



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CON
ACTIVIDAD BIODEGRADATIVA DE TEREFTALATO DE POLIETILENO Y
POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL
EL TRAGADERO, BAÑOS DEL INCA-CAJAMARCA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. BETSY ROSEMARY QUISPE CRUZ

ASESOR:

MG. MBLGO. LUIS FELIPE VALDEZ NÚÑEZ

CO-ASESOR:

DR. MBLGO. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

CAJAMARCA – PERÚ

2022

COPYRIGHT©
BETSY ROSEMARY QUISPE CRUZ
Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Quispe, B. 2021. **IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CON ACTIVIDAD BIODEGRADATIVA DE TEREFTALATO DE POLIETILENO Y POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL EL TRAGADERO, BAÑOS DEL INCA-CAJAMARCA** / Betsy Rosemary Quispe Cruz

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Mg. Mblgo. Luis Felipe Valdez Núñez

Co-asesor: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo
UNC -2022

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CON
ACTIVIDAD BIODEGRADATIVA DE TEREFTALATO DE POLIETILENO Y
POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL
EL TRAGADERO, BAÑOS DEL INCA-CAJAMARCA**

AUTOR: Bach. Betsy Rosemary Quispe Cruz

ASESOR: Mg. Mblgo. Luis Felipe Valdez Núñez.

CO-ASESOR: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

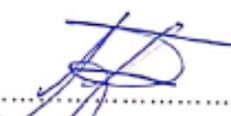
Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo

Biotechnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



.....
Presidente
Deza Arroyo Nilton Eduardo



.....
Secretario
Padilla Sobrados José Armando



.....
Vocal
López Orbegoso John Victor

Cajamarca, 2022 – Perú

Anexo PAGE 2

Universidad Nacional de
Cajamarca

Acta de sustentación de tesis virtual, basado en el Reglamento de sustentación de tesis virtuales Resolución 944-2020 artículo 8

Siendo las 8:30 p.m. del día 22 de marzo del año 2022 se procedió a iniciar la sustentación virtual de la tesis titulada: "Identificación y caracterización de bacterias con actividad biodegradativa de Tereftalato de Polietileno y Polietileno de Baja Densidad aisladas de la fuente termal el Tragadero, Baños del Inca-Cajamarca", presentada por la Bachiller en: Ciencias Biológicas: Betsy Rosemary Quispe Cruz.

El Jurado Evaluador está integrado por:

Presidente: Dr. Nilton Eduardo Deza Arroyo

Secretario: Dr. José Armando Padilla Sobrados

Vocal: M.Cs. John Víctor López Orbegoso

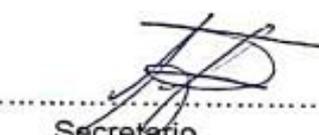
Asesor: Mg. Mblgo. Luis Felipe Valdez Núñez

Co-asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Terminado el tiempo de sustentación estipulado en el Reglamento.

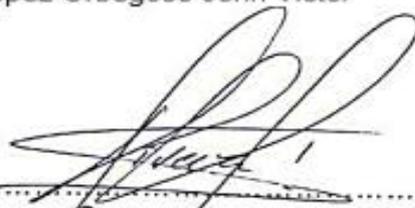
La tesista ha obtenido el siguiente calificativo: Diecisiete (17) Siendo las 9:30 p.m. del día 22 del mes de marzo del año 2022 se dio por concluido el proceso de Sustentación Virtual de Tesis

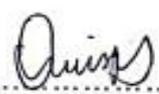

.....
Presidente
Deza Arroyo Nilton Eduardo


.....
Secretario
Padilla Sobrados José Armando


.....
Vocal
López Orbegoso John Víctor


.....
Asesor
Valdez Núñez Luis Felipe


.....
Co-asesor
Rivera Jacinto Marco Antonio


.....
Tesista
Quispe Cruz Betsy Rosemary

“La verdadera ignorancia no es la ausencia de conocimientos, sino el hecho de negarse a adquirirlos”

Karl Popper.

Agradecimiento

En primer lugar, a Dios, a mis padres y hermanos, por el apoyo incondicional, amistad y consejos que me brindaron durante todo este importante trayecto.

A mis asesores, por sus acertadas observaciones, guía, apoyo, y conocimientos compartidos durante el desarrollo de esta investigación. El Mg. Luis Felipe Valdez, por siempre esclarecer las ideas en momentos de incertidumbre, y al Dr. Marco Rivera, por sus orientaciones y brindar claros lineamientos en esta investigación.

Al grupo de Investigación GEM-BIOTEC, por permitirme crecer como investigador científico.

A CONCYTEC - PROCENCIA que, en el marco de la convocatoria de Proyectos de Investigación Básica 2019-01, financió el Proyecto Semilla “Potencial genético con aplicación biotecnológica industrial y ambiental de la microbiota termófila nativa de las fuentes geotermales de la Región Cajamarca” [número de contrato 395-2019-FONDECYT] del cual forma parte este trabajo de Tesis.

Tabla de contenido

Título	X
Resumen	xi
Abstract	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes de la Investigación	4
2.2 Bases teóricas	6
2.3 Marco Conceptual	10
CAPÍTULO III: DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS	12
3.1 Nivel de investigación	12
3.2 Tipo y diseño de estudio	12
3.3 Marco Muestral	12
3.4 Lugar de muestreo	12
3.5 Colección de muestras	13
3.6 Análisis químico de las muestras	13
3.7 Preparación del inóculo	14
3.8 Enriquecimiento	14
3.9 Aislamiento bacteriano	16
3.10 Ensayos de biodegradación	16
3.11 Identificación y caracterización de aislamientos bacterianos	19
3.12 Procesamiento y análisis de datos	21
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1 Características físico-químicas del agua y sedimento de la fuente termal	22
4.2 Aislamiento y caracterización morfológica	24
4.3 Evaluación de la actividad degradativa de las bacterias	27
4.4 Identificación y caracterización de los aislamientos	33
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
LISTA DE REFERENCIAS	46
APÉNDICES	60

Lista de abreviaciones

FTIR: espectroscopía infrarroja transformada de Fourier

K: velocidad de reducción del polímero

LDPE: polietileno de baja densidad

PET: polietileno de tereftalato

%PP: porcentaje de pérdida de peso

SEM: microscopía electrónica de barrido

$t_{1/2}$: tiempo de vida media del polímero

TCA: ciclo del ácido tricarboxílico

Glosario

Biopelícula

Es una estructura de comunidades de microorganismos embebidos en una matriz extracelular (conformada por exopolisacáridos secretados por las bacterias, proteínas, ácidos nucleicos y otros productos derivados de la lisis bacteriana) que se encuentra adherida a superficies vivas o inertes (Muro *et al.*, 2012).

Biosurfactantes

Son tensioactivos sintetizados por microorganismos. Estos tensioactivos son moléculas anfipáticas que reducen las tensiones superficiales e interfaciales y son usados en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y petrolera (Banerjee and Ghosh, 2021).

Polímero

Son sustancias compuestas por moléculas muy grandes (macromoléculas), que son múltiplos de unidades químicas más simples llamadas monómeros. Pueden ser sustancias naturales (proteínas) o sintéticas (polietileno, poliéster) (Encyclopedia Britannica, 2021).

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CON
ACTIVIDAD BIODEGRADATIVA DE TEREFALATO DE POLIETILENO Y
POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL
EL TRAGADERO, BAÑOS DEL INCA-CAJAMARCA**

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo identificar y caracterizar bacterias termófilas de la fuente termal “El Tragadero” (66.3 °C) ubicado en la Región Cajamarca. Los aislamientos se obtuvieron previo enriquecimiento *ex situ* e *in situ*. La capacidad de utilizar el polietileno de tereftalato (PET) y polietileno de baja densidad (LDPE) como única fuente de carbono por parte de los aislamientos fue evaluada mediante ensayos de biodegradación. Posteriormente, se calculó el porcentaje de peso perdido (% PP), la velocidad de reducción del polímero (k), y su tiempo de vida media ($t_{1/2}$). Los aislamientos que mejor redujeron el peso del polímero fueron caracterizados microbiológicamente e identificados a través del análisis del gen 16S RNAr. Se obtuvieron 17 aislamientos del enriquecimiento *ex situ* y 37 del *in situ*. Los ensayos de biodegradación con PET mostraron que 7 aislamientos lograron un % PP entre 0.6 a 4.8 %, siendo 19P y 14P los aislamientos que lograron una reducción promedio significativa ($p < 0,05$). El cultivo 19P, presentó un valor k de 0.00056 g día⁻¹ y un $t_{1/2}$ de 3.4 años. Con respecto al LDPE, 5 aislamientos lograron un % PP entre 0.66 al 3.9 %. El análisis del gen 16S ARNr estableció que el aislamiento 19P (mayor % PP) está afiliado a *Cytobacillus oceanisediminis*. Por otro lado, los aislamientos 16E, 14P, 28E, 9L, 2E y 9P se encuentran identificados como *Bacillus* spp., *Caldibacillus* spp., *Staphylococcus pasteurii*, *B. paralicheniformis*, *Neobacillus thermocopriae*, y *Brevibacillus borstelensis*. Así mismo, los aislados 13E, 9E, 11E y 3E a *Bacillus licheniformis*. Concluimos que al menos 8 especies bacterianas termófilas de la fuente termal El Tragadero tienen capacidad para biodegradar polímeros PET y LDPE.

Palabras clave: Fuente termal, bacterias termófilas, PET, LDPE, biodegradación.

Abstract

The objective of this research was to identify and characterize thermophilic bacteria from the "El Tragadero" hot spring (66.3 °C) located in the Cajamarca region. The isolates were obtained after *ex situ* and *in situ* enrichment. The ability of the isolates bacteria to use polyethylene terephthalate (PET) and low-density polyethylene (LDPE) as the sole carbon sources was evaluated by biodegradation tests. Subsequently, the percentage of weight lost (% PP), the polymer reduction rate (k), and its half-life ($t_{1/2}$) were calculated. The isolates that reduced the polymer weight the best were microbiologically characterized and identified through 16S rRNA gene analysis. Seventeen isolates were obtained from *ex situ* and 37 from *in situ* enrichment. Biodegradation tests with PET showed that 7 isolates achieved a % PP between 0.6 to 4.8 %, being 19P and 14P the isolates that achieved a significant average reduction ($p < 0.05$). The 19P culture presented a k value of $0.00056 \text{ g}\cdot\text{day}^{-1}$ and a $t_{1/2}$ of 3.4 years. With respect to LDPE, 5 isolates achieved a %PP between 0.66 to 3.9 %. The 16S rRNA gene analysis showed that isolate 19P (highest %PP) belong to *Cytobacillus oceanisediminis*. On the other hand, isolates 16E, 14P, 28E, 9L, 2E and 9P are identified as *Bacillus spp*, *Caldibacillus spp*, *Staphylococcus pasteuri*, *B. paralicheniformis*, *Neobacillus thermocopriae*, and *Brevibacillus borstelensis*. Likewise, isolates 13E, 9E, 11E and 3E would belong to *Bacillus licheniformis*. We conclude that at least 8 thermophilic bacterial species from the El Tragadero hot spring have the capacity to biodegrade PET and LDPE polymers.

Key words: Thermophilic bacteria, PET, LDPE, biodegradation.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El polietileno de tereftalato (PET, por sus siglas en inglés) y el polietileno de baja densidad (LDPE, por sus siglas en inglés) son dos de los polímeros plásticos de mayor uso en el mundo, debido a su alta durabilidad, resistencia y bajo costo (Iparraguirre y Vivanco, 2015). El polietileno de tereftalato es usado ampliamente en el envasado de alimentos, bebidas e incluso cosméticos (EPA, 1995), mientras el polietileno de baja densidad constituye los envases plásticos para el pan, o bolsas plásticas que son usadas diariamente en el transporte de diversas mercancías (British Plastics Federation, 2018).

Aunque existen leyes para reducir el uso de polímeros plásticos en nuestro país (p.e. Ley n° 30884), el riesgo de contaminación es cada vez mayor debido a la acumulación de sus componentes en el ambiente y al incremento de su producción. Tan solo en Estados Unidos (USA), más de 34 millones de toneladas de plástico fueron generados en el 2015, y solo el 9.1% fue reciclado, el resto, o mejor dicho la mayor parte, acabó siendo desechado sin control, contaminando ciudades, ríos, océanos y otros ambientes (EPA, 2018). El mismo año, la producción mundial de resina de polietileno de tereftalato ascendió a 27.8 millones de toneladas (Danso *et al.*, 2018).

Actualmente, en el Perú, los residuos plásticos representan el 10 % de los residuos sólidos generados (MINAM, 2018), y en Cajamarca, al 2004 (no se encontró fechas actuales), estos representaban el 20.55% junto con otros residuos (papel, cartón, vidrio, metales, jebes y textiles) (Román Guillén, 2011). Sumado a la contaminación ambiental, algunos efectos negativos en humanos podrían generarse del contacto permanente con el

polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad, tales como sensibilidad en la piel, afecciones al tracto respiratorio superior y los pulmones; ya que producen sustancias tóxicas como las cetonas, ftalatos y antimonio que son lixiviados a los alimentos al ser usados como envases (Amaia Bilbao Villena, 2015).

Debido a la evidente necesidad de disminuir los polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad, algunas prácticas como la incineración son empleadas como alternativas; sin embargo, la quema de plásticos es altamente contaminante pues incrementa los niveles de CO₂ en la atmósfera y libera otras sustancias peligrosas (Segura *et al.*, 2007). Una alternativa poco estudiada es la biodegradación microbiana, en la cual intervienen bacterias y hongos, cuyas enzimas extracelulares originan (directa e indirectamente) la degradación de polímeros plásticos, catalizando una o varias reacciones en su superficie tales como oxidación, reducción, hidrólisis y esterificación (Acuña Molina, 2017). *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibaccillus sp.* son algunos géneros microbianos que han demostrado capacidad de biodegradación sobre el polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad (Hadad, Geresh y Sivan, 2005; Skariyachan *et al.*, 2017).

Por todo lo expresado anteriormente, el presente estudio se enfocó en la búsqueda e identificación de bacterias termófilas con capacidad biodegradativa de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad a partir de muestras provenientes de la fuente termal “El Tragadero” localizada en el distrito de Baños del Inca (Cajamarca). Para ello, los aislamientos fueron sometidos a pruebas de biodegradación, las cuáles permitieron determinar el uso de estos polímeros como fuente de carbono por parte de los microorganismos aislados. Además, la evolución de CO₂ y el cambio en la morfología de las tiras de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad también fueron

evaluadas. Los resultados del presente estudio permitirán el desarrollo de alternativas biotecnológicas más eficientes mejorando la reducción y posterior eliminación de los polímeros plásticos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Hu y su equipo de investigación aislaron bacterias termofílicas a partir de películas de poliéster compostadas, las identificaron mediante secuenciación del gen 16S ARNr y las clasificaron en dos grupos *Actinomycetes* (*Streptomyces*, *Thermobifida*, *Mycobacterium*, *Saccharomonospora* y *Thermoactinomyces*) y *Bacillus* (*Bacillus*, *Ureibacillus*, *Aneurinibacteria*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus*). La degradabilidad del polímero se evaluó mediante una zona despejada alrededor de los inóculos, donde *Thermobifida alba* exhibió una fuerte degradación del copoliéster y Poli-(caprolactona) (PCL) (Hu *et al.*, 2010). Otros estudios han detectado enzimas capaces de degradar al poliéster sintético en varios actinomicetos termófilos (*T. fusca*, *T. alba*, *T. cellulosilytica*, *T. halotolerans* y *Thermomonospora curvata*) y es su estabilidad térmica a altas temperaturas (50 °C - 60°C) las que hacen que estas enzimas sean útiles para la degradación del polietileno de tereftalato (Wei, Oeser y Zimmermann, 2014).

Farzi y sus colaboradores evaluaron la biodegradación de polietileno de tereftalato por especies de *Streptomyces*. Prepararon partículas de polietileno de tereftalato a partir de botellas y las expusieron a las bacterias. Los resultados mostraron que los porcentajes finales de biodegradación para las partículas de polietileno de tereftalato de 500, 420, 300 y 212 μm fueron 49.2%, 57.4%, 62.4% y 68.8%, respectivamente; mostrando que el tamaño de la partícula era un parámetro importante en la biodegradación (Farzi, Dehnad y Fotouhi, 2019). En otro estudio, se demostró que la bacteria *Ideonella sakaiensis* degrada el poliéster de polietileno de tereftalato con la ayuda de dos enzimas (PETasa y

MHETasa) al incubar la película de polietileno de tereftalato con la bacteria a 30 °C durante 18 h (Yoshida *et al.*, 2016).

En el 2017, un grupo de investigadores evaluó la degradación del polietileno de baja y alta densidad (LDPE y HDPE) utilizando consorcios microbianos termofílicos aislados a partir de estiércol de vaca. La actividad metabólica se detectó controlando el porcentaje de pérdida de peso y observando la formación de biopelículas bacterianas en la superficie plástica, a través de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM). En un periodo de 120 días a 55 °C observaron 75 % y 55 % de degradación de tiras y pellets de polietileno de baja densidad respectivamente. *Bacillus vallismortis*, *Pseudomonas protegens*, *Stenotrophomonas* sp. y *Paenibacillus* sp. fueron los cuatro aislamientos que mostraron mayor capacidad de biodegradación (Skariyachan *et al.*, 2017).

