



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA Y
BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

**BIODEGRADACIÓN DEL TEREFTALATO DE POLIETILENO POR CEPAS
BACTERIANAS TERMÓFILAS DE LA FUENTE TERMAL DE QUILCATE-
CAJAMARCA**

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

PRESENTADO POR:

BACH. RUBEN GONZALES VALIENTE

ASESOR:

Mblgo. LUIS FELIPE VALDEZ NUÑEZ

CAJAMARCA-PERÚ

2024

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. **Investigador:** Ruben Gonzales Valiente
DNI N° 76087266
Escuela Profesional: Biología y Biotecnología
2. **Asesor:** Mblgo. Luis Felipe Valdez Nuñez
Facultad: Ciencias de la salud
3. **Grado académico o título profesional:**
 Bachiller Título profesional Segunda especialidad
 Maestro Doctor
4. **TIPO DE INVESTIGACION:**
 Tesis Trabajo de investigación Trabajo de sustentación profesional
 Trabajo académico
5. **Título de trabajo de investigación:** “Biodegradación del tereftalato de polietileno por cepas bacterianas termófilas de la fuente termal de Quilcate-Cajamarca.”
6. **Fecha de evaluación:** 19/09/2024
7. **Software antiplagio:** TURNITIN URKUND (OURIGINAL) (*)
8. **Porcentaje de informe de similitud:** 12 %
9. **Código documento:** Identificación de reporte de similitud: oid:3117:383117863
10. **Resultado de evaluación de similitud:**
 APROBADO PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

20 de septiembre de 2024



*En caso se realizó la evaluación hasta septiembre de 2023

Copyright©

Ruben Gonzales Valiente

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Gonzales Valiente, R. 2024. **Biodegradación del tereftalato de polietileno por cepas bacterianas termófilas de la fuente termal de Quilcate-Cajamarca** / Ruben Gonzales Valiente.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Mblgo. Luis Felipe Valdez Nuñez

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo UNC

– 2024

**Biodegradación del tereftalato de polietileno por cepas bacterianas termófilas de la
fuente termal de Quilcate-Cajamarca**

AUTOR: Bach. Ruben Gonzales Valiente

ASESOR: Mblgo. Luis Felipe Valdez Nuñez

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



PRESIDENTE

Dr. Demetrio Cieza Yrigoín



SECRETARIA (O)

Dra. Carmen Eddy Medina Rodríguez



VOCAL

M. Cs. Néstor Estuardo Carbajal Caballero

Cajamarca, 2024 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 9:00 am del 17 de Septiembre del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente I.I-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada:

Biodegradación conjunta del tereftalato de polietileno por cepas bacterianas termófilas de la fuente termal de Quilcate - Cajamarca

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas: Ruben Gonzales Saliente

Siendo las 10:00 am del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: Muy bueno, con el calificativo de: 18, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra Apto para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

Table with 2 columns: Miembros Jurado Evaluador (Nombres y Apellidos) and Firma. Rows include Presidente (Dr. Demetrio Cieza Yrigoin), Secretario(a) (Dra. Carmen Eddy Medina Rodriguez), Vocal (M.Cs. Nestor Estuardo Carbajal Caballero), Accesitaria, Asesor (a) (M.Cs. Luis Felipe Valdez Noñez), and Asesor (a).

Términos de Calificación: EXCELENTE (19-20), MUY BUENO (17-18), BUENO (14-16), REGULAR (12-13), REGULAR BAJO (11), DESAPROBADO (10 a menos)

Agradecimiento:

En la culminación de esta tesis, expreso mi más sincero agradecimiento a mi asesor, el Mblgo. Luis Felipe Valdez, por su orientación y compromiso inquebrantable con mi crecimiento académico durante el desarrollo de este trabajo. Además, extendiendo mi gratitud al Dr. Marco Rivera, Dr. Pedro Ortiz y M. Cs. Cristian Hobán, cuya generosidad al poner a mi disposición equipos de laboratorio ha enriquecido mi investigación. A mi familia, especialmente a mi madre, hermana, tíos, primos, así como a mis amigos y compañeros de tesis, quienes fueron una fuente constante de estímulo moral y su respaldo ha sido el pilar sobre el cual he construido este trabajo. Esta investigación no habría sido posible sin la colaboración y contribución de todos ustedes.

Índice

Título.....	xii
Resumen:	xiii
Abstract:.....	xiv
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II.....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes de la investigación:	4
2.2. Bases teóricas:	9
2.2.1. Bacterias termófilas:	9
2.2.2. Metabolitos que disminuyen la hidrofobicidad del PET:.....	13
2.2.3. Polímeros Plásticos:	15
CAPÍTULO III.....	25
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	25
3.1. Nivel de investigación:	25
3.2. Tipo y diseño de estudio:.....	25
3.2.1. Tipo de Investigación:	25
3.2.2. Diseño de investigación:	25
3.3. Procedimientos:	25
3.3.1. Reactivación de las cepas:.....	26
3.3.2. Evaluación de la producción de metabolitos secundarios:.....	26
3.3.2.1. Producción de biosurfactantes (BS):.....	26
3.3.2.2. Evaluación de la producción de lipasas:	28
3.3.3. Ensayo de biodegradación de PET:.....	29
CAPÍTULO IV	33
RESULTADOS	33
4.1. Producción de metabolitos secundarios:	33
4.1.1. Producción de biosurfactantes:	33
4.1.2. Producción de lipasas:	34
4.2. Ensayos de biodegradación del PET:	36
4.2.1. Variación del pH:	36
4.2.2. DCM del sobrenadante de los Tratamientos:.....	37
4.2.3. Determinación de la pérdida de peso:.....	38
4.3. Análisis estadístico:	39

CAPÍTULO V	40
DISCUSIÓN	40
5.1. Metabolitos secundarios producidos por cepas degradadoras de PET:.....	40
5.2. Biodegradación individual y conjunta del PET:	43
CAPÍTULO VI.....	48
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	48
6.1. Conclusiones:	48
6.2. Recomendaciones:	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	50
APÉNDICES:	65
ANEXOS:	72

Abreviaciones:

BA: Ácido benzoico.

BHET: Tereftalato de dihidroxietilo.

BS: Biosurfactantes.

CHA: Ácido 4-carboxi-2-hidroxi-3-mucónico.

CMC: Concentración micelar crítica.

EG: Etilenglicol.

HDPE: Polietileno de alta densidad.

HEB: Benzoato de hidroxietilo.

LB: Luria Bertani.

LDPE: Polietileno de baja densidad.

LLDPE: Polietileno lineal de baja densidad.

MHET: Tereftalato de monohidroxietilo.

MS: Medio sintético.

MSM: Medio mínimo de sales.

PCA: Ácido protocatequico.

PDA: Ácido 2-pirona-4,6-dicarboxílico.

PET: Tereftalato de polietileno.

PP: Polipropileno.

T°: Temperatura.

TPA: Ácido Tereftálico.

TSA: Agar triptono soja.

UV: Radiación ultravioleta.

%Pp: Porcentaje de pérdida de peso.

Glosario:

Hidrofobicidad: La hidrofobicidad es la capacidad que tiene un material de repeler el agua de su superficie, por ejemplo, si colocamos una gota sobre un material y presenta un ángulo mayor de 90°, se parecerá a una gota esférica, teniendo un comportamiento hidrófobo, pero si por el contrario la gota tiene un ángulo de contacto menor de 90°, será una gota muy plana y se esparcirá por la superficie, presentando un comportamiento hidrófilo (Law, 2014).

Cristalinidad de polímeros: Se refiere al ordenamiento de la estructura molecular de los plásticos, es decir, cuando las cadenas del polímero están paralelamente y compactamente acomodadas; los polímeros plásticos se caracterizan por ser semicristalinos (presentan una región amorfa y una cristalina) (Méndez, 2017).

Co-metabolismo: Degradación simultánea de dos compuestos, en la que la degradación del segundo compuesto depende de la presencia del primer compuesto; y esto ocurre cuando un organismo está utilizando un compuesto para crecer y oxida un segundo compuesto que no puede ser utilizado como fuente de energía por el organismo primario, pero los productos de oxidación están disponibles para su uso por otros microorganismos (Global, 2022).

Sinergismo: Es la interacción entre diferentes microorganismos en donde ambas poblaciones o ambos microorganismos salen beneficiadas de la interacción. Son capaces de sobrevivir sin la presencia de la otra, pero la asociación de ambas ofrece ventajas mutuas, como la capacidad de acelerar el ritmo de crecimiento de la otra (Symborg, 2021).

Biodisponibilidad: Puede definirse como interacciones biológicas, físicas y químicas que determinan la exposición de un compuestos químicos, en otras palabras, es la

posibilidad de que un nutriente sea empleado por los microorganismos luego de que establezca un vínculo con los componentes del ambiente (Barrionuevo, 2017).

Resistencia a la tracción: Es el máximo esfuerzo que un material puede resistir antes de su rotura (Mariano, 2011)

**BIODEGRADACIÓN DEL TEREFTALATO DE POLIETILENO POR CEPAS
BACTERIANAS TERMÓFILAS DE LA FUENTE TERMAL DE QUILCATE-
CAJAMARCA**

Resumen:

El objetivo de esta investigación fue comparar la biodegradación individual y conjunta del PET empleando cepas bacterianas termófilas, provenientes de la fuente termal de Quilcate-Cajamarca. Así también, se determinó la eficiencia de estos tratamientos (a pH 5.6 y 6.6), y se evaluó la producción de metabolitos secundarios (biosurfactantes y lipasas). Para esto, se emplearon 10 cepas, recuperadas de una investigación previa. Se realizó un ensayo de biodegradación en donde se formaron 17 tratamientos: 10 individuales y 7 en conjunto. Para ello se empleó el medio sintético suplementado con PET en polvo (0.3 % p/v), a una temperatura de 55-60 °C, por 90 días. En el proceso de incubación se monitoreó la evolución del pH, y al finalizar el proceso se recuperó el PET para determinar el % Pp. Además, se realizó una prueba de producción de biosurfactantes de los sobrenadantes de cada tratamiento. Los resultados demostraron que 4 cepas producen biosurfactantes, y 9 cepas producen lipasas, demostrando así que las bacterias termófilas poseen la capacidad de producir metabolitos secundarios que pueden intervenir en la biodegradación del PET. En los ensayos de biodegradación del PET, el mayor % Pp, individualmente, correspondió a la cepa *Bacillus licheniformis* (GU323372.1), 29.09 % a pH 6.6, y el mayor % Pp, en conjunto, correspondió al consorcio formado por *B. licheniformis* (KU983867.1) y *Tistrella mobilis* (KF783213.1), 25.80 % a pH 6.6. Se concluyó que las cepas empleadas en este estudio tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios, los cuales podrían influenciar positivamente en los procesos de biodegradación del polímero. Así también, las cepas fueron capaces de degradar el PET a diferentes pH, individualmente y en conjunto. Esta investigación contribuye con la generación de nuevo conocimiento, útil para futuras investigaciones basadas en la biodegradación de plásticos empleando microorganismos extremófilos.

Palabras clave: Bacterias termófilas, PET, biodegradación, biosurfactantes, lipasas.

Abstract:

The objective of this research was to compare the individual and joint biodegradation of PET using thermophilic bacterial strains from the Quilcate-Cajamarca hot spring. Also, the efficiency of these treatments was determined (at pH 5.6 and 6.6), and the production of secondary metabolites (biosurfactants and lipases) was evaluated. For this, 10 strains were used, recovered from a previous investigation. A biodegradation test was carried out where 17 treatments were formed: 10 individual and 7 together. For this, the synthetic medium supplemented with PET powder (0.3% w/v) was used, at a temperature of 55-60 °C, for 90 days. During the incubation process, the pH evolution was monitored, and at the end of the process the PET was recovered to determine the % Pp. In addition, a biosurfactant production test was carried out on the supernatants of each treatment. The results showed that 4 strains produce biosurfactants, and 9 strains produce lipases, thus demonstrating that thermophilic bacteria have the ability to produce secondary metabolites that can intervene in the biodegradation of PET. In the PET biodegradation tests, the highest % Pp, individually, corresponded to the strain *Bacillus licheniformis* (GU323372.1), 29.09 % at pH 6.6, and the highest % Pp, together, corresponded to the consortium formed by *B. licheniformis* (KU983867.1) and *Tistrella mobilis* (KF783213.1), 25.80 % at pH 6.6. It was concluded that the strains used in this study have the ability to produce secondary metabolites, which could positively influence the polymer biodegradation processes. Likewise, the strains were able to degrade PET at different pH, individually and together. This research contributes to the generation of new knowledge, useful for future research based on the biodegradation of plastics using extremophile microorganisms.

Key words: Thermophilic bacteria, PET, biodegradation, biosurfactants, lipases.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El tereftalato de polietileno (PET), es una resina termoplástica (se deforma al aumentar la temperatura y se endurece al disminuirla), producida por la condensación del ácido tereftálico y 1,2-etilenglicol (García, 2017). Este polímero es uno de los plásticos más empleados por la industria a nivel mundial (Tiseo, 2021), debido a su dureza, estabilidad dimensional, elevado grado de cristalinidad, impermeabilidad a los gases, resistencia al calor y a los ácidos, así como una notable resistencia y tenacidad (García, 2017).

La inadecuada disposición de plástico, ha provocado un grave problema de contaminación mundial. Entre 1950 y 2017, la producción de este polímero alcanzó las 9.2 mil millones de toneladas, y se proyecta que aumentará 4 veces más para el año 2050 (Geyer, 2020). Por otro lado, de los 400 millones de toneladas de plástico que se producen al año en el mundo, aproximadamente 1.2 millones de toneladas, son generadas en nuestro país (La República, 2023; Chen, 2023). Así también, en Cajamarca, se generan 142,350 toneladas de residuos sólidos al año, siendo una parte significativa polímeros plásticos, de los cuales el 50% se destina a un relleno sanitario y solo el 10% se recicla (GRC, 2019).

La degradación natural del plástico en el ambiente es un proceso muy lento el cual podría generar diversos impactos negativos en los ecosistemas (Pivokonsky *et al.*, 2018; Wright y Kelly, 2017). Los efectos adversos de la degradación natural de los polímeros plásticos incluyen la formación de microplástico, así como la liberación de productos químicos tóxicos provenientes de la degradación de estos polímeros (p.e., ácido tereftálico y etilenglicol), provocando el aumento de la mortalidad de los seres vivos (Schuyler *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2019).

Existen diversas metodologías que podrían ayudar a una degradación controlada del PET. Por un lado, tecnologías basadas principalmente en procesos químicos tales como la hidrólisis ácida y básica, metanólisis, aminólisis, etc; suelen ser empleadas (Suasnavas, 2017). Sin embargo, el alto consumo de energía, la generación de subproductos tóxicos y costos elevados hacen de estos métodos una alternativa poco eficiente. Por otro lado, la biodegradación, la cual consiste en la descomposición de este polímero por acción de agentes biológicos (p.e., bacterias), es una alternativa más sostenible debido a que disminuyen los costes y se evita la generación de subproductos tóxicos.

La biodegradación de plásticos a temperaturas elevadas puede ser un proceso aún más eficiente. A temperaturas cercanas a los 70 °C aumenta la flexibilidad del polímero (T° de transición vítrea), es decir, disminuye la resistencia a la tracción y se vuelve más maleable, por lo que emplear microorganismos termófilos (55-60 °C) o sus enzimas termoestables, e.g., lipasas, (Atanasova *et al.*, 2021), podría resultar muy ventajoso. Así también, al utilizar estos microorganismos, en conjunto, en lugar de monocultivos puede incrementar la eficiencia del proceso de biodegradación, ya que al desarrollar procesos co-metabólicos y sinérgicos mejora la supervivencia de los microorganismos impactando positivamente sus metabolismos (Singh y Wahid, 2015).

Por lo anteriormente expuesto, este estudio se centró en comparar la biodegradación individual y conjunta del PET empleando cepas bacterianas termófilas, provenientes de la fuente termal de Quilcate-Cajamarca. Además, se evaluó la producción de lipasas y biosurfactantes, metabolitos clave en la degradación de plásticos. Esta investigación genera nuevo conocimiento para futuras investigaciones basadas en la biodegradación de plásticos empleando microorganismos extremófilos. Consecuentemente, al emplear los propios recursos biológicos de la región Cajamarca se espera lograr la eliminación de

estos polímeros plásticos de una forma más eficiente, ecoamigable y sostenible, contribuyendo así a un adecuado mantenimiento del ambiente.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación:

Maheswaran *et al.*, (2023), en India, investigaron el potencial de degradación del PET de cepas microbianas aisladas de vertederos de residuos plásticos, las cuales fueron identificadas como: *Sarcina aurantiaca*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus flavus* y *A. niger*. Se trabajó con películas de PET, las cuales, se incubaron durante 60 días a 37 °C, en medio mínimo de sales (MSM) y caldo Bushnell Hass, con microorganismos individuales y en consorcio. Los resultados revelaron que en el consorcio microbiano (*S. aurantiaca* + *B. subtilis* + *A. flavus* + *A. niger*), la Pp de las películas de PET fue del 28.78%.

Guo *et al.*, (2023), investigaron la biodegradación del PET por la PET esterasa anclada a la membrana de la bacteria marina *Rhodococcus piridinivorans* P23. En su metodología emplearon técnicas de expresión heteróloga, y evaluaron los subproductos generados de la biodegradación. En sus resultados obtuvieron una mejor despolimerización del PET e hidrólisis del tereftalato de monohidroxietilo (MHET) en ácido tereftálico (TPA), en condiciones ácidas y observaron una Pp del 4.28 % en 5 semanas de cultivo de *R. piridinivorans* P23 a 30 °C.

Dhaka *et al.*, (2022), en India, realizaron una investigación, cuyo objetivo fue determinar la capacidad de las rizobacterias para biodegradar el PET; en su metodología aislaron bacterias de un vertedero, capaces de degradar el plástico en MSM, usándolo como única fuente de carbono. *Priestia aryabhatai* VT 3.12, *B. pseudomycooides* VT 3.15 y *B. pumilus* VT 3.16 mostraron la mayor % Pp después de 28 días para láminas de PET y 18 días para polvo de PET, incubadas a 30 °C y con 120 rpm; mencionando finalmente que la tasa de degradación representó más del 65 %.

