

UNIVERSIDAD INTERAMERICANA DE PUERTO RICO
RECINTO DE SAN GERMÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE
DEGRADAR LDPE

KEVIN PÉREZ NIEVES
DICIEMBRE, 2024

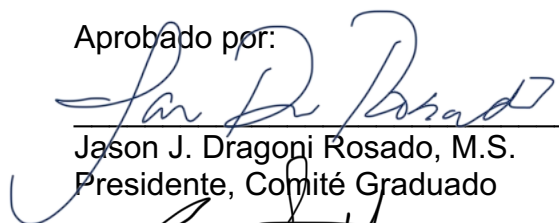
UNIVERSIDAD INTERAMERICANA DE PUERTO RICO
RECINTO DE SAN GERMÁN
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CIENCIAS AMBIENTALES

Tesis presentada como cumplimiento parcial de los requisitos para el título de:
Maestro en Ciencias en Ciencias Ambientales

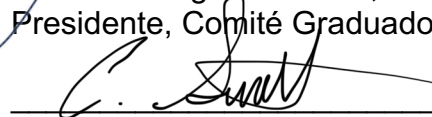
ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DE
DEGRADAR LDPE

KEVIN PÉREZ NIEVES
DICIEMBRE, 2024

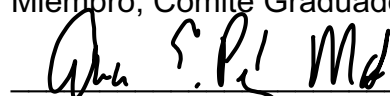
Aprobado por:


Jason J. Dragoni Rosado, M.S.
Presidente, Comité Graduado

12/Dic/2024
Fecha


Christopher A. Sambolín Pérez, M.S.
Miembro, Comité Graduado

12/Dic/2024
Fecha


Ana E. Pérez Matos, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

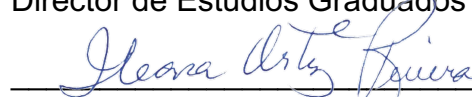
16/Dic/2024
Fecha


Lina S. Llanos Vargas, Ed.D.
Directora de Departamento de Ciencias y Tecnología

Diciembre 16/2024
Fecha


Carlos E. Irizarry Guzmán, D.B.A.
Director de Estudios Graduados

17 de diciembre de 2024
Fecha


Ileana Ortiz Rivera, Ed.D.
Decana Interina de Asuntos Académicos

7 de enero de 2025
Fecha

Abstract

Plastics have become a global problem due to their ability to cause environmental pollution. Over the years, scientists have developed several physical methods or strategies to help reduce the presence and persistence of these pollutants in the environment. This study was conducted to isolate and identify bacteria that can biodegrade plastic and are found in places previously contaminated with oil. To achieve this objective, soil and water samples were taken in Guánica Bay, processed in the laboratory using serial dilutions, and cultured on nutrient agar plates using the spread plate method. Representative colonies were selected, purified, and exposed to the Bushnell-Haas Agar culture medium to determine their ability to grow in the presence of LDPE plastic. Of these bacteria, six were selected to evaluate their ability to grow in Bushnell-Haas broth, as well as to perform a Gram stain and use scanning electron microscopy to determine their morphology. Then, using molecular methods, genomic DNA was extracted from the bacteria, the 16S rDNA gene was amplified, the genetic material was sequenced for consultation in Blast to identify the microorganisms, also a phylogenetic tree was created, and PCR detected the presence of genes associated with plastic degradation. These analyses identified the bacteria as *Metabacillus indicus*, *Mesobacillus jeotgali*, *Bacillus altitudinis*, *Exiguobacterium* sp., *Exiguobacterium* sp. CNJ771PL04 and *Bacillus* sp. In addition, the presence of bands of interest of the gene *alkB1* was detected by electrophoresis in *Bacillus altitudinis*, *Exiguobacterium* sp., and *Exiguobacterium* sp. CNJ771PL04 and *Bacillus* sp. and *alkB2* in *Bacillus altitudinis* and *Bacillus* sp. For the Lac gene, the bands of interest were not visualized in any of the microorganisms used for the research. The results show that bacteria are present in

places previously contaminated with oil that can biodegrade plastics. These microorganisms can be used as bioprospects for the development of effective processes to reduce the presence of plastic in ecosystems.

Resumen

Los plásticos se han convertido en una problemática mundial por su capacidad de provocar contaminación en el medio ambiente. A lo largo de los años, los científicos han desarrollado varios métodos físicos o estrategias para ayudar a reducir la presencia y persistencia de estos contaminantes en el medio ambiente. Este estudio se realizó con el objetivo aislar e identificar bacterias que tengan la capacidad de biodegradar el plástico y que se encuentren en lugares previamente contaminados con petróleo. Para lograr este objetivo, se tomaron muestras de suelo y agua en la Bahía de Guánica y se procesaron en el laboratorio utilizando diluciones seriadas y cultivadas en platos de agar nutritivo utilizando el método de plato esparcido. Las colonias representativas fueron seleccionadas, purificadas y expuestas al medio de cultivo Bushnell-Haas Agar para determinar su capacidad de crecer en presencia del plástico LDPE. De esas bacterias, se seleccionaron seis para evaluar su capacidad de crecer en el caldo de Bushnell-Haas, así como para realizarles una tinción Gram y utilizar la microscopía electrónica de barrido para determinar su morfología. Luego con métodos moleculares se realizó una extracción de ADN genómico de las bacterias, se amplificó el gen 16S rDNA, se secuenció el material genético para consultarlo en Blast, luego determinar la identidad de los microorganismos, realizar un árbol filogenético y detectar la presencia de genes asociados a la degradación de plástico. Con estos análisis se identificaron a las bacterias como *Metabacillus indicus*, *Mesobacillus jeotgali*, *Bacillus altitudinis*, *Exiguobacterium* sp., *Exiguobacterium* sp. CNJ771PL04 y *Bacillus* sp. Además, se detectó la presencia de bandas de interés de los genes *alkB1* en *Bacillus altitudinis*, *Exiguobacterium* sp., *Exiguobacterium* sp. CNJ771PL04 y *Bacillus* sp. y *alkB2* en *Bacillus altitudinis* y *Bacillus*

sp. Para el gen Lac, no se visualizaron las bandas de interés en ninguno de los microorganismos utilizados para la investigación. Los resultados demuestran que existe la presencia de bacterias en lugares previamente contaminados con petróleo que tienen la capacidad de biodegradar plásticos. Estos microorganismos podrán ser utilizados como bioprospectos para el desarrollo de procesos efectivos para reducir la presencia de plástico en los ecosistemas.

Derechos de Autor Reservados ©
Kevin Pérez Nieves
2024

Dedicatoria

A Dios por cada día darme la bendición de poder vivir, guardar y cuidar mis pasos, darme fuerza, y salud.

A mi madre Betsy Nieves y padre Melvin Pérez por su amor y apoyo.

A mi familia.

A todas las personas que me brindaron motivación, me dieron consejos positivos, me brindaron confianza.

Agradecimientos

- Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Dios, por brindarme la sabiduría y la inteligencia necesarias para culminar este grado.
- A mi familia, gracias por sus constantes oraciones, motivación y palabras de aliento. Su apoyo incondicional ha sido fundamental en este proceso.
- Extiendo mi sincera apreciación y gratitud a las siguientes personas, cuyo apoyo y contribución han sido esenciales para llevar a cabo esta investigación:
- A mi presidente del comité graduado, el Prof. Jason Dragoni Rosado, y a mis codirectores, Prof. Christopher Sambolin y Dra. Ana Pérez Matos. Estoy profundamente agradecido por sus valiosos consejos, por guiarme en cada etapa del camino y por su disposición constante para ayudarme, sin importar cuántas veces acudiera a ustedes. Su compromiso como comité de esta investigación ha sido clave para alcanzar esta meta.
- A la Universidad Interamericana de Barranquitas y su rector, el Dr. Juan A. Negrón Berríos por brindarme la oportunidad de realizar mi estudio en las instalaciones del Instituto de Biotecnología Sustentable.
- A la compañía *Beckton Environmental*, por su apoyo en la adquisición de materiales necesarios para el desarrollo de este trabajo.
- Gracias a la Dra. Ángela González Mederos y a la propuesta federal *Building Research, Education and Leadership for Agriculture and Related Careers* (bREAL ARC) Program from USDA-NIFA Award No. 2022-22040-37619 por ayudarme a costear los gastos de los materiales para realizar la tesis.
- Al personal de laboratorio y a los estudiantes de la Universidad Interamericana, Recinto de Barranquitas por su colaboración en el procedimiento experimental: Abner Colón, Sharelys Montes, Hirelys Montes, Yairelys Rosa y Kamila Rivera

Tabla de contenido

Introducción	1
Justificación	2
Objetivos generales	5
Objetivos específicos	5
Revisión de literatura	6
Contaminación ambiental.....	6
El plástico	8
Presencia del plástico en el medio ambiente	9
El plástico como contaminante en los océanos	11
Métodos existentes para manejar el plástico como residuo	12
Biodegradación de plástico	13
Metabolismo de bacterias con capacidad degradar hidrocarburos.....	17
Factores que afectan la tasa de degradación microbiana del plástico	18
Identificación de bacterias por métodos moleculares	19
Identificación de genes relacionados a la degradación del plástico	21
Metodología	23
Lugar de muestreo	24
Aislamiento y enriquecimiento de bacterias	25
Purificación de bacterias aisladas	27
Tinción Gram.....	28
Degradación de hidrocarburo.....	29
Prueba de catalasa	30
Microscopía electrónica de rastreo	30
Extracción de ADN Genómico	31
Concentración del ADN genómico	31
Amplificación del gen 16S rDNA	32
Método Sanger sequencing y bioinformática	32
Identificación de genes encargados de degradar hidrocarburos	33
Análisis estadístico.....	34
Resultados	35
Aislamiento y purificación de bacterias	35

