pomaquero, J. y López Salazar, J. (2020). Análisis de la contaminación ambiental por plásticos. *Polo del Conocimiento*, 5(12), 725–742. <https://doi.org/10.23857/pc.v5i12.2139>
- Mena, M. (2021). *La producción de plásticos en el mundo*.
- Meza, M. (2013). Biodegradabilidad de polietileno tereftalato y de

oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, caballa y gallina. En *Escuela Politécnica del Ejército*.

Moreno, L. (2017). *Caracterización de cepas bacterianas de la laguna amarilla perteneciente al nevado El Altar en la provincia de Chimborazo*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Moscote, O. y Quintana, L. (2018). Estadística I. En *Escuela Superior De Administración Pública* (pp. 1–108).

Ormaza, J., Neira, M., Giler, L. y Quevedo, J. (2020). Máquina bio-recicladora de plástico pet: un emprendimiento viable. Caso Azogues – Ecuador. *Telos Revista de Estudios Interdisciplinarios en Ciencias Sociales*, 22(2), 395–409. <https://doi.org/10.36390/telos222.11>

Palacios, C. y Prado, V. (2018). *Biodegradación de polietileno tereftalato por acción de consorcios bacterianos procedentes de diferentes tipos de humus*.

Papadopoulou, A., Hecht, K. y Buller, R. (2019). Enzymatic PET degradation. *Chimia*, 73(9), 743–749. <https://doi.org/10.2533/chimia.2019.743>

Peraza, A. (2017). *Estudio preliminar de la biodegradación de plásticos por bacterias marinas*.

Plastics Europe. (2020). Plásticos – Situación en 2020. En *Plastics Europe*.

Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente [PNUMA]. (2019). *Reciclaje de plástico: el sector está listo para un nuevo impulso*. <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/reciclaje-de-plastico-el-sector-esta-listo-para-un-nuevo-impulso>

Roager, L. y Sonnenschein, E. C. (2019). Bacterial Candidates for Colonization and Degradation of Marine Plastic Debris. *Environmental Science and Technology*, 53(20), 11636–11643. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02212>

Rodríguez, O. y Morales, S. (2020). *Tema 7. Transformación de datos*. <https://www.youtube.com/watch?v=tzbVSgynGBM>

Soriano, B. (2020). Biodegradación de plásticos en ambientes naturales. En Zaragoza. Universidad de Alcalá.

Sucasaire, J. (2021). *Coeficiente de variación*.

<https://www.youtube.com/watch?v=XHDuKWJEUZI>

Taghavi, N. (2021). *Enhancement in biodegradation of thermoplastics using UV-pretreatment and biosurfactant Navid Taghavi*.

Torena, P., Alvarez-Cuenca, M. y Reza, M. (2021). Biodegradation of polyethylene terephthalate microplastics by bacterial communities from activated sludge. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 99(S1), S69–S82. <https://doi.org/10.1002/cjce.24015>

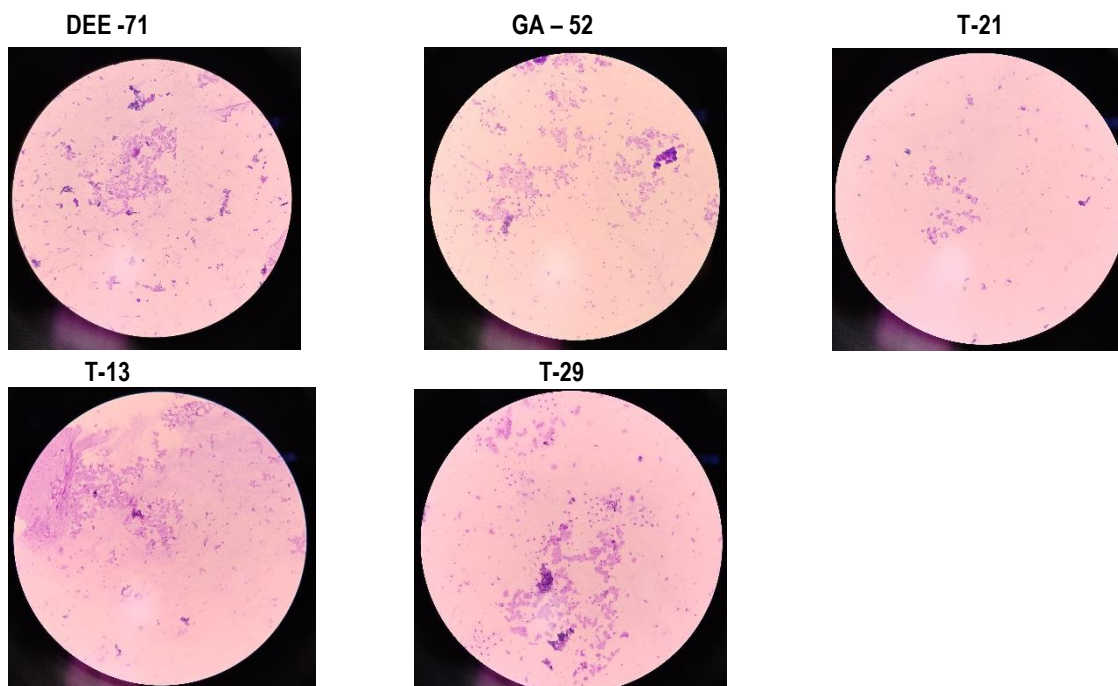
Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S. y Merino, F. (2013). Biodegradación de polietileno de baja densidad por consorcios microbianos. *Rev. Perú. Biol.*, 17(1), 133–136.