Qi *et al.*, (2021), en China, elaboraron un consorcio microbiano artificial compuesto por *R. jostii*, *Pseudomonas putida* y dos *B. subtilis* modificados metabólicamente para degradar el PET; En primer lugar, se construyó un consorcio con dos *B. subtilis* modificadas (secretaron PETasa y MHETasa) y degradaron el 13.6 % de la película de PET en 7 días, luego se adicionó *R. jostii* para reducir la inhibición provocada por el ácido tereftálico y se redujo un 31.2 % en 3 días; finalmente se introdujo *P. putida* para reducir la inhibición provocada por el etilenglicol y la Pp fue de 23.2 %.

Yan *et al.*, (2021), en China, emplearon un sistema microbio-enzimático sinérgico compuesto por *Microbacterium oleivorans* y *Thermobifida fusca* cutinasa para mejorar la tasa de degradación de películas PET altamente cristalino; la biodegradación se evidenció por la generación de ácido tereftálico y tereftalato de mono(2-hidroxietilo), y finalmente se predijo la presencia de hidrolasas incluidas tres carboxilesterasas, una esterasa y una lipasa, mediante un análisis de secuenciación del genoma completo.

Yan *et al.*, (2020), en China, trabajaron con la bacteria termófila *Clostridium thermocellum*, la cual se aisló de un compost vegetal y se manipuló genéticamente con el fin de expresar una cutinasa termoestable; para posteriormente tratar películas de PET, obteniendo una Pp de 60% en 14 días a 60 °C.

Markandan *et al.*, (2019), en India, trabajaron con la bacteria *B. licheniformis*, aisladas de un vertedero de basura y tuvieron como objetivo investigar la capacidad de estas bacterias de asociarse y adherirse a la superficie del PET; y por microscopía observaron que el PET tratado con UV y con las bacterias, condujo a la formación de biopelículas, la corrosión de la superficie y la colonización bacteriana; y la degradación del PET fue confirmado por estudios espectrometría, que indicaron la formación de un grupo éster y un grupo metileno.

Wei *et al.*, (2019), en Alemania, sobreexpresaron la cutinasa recombinante *Thermobifida fusca* TfCut2 en *B. subtilis* y se trató envases de alimentos de PET posconsumo y en sus resultados obtuvieron una Pp de más del 50 % después de 96 h de incubación a 70°C; las altas tasas de degradación lineal observadas a las 72 h de incubación se debieron a la alta susceptibilidad a la hidrólisis de la fracción amorfa móvil de PET, las regiones amorfas se degradaron en un 97 % en 120 h.

Skariyachan *et al.*, (2018), en India, realizaron un trabajo utilizando consorcios termófilos de *Brevibacillus spp.* y *Aneurinibacillus sp.*, los cuales fueron aislados de plantas de tratamiento de aguas residuales y vertederos de gestión de residuos para posteriormente tratar películas y gránulos de polietileno de baja y alta densidad (LDPE, HDPE) y polipropileno (PP); se obtuvieron 36 aislados, se realizó el cribado, y entre los 8 aislamientos que mostraron mejores resultados se realizaron varias combinaciones y determinaron que el % Pp más alto en 140 días a 50 °C para las tiras de LDPE, HDPE y PP fue 58.21 %, 46.6 % y 56.3 % y de los gránulos fueron de 45.7 %, 37.2 % y 44.2 %, respectivamente.

Mukherjee *et al.*, (2017), en India, trataron los polietilenos disponibles comercialmente con biosurfactantes (BS) producido por *B. licheniformis*, y con *P. fluorescens* y realizaron combinaciones diferentes para lograr una mayor biodegradación; en sus resultados utilizaron espectrometría para evidenciar grupos carbonilo, ácidos alifáticos, alcoholes y moléculas cortas de hidrocarburos y por último obtuvieron una Pp de 7.13 ± 0.05 % en muestras de polietileno tratadas con SDS, *P. fluorescens* y potenciado con el BS en tres meses.

Dang *et al.*, (2018), en Vietnam, realizaron una investigación con el objetivo de explorar el potencial de las bacterias termófilas aisladas del residuo del compostaje agrícola y sus enzimas para la degradación de bolsas de plástico HL, VHL y VN1 que contenían

polietileno lineal de baja densidad (LLDPE) y HDPE, y después de 30 días de tratamiento a 55°C con la cepa de *Bacillus sp. BCBT21* la Pp fue de 60.75 % de 1 g HL, 11 % de 1 g de VHL y 4.44 % de 1 g VN1; a esta cepa se le atribuye la producción de enzimas hidrolasas extracelulares que incluyen lipasa, CMCasa, xilanasas, quitinasas y proteasa.

Skariyachan *et al.*, (2017), en India, estudiaron la biodegradación del polietileno LDPE y HDPE, utilizando consorcios microbianos termofílicos formulados a partir de estiércol de vaca; en su procedimiento emplearon los mejores aislados para formar varias combinaciones de consorcios microbianos, y en sus resultados obtuvieron $75 \pm 2.55 \pm 2.60 \pm 3$ y 43 ± 3 % de degradación para tiras de LDPE, gránulos, tiras de HDPE y gránulos, respectivamente, durante un período de 120 días; los aislados se identificaron como *B. vallismortis* bt-dsce01, *P. protegens* bt-dsce02, *Stenotrophomonas sp.* bt-dsce03, y *Paenibacillus sp.*bt-dsce04.

Mukherjee *et al.*, (2015), en India, investigaron un método de biodegradación de polietileno comercial mediante el uso simultáneo de un BS producido por la bacteria *B. licheniformis* y *Lysinibacillus* en varias combinaciones; en sus resultados observaron que cuanto menor es la tensión superficial, mayor es el nivel de oxidación del polietileno, y obtuvieron una Pp máxima de 2.97 % durante 1 mes, concluyendo que la biodegradación se da por la conversión de grupos carbonilo en hidrocarburos insaturados por acción del BS y de la bacteria *Lysinibacillus*.

Hadad *et al.*, (2005), en Israel, se plantearon el objetivo de seleccionar un microorganismo degradante del polietileno y en su metodología aislaron del suelo la bacteria termófila *Brevibacillus borstelensis* cepa 707, la cual utilizó polietileno ramificado de baja densidad como única fuente de carbono y lo degradó; mediante espectrometría revelaron una reducción en los grupos carbonilo después de la incubación con la bacteria, logrando reducir su peso en un 30% en 30 días y a 50 °C.

En nuestro país también se han realizado trabajos de biodegradación de polímeros, por ejemplo, Arotoma *et al.*, (2021), en Huancavelica, realizaron un trabajo sobre la biodegradación del LDPE utilizando *Staphylococcus sp.*; los cuales fueron aislados del botadero de Ascensión-Huancavelica, el periodo de incubación fue de 90 días, en tres estufas a T° de 37, 20 y 15°C; y obtuvieron como resultado que a una T° de 37 °C el porcentaje de Pp fue de 2.16 %, a 20 °C fue de 0.52 % y a 15 °C fue de 0.29 %; logrando concluir que a mayor T° mayor será el % de degradación.

Palacios y Prado, (2018), en Ica, realizaron un trabajo que tuvo como objetivo demostrar la biodegradación del PET por acción de consorcios bacterianos procedentes de diferentes tipos de humus y lograron aislar 12 cepas de bacterias Gram positivas que corresponden al género *Bacillus*; la biodegradación se evidenció por la Pp del plástico por un periodo de evaluación cada 15 días y evaluación cualitativa por la formación de biopelícula y porosidad, los promedios de la variación porcentual de degradación oscilaron entre 0% y 4.5% después de 90 días de incubación.

Barbarán *et al.*, (2018), en Trujillo, realizaron una investigación, en donde utilizaron la bacteria *P. aeruginosa* para biodegradar tereftalato de polietileno obtenido de botellas de agua CIELO; en este trabajo sometieron a prueba diferentes concentraciones bacterianas (18×10^7 UFC, 36×10^7 UFC y 9×10^8 UFC), trabajaron con diferentes periodos (15, 25 y 35 días), y utilizando el método de Pp obtuvieron como resultados un 19.93% como porcentaje de Pp con la concentración de 9×10^8 UFC de durante un periodo de 35 días.

2.2. Bases teóricas:

2.2.1. Bacterias termófilas:

Las bacterias termófilas son microorganismos que necesitan temperaturas altas para su crecimiento (entre 45-122 °C); estos microorganismos se clasifican según su rango de T°: los hipertermófilos necesitan una T° superior a 80 °C para su crecimiento óptimo (Berenguer, 2011); los termófilos extremos, 60 - 80 °C; los termófilos moderados, 50- 60 °C (Zuliani *et al.*, 2021), los termófilos facultativos, 41-50 °C, y los microorganismos termotolerantes son microorganismos mesófilos que pueden tolerar una T° superior a 41 °C pero crecen de manera óptima a temperaturas más bajas (Orellana *et al.*, 2018).

Los termófilos y los hipertermófilos habitan en ecosistemas como las fumarolas blancas y negras de aguas profundas, las fuentes termales, géiseres terrestres, los volcanes y los entornos creados por el hombre, como las instalaciones de compostaje, las centrales eléctricas de vapor y los invernaderos; algo importante que resaltar de estos microorganismos es que han desarrollado mecanismos para el crecimiento activo en estos hábitats, como cambios de aminoácidos en la estructura primaria de sus proteínas y la participación de proteínas de choque térmico en el plegamiento de proteínas (Orellana *et al.*, 2018).

El mecanismo de protección del ADN de la desnaturalización en altas temperaturas estaría dado por un alto contenido de GC genómico (poseen triple enlace de hidrógeno) (Orellana *et al.*, 2018), asimismo, las altas concentraciones de iones como Na⁺, K⁺ y Mg²⁺; sales, proteínas y enzimas estabilizan la estructura de los ácidos nucleicos, de esta última resaltando la girasa inversa que provoca el superenrollamiento positivo en la molécula de ADN (Cuecas, 2017); por otro lado, la desnaturalización de la bicapa lipídica de la membrana celular se contrarresta mediante la biosíntesis de membranas que contienen

más ácidos grasos saturados y de cadena lineal, ramificados y poliamidas y menos ácidos grasos insaturados (los ácidos grasos saturados forman un entorno hidrofóbico más fuerte, y los ácidos grasos de cadena larga tienen un punto de fusión más alto que los ácidos grasos de cadena más corta) (Vavitsas *et al.*, 2022).

Finalmente, la estabilidad de las proteínas frente a las altas temperaturas se ve reforzada por las redes adicionales de enlaces de hidrógeno, la disminución de la longitud de los bucles superficiales, el aumento del número de enlaces iónicos entre los aminoácidos, básicos y ácidos; y su interior a menudo altamente hidrofóbico (Kumwenda *et al.*, 2013).

El uso de bacterias termófilas para degradar polímeros plásticos es potencialmente ventajoso debido a la mejora de la biodisponibilidad y solubilidad del sustrato como resultado de los cambios en las propiedades físicas de los polímeros a temperaturas elevadas; además, existe una mayor actividad enzimática como resultado de la disminución de la resistencia del polímero, al disminuir la resistencia a la tracción, las mayores tasas de difusión de los compuestos orgánicos, la menor viscosidad de los líquidos de cultivo y el menor riesgo de contaminación microbiana (Ahmed *et al.*, 2018). A temperaturas altas, las cadenas del PET en la fracción amorfa móvil se vuelven más flexibles y, por lo tanto, más accesibles para la hidrólisis enzimática (Wei *et al.*, 2019).

2.2.1.1. *Bacillus licheniformis*:

Es una especie bacteriana Gram positiva, considerada termófila debido a tiene un amplio rango de temperatura óptima de crecimiento (25-90 °C), formadora de esporas (Muras *et al.*, 2021; Zocorro, 2015); caracterizada por producir BS y utilizada en procesos de biodegradación de polímeros como el polietileno (Nayak *et al.*, 2020).

- **Taxonomía:** (Schoch CL *et al.*, 2020)

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: Bacillus

Especie: *Bacillus licheniformis*

2.2.1.2. *Bacillus paralicheniformis*:

Es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa, bacilo móvil formadores de endosporas, catalasa y ureasa positiva, oxidasa negativo y reduce nitratos a nitritos (Dunlap *et al.*, 2015); son bacterias termófilas, presentan actividad celulolítica y hemicelulolítica (Zalma y El-Sharoud, 2021). Además, presentan un gran número de genes que codifican para enzimas implicadas en la biodegradación de polímeros plásticos, como las esterases, oxigenasas, lipasas, hidrolasas, oxidorreductasas y deshidrogenasas (Ganesh Kumar *et al.*, 2021), y se ha reportado que este microorganismo utiliza el LDPE como única fuente de carbono (Quispe, 2022).

- **Taxonomía** (Schoch CL, 2020):

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: Bacillus

Especie: *Bacillus paralicheniformis*

2.2.1.3. *Brevibacillus borstelensis*:

Es una bacteria Gram-positiva, aerobia, móvil, formadores de endosporas, con forma de bastoncillo (Aulitto *et al.*, 2020), es un termófilo que crece entre 45°C y 70°C (Khalil *et al.*, 2018); capaz de degradar y utilizar polietileno como única fuente de carbono (Hadad *et al.*, 2005); se ha reportado que algunas cepas producen enzimas de importancia industrial como amidasa, lipasa, proteasa y esterasa a una T° de crecimiento óptima de 50 °C (Tripathy *et al.*, 2016).

- **Taxonomía:** (Schoch CL *et al.*, 2020)

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Paenibacillaceae

Género: *Brevibacillus*

Especie: *Brevibacillus borstelensis*

2.2.1.4. *Tistrella mobilis*:

Es una bacteria Gram-negativa, tiene forma de bastón, aerobia estricta y altamente móvil con un solo flagelo polar, oxidasa y catalasa positiva, (Shi *et al.*, 2002), y recientemente fue reportada como termófila (Valdez- Nuñez y Rivera-Jacinto, 2022). Tienen gran importancia en la biodegradación de los contaminantes clorados (Wang *et al.*, 2015); y en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Cui y Shao, 2009).

- **Taxonomía:** (Schoch CL *et al.*, 2020)

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhodospirillales

Familia: Rhodospirillaceae

Género. *Tistrella*

Especie: *Tistrella mobilis*

2.2.2. Metabolitos que disminuyen la hidrofobicidad del PET:

2.2.2.1.Lipasas:

Las enzimas implicadas en la biodegradación de polímeros plásticos pertenecen a dos clases principales, las hidrolasas y las oxidasas, y dentro de estas las de mayor importancia son las esterasas, lipasas, proteasas, cutinasas, deshidrogenasas y lacasas, de las cuales las dos primeras hidrolizan los plásticos mediante la ruptura de enlaces éster en la cadena de carbono y son activas principalmente en poliésteres alifáticos (Atanasova *et al.*, 2021).

Las enzimas que resisten altas temperaturas son más rígidas y resistentes a la proteólisis y a los agentes desnaturalizantes, como los disolventes orgánicos y los detergentes; una característica importante de las enzimas termófilas es la ralentización del proceso de "envejecimiento", lo cual resulta beneficiosa porque se evita potencialmente la pérdida de actividad enzimática en procesos lentos como la degradación del plástico (Atanasova *et al.*, 2021).

Las lipasas pertenecen a las hidrolasas, los sustratos de estas enzimas son insolubles en agua (Javed *et al.*, 2017); causan la degradación efectiva de partículas de PET gracias a que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster presentes en el plástico (Arribas, 2021), provocando una disminución de la longitud de la cadena y acabando finalmente en

intermedios solubles en agua, los cuales pueden transportarse a las células microbianas y metabolizarse allí (Herzog, Müller y Deckwer, 2006).

2.2.2.2. Biosurfactantes:

Los BS, son moléculas anfipáticas, es decir, presentan una región hidrofílica formada por aminoácidos, péptidos (aniones o cationes), mono o polisacáridos ; y una región hidrofóbica, que consiste de ácidos grasos saturados e insaturados, característica que les facilita reducir las tensiones superficiales e interfaciales entre dos líquidos inmiscibles, incrementando la solubilidad de compuestos hidrofóbicos en un medio acuoso (De la Rosa Cruz *et al.*, 2014); los BS son producidos por diferentes microorganismos que incluye a las bacterias, y pueden ser secretados extracelularmente o estar unidos a la membrana celular, mayormente durante la fase de crecimiento, especialmente cuando se cultivan en sustratos que son insolubles en agua (Santos *et al.*, 2016).

Los BS producidos por microorganismos incluyen glicolípidos, lipoaminoácidos, lipopéptidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos, fosfolípidos, monoglicéridos y diglicéridos (Becerra y Horna, 2016); y la literatura cita a bacterias del género *Bacillus* como grandes productoras de BS (Silva *et al.*, 2014); estas sustancias al ser compuestos tensioactivos tienen mucha utilidad en procesos de biodegradación ya que pueden aumentar la biodisponibilidad incrementando la solubilidad de los hidrocarburos, mejorando así la degradación, y no son tóxicos (Arribas, 2021).

Cuando existe una mezcla de líquidos inmiscibles, los BS se encuentran en la interfase en forma de una monocapa que expone la parte polar hacia la fase acuosa y la no polar hacia la fase hidrofóbica y si la concentración del BS es lo suficientemente alta como para superar lo que se conoce como “concentración micelar crítica (CMC)” se da la emulsificación. La concentración micelar crítica se define como aquella a la cual un

determinado agente tensioactivo forma de manera espontánea micelas en solución y una vez formadas las micelas, el componente orgánico de la mezcla pasará a ubicarse dentro de ellas “solubilizándose” en la fase acuosa (Barrionuevo, 2017).