Capacidad de degradación de plástico	35
Prueba de catalasa	36
Tinción Gram y microscopía.....	37
Microscopía electrónica de rastreo (SEM)	37
Extracción de ADN genómico	38
Concentración del ADN genómico	39
Amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA	40
Identificación de los microorganismos	40
Detección de genes encargados de degradar plástico	42
Discusión de resultados.....	45
Conclusiones	52
Recomendaciones	53
Referencias.....	54

Listado de Figuras

Figura 1. Diferentes causas para la degradación ambiental.....	7
Figura 2. Rutas de entrada de residuos plásticos en los océanos.....	10
Figura 3. Reacción de polimerasa en cadena (PCR).....	20
Figura 4. Método Sanger Sequencing.....	21
Figura 5. Metodología establecida para esta investigación.....	23
Figura 6. Lugar de muestreo – Bahía de Guánica.....	25
Figura 7. Resultado del aislamiento de bacterias en agar nutriente.....	26
Figura 8. Cultivo en cuadrante para purificación de bacteria aislada.....	27
Figura 9. Resultado de la tinción Gram realizada a las bacterias aisladas.....	28
Figura 10. Bacterias incubadas con agitación.....	29
Figura 11. Prueba de catalasa realizada a las bacterias.....	30
Figura 12. Visualización de las bacterias con microscopía de barrido (SEM).....	38
Figura 13. Gel de agarosa para visualizar extracción de ADN genómico.....	39
Figura 14. Gel de agarosa con resultados de amplificación del gen 16S rDNA.....	40
Figura 15. Árbol filogenético desarrollado de las seis bacterias.....	42
Figura 16. Electroforesis del producto de PCR de los genes alkB1(A) y alkB2 (B).....	43
Figura 17. Electroforesis del producto de PCR del gen Lac.....	44

Listado de Tablas

Tabla 1. Descripción de los cebadores específicos para los genes de interés.....	34
Tabla 2. Bacterias seleccionadas para el estudio.....	35
Tabla 3. Promedio de las lecturas de absorbancia de las bacterias.....	36
Tabla 4. Resultados reacción de catalasa de las bacterias.....	36
Tabla 5. Resultados de tinción Gram y morfología de bacterias.....	37
Tabla 6. Concentración del ADN genómico de las bacterias.....	39
Tabla 7. Identidad de las bacterias.....	41

Introducción

En la actualidad, los niveles de contaminación han alcanzado cifras preocupantes a nivel global. La presencia de múltiples contaminantes tanto en la atmósfera, litósfera e hidrósfera ha provocado una degradación acelerada de los entornos naturales en todo el planeta. Entre los contaminantes más comunes se encuentran los plásticos y sus derivados, que se han convertido en un problema ambiental por su persistencia en diversos ecosistemas alrededor del mundo (Sarkhel et al., 2020). Cada año, a nivel mundial se producen cantidades exorbitantes de plástico para diversas aplicaciones por sus ventajas en cuanto a durabilidad, costos y capacidad de moldearse para tomar diversas formas. Estos polímeros son utilizados mayormente para empaque, construcción, transportación, electrónicos, agricultura, salud, entre otros (Zhao et al., 2022). Por esta razón en el mercado se encuentran distintos tipos de plásticos según su aplicación, como lo son PETE (tereftalato de polietileno), HDPE (polietileno de alta densidad), PVC (policloruro de vinilo), LDPE (polietileno de baja densidad), PP (polipropileno), PS (poliestireno), entre otros.

Sin embargo, a pesar de sus aplicaciones, el plástico también tiene sus desventajas sobre el medio ambiente. Las desventajas del plástico se derivan en cuanto a su producción en grandes cantidades, estabilidad estructural y su baja tasa de descomposición en la naturaleza, lo que provoca su acumulación en diversos hábitats y biomas en el planeta (Margeta et al., 2021). De los ecosistemas más afectados por la presencia y acumulación del plástico se encuentran los mares y océanos. Donde se estima que hay aproximadamente ocho millones de toneladas de plástico que ha sido arrojadas como desecho marino en los sedimentos de estos ecosistemas (Sarkhel et al.,

2020). Cerca del 80% de esos plásticos provienen de fuentes terrestres, donde el mal manejo de los rellenos sanitarios y las descargas de desperdicios contribuye a que al contaminante esté en los ríos y por ende termine en los océanos (Ganesh-Kumar et al., 2020; Acosta et al., 2022). Es importante destacar que estos polímeros se encuentran distribuidos en distintas densidades oceánicas tanto en áreas superficiales, zonas pelágicas y bénticas.

Por esta razón en el medioambiente, los plásticos se han convertido en un desperdicio persistente dado a que su estructura es resistente a la degradación química y física (OECD, 2022). Gracias a este problema, por décadas se ha tratado de reducir la basura plástica y la contaminación de los ambientes terrestres y acuáticos (Flury & Narayan, 2021). Sin embargo, en la actualidad no existe una solución inmediata para reducir la dependencia al uso del plástico al nivel global (Lloyd, 2022). Por tal motivo este proyecto de investigación aportará en la búsqueda de soluciones a esta situación, mediante el aislamiento, identificación y caracterización de cepas bacterianas que sean capaces de degradar plástico.

Justificación

Los plásticos son un problema ambiental reconocido por su dominancia en el medio ambiente y en la red trófica (Tamargo et al., 2022). Además de estar ampliamente distribuidos y acumulados en las aguas de todo el mundo (Sarkhel et al., 2020). Esto gracias a que el ser humano los ha producido y utilizado en grandes escalas, y gran parte ha terminado en los ambientes marinos por el pobre manejo al momento de su disposición. Poniendo así en peligro no solo la biota marina, sino también los recursos que provienen de este tipo de ecosistema (Margeta et al., 2021). Por ejemplo, se estima

que de un 30% - 60% de los peces muestreados poseen la presencia de micro plásticos primarios o secundarios (Willard-Stepan et al., 2021). Lo que representa un peligro potencial para la salud de los consumidores de este tipo de producto pesquero. Sin embargo, los microplásticos no solo afectan a los peces, también a otros organismos como el plancton, reptiles marinos, lombrices, crustáceos, pepinos de mar, langostas, cangrejos, entre otros. Hay numerosos efectos negativos probados, así como consecuencias para la salud de los organismos marinos (Margeta et al., 2021). Estos efectos se relacionan con las interacciones físicas (la ingestión del plástico provoca que el organismo marino se inmovilice, no pueda alimentarse, pierda oxígeno y muera) y químicas (los aditivos son absorbidos causando toxicidad, afectando su reproducción y provocando muerte) (Tekman et al., 2022).

Por otra parte, de los plásticos comúnmente identificados en estudios como el de Ibor et al. (2022) se encuentra el LDPE, que se caracteriza por ser un material persistente en el ambiente y es el constituyente principal de las láminas y bolsas de plástico. Según la investigación de Novarini et al. (2021), el incremento descontrolado de la población mundial y el uso constante de bolsas de plástico en los hogares y en los mercados, contribuye significativamente al incremento de residuos plásticos. Este tipo de residuo proveniente del LDPE es problemático porque no tiene valor comercial, su disposición no es la adecuada y su composición química lo hace no biodegradable (Kunlere & Fagade, 2019). Además, Kumi-Larbi et al. (2018) destacan en su estudio los problemas que el LPDE puede causar en países en desarrollo, donde la ausencia de programas de reciclaje empeora la situación, resultando en desechos que provocan serias consecuencias ambientales y de salud pública.

Ahora bien, el ser humano no está exento de los problemas relacionados con la presencia del plástico en los ecosistemas. Según Tamargo et al. (2022) algunas de las complicaciones de salud que se desarrollan al ingerir estos contaminantes están relacionadas con problemas gastrointestinales, la alteración de la flora bacteriana del intestino y el desarrollo de otras condiciones como el cáncer. Esto se debe a su asociación con metales pesados y a ciertos aditivos utilizados para producir este polímero. Además, en investigaciones previas se ha demostrado la presencia de partículas micro-plásticas encontradas en heces fecales, en líquido amniótico y placenta de mujeres embarazadas. Esta última representa un riesgo para el embarazo, el embrión, el desarrollo y salud en general del bebé (Margeta et al., 2021).

Actualmente, los científicos se han centrado en desarrollar procesos efectivos para disminuir el impacto negativo de la contaminación con plástico. Un ejemplo es la búsqueda y el uso de enzimas producidas por ciertos microorganismos para afrontar esta preocupación ambiental (Atanasova et al., 2021). Dado a las características de estos microorganismos que degradan polímeros, estos mayormente deben ser aislados e identificados para evaluar sus tasas de degradación. Este proceso es necesario para obtener información para su uso eficaz en procesos de biodegradabilidad de este tipo de material tanto sintético como natural y bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Además, en la actualidad la disponibilidad de enzimas que degraden plástico es muy baja, siendo necesario que se continúen aislando microorganismos e identificando sus capacidades de biodegradación (Shilpa et al., 2022).