Shah y su equipo usaron una técnica de enriquecimiento para aislar una bacteria termófila identificada como *Ralstonia* sp. de un manantial de agua caliente, la cual degradó eficientemente al poliéster PCL. La bacteria fue caracterizada morfológicamente, por microscopía y pruebas bioquímicas e identificada por secuenciación del gen 16S ARNr. La degradación del poliéster se analizó mediante la medición de la pérdida de peso, SEM y FTIR (Shah *et al.*, 2015). En otro estudio, se aisló *Bacillus amyloliquefaciens* de suelo de un vertedero de residuos sólidos y se evaluó su capacidad para degradar polietileno de baja densidad, teniendo como estrategia un pretratamiento del polímero y el uso de un medio sintético suplementado con polietileno de baja densidad. Para detectar la actividad metabólica y degradación, estudiaron los cambios de pH, determinaron el peso perdido,

realizaron prueba de evolución de CO₂, espectroscopia FTIR y SEM (Das y Santosh, 2015).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Plástico

Los plásticos son materiales sintéticos, derivan del petróleo y forman parte de compuestos orgánicos denominados polímeros, generalmente son de naturaleza química hidrófoba, tienen características propias entre las que destacan su durabilidad, resistencia a la degradación, poseen un punto fijo de ebullición, elasticidad y flexibilidad en determinado intervalo de temperaturas lo que permite moldear u obtener la forma deseada (Muñoz Inostroza, 2014; Acuña Molina, 2017).

Existen varios tipos de plásticos, y se clasifican de acuerdo a su estructura química y propiedades térmicas. Según su comportamiento con la temperatura se divide en termoplásticos y termofijos o termoestables. Los termoplásticos son aquellos que se ablandan al calentarse y se endurecen al enfriarse, esto permite que el plástico sea moldeado varias veces; por ejemplo: polietileno, polipropileno, poliestireno, cloruro de polivinilo y politetrafluoroetileno. Y los termoestables, son plásticos que se endurecen al calentarse y no se ablandan al continuar calentando, por lo tanto no pueden ser moldeados repetidas veces, entre ellos: la baquelita (fenol-formaldehído), y poliuretanos, entre otros (Muñoz Inostroza, 2014; Yepes Aguirre, 2014).

2.1.1 Polietileno (PE)

El PE es un polímero sintético termoplástico, formado por largas cadenas de monómeros de etileno. Existen dos tipos: los de alta densidad y los de baja densidad; de los cuales

este último es el plástico con mayor demanda en el Perú y el mundo, pues se usa para fabricar rollos de bolsas, envases de alimentos, juguetes, etc., y son difíciles de degradar por los microorganismos (Tokiwa *et al.*, 2009; Gutierrez Taipe, 2018).

2.2.1.1.1 Polietileno de baja densidad (LDPE)

El polietileno está formado por una cadena de átomos de carbono unidos a dos átomos de hidrógeno, y el polietileno de baja densidad se forma cuando átomos de carbono se unen a otras cadenas de polietileno y no a átomos de hidrógeno (Muñoz Inostroza, 2014).

El polietileno de baja densidad, se caracteriza porque presenta más ramificaciones que el polietileno de alta densidad, por lo que tiene menor cristalinidad y densidad que el polietileno de alta densidad. Además sus fuerzas intermoleculares (atracción entre sus cadenas) son más débiles, provocando una baja temperatura de transición vítrea (Coreño Alonso y Méndez Bautista, 2010; Sen y Raut, 2015).

2.2.1.2 Poliéster

El poliéster es un polímero sintético que puede ser termoplástico o termoestable, cuyas cadenas están unidas por grupos éster (CO-O). Los poliésteres son usados para elaborar hilos para cocer, botellas de refrescos desechables, neumáticos de goma, pinturas de esmalte, etc. (Encyclopedia Britannica, 2014).

2.2.1.2.1 Polietileno de tereftalato (PET)

El polietileno de tereftalato es una fibra y resina de poliéster termoplástico producida por la polimerización de etilenglicol y ácido tereftálico. Se usa como fibras en la industria

textil y como envase de alimentos, bebidas, cosméticos y otros productos (EPA 1995; Muñoz Inostroza, 2014).

2.2.1.3 Factores que afectan la degradación de los plásticos

Características del polímero: Las propiedades físicas y químicas de los plásticos influyen en su degradación, como el área superficial, propiedades hidrófobas e hidrófilas, su estructura química, peso molecular, temperatura de fusión, cristalinidad (Tokiwa *et al.*, 2009).

Peso molecular: Un aumento del peso molecular disminuye la degradación del plástico, pues incrementan la dureza, resistencia y estabilidad del polímero (Skariyachan *et al.*, 2017).

Grado de cristalinidad: El PE presenta un dominio amorfo y cristalino, de los cuales la región amorfa es más susceptible a la degradación, pues están menos empaquetadas. Por lo tanto, la velocidad de degradación del plástico disminuye al aumentar su grado de cristalinidad (Tokiwa *et al.*, 2009).

La temperatura de fusión (Tf): La biodegradación disminuirá al aumentar la Tf (Tokiwa *et al.*, 2009).

Ramificaciones: El plegamiento de las cadenas son impedidas por las ramificaciones en la cadena principal y esto dificulta la cristalización de los polímeros (Coreño Alonso y Méndez Bautista, 2010).

Entrecruzamiento: En los termoplásticos el entrecruzamiento se produce cuando las cadenas se unen entre ellas por un enlace covalente, esto impedirá la formación de cristales al evitar el plegamiento de las cadenas. Los enlaces por puente de hidrógeno e iónicos originan entrecruzamientos no covalentes, por lo tanto reversibles (Coreño Alonso y Méndez Bautista, 2010).

Parámetros ambientales: La humedad, temperatura, pH, salinidad, disponibilidad de oxígeno, luz solar, agua, radiación UV no solo influyen en la degradación del polímero; también afectan la actividad microbiana (Acuña Molina, 2017).

2.2.2 Bacterias termófilas

La membrana celular de los termófilos contiene ácidos grasos saturados que mantienen a la célula lo suficientemente rígida para sobrevivir y habitar elevadas temperaturas, superiores a 45°C. Además, hay microorganismos que crecen a temperaturas óptimas de 70-80 °C, tal es el caso de hipertermófilos como *Thermus aquaticus*. Como consecuencia de su adaptabilidad y propiedades macromoleculares únicas (proteínas especialmente estables, ya que poseen un mayor número de puentes de hidrogeno entre sus aminoácidos), los termófilos poseen alta estabilidad metabólica, enzimas estables física y químicamente, y crecimiento lento (Oliart, Manresa y Sánchez, 2016).

2.2.2.1 Bacterias como agentes degradadores de polietileno de baja densidad

Algunos investigadores han encontrado buenos resultados en la biodegradación de polietileno de baja densidad mediado por bacterias. Por ejemplo, se ha aislado bacterias intestinales de lombriz de tierra (previamente tratados con microplásticos) e identificaron a *Rhodococcus jostii*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Streptomyces fulvissimus* *Bacillus*

simplex y *Bacillus sp.*, los cuales disminuyeron la presencia de microplásticos de polietileno de baja densidad en un 60 % después de 21 días (Huerta Lwanga *et al.*, 2018). Otro estudio ha evaluado el potencial de degradación del polietileno (polietileno de baja densidad y HDPE) y polipropileno por un consorcio de bacterias termofílicas conformadas por *Brevibacillus sps.* y *Aneurinibacillus sp.* obteniendo una reducción del 58.2 % para las tiras de polietileno de baja densidad (Skariyachan *et al.*, 2018a).

2.2.2.2 Bacterias como agentes degradadores de polietileno de tereftalato

Bacterias del filo *Actinobacteria*, (Gram positivas) como *Thermobifida* y *Thermomonospora*, poseen potencial para la degradación del polietileno de tereftalato. Además, se ha descrito una importante capacidad para degradar el poliéster por la bacteria Gram negativa *Ideonella sakaiensis*, que puede usar polietileno de tereftalato como fuente principal de energía y de carbono (Danso *et al.*, 2018).

2.3 Marco conceptual

Cuando los plásticos están expuestos a la radiación ultravioleta de la luz solar, estos sufren cambios irreversibles en su estructura, pierden su resistencia a la tracción, se vuelven frágiles y el polímero se fragmenta; esta fragmentación representa una degradación real en términos de peso molecular (Sivan, 2011).

La biodegradación es la capacidad de uno o más cultivos de microorganismos para utilizar el polímero sintético como única fuente de carbono y depende de la biodegradabilidad de los polímeros (potencial de un polímero sintético para ser degradado por microorganismos) (Sivan, 2011).

La búsqueda de nuevas especies con capacidad de degradar contaminantes como los plásticos, ha generado que los microorganismos termófilos adquieran mayor interés biotecnológico debido a que las bacterias utilizan un complejo proteico denominado proteínas del choque térmico, las cuales ayudan a replegar a las proteínas a su forma nativa y restaurar sus funciones después de su desnaturalización; otorgando a la bacteria termófila la capacidad de resistir a condiciones adversas, es decir, termoestabilidad (Salazar, 2017).

Las aguas termales, son aguas subterráneas que emergen con una temperatura mayor a 5 °C a la temperatura media anual del ambiente; se clasifican en aguas: frías, hipotermas, termales e hipertermas (presentan temperaturas mayores a 45 °C). Estas aguas poseen una gran diversidad de microorganismos autóctonos de interés biotecnológico (Ibaza, 2018).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1 Nivel de investigación

Descriptivo.

3.2 Tipo y diseño de estudio

Diseño descriptivo, observacional y de una sola casilla.

3.3 Marco Muestral

Bacterias termófilas aerobias aisladas de la fuente termal que crecieron en medios sólidos previo enriquecimiento; las bacterias se seleccionaron bajo un criterio de presunción de su capacidad biodegradativa de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad.

3.3.1 Material biológico

Bacterias presentes en las muestras de tapete microbiano (27), biofilm (5) y sedimento (24) colectadas en la fuente termal El Tragadero de Baños del Inca, Cajamarca.

3.3.2 Unidades de estudio

Bacterias con capacidad biodegradativa del polietileno de tereftalato (polietileno de tereftalato) y el polietileno de baja densidad (polietileno de baja densidad).

3.4 Lugar de muestreo

El lugar de muestreo fue la fuente termal “El Tragadero”, del distrito de Baños del Inca, Cajamarca. La fuente presenta una temperatura media de 71 °C y está ubicada a 7°09’53’’ latitud Sur y 78°27’26’’ longitud Oeste, a una altitud de 2,722 m.s.n.m. (Apéndice 1). Las

zonas de muestreo seleccionadas fueron aquellas que presentaban tapetes microbianos, biofilms y sedimento, de las cuales se midió *in situ* el pH, conductividad eléctrica, potencial redox y temperatura del agua.

3.5 Colección de muestras

Se colectó tapetes microbianos, biofilms y sedimentos de la zona seleccionada (Apéndice 2). El muestreo fue aleatorio y por triplicado. El pH, conductividad, potencial redox y temperatura fueron medidos *in situ* empleando un equipo multiparámetro (Oakton instruments, model 110 series). La recolección de sedimento se realizó empleando jeringas estériles (50mL) cortadas (por la línea cero de la graduación, con la finalidad de ampliar el diámetro de la jeringa para recolectar el sedimento), las cuales fueron introducidas de forma vertical hasta una profundidad de ~5 cm. Posteriormente, cada jeringa se colocó en bolsas estériles de 500 mL con cierre hermético. Las muestras de tapetes microbianos se recolectaron con una espátula de acero inoxidable (Bürkle, Germany) teniendo en cuenta una superficie de 100 cm² y ~2 cm de profundidad; las muestras se almacenaron en bolsas herméticas estériles de 500 mL, dejando un espacio libre con aire antes de sellarlo completamente. Las muestras de biofilm se recolectaron en frascos de vidrio estériles de 250 mL (Boeco, Germany), que se llenaron hasta la tercera parte con agua de la zona para mantener el biofilm antes de ser selladas. Las muestras se etiquetaron y transportaron al laboratorio en un contenedor portátil manteniendo una temperatura mayor a 50 °C.

3.6 Análisis químico de las muestras

Se recolectaron muestras adicionales de agua (~1 L) y sedimento (500 g) para la determinación de metales totales (Cd, Cr, Mn, Ni, Fe, Cu, Zn, As, Pb, Li, Hg, Ba, Sr y

Al), azufre total y nitrógeno total. En sedimentos, estos análisis se realizaron a partir del agua intersticial, para lo cual las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm x 30 min en el laboratorio (USEPA, 2001). El análisis de metales totales se realizó mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), el azufre total se detectó por espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), y el nitrógeno total mediante el método de persulfato. El análisis químico estuvo a cargo de la empresa SGS del Perú.

3.7 Preparación del inóculo

Las muestras de tapetes microbianos y sedimento se homogenizaron en un contenedor estéril. Posteriormente, se adicionó 1g de cada muestra en 9 mL de agua de la fuente termal (estéril). Las muestras de biofilms fueron centrifugadas a 5000 rpm por 5 min y resuspendidas en 9 mL agua de la fuente termal (estéril). Las suspensiones se conservaron a 5 °C para su posterior uso.

3.8 Enriquecimiento

Se realizaron dos tipos de enriquecimiento: (i) enriquecimiento *ex situ* (en el laboratorio) y (ii) enriquecimiento *in situ* (dejando cebos en la fuente termal). Para el enriquecimiento *ex situ*, se empleó el medio sintético (MS) según lo sugerido por Hadad *et al.*, (2005), cuya composición fue la siguiente (g.L^{-1}): NH_4NO_3 , 1.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; K_2HPO_4 , 1.0 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; KCl, 0.15 g; extracto de levadura 0.1 g y 1.0 mg.L^{-1} de cada uno de los siguientes microelementos $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y MnSO_4 . El medio fue suplementado con 100 mg de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad obtenidos a partir de envases de bebidas gaseosas y bolsas ziploc, respectivamente. Las tiras de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad fueron esterilizadas de

acuerdo a Rosario y Baburaj, (2017). Brevemente, las películas de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad se cortaron en segmentos pequeños (2 x 1 cm), para luego ser desinfectadas durante 15 min en una placa con hipoclorito de sodio al 10 % (v/v), acto seguido se realizaron cinco lavados sucesivos en placas con agua destilada estéril por 5 min, después se retiraron y se colocaron en etanol al 70 % por 10 min. Finalmente, el secado del material se realizó a temperatura ambiente durante toda la noche. El inóculo en cada enriquecimiento consistió de 1 mL de la suspensión de cada muestra obtenidos en el apartado anterior (procesamiento de las muestras). Se contó con un control negativo (sin inóculo). Los cultivos se desarrollaron en botellas de vidrio de 250 mL que contenían 20 mL de medio y se incubaron a 50 - 60 °C durante 25 días, su crecimiento se evaluó cada 7 días (Uchida *et al.*, 2000; Uribe *et al.*, 2010). El medio se renovó en este periodo, agregando 10 mL de MS fresco. Para su posterior aislamiento, se seleccionaron los cultivos en función al crecimiento microbiano (turbidez).

El enriquecimiento *in situ* se realizó de acuerdo a lo recomendado por Kublanov y sus colaboradores (2009) con algunas modificaciones. Se dejaron en el fondo de la fuente termal (66.3 °C, temperatura promedio) tiras de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad como sustrato (3cm × 3 cm). Se prepararon sistemas por duplicado para cada sustrato, los cuales fueron mezclados posteriormente. Pasado 10 meses (debido al estado de emergencia) se recolectaron en frascos de vidrio estériles de 250 mL y se llenaron hasta la tercera parte con agua de la zona para mantener las trampas antes de ser selladas y se transportaron al laboratorio en un contenedor portátil manteniendo una temperatura mayor a 50 °C para la recuperación previa de los biofilms (adheridos a los polímeros) y su posterior aislamiento.

La recuperación de biofilms a partir de las muestras de polietileno fue de acuerdo a Puglisi et al., (2019). Las tiras de polietileno de tereftalato o polietileno de baja densidad se colocaron en un frasco de 50 mL con 20 mL de solución fisiológica estéril (SFE) y se agitaron vigorosamente de forma manual por periodos de 10 min durante 1 hora. Luego, la fase líquida (con biofilms) se centrifugó a 5000 rpm por 5 min a 4 °C. Posteriormente, el pellet fue resuspendido en 10 mL de SFE.