En la biodegradación de plásticos, por un lado, los BS de la pared celular facilitan la adhesión microbiana a la superficie del polímero, al conferir hidrofobicidad, y movilizan los productos de la degradación enzimática de hacia el espacio periplásmico y a través de la membrana plasmática ingresan al citoplasma, en donde los polímeros son asimilados en el ciclo de β -oxidación de los ácidos grasos, con liberación de CO_2 y H_2O como productos finales (Santucho, 2015; Koutny *et al.*, 2006); y por otro lado los BS extracelulares generalmente se liberan en el medio como monómeros que se agregan en micelas grandes cuando la concentración supera CMC, momento en el que los sustratos hidrofóbicos se incorporan dentro del núcleo hidrofóbico de las micelas y mejora su dispersión en la fase acuosa y, por lo tanto, su biodisponibilidad para la absorción por las células (Perfumo *et al.*, 2010).

La adhesión de los microorganismos a la superficie del polímero se debe a que los BS incrementan de la hidrofobicidad de su superficie celular y esto se debe a que producen cambios como la remodelación de las capas externas de la célula (Kaczorek *et al.*, 2018), modificación de los grupos funcionales de la superficie celular, cambios en los lipopolisacáridos y ácidos grasos (Ma *et al.*, 2018), en los grupos carboxilo, fosforilo y amina (Mohanty y Mukherji, 2013).

2.2.3. Polímeros Plásticos:

Los plásticos son polímeros orgánicos de alto peso molecular hechos por el hombre a partir de productos petroquímicos no renovables como el petróleo fósil, el gas natural y el carbón (Atanasova *et al.*, 2021); sus macromoléculas están conformadas por

monómeros unidos por enlaces covalentes, y se han utilizado ampliamente por presentar características como suavidad, ligereza, transparencia, resistencia, de bajo costo, fácilmente procesables y de larga vida; los polímeros sintéticos son resistentes a la degradación biológica por su baja área superficial, su alto peso molecular, carácter hidrofóbico y alto grado de cristalinidad, debido a que las enzimas de los microorganismos no son capaces de romper los enlaces C–C (Suasnavas, 2017).

2.2.3.1.El tereftalato de polietileno:

El PET es uno de los plásticos más utilizados a nivel mundial, en 2020 la demanda mundial fue de 27 millones de toneladas métricas y para 2030, se prevé que ascienda a 42 millones de toneladas métricas (Tiseo, 2021). Este copolímero es un éster, es una resina sintética termoplástica (se deforma al aumentar la temperatura y se endurece al disminuirla), producido por la condensación del ácido tereftálico (ácido 1,4-bencenodicarboxílico) y 1,2-etilenglicol (también puede obtenerse utilizando dimetiltereftalato en lugar de ácido tereftálico); este material es un polímero extremadamente duro, dimensionalmente estable, lineal, con alto grado de cristalinidad, impermeable frente a los gases y resistente al calor y a los ácidos, tiene alta resistencia y tenacidad (García, 2017).

Su fórmula molecular es $(C_{10}H_8O_4)_n$, tiene un punto de fusión es de 256-271 °C, su temperatura de transición vítrea es de 70 °C, tiene una densidad de 1.38 g/cm³, es semicristalino, es decir, presenta una fracción amorfa y otra cristalina; el grupo químico éster (CO-O) es el responsable de su carácter polar (Méndez, 2021), el anillo bencénico le proporciona un aumento de la rigidez (Suasnavas, 2017); y de la fragmentación de su estructura química se puede generar tereftalato de dihidroxietilo (BHET), tereftalato de monohidroxietilo (MHET), ácido benzoico (BA), etilenglicol (EG), ácido Tereftálico (PTA), benzoato de hidroxietilo (HEB), ácido protocatequico (PCA), ácido 4-carboxi-

2-hidroximucónico (CHA) y ácido 2-pirona-4,-6-dicarboxílico (PDA) (Rocha y Peña, 2020; Johnston *et al.*, 2022).

2.2.3.2. Contaminación por polímeros plásticos:

La contaminación ambiental es la presencia de agentes físicos, químicos o biológicos, en el ambiente, de tal manera que sus concentraciones puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, o que puedan ser perjudiciales para la vida vegetal y animal. También se puede decir que la contaminación ambiental se refiere a la acción en la que el hombre incorpora contaminantes a los ecosistemas por encima de las concentraciones máximas permitidas que resulten ser tóxicas para los seres vivos (MINAM, 2016).

La contaminación ambiental con polímeros plásticos es un problema actual y su incremento se debe a que son utilizados en diferentes áreas de la industria, y generalmente lo encontramos como empaques y envases de un solo uso, que van a terminar en diferentes ecosistemas y permanecen por cientos de años. Los plásticos provienen de las zonas urbanas y recorren largas distancias; los podemos encontrar en las calles de nuestra ciudad, bloqueando alcantarillas, en los ríos, en el hielo de la Antártida y en las zonas más profundas del océano (Rivas y Garelli, 2021).

Dentro de los efectos de polímeros plásticos está el aumento de la mortalidad de animales marinos que ingieren microplástico (Schuyler *et al.*, 2015), la contaminación del agua potable (Pivokonsky *et al.*, 2018), la contaminación del aire por el desprendimiento de microplástico a partir de la ropa (Wright y Kelly, 2017), el incremento de gases de efecto invernadero, como el metano y etileno (Royer *et al.*, 2018), y en los humanos está relacionado con daños al sistema nervioso, daños reproductivos, y el incremento del estrés oxidativo (Chang *et al.*, 2019).

2.2.3.3. Biodegradación de PET:

La biodegradación se refiere a la colonización de microorganismos sobre la superficie de un polímero, seguida de la alteración de su estructura física o química de las cadenas del polímero, lo que conlleva una reducción del peso molecular del polímero (Barbarán *et al.*, 2018); en otras palabras es la asimilación de los polímeros por los organismos vivos hasta su mineralización, es decir, descomponen el material hasta dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), agua (H₂O) y constituyentes orgánicos, a causa de la acción enzimática de los microorganismos; este proceso se puede dar naturalmente o en condiciones de laboratorio (Gama, 2014).

El PET, en polvo, puede experimentar degradación mediante la acción de despolimerasas, ya sea intracelulares o extracelulares, en diversos microorganismos. La degradación intracelular implica la hidrólisis de un reservorio interno de carbono por parte de los propios microbios que se acumulan. La degradación extracelular implica el uso de una fuente externa de carbono, y no necesariamente llevada a cabo por los microorganismos, si no, las enzimas extracelulares descomponen las macromoléculas de PET en moléculas de menor tamaño, como oligómeros, dímeros y monómeros, que son lo suficientemente pequeños para atravesar membranas semipermeables (Yuan *et al.*, 2020).

El porcentaje de Pp de los polímeros plásticos depende de sus propiedades, como la presencia de ramificaciones que impulsan una mayor hidrofilia; la proporción de las regiones cristalinas y amorfas; presencia de enlaces covalentes polares, como enlaces éster o amida, en lugar de enlaces carbono-carbono; el peso molecular y la longitud de la cadena carbonada; el pretratamiento del polímero plástico, es decir, el tamaño y la forma del sustrato ya sea polvo, fibras, gránulos o películas; agentes ambientales como radiación ultravioleta, pH, temperatura y humedad; las características de las enzimas (Ahmed *et al.*, 2018).

El ataque enzimático empieza en las regiones amorfas de los polímeros semicristalinos (**fig. 1**), y se degradan más rápido (son muy móviles, que las fracciones cristalinas (son muy fijas) (Kawai *et al.*, 2019). La tasa de degradación general está determinada por la región cristalina debido a que se degradan más lentamente, aumentando con presencia de BS; en el punto de fusión, el estado cristalino se vuelve tan móviles como en el estado amorfo (Herzog *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2015).

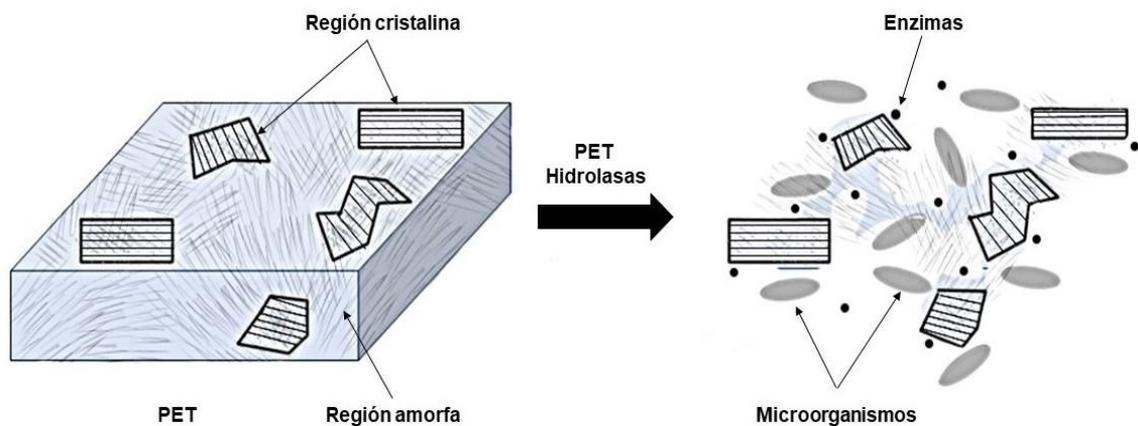


Fig.1. Ataque preferencial a la región amorfa de la película de PET. Adaptado de (Kawai *et al.*, 2019).

La región amorfa se oxida más fácilmente debido a que los prooxidantes y el oxígeno molecular están presentes exclusivamente en esas regiones (son menos resistente al oxígeno y a la enzima) (Koutny *et al.*, 2006). Durante el tratamiento con BS, una mayor cantidad de región amorfa oxidada y en consecuencia se liberan partículas cristalinas más pequeñas que también se oxidan y son utilizadas por las bacterias (Manzur *et al.*, 2004). La pérdida de peso de películas de PET amorfo es superior al 60% después de 14 días de incubación a 60 °C (Yoshida *et al.*, 2016).

En la despolimerización del PET para producir monómeros, se requieren dos características fundamentales de las enzimas hidrolasas PET; en primer lugar, una alta especificidad de sustrato hacia la estructura del anillo aromático del polímero y, en segundo lugar, una temperatura óptima y termoestabilidad a 70°C, la cual corresponde a

la temperatura de transición vítrea del PET, para acceder a las cadenas de PET y aumentar la flexibilidad, lo que permite una hidrólisis de PET altamente eficiente (Oda *et al.*, 2021).

2.2.3.4.Mecanismo de acción:

El proceso de biodegradación de PET, de forma general, empieza con el **biodeterioro**, en donde, el cambio de pH, el cambio de temperatura y la formación de biopelículas provoca grietas en la superficie del polímero, debilita las propiedades físicas y cambia su estructura; seguido de la **biofragmentación** de la cadena polimérica larga, en donde la actividad enzimática y los radicales libres conducen a la liberación de oligómeros y posteriormente se da la **degradación de oligómeros** a monómeros (ácidos grasos, cetonas, aldehídos, alcoholes), en el interior de las células, y finalmente se produce la **asimilación** de los monómeros como fuente de carbono, en donde se liberan H₂O, CO₂, N₂ y CH₄ (mineralización) (Atanasova *et al.*, 2021).

Basandose en la evidencia científica revisada, la propuesta de biodegradación del PET, con bacterias termófilas, trabajando a diferentes pHs y produciendo metabolitos secundarios, quedaría de la siguiente manera (**Fig.2.**): **Biodeterioro:** (1) el cambio de T°, de pH, y la formación de biopelículas producen un cambio en la superficie del polímero, iniciando preferentemente en las regiones amorfas, liberando algunos grupos éster, metilo y carboxilo (Kawai *et al.*, 2019). (2) Los BS de la pared celular producen cambios en la superficie celular y aumentan su hidrofobicidad, lo cual favorece la adhesión a la superficie del polímero (Perfumo *et al.*, 2010). La adjunción de los microorganismos al polímero también es posible con la producción de polisacáridos, por presencia de flagelos o algún apéndice celular (Zhang *et al.*, 2023; Guo *et al.*, 2023). (3) Se produce la liberación de hidrolasas y BS extracelulares (ambos metabolitos pueden ser liberados por una sola bacteria o cada bacteria puede liberar un metabolito). **Biofragmentación:** (4) las enzimas se unen al polímero y se forma el complejo enzima-sustrato y paralelamente los

biosurfactantes se agrupan y se forman micelas al superar la concentración crítica micelar.

(5) Se fragmentan las cadenas del polímero, al hidrolizarse los enlaces éster (Arribas, 2021), liberándose, BHET, MHET, TPA y EG. **(6)** El BHET se hidroliza aún más y forma MHET. **(7)** Las moléculas de MHET finalmente se degradan a EG y TPA (Yoshida *et al.*, 2016). Es posible que las enzimas que hidrolizan el PET para liberar BHET Y MHET se activen a un pH cercano al neutro, y la acumulación de grupos carboxilos, acidifican el medio, llegando a tornarse ácido, y en consecuencia se activen las enzimas capaces de liberar TPA y EG (Guo *et al.*, 2023). **Incorporación de elementos asimilables: (8)** estos subproductos de la actividad enzimática extracelular (TPA y EG), son incorporados al interior de la célula debido a que se vuelven solubles y también las micelas incrementan la biodisponibilidad de los productos hidrofóbicos (Santucho, 2015; Koutny *et al.*, 2006). **Asimilación: (9)** los subproductos son asimilados en el citoplasma, por diferentes rutas metabólicas. **(10)** Finalmente se produce la oxidación completa y se da la mineralización con la liberación de CO₂ y H₂O (Atanasova *et al.*, 2021).

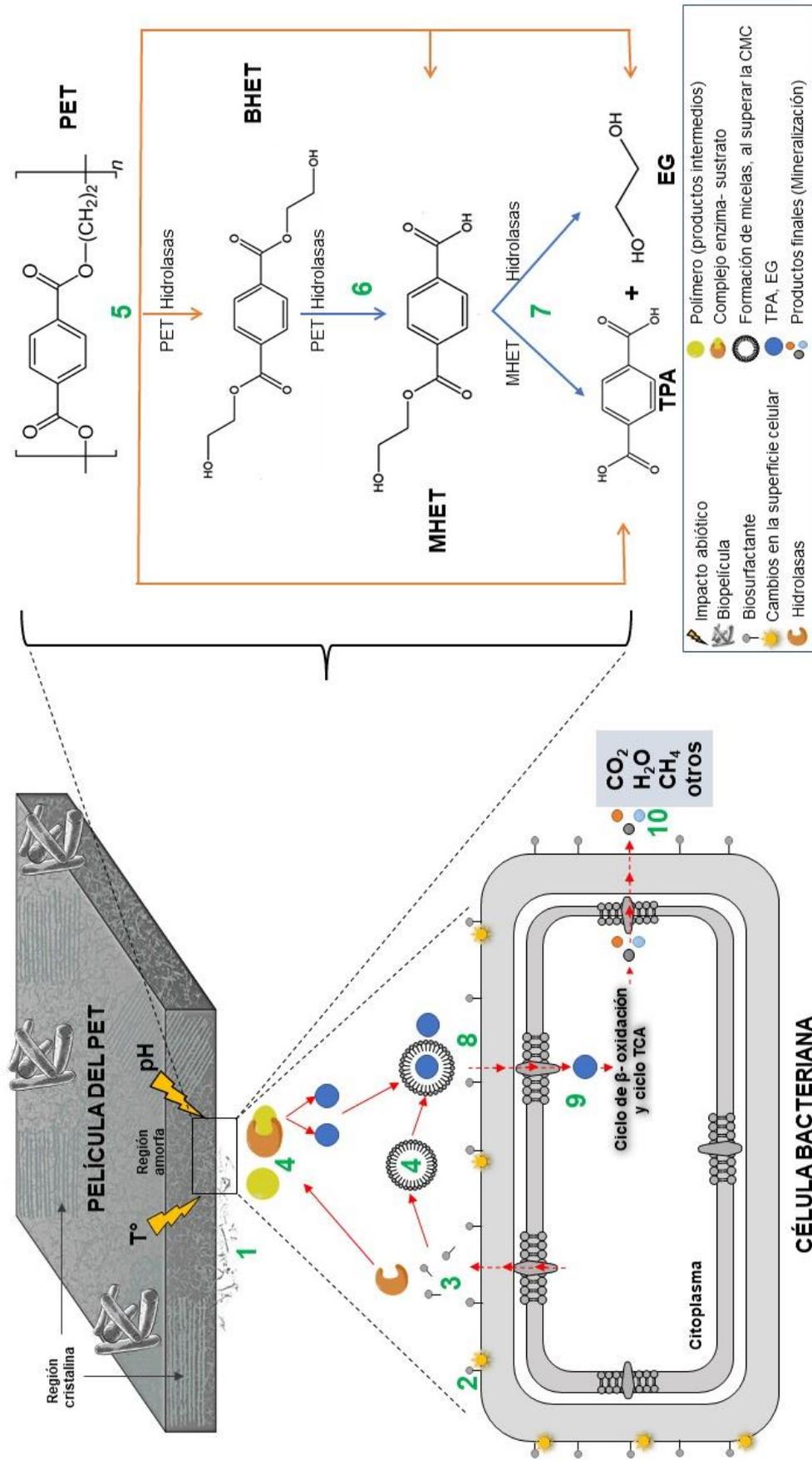


Fig.2. Propuesta de biodegradación del PET, utilizando bacterias termófilas, de forma individual y conjunta, a diferentes niveles de pH y produciendo metabolitos secundarios. Fuente: Elaboración propia.

2.2.3.5. Biodegradación individual.

La biodegradación individual se refiere al proceso de degradación de un material por microorganismos específicos que tienen la capacidad de descomponer ese material en particular, en este caso, los polímeros plásticos. Sin embargo no todos los microorganismos tienen esa maquinaria enzimática completa para degradar todos los subproductos liberados de un polímero y estos productos finales tóxicos pueden inhibir su propio crecimiento (Tahri *et al.*, 2013).

2.2.3.6. Biodegradación con bacterias empleadas en forma conjunta:

Un grupo de bacterias o bacterias, en conjunto, se define como dos o más bacterias en un ambiente determinado cumpliendo funciones similares o diferentes. Las diferentes cepas que conforman el conjunto de bacterias, tienen diferentes vías metabólicas, y por ende diferentes capacidades de degradación y el propósito es integrar las ventajas de cada cepa para lograr la degradación eficiente de los contaminantes (Zhang y Zhang, 2022).