Rodríguez-Gonzales et al. (2022) en su estudio de la composición de las comunidades microbianas presentes en suelos contaminados demostró que los

microorganismos son esenciales para llevar a cabo la biodegradación. Los microorganismos sobreviven en lugares diversos de la biosfera, debido a que su actividad metabólica. Su metabolismo está influenciado por diversas condiciones ambientales como lo son el pH, temperatura, humedad, oxígeno, nutrientes y composición de suelo. Por lo tanto, estos factores externos tienen un rol importante en determinar las condiciones favorables para que la biodegradación ocurra de manera adecuada. Además, la capacidad enzimática de los microorganismos es muy variada, y por lo que se les utiliza como biodegradadores de contaminantes ambientales como el petróleo y sus derivados. Por esta razón en esta investigación se caracterizaron aquellas bacterias con capacidad enzimática para degradar plástico y aisladas en lugares contaminados con petróleo.

Objetivos generales

- Aislar y caracterizar bacterias de lugares contaminados con petróleo que tengan la capacidad de degradar sus derivados.

Objetivos específicos

- Aislar, purificar e identificar molecularmente bacterias de un lugar previamente contaminado con petróleo en Puerto Rico.
- Identificar genes en las bacterias relacionados con la producción de enzimas capaces de degradar LDPE.

Revisión de literatura

Contaminación ambiental

La degradación medioambiental actual surge como parte del incremento en las demandas de los sistemas agroalimentarios e industriales a causa del aumento en la población mundial (FAO y PNUMA, 2022). Muchas de las actividades del ser humano alteran y degradan las condiciones ambientales, dejando una huella persistente en el planeta (Santos et al., 2021). Entre ellas se encuentra la contaminación, donde anualmente se liberan cantidades excesivas de contaminantes al medioambiente. Siendo los recursos suelo, aire y agua los más afectados por la presencia de contaminantes mayormente liberados por las actividades antropogénicas (Figura 1).

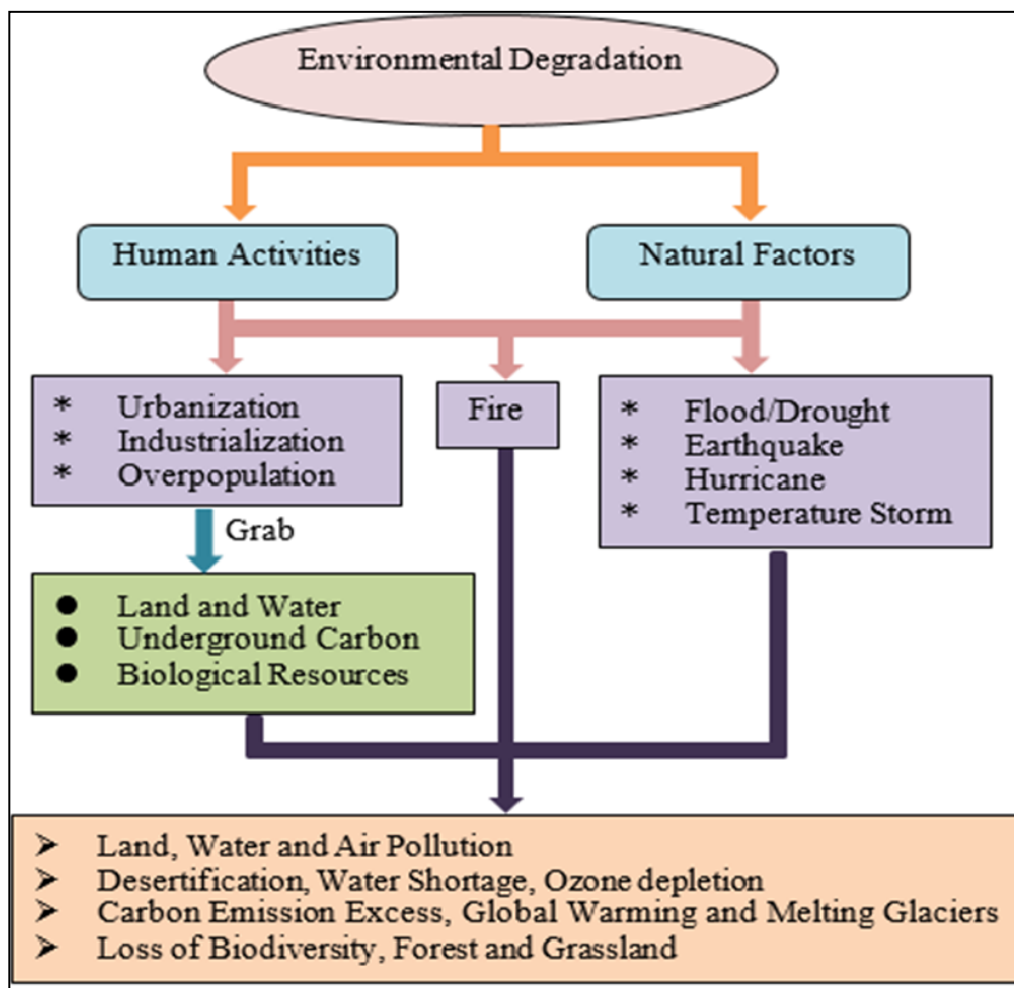
Por ejemplo, el suelo se ve afectado por la adición de compuestos químicos o cualquier otro agente extraño que tenga un efecto negativo sobre los organismos del lugar o sobre las funciones del propio recurso (FAO, 2016). La contaminación tiene la capacidad de producir un efecto en cadena sobre todos los ecosistemas terrestres, donde se ven afectados los organismos que dependen del recurso y todas las redes tróficas que interconectan con el suelo (FAO y PNUMA, 2022). La presencia de metales pesados, contaminantes orgánicos y hasta microplásticos forma parte de la contaminación que se encuentra en el suelo y la cual puede ser transportada por el aire y el agua (Agencia Europea de Medio Ambiente, 2020).

Por otro lado, en la actualidad el recurso aire es contaminado por múltiples fuentes de emisiones tanto de origen natural como antropogénico, siendo la industrialización y la quema de combustible fósil una de las principales causas (WHO, 2022). Además, a este tipo de contaminación se le atribuye una variedad de fenómenos globales que se

encuentran ocurriendo en la actualidad, los cuales incluyen la pérdida global en la biodiversidad y los cambios en el clima del planeta Tierra (Santos et al., 2021). El cambio climático y sus efectos tienen la capacidad afectar tanto al ser humano como a todos los organismos presentes en los ecosistemas (Heshmati, 2020).

Figura 1

Diferentes causas para la degradación ambiental



Nota. La imagen resume los diferentes factores que influyen en la degradación del medioambiente por Maurya et al. (2020).

Asimismo, la calidad del agua depende de los parámetros físicos, químicos y biológicos de donde se obtiene para consumo o uso recreacional (Hossain & Patra, 2020). En el caso de este recurso, en los últimos años su tratamiento previo a su

utilización ha sido de gran preocupación por la presencia de la contaminación producida por los seres humanos (Martínez-Ruiz et al., 2022). Globalmente el problema y la escasez del agua ha llamado la atención de muchas organizaciones que buscan proteger los recursos. Estudios advierten sobre la presencia de altos niveles compuestos químicos afectando la calidad y los organismos que viven en ciertos cuerpos de agua (Helal et al., 2018). Además, existe otro problema con la generación y disposición inadecuada de un polímero de alta duración conocido como el plástico. Durante las últimas décadas el uso del plástico se ha ido descontrolando, provocando que toneladas de desechos de este polímero terminen en los ambientes acuáticos y otros ecosistemas alrededor del planeta (Purohit et al., 2020).

El plástico

Para la década del 1940 es cuando se comienza con la síntesis y producción del plástico a nivel industrial (Santos et al., 2021). Su aplicación está presente cada vez más en actividades de la vida diaria, incluyendo el envasado de distintas industrias de alimentos, farmacéuticos y otros sectores de la producción (Evode et al., 2021). Convirtiéndose así en el polímero sintético derivado del petróleo más utilizado debido a su aplicación multi-especializada dada su naturaleza versátil y propiedades (Murab et al., 2021). Sin embargo, no todos los plásticos son iguales y sus propiedades químicas, y su estructura física varían según las necesidades que se quieran cubrir.

Los materiales plásticos ofrecen numerosas ventajas debido a su bajo costo, alta versatilidad y durabilidad (OECD, 2022). Actualmente la industria del plástico es una de las industrias con mayor crecimiento en el mundo (Andrady, 2011). Se estima que la producción total de plásticos puede llegar a 100 millones de toneladas (Zhong et al.,

2018). Según Jones et al. (2021), los plásticos poseen muchas aplicaciones en las industrias del empaque, vehículos y construcción. Otras industrias utilizan envases de plástico para conservar y proteger productos farmacéuticos, de cuidado personal, limpieza del hogar y electrónica. Sin embargo, la industria de alimentos y bebidas es la que posee la mayor participación en el mercado de envases de plástico (Phelan et al., 2022).

A continuación, se presentan los plásticos más utilizados y las aplicaciones que tienen en las actividades del ser humano. Las botellas de plástico, bolsas de supermercado y los empaques de materiales son producidos con tereftalato de polietileno (PETE). El polietileno de baja densidad (LPDE) se utiliza para fabricar cortinas de baño y decoraciones de jardín. En el caso del polietileno de alta densidad (HDPE) se utiliza para producir botellas de detergentes y estuches de plástico. Para los materiales de construcción como puertas y ventanas se utiliza policloruro de vinilo (PVC) y el poliestireno (PS) para los empaques de comida preparada (Rhodes, 2018). Algunos de estos plásticos como el PE se pueden reciclar, pero por su alta demanda energética, tecnológica y la baja rentabilidad económica del proceso hacen de esta opción no costo-efectiva (Rodríguez-Carreón et al., 2021).