3.9 Aislamiento bacteriano

Se empleó el método de dilución-agar (Tamariz, 2014), para ello, se agitó el contenido de cada botella de enriquecimiento (*ex situ* e *in situ*) con el fin de resuspender las células. Se prepararon diluciones al décimo de cada muestra hasta la dilución 10^{-3} y se inoculó por duplicado 0,1 mL de cada dilución en agar Luria Bertani (LB), la siembra se realizó por extensión empleando un asa de Drigalsky; finalmente, se incubó a 50 °C - 60 °C por 5 días. Pasado el periodo de incubación, se anotaron las características culturales de cada colonia (color, pigmentación y forma) y se obtuvo cultivos puros en viales con agar nutritivo que fueron incubados a la temperatura y periodo antes descritos. Pasado el tiempo de incubación, los cultivos puros se conservaron a 4 °C.

3.10 Ensayos de biodegradación

Se realizaron suspensiones de cada uno de los cultivos bacterianos seleccionados en SFE, empleando una concentración de 6×10^8 ufc/mL, la cual se determinó empleando el tubo N° 2 de los estándares de turbidez de McFarland. Posteriormente, se inoculó 20 mL de cada suspensión en frascos de 300 mL con 200 mL de medio MS, conteniendo películas de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad, previamente esterilizadas y pesadas. Cada sistema se incubó a 50 °C por 90 días en oscuridad (Uribe *et al.*, 2010). Se

contó con controles abióticos (sin células bacterianas), los cuales se realizaron en paralelo a la prueba (Shah *et al.*, 2015). Los ensayos se realizaron por duplicado.

a) Determinación del peso seco del PET y LDPE residual

Transcurrido el periodo de incubación (90 días), las películas de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad se recuperaron del medio MS y se lavaron para descartar las células bacterianas adheridas a la superficie del polímero con solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2 % (p/v) durante 4 horas, seguido de agua destilada durante 6 h, y etanol al 70 % (v/v) durante 2 h. Todos los procesos emplearon una agitación de 150 rpm (Das y Santosh, 2015). Las películas de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad ya lavadas se colocaron en papel toalla estéril y se dejaron secar durante una noche a temperatura ambiente antes de ser pesadas, posteriormente el peso obtenido se comparó con el peso inicial y se calculó el % de peso perdido mediante la siguiente fórmula (Das y Santosh, 2015).

$$\% \text{ de peso perdido} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Adicionalmente, se determinó la constante de velocidad de reducción del polímero (k) y el tiempo de vida media del polímero ($t_{1/2}$), usando las siguientes fórmulas:

$$k = -\frac{1}{t} \left(\ln \frac{W}{W_0} \right)$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k}$$

Donde k es la constante de velocidad de reducción del polímero, t es el tiempo en días, W es el peso final del polímero (g), y W_0 es el peso inicial del polímero (g).

b) Análisis superficial del polietileno de baja densidad y polietileno de tereftalato

La morfología de la superficie del polímero tratado y no tratado con los cultivos bacterianos, se examinó en un microscopio (Olympus CX31) a 40x, para lo cual se tuvo en cuenta los cambios en el brillo y fisuras o grietas en las muestras de polietileno de baja densidad y polietileno de tereftalato (Méndez *et al.*, 2007).

c) Prueba de Sturm (Pramila y Vijaya, 2011; Ameen *et al.*, 2016)

Esta prueba se realizó a aquellos cultivos que presentaron un % PP superior al 3 %. Se prepararon botellas de vidrio (300 mL) de control y prueba, conteniendo 200 mL de medio MS suplementado con películas de polietileno de tereftalato/polietileno de baja densidad. Se añadió 20 mL de los cultivos bacterianos (6×10^8 ufc/mL) en la botella de prueba; y se suministró continuamente aire estéril al sistema para la condición aeróbica. El aire estéril pasó a través de una solución de KOH 3M para eliminar el CO₂ atmosférico y luego se dejó fluir a través de las botellas de prueba, que estaban conectadas a botellas con KOH 1M (botellas de adsorción).

El aire burbujeante libre de CO₂ que se suministró a las botellas de prueba proporcionó aireación para la actividad bacteriana, permitiendo así la evolución de CO₂ (producto de la mineralización del polietileno de tereftalato) que quedó atrapado en la botella de adsorción, y que, al reaccionar con el KOH, formó bicarbonato (HCO₃⁻). La cantidad disuelta en el caldo se estimó añadiendo 100 ml de BaCl 0.1 M para formar un precipitado de carbonato de bario. El CO₂ producido se calculó gravimétricamente midiendo el peso

del precipitado, y estableciendo la diferencia entre los valores obtenidos de las botellas de prueba y de control, según la fórmula descrita a continuación. El ensayo se realizó por 15 días, a una temperatura de 50 °C.

$$CO_2 \text{ producido (g/l)} = (CO_2)_{Prueba} - (CO_2)_{Control}$$

3.11 Identificación y caracterización de aislamientos bacterianos

3.11.1 Identificación molecular de las bacterias

3.11.1.1 Extracción de ADN

El ADN genómico de cada aislamiento fue extraído utilizando la técnica de shock térmico (Gonzales *et al.*, 2014), a partir de cultivos puros de 18 h de crecimiento en agar base. Brevemente, cinco colonias fueron resuspendidas en microtubos de 1.5 mL con 100 µL de agua grado molecular estéril para luego ser sometidas a un proceso de calor-frío de 80 °C por 10 min y de -20 °C por 10 min para lisar las células, este proceso se repitió 2 veces. Luego de reposar 15 min a temperatura ambiente, la suspensión se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min a 20 °C para separar el ADN de los residuos celulares. El sobrenadante con el ADN fue transferido a un microtubo estéril (Wright *et al.*, 2017). La calidad del ADN extraído se determinó por espectrofotometría empleando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) y su respectivo software. El ADN se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

3.11.1.2 Amplificación del gen 16S ARNr

La amplificación del gen 16S ARNr de cada aislamiento se hizo mediante PCR empleando los primers universales 27F-5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1492R-5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' en una mezcla de reacción de 50 µL conteniendo 1µL de ADN genómico, 1µL de KOD Hot Start DNA Polymerase 1U/µL,

5 μL de buffer 10x para KOD Hot Start DNA Polymerase, 3 μL de MgSO_4 25mM, 5 μL de dNTPs 2mM, 1.5 μL del primer *forward* 10 μM , y 1,5 μL del primer *reverse* 10 μM ; finalmente se completó el volumen con agua grado molecular. Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 35 - 40 ciclos compuestos por desnaturalización a 95 °C por 20 s, alineamiento a 54 °C por 30 s, extensión a 70 °C por 20 s, y una extensión final a 70 °C por 5 min. Los productos de PCR se examinaron en geles de agarosa al 1.0 % empleando SybrSafe DNA (Thermo Scientific, USA). La corrida electroforética se realizó a 100 V por 30 minutos. Las bandas de los amplicones se visualizaron en un transiluminador con luz UV (Visi-Blue Transilluminator, USA) y se registraron mediante fotografías.

3.11.1.3 Secuenciación del gen 16S ARNr y análisis bioinformático

Los amplicones 16S ARNr de cada aislamiento fueron secuenciados bidireccionalmente por el servicio de secuenciación de Macrogen (Korea) mediante el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1997). Cada secuencia entregada por Macrogen fue sometida a un proceso de edición en el programa Aliview 1.27 (Larsson, 2014) antes de su alineamiento con las secuencias depositadas en bases de datos públicas y de acceso libre utilizando la herramienta BLASTn del NCBI (National Center for Biotechnology) (Altschup *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). Finalmente, utilizando secuencias del gen 16S ARNr de especies cercanas, con porcentajes de similitud mayor a 99 %, recuperadas del GenBank-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>), se creó un archivo multi-FASTA junto con las secuencias obtenidas en este estudio (query) para construir árboles filogenéticos con el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) empleando el programa MEGA 10.2 (Tamura *et al.*, 2007), considerando los criterios establecidos por defecto en dicho programa.

3.11.2 Caracterización microbiológica de los aislados bacterianos

Las bacterias con capacidad de degradar el polietileno de tereftalato o polietileno de baja densidad se caracterizaron cultural, morfológica y tintorialmente (tinción Gram y de endoesporas (Shaeffer y Fulton)) (Villa, Fernández y Castillo, 2012). En la caracterización también se consideró las siguientes pruebas bioquímicas: producción de ácidos a partir de azúcares (glucosa, sacarosa y lactosa) en agar TSI, vía ácido-mixta o butanodiólica en caldo MR-VP, descarboxilación de lisina en agar LIA, utilización de citrato en agar citrato de Simmons, movilidad en agar SIM, hidrólisis de urea en medio sólido, y producción de catalasa (Shah *et al.*, 2015). La siembra en agar sangre también fue empleada. La observación de alfa o beta hemólisis se consideró como resultado positivo.

3.12 Procesamiento y análisis de datos

La significancia de los niveles de biodegradación que presentaron las bacterias seleccionadas fue determinada empleando el paquete estadístico SPSS v23 (2014), en el cual se empleó un análisis ANOVA y el método de Tukey, con un nivel de confianza de 95% y un $p < 0.05$, para establecer diferencias significativas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Características físico-químicas del agua y sedimento de la fuente termal

El valor promedio de los parámetros fisicoquímicos se muestra en la Tabla 1.

La temperatura promedio encontrada en El Tragadero (66.3°C) es característica de una fuente hidrotermal por lo que cualquier organismo biológico que habite estas aguas debe ser considerado como termófilo. Es importante mencionar que a estas temperaturas, la degradación de los polímeros plásticos es favorecida debido a que el calor provoca cambios químicos en los polímeros a medida que se acerca a su temperatura de fusión (Leahy y Colwell, 1990; Tokiwa *et al.*, 2009; Suasnavas, 2017). Así también, a elevadas temperaturas se producen altos rangos de actividad enzimática y una mejora en la difusión de compuestos orgánicos en los microorganismos, además de disminuir el riesgo de contaminación por microorganismos exógenos durante los procesos biodegradativos (Atanasova *et al.*, 2021).

El ión predominante en el agua termal fue el calcio (26.1×10^{-1} mM), seguido del silicio y del hierro; en el sedimento, el silicio (26.1×10^{-1} mM) presentó mayor concentración, seguido del aluminio y del calcio (Tabla 1). La presencia del calcio, tanto en aguas superficiales como intersticiales, indica que estas son moderadamente duras (75 – 150 mg/L de CaCO_3). La presencia de elementos tales como el hierro, aluminio, magnesio, y silicio puede deberse a procesos de disolución ocasionados por el contacto constante del agua con rocas que contengan minerales tales como halositas ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), kaolinitas ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$), biotitas ($\text{K}(\text{Mg}, \text{Fe})_3 \text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{OH}, \text{F})_2$) o albitas ($\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$), normalmente reportadas en fuentes termales (Torres-Ceron *et al.*, 2019). Por otro lado, la

concentración de Fe es lo suficientemente alta para causar coloraciones marrones-rojizas en el agua ($> 5.4 \times 10^{-3}$ mM).

Otro factor importante que interviene en la degradación de polímeros plásticos es el pH. En los procesos de biodegradación (p.e. hidrocarburos), la mayoría de las bacterias prefieren un pH cercano a la neutralidad (Leahy y Colwell, 1990; Pepper, Gerba y Gentry, 2015). Al encontrar valores similares de pH en la fuente termal estudiada (6.4), inferimos que esto pudo contribuir a encontrar microorganismos con capacidad de degradar polímeros tales como el polietileno de tereftalato/polietileno de baja densidad.

Por otro lado, la presencia de microelementos esenciales tales como el nitrógeno y fósforo indican un gran reservorio de micronutrientes para el desarrollo microbiano en esta fuente termal. En la biodegradación de hidrocarburos, la relación carbono:nitrógeno:fósforo es uno de los parámetros que limita de forma considerable la degradación de estos compuestos en sitios contaminados (Leahy y Colwell, 1990). Por otro lado, la disponibilidad de oxígeno, en niveles superiores a 0.5 mg/L, es también de vital importancia en procesos aeróbicos biodegradativos.

En cuanto a la conductividad del agua de la fuente termal (Tabla 1), esta fue menor a los parámetros descritos en la categoría 1 del ECA del agua (MINAM, 2017). Esto estaría asociado a las bajas concentraciones de sales, que podría afectar positivamente la capacidad bacteriana de degradar los polímeros (Briseño, 2018).

Tabla 1. Parámetros físico-químicos (pH, ORP (mV), temperatura (°C), conductividad (μS/cm), oxígeno disuelto (mg OD/mL), metales, metaloides y no metales mayoritarios (mM)) medidos en muestras de agua y sedimento (agua intersticial) de la fuente termal El Tragadero.

Muestra	pH	ORP (mV)	T (°C)	Conduct (μS/cm)	OD (mg OD/L)	Al	Fe	Si	P	Ca	S	N
Agua	6.4	+18.9	66.3	1054	6.4	9.9 x 10 ⁻¹	13.3 x 10 ⁻¹	17.2 x 10 ⁻¹	7.5 x 10 ⁻²	26.1 x 10 ⁻¹	6.9 x 10 ⁻¹	2.1 x 10 ⁻²
Sedimento	-	-	-	-	-	27.9 x 10 ⁻¹	9.2 x 10 ⁻¹	38.5 x 10 ⁻¹	11.3 x 10 ⁻³	18.1 x 10 ⁻¹	-	-

4.2 Aislamiento y caracterización morfológica

A partir del enriquecimiento *ex situ* se obtuvieron 28 aislamientos y debido al estado de emergencia sanitaria ocasionada por el COVID-19, algunos de ellos no se lograron reactivar, obteniéndose al final solo 17 aislamientos (7 bacterias a partir del enriquecimiento de polietileno de tereftalato y 10 a partir del enriquecimiento de polietileno de baja densidad). Por otro lado, del enriquecimiento *in situ* se obtuvieron 37 aislamientos (21 bacterias a partir del enriquecimiento de polietileno de tereftalato y 16 a partir del enriquecimiento de polietileno de baja densidad); cabe resaltar que el enriquecimiento *in situ* duró más de lo previsto (diez meses), debido al estado de emergencia. Esto fue favorable ya que mientras más tiempo se encuentre el polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad en la fuente termal, mayor es la probabilidad de encontrar microorganismos que metabolizan a los polímeros.

Las colonias bacterianas presentaron una amplia gama de morfologías tanto entre especies como dentro de cada especie. Algunas morfologías coloniales se muestran en la

Figura 1. En cuanto a la morfología celular, la mayoría de las células se presentaron en forma de bacilos y solo un aislamiento tenía forma de coco. Las células se presentaron solas, en parejas o agrupadas, algunas en cadenas o formando filamentos (Figura 2). Así mismo, el 66.7 % de los aislamientos fueron Gram-negativas mientras que el 27.8 % Gram-positivas, aunque algunas (5.6%) fueron Gram-variables; todas las bacterias fueron productoras de endosporas (centrales, subterminales y terminales (Apéndice 3)).

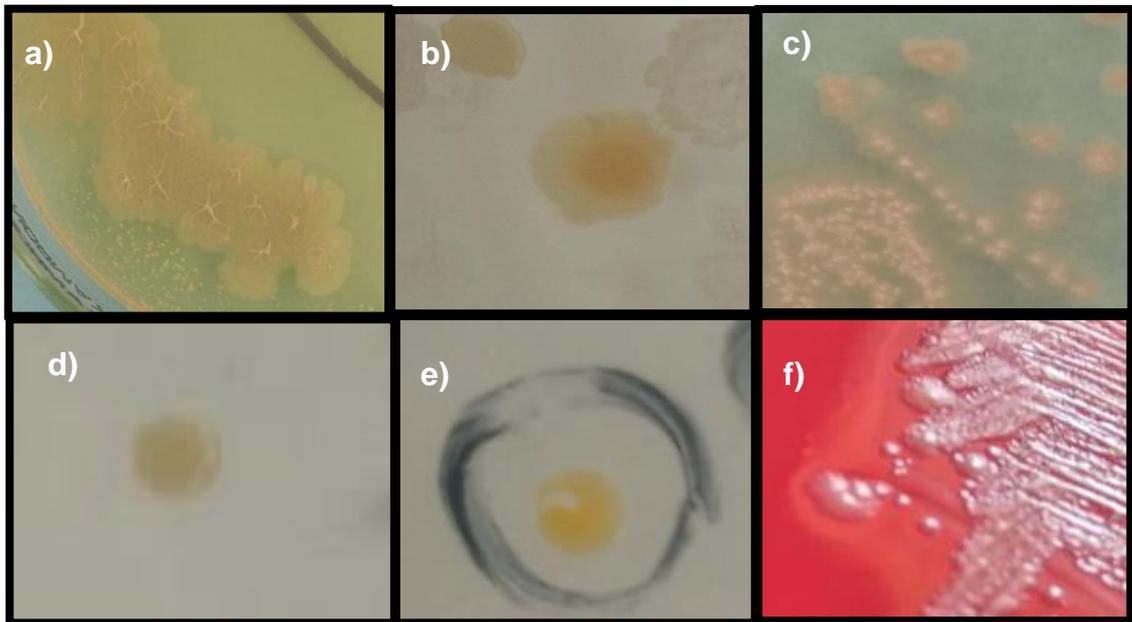


Figura 1. Colonias bacterianas tras 24-36 h de incubación a 50 °C. a) Aislado 3E: colonias rugosas, irregulares y bordes ondulados. b) Aislado 21E: colonia irregular, plana y de suave textura. c) Aislado 23E: colonias irregulares, de aspecto rugoso y ondulado. d) Aislado 9P: colonia circular, plana, de textura suave. e) Aislado 28E: colonia circular con borde entero, textura suave y capaz de producir pigmento amarillo. f) Aislado 3L: colonia circular, de textura suave y color crema.