Utilizar bacterias en conjunto, puede ayudar a contrarrestar problemas de inhibición por subproductos generados del proceso de degradación; además, son capaces de desarrollar biofilms densos en la superficie del polímero e inducir una alteración de su topografía y de sus propiedades reológicas (Yuan *et al.*, 2020); adicionalmente, pueden desarrollar procesos de co-metabolismo (Skariyachan *et al.*, 2018), interacciones simbióticas, mutuas y sinérgicas, lo que les permite tener mayor actividad y tolerancia durante el tratamiento de polímeros plásticos (Singh y Wahid, 2015).

En la degradación del PET se genera TPA y EG y estos productos son tóxicos para las células e inhiben las hidrolasas de PET (Barth *et al.*, 2015), y para hacer frente a estos problemas, se utilizan bacterias en conjunto, con las cuales se distribuye el trabajo complicado a diferentes microorganismos de acuerdo con sus propias ventajas

específicas, para completar el trabajo que no puede ser llevado a cabo por un solo microorganismo (Qi *et al.*, 2021).

2.2.3.7. Porcentaje de Pp del PET:

Se refiere a una evaluación cuantitativa en la que se determina la pérdida de peso de un polímero en un tiempo en el que existió una formación de biopelículas, porosidad y fragmentación de sus cadenas por acción enzimática de los microorganismos con el fin de utilizarlo como fuente de carbono (Palacios y Prado, 2018); este porcentaje de Pp se obtiene por medio de una fórmula matemática que consiste en obtener datos del peso antes del tratamiento y después del tratamiento y se representa de la siguiente manera:

$$Pp (\%) = \frac{Pi - Pf}{Pi} \times 100$$

Donde:

Pp: Pérdida de peso en porcentaje (%)

Pi: peso inicial del polímero plástico

Pf: peso final del polímero plástico

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

3.1. Nivel de investigación:

Explicativo: En la investigación se buscó entender las causas de un fenómeno y establecer relaciones de causalidad.

3.2. Tipo y diseño de estudio:

3.2.1. Tipo de Investigación:

Básica: La investigación se enfocó principalmente en generar nuevos conocimientos acerca de la biodegradación de PET.

3.2.2. Diseño de investigación:

Cuasi-experimental: En la investigación se manipuló al menos 1 variable independiente para observar su efecto o relación con una o más variables dependientes.

3.3. Procedimientos:

Para este estudio se utilizaron 10 cepas bacterianas termófilas (**Tabla 1**), pertenecientes a los géneros: *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Tistrella*, obtenidas de una investigación previa en la fuente termal de Quilcate- Cajamarca (Valdez-Nuñez y Rivera-Jacinto, 2022).

Tabla 1. Cepas bacterianas termófilas.

Códigos	Cepa
QP03	<i>Bacillus licheniformis</i> / FJ266313.1
QP08	<i>Brevibacillus borstelensis</i> / KX783601.1
QP10	<i>Bacillus paralicheniformis</i> /MT527535.1
QP12	<i>Bacillus licheniformis</i> / MW148420.1
QP15	<i>Bacillus paralicheniformis</i> /OL824873.1
QP19	<i>Bacillus licheniformis</i> /GU323372.1
QP21	<i>Bacillus licheniformis</i> /KX946197.1
QP22	<i>Bacillus sp.</i> /MT505502.1
QP27	<i>Tistrella mobilis</i> /KF783213.1
QP28	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1

3.3.1. Reactivación de las cepas:

Las cepas bacterianas termófilas almacenadas en crioviales a -80 °C fueron descongeladas a 4-5 °C. Se preparó el medio Luria Bertani (LB) (**Anexo 1**) como medio para la reactivación, para lo cual se disolvió 25 g de caldo LB (Himedia), en 1 L de agua destilada, se ajustó el pH a 7. Luego se dispensó 30 ml del caldo en viales de vidrio o tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Se colectó 500 µL de cada criotubos con las bacterias termófilas descongeladas y se agregó a los viales con medio de cultivo previamente preparados. Finalmente se incubaron los viales a 55-60 °C durante 24-48 h. Pasado el tiempo de incubación, se inspeccionó el crecimiento en los tubos mediante la presencia de turbidez en el medio. Los cultivos que no presentaron crecimiento fueron sembrados en el medio Infusión cerebro-corazón, BHI, (Himedia) bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

3.3.2. Evaluación de la producción de metabolitos secundarios:

3.3.2.1. Producción de biosurfactantes (BS):

Las cepas se sembraron en 5 mL de caldo LB, la siembra se realizó colocando una asada de cada cultivo puro en el medio, incubado posteriormente a 55-60 °C por 24-48 horas.

Se trabajó con una concentración de 6×10^8 UFC/mL, la cual se determinó empleando el tubo N° 2 de los estándares de turbidez de McFarland.

De cada tubo se traspasó 1 mL a tubos Eppendorf y se centrifugó a 16200 xg durante 20 min para precipitar las células, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua destilada estéril (1 mL). Se inoculó el volumen en un frasco de vidrio con 15 mL del medio MSM (Valdez-Nuñez y Rivera-Jacinto, 2022), a un pH de 6.5. La composición del medio MSM se detalla en el **Anexo 1**.

Se adicionó el hidrocarburo (gasolina), y la solución de elementos traza en el medio MSM (Linhardt *et al.*, 1989), en una concentración de 1% (v/v) y 0.5% (v/v), respectivamente. La composición de elementos traza se detalla en el **Anexo 1**. Ambos líquidos se esterilizaron por filtración empleando filtros de jeringa de 0.2 μ m (Puradisc™ 25mm, Whatman™, UK). Cada frasco se incubó a 55 - 60 °C, sin agitación, por 7 días. Finalmente, los cultivos se filtraron. El filtrado (libre de células) se empleó en los procedimientos subsecuentes.

Método de colapso de la gota (DCM):

Este método se realizó para determinar la presencia de BS de bajo peso molecular. El fundamento de este método radica en la capacidad de los BS para reducir la tensión interfacial de una sustancia hidrofóbica, verificándose esto a través de la deformación de la gota del filtrado al estar en contacto con una superficie hidrofóbica como lo es el Parafilm (Parafilm M). La deformación de la gota nos indica que la parte hidrofóbica del BS se pone en contacto con la superficie del Parafilm, incrementando así el área de contacto (Varjani *et al.*, 2014).

Para esto, se colocó 20 μ L del filtrado de cada cultivo en la superficie hidrófoba de una tira de parafilm. Se adicionó un control negativo (20 μ L filtrado de medio no inoculado)

y uno positivo (20 µL de SDS al 10% (p/v)). Luego de 1 minuto, se comparó las gotas, y categorizó. Un resultado positivo (cultivo productor de BS) se visualizó al deformarse la gota en la superficie debido a la reducción de la tensión interfacial. La deformación de la gota se categorizó de la siguiente manera: +, parcial; ++, regular; y +++, total (Yalcin, Ergin-Tepebasi y Uyar, 2018).

Índice de emulsificación (IE-24):

Este método se realizó para determinar la presencia de BS de alto peso molecular (bioemulsificantes). El índice de emulsificación desempeña un papel fundamental en la determinación de bioemulsionantes y proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de estas sustancias para formar y estabilizar emulsiones (Becerra y Horna, 2016). Para esto, se colocó 7 mL del filtrado de cada cultivo en un tubo de centrifuga con tapa y se añadió por encima del filtrado 3 mL del hidrocarburo (diésel o gasolina), y se aplicó pulsos de vortex por 1 minuto. El índice de emulsificación se calculó a las 24 horas utilizando la siguiente expresión (Płaza *et al.*, 2006):

$$EI_{24} = \frac{\text{Altura de la capa emulsificada (mm)}}{\text{Altura total del líquido (mm)}} \times 100$$

3.3.2.2. Evaluación de la producción de lipasas:

La actividad lipolítica de las cepas fue detectada por la formación de un halo opaco de precipitación formado por cristales de calcio que indica la degradación de lípidos (zona de hidrólisis) alrededor de las colonias que crecieron en placas de agar triptonsoja, TSA, (Himedia) suplementadas con 1% (p/v) de Tween 80 estéril (éster de ácido oleico) (Sierra, 1957).

El medio TSA y el Tween 80 se esterilizaron por separado en autoclave empleando las condiciones anteriormente mencionadas, posteriormente se adicionó el 1% a la concentración final del medio y se sirvió en placas de Petri. El pH del medio fue de 7.0. Las cepas previamente reactivadas se sembraron con una asa en punta en el centro de la placa y fueron incubadas a 55 °C por 24 h.

3.3.3. Ensayo de biodegradación de PET:

Configuración del experimento:

Se realizó ensayos de biodegradación de PET empleando cepas de forma individual y conjunta para poder comparar el % Pp. Se realizaron en total 17 tratamientos, de los cuales, los primeros 10 consistieron en el uso de cepas individuales, mientras que los 7 restantes consistieron en tratamientos en conjunto (consorcios), formados por 2 y 5 cepas (**Tabla 2**). Para la formación de consorcios se consideraron datos del tamaño del halo de cada cepa en agar PET, datos generados por Valdez-Nuñez y Rivera-Jacinto, (2022), no publicados.

Es importante mencionar que en los tratamientos con 2 cepas (T11-T14), se incluyó la cepa que presentó el halo más grande (QP28), junto con cepas de diferentes especies. En los tratamientos con 5 cepas, un tratamiento se formó con cepas de la misma especie (T15), y dos tratamientos incluyeron cepas de diferentes especies, uno con la cepa QP28 (T16), y el otro sin dicha cepa (T17).

El ensayo de biodegradación se llevó a cabo en tubos Falcon de 50 mL conteniendo 40.5 mL de Medio Sintético, MS, (Hadad, Geresh y Sivan, 2005), la composición del medio MS se detalla en el **Anexo 1**. A cada tubo se le agregó 0.3 % (p/v) de PET reciclado de botellas usadas, el cual fue reducido a polvo para aumentar su biodisponibilidad. Se adicionó la solución de elementos traza en el medio MS, en una concentración de 0.1%

(v/v), la cual se esterilizó por filtración empleando filtros de jeringa de 0.2 μ m (PuradiscTM 25mm, WhatmanTM, UK), y finalmente se inoculó 4.5 mL de los cultivos reactivados (10% del volumen total del medio de cultivo). En los tratamientos individuales (T01-10), este volumen fue exclusivamente de una sola cepa. En los tratamiento con 2 cepas (T11-T14), se transfirió 2.25 mL de cada cepa; mientras que en los tratamiento con 5 cepas (T15-T17), se transfirió 0.9 mL de cada cepa.

El ensayo se realizó por triplicado adicionando un control abiótico (MS + PET). La temperatura de incubación fue entre 55 y 60 °C. Además, con el fin de evidenciar el efecto del pH en la biodegradación del PET, se realizaron dos lotes, uno a pH 5.6 y otro a 6.6, ambos con un periodo de incubación de 90 días.

Tabla 2. Tratamientos empleados en el ensayo de biodegradación. T01-10, individualmente; T11-14, en conjunto (2 cepas); T15-17, en conjunto (5 cepas).

Tratamiento	Cepas bacterianas
T01	<i>Bacillus licheniformis</i> /FJ266313.1
T02	<i>Brevibacillus borstelensis</i> /KX783601.1
T03	<i>Bacillus paralicheniformis</i> /MT527535.1
T04	<i>Bacillus licheniformis</i> /MW148420.1
T05	<i>Bacillus paralicheniformis</i> /OL824873.1
T06	<i>Bacillus licheniformis</i> /GU323372.1
T07	<i>Bacillus licheniformis</i> /KX946197.1
T08	<i>Bacillus sp.</i> /MT505502.1
T09	<i>Tistrella mobilis</i> /KF783213.1
T10	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1
T11	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1; <i>Brevibacillus borstelensis</i> /KX783601.1
T12	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1; <i>Bacillus paralicheniformis</i> /OL824873.1
T13	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1; <i>Bacillus sp.</i> /MT505502.1
T14	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1; <i>Tistrella mobilis</i> /KF783213.1
T15	<i>Bacillus licheniformis</i> /FJ266313.1; <i>Bacillus licheniformis</i> /MW148420.1; <i>Bacillus licheniformis</i> /GU323372.1; <i>Bacillus licheniformis</i> /KX946197.1; <i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1

T16	<i>Brevibacillus borstelensis</i> /KX783601.1; <i>Bacillus paralicheniformis</i> /OL824873.1; <i>Bacillus sp.</i> /MT505502.1; <i>Tistrella mobilis</i> /KF783213.1; <i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1
T17	<i>Brevibacillus borstelensis</i> /KX783601.1; <i>Bacillus paralicheniformis</i> /MT527535.1; <i>Bacillus paralicheniformis</i> /OL824873.1; <i>Bacillus sp.</i> /MT505502.1; <i>Tistrella mobilis</i> /KF783213.1

Desarrollo y término del experimento:

El ensayo de biodegradación del PET tuvo una duración de 90 días en el cual la agitación fue constante. En el transcurso, se agregó medio de cultivo fresco cada dos semanas debido a la evaporación constante causada por la alta temperatura de incubación. Así también, se colectó muestras para realizar la medición de pH. Terminado el periodo, se recuperó el polímero remanente centrifugando los tubos a 3000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante de cada tubo (5 mL se guardó en viales para determinar presencia de BS), se lavó el polímero con etanol al 70 % por centrifugación a 3000 rpm, se enjuagó dos veces con agua destilada, y se secó en estufa a 60 °C por 48 h.

Métodos analíticos:

Medición del pH:

Esta medición se realizó con la finalidad de evaluar si existió variaciones en el pH durante el proceso de biodegradación. Para esto se empleó un potenciómetro Hanna HI2002 y un electrodo de HI11310 con una referencia de Ag/AgCl. El pH se midió al inicio del tratamiento y luego de forma mensual hasta finalizar el tratamiento.

Producción de biosurfactantes:

Adicionalmente se realizó el DCM para detectar la producción de BS al final del ensayo de biodegradación. Para esto se empleó el sobrenadante obtenido posterior al lavado del PET (ver la sección de desarrollo y término del experimento). El DCM se realizó con los

sobrenadantes de los 17 tratamientos así como con los controles considerando ambos pH (5.6 y 6.6). El procedimiento fue el mismo tal como se detalla anteriormente.

Determinación de porcentaje de pérdida de peso (%Pp):

Luego de la recuperación del PET (ver la sección de configuración del experimento), este se secó completamente y se pesó. El porcentaje de reducción de peso se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$(1) Pp (\%) = \frac{Pi - Pf}{Pi} \times 100$$

Donde:

Pp: Pérdida de peso en porcentaje (%)

Pi: peso inicial del polímero plástico

Pf: peso final del polímero plástico

Análisis estadísticos:

El análisis estadístico de la pérdida de peso del PET, posterior de los ensayos de biorremediación, se realizó empleando el paquete estadístico SPSS v29, en el cual se empleó un análisis con la prueba de Kruskal-Wallis, y pruebas Post-hoc con un nivel de confianza de 95% y un $p < 0.05$, para establecer diferencias estadísticas significativas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Producción de metabolitos secundarios:

4.1.1. Producción de biosurfactantes:

Para determinar la producción de BS de bajo peso molecular, se utilizó el método del colapso de la gota. De las 10 cepas puestas a prueba, se clasificó a 3 cepas como parcial y una cepa como regular, después de compararlo con el control negativo, como se indica en la **Tabla 3** y **Fig.3A**. Las 6 cepas restantes se comportaron de manera similar al control negativo, por lo que se determinó que no disminuyen la tensión interfacial.

Para determinar la producción de BS de alto peso molecular (bioemulcificantes) se usó el E1-24. Los resultados de las 10 cepas fueron negativas, como se muestra en la **Tabla 3** y **Fig.3B**. Los 10 tubos que contenían el filtrado derivado de cada una de las cepas, junto con el hidrocarburo, permanecieron segregados debido a las diferentes densidades de cada solución, y por ende no se evidenció ningún nivel de emulsión. **Apéndice 3**.