Anexos

Anexo 1. Registro del periodo de adaptación

Periodo de adaptación		
Medio de cultivo	Fecha	Observación
Medio de sales minerales con Polvo PET	09/06/2022	Las bacterias inician el proceso de adaptación a 37°C y 150rpm
Medio de sales minerales con Polvo PET	13/06/2022	El medio presenta un cambio de coloración, de ser completamente transparente se torna a un color blanco traslucido, indicativo de cambio en la turbidez del medio.
Medio de sales minerales con Polvo PET	20/06/2022	Se visualiza formación de biopelícula y aumento en la turbidez del medio. El polvo de PET se asienta en el fondo del matraz mientras está en reposo.
Medio de sales minerales con Polvo PET	23/06/2022	Se visualiza al microscopio el crecimiento de bacterias. Las 5 cepas se desarrollaron en el medio utilizado.

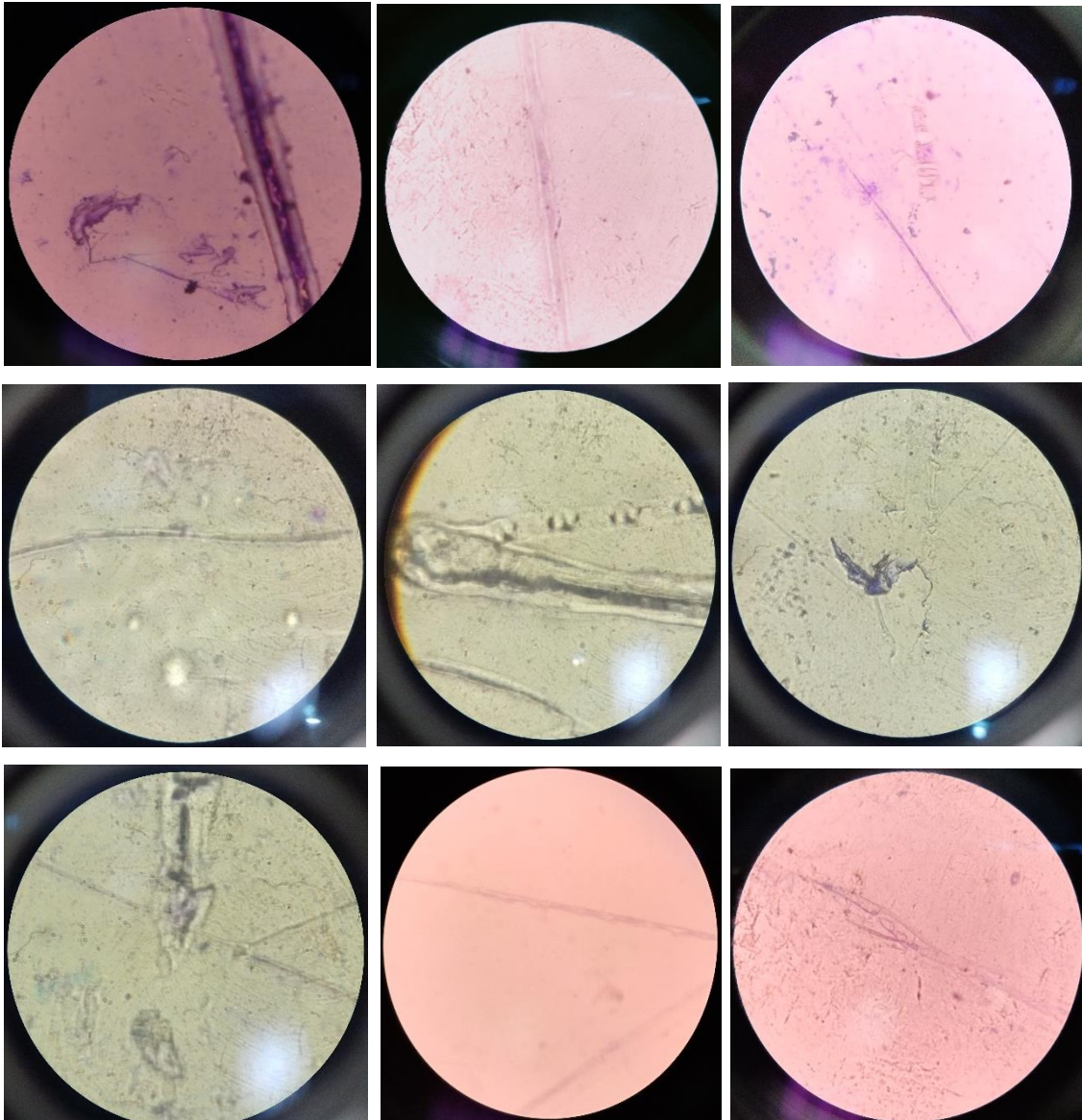
Anexo 2. Visualización microscópica de las cinco cepas de *Bacillus sp.* en el periodo de adaptación