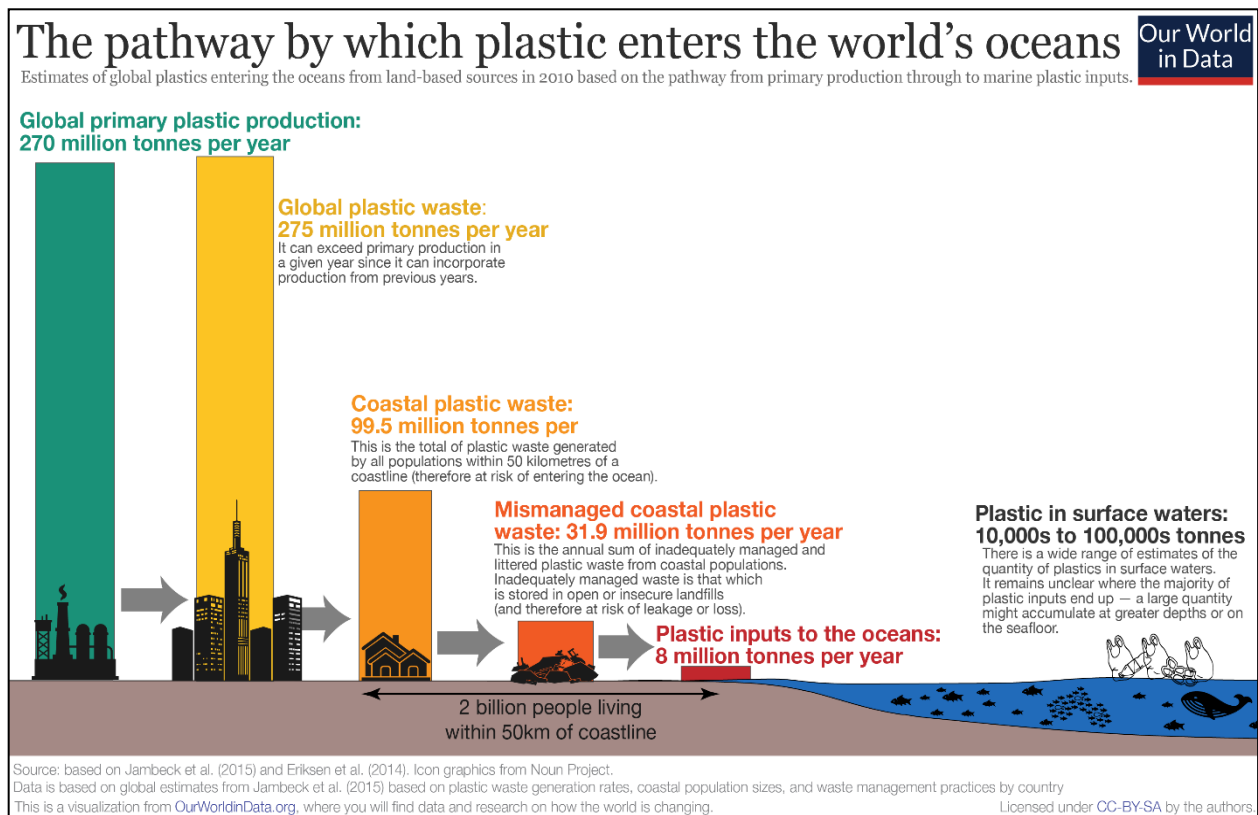
Presencia del plástico en el medio ambiente

La contaminación con plástico altera los hábitats, los procesos naturales, los medios de vida, la producción de alimentos y el bienestar social de las personas (UNEP, 2022). Para Van Kleunen et al. (2020) este es un problema ambiental y de mucha preocupación social que va a continuar en aumento con el pasar de los años. Afectando todos los ecosistemas en general, pero los ambientes acuáticos son los que han recibido

más atención por las grandes cantidades acumuladas del desperdicio en dichos lugares. Y es que gran parte de estos contaminantes son arrastrados por la acción de la lluvia, viento y actividades antropogénicas a cuerpos de agua como ríos y quebradas que descargan en los océanos (Figura 2).

Figura 2

Rutas de entrada de residuos plásticos en los océanos.



Nota. La imagen presenta las rutas en las cuales se produce el plástico y las cantidades que terminan en los océanos anualmente por Ritchie & Roser (2018).

Sin embargo, la contaminación por plástico no se limita a los océanos, se han encontrado partículas en la atmósfera de áreas urbanas e incluso en glaciares de gran altitud como el Ártico y la Antártida (Geneva Environment Network, 2022). Aunque el Ártico no es muy poblado puede que el cambio climático agravé el problema con los plásticos por el derretimiento de los polos y el aumento de las actividades marítimas

(Collard & Ask, 2021). Esta situación demuestra el alcance que tiene la presencia del plástico en la actualidad en muchos ecosistemas importantes alrededor del planeta.

El plástico como contaminante en los océanos

Los ecosistemas se están afectando por la acumulación de partículas de plástico, pero uno de los más afectados es el medio ambiente marino que plantea una amenaza global para la red trófica (Margeta et al., 2021). La exposición de los organismos marinos a este tipo de contaminación tiene efectos perjudiciales innegables a su calidad de vida (Acosta et al., 2022). La posibilidad de absorción y retención de componentes plásticos y compuestos tóxicos dentro de los organismos, así como la posibilidad de una transmisión trófica dentro de la cadena alimentaria plantea un riesgo para el consumo humano (Margeta et al., 2021; Pattiaratchi et al., 2022). Siendo esto la base de muchas enfermedades crónicas, pero también para numerosas inflamaciones, daño celular y daño al ADN (Margeta et al., 2021).

En los océanos contaminados se encuentran distintos productos de plástico de los cuales predominan las bolsas, botellas, envases para almacenar comida y envolturas (Edmond, 2022). Estos materiales son difíciles de degradarse en el ambiente acuático por lo que no se desaparecen, pero si pueden fragmentarse hasta llegar a pedazos de tamaño microscópico (Aldana et al., 2022). Estudios han confirmado que aproximadamente 5 billones de piezas de micro plásticos se han encontrado flotando en los océanos (Sherri, 2021). Su pequeño tamaño también hace que estos desechos sean difíciles de rastrear y eliminar en el ambiente de mar abierto (Jambeck et al., 2015).

Estas partículas de plástico pueden llegar a la biota marina a través de dos rutas principales: (1) por consumo directo de los sedimentos o partículas suspendidas y (2) de

manera indirecta por consumo de otros organismos (Acosta et al., 2022). En investigaciones recientes se ha estimado que un total de 2,141 especies que se encuentran habitando en lugares contaminados por este polímero, incluyendo los océanos (Tekman et al., 2022). Esta situación impacta a los organismos acuáticos, los cuales representan uno de los eslabones más importantes en la sustentabilidad de las poblaciones para las cuales el efecto tóxico de los aditivos micro plásticos podría ser fatal (Margeta et al., 2021). Por lo que resulta necesario buscar alternativas u optimizar los procesos existentes para ayudar a reducir la presencia de este contaminante en los ambientes acuáticos.

Métodos existentes para manejar el plástico como residuo

Los plásticos se han convertido en una problemática mundial por su capacidad de provocar contaminación en el medio ambiente. Por tal razón, a través de los años se han venido desarrollado varios métodos físicos o estrategias para ayudar con esta causa. Entre los que se encuentran los rellenos sanitarios, el reciclaje, la quema del material y hasta la producción de materiales de construcción y de carreteras (Bekhedda & Merbouh, 2022; Huang et al., 2022). Siendo la producción de materiales reciclables y el propio reciclaje unas de las alternativas viables para darles una segunda oportunidad a los plásticos (Bianco et al., 2021). Considerando las características propias de los polímeros existentes y su clasificación mediante un número que facilita al consumidor agruparlos para su posterior reciclaje.

Otras alternativas lo son el degradar plástico a través de procesos químicos, físicos y biológicos. Teniendo el último aplicaciones biotecnológicas donde se incorpora el uso de ciertos microorganismos (bacterias y hongos) para degradar el polímero

(Sarkhel et al., 2020). A este proceso se le conoce como biodegradación, el cual es considerado una de las mejores maneras para manejar la contaminación de plásticos (Asiandu et al., 2022). Por su potencial de recuperar lugares contaminados con hidrocarburos y de aplicar técnicas que incluyan actividad enzimática de los microorganismos para la degradación de esos contaminantes (Rodríguez-Gonzales et al., 2022). A través de la biodegradación de distintos plásticos se ha demostrado la posibilidad de simular condiciones experimentales y evaluar el proceso de eficacia de la degradación a lo largo del tiempo algunos de estos principales factores lo son la temperatura, humedad y aireación (Baldera-Moreno et al., 2022).

Biodegradación de plástico

En los últimos años se ha posicionado en la comunidad científica la utilización de enzimas de hongos y bacterias para la biodegradación de plásticos por hidrólisis u oxidación enzimática (Krueger et al., 2015; Asiandu et al., 2022). La mayoría de las enzimas descritas hasta ahora para degradar plástico son proteínas cuyo sustrato original es la lignina (Campos-Granados, 2021). De los resultados obtenidos por medio de su aplicación, se ha logrado identificar un tipo de biodegradación llamada biotransformación metabólica que implica cambio en la estructura química del plástico. Esta biodegradación consiste en un conjunto de transformaciones que sufre el polímero, teniendo, así como objetivo formar un compuesto hidrosoluble poco tóxico y fácilmente eliminable (Krueger et al., 2015).