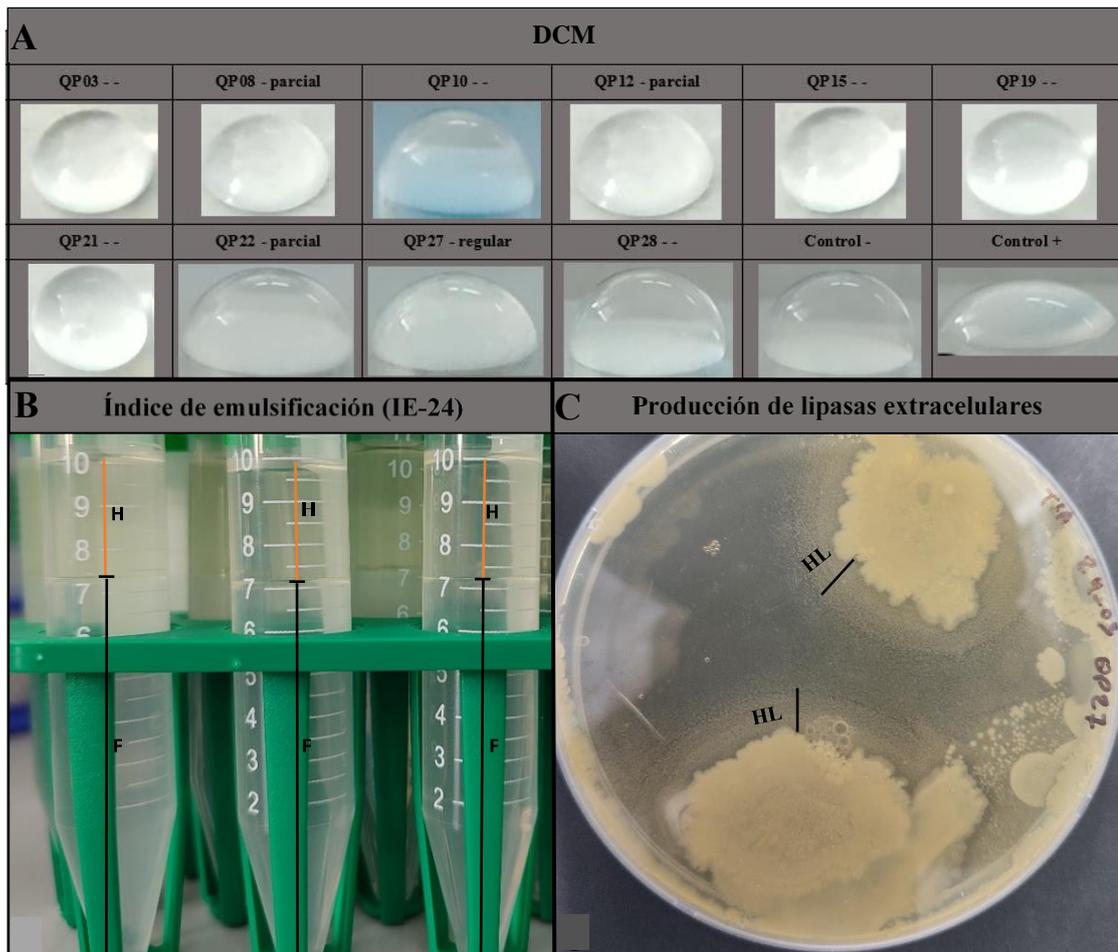


Fig.2. Producción de metabolitos secundarios: **A.** En el DCM, se puede apreciar la categorización de la deformación de la gota, después de compararlo con el control negativo y positivo. **B.** En El-24, se observa que los tubos que contenían el filtrado derivado de cada una de las cepas, junto con el hidrocarburo, permanecieron segregados y no se evidenció ningún nivel de emulsión. H, hidrocarburo; F, filtrado. **C.** En la producción de lipasas extracelulares, se puede apreciar la formación de un halo opaco de precipitación (HL), alrededor de las colonias, formado por cristales de calcio que indica la degradación de lípidos (zona de hidrólisis).

4.1.2. Producción de lipasas:

En la evaluación de lipasas extracelulares, se determinó como ensayo positivo la formación de un halo en medio TSA. De las 10 cepas evaluadas, se obtuvieron 9 cepas productoras de lipasas, tal como se muestra en la **Tabla 3** y **Fig.3C**. Solo la cepa *B.*

borstelensis, no produjo la formación de halos y se determinó como no productora de lipasas. **Apéndice 5.**

Tabla 3. Resultados en la producción de metabolitos secundarios.

Códigos	Cepa	Biosurfactantes		Lipasas extracelulares
		DCM	EL-24	
QP03	<i>Bacillus licheniformis</i> / FJ266313.1	-	-	+
QP08	<i>Brevibacillus borstelensis</i> / KX783601.1	+	-	-
QP10	<i>Bacillus paralicheniformis</i> / MT527535.1	-	-	+
QP12	<i>Bacillus licheniformis</i> / MW148420.1	+	-	+
QP15	<i>Bacillus paralicheniformis</i> / OL824873.1	-	-	+
QP19	<i>Bacillus licheniformis</i> / GU323372.1	-	-	+
QP21	<i>Bacillus licheniformis</i> / KX946197.1	-	-	+
QP22	<i>Bacillus</i> sp./ MT505502.1	+	-	+
QP27	<i>Tistrella mobilis</i> / KF783213.1	++	-	+
QP28	<i>Bacillus licheniformis</i> / KU983867.1	-	-	+

DCM: -(negativo), + (parcial), ++ (regular); y +++ (total); EL-24 y lipasas extracelulares: - (negativo), + (positivo).

4.2. Ensayos de biodegradación del PET:

4.2.1. Variación del pH:

El monitoreo del pH se realizó para verificar la variación durante el periodo de incubación y para correlacionar los cambios con la producción de biomasa, la cual se evidenció con la presencia de turbidez, o cualquier cambio de color del medio.

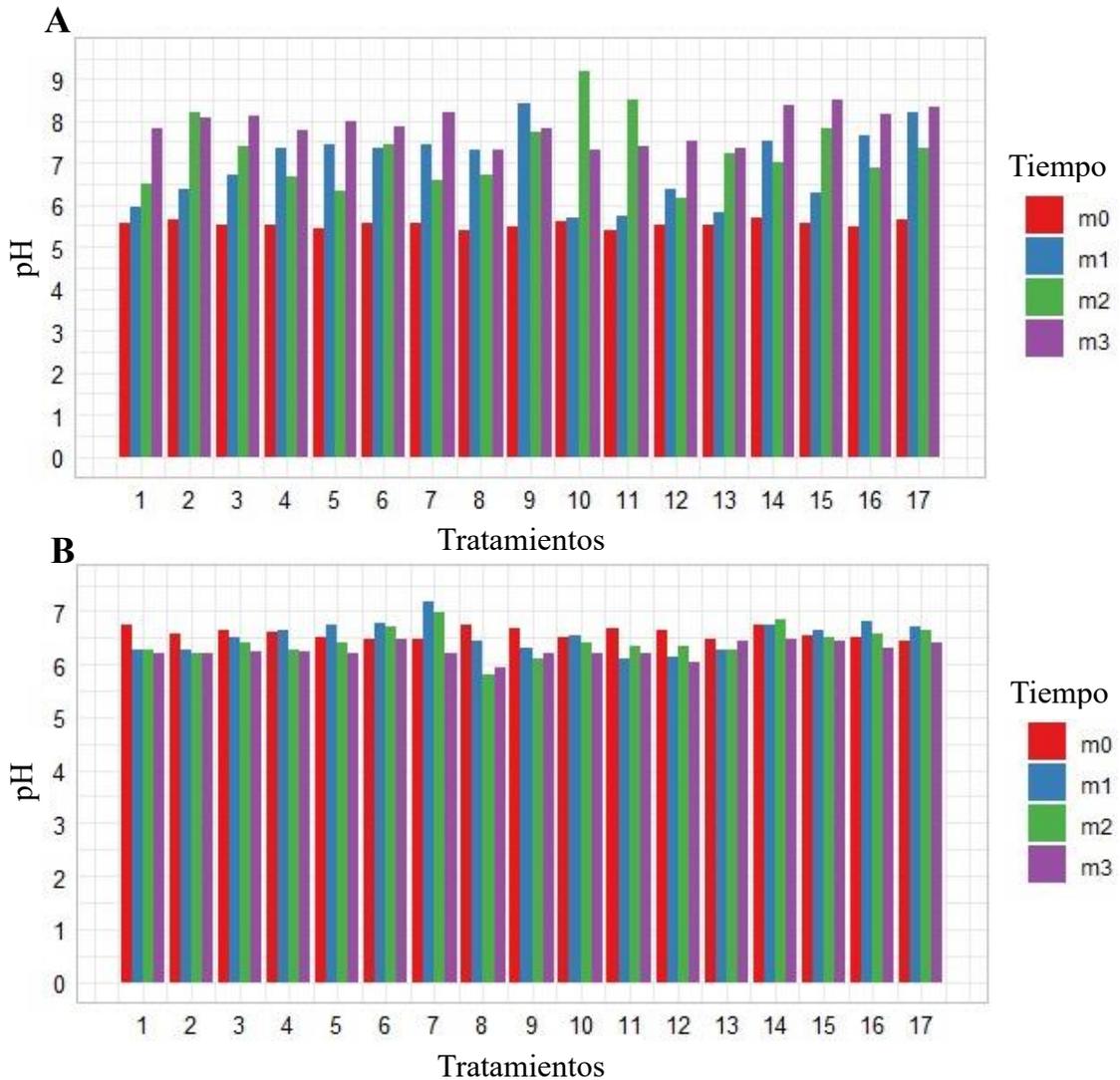


Fig.3. Variación del pH del medio de cultivo durante el ensayo de biodegradación según tratamientos durante los 3 meses de incubación. **A.** pH inicial de 5.6. **B.** pH inicial de 6.6. m0= inicio del tratamiento, m1= primer mes, m2 = segundo mes, m3= tercer mes.

4.2.2. DCM del sobrenadante de los Tratamientos:

Se realizó el DCM, para detectar disminución de la tensión interfacial, con el sobrenadante obtenido posterior a la centrifugación que se realizó para hacer el lavado del PET, de todos los tratamientos a ambos pH, después de los 3 meses de incubación, (Tabla 4).

Tabla 4. DCM del sobrenadante de los Tratamientos.

Tratamiento	DCM pH 5.6	DCM pH 6.6
T01	-	-
T02	+	-
T03	+	-
T04	-	-
T05	-	++
T06	-	-
T07	-	-
T08	+	-
T09	+	-
T10	++	-
T11	-	-
T12	-	-
T13	-	-
T14	-	-
T15	-	-
T16	-	-
T17	++	-

DCM: -(negativo), + (parcial), ++ (regular); y +++ (total).

4.2.3. Determinación de la pérdida de peso:

Los porcentajes de pérdida de peso (%Pp) en los tratamientos individuales y conjuntos se muestran en la **Tabla 5** y **Tabla 6**, respectivamente. Para determinar el % Pp del PET, se utilizaron los pesos iniciales y finales de los tratamientos, y los resultados se mostraron en porcentajes de acuerdo con la **Fórmula 1**. Los resultados en las tablas se muestran ordenados de mayor a menor % Pp. De los 17 tratamientos a pH 5.6, solo 3 manifestaron un % Pp del PET > 10 %, y correspondieron a los tratamientos individuales. En cambio, a un pH de 6.6, 6 tratamientos exhibieron un % Pp del PET > 10 %, 3 tratamientos individuales y 3 tratamientos grupales. Cabe aclarar que para discutir los resultados solo se tuvo en cuenta los tratamientos con un % Pp > a 10%.

Tabla 5. Porcentajes de pérdida de peso con tratamientos individuales, a pH 5.6 y 6.6.

% Pp del PET- Tratamientos individuales							
pH 5.6				pH 6.6			
Trat.	PI (g)	PF (g)	% Pp	Trat.	PI (g)	PF (g)	% Pp
T09	0.1350	0.1122	16.86	T06	0.1350	0.0957	29.09
T02	0.1350	0.1137	15.80	T09	0.1350	0.1094	18.96
T03	0.1350	0.1196	11.43	T01	0.1350	0.1119	17.14
T08	0.1350	0.1312	2.84	T02	0.1350	0.1258	6.84
T01	0.1350	0.1339	0.84	T04	0.1350	0.1326	1.75
T06	0.1350	0.135	0.00	T03	0.1350	0.1338	0.86
T07	0.1350	0.135	0.00	T05	0.1350	0.135	0.00
T05	0.1350	0.1352	-0.12	T08	0.1350	0.1354	-0.27
T04	0.1350	0.1353	-0.20	T10	0.1350	0.1354	-0.32
T10	0.1350	0.1356	-0.42	T07	0.1350	0.1357	-0.54

Trat: Tratamientos, PI: peso inicial, PF: peso final, % Pp: % de pérdida de peso.

Tabla 6. Porcentajes de pérdida de peso con tratamientos en conjunto, a pH 5.6 y 6.6.

% Pp del PET- Tratamientos en conjunto							
pH 5.6				pH 6.6			
Trat.	PI (g)	PF (g)	% Pp	Trat.	PI (g)	PF (g)	% Pp
T14	0.1350	0.1303	3.46	T14	0.1350	0.1002	25.80
T11	0.1350	0.1351	-0.10	T12	0.1350	0.1114	17.48
T12	0.1350	0.1352	-0.12	T17	0.1350	0.1153	14.57
T13	0.1350	0.1356	-0.47	T15	0.1350	0.1274	5.65
T16	0.1350	0.1357	-0.54	T13	0.1350	0.135	0.00
T15	0.1350	0.1358	-0.59	T11	0.1350	0.1354	-0.30
T17	0.1350	0.1362	-0.89	T16	0.1350	0.1362	-0.89

Trat: Tratamientos, PI: peso inicial, PF: peso final, % Pp: % de pérdida de peso.

4.3. Análisis estadístico:

De acuerdo al análisis estadístico con Kruskal-Wallis, se determinó que si hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, tanto para los ensayos a pH 5.6, como también con los ensayos con pH 6.6, **Apéndice 7**. Al utilizar las pruebas Post-hoc, con un nivel de confianza de 95% y un $p < 0.05$, para establecer diferencias significativas en el % Pp de los diferentes grupos y el control, a pH 5.6, se estableció que existe diferencias significativas en los tratamientos T02, T03 y T09 (todos fueron tratamientos individuales); y a pH 6.6 en los tratamientos T01, T06, T09 (tratamientos individuales), T12 y T14 (tratamientos en conjunto), **Apéndice 8**.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1. Metabolitos secundarios producidos por cepas degradadoras de PET:

El objetivo del trabajo fue comparar la biodegradación individual y conjunta del PET empleando cepas bacterianas termófilas. De forma complementaria, se realizó el screening de la producción de BS y lipasas por parte de las cepas bacterianas termófilas degradadoras de PET ya que estas moléculas podrían ayudar a disminuir la hidrofobicidad en el polímero plástico para así lograr una mejor adjunción de los microorganismos (Santucho, 2015; Herzog, Müller y Deckwer, 2006).

Respecto a la producción de BS (**Tabla 3**), los resultados muestran que solo 4 cepas (p.e., *Tistrella mobilis*, *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus borstelensis*, y *Bacillus sp.*) fueron capaces de disminuir la tensión interfacial en el ensayo DCM, lo que podría influir positivamente en la capacidad de estos microorganismos para adjuntarse a los polímeros hidrofóbicos como el PET. En cuanto a las cepas restantes que no produjeron cambios evidentes en este ensayo, estas podrían estar empleando otros mecanismos para su adjunción a los polímeros plásticos, tales como la producción de polisacáridos o la adjunción por flagelos o algún apéndice, sin embargo se necesita realizar pruebas adicionales para confirmarlo (Zhang *et al.*, 2023; Guo *et al.*, 2023).

Los BS producidos por *Tistrella*, *Bacillus* y *Brevibacillus* han sido reportados en estudios previos. En nuestro estudio la cepa *T. mobilis*, obtuvo el mejor resultado respecto a la disminución de la tensión interfacial, lo cual concuerda con la investigación de Ding *et al.*, (2013), en la cual se reporta la producción de didemnina B, un lipopéptido con actividad tensioactiva producido por *T. mobilis*. De forma similar, las cepas de *B. licheniformis* también produjeron una disminución de la tensión interfacial, aunque más

débil. Estudios previos reportan la producción de lipopéptidos similares a la liquenisina-A y surfactina por parte de este microorganismo (Joshi *et al.*, 2016; El-Sheshtawy *et al.*, 2016). Con respecto a la cepa de *B. borstelensis*, la ligera disminución de la tensión interfacial podría deberse a la producción de moléculas tensioactivas tales como fengicinas (Dong *et al.*, 2022).

Es importante mencionar que existen diversos parámetros que influyen en la producción de BS por microorganismos. Uno de estos factores es la fuente de carbono; en este trabajo se usó gasolina como única fuente de carbono, sin embargo, se reporta que el empleo de fuentes de carbono (p.e., glucosa y aceite de soya) de forma simultánea, puede aumentar la producción de biosurfactantes (Kim *et al.*, 1997). Otro factor es el tiempo de incubación, y esto puede variar según el microorganismo, siendo entre 5 – 11 días el tiempo promedio (Cavalero y Cooper, 2003). La agitación es otro factor importante, cuando se trabaja con microorganismos aerobios, debido a que incrementa la concentración de O₂ disuelto y mejora la homogenización de los nutrientes disponibles. Por ejemplo, se ha reportado que una agitación constante de 200 rpm, a pH 7, con una concentración de aceite de palma a 3,0% (v/v), a 29 °C, mejora la producción de BS con *P. alcaligenes* (Oliveira *et al.*, 2009). En otro estudio, se reportó que una agitación de 100 rpm, a pH 7, con una concentración de gasolina mezclada con etanol de 3 a 4 % (v/v) y a 30 °C, mejora la producción de BS con *Serratia* sp. (Cunha *et al.*, 2004).

Así también, el pH es un factor a tener en cuenta. Abouseoud *et al.*, (2010), sugieren que el pH alcalino favorece una mayor capacidad de emulsión utilizando diferentes solventes orgánicos, esto fue comprobado por Alvarez *et al.*, (2015), quienes trabajaron con microorganismos aislados de suelos contaminados con petróleo y evaluaron diferentes valores de pH (4.0 – 10.0), siendo el pH 8 el que brindó un mejor resultado en la

emulsificación de este hidrocarburo. Es importante mencionar que el pH de 8 no afectó el desarrollo de los microorganismos estudiados.

Respecto a la actividad lipolítica extracelular, resultados positivos fueron observados en las cepas de los géneros *Bacillus* y *Tristrella*. Bredai *et al.*, (2021), reportan la producción de lipasas en *B. licheniformes*, usando como sustrato aceite de oliva y mostrando estabilidad y viabilidad a altas temperaturas y un amplio rango de pH; de igual manera, Dang *et al.*, (2018), reportan la producción de lipasas con una cepa termófila de *Bacillus* sp, usando como sustrato tributirina (éster compuesto de ácido butírico y glicerol), a una T° de incubación de 55°C, siendo aplicada en la biodegradación de plásticos. Asimismo, Zhang *et al.*, (2011), reportan actividad lipolítica en especies del género *Tristrella*, determinada mediante tiras de índice de perfil analítico (API), aunque este estudio fue realizado a 20°C.

Por otro lado, aunque no se observó producción de lipasas por parte de la cepa *B. borstelensis*, existen reportes en los que se ha logrado demostrar la actividad lipolítica extracelular por parte de estos microorganismos. Tripathy *et al.*, (2016), reportaron la producción de lipasas por *B. borstelensis* (aislada de una fuente termal), a una T° óptima de 50 °C . Esto indica que cambiando los medios de cultivo o modificando las condiciones de incubación es posible obtener resultados más favorables.