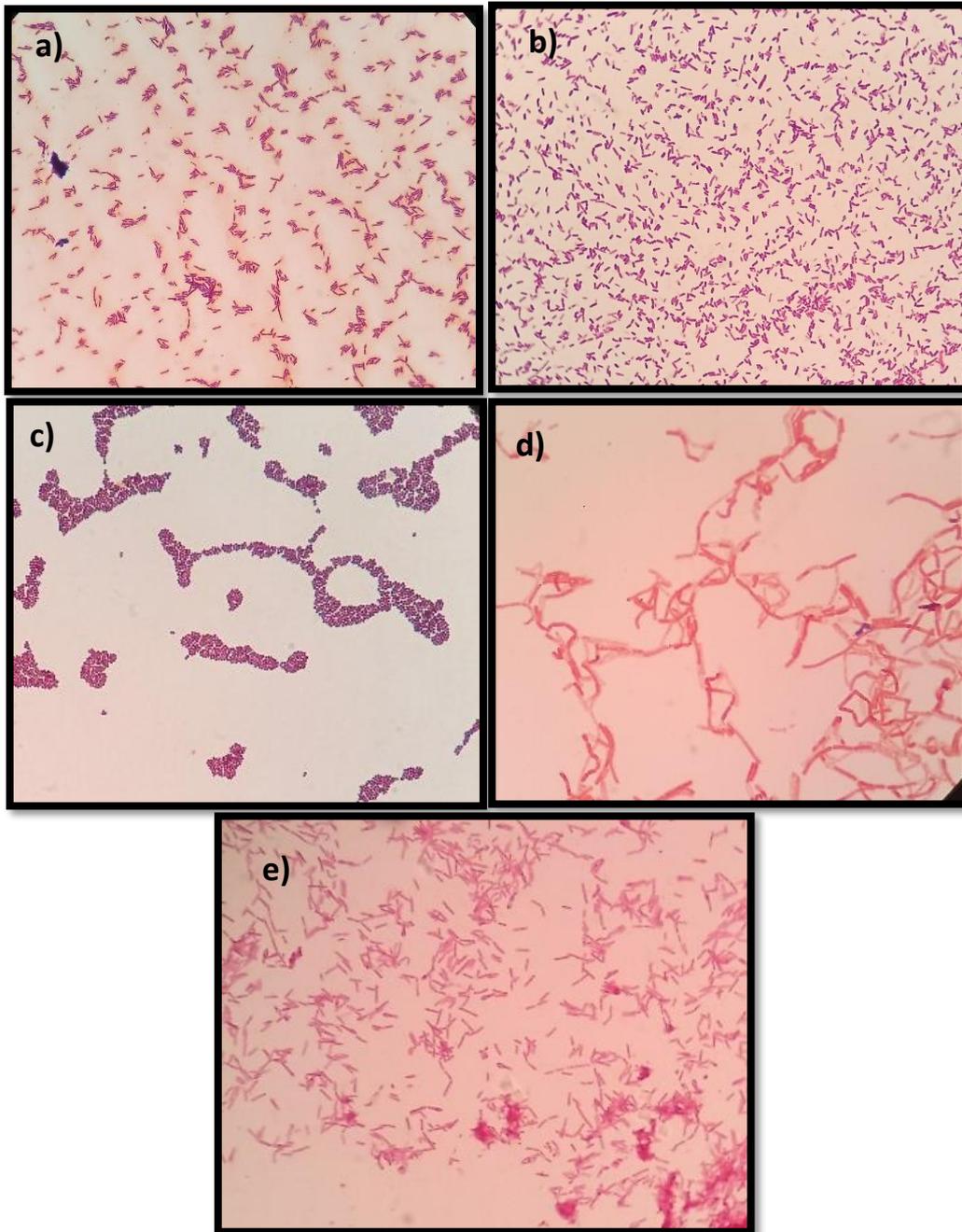


Figura 2. Tinción Gram de los aislados 3E, 13L, 28E, 5L y 14P. Observación microscópica 1000x. a) Aislado 3E, Bacilos Gram Negativas, agrupados y pequeños. b) Aislado 13L, Bacilos Gram Positivos, dispersos y pequeños. c) Aislado 28E, cocos Gram Positivos. Agrupados. d) Aislado 5L, bacterias Gram negativas, en forma de filamentos. e) Aislado 14P, bacterias Gram negativas, agrupadas, formadoras de esporas terminales.

4.3 Evaluación de la actividad degradativa de las bacterias

4.3.1 Degradación de los polímeros plásticos

La Tabla 2 muestra los resultados de la biodegradación del polímero de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad como única fuente de carbono en un periodo de 90 días de incubación. De los 54 aislamientos obtenidos solo se evaluaron a 41 cultivos debido a que los aislados restantes no crecieron lo suficiente para llegar a la concentración necesaria a la que fueron evaluadas (6×10^8 ufc/ml); de estos 41 cultivos evaluados, 36 ensayos fueron positivos.

Los ensayos de biodegradación mostraron que 34 aislamientos lograron un porcentaje de peso perdido entre 0.1 a 4.8 %, siendo 19P, 16E y 14P los cultivos que lograron mayor reducción de los polímeros (4.8 ± 4.2 %, 3.9 ± 1.9 % y 3.4 ± 2.5 %, respectivamente). Respecto a los experimentos controles, solo en el que contenía polietileno de baja densidad no se observó ninguna pérdida de peso; cabe resaltar que, aunque hubo pérdida de peso en el control con polietileno de tereftalato, esta no fue significativa respecto a los ensayos con las bacterias ($p > 0.5$, según ANOVA y Tukey, Apéndice 4). Por lo tanto, los resultados demuestran que la pérdida de peso durante la incubación con los aislados se debió al uso de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad por parte de las bacterias como única fuente de carbono.

Adicionalmente, se utilizaron los datos para determinar la velocidad de reducción del polímero, es decir la cantidad de absorción del polímero por la bacteria en un día y el tiempo de vida media del polímero (el tiempo que demora la bacteria en reducir el polímero a su mitad). La tasa de absorción más alta para polietileno de tereftalato fue de 0.00056 g/día y una vida media de aproximadamente 3.4 años obtenidos por el cultivo

19P; y en la degradación de polietileno de baja densidad, el aislado 16E en un día absorbió 0.00044 g de polietileno de baja densidad, además necesitaría 4.3 años aproximadamente para reducir el polímero a su mitad.

Tabla 2. Porcentaje de peso perdido (% PP), velocidad de reducción (k) y vida media de los polímeros ($t_{1/2}$) obtenidos luego de los ensayos de biodegradación de PET/LDPE. C-: control negativo.

Tipo de plástico	Aislamiento Bacteriano	%PP	k (g.día ⁻¹)	$t_{1/2}$ (años)
PET	19P	4.8 ± 4.2	0.00056	3.4
LDPE	16E	3.9 ± 1.9	0.00044	4.3
PET	14P	3.4 ± 2.5	0.00039	4.9
LDPE	13L	1.3 ± 1.1	0.00014	13.6
LDPE	3L	1.1 ± 0.3	0.00013	14.6
LDPE	28E	0.9 ± 0.4	0.0001	18.9
PET	18P	0.8 ± 0.2	0.000085	22.3
LDPE	9L	0.7 ± 0.4	0.000074	25.7
PET	2E	0.7 ± 0.2	0.000072	26.4
PET	13E	0.6 ± 0.1	0.000071	26.7
PET	9P	0.6 ± 0.2	0.000067	28.3
PET	9E	0.6 ± 0.02	0.000066	28.8
PET	11P	0.6 ± 0.1	0.000066	28.8
PET	17P	0.6 ± 0.2	0.000065	29.2
PET	8P	0.6 ± 0.1	0.000063	30.1
PET	11E	0.6 ± 0.02	0.000063	30.1
PET	1P	0.6 ± 0.3	0.0000625	30.4
PET	3E	0.6 ± 0.005	0.000061	31.1
PET	10E	0.5 ± 0.04	0.00006	31.7
PET	6P	0.5 ± 0.02	0.000058	32.7
PET	13P	0.5 ± 0.03	0.000057	33.3
PET	20P	0.5 ± 0.01	0.000056	33.9
PET	2P	0.5 ± 0.02	0.000052	36.5
LDPE	19E	0.5 ± 0.4	0.00005	37.9
LDPE	4L	0.5 ± 0.1	0.00005	37.9
LDPE	20E	0.5 ± 0.4	0.000049	38.8
LDPE	25E	0.4 ± 0.6	0.000039	48.7
LDPE	21E	0.3 ± 0.3	0.000034	55.9
LDPE	1L	0.3 ± 0.1	0.000033	57.5
LDPE	14L	0.3 ± 0.3	0.000031	61.3
LDPE	10L	0.3 ± 0.1	0.000028	67.8
LDPE	23E	0.2 ± 0.2	0.000019	99.9
LDPE	26E	0.2 ± 0.04	0.000018	105.5

LDPE	17E	0.1 ± 0.1	0.000016	118.7
LDPE	8L	0.04 ± 0.04	0.0000042	452.2
PET	21P	0.04 ± 0.02	0.0000038	499.7
PET	C-	0.4 ± 0.4	-	-
LDPE	C-	-0.09 ± 0.2	-	-

Así mismo, teniendo en cuenta los porcentajes de peso perdido, los datos se agruparon en tres niveles (bajo: menor a 0.75 %; medio: entre 0.75 % y 1.5 % y alto: mayor al 3 %), independientemente del tipo de polímero. Al realizar el análisis estadístico y comparar los grupos, se observaron diferencias altamente significativas entre los grupos ($p < 0.001$) (Apéndice 4). Cabe resaltar que, las bacterias con un porcentaje de peso perdido del polímero mayor a 3 %, serían las que mejor prospección tendrían debido a que sus capacidades biodegradativas frente a estos polímeros muestran una diferencia importante frente a las otras agrupadas en los otros niveles, según las pruebas de ANOVA y las de comparación entre grupos, de Tukey y Bonferroni ($p < 0.001$, Apéndice 4).

Los resultados muestran también que no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el porcentaje de peso perdido del polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad. Es decir, las bacterias degradan ambos tipos de plásticos sin preferencia por alguno de ellos. A la vez, tampoco se encontraron diferencias significativas en relación al tiempo de vida media y velocidad de reducción del polímero puesto que, al no tener preferencia por alguno de ellos, las bacterias usaron como fuente de carbono al polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad con la misma velocidad, por ende, el tiempo que demoró la bacteria en degradar el polímero a su mitad tampoco fue significativo al comparar los resultados entre ambos polímeros.

La estructura extracelular bacteriana también podría jugar un rol importante en la degradación de polímeros plásticos. Al analizar los datos de coloración de los 36 cultivos con capacidad para utilizar polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad como única fuente de carbono, se observó que la mayoría eran bacilos Gram negativos (25 bacterias aisladas). Esto se debería a que los lipopolisacáridos que poseen las bacterias Gram negativas facilitan la formación y estabilización de las emulsiones de hidrocarburos, contribuyendo a aumentar el contacto con la superficie del polímero (Briseño, 2018). Sin embargo, algunas de las bacterias Gram positivas presentaron un porcentaje de pérdida de peso importante (agrupados en el nivel medio), uno de ellos es el aislado 13L, cuyo porcentaje promedio de degradación por pérdida de peso fue de 1.3%.

Después de 90 días de incubación, el crecimiento bacteriano se evidenció a través de la turbidez producida en la mayoría de las pruebas de biodegradación, y la invasión bacteriana se vio a través de la formación de biopelículas (producida en mayor cantidad por los cultivos 19P, 16E, 13E y 14P) que envolvía toda la superficie del polietileno de tereftalato y el polietileno de baja densidad, demostrando así la gran capacidad que tienen las bacterias para adherirse al polímero, lo cual estaría propiciando una mayor biodegradación, como el porcentaje de pérdida de peso máximo de 4.8 % obtenido por el aislado 19P. Resultados similares fueron descritos por Tribeti y Sil (2013), quienes demostraron la degradación de polietileno de baja densidad por una cepa de *Pseudomonas* con capacidad para formar biopelículas.

Según algunos estudios, el potencial de biodegradación de un microorganismo mejora significativamente si este tiene la capacidad de formar biopelículas, pues permite a la

bacteria adaptarse a los cambios en la topografía del polímero, ya que se generan ranuras e irregularidades en la superficie del plástico debido al ataque enzimático (Espinilla, 2017). Las enzimas extracelulares tales como esterasas, lipasas, lacasas son esenciales para aumentar la hidrofiliidad de los polímeros plásticos, mejorando así la unión microbiana y por ende la biodegradación (Miri *et al.*, 2022). Además, las hidrolasas extracelulares (lipasas, esterasas, cutinasas, despolimerasas y poli(3-hidroxi-butirato)) actúan sobre la superficie del polímero, dando como resultado grietas y provocando la formación de fragmentos de bajo peso molecular (Miri *et al.*, 2022).

Ambos enriquecimientos, *ex situ* e *in situ*, permitieron el aislamiento de bacterias termófilas con capacidad biodegradativa de polímeros plásticos. Las bacterias que presentaron mayor porcentaje de peso perdido fueron aisladas a partir del enriquecimiento *in situ* (19P, 14P, 13L, 3L, 18P, 9L, 9P), y del enriquecimiento *ex situ*, a partir de biofilm (16E, 2E, 3E) y tapetes microbianos (28E, 13E, 11E). Los aislados bacterianos 14P y 19P obtenidos a partir del enriquecimiento *in situ* presentaron el mejor porcentaje de peso perdido, sin embargo, el enriquecimiento *ex situ* también fue eficaz para obtener bacterias con potencial biodegradativo (16E y 28E) (ver Apéndice 3). Cabe mencionar, que a partir del sedimento también se obtuvo bacterias con capacidad biodegradativa (19E, 21E y 20E), pero su potencial de biodegradación no fue tan elevado; esto podría deberse a que en los sedimentos la difusión del oxígeno es relativamente baja, limitando la biodegradación del polímero, ya que uno de los pasos iniciales para iniciar la biodegradación de los hidrocarburos es la oxidación del polímero por parte de las oxigenasas (Leahy y Colwell, 1990; Das y Chandran, 2011).

4.3.2 Prueba de Sturm

Los resultados que se muestran en la Tabla 3 corresponden a los aislados 19P y 16E (obtenidos del enriquecimiento *in situ* y *ex situ*, respectivamente), quienes obtuvieron la mejor reducción de peso en cada polímero evaluado. Se muestra una concentración de CO₂ de 0.1967 g.L⁻¹ y 0.7081 g.L⁻¹ respectivamente, después de 15 días. Esta tendencia coincide estrechamente con su velocidad de reducción y porcentaje de degradación por pérdida de peso. Pramila y col. (2012) revelaron un desprendimiento de CO₂ de 1.0604 g/L a los dos días por la bacteria *Acinetobacter baumannii* al degradar el polietileno de baja densidad, tratado con xileno para disolverlo y transformarlo en polvo antes del ensayo. Aunque esos resultados fueron mayores a los obtenidos en este trabajo, en nuestros ensayos no se dio ningún pretratamiento al polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad, por lo que podemos afirmar que la biodegradación puede mejorar si se realiza algún pretratamiento a los polímeros.

La cuantificación de CO₂ es un indicador de la utilización de los compuestos plásticos. Después de la biofragmentación de los polímeros por acción enzimática, los intermediarios metabólicos son metabolizados por enzimas intracelulares a través de la β-oxidación y el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). Posteriormente se da la mineralización, y posterior liberación de CO₂ (Zhang *et al.*, 2004; Miri *et al.*, 2022). Nuestros resultados corroboran que el aislado 19P tiene capacidades potenciales para la biodegradación de polímeros plásticos, pues ha producido una concentración de CO₂ mucho más alta.

Tabla 3. Evolución del CO₂ en función del carbonato de bario durante el tratamiento de aislados bacterianos con láminas de PET y LDPE.

Aislamiento bacteriano	Emisión de CO ₂ después de 2 semanas		
	Controles (g/L)	Tratamientos (g/L)	Diferencia de peso (g/L)
16E	0.1401	0.3098	0.1697
19P	0.0794	0.7875	0.7081

4.3.3 Observación macroscópica de los polímeros plásticos

Al realizar la observación en el microscopio óptico, los cambios fueron poco visibles. El control de polietileno de baja densidad y el polietileno de baja densidad tratado (con bacterias), mostraron una morfología de superficie con fisuras, siendo más evidente la alteración en el polietileno de baja densidad tratado, pues las fisuras se mostraban más ensanchadas y en el polímero de polietileno de tereftalato (tratado y no tratado) se manifestaron áreas desgastadas con agujeros, siendo más prominentes en el polietileno de tereftalato tratado (con bacterias) (Apéndice 5); sin embargo al ser las tiras de plástico recicladas, no estuvieron exentas de sufrir daños o fisuras por lo que se sugiere repetir el experimento con polímeros plásticos de primer uso.