Actualmente se han logrado aislar e identificar varias cepas de bacterias capaces de producir las enzimas responsables de la biodegradación. Informes demuestran que especies de *Bacillus* y *Enterobacter* son capaces de biodegradar tipos de plástico como

el polietileno (PE) (Sarker et al 2021). Otros estudios han presentado resultados de la biodegradación de plásticos por bacterias termófilas, alcalófilas, halófilas, y psicrófilas tanto en ambiente natural como en el laboratorio (Atanasova et al., 2021). Por otro lado, se ha sugerido que bacterias pertenecientes a los géneros *Ideonella* spp., *Streptomyces* spp. y *Pseudomonas* spp. son capaces de degradar desperdicios que posean plástico (Shilpa et al., 2022).

A continuación, se presentan y describen varias de las bacterias que poseen enzimas capaces de degradar el plástico según la literatura:

- ***Bacillus* spp.** - Este género es un grupo diverso de bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, productoras de esporas y catalasa positiva (Luise et al., 2022). Algunas especies de este género cuentan con la enzima PETasa, la cual ayuda a que el microorganismo despolimerice el plástico (Krueger et al., 2015).
- ***Streptomyces* spp.** - Son bacterias Gram positivas, aerobias, productoras de antibióticos y sustancias antifúngicas (Goredema et al., 2020). Este género posee la enzima esterasa, una hidrolasa que rompe los enlaces ésteres de ciertos polímeros (Atanasova et al., 2021).
- ***Pseudomonas* spp.** - Estas son bacterias Gram negativas, aeróbicas y oxidasa positiva. Son capaces de producir la enzima alcano hidroxilasa (Krueger et al., 2015), la cual degrada el polietileno en temperaturas bajas (Yoon et al., 2012).
- ***Ideonolla sakaiensis*** - Es una bacteria Gram negativa, aeróbica y no formadora de esporas (Tanasupawat et al., 2016). Capaz de producir la enzima petasa (Son et al., 2019) la cual ayuda a que el microorganismo despolimerice el plástico (Krueger et al., 2015) en bajas temperaturas.

- ***Rhodococcus* spp.** - Un ejemplo de este género sería *Rhodococcus ruber* esta bacteria tiene aplicaciones potenciales en biotransformación y biorremediación, es conocida por la producción de etanol cloroformo y fenol (Kuang et al., 2018). Utiliza la enzima lacasa la cual es una oxidasa y cataliza la oxidación de substratos orgánicos (Atanasova et al., 2021).

Además, otros microorganismos como los hongos son capaces de degradar los plásticos especialmente el tereftalato de polietileno (PET) (Ahmaditabatabaei et al., 2021). La biodegradación de los plásticos que contienen enlaces covalentes de carbono (C-C) y enlaces covalentes polares de carbón y cloro (C-Cl) se ha investigado y utilizado dos grupos de basidiomicetos (hongos) llamados de podredumbre blanca y podredumbre parda. Algunos ejemplos de los hongos de podredumbre blanca son aquellos que degradan la lignina y la celulosa como lo son *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma* spp. (Alban, 2022). Ejemplos de hongos de podredumbre parda lo serían *Monilinia fructicola* y *Monilinia fructigena* (De Miccolis-Angelini et al., 2022). Estos hongos se consideran una fuente potencial de nuevas enzimas con propiedades únicas (termoestables, alto potencial de REDOX, halotolerantes y al pH) los que las hacen atractivas para el desarrollo de enzimas eficaces para la biodegradación del plástico (Jutinico-Shubach et al., 2022). A continuación, se presentan y describen otros de estos microorganismos que poseen enzimas capaces de degradar el plástico:

- ***Penicillium* spp.** - Los miembros de este género son capaces de producir varios compuestos de utilidad, como lo es la penicilina, que es uno de los antibióticos más utilizado para combatir infecciones causadas por bacterias (Wang et al., 2021). Sin embargo, este hongo utiliza la enzima cutinasa para romper por

actividad hidrolítica los ésteres solubles del plástico (Ahmaditabatabaei et al., 2021).

- ***Aspergillus oryzae***. - Este hongo se ha utilizado para el biocontrol de hongos productores de aflatoxina (Dwipa et al., 2022). Además, utiliza la enzima cutinasa hidrolasa para romper ésteres solubles (Ahmaditabatabaei et al., 2021).
- ***Phanerochaete chrysosporium*** - Es un basidiomiceto de podredumbre blanca que degrada la lignina. Este posee la enzima lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa (Singh & Chen, 2008). Estas enzimas pueden degradar los plásticos por oxidación e hidrólisis (Srikanth et al., 2022).
- ***Pleurotus ostreatus*** - Este hongo crece sobre madera muerta, pero puede ser cultivado artificialmente sobre desechos agrícolas. Es capaz de producir enzimas lignocelulolíticas, las cuales son importantes en la utilización de lignina, celulosa y hemicelulosa como fuente de carbono (Rodrigues et al., 2012). Ejemplos de estas enzimas serían la lacasa y peroxidasa fúngica que son producidas por los hongos para degradar la lignina y estas muestran buenos resultados para la degradación de plásticos (Temporiti et al., 2022).
- ***Ganoderma spp.*** – Es un hongo de podredumbre blanca, el cual produce enzimas como lignina, peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa (Maganhotto de Souza Silva et al., 2005). Para degradar el plástico el hongo puede utilizar estrategias parecidas a la degradación de lignocelulosa como lo es superar la hidrofobicidad de la lignina y la cristalinidad de la celulosa (Daly et al., 2021).

- ***Monilinia fructicola*** - Es un hongo de podredumbre parda que produce las enzimas cutinasas, α -glucosidasas, pectinaliasas, poligalacturonasas y proteasas (García-Benítez et al., 2019).
- ***Monilinia fructigena*** – Se ha encontrado que miembros del género *Monilinia* spp. secretan enzimas degradantes como cutinasas, α -glucosidasas, pectinaliasas, poligalacturonasas y xilanasas (García-Benítez et al., 2019).

Metabolismo de bacterias con capacidad degradar hidrocarburos

Describir y conocer los perfiles bioquímicos y metabólicos de las bacterias con capacidades de degradar hidrocarburos permite caracterizar mejor a estos microorganismos de interés. Por ejemplo, en estudios como el de Kaushal et al. (2018) se determinó que la presencia de la enzima catalasa ha sido vinculada con organismos capaces de metabolizar derivados de hidrocarburos. Las catalasas son importantes metaloenzimas antioxidantes que previenen la oxidación de otras moléculas y catalizan la irregularidad del peróxido de hidrógeno, formando dióxígeno y agua (Barynin et al., 2001). Además, se encontró que la enzima ha demostrado ser eficaz en suelos contaminados con hidrocarburos Kaushal et al. (2018).

A su vez, estudios como los de Kulakov et al. (2005) y Larkin et al. (2005) demostraron que especies del género *Pseudomonas* spp. y *Rhodococcus* spp. poseen genes específicos como (*narAa*, *narAB* y *narB*) para la descomposición de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés). Mediante la utilización de mono o di-oxigenasas para hidroxilar los anillos y facilitar el rompimiento en moléculas que integrarán el metabolismo del ácido tricarboxílico. Este es un buen ejemplo de lo importante que es conocer la actividad biológica de estos agentes catalizadores ya que

proveen información presuntiva sobre la capacidad de metabolizar hidrocarburos. No obstante, esta actividad enzimática está altamente regulada por la presencia de ciertos factores abióticos como el pH y la temperatura.

Factores que afectan la tasa de degradación microbiana del plástico

En los procesos de biodegradación influye una combinación de factores bióticos y abióticos que determinan la velocidad con la que las enzimas liberadas por los microorganismos funcionan (Cai et al., 2023). También afecta el tipo de polímero y su estructura química, la cual mayormente es convertida a compuestos más simples a través de la degradación microbiana (Fesseha & Abebe, 2019). Un ejemplo de cómo estos factores influyen en la velocidad de degradación lo son los resultados presentados en el estudio desarrollado por Adekanmbi et al. (2023), donde se demostró que la temperatura es un factor abiótico importante en la actividad de las enzimas. Siendo así, un factor crítico en la actividad enzimática de los microorganismos responsables de la degradación del plástico, donde la velocidad de reacción aumenta a mayor temperatura, pero hasta un cierto límite para evitar su desnaturalización (Khandelwal, 2016; Nedi et al., 2024).