La producción de BS y lipasas, por parte de los microorganismos termófilos estudiados, tienen una relación crucial con la biodegradación de plásticos, pues su presencia puede desempeñar un papel significativo, por un lado, al catalizar la hidrólisis de los enlaces éster presentes en el plástico, provocando una disminución de la longitud de la cadena, y por otro lado, al facilitar la adhesión microbiana a la superficie del polímero, al conferir hidrofobicidad, y al movilizar los productos de la degradación enzimática hacia el

citoplasma, por lo tanto, en la eficiencia y velocidad de despolimerización del plástico, según diversas investigaciones. En esta investigación, se logró demostrar la producción de estos metabolitos en al menos 3 géneros diferentes de las cepas evaluadas, lo que tendría relación con los resultados de los ensayos de biodegradación del PET que se explican a continuación.

5.2. Biodegradación individual y conjunta del PET:

Luego de realizar el ensayo de biodegradación, los tratamientos individuales que obtuvieron un % Pp > 10 % fueron T02; T03; T09 a pH 5.6, y T01; T06; T09; a pH 6.6, (**Tabla 5**). Por otro lado, los tratamientos conjuntos que obtuvieron un Pp > 10 % fueron el T12; T14; T17, a pH 6.6. (**Tabla 6**).

En cuanto a los tratamientos individuales, los microorganismos involucrados en la mayor biodegradación de PET han sido reportados en otros estudios y están directamente relacionados con la producción de metabolitos secundarios. La cepa *B. licheniformis* (T06) obtuvo el porcentaje más alto en la degradación del PET a pH 6.6 (Pp: 29.09 %). Auta, Emenike y Fauziah, (2017), experimentaron con *Bacillus sp.* en la biodegradación de PET, obteniendo como resultados 3.0 % y 6.6 % Pp en 40 días de incubación. De igual manera, Álava y Velásquez, (2023), trabajaron con láminas de PET a 20°C y a 180 rpm y obtuvieron 0.43% Pp a los 45 días. Es importante mencionar que en nuestro estudio esta cepa produjo lipasas extracelulares. El alto % Pp de esta cepa pudo deberse a que las condiciones establecidas fueron óptimas para su desarrollo. Además, la utilización del PET en polvo, a 55-60 °C, redujo la hidrofobicidad y aumentó la flexibilidad del polímero.

Adicionalmente, *T. mobilis*, T09, (Pp de 16.86% y 18.96 % a pH 5.6 y 6.6; respectivamente), ha sido reportada como una bacteria biodegradadora de contaminantes

clorados e hidrolizante de PET (Wang *et al.*, 2015; Valdez-Nuñez y Rivera-Jacinto, 2022). En este estudio esta cepa mostró que tiene capacidad para producir BS y lipasas. Por otro lado, *B. borstelensis*, T02, (15.80 % Pp a pH 5.6) ha sido reportada en la biodegradación de polietileno de baja densidad a 50°C (Hadad, Geresh y Sivan, 2005), así como en la biodegradación de PET (Valdez-Nuñez y Rivera-Jacinto, 2022; Quispe, 2022), esta cepa mostró que tiene capacidad para producir BS. Así también, *B. paralicheniformis*, T03, (11.43 % Pp a pH 5.6), microorganismo que presenta genes que codifican para enzimas implicadas en la biodegradación de polímeros plásticos (p.e., esterases, oxigenasas, lipasas, hidrolasas, oxidorreductasas y deshidrogenasas (Ganesh Kumar *et al.*, 2021)) ha sido relacionado con la capacidad de utilizar el LDPE como única fuente de carbono (Quispe, 2022). En este estudio, esta cepa produjo lipasas.

Trabajar con bacterias en conjunto (consorcio) podría ser difícil de controlar en comparación a los monocultivos, sin embargo, debido a las interacciones positivas entre los microorganismos (p.e., sinergismo), este enfoque podría llegar a ser muy beneficioso para la biodegradación del PET. En este estudio, el resultado más destacado fue el obtenido por el T14 (25.80 % Pp a un pH de 6.6). El T14 estuvo conformado por las cepas de los tratamientos individuales T09 y T10, siendo el primero (*T. mobilis*), uno de los tratamientos más sobresalientes. Si bien es cierto, con T10 (*B. licheniformis*), no se obtuvo ningún % Pp individualmente en los pHs evaluados, es importante resaltar que en conjunto esta cepa pudo haber aportado positivamente al proceso de biodegradación. *T. mobilis*, produjo ambos metabolitos, y *B. licheniformis* produjo lipasas, en el screening de metabolitos secundarios (**Tabla 3**). Este hallazgo encuentra respaldo con el reporte de Maheswaran *et al.*, (2023), quienes llevaron a cabo una investigación con películas de PET y obtuvieron un 28.78% Pp de gránulos de PET a 25 °C utilizando un consorcio

artificial (*S. aurantiaca*, *B. subtilis*, *A. flavus* y *A. niger*), durante un periodo de incubación de 60 días.

Un hallazgo interesante fue el T12. Este tratamiento en conjunto mostró una alta Pp con 17.48% a pH 6.6, sin embargo, las cepas que conformaron este tratamiento (T05 y T10), no mostraron actividad en la biodegradación de PET de forma individual. No obstante, estas cepas sí mostraron producción de lipasas extracelulares, en el screening de metabolitos secundarios (**Tabla 3**), y produjeron BS en los sobrenadantes, posterior a los procesos de biodegradación (**Tabla 4** y **Apéndice 4**). Este resultado sugiere que los microorganismos involucrados no ejercieron una acción individual pero sí conjunta en la biodegradación del PET, esto debido probablemente a interacciones de sinergismo entre estos microorganismos (p.e., es probable que un “microorganismo A”, haya iniciado la degradación de las cadenas grandes, liberando subproductos que fueron aprovechados por el “microorganismo B”, evitando así la inhibición del “microorganismos A” por acumulación de subproductos en el medio; o también es probable que la producción de algún metabolito haya propiciado la formación de un ambiente óptimo para el crecimiento de ambos microorganismos), para beneficio mutuo.

El T17 fue otro de los tratamientos en conjunto que mostró una mayor biodegradación del PET (Pp: 14.57 % a pH 6.6). Este tratamiento estuvo conformado por los tratamientos individuales T02, T03, T05, T08 y T09; en donde T09 (a ambos pHs), T02 y T03 (pH 5.6), mostraron altos % Pp cuando trabajaron individualmente. Este resultado se respalda con la producción de metabolitos secundarios por parte de las cepas que conformaron este tratamiento (**Tabla 3**). T05 produjo BS en los sobrenadantes, posterior a los procesos de biodegradación (**Tabla 4**).

Un factor crucial para la obtención de estos resultados en la biodegradación del PET fue el utilizar PET en polvo. Esto fue clave porque se incrementó la biodisponibilidad, al aumentar el área de contacto, y por ende, una mayor adherencia de los microorganismos al polímero; mejoró la actividad enzimática, al aumentar las cadenas sueltas; se redujo la resistencia mecánica, al disminuir las regiones cristalinas; y se mejoró la dispersión de la fuente de carbono en un medio acuoso. Este enfoque se respalda con la investigación de Dhaka *et al.*, (2022), quienes emplearon cepas del género *Bacillus* y trabajaron tanto con láminas como con polvo de PET; en su investigación, lograron un 36 % Pp en láminas en un periodo de 28 días, mientras que para el polvo de PET de 300 μm , alcanzaron un 66% Pp en tan solo 18 días, bajo condiciones de incubación a 30 °C y 120 rpm.

La biodegradación del PET se pudo observar principalmente en los tratamientos individuales. Esto podría explicarse por el inóculo utilizado en cada tratamiento (10 %). En los tratamientos individuales, la totalidad del inóculo correspondió a una sola cepa. En cambio, en los tratamientos grupales, el mismo volumen tuvo que ser distribuido entre 2 o 5 cepas pudiendo afectar su desempeño al momento de emplear el PET como principal fuente de carbono. Efectos inhibitorios entre los microorganismos empleados (antagonismos), así como prolongadas fases de adaptación (fase lag de la curva de crecimiento), entre estos tampoco podría descartarse.

Durante la biodegradación del PET los valores de pH variaron especialmente en condiciones ácidas y se observaron cambios de color del medio de cultivo. En el lote de pH 5.6 (**Fig.3A**) existió un aumento significativo, superando incluso el pH 9.0, mientras que a pH 6.6, (**Fig.3B**), la variación fue mucho menor, manteniéndose entre 5.81 y 7.18, pero en general, se redujo levemente. La alcalinización del medio cuando se trabajó a un pH inicial ligeramente ácido (5.6), se debería a la liberación de algún metabolito o algún compuesto como mecanismo de adaptación, por parte de los microorganismos. La

disminución del pH se debe a acumulación de grupos carboxilos, en el proceso de biodegradación (Guo *et al.*, 2023).

La generación de subproductos es inherente a la biodegradación de compuestos orgánicos, y también está muy relacionado con el cambio de pH, por ejemplo, la liberación de BHET y MHET, por acción de enzimas tales como las esterasas, según la investigación de Guo *et al.*, (2023), se lleva a cabo a pH entre 7-8; mientras que la liberación de TPA, se llevaría a cabo a un pH más ácido; si estos datos lo comparamos con la presente investigación, se podría asumir que cuando se trabajó a pH 5.6 (el pH se incrementó), se liberó más BHET y MHET, y poco TPA, y cuando se trabajó con pH 6.6 (el pH disminuyó levemente), se liberó BHET, MHET, y TPA en mayor cantidad (el TPA es asimilado por el microorganismo). Por otro lado, el cambio de color a amarillo pudo deberse a la liberación del anión 4-nitrofenolato, a partir del TPA (Pirillo, Pollegioni y Molla, 2021). Finalmente, la aparente falta de Pp o, el ligero aumento del peso, puede atribuirse a la presencia de biomasa aún adherida a las partículas de PET. Cabe resaltar que todos los controles se mantuvieron sin cambios.

Se puede mencionar que las bacterias termófilas estudiadas demostraron ser capaces de realizar la biodegradación del PET, tanto de forma individual como en conjunto. Así también, la biodegradación de este polímero pudo observarse en los dos valores de pH evaluados (1 punto de pH de diferencia). Considerando que la desviación en una unidad de pH puede reducir la tasa de crecimiento y la actividad metabólica de las comunidades microbianas en aproximadamente un 50%, las cepas termófilas evaluadas en este estudio podrían tener un amplio espectro de aplicación respecto a este parámetro (Jin y Kirk, 2018).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones:

Las bacterias termófilas son capaces de degradar el PET, tanto individualmente como en conjunto (formando consorcios). Individualmente, T02 (*B. borstelensis*), T03 (*B. paralicheniformis*) y T09 (*T. mobilis*) a un pH inicial de 5.6; y T01 (*B. licheniformis*), T06 (*B. licheniformis*) y T09 (*T. mobilis*), a un pH inicial de 6.6, mostraron un % Pp > 10 %. Los tratamientos en conjunto, T12, T14 y T17, fueron los más sobresalientes a un pH inicial de 6.6 (14.57 % - 25.80%).

Se demostró que las bacterias termófilas poseen la capacidad de producir metabolitos secundarios relacionados a la biodegradación del PET. Entre estas, *Tistrella mobilis* (T09), mostró el mejor rendimiento en la producción de biosurfactantes. *Brevibacillus borstelensis* (T02), *Bacillus licheniformis* (T04), y *Bacillus sp.*(T08), también demostraron actividad en la disminución de la tensión interfacial. Respecto a la producción de lipasas, 9 de las 10 cepas evaluadas presentaron resultados positivos.

El pH juega un papel muy importante en la biodegradación de plásticos, algunos tratamientos tuvieron mejor actividad a un pH inicial de 6.6 (T01, T06, T09, T12, T14 y T17), y otros a un pH inicial de 5.6 (T02, T03). Es importante resaltar que los tratamientos a pH 5.6 alcalinizaron el medio hasta valores superiores a 9, a pesar de esto, los tratamientos a pH 6.6 obtuvieron un mayor %Pp.

6.2.Recomendaciones:

Observar la interacción microscópica del polímero con los microorganismos sería muy interesante, ya que permitiría analizar la colonización y la alteración de la topografía del polímero.

Realizar una caracterización química de los subproductos liberados en la biodegradación del PET, aclararía muchas dudas respecto a algunos fenómenos como por ejemplo el cambio de color del medio.

Trabajar con un tamaño uniforme del polímero (emplear un tamiz), para así evitar errores en la pérdida de peso.

Mantener los ensayos de biorremediación en constante agitación podría mejorar los resultados, ya que se incrementa la oxigenación y se homogeniza el sustrato en todo el medio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abouseoud, M. *et al.* (2010) 'Effect of pH and salinity on the emulsifying capacity and naphthalene solubility of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*', *Journal of Hazardous Materials*, 180(1–3), pp. 131–136. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2010.04.003.

Ahmed, T. *et al.* (2018) 'Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety', *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), pp. 7287–7298. doi: 10.1007/s11356-018-1234-9.

Álava, S. and Velásquez, C. (2023) *Evaluación de Bacillus sp. antárticos en la biodegradación de polietileno PET*. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. Available at: https://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/2084/1/TIC_IA38D.pdf.

Alvarez, V. M. *et al.* (2015) 'Bacillus amyloliquefaciens TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, pp. 14–21. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.046.

Arotoma, F. *et al.* (2021) 'Biodegradación del polietileno de baja densidad con *Staphylococcus sp.* aislado del botadero de Ascensión – Huancavelica', *Siglo XXI*, 1, pp. 1–10. Available at: <https://revistas.unh.edu.pe/index.php/rcsxxi/article/view/21>.

Arribas, H. (2021) *Microorganismos de la plastisfera y la biodegradación del plástico por la microbiota digestiva de diferentes insectos*. Universidad de Salamanca. Available at: <http://hdl.handle.net/10366/147486>.

Atanasova, N. *et al.* (2021) 'Plastic degradation by extremophilic bacteria', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). doi: 10.3390/ijms22115610.

Aulitto, M. *et al.* (2020) ‘Whole-Genome Sequence of *Brevibacillus borstelensis* SDM, Isolated from a Sorghum-Adapted Microbial Community’, *Microbiology Resource Announcements*, 9(48), pp. 15–16. doi: 10.1128/mra.01046-20.

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*, 231, pp. 1552–1559. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2017.09.043.

Barbarán, H. M., Cabanillas, L. J. and Rubio, Y. E. (2018) ‘Biodegradación de polietileno tereftalato (PET) por acción de *Pseudomona aeruginosa*, en condiciones de laboratorio’, *Ucv*, p. 358. Available at: https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/32118/barbaran_sh.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Barrionuevo, R. (2017) *Producción de biosurfactantes bacterianos para su uso en procesos de biotratamiento de efluentes industriales con contenido de metales*, *Biblioteca Digital FCEN-UBA*. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Available at: https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6463_Barrionuevo%0Ahttps://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6463_Barrionuevo.pdf.

Barth, M. *et al.* (2015) ‘Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from *Thermobifida fusca*’, *Biochemical Engineering Journal*, 93, pp. 222–228. doi: 10.1016/j.bej.2014.10.012.

Becerra, L. and Horna, M. (2016) ‘Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos’, *Scientia agropecuaria*, 7(1), pp. 23–31. doi:

10.17268/sci.agropecu.2016.01.03.

Berenguer, J. (2011) *Thermophile*, *Encyclopedia of Astrobiology*. Berlin. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-642-11274-4_1583.

Bredai, R. *et al.* (2021) ‘Purification of *Bacillus licheniformis* Lipase and its Application as an Additive in Detergent for Destaining’, *Journal of Surfactants and Detergents*, 24(5), pp. 835–853. doi: 10.1002/JSDE.12514.

Cavalero, D. A. and Cooper, D. G. (2003) ‘The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214’, *Journal of Biotechnology*, 103(1), pp. 31–41. doi: 10.1016/S0168-1656(03)00067-1.

Chang, X. *et al.* (2019) ‘Potential health impact of environmental micro- and nanoplastics pollution’, *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), pp. 1–12. doi: 10.1002/jat.3915.

Chen, S. (2023) *A global treaty to end plastic pollution is in sight*, *United Nations Development Programme*. Available at: <https://www.undp.org/blog/global-treaty-end-plastic-pollution-sight>.

Cuecas, M. de P. A. (2017) *Vida microbiana a temperaturas elevadas. diversidad, aislamiento, termoestabilidad molecular y genómica*. Universidad de Sevilla. Available at: <https://digital.csic.es/handle/10261/154334>.

Cui, Z. and Shao, Z. (2009) ‘Predominant strains of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading consortia from deep sea of the Middle Atlantic Ridge’, *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 49. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19873754/>.

Cunha, C. D. *et al.* (2004) ‘*Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline’, *Process*

- Biochemistry*, 39(12), pp. 2277–2282. doi: 10.1016/J.PROCBIO.2003.11.027.
- 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*, 9(1). doi: 10.1088/2043-6254/aaabaf.
- Dhaka, V. *et al.* (2022) ‘Biological Degradation of Polyethylene Terephthalate by Rhizobacteria’, *Research Square*. Available at: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1190216/v1>.
- Ding, X. *et al.* (2013) ‘Bacterial biosynthesis and maturation of the didemnin anticancer agents’, *Journal of the American Chemical Society*, 1320(3), pp. 8625–8632. doi: 10.1021/ja301735a.Bacterial.
- Dong, H. *et al.* (2022) ‘Optimization and characterization of biosurfactant produced by indigenous: *Brevibacillus borstelensis* isolated from a low permeability reservoir for application in MEOR’, *RSC Advances*, 12(4), pp. 2036–2047. doi: 10.1039/d1ra07663a.
- Dunlap, C. A. *et al.* (2015) ‘*Bacillus paralicheniformis* sp. Nov., isolated from fermented soybean paste’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(10), pp. 3487–3492. doi: 10.1099/ijsem.0.000441.
- El-Sheshtawy, H. S. *et al.* (2016) ‘Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery’, *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(3), pp. 293–298. doi: 10.1016/J.EJPE.2015.07.018.
- Gama, C. (2014) ‘Acción de la celulosa en la biodegradación de películas de gelatina’, p. 63. Available at: https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/13565/Tesis_2014_Cynthia_Gama_Abundez.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Ganesh Kumar, A. *et al.* (2021) ‘Biodegradation of polystyrene by deep-sea *Bacillus*

paralicheniformis G1 and genome analysis’, *Science of the Total Environment*, 774, p. 145002. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.145002.