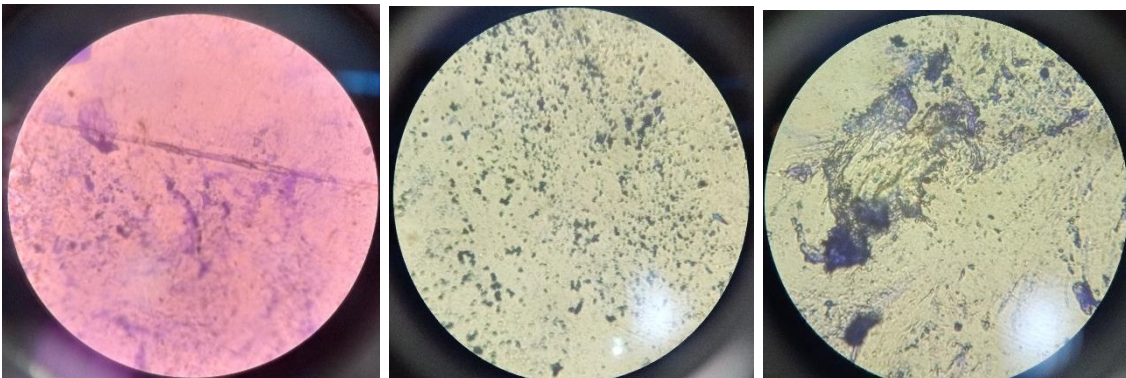
Anexo 3. Registro del periodo de biodegradación

Periodo de biodegradación		
Medio de cultivo	fecha	Observación
Medio de sales minerales con Láminas PET	24/06/2022	Se inoculan las bacterias del proceso de adaptación en los 72 tubos de ensayo con MSM, a 170 rpm y a temperatura ambiente.
Medio de sales minerales con Láminas PET	01/07/2022	Presencia de sedimento de color blanco, turbidez muy baja.
Medio de sales minerales con Láminas PET	08/07/2022	Turbidez baja con formación de biopelícula en todas las réplicas. Retiro, lavado y pesaje de láminas.
Medio de sales minerales con Láminas PET	11/07/2022	Visualización de láminas bajo el microscopio.
Medio de sales minerales con Láminas PET	15/07/2022	Cambio en la turbidez, ligero aumento. Sedimento con coloración crema y formación grumosa. El plástico muestra adherencias
Medio de sales minerales con Láminas PET	22/07/2022	No hubo mayor variación. Se retiran las láminas y se pesan.
Medio de sales minerales con Láminas PET	25/07/2022	Visualización de láminas bajo el microscopio.
Medio de sales minerales con Láminas PET	29/07/2022	La turbidez y biopelícula se mantiene sin mayores cambios. Las adherencias de las láminas parece ser mayor en todas las réplicas a excepción del control
Medio de sales minerales con Láminas PET	05/08/2022	Retiro, lavado y peso de laminas
Medio de sales minerales con Láminas PET	08/08/2022	Visualización de láminas bajo el microscopio.

Anexo 4. Observación al microscopio óptico de las láminas de PET (100X)



Anexo 5. Visualización de biopelícula adherida a las láminas de PET



Anexo 6. Análisis estadístico respecto al por el porcentaje de Pérdida de Peso Transformado (%PP_TRANS)

Análisis de la varianza

%PP_TRANS

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%PP TRANS	18	0,76	0,60	8,75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,34	7	0,05	4,63	0,0149
Tratamientos	0,18	5	0,04	3,50	0,0436
Bloques	0,16	2	0,08	7,46	0,0104
Error	0,10	10	0,01		
Total	0,44	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,29002

Error: 0,0105 gl: 10

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
T-29	1,29	3	0,06	A
DEE-71	1,25	3	0,06	A
GA-52	1,21	3	0,06	A
T-21	1,19	3	0,06	A
T-13	1,07	3	0,06	A
CONTROL	1,00	3	0,06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,16185

Error: 0,0105 gl: 10

Bloques	Medias	n	E.E.	
B3_45D	1,29	6	0,04	A
B2_30D	1,15	6	0,04	A B
B1_15D	1,06	6	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)