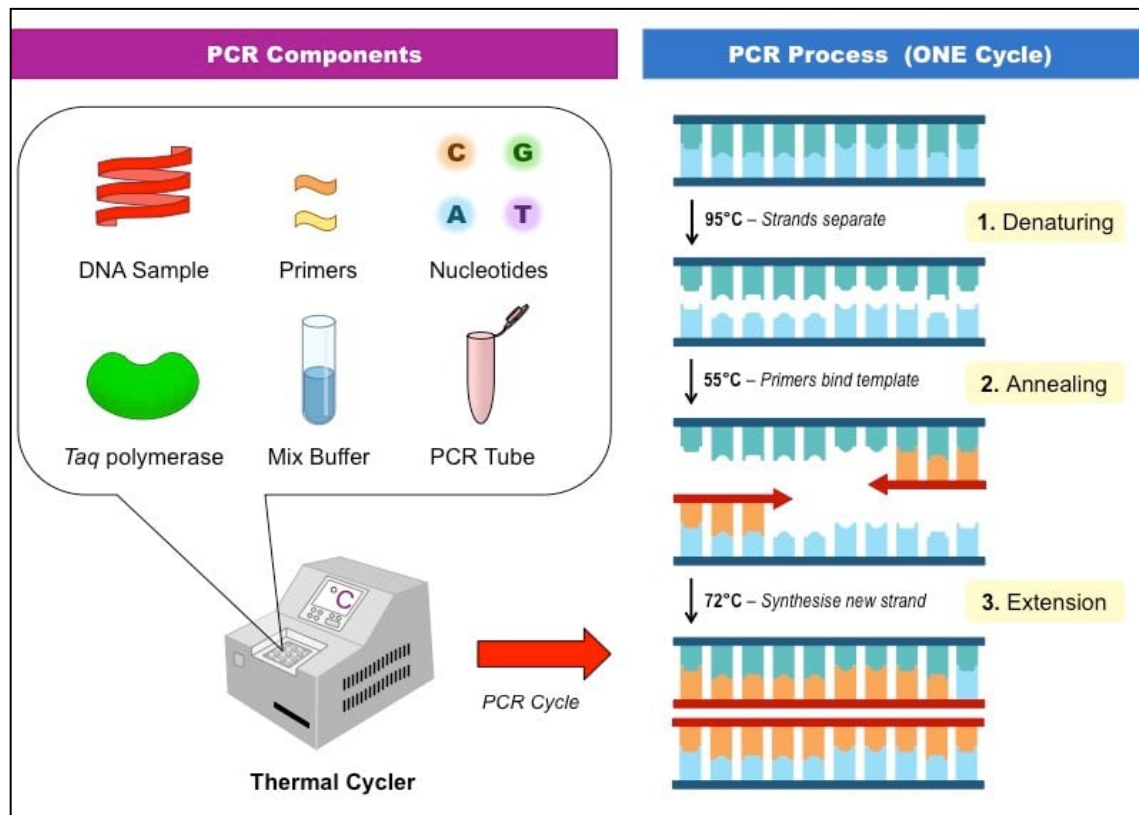
Autores como (Cai et al., 2023) sugieren el desarrollo de más estudios que ayuden a optimizar las condiciones para una acción enzimática más efectiva durante la degradación. Por ejemplo, en pruebas de biodegradación del plástico se optimizan las condiciones y la temperatura se mantiene constante en el rango de 20 a 28°C para favorecer el crecimiento de microorganismos mesófilos (Pischedda et al., 2019). Además, este factor se ha encontrado que influye en la formación de biopelículas en bacterias que son importantes para la degradación del plástico (Leighton et al., 2022).

Identificación de bacterias por métodos moleculares

En la búsqueda de microorganismos que degraden plástico se aplican métodos tradicionales dependientes de cultivos para detectar la presencia de actividad de biodegradación. Sin embargo, en la actualidad existen análisis moleculares que se utilizan en conjunto para identificar a los microorganismos aislados del medioambiente y detectar de manera efectiva la presencia de actividad enzimática relacionada con degradación de estos polímeros (Viljakainen & Hug, 2021). Entre estos se encuentra el *DNA barcoding*, un método rápido, preciso y estandarizado utilizado para la identificación de bacterias mediante el uso de secuencias cortas de ADN (Lebonah et al., 2014). Este método utiliza la reacción de polimerasa en cadena (PCR, por sus siglas en inglés) para amplificar una región conservada y de interés mediante cebadores complementarios a la región de interés en el ADN (Yang et al., 2018) (Figura 3). Los marcadores aplicados en *DNA barcoding* son códigos de barras que son utilizados para la identificación de una especie en particular dado a su alta especificidad (Ankola et al., 2021). Los protocolos para el PCR varían y requieren calibraciones y diseños de cebadores específicos al igual que temperaturas y condiciones de corridas en el termociclador (Wang et al., 1997). La amplificación de ADN conlleva en diseñar oligonucleótidos cortos los cuales se hibridizan específicamente con la secuencia y actúan como punto de partida para sintetizar una nueva cadena de ADN (Church, 2013). La combinación de herramientas de análisis molecular como amplificación y secuenciación permite el estudio, identificación de organismos y caracterización de presencia de enzimas como por ejemplo las que degradan derivados de petróleo como los hidrocarburos.

Figura 3

Reacción de polimerasa en cadena (PCR)



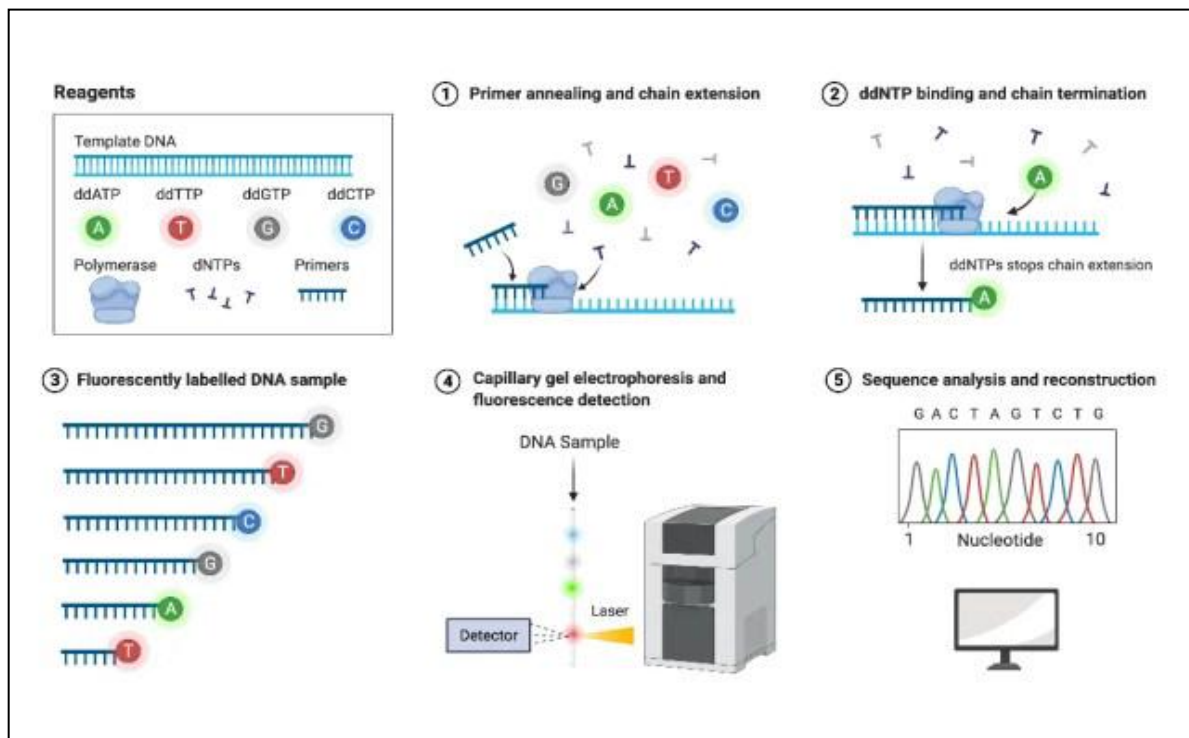
Nota. La imagen representa el proceso y los componentes necesarios para realizar PCR (Imagen adaptada de Aryal, 2022).

De esta manera, mediante la secuenciación de ADN por el método Sanger se puede descifrar el código genético y la secuencia específica de la región de interés que será utilizado como marcador molecular para la identificación de un microorganismo. Esta metodología de *Sanger sequencing* se utiliza como método tradicional en estudios de secuenciaciones de genomas (Eren et al., 2023). La cual se basa en la terminación de la cadena de ADN con una pequeña concentración de moléculas de trifosfato de didesoxinucleótido (dNTP) marcadas radio o fluorescentemente seguida de una separación por tamaños mediante electroforesis en gel (Dewey et al., 2012). Es muy importante para la investigación biológica durante los últimos años ya que muchos

investigadores han invertido una gran cantidad de tiempo y recursos para desarrollar y mejorar las tecnologías que sustentan la secuenciación del ADN (Heather & Chain, 2016). Una de las razones por las cuales los investigadores han invertido tiempo y recursos en esta técnica es que ha reducido el costo de la secuenciación al tiempo que aumenta el rendimiento a un ritmo nunca visto (Morey et al., 2013). Esta tecnología desempeña un papel importante en la confirmación de los resultados de la PCR y se puede utilizar para proporcionar datos de secuencias genéticas necesarias para análisis filogenéticos (Crossley et al., 2020)

Figura 4

Método Sanger Sequencing



Nota. La imagen representa los pasos del método *Sanger Sequencing* (Adaptado de Shrestha, 2022)

Identificación de genes relacionados a la degradación del plástico

La degradación enzimática de los hidrocarburos está mediada por la presencia o ausencia de ciertos genes encargados para codificar proteínas particulares. Sin

embargo, el petróleo en su composición posee diversos compuestos que no siempre son degradados por el mismo tipo de enzimas. Por lo que actualmente para la degradación de los compuestos de este polímero ya se han sido identificado algunos genes que codifican enzimas particulares presentes en ciertas bacterias (Liu et al., 2022), entre los que se encuentran:

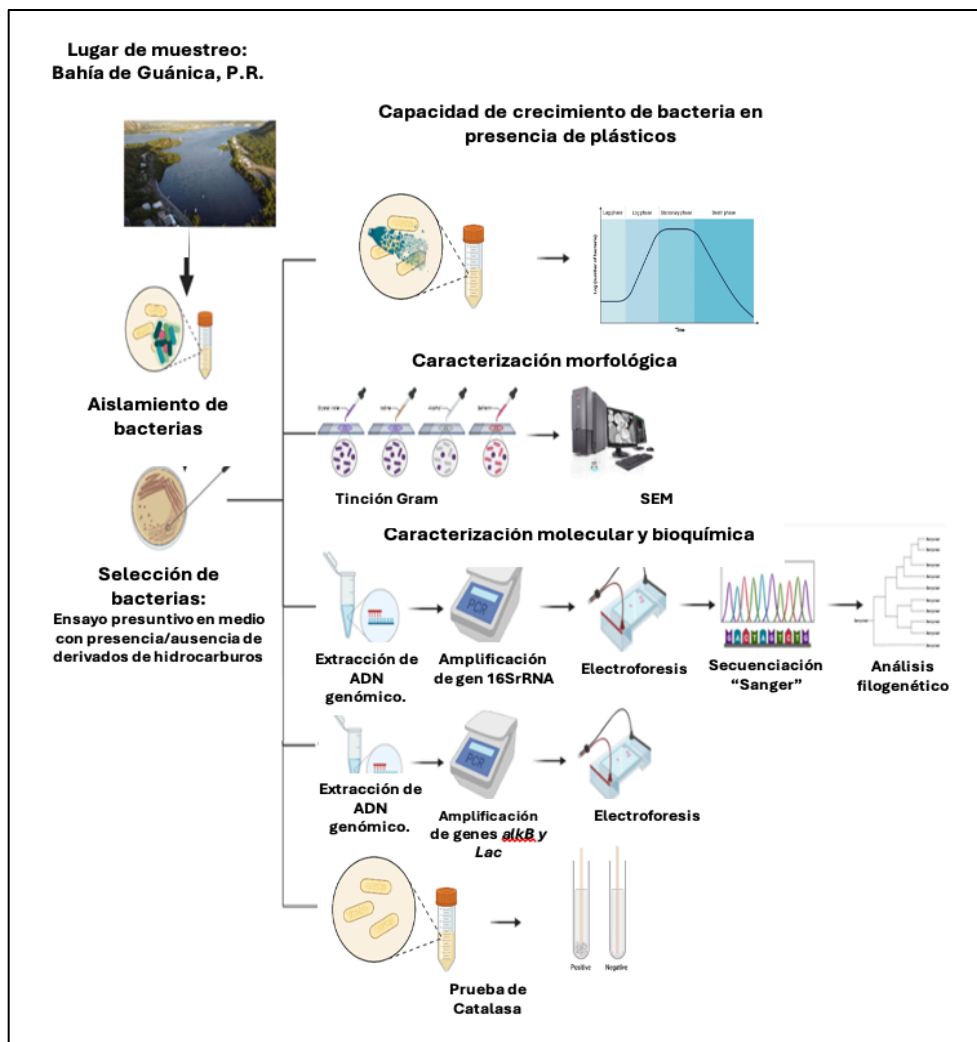
1. *alkB*, gen que codifica de para el complejo enzimático de alcano hidroxilasa, una familia de enzimas utilizadas para degradar aeróbicamente a los alcanos provenientes de hidrocarburos (Smith et al., 2013; Guibert, 2015).
2. *LadA*, codifica para una de las primeras enzimas bacterianas (monooxigenasa) estructural y funcionalmente caracterizada, responsable de degradar cadenas largas de alcanos (Perera et al., 2022). Además, se han encontrado homólogos de estas proteínas en los proteomas del hongo *Aspergillus flavus*.
3. *nahAc*, gen naftaleno dioxigenasa encargado de codificar enzimas encargadas de degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's, por sus siglas en inglés). Están presentes en bacterias aeróbicas y sirven como marcadores para determinar la actividad de degradación de los PAH's (Park & Crowley, 2006).

Metodología

Esta investigación tuvo como objetivo el aislar bacterias de un lugar previamente afectado con contaminación por petróleo. Una vez aisladas y purificadas por métodos tradicionales se determinó si tienen la capacidad de producir enzimas que ayuden a degradar plástico. Aquellas que presentaron actividad enzimática se identificaron y caracterizaron molecularmente. A continuación, se detalla el procedimiento llevado a cabo con el fin de cumplir con los objetivos de la investigación (Figura 5):

Figura 5

Metodología establecida para esta investigación



Lugar de muestreo

Para aislar las bacterias se utilizó una ubicación que haya sido afectada por derrames de petróleo en el pasado. Se determinó utilizar la Bahía de Guánica, localizada al suroeste de Puerto Rico, ya que ha sufrido derrames de petróleo y otros contaminantes desde la década de 1960 (Kumar et al., 2016). A continuación, se describe en detalles el lugar y los contaminantes que allí se encuentran. En el estudio de la National Centers for Coastal Ocean Science (2017) se informó que muestras de sedimentos de la Bahía de Guánica, Puerto Rico, contenían concentraciones altas de bifenilos policlorados (PCB), clordano, cromo y níquel. Estos contaminantes afectan a corales, peces y otros organismos presentes en los ecosistemas acuáticos:

1. Estudios han determinado que los PCB pueden causar un potencial cancerígeno tanto en animales como en humanos (United States Environmental Protection Agency, 2022).
2. El clordano el cual es parte de la familia de los pesticidas organoclorados, afecta a los peces causándole cáncer (Habibullah-Al-Mamun et al., 2022).
3. Por otra parte, el cromo afecta de manera citotóxica y genotóxica a las células de las tortugas hasta producirle la muerte (Wise et al., 2014).
4. En cuanto al níquel, su liberación en los océanos afecta en el crecimiento de los corales (Biscéré et al., 2017).

Las coordenadas del área utilizada para muestrear en la bahía fueron 17.96177N, 66.9320 de donde se tomaron muestras de tres puntos distintos: suelo, agua y fango (Figura 6).

Figura 6

Lugar de muestreo – Bahía de Guánica



Nota. Área de la Bahía de Guánica, donde se tomaron las muestras para el aislamiento de bacterias se tomaron 3 muestras de cada lugar.

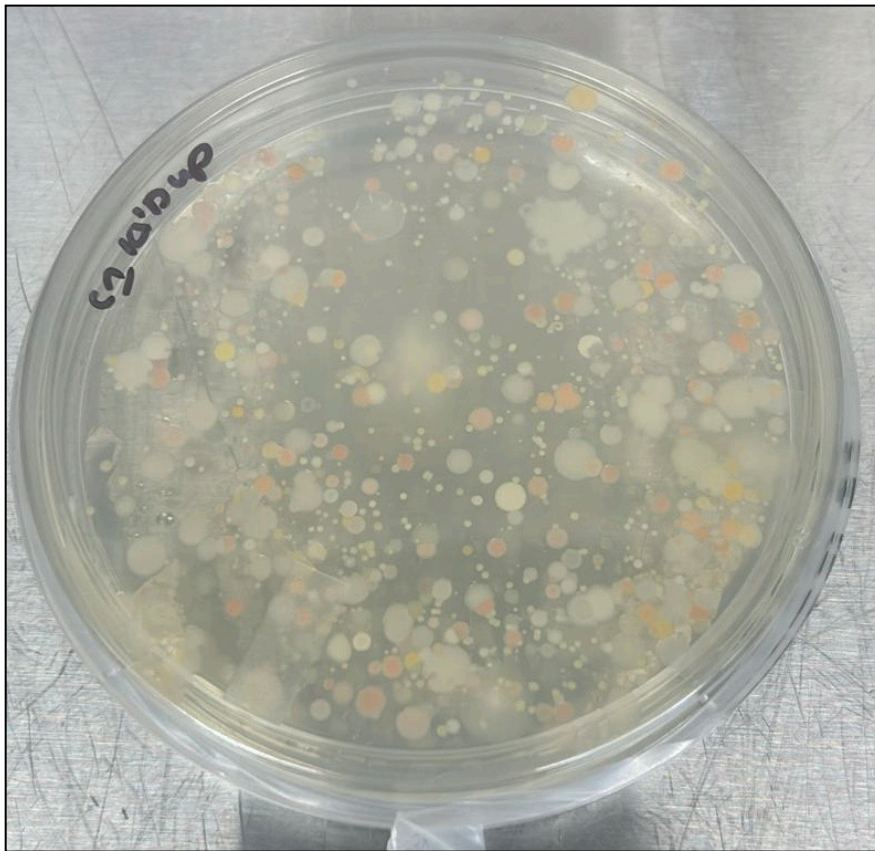
Aislamiento y enriquecimiento de bacterias

Para aislar a las bacterias del lugar previamente contaminado con petróleo se utilizó el método descrito por Sriyapai et al. (2018) con algunas variaciones. Se recolectaron muestras de suelo a un rango de profundidad de entre 5 - 10 cm. Todas las muestras fueron colocadas asépticamente en tubos estériles de 50 mL y se mantuvieron a temperatura de refrigeración previo a ser analizadas en el laboratorio. Luego como parte del enriquecimiento de las bacterias se utilizó el método descrito por Nademo et al.

(2023) con algunas variaciones. Una vez en el laboratorio, se tomó un gramo del suelo o un mililitro de agua, se mezcló con 9 mL de solución de agua peptona al 0.1% y se homogenizó por agitación. Luego, una alícuota de 1 mL de la solución de suelo se transfirió a tubos de ensayos con solución de agua peptona al 0.1% para realizar una dilución seriada de 10^{-1} a 10^{-7} . Luego de la dilución 0.1 mL de la última solución fue transferido a platos con agar nutriente (NA, por sus siglas en inglés) con la técnica de plato esparcido y se incubó a temperatura ambiente (27°C) por 1 semana para aislar a los microorganismos de las muestras (Figura 7).