Garcia, A. O. (2017) *Ingenieria Basica de una Planta de Produccion de Tereftalato de Polietileno*. Universidad de Sevilla. Available at: <https://biblus.us.es/bibing/proyectos/abreproy/91113/fichero/TFGdefinitivo.pdf>.

Geyer, R. (2020) *Production, use, and fate of synthetic polymers, Plastic Waste and Recycling*. California: Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-817880-5.00002-5.

Global, I. (2022) *¿Qué es el cometabolismo?* Available at: <https://www.igi-global.com/dictionary/cometabolism/49449>.

GRC (2019) *Región Cajamarca produce 390 toneladas de basura por día*. Cajamarca. Available at: [https://portal.regioncajamarca.gob.pe/sites/default/files/noticias/documentos/nota de prensa 170.pdf](https://portal.regioncajamarca.gob.pe/sites/default/files/noticias/documentos/nota_de_prensa_170.pdf).

Guo, W. *et al.* (2023) ‘Biodegradation of PET by the membrane-anchored PET esterase from the marine bacterium *Rhodococcus pyridinivorans* P23’, *Communications Biology*, 6(1), pp. 1–13. doi: 10.1038/s42003-023-05470-1.

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

Herzog, K., Müller, R. J. and Deckwer, W. D. (2006) ‘Mechanism and kinetics of the enzymatic hydrolysis of polyester nanoparticles by lipases’, *Polymer Degradation and Stability*, 91(10), pp. 2486–2498. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2006.03.005.

Javed, S. *et al.* (2017) ‘Bacterial lipases: A review on purification and characterization’,

Progress in Biophysics and Molecular Biology, 132, pp. 23–34. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014.

Jin, Q. and Kirk, M. F. (2018) ‘pH as a primary control in environmental microbiology: 1. thermodynamic perspective’, *Frontiers in Environmental Science*, 6(MAY), pp. 1–15. doi: 10.3389/fenvs.2018.00021.

Johnston, B. *et al.* (2022) ‘Bioconversion of Plastic Waste Based on Mass Full Carbon Backbone Polymeric Materials to Value-Added Polyhydroxyalkanoates (PHAs)’, *Bioengineering*, 9(9). doi: 10.3390/BIOENGINEERING9090432.

Joshi, S. J. *et al.* (2016) ‘Production, characterization, and application of bacillus licheniformis W16 biosurfactant in enhancing oil recovery’, *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), p. 227821. doi: 10.3389/FMICB.2016.01853/BIBTEX.

Kaczorek, E. *et al.* (2018) ‘The impact of biosurfactants on microbial cell properties leading to hydrocarbon bioavailability increase’, *Colloids and Interfaces*, 2(3). doi: 10.3390/colloids2030035.

Kawai, F., Kawabata, T. and Oda, M. (2019) ‘Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(11), pp. 4253–4268. doi: 10.1007/s00253-019-09717-y.

Khalil, A. B. *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: 10.1155/2018/5862437.

Kim, S. Y. *et al.* (1997) ‘Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture’, *Applied Microbiology and*

Biotechnology, 48(1), pp. 23–26. doi: 10.1007/S002530051009/METRICS.

Koutny, M., Lemaire, J. and Delort, A. M. (2006) ‘Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives’, *Chemosphere*, 64(8), pp. 1243–1252. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.12.060.

Kumwenda, B. *et al.* (2013) ‘Analysis of protein thermostability enhancing factors in industrially important *Thermus* bacteria species’, *Evolutionary Bioinformatics*, (9), pp. 327–342. doi: 10.4137/EBO.S12539.

De la Rosa Cruz, N. L., Sánchez-Salinas, E. and Ortiz-Hernández, y M. L. (2014) ‘Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas’, *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 5(2). doi: 10.7603/s40682-014-0008-4.

Law, K.-Y. (2014) ‘Definitions for Hydrophilicity, Hydrophobicity, and Superhydrophobicity: Getting the Basics Right’. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jz402762h>.

Linhardt, R. J. *et al.* (1989) ‘Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose’, *Biotechnology and Bioengineering*, 33, pp. 365–368. Available at: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/bit.260330316>

Ma, Z. *et al.* (2018) ‘Rhamnolipid influences biosorption and biodegradation of phenanthrene by phenanthrene-degrading strain *Pseudomonas* sp. Ph6’, *Environmental Pollution*, 240, pp. 359–367. doi: 10.1016/j.envpol.2018.04.125.

Maheswaran, B. *et al.* (2023) ‘In vivo degradation of polyethylene terephthalate using microbial isolates from plastic polluted environment’, *Chemosphere*, 310, p. 136757. doi:

10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.136757.

Manzur, A., Limón-González, M. and Favela-Torres, E. (2004) ‘Biodegradation of Physicochemically Treated LDPE by a Consortium of Filamentous Fungi’, *Journal of Applied Polymer Science*, 92(1), pp. 265–271. doi: 10.1002/app.13644.

Mariano (2011) *Propiedades Mecánicas, Tecnología de los plásticos*. Available at: <https://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2011/06/propiedades-mecanicas.html#:~:text=La resistencia a la tracción,temperatura%2C humedad y velocidad especificadas.> (Accessed: 30 April 2022).

Markandan, Umamaheswari and Anuradha (2019) ‘Bacterial (*Bacillus licheniformis*) biodegradation of UV exposed pet (poly ethylene terephthalate)’, *International Journal of Recent Scientific Research*, 10(November), pp. 30693–30695. doi: 10.24327/IJRSR.

Méndez, A. (2017) *La cristalinidad, ¿amigo o enemigo durante el procesamiento del PET?*, *Plastics Technology México*. Available at: <https://www.pt-mexico.com/articulos/la-cristalinidad-amigo-o-enemigo-durante-el-procesamiento-del-pet>.

Méndez, A. (2021) *Problemas decisivos en el reciclado de PET: humedad*, *Plastics technology México*. Available at: <https://www.pt-mexico.com/articulos/problemas-decisivos-en-el-reciclado-de-pet-humedad>.

MINAM (2016) *Salud y ambiente, Dirección General de Educación, Cultura y Ciudadanía Ambiental*. Lima. Available at: <https://www.minam.gob.pe/educacion/wp-content/uploads/sites/20/2017/02/Publicaciones-1.-Texto-de-consulta-Módulo-1-1.pdf>.

Mohanty, S. and Mukherji, S. (2013) ‘Surfactant aided biodegradation of NAPLs by *Burkholderia multivorans*: Comparison between Triton X-100 and rhamnolipid JBR-

515', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, pp. 644–652. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.08.064.

Mukherjee, S., Roy Chowdhuri, U. and Kundu, P. 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', *RSC Advances*. doi: 10.1039/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', *Chemical Technology & Biotechnology*, 28(5), pp. 1300–1311. doi: 10.1002/j.

Muras, A. *et al.* (2021) 'Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*', *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), pp. 609–627. doi: 10.1080/07388551.2021.1873239.

Nayak, N. S. *et al.* (2020) 'Biosurfactant production and engine oil degradation by marine halotolerant *Bacillus licheniformis* LRK1', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101808.

Oda, M. *et al.* (2021) *Cutinases from thermophilic bacteria (actinomycetes): From identification to functional and structural characterization*. 1st edn, *Enzymatic Plastic Degradation*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.mie.2020.12.031.

Oliveira, F. J. S. *et al.* (2009) 'Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain', *Process Biochemistry*, 44(4), pp. 383–389. doi: 10.1016/J.PROCBIO.2008.11.014.

Orellana, R. *et al.* (2018) 'Living at the Frontiers of Life: Extremophiles in Chile and Their Potential for Bioremediation', *Frontiers in Microbiology*, 9(October), pp. 1–25.

doi: 10.3389/fmicb.2018.02309.

Palacios, C. and Prado, V. (2018) 'Biodegradación de polietileno tereftalato por acción de consorcios bacterianos procedentes de diferentes tipos de humus', pp. 2–51. Available at: <https://repositorio.unica.edu.pe/handle/20.500.13028/3153>.

Perfumo, A. *et al.* (2010) 'Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology', in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Northern Ireland, UK, pp. 1502–1510. doi: DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_103.

Pirillo, V., Pollegioni, L. and Molla, G. (2021) 'Analytical methods for the investigation of enzyme-catalyzed degradation of polyethylene terephthalate', *FEBS Journal*, 288(16), pp. 4730–4745. doi: 10.1111/febs.15850.

Pivokonsky, M. *et al.* (2018) 'Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water', *Science of the Total Environment*, 643, pp. 1644–1651. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.102.

Płaza, G. A., Zjawiony, I. and Banat, I. M. (2006) 'Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils', *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 50(1), pp. 71–77. doi: 10.1016/j.petrol.2005.10.005.

Qi, X. *et al.* (2021) 'Evaluation of PET Degradation Using Artificial Microbial Consortia', *Frontiers in Microbiology*, 12(December), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2021.778828.

Quispe, B. (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*. Universidad Nacional de

Cajamarca. Available at:
[https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/4714/Betsy Rosemary Quispe Cruz.pdf?sequence=4](https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/4714/Betsy_Rosemary_Quispe_Cruz.pdf?sequence=4).

La República (2023) *Perú genera 1.2 millones de toneladas de residuos plásticos al año, República sostenible*. Available at: <https://especial.larepublica.pe/la-republica-sostenible/2023/07/05/peru-genera-12-millones-de-toneladas-de-residuos-plasticos-al-ano-269930>.

Rivas, M. and Garelli, O. (2021) *Impacto de la contaminación por plásticos en la biodiversidad y patrimonio biocultural de México, Heinrich-Böll-Stiftung*. Available at: <https://mx.boell.org/es/2021/03/10/impacto-de-la-contaminacion-por-plasticos-en-la-biodiversidad-y-patrimonio-biocultural>.

Rocha, A. and Peña, F. (2020) *Monografía Sobre La Biodegradación De Tereftalato De Polietileno (PET)*. Universidad Distrital Fransisco José de Caldas. Available at: <https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/25500/RochaNiñoJenyferAlexandra2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Royer, S.-J. *et al.* (2018) ‘Production of methane and ethylene from plastic in the environment’, *Journal of Computational and Applied Mathematics*. doi: 10.1016/j.cam.2010.07.024.

Santos, D. K. F. *et al.* (2016) ‘Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century’, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), pp. 1–31. doi: 10.3390/ijms17030401.

Santucho, M. (2015) *Estudio de factibilidad de degradación fotoquímica en films plásticos a base de poliolefinas*. Universidad de Belgrano. Available at: http://repositorio.ub.edu.ar/bitstream/handle/123456789/6076/tesina_664_santucho

weimer.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Schoch CL, et al (2020) 'Taxonomía de NCBI: una actualización completa sobre curación, recursos y herramientas', *NCBI*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1402&mode=info>.

Schuyler, Q. A. *et al.* (2015) 'Risk analysis reveals global hotspots for marine debris ingestion by sea turtles', *Global Change Biology*, 22(2), pp. 567–576. doi: 10.1111/gcb.13078.

Shi, B. H. *et al.* (2002) 'Tistrella mobilis gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate-producing bacterium belonging to α -Proteobacteria', *Journal of General and Applied Microbiology*, 48(6), pp. 335–343. doi: 10.2323/jgam.48.335.

Sierra, G. (1957) 'A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates', *Antonie van Leeuwenhoek*, 23(1), pp. 15–22. doi: 10.1007/BF02545855.

Silva, R. de C. F. S. *et al.* (2014) 'Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), pp. 12523–12542. doi: 10.3390/ijms150712523.

Singh, L. and Wahid, Z. A. (2015) 'Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review', *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, pp. 70–80. doi: 10.1016/j.jiec.2014.05.035.

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*, 24(9), pp. 8443–8457. doi: 10.1007/s11356-017-8537-0.

- Skariyachan, S. *et al.* (2018) '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*, 149, pp. 52–68. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.01.018.
- Suasnavas, F. (2017) *Degradación de materiales plásticos "PET" (polyethylene terephthalate), como alternativa para su gestión*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Available at: [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13224/Degradación Química del PET.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13224/Degradación%20Química%20del%20PET.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Symborg (2021) *Cómo interactúan los microorganismos del suelo*. Available at: <https://symborg.com/es/proteccion-suelos/como-interactuan-los-microorganismos-del-suelo/#:~:text=En las relaciones de sinergismo,de crecimiento de la otra>.
- Tahri, N. *et al.* (2013) 'Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms', *Biodegradation - Life of Science*. doi: 10.5772/56194.
- Tiseo, I. (2021) *Demanda de tereftalato de polietileno a nivel mundial de 2010 a 2020, con una previsión de 2021 a 2030*, *Statista*. Available at: <https://www.statista.com/statistics/1128658/polyethylene-terephthalate-demand-worldwide/>.
- Tripathy, S. *et al.* (2016) 'Draft Genome Sequence of *Brevibacillus borstelensis* cifa_chp40, a Thermophilic Strain Having Biotechnological Importance', *Journal of Genomics*, 4, pp. 4–6. doi: 10.7150/jgen.14036.
- Valdez-Nuñez, L. F. and Rivera-Jacinto, M. A. (2022) 'Thermophilic bacteria from Peruvian hot springs with high potential application in environmental biotechnology', *Environmental Technology*. doi: 10.1080/09593330.2022.2143293.

- Vavitsas, K., Glekas, P. D. and Hatzinikolaou, D. G. (2022) ‘Synthetic Biology of Thermophiles: Taking Bioengineering to the Extremes?’, *Applied Microbiology*, 2(1), pp. 165–174. doi: 10.3390/applmicrobiol2010011.
- Wang, L. *et al.* (2015) ‘Expression and characterization of a novel halohydrin dehalogenase from *Tistrella mobilis* KA081020-065’, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26571687/>.
- Wei, R. *et al.* (2019) ‘Biocatalytic Degradation Efficiency of Postconsumer Polyethylene Terephthalate Packaging Determined by Their Polymer Microstructures’, *Advanced Science*, 6(14). doi: 10.1002/advs.201900491.
- Wright, S. L. and Kelly, F. J. (2017) ‘Plastic and Human Health: A Micro Issue?’, *Environmental Science and Technology*, 51(12), pp. 6634–6647. doi: 10.1021/acs.est.7b00423.
- Yalcin, H., Ergin-Tepebasi, G. and Uyar, E. (2018) ‘Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives’, *Journal of Basic Microbiology*. doi: <https://doi.org/10.1002/jobm.201800126>.
- Yan, F. *et al.* (2020) ‘Thermophilic whole-cell degradation of polyethylene terephthalate using engineered *Clostridium thermocellum*’, *Microbial Biotechnology*, 14(2), pp. 374–385. doi: 10.1111/1751-7915.13580.
- Yan, Z. F. *et al.* (2021) ‘Synergistic biodegradation of poly(ethylene terephthalate) using *Microbacterium oleivorans* and *Thermobifida fusca* cutinase’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(11), pp. 4551–4560. doi: 10.1007/s00253-020-11067-z.
- Yoshida, S. *et al.* (2016) ‘A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene

terephthalate)', *Science*, 351(6278), pp. 1196–1199. doi: 10.1126/science.aad6359.

Yuan, J. *et al.* (2020) 'Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics', *Science of the Total Environment*, 715, p. 136968. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136968.

Zalma, S. A. and El-Sharoud, W. M. (2021) 'Diverse thermophilic *Bacillus* species with multiple biotechnological activities are associated within the Egyptian soil and compost samples', *Science Progress*, 104(4), pp. 1–12. doi: 10.1177/00368504211055277.

Zhang, D. C. *et al.* (2011) '*Tistrella bauzanensis* sp. nov., isolated from soil', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(9), pp. 2227–2230. doi: 10.1099/ijs.0.026930-0.

Zhang, M. *et al.* (2023) 'Influence of flagella and their property on the initial attachment behaviors of bacteria onto plastics', *Water Research*, 231, p. 119656. doi: 10.1016/J.WATRES.2023.119656.

Zhang, T. and Zhang, H. (2022) 'Microbial Consortia Are Needed to Degrade Soil Pollutants', *Microorganisms*, 10(2). doi: 10.3390/microorganisms10020261.

Zocorro, G. (2015) *Efecto de diferentes tipos de sustrato de almidón sobre la cinética de crecimiento de Bacillus licheniformis*, *Revista Rebiol.* Available at: https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5073/Zegarra_Zuñiga%2C_Gabi_Zocorro.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

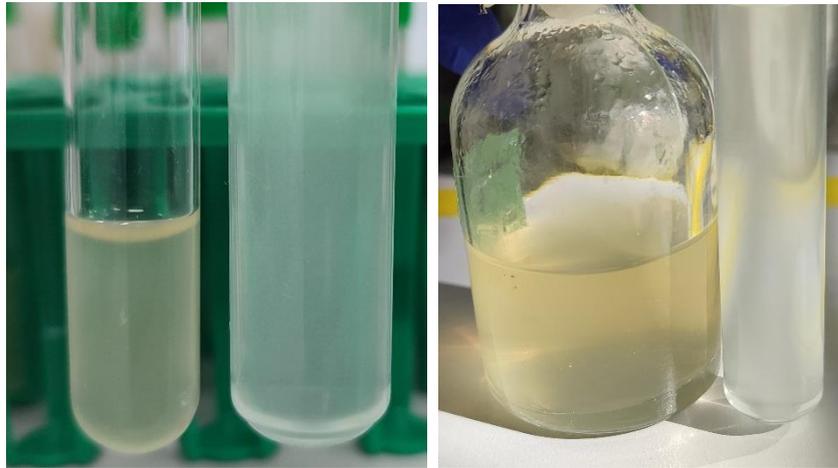
Zuliani, L. *et al.* (2021) 'Biorefinery gets hot: Thermophilic enzymes and microorganisms for second-generation bioethanol production', *Processes*, 9(9), pp. 1–28. doi: 10.3390/pr9091583.