4.4 Identificación y caracterización de los aislamientos

4.4.1 Identificación molecular de los aislamientos

La Tabla 4, muestra la identidad de las bacterias termófilas luego del análisis de las secuencias del gen 16S ARNr. Aunque este análisis fue realizado a los aislamientos que presentaron la mayor capacidad para degradar el polietileno de baja densidad y polietileno de tereftalato (3, 2 y 7 aislamientos pertenecían a los niveles de % PP alto, medio y bajo, respectivamente), es importante mencionar que a los aislamientos 3L y 18P, que también produjeron porcentajes importantes de pérdida de peso de los polímeros (1.1 % de

polietileno de baja densidad y 0.8 %, respectivamente), no fueron incluidos debido a que no se les logró extraer ADN por el método ensayado.

Tabla 4. Identificación molecular mediante el análisis del gen 16S ARNr de las bacterias termófilas con capacidad biodegradativa de PET y LDPE aisladas de la fuente termal El Tragadero.

Aislamiento	Cobertura (%)	Identidad (%)	Identidad en GenBank	Número de acceso
19P	100	99.3	<i>Cytobacillus oceanisediminis</i>	KM374766.1
16E	99	85.71	<i>Bacillus sp.</i>	MK143282.1
14P	99	99.86	<i>Caldibacillus sp.</i>	MZ984225.1
13L	100	99.65	<i>Cytobacillus oceanisediminis</i>	KM873030.1
28E	100	98.39	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	MG680735.1
9L	100	99.65	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	MN013960.1
2E	100	99.86	<i>Neobacillus thermocopriae</i>	MG651167.1
13E	99	99.49	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX447652.1
9P	100	99.57	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	LC107509.1
9E	98	99.93	<i>Bacillus licheniformis</i>	KP216575.1
11E	99	95.86	<i>Bacillus licheniformis</i>	KP216573.1
3E	100	99.65	<i>Bacillus licheniformis</i>	KX686993.1

En este estudio, de acuerdo a la bibliografía encontrada, el aislado 19P homólogo a *Cytobacillus oceanisediminis*, es reportado por primera vez realizando procesos de biodegradación de polímeros plásticos tales como el polietileno de tereftalato. Sobre este microorganismo se cuenta con información depositada en el GenBank junto con las secuencias homólogas, donde se menciona que las bacterias fueron aisladas a partir de suelos contaminados con hexaclorociclohexano (HCH) y petróleo crudo (códigos de acceso KM374766.1 y KM873030.1). Otros estudios revelan que esta bacteria tiene la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos a 30 °C (Sachaniya *et al.*, 2020); además esta bacteria tiene la capacidad de producir biosurfactantes que pueden

reducir la tensión superficial, aumentando así la biodisponibilidad de los polímeros (Banerjee y Ghosh, 2021).

Por otro lado, el género *Bacillus* fue hallado con mayor frecuencia entre los géneros con capacidad biodegradativa de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad, siendo *B. licheniformis* el más representativo; por ello se decidió agrupar a las bacterias en BL (*B. licheniformis*) y en NBL (otras bacterias no *B. licheniformis*), con el objetivo de analizar los datos del porcentaje de pérdida de peso, velocidad de reducción y el tiempo de vida media entre ambos grupos, mediante la prueba T. Se encontró que las NBL produjeron un porcentaje de degradación por pérdida de peso significativamente mayor en comparación a *B. licheniformis* (p valor < 0.038), aunque sin asumir varianzas iguales (Apéndice 4).

El género *Bacillus* (mesófilos y termófilos) ha sido reportado en varios estudios por tener la capacidad degradativa de polietileno, informándose diferentes especies de este género (Auta, Emenike y Fauziah, 2017; Dang *et al.*, 2018; Muhonja *et al.*, 2018; Zahari *et al.*, 2021); en este estudio, corroboramos esta información al encontrar los aislados-homólogos 13E – *B. licheniformis*, 9L – *B. paralicheniformis* y 16E – *Bacillus spp.* que mostraron porcentajes de degradación por pérdida de peso de 0.6 % de polietileno de tereftalato, 0.7 % de polietileno de baja densidad y 3.9 % de polietileno de baja densidad, respectivamente. Otros autores ratifican esta capacidad al reportar el potencial de degradación de petróleo crudo y poliestireno por *B. licheniformis* y *B. paralicheniformes* (Khanpour-alikelayeh *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021; Partovinia, Abolhasani y Koosha, 2021). Además, en otro estudio se informó resultados similares a los reportados en este estudio en cuanto al porcentaje de degradación por pérdida de peso del polietileno de baja

densidad (1.5 % y 1.75% por *B. pumilus* M27 y *B. subtilis* H1584, respectivamente) (Harshvardhan y Jha, 2013).

La biodegradación de los polímeros inicia con la colonización por las biopelículas, *B. licheniformis*, *B. megaterium* y *B. subtilis* son capaces de formar biopelículas y degradar el polietileno de tereftalato (Restrepo-Flórez, Bassi y Thompson, 2014; Hiraga *et al.*, 2019; Dąbrowska, Janczak y Richert, 2021). Después de la adhesión de los microorganismos a los polímeros, las bacterias secretan enzimas extracelulares, como la alcano hidroxilasa (Van Beilen, Li y Witholt, 2003), que oxidan los enlaces CC generando alcoholes que son oxidados a aldehídos o cetonas, y luego a ácidos carboxílicos; posteriormente los n-alcanos carboxilados son catabolizados a través de la vía del sistema de β -oxidación (Montazer, Najafi y Levin, 2020). Otras enzimas como lacasas y manganeso peroxidasa fueron producidas por *B. cereus*, en la degradación del polietileno previamente tratado con UV (Tkachuk y Zelena, 2021). Otros autores informaron que *Bacillus sp.* es capaz de producir la enzima oxidoreductasa, que también forma hidrocarburos más cortos (alcoholes, cetonas) (Ingavale y Raut, 2018). Por otra parte, *B. subtilis* y *B. licheniformis* son capaces de producir biosurfactantes, mejorando así el proceso de degradación de los polímeros (Vimala y Mathew, 2016).

A pesar de todo lo antes mencionado, pocos son los estudios que evalúen específicamente el potencial de degradación del polietileno de tereftalato o polietileno de baja densidad por *B. licheniformis*, aunque sí existen algunos estudios relacionados a mejorar el potencial de degradación de otras bacterias, al ser utilizadas como productores de biosurfactantes, donde los autores reportan que el uso simultáneo de la bacteria y el

surfactante aumenta considerablemente el porcentaje de degradación del polietileno (Mukherjee *et al.*, 2015, 2017).

Respecto a *Staphylococcus pasteurii*, no se han reportado estudios sobre esta bacteria en procesos de biodegradación de polímeros plásticos; sin embargo, ha sido utilizada en estudios de degradación de hidrocarburos, a 37 °C (Doley y Barthakur, 2017; Hentati *et al.*, 2021). Por otra parte, las secuencias homólogas afiliadas a la bacteria termófila *Caldibacillus* spp., indican que este microorganismo si está relacionado con la degradación de plásticos (código de acceso: AB360816.1, artículo no publicado). Además, hay estudios informando que *C. thermoamylovorans* tiene potencial para emulsionar el petróleo crudo a 58 °C en condiciones aeróbicas y producir metano a partir de petróleo crudo a 55 °C en condiciones anaeróbicas (Liu *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2020), demostrando que tiene el potencial para degradar polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad ya que estos polímeros son productos derivados del petróleo. No obstante, no se ha podido encontrar más información relacionada a la degradación de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad por estos géneros microbianos.

El aislado 9P fue identificado como *Brevibacillus borstelensis*. Esta bacteria posee genes asociados a la degradación de una importante variedad de sustratos, entre ellos el polietileno de baja densidad, así como el fungicida carbendazim (Khalil *et al.*, 2018; Mohanrasu *et al.*, 2018; Skariyachan *et al.*, 2018b); sin embargo, no se ha encontrado reportes acerca de la degradación de polietileno de tereftalato por parte de esta bacteria, aunque si con polietileno de baja densidad a 50°C (Hadad *et al.*, 2005). En este estudio, estamos reportando la degradación de polietileno de tereftalato por *B. borstelensis*, con % PP de 0.6 %. Por último, el aislado 2E – *Neobacillus thermocopriae*, al igual que

Cytobacillus, solo se encontró una secuencia homóloga que fue aislada de un campo petrolífero (código de acceso KT807465.1).

En la Figura 3 se muestra la relación filogenética de todos los géneros y especies identificados. La ubicación de cada género y especie corresponde a un nodo terminal diferente, demostrando así la divergencia genotípica existente entre cada género y especie; sin embargo, entre las familias *Paenibacillaceae* y *Bacillaceae* no se reveló con mucha claridad la divergencia genética existente, lo cual es concordante, debido a que el género *Brevibacillus* se encuentra estrechamente relacionado con el género *Caldybacillus*.

Adicionalmente, se construyó un cladograma con los datos de caracteres morfológicos y bioquímicos de los aislados (Figura 4); ubicándose *S. pasteurii*, aislado 28E, en un clado principal y los otros géneros (*Bacillus*, *Brevibacillus*, *Cytobacillus*, *Neobacillus* y *Caldybacillus*) en otro clado. Tanto en el cladograma fenotípico como en el dendrograma es notoria la divergencia de las familias *Paenibacillaceae* (9P) y *Bacillaceae* (16E, 19P, 14P, 2E, 9E, 9L, 13E, 11E, 3E y 13L) frente a *Staphylococcaceae* (28E).

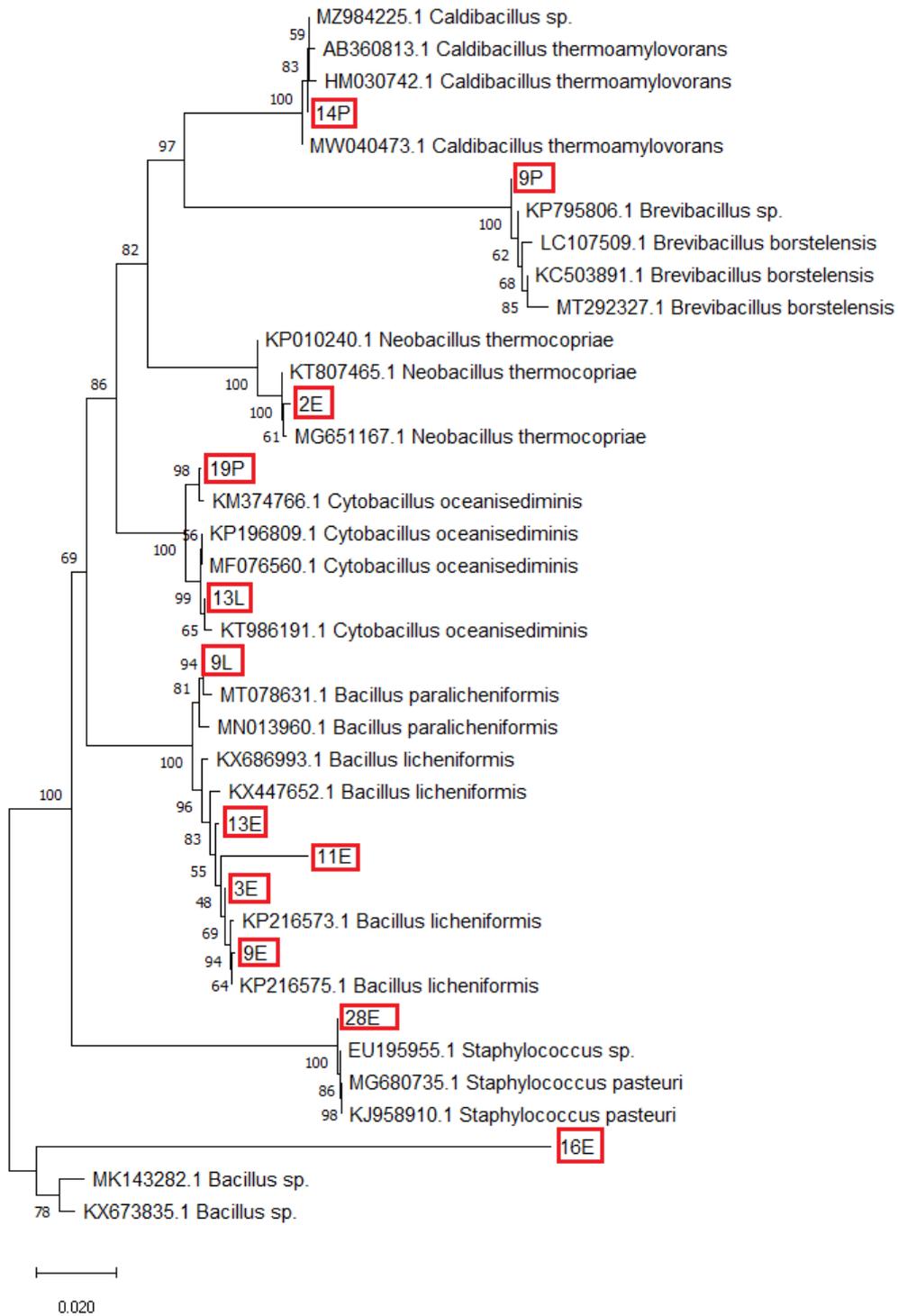


Figura 3. Árbol filogenético inferido a partir de la comparación de las secuencias 16S ARNr consenso de los aislados bacterianos con capacidad degradadora de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad obtenidos en este estudio (en rojo) con las secuencias homólogas obtenidas del GenBank (número de acceso descritos en el árbol), mediante el método NJ y *bootstrap* = 500.

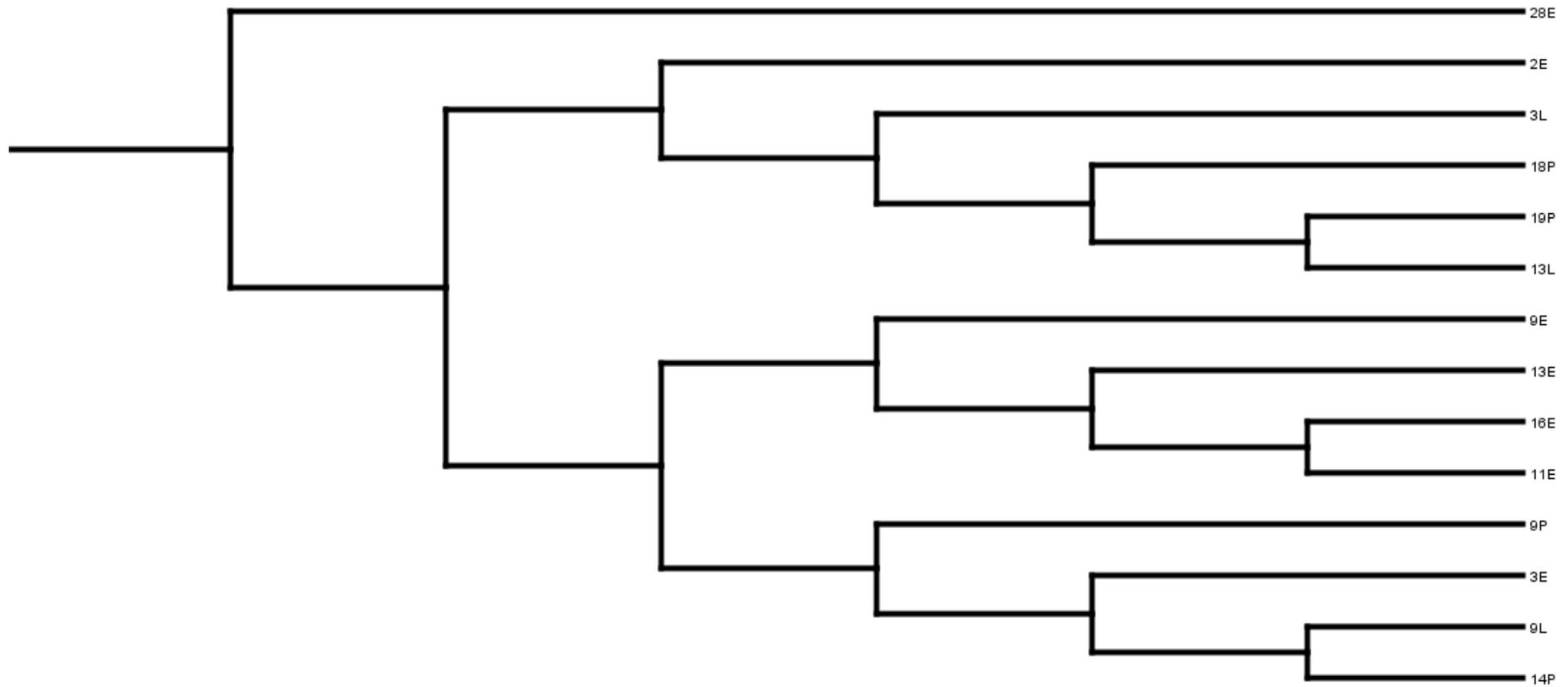


Figura 4. Cladograma construido con datos de los caracteres morfológicos y bioquímicos de los aislados con capacidad degradativa de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad. Realizado con el método UPGMA en el programa Mesquite.