Figura 7

Resultado del aislamiento de bacterias en agar nutriente

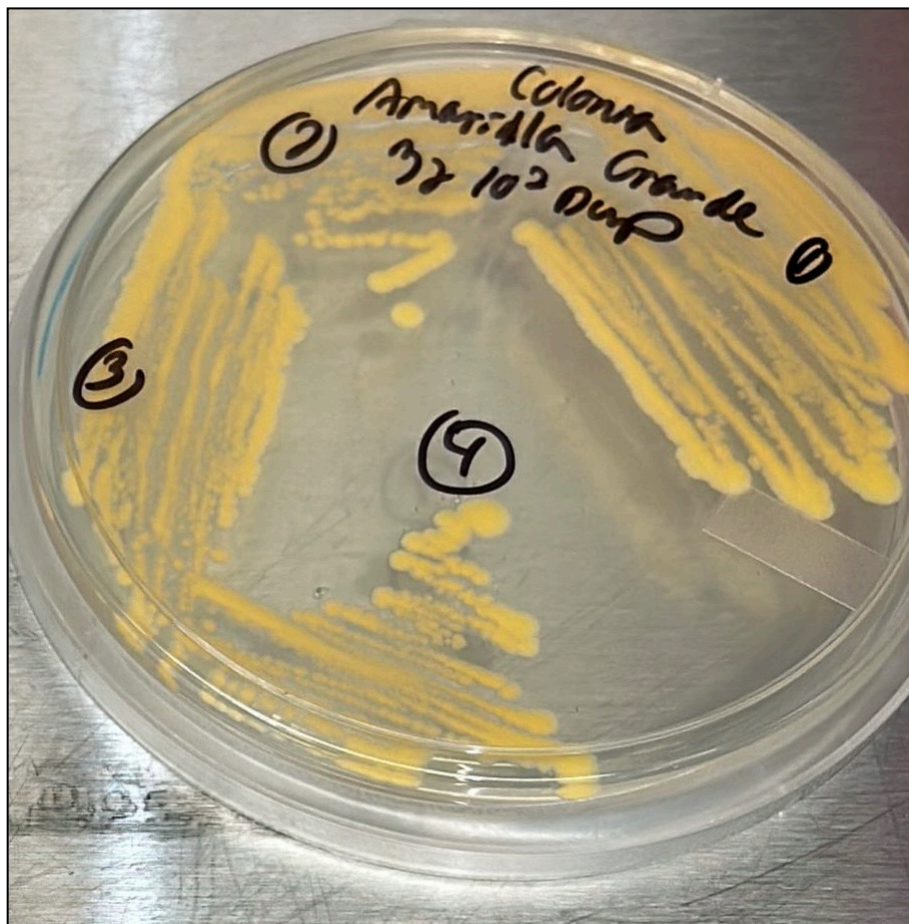


Purificación de bacterias aisladas

Las bacterias aisladas en el paso anterior fueron purificadas utilizando técnicas microbiológicas tradicionales. Se seleccionó el crecimiento presente en los platos de NA para obtener colonias aisladas mediante estriados de cuatro cuadrantes (Figura 8). Luego fueron transferidas a tubos con NA inclinado para mantener a las bacterias viables, realizarle tinción Gram y continuar su caracterización molecular y bioquímica.

Figura 8

Cultivo en cuadrante para purificación de bacteria aislada

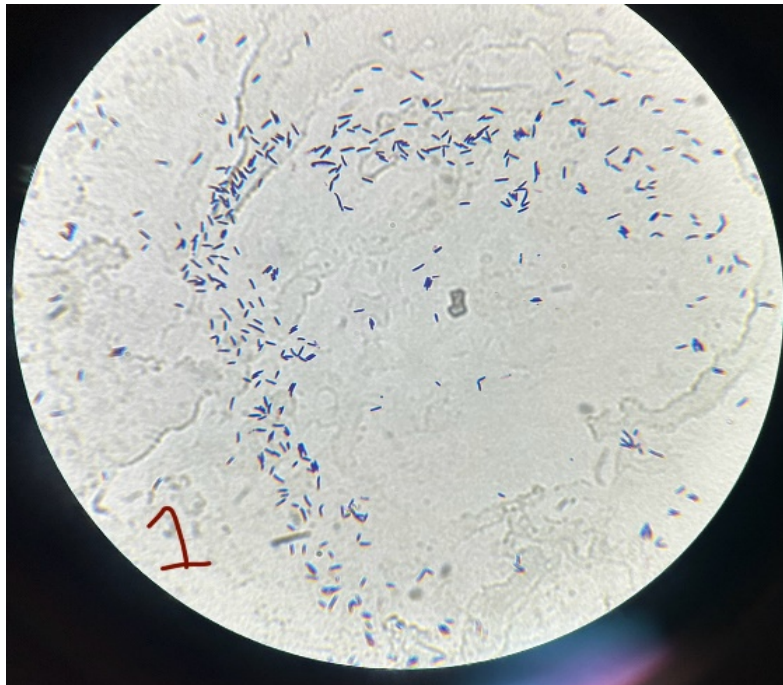


Tinción Gram

Para determinar la pureza de las bacterias aisladas y que degradan hidrocarburos, se utilizó la tinción Gram como método para validar la presencia de un solo grupo microorganismo en el cultivo y conocer su morfología. Con un asa bacteriológica se colocó una porción del cultivo fresco de 24 - 48 horas sobre una laminilla limpia a la cual se le añadió previamente una gota de agua destilada. Se mezcló el contenido para luego fijarlo con calor utilizando un mechero. Para teñir a la bacteria se utilizó el siguiente protocolo: cristal violeta (1 minuto), agua para enjuagar, iodo (1 minuto), agua para enjuagar, alcohol hasta que caigan gotas transparentes, agua para enjuagar, safranina (30 segundos) y agua para enjuagar. Luego de que la laminilla esté seca, se colocó en el microscopio para observar los detalles antes mencionados (Figura 9).

Figura 9

Resultado de la tinción Gram realizada a las bacterias aisladas



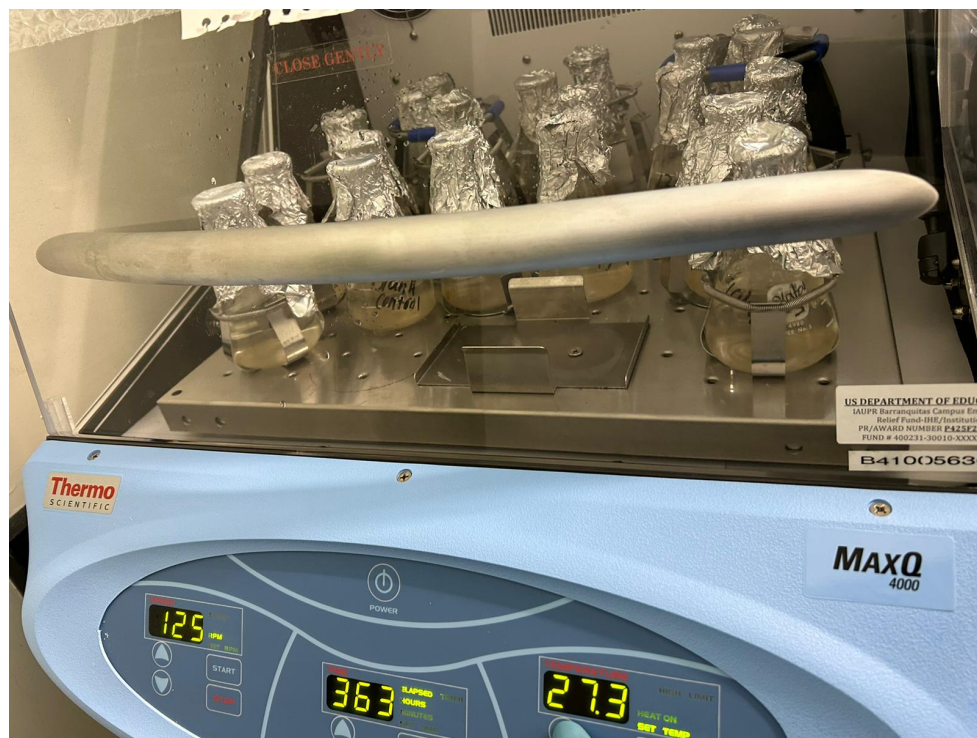
Nota. En la imagen se observan bacilos Gram positivo

Degradación de hidrocarburo

Para caracterizar y evaluar la capacidad de degradación de los microorganismos aislados se utilizaron los métodos presentados por Mahalingam & Sampath (2014), con modificaciones. Las bacterias aisladas fueron sub-cultivadas en 100 mL del Bushnell Haas Broth el cual fue suplementado con 0.1% W/V de polvo de LDPE (esterilizado por 30 min en UV) y expuestas a temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 2 semanas en agitación constante a 125 rpm (Figura 10). El crecimiento será determinado midiendo por triplicado la densidad óptica de la biomasa en un espectrofotómetro a 600 nm. Aquellas bacterias que crecieron en el medio fueron las seleccionadas para realizarle microscopia de rastreo (SEM) e identificarlas con métodos moleculares.

Figura 10

Bacterias incubadas con agitación