APÉNDICES:

Apéndice 1: Hoja de registro de datos

Trat.	Combinaciones	PI PET (g)	PF. PET (g)					Pp (g) \bar{x}	Pp. (%)
			1	2	3	C	\bar{x}		
T01	<i>Bacillus licheniformis</i> /FJ266313.1								
T02	<i>Brevibacillus borstelensis</i> /KX783601.1								
T03	<i>Bacillus paralicheniformis</i> /MT527535.1								
T04	<i>Bacillus licheniformis</i> /MW148420.1								
T05	<i>Bacillus paralicheniformis</i> /OL824873.1								
T06	<i>Bacillus licheniformis</i> /GU323372.1								
T07	<i>Bacillus licheniformis</i> /KX946197.1								
T08	<i>Bacillus sp.</i> /MT505502.1								
T09	<i>Tistrella mobilis</i> /KF783213.1								
T10	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1								
T11	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1; <i>Brevibacillus borstelensis</i> /KX783601.1								
T12	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1; <i>Bacillus paralicheniformis</i> /OL824873.1								
T13	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1; <i>Bacillus sp.</i> /MT505502.1								
T14	<i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1; <i>Tistrella mobilis</i> /KF783213.1								
T15	<i>Bacillus licheniformis</i> /FJ266313.1; <i>Bacillus licheniformis</i> /MW148420.1; <i>Bacillus licheniformis</i> /GU323372.1; <i>Bacillus licheniformis</i> /KX946197.1; <i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1								
T16	<i>Brevibacillus borstelensis</i> /KX783601.1; <i>Bacillus paralicheniformis</i> /OL824873.1; <i>Bacillus sp.</i> /MT505502.1; <i>Tistrella mobilis</i> /KF783213.1; <i>Bacillus licheniformis</i> /KU983867.1								
T17	<i>Brevibacillus borstelensis</i> /KX783601.1; <i>Bacillus paralicheniformis</i> /MT527535.1; <i>Bacillus paralicheniformis</i> /OL824873.1; <i>Bacillus sp.</i> /MT505502.1; <i>Tistrella mobilis</i> /KF783213.1								

Apéndice 2: Concentración bacteriana de 6×10^8 ufc/mL, empleando el tubo N° 2 de los estándares de turbidez de McFarland.



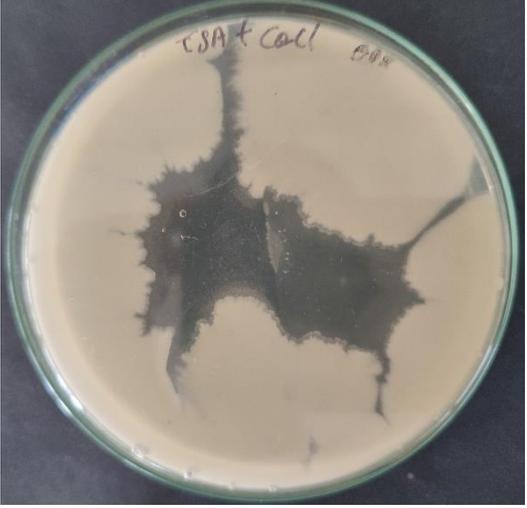
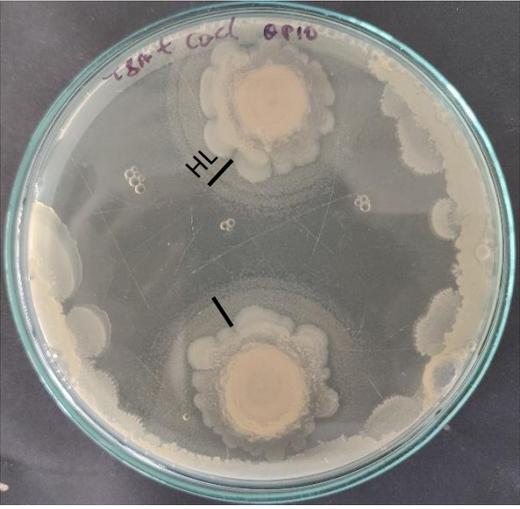
Apéndice 3: Índice de emulsificación (IE-24): Para determinar la producción de biosurfactantes de alto peso molecular (bioemulcificantes) se usó el IE-24, el cual consistió en verificar la mezcla de dos sustancias inmiscibles. Los resultados de las 10 cepas fueron negativas. Los 10 tubos que contenían el filtrado derivado de cada una de las cepas, junto con el hidrocarburo, permanecieron segregados debido a las diferentes densidades de cada solución, y por ende no se evidenció ningún nivel de emulsión. H, hidrocarburo; F, filtrado.

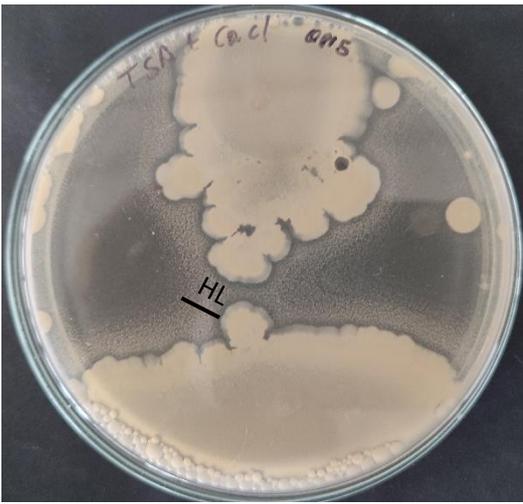


Apéndice 4. Resultados del método del colapso de la gota de los sobrenadantes de los ensayos de biodegradación, al finalizar dicho proceso, a pH 5.6 y 6.6. Se realizó el DCM, para detectar disminución de la tensión interfacial, con el sobrenadante obtenido posterior a la centrifugación que se realizó para hacer el lavado del PET, de todos los tratamientos a ambos pH, después de los 3 meses de incubación. A pH 5.6, se categorizó a cuatro tratamientos como parcial, dos tratamientos como regular y 11 como negativos, en la deformación de la gota, después de compararlos con el control. A pH 6.6, se categorizó a dos tratamientos como parcial y a uno como regular, y los demás como negativos, en la deformación de la gota, después de compararlo con los controles.

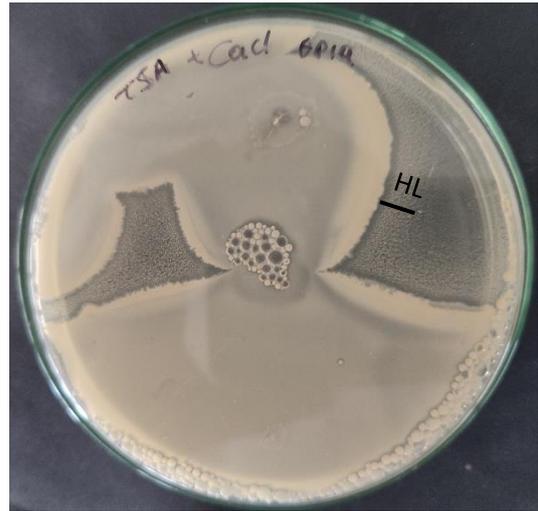


Apéndice 5: Resultados de producción de lipasas extracelulares. En la evaluación de lipasas extracelulares, se determinó como ensayo positivo la formación de un halo en medio TSA. De las 10 cepas evaluadas, se obtuvo 9 cepas productoras de lipasas. Solo la cepa *B. borstelensis*, no produjo la formación de halos y se determinó como no productora de lipasas. H, Halo.

<p>1. <i>Bacillus licheniformis</i>/ FJ266313.1</p> 	<p>2. <i>Brevibacillus borstelensis</i>/ KX783601.1</p> 
<p>3. <i>Bacillus paralicheniformis</i>/MT527535.1</p> 	<p>4. <i>Bacillus licheniformis</i>/ MW148420.1</p> 
<p>5. <i>Bacillus paralicheniformis</i>/OL824873.1</p>	<p>6. <i>Bacillus licheniformis</i>/GU323372.1</p>



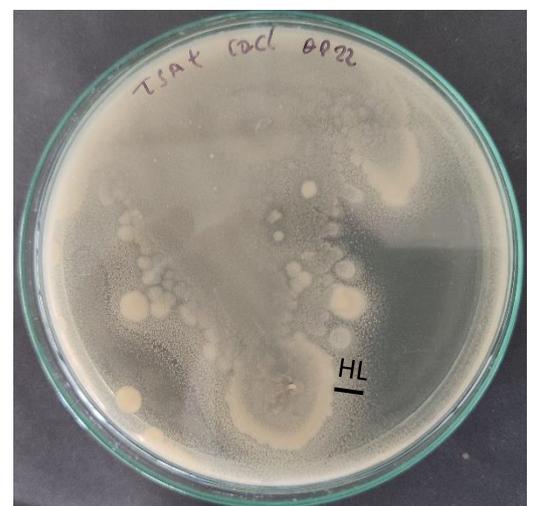
7. *Bacillus licheniformis*/KX946197.1



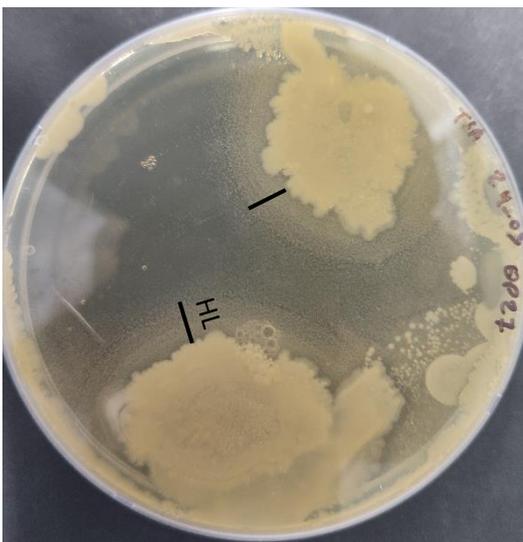
8. *Bacillus* sp./MT505502.1



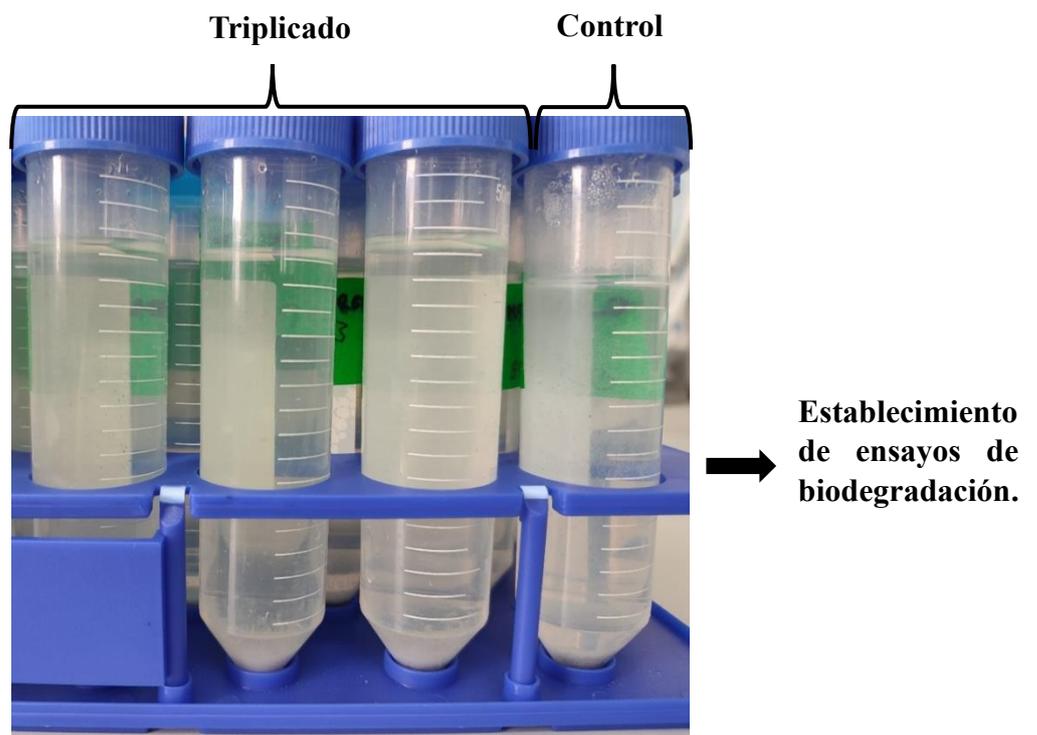
9. *Tistrella mobilis*/KF783213.1



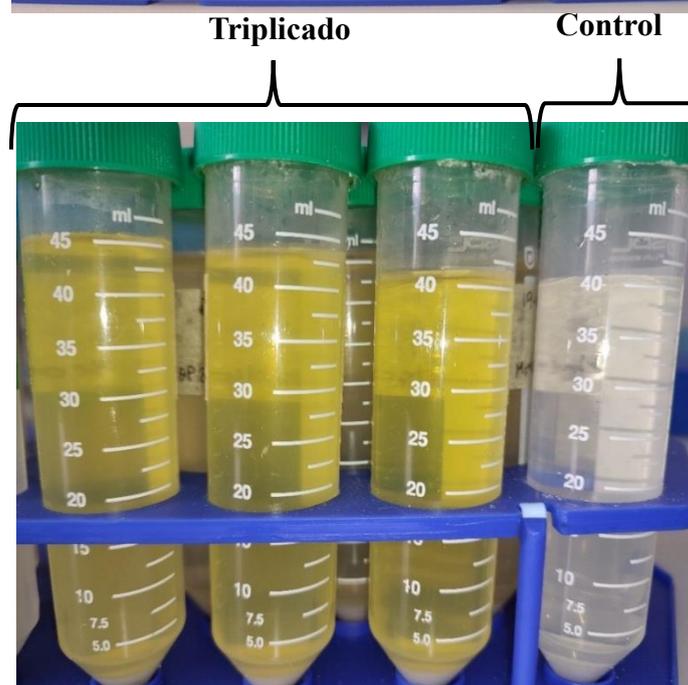
10. *Bacillus licheniformis*/KU983867.1



Apéndice 6: Establecimiento y finalización del periodo de incubación de los ensayos de biodegradación. Todos los tratamientos se establecieron por triplicado más un control (no inoculación de bacterias), de tal manera que al inicio todos los tubos estuvieron completamente transparentes y al finalizar con el periodo de incubación (3 meses después), todos los tratamientos presentaron cambio en la coloración y turbidez, a excepción de los controles, que siempre se mantuvieron transparentes.



Establecimiento de ensayos de biodegradación.



Finalización del periodo de incubación de los ensayos de biodegradación.

Apéndice 7: Análisis estadístico con la Prueba de Kruskal-Wallis.

Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov			
	Estadístico	gl	Sig.
Trat. pH 5.6	0.221	54	<.001
Trat. pH 6.6	0.242	54	<.001

Significancia <0.05 = datos no siguen distribución normal.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes		
Hipótesis nula	Sig.	Decisión
La distribución de Trat.pH5.6 es la misma entre categorías de Tratamiento.	0.031	Rechace la hipótesis nula.
La distribución de Trat.pH6.6 es la misma entre categorías de Tratamiento.	<.001	Rechace la hipótesis nula.

Significancia <0.05 = existen diferencias significativas en al menos dos grupos.

Apéndice 8: Pruebas Post-hoc de Kruskal-Wallis, ajustado mediante la corrección Bonferroni, para establecer diferencias significativas en la Pp de los diferentes grupos y control. A pH 5.6 y 6.6.

Comparaciones por parejas de Tratamiento					
Trat. pH 5.6		Trat. pH 6.6			
Trat.	Sig.	Trat.	Sig.		
C	1	0.846	C	1	0.032
	2	0.039		2	0.153
	3	0.080		3	0.594
	4	0.765		4	0.436
	5	0.668		5	0.938
	6	0.907		6	0.003
	7	0.697		7	0.835
	8	0.525		8	0.866
	9	0.032		9	0.018
	10	0.785		10	0.876
	11	0.746		11	0.979
	12	0.650		12	0.033
	13	0.755		13	0.959
	14	0.213		14	0.007
	15	0.805		15	0.222
	16	0.613		16	0.640
	17	0.475		17	0.075

C, control; Trat, tratamientos; sig, significancia.

ANEXOS:

Anexo 1. Composición de los medios de cultivo.

Cuadro 2. Composición del medio Luria Bertani (LB)

LB	
Formulación	g ^l ⁻¹
Peptona de caseína	10
Extracto de Levadura	5
Cloruro de sodio (NaCl)	10

Fuente: (ICT, 2010).

Cuadro 3. Composición del Medio mínimo de sales (MSM)

MSM	
Formulación	g ^l ⁻¹
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	7.5
Cloruro de potasio (KCl)	1.1
Cloruro de sodio (NaCl)	1.1
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0.00028
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	4.4
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	3.4
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.5
Extracto de levadura	0.5

Fuente: (Valdez-Nuñez and Rivera-Jacinto, 2022)

Soluciones traza para MSM

Formulación	g ^l ⁻¹
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0.29
Cloruro de calcio (CaCl ₂ .4H ₂ O)	0.24
Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0.25
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ .H ₂ O)	0.17

Fuente: (Linhardt et al., 1989)

Cuadro 4. Composición del medio sintético (MS)

Medio MS	
Componentes	gl⁻¹
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1.0
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ . 7H ₂ O)	0.2
Fosfato de di-potasio (K ₂ HPO ₄)	1.0
Cloruro de calcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0.1
Cloruro de potasio (KCl)	0.15
Extracto de levadura	0.1
Polvo de PET	3.0

Fuente: (Hadad, Geresh and Sivan, 2005)

Soluciones traza para MS	
Formulación	mg l⁻¹
Sulfato ferroso (FeSO ₄ .6H ₂ O)	1.0
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	1.0
Sulfato de manganeso (MnSO ₄)	1.0

Fuente: (Hadad, Geresh and Sivan, 2005)

Cuadro 5. Composición del Agar digerido de caseína y soja (TSA)

TSA	
Componentes	gl⁻¹
Triptona	15.0
Peptona de soja	5.0
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0
Cloruro de calcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0.1
Agar	15.0

Fuente: (Sierra, 1957).