4.4.2 Caracterización microbiológica

La tabla 5, muestra las características bioquímicas y fenotípicas de catorce bacterias que presentaron capacidad para degradar los polímeros polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad (12 identificadas molecularmente). De manera adicional, los aislados se sembraron en agar sangre. Se observó hemólisis beta y alfa alrededor de las colonias, así como la ausencia de hemólisis (gamma) (Figura 5).

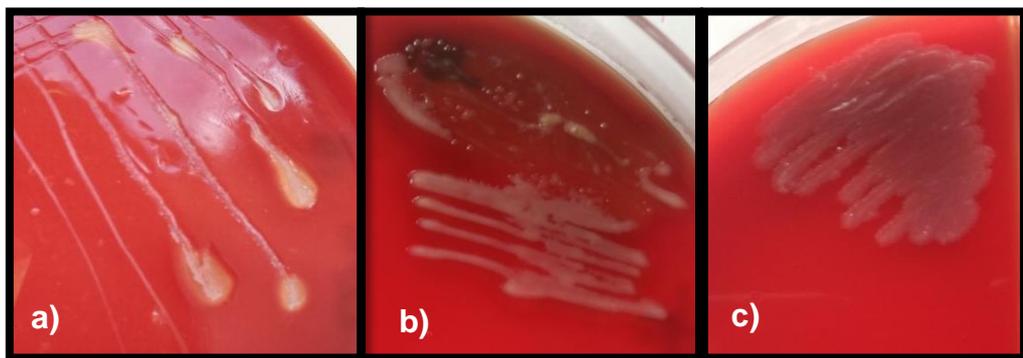


Figura 5. a) Aislado 28 E beta hemolítico. Se puede apreciar un halo completamente claro alrededor de las colonias. b) Aislado 18P alfa hemolítico, se observa un halo color verde alrededor de las colonias. c) Aislado 3E, no hay hemólisis (gamma).

Los resultados muestran que las bacterias tienen metabolismo heterótrofo y solo 4 de ellas presentaron capacidad para utilizar distintas fuentes de carbono, dicha versatilidad enzimática podría permitir sobrevivir a estos microorganismos en ambientes oligotróficos. Por otra parte, se ha reportado una estrecha relación entre bacterias con gran potencial en la producción de biosurfactantes y la capacidad de producir hemólisis en agar sangre (Ibrahim y Salah, 2019). Los biosurfactantes pueden ayudar a la adhesión de los consorcios bacterianos a la superficie del polímero (disminución de la hidrofobicidad), promoviendo la formación de biofilms y aumentando su biodisponibilidad (Ward, 2010). Por lo tanto, si las bacterias con actividad hemolítica encontradas en este estudio (14P,

16E, 28E, 11E, 9E, 18P y 3L) son capaces de producir biosurfactantes, podrían aumentar la biodisponibilidad de los polímeros y por ende su biodegradación.

Tabla 5. Características fenotípicas y bioquímicas de aislamientos con capacidad biodegradativa de polímeros PET y LDPE.

Código del Aislamiento	Fenotípicas					Pruebas Bioquímicas										
	Morfología	Tinción Gram	Espora	Forma biopelícula	Hemólisis	Citrato	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Ureasa	VP	RM	Catalasa	Movilidad	Descarboxilación de la lisina	Crecimiento a 50 °C
16E	b	-	+	+	β	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
19P	b	-	+	+	sc	-	sc	sc	sc	-	-	-	+	-	sc	+
28E	c	+	-	-	β	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
9L	b	+	+	+	γ	-	+	+	+	+	-	-	+	-	sc	+
11E	b	+	+	+	α	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
9E	b	+	+	+	α	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
13E	b	+	+	+	γ	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
3E	b	-	+	-	γ	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
9P	b	-	+	+	γ	-	+	-	-	-	-	-	+	-	sc	+
14P	b	-	+	+	α	-	+	+	+	+	-	-	+	-	sc	+
2E	b	-	+	-	sc	-	sc	sc	sc	+	sc	sc	+	-	sc	+
18P	b	-	+	+	α	-	sc	sc	sc	-	-	-	+	+	-	+
3L	b	-	+	-	α	-	sc	sc	sc	+	-	-	+	-	-	+
13L	b	+	+	+	γ	-	sc	sc	sc	-	-	-	+	-	-	+

VP: prueba Voges-Proskauer; RM: prueba de Rojo de Metilo; b: bacilo; c: coco; sc: sin crecimiento; +: positivo; -: negativo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La fuente termal “El Tragadero” localizada en la Región Cajamarca posee bacterias termófilas con potencial biodegradativo de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad.

En este estudio reportamos que las especies *Cytobacillus oceanisediminis*, *Bacillus spp.* y *Caldybacillus spp.* presentaron mayor porcentaje de degradación: 4.8 ± 4.2 %, $3,9 \pm 1.9$ % y 3.4 ± 2.5 % de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad, respectivamente.

C. oceanisediminis es reportada por primera vez biodegradando estos polímeros plásticos.

Las especies *Staphylococcus pasteuri*, *B. paralicheniformes*, *Neobacillus thermocopriae*, *B. licheniformis* y *Brevibacillus borstelensis* también presentaron actividad biodegradativa del polietileno de baja densidad y polietileno de tereftalato.

En este estudio también se encontró que las bacterias estudiadas pueden metabolizar hasta 0.00056 g de polímeros plásticos, lo que implicaría que, en un eventual ensayo real de biodegradación, se necesitarían entre 3.4 y 4.3 años para degradarlos a la mitad.

5.2 Recomendaciones

Realizar experimentos que consideren pre tratamientos físicos al polímero, como exponer a rayos UV, o simular condiciones ambientales para las pruebas de degradación con el fin de aumentar su biodisponibilidad al exponerlo a los microorganismos. También se sugiere evaluar diferentes tipos de pH y temperatura, para determinar qué condiciones son las más óptimas para las bacterias termófilas al utilizar a estos polímeros como fuente de carbono. Realizar la prueba de Sturm cambiando las botellas de absorción cada dos o tres días, para evitar pérdidas de CO₂.

LISTA DE REFERENCIAS

- Acuña Molina, N. (2017) *Revisión bibliográfica sobre los microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material*. Universidad Distrital Francisco Jose de Caldas.
- Altschul, S. F. *et al.* (1997) ‘Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs’, *Nucleic Acids Research*, 25(17), pp. 3389–3402. Available at:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC146917/pdf/253389.pdf>.
- Altschup, S. F. *et al.* (1990) ‘Basic Local Alignment Search Tool’, *Journal Molecular Biology*, pp. 403–410. Available at: <https://www.cs.cmu.edu/~durand/03-711/Readings/eserdurand14.pdf>.
- Amaia Bilbao Villena (2015) ‘Desengancharse del plástico. Problemas de un material ubicuo’, *Ecologistas En Accion*, p. 20.
- Ameen, F. *et al.* (2016) ‘Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia’, *Saudi Journal of Biological Sciences*. King Saud University, 23(2), pp. 211–218. Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X15000765>.
- Atanasova, N. *et al.* (2021) ‘Plastic Degradation by Extremophilic Bacteria’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22. doi:
doi.org/10.3390/ijms22115610.
- Auta, H. S., Emenike, C. U. and Fauziah, S. H. (2017) ‘Screening of Bacillus strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation’, *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 231, pp. 1552–1559. doi: doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.043.

- Banerjee, S. and Ghosh, U. (2021) ‘Production, purification and characterization of biosurfactant isolated from *Bacillus oceanisediminis* H2’, *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd, pp. 2–6. doi: doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.366.
- Van Beilen, J. *et al.* (2003) ‘Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment’, *Oil & Gas Science and Technology*, 58(4). Available at: https://ogst.ifpenergiesnouvelles.fr/articles/ogst/pdf/2003/04/vanbeilen_v58n4.pdf.
- Briseño, J. (2018) *Identificación molecular de cepas hidrocarbonoclastas nativas de suelo en sitios contaminados por petróleo crudo en Tabasco y Veracruz, México*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- British Plastics Federation (2018) *Polyethylene (Low Density) LDPE, LLDPE*.
- Coreño Alonso, J. and Méndez Bautista, M. T. (2010) ‘Relación estructura-propiedades de polímeros’, *Educación Química*. Elsevier, 21(4), pp. 291–299. Available at: <http://www.scielo.org.mx/pdf/eq/v21n4/v21n4a6.pdf>.
- Dąbrowska, G. B., Janczak, K. and Richert, A. (2021) ‘Combined use of *Bacillus* strains and *Miscanthus* for accelerating biodegradation of poly(lactic acid) and poly(ethylene terephthalate)’, *PeerJ*, 9, pp. 1–21. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8018249/>.
- Dang, T. C. H. *et al.* (2018) ‘Plastic degradation by thermophilic *Bacillus* sp. BCBT21 isolated from composting agricultural residual in Vietnam’, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. IOP Publishing, 9(1). Available at: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2043-6254/aaabaf/pdf>.
- Danso, D. *et al.* (2018) ‘New insights into the function and global distribution of

Polyethylene Terephthalate (PET) -Degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes', *Applied and Environmental Microbiology*, 84(8), pp. 1–13. doi: 10.1128/AEM.02773-17.

Das, M. P. and Santosh, K. (2015) 'An approach to low-density polyethylene biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens*', *Springer*, 5, pp. 81–86. Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-014-0205-1>.

Das, N. and Chandran, P. (2011) 'Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview', *Biotechnology Research International*, pp. 1–13. doi: <https://doi.org/10.4061/2011/941810>.

Doley, R. and Barthakur, M. (2017) 'Biodegradation of Naphthalene by *Staphylococcus pasteurii* RD2 Isolated from Oil Contaminated Soil', *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(12), pp. 1310–1319. Available at: [https://www.ijcmas.com/6-12-2017/Ruby Doley and Manoj Barthakur.pdf](https://www.ijcmas.com/6-12-2017/Ruby%20Doley%20and%20Manoj%20Barthakur.pdf).

Encyclopedia Britannica (2014) *Polyester*.

Encyclopedia Britannica (2021) *Polymer*.

Environmental Protection Agency (2018) *Facts and Figures about Materials, Waste and Recycling*.

EPA (1995) 'Poly (ethylene Terephthalate)', in *Organic Chemical Process Industry*, pp. 1–2.

Espinilla, M. (2017) *Estudio preliminar de la degradacion de plasticos por poblaciones bacterianas presentes en suelo del Complejo Ambiental de Arico*. Universidad de La Laguna.

Farzi, A., Dehnad, A. and Fotouhi, A. F. (2019) 'Biodegradation of polyethylene

terephthalate waste using *Streptomyces* species and kinetic modeling of the process', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 17, pp. 25–31. doi: doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.002.

Gonzales, V., Claverías, F. and Cámara, B. (2014) *Aislamiento y caracterización de Actinobacterias de ambientes extremos y búsqueda de su potencial rol en biotecnología*. Chile.

Gu, Y. *et al.* (2020) 'Effects of Air Injection on the Metabolic Activity of Emulsifier-Producing Bacteria from Oil Reservoirs', *Geofluids*. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/geofluids/2020/8987258/>.

Gutierrez Taipe, K. Y. (2018) *Influencia de factores ambientales de crecimiento microbiano en la degradación de polietileno de baja densidad por la bacteria pseudomona aeruginosa en Huancayo*. Universidad Continental.

Hadad, D., Geresh, S. and Sivan, A. (2005) 'Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*', *Journal Applied Microbiology*, 98(5), pp. 1093–1100. doi: doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x.

Harshvardhan, K. and Jha, B. (2013) 'Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters , Arabian Sea , India', *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier Ltd, 77(1–2), pp. 100–106. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.10.025.

Hentati, D. *et al.* (2021) 'Investigation of halotolerant marine *Staphylococcus* sp. CO100, as a promising hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacterium, under saline conditions', *Journal of Environmental Management*. Elsevier Ltd, 277. doi: doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111480.

- Hiraga, K. *et al.* (2019) 'Biodegradation of waste PET', *EMBO reports*, 20(11), pp. 1–5.
doi: 10.15252/embr.201949365.
- Hu, X. *et al.* (2010) 'Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, pp. 771–779.
doi: 10.1007/s00253-010-2555-x.
- Huerta Lwanga, E. *et al.* (2018) 'Decay of low-density polyethylene by bacteria extracted from earthworm's guts: A potential for soil restoration', *Science of the Total Environment*. The Authors, 624, pp. 753–757. doi: doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.144.
- Ibaza, Y. (2018) *Biodiversidad microbiana de las aguas termales 'Santagua de Chachimbiro' en la provincia de Imbabura: Búsqueda de microorganismos con propiedades biotecnológicas*. Universidad Central del Ecuador.
- Ibrahim, Y. and Salah, W. (2019) 'Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil-Contaminated Water', *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 16(04), pp. 833–841. Available at: <http://www.biotech-asia.org/vol16no4/isolation-and-characterization-of-biosurfactant-producing-bacteria-from-oil-contaminated-water/>.
- Ingavale, R. R. and Raut, P. D. (2018) 'Comparative biodegradation studies of LDPE and HDPE using *Bacillus weihenstephanensis* isolated from garbage soil', *Nature Environment and Pollution Technology*, 17(2), pp. 649–655. Available at: [http://www.neptjournal.com/upload-images/NL-64-45-\(43\)B-3528.pdf](http://www.neptjournal.com/upload-images/NL-64-45-(43)B-3528.pdf).
- Iparraguirre, K. and Vivanco, M. (2015) *Aislamiento y caracterización de hongos*

filamentosos biodegradadores de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad-Ica. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.

Khalil, A. *et al.* (2018) ‘Insights into *Brevibacillus borstelensis* AK1 through Whole Genome Sequencing : A Thermophilic Bacterium Isolated from a Hot Spring in Saudi Arabia’, *BioMed Research International*. doi: doi.org/10.1155/2018/5862437.

Khanpour-alikelayeh, E. *et al.* (2020) ‘Investigation of *Bacillus licheniformis* in the biodegradation of Iranian heavy crude oil : A two-stage sequential approach containing factor-screening and optimization’, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier Inc., 205(July), p. 111103. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651320309428?via%3Dihub>.

Kublanov, I. V *et al.* (2009) ‘Biodiversity of thermophilic prokaryotes with hydrolytic activities in hot springs of Uzon Caldera , Kamchatka (Russia)’, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), pp. 286–291. Available at: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/AEM.00607-08>.

Kumar, A. G. *et al.* (2021) ‘Biodegradation of polystyrene by deep-sea *Bacillus paralicheniformis* G1 and genome analysis’, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 774, p. 145002. doi: doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145002.

Larsson, A. (2014) ‘AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets’, *Bioinformatics*, 30(22), pp. 3276–3278. doi: doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531.

Leahy, J. G. and Colwell, R. R. (1990) ‘Microbial Degradation of Hydrocarbons in the

Environment', *Microbiological Reviews*, 54(3), pp. 305–315. doi:
doi.org/10.1128/mr.54.3.305-315.1990.

Liu, C. *et al.* (2015) 'Effects of Fe²⁺, Co²⁺ and Ni²⁺ ions on biological methane production from residual heavy oil', *China Petroleum Processing and Petrochemical Technology*, 17(2), pp. 32–38. Available at:
<https://www.semanticscholar.org/paper/Effects-of-Fe-2%2B-%2C-Co-2%2B-and-Ni-2%2B-Ions-on-Methane-Liu-Chunshuang/fd76e6c6ebddef3d8affa744e5ea91da87f8f7d7>.

Méndez, C. R. *et al.* (2007) 'Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno', *Revista Peruana de Biología*, 13(3), pp. 203–205. Available at:
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v13n3/v13n03a08.pdf>.

MINAM (2017) 'Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen Disposiciones Complementarias', pp. 10–19.

MINAM (2018) *MINAM: El plástico representa el 10% de todos los residuos que generamos en el Perú, Ministerio del Ambiente.*

Miri, S. *et al.* (2022) 'Biodegradation of microplastics: Better late than never', *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 286(P1), p. 131670. doi:
10.1016/j.chemosphere.2021.131670.

Mohanrasu, K. *et al.* (2018) 'Exploring multi potential uses of marine bacteria; an integrated approach for PHB production, PAHs and polyethylene biodegradation', *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.05.014.

Montazer, Z., Najafi, M. B. H. and Levin, D. B. (2020) 'Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene', *Polymers*, 12(1). Available at:

<https://www.mdpi.com/2073-4360/12/1/123>.

Muhonja, C. *et al.* (2018) ‘Molecular Characterization of Low-Density Polyethylene (LDPE) Degrading Bacteria and Fungi from Dandora Dumpsite , Nairobi , Kenya’, *International Journal of Microbiology*. doi: doi.org/10.1155/2018/4167845.

Mukherjee, S., RoyChaudhuri, R. and Kundu, P. (2015) ‘Bio-degradation of Polyethylene Waste by Simultaneous Use of Two Bacteria: *Bacillus licheniformis* for production of Bio-surfactant and *Lysinibacillus fusiformis* for Bio- degradation. Shritama’, *RSC Advances*, 6(4). Available at: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c5ra25128a>.

Mukherjee, S., RoyChaudhuri, U. and Kundu, P. P. (2017) ‘Bio-degradation of polyethylene via complete solubilisation by the action of *Pseudomonas fluorescens*, bio-surfactant produced by *Bacillus licheniformis* and anionic surfactant’, *Journal of Chemical and Biotechnology*. doi: doi.org/10.1002/jctb.5489.

Muñoz Inostroza, S. (2014) *Degradación de polímeros de interés industrial utilizando una mezcla de Pseudomonas aeruginosa , Cladosporium sp y Alternaria sp* . Universidad Santo Tomás.

Muro, L. *et al.* (2012) ‘Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir Multi-species biofilms: association to survive’, *Investigacion y Ciencia*, 20(54), pp. 49–56. Available at: <https://biblat.unam.mx/hevila/InvestigacionycienciaUniversidadautonomadeaguascalientes/2012/vol20/no54/7.pdf>.

Oliart, R., Manresa, Á. and Sánchez, M. (2016) ‘Utilización de microorganismos de

ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico’,
CienciaUAT, 11(1), pp. 79–90. Available at:

<http://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v11n1/2007-7858-cuat-11-01-00079.pdf>.

Partovinia, A., Abolhasani, A. and Koosha, M. (2021) ‘Synergistic adsorption and biodegradation of heavy crude oil by a novel hybrid matrix containing immobilized *Bacillus licheniformis*: Aqueous phase and soil bioremediation’, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier Inc., 222, p. 112505. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112505.

Pepper, I. L., Gerba, C. P. and Gentry, T. J. (2015) *Environmental Microbiology*. 3rd edn.

Pramila, R. and Vijaya, R. (2011) ‘Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water- a SEM analysis’, *African Journal of Microbiology Research*, 5(28), pp. 131–136. Available at:
<https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/296918417039>.

Puglisi, E. *et al.* (2019) ‘Selective bacterial colonization processes on polyethylene waste samples in an abandoned landfill site’. doi: 10.1038/s41598-019-50740-w.

R. Pramila *et al.* (2012) ‘*Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas citronellolis* - Potential candidates for biodegradation of low density polyethylene (LDPE)’, *Journal of Bacteriology Research*, 4(1), pp. 9–14. doi: DOI:10.5897/JBR12.003.

Restrepo-Flórez, J. M., Bassi, A. and Thompson, M. R. (2014) ‘Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review’, *International*

Biodeterioration and Biodegradation. Elsevier Ltd, 88, pp. 83–90. doi:
doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014.

Román Guillén, G. A. (2011) *Evaluación del diseño de infraestructura de disposición de residuos sólidos del ámbito municipal de Cajamarca, Distrito de Jesus, provincia de Cajamarca, departamento de Cajamarca*. Universidad Nacional de Ingeniería.

Rosario, L. L. D. and Baburaj, S. (2017) ‘Isolation and Screening of Plastic Degrading Bacteria from Polythene Dumped Garbage Soil’, *IJRASET*, pp. 1028–1032.

Sachaniya, B. K. *et al.* (2020) ‘Bioengineering for multiple PAHs degradation for contaminated sediments: Response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN)’, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Elsevier Ltd, 202. doi:
doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.104033.

Saitou, N. and Nei, M. (1987) ‘The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phulogenetic Trees’, *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), pp. 406–425. doi: doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Salazar, V. (2017) *Biodecoloración de tintes sintéticos industriales por bacterias termófilas con actividad enzimática tipo lacasa*. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, R. (1997) ‘DNA sequencing with chain-terminating inhibitors’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12). Available at:
<https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.74.12.5463>.

Segura, D., Noguez, R. and Espín, G. (2007) ‘Contaminación ambiental y bacterias

productoras de plásticos biodegradables', *Biotecnología*, 14(3), pp. 361–372.

Sen, S. K. and Raut, S. (2015) 'Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review', *Journal of Environmental Chemical Engineering*. Elsevier B.V., 3(1), pp. 462–473. doi: doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003.

Shah, A. A. *et al.* (2015) 'Degradation of poly(ϵ -caprolactone) by a thermophilic bacterium *Ralstonia* sp. strain MRL-TL isolated from hot spring', *International Biodeterioration and Biodegradation*, 98, pp. 35–42. doi: doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.11.017.

Sivan, A. (2011) 'New perspectives in plastic biodegradation', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 22(3), pp. 422–426. doi: doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.013.

Skariyachan, S. *et al.* (2017) 'Enhanced biodegradation of low and high-density polyethylene by novel bacterial consortia formulated from plastic-contaminated cow dung under thermophilic conditions', *Environmental Science and Pollution Research*. Environmental Science and Pollution Research, 24(9). doi: 10.1007/s11356-017-8537-0.

Skariyachan, S. *et al.* (2018a) 'Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants', *Polymer Degradation and Stability*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.01.018.

Skariyachan, S. *et al.* (2018b) 'Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and

- Aneurinibacillus sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants’, *Polymer Degradation and Stability*. Elsevier Ltd. doi: doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.01.018.
- Suasnavas, D. (2017) *Degradación de materiales plásticos ‘PET’ (polyethylene terephthalate), como alternativa para su gestión*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Tamariz, C. del R. (2014) *Diversidad de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas aisladas de fuentes termales del Callejon de Huaylas*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Tamura, K. *et al.* (2007) ‘MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0’, *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), pp. 1596–1599. doi: doi.org/10.1093/molbev/msm092.
- Tkachuk, N. and Zelena, L. (2021) ‘The Impact of Bacteria of the Genus Bacillus upon the Biodamage/Biodegradation of Some Metals and Extensively Used Petroleum-Based Plastics’, *Corrosion and Materials Degradation*, 2(4), pp. 531–553. Available at: <https://www.mdpi.com/2624-5558/2/4/28>.
- Tokiwa, Y. *et al.* (2009) ‘Biodegradability of plastics’, *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), pp. 3722–3742. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms10093722>.
- Torres-Ceron, D. A., Acosta-Medina, C. D. and Restrepo-Parra, E. (2019) ‘Geothermal and mineralogic analysis of hot springs in the Puracé-La Mina Sector in Cauca, Colombia’, *Geofluids*. Hindawi Limited, 2019. doi: doi.org/10.1155/2019/3191454.
- Tribedi, P. and Sil, A. K. (2013) ‘Low-density polyethylene degradation by Pseudomonas sp. AKS2 biofilm’, *Environmental Science and Pollution*

Research, 20(6), pp. 4146–4153. doi: 10.1007/s11356-012-1378-y.

- Uchida, H. *et al.* (2000) ‘Properties of a bacterium which degrades solid poly(tetramethylene succinate)-co-adipate, a biodegradable plastic’, *FEMS Microbiology Letters*, 189(1), pp. 25–29. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09201.x.
- Uribe, D. *et al.* (2010) ‘Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú’, *Revista peruana de Biología*, 17(1), pp. 133–136. doi: 10.15381/rpb.v17i1.62.
- USEPA (2001) *Methods for Collection, Storage and Maripulation of Sediment for chemical and toxicological analyses: Technical Manual*.
- Villa, R., Fernández, E. and Castillo, G. (2012) *Manual de Prácticas de Laboratorio, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
- Vimala, P. P. and Mathew, L. (2016) ‘Biodegradation of Polyethylene using *Bacillus Subtilis*’, *Procedia Technology*. The Author(s), 24, pp. 232–239. doi: doi.org/10.1016/j.protcy.2016.05.031.
- Wei, R., Oeser, T. and Zimmermann, W. (2014) ‘Synthetic Polyester-Hydrolyzing Enzymes From Thermophilic Actinomycetes’, in *Advances in Applied Microbiology*. 1st edn. Elsevier Inc., pp. 267–305. doi: 10.1016/B978-0-12-800259-9.00007-X.
- Wright, M., Adelskov, J. and Greene, A. (2017) ‘Bacterial DNA extraction using individual enzymes and phenol/chloroform separation’, *J Microbiol Biol Educ*, 18(2). doi: doi.org/10.1128/jmbe.v18i2.1348.
- Yepes Aguirre, L. M. (2014) *Degradación de polietileno de baja densidad utilizando hongos. Revisión sistemática de la literatura*, *Journal of Chemical*

Information and Modeling. Pontificia Universidad Javeriana. doi:
10.1017/CBO9781107415324.004.

Yoshida, S. *et al.* (2016) 'A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)', *Science*, pp. 1–5.

Zahari, N. Z. *et al.* (2021) 'Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) and starch – based plastic (SBP) by thermophiles *Bacillus subtilis* and *Candida tropicalis*', *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1173. doi: 10.1088/1757-899X/1173/1/012035.

Zhang, J. *et al.* (2004) 'A Study on the Biodegradability of Polyethylene Terephthalate Fiber and Diethylene Glycol Terephthalate'. doi:
doi.org/10.1002/app.20556.

APÉNDICES

Apéndice 1. Lugar de muestreo “El Tragadero”, Baños del Inca-Cajamarca



Figura 6. Fuente termal El Tragadero.

Tabla 6. Coordenadas de geolocalización de la fuente termal “El Tragadero”.

Parámetro	Coordenadas		
Latitud	-7°	9'	53.18”
Longitud	-18°	27'	25.77”

Apéndice 2. Puntos de muestreo y tipos de muestras colectadas

Tabla 7. Ficha de toma de datos.

FECHA: 12/02/2020		COORDENADAS POR GPS:		ALTITUD: 2566 m.s.n.m.		
LUGAR: El Tragadero		E: 78 08 49. 31 N: 9 207 257. 83 Z: 2 674. 02				
DISTRITO: Baños del Inca		PROVINCIA: Cajamarca		DEPARTAMENTO: Cajamarca		
CÓDIGOS	MUESTRAS			PARÁMETROS FÍSICO -QUÍMICOS		
	TApolietileno de tereftalatoE	SEDIMENTO	BIOPELÍCULA	TEMPERATURA (°C)	pH	POTENCIAL REDOX (mv)
Punto 1	ET – TP 1	ET – SE 1.1 ET – SE 1.2	ET – BP 1	70.2	6.2	-
Punto 2	ET – TP 2	ET – SE 2	-	65.6	6.45	19
Punto 3	ET – TP 3	ET – SE 3	-	65	6.44	19
Punto 4	ET – TP 4	ET – SE 4	-	65	6.42	18
Punto 5	ET – TP 5	ET – SE 5	-	65	-	-
Punto 6	ET – TP 6	ET – SE 6	-	65	-	-
Punto 7	ET – TP 7	ET – SE 7	-	69	6.27	30
Punto 8	ET – TP 8	ET – SE 8	ET – BP 8 (Sumergida)	65	6.43	17.4
Punto 9	ET – TP 9		ET – BP 9	BP: 67.1 TP: 66.2	BP: 6.50 TP: 6.52	BP: 14.3 TP: 15.1



Figura 7. Tapetes microbianos en la superficie de la fuente termal El Tragadero.



Figura 8. Presencia de sedimento en la fuente termal El Tragadero.



Figura 9. Presencia de Biofilm en la fuente termal El Tragadero.



Figura 10. Colección de muestras: a) Tapetes microbianos, b) sedimento y c) Biofilm.

Apéndice 3. Caracterización morfológica y cultural

Tabla 8. Cepas bacterianas aisladas a partir del enriquecimiento *ex situ* -polietileno de baja densidad.

Cepas bacterianas aisladas de	Aislados	Tinción Gram	Morfolología	
			Colonias	Células
Biofilms	16 E	-	Form: Irregular Eleva: convex Marg: undulate Text: Smooth Color: Cristal Light: translucent	Bacilos largos, cadenas (2-4), agrupados. Espora central
	17 E	+	Form: circular Eleva: raised Marg: entero Text: smooth Color: Cream Light: Opaque	Bacilos G +, cortos, delgados, agrupados, en cadenas (2-4). Esporas deformantes
Sedimento	19 E	-	Form: circular Eleva: umbonate Marg: undulate Text: Smooth Color: cream Light: opaque	Bacilo, cortos, cadena (2), delgados.
	20 E	-	Form: irregular Eleva: flat Marg: filiforme Text: Smooth Color: cream Light: opaque	Bacilos cortos, agrupado (2), delgados. Espora deformante.
	21 E	-	Form: irregular Eleva: flat Marg: filiforme Text: Smooth Color: blanco (centro amarillo) Light: opaque	Bacilos cortos, gordos, en cadenas de 2.
	22 E	+	Form: irregular Eleva: crateriform Marg: umbonate Text: rough Color: white Light: opaque	Bacilos anchos, agrupados. Espora deformante.
	23 E	-	Form: irregular Eleva: convex Marg: undulate Text: rough Color: white Light: opaque	Bacilos pequeños. Espora deformante

Tapetes microbianos	25 E	+	Form: Circular Eleva: Raised Marg: Entire Text: Smooth Color: Cristal Light: translucent	Bacilo G-, cadenas (2-4), agrupadas, espora deformante.
	26 E	+	Form: Circular Eleva: umbonate Marg: undulate Text: Smooth Color: crema Light: Opaque	Bacilos cortos, gordos, en cadenas. Espora deformante
	28 E	+	Form: Punctiform Eleva: Convex Marg: Entire Text: Smooth Color: yellow Light: opaque	Cocos

Form: forma, Eleva: elevación, Marg: margen, Text: textura, Color: color, Light: luz.

Tabla 9. Cepas bacterianas aisladas a partir del enriquecimiento *ex situ* - polietileno de tereftalato.

Cepas bacterianas aisladas de	Aislados	Tinción Gram	Morfología	
			Colonias	Células
Biofilms	2 E	-	Form: circular Eleva: umbonate Marg: Undulate Text: Smooth Color: Cream Light: opaque	Bacilos cortos, agrupados, esporas deformantes
	3 E	-	Form: circular Eleva: Flat Marg: lobate Text: rough Color: Cream Light: Opaque	Short rod-shape, in groups, subterminal spore.
Tapetes microbianos	11 E	+	Form: irregular Eleva: flat Marg: lobate Text: dry Color: Cream Light: opaque	Bacilos cortos, cadenas (2-4). Espora deformante.
	13 E	+	Form: irregular Eleva: Convex Marg: undulate Text: Smooth Color: Cristal Light: translucent	Bacilos cortos, delgados, agrupa (2-4). Espora deformante.

Sedimento	8 E	-	Form: Punctiform Eleva: Convex Marg: Entire Text: Smooth Color: yellow Light: opaque	Bacilos cortos, gordos, en cadenas (2 -4). Esporas
Saco (extra)	9 E	+	Form: Punctiform Eleva: Convex Marg: Entire Text: Smooth/dry Color: Cream Light: opaque	Bacilos cortos, pequeños, en cadena (2-3), espora deformante.
	10 E	+	Form: irregular Eleva: flat Marg: undulate Text: Smooth Color: yellow Light: opaque	Bacilos pequeños, delgados, agrupados.

Form: forma, Eleva: elevación, Marg: margen, Text: textura, Color: color, Light: luz.

Tabla 10. Cepas bacterianas aisladas a partir del enriquecimiento *in situ* - polietileno de baja densidad.

Aislados	Tinción Gram	Morfología	
		Colonias	Células
1 L	-	Form: circular Eleva: Convex Marg: Entire Text: Smooth Color: Crema Light: opaco	Bacilos pequeños, delgados
2 L	-	Form: circular Eleva: umbonate Marg: entero Text: liso Color: amarillo Light: opaque	Bacilos largos, agrupagos
3 L	-	Form: irregular Eleva: umbonate Marg: undulate Text: liso Color: crema Light: opaque	
4 L	-	Form: irregular Eleva: flat Marg: entero Text: liso Color: crema Light: opaque	Bacilos cortos

5 L	-	Form: circular Eleva: flat Marg: entero Text: liso Color: crema Light: opaque	Bacilos grandes, cadenas 2-4
6 L	-	Form: rizoide Eleva: flat Marg: undulate Text: liso Color: crema Light: opaque	Bacilos anchos, cadenas 2-4
7 L	-	Form: irregular Eleva: flat Marg: undulate Text: liso Color: crema Light: opaque	Bacilos anchos
8 L	-	Form: irregular Eleva: flat Marg: undulate Text: liso Color: rosa pálido Light: opaque	Bacilos, cadenas 2-4, esporas deformantes
9 L	+	Form: irregular Eleva: umbonate Marg: undulate Text: rugoso Color: crema Light: opaque	Bacilos, pequeñitos
10 L	-	Form: circular Eleva: flat Marg: undulate Text: chicle Color: rosa pálido Light: opaque	Bacilos, delgados, cadenas 2-3.
11 L	+	Form: circular Eleva: convexo Marg: entero Text: liso Color: cream Light: opaque	Bacilos cortos, agrupado
12 L	-	Form: circular Eleva: flat Marg: entero Text: liso Color: crema Light: opaco	Bacilos, espora deformante.
13 L	+	Form: circular Eleva: flat Marg: entero Text: suave Color: white Light: amarillo	Bacilos G +, gordos, agrupados.

14 L	-	Form: circular Eleva: umbonate Marg: undulate Text: suave Color: white-crema Light: opaco	Bacilos G-, delgados, cortos.
16 L	+	Form: irregular Eleva: crateriforme Marg: undulate Text: rugoso Color: Crema Light: opaco	Bacilos pequeños
17 L	+	Form: Circular Eleva: flat Marg: undulate Text: suave Color: cremoso Light: Opaco	Bacilos cortos

Form: forma, Eleva: elevación, Marg: margen, Text: textura, Color: color, Light: luz.

Tabla 11. Cepas bacterianas aisladas a partir del enriquecimiento *in situ* - polietileno de tereftalato.

Aislados	Tinción Gram	Morfología	
		Colonias	Células
1 P	-	Form: filamentosa Eleva: crateriforme Marg: rizoide Text: rugosa Color: Cream Light: opaque	Bacilos cortos, cadenas 2, esporas deformantes.
2 P	-	Form: circular Eleva: flat Marg: Undulate Text: lisa Color: Cream Light: opaque	Bacilos cortos, gordos. Agrupados, esporas
3 P	-	Form: irregular Eleva: Flat Marg: undulate Text: lisa Color: Amarillo bajito Light: Opaque	Bacilos pequeñitos, cadenas 2-4, esporulado.
4 P	-	Form: irregular Eleva: raised Marg: undulate Text: lisa Color: Amarillo Light: Opaque	Bacilos cortos, cadenas 2-3
		Form: circular Eleva: raised	Bacilos pequeñitos, esporulado

5 P	-	Marg: entero Text: lisa Color: Amarillo bajito Light: Opaque	
6 P	-	Form: irregular Eleva: flat Marg: undulate Text: liso Color: Cream Light: opaque	Bacilos cortos, esporulados.
7 P	±	Form: irregular Eleva: umbonate Marg: undulate Text: rugoso Color: Cream Light: opaque	Bacilos cortos, espora deformante
8 P	-	Form: Circular Eleva: crateriforme Marg: Entero Text: liso Color: crema Light: Opaque	Bacilos anchos, delgados, cadenas de 2-3.
9 P	-	Form: Circular Eleva: flat Marg: undulate Text: liso Color: Cream Light: opaque	Bacilos, esporulados.
10 P	-	Form: irregular Eleva: flat Marg: undulate Text: liso Color: Crema Light: opaque	Bacilos agrupados,
11 P	-	Form: irregular Eleva: flat Marg: undulate Text: liso Color: rosa pálido Light: opaque	Bacilos anchos, cadenas 3-4
13 P	-	Form: irregular Eleva: flat Marg: undulate Text: liso Color: amarillo Light: opaque	Bacilos cortos
14 P	-	Form: rizoide Eleva: flat Marg: undulate Text: liso Color: amarillo Light: opaco	Bacilos delgados, esporulado
		Form: circular Eleva: umbonate	Bacilos cortos, delgados, esporulado.

15 P	-	Marg: entero Text: liso Color: crema Light: opaco	
16 P	-	Form: circular Eleva: umbonate Marg: Entero Text: liso Color: amarillo Light: opaque	Bacilos pequeños
17 P	-	Form: irregular Eleva: crateriforme Marg: undulate Text: rugoso Color: cremoso Light: opaque	Bacilos cortos
18 P	-	Form: circular Eleva: raised Marg: entero Text: rugoso Color: cremoso Light: opaque	Bacilos anchos, delgados, cadenas 2
19 P	-	Form: irregular Eleva: crateriforme Marg: undulate Text: rugoso Color: cremoso Light: opaque	Bacilos cortos, delgados
20 P	+	Form: circular Eleva: flat Marg: entero Text: liso Color: cremoso Light: opaque	Bacilos cortos
21 P	\pm	Form: circular Eleva: umbonate Marg: undulate Text: rugoso Color: blanco Light: opaque	Bacilos cortos, espora deformante
22 P	\pm	Form: irregular Eleva: umbonate Marg: undulate Text: suave Color: cremoso Light: opaque	Bacilos, espora deformante

Form: forma, Eleva: elevación, Marg: margen, Text: textura, Color: color, Light: luz.

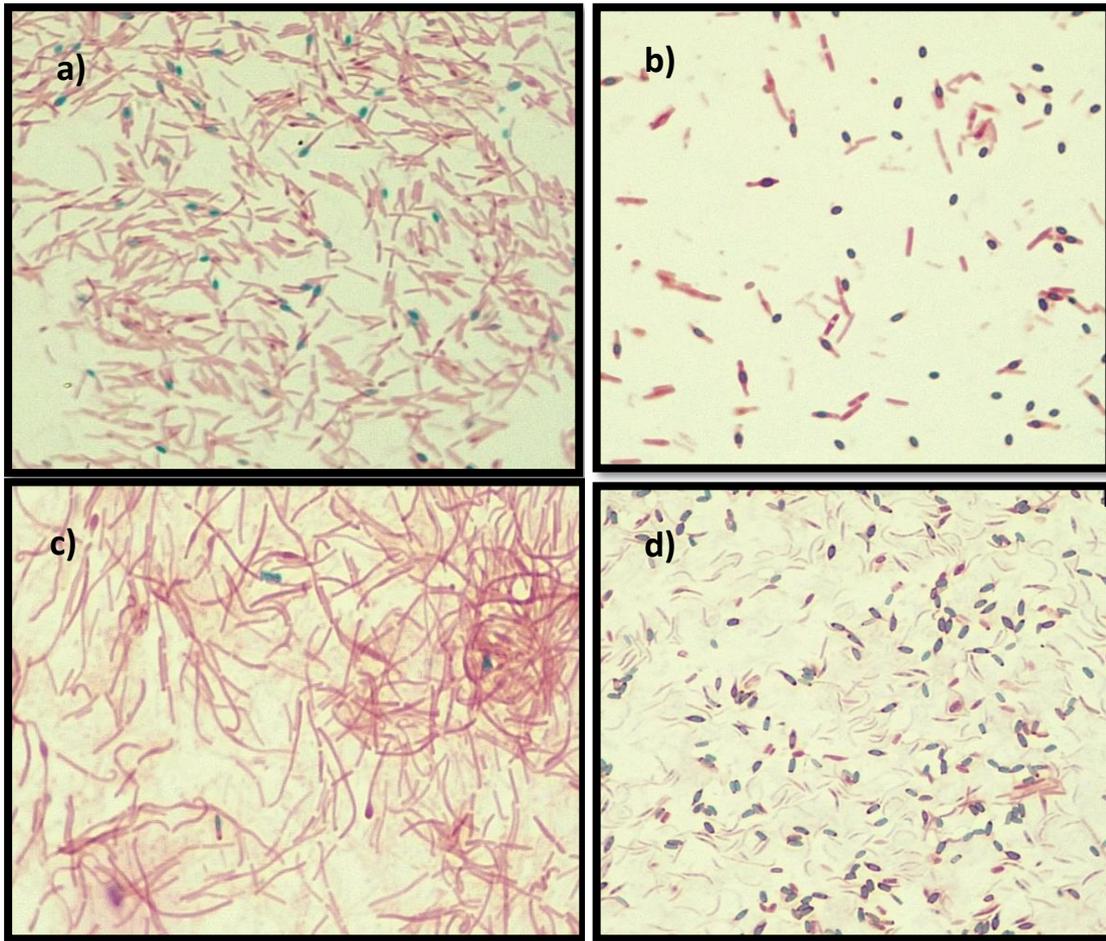


Figura 11. Tinción de esporas, observación a 1000x. a) Aislado 14P, esporas terminales deformantes. b) Aislado 13L, esporas subterminales deformantes. c) Aislado 2E, esporas subterminales. d) Aislado 9P, esporas centrales deformantes.

Apéndice 4. Análisis estadísticos

Tabla 12. ANOVA y prueba de Tukey ($p > 0.5$), (α , 0.05).

ANOVA					
Sources	SS	df	MS	F	P value
Between Groups	44.451	11	4.041	1.00119	0.4958
Within Groups	48.435	12	4.0362		
Total	92.886	23	4.0385		

Q TEST							
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value
C- PET	18P	0.34	1.42060067	0.23933538	-7.63667274	8.31667274	1
C- PET	19P	4.36	1.42060067	3.06912428	-3.61667274	12.3366727	0.59262272
C- PET	14P	2.955	1.42060067	2.08010602	-5.02167274	10.9316727	0.92347201
C- PET	13E	0.22	1.42060067	0.15486407	-7.75667274	8.19667274	1
C- PET	9P	0.18	1.42060067	0.12670697	-7.79667274	8.15667274	1
C- PET	2E	0.225	1.42060067	0.15838371	-7.75167274	8.20167274	1
C- PET	11E	0.145	1.42060067	0.1020695	-7.83167274	8.12167274	1
C- PET	9E	0.175	1.42060067	0.12318733	-7.80167274	8.15167274	1
C- PET	3E	0.125	1.42060067	0.08799095	-7.85167274	8.10167274	1
C- PET	8P	0.145	1.42060067	0.1020695	-7.83167274	8.12167274	1
C- PET	21P	0.385	1.42060067	0.27101212	-7.59167274	8.36167274	1

Tabla 13. ANOVA - comparación entre grupos (bajo, medio y alto), ($p < 0.001$).

ANOVA

Porcentaje Peso Perdido (%).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	25,477	2	12,738	121,045	,000
Dentro de grupos	1,158	11	,105		
Total	26,635	13			

Tabla 14. ANOVA y en las pruebas de Tukey y Bonferroni ($p < 0,001$).

	(I) Grupo según nivel	(J) Grupo según nivel	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	Alto	Medio	3,0083333*	,2477668	,000	2,339151	3,677516
		Bajo	3,4061905*	,2238593	,000	2,801579	4,010802
	Medio	Alto	-3,0083333*	,2477668	,000	-3,677516	-2,339151
		Bajo	,3978571	,2033303	,169	-,151309	,947024
	Bajo	Alto	-3,4061905*	,2238593	,000	-4,010802	-2,801579
		Medio	-,3978571	,2033303	,169	-,947023	,151309
Bonferroni	Alto	Medio	3,0083333*	,2477668	,000	2,309623	3,707044
		Bajo	3,4061905*	,2238593	,000	2,774900	4,037481
	Medio	Alto	-3,0083333*	,2477668	,000	-3,707044	-2,309623
		Bajo	,3978571	,2033303	,229	-,175541	,971255
	Bajo	Alto	-3,4061905	,2238593	,000	-4,037481	-2,774900
		Medio	-,3978571	,2033303	,229	-,971255	,175541

* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

Tabla 15. Según tipo de plástico (p>0.5). Análisis de k y $t_{1/2}$ (p>0.5).

Aislado	Especie	Tipo	BX	Grupo	Porcentaje	Velocidad	Tiempo
2E	<i>Neobacillus thermocopriae</i>	PET	NBL	Bajo	,6450	,0000715	10312,12
11E	<i>Bacillus licheniformis</i>	PET	BL	Bajo	,5650	,0000627	11062,18
13E	<i>Bacillus licheniformis</i>	PET	BL	Bajo	,6400	,0000712	10055,13
3E	<i>Bacillus licheniformis</i>	PET	BL	Bajo	,5450	,0000611	11355,48
9E	<i>Bacillus licheniformis</i>	PET	BL	Bajo	,5950	,0000664	10455,86
9L	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	LDPE	NBL	Bajo	,6600	,0000738	13385,60
13L	<i>Bacillus spp</i>	LDPE	NBL	Medio	1,245	,0000202	38143,11
16E	<i>Bacillus spp</i>	LPDE	NBL	Alto	3,8850	,0004425	2090,15
18P	BGNNI	PET	NBL	Medio	,7600	,0000847	9132,25
3L	BGNNI	LDPE	NBL	Medio	1,1000	,0001250	2784,97
9P	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	PET	NBL	Bajo	,6000	,0000670	11057,35
14P	<i>Caldibacillus spp</i>	PET	NBL	Alto	3.3750	,0000385	3983,01
19P	<i>Cytobacillus oceanisediminis</i>	PET	NBL	Alto	4,7800	,0005550	6105,40
28E	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	LDPE	NBL	Medio	,9150	,0001050	7940,64

BGNNI: bacterias Gram negativas no identificadas. NBL: no *Bacillus licheniformis*,
BL: *Bacillus licheniformis*.

Tabla 16. Igualdad de las medias. Prueba T Student. (p<0.038). No se asume varianzas iguales.

Porcentaje Peso Perdido (%)	Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales
Velocidad de reducción (g/día)	Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales
Tiempo de vida media del polímero	Se asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales

Prueba t para la igualdad de medias.

t	gl	sig. (bilateral)	Diferencia de medias	diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
					Inferior	Superior
-1,496	12	,161	-1.2102500	,8091870	-2,9733169	,5528169
-2,421	9,031	,038	-1.2102500	,4998110	-2,3403147	-,0801853
-,987	12	,343	-,0000929850	,0000941654	-,0002981538	,0001121838
-1,599	9,827	,144	-,0000929850	,0000581579	-,0002244874	,0000385174
,045	12	,965	238,70282	-11376,02941	-11376,02941	11853,43504
,072	9,142	,944	238,70282	-7212,22212	-7212,22212	7689,62775

Apéndice 5. Observación macroscópica del PET y LDPE

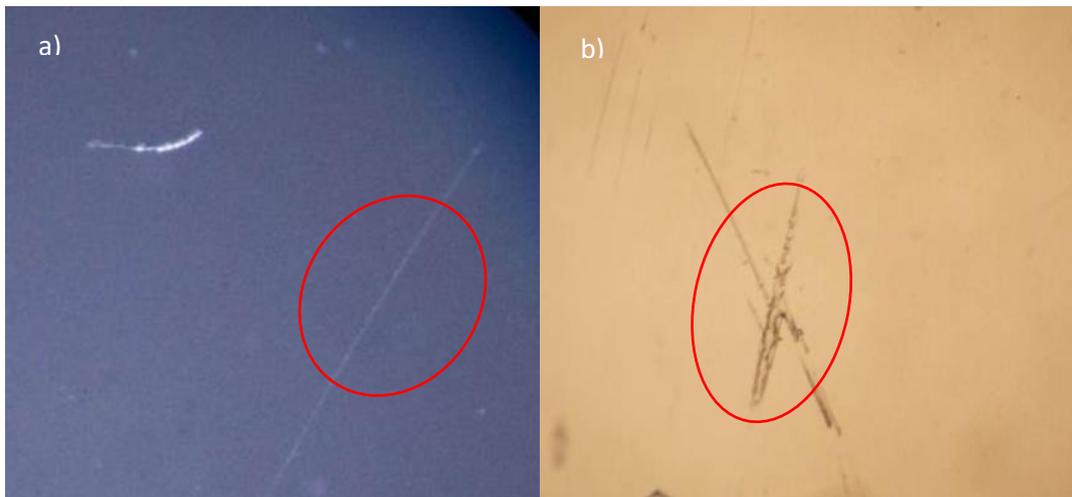


Figura 12. Cambios superficiales en el polietileno de baja densidad. Aumento 400x a) Control polietileno de baja densidad b) polietileno de baja densidad tratado con el cultivo 13L.

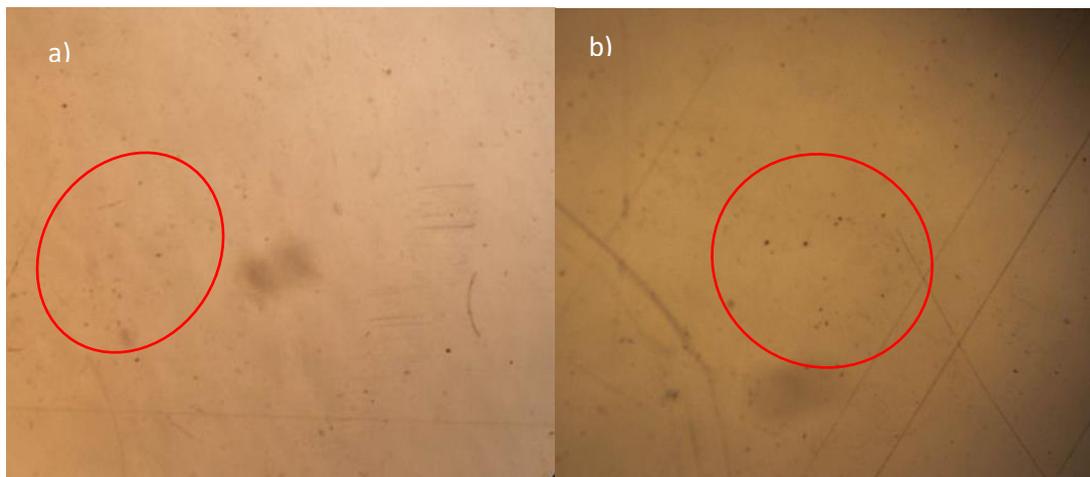


Figura 13. Cambios superficiales en el polietileno de tereftalato. Aumento 400X. a) Control polietileno de tereftalato; b) polietileno de tereftalato tratado con el cultivo 14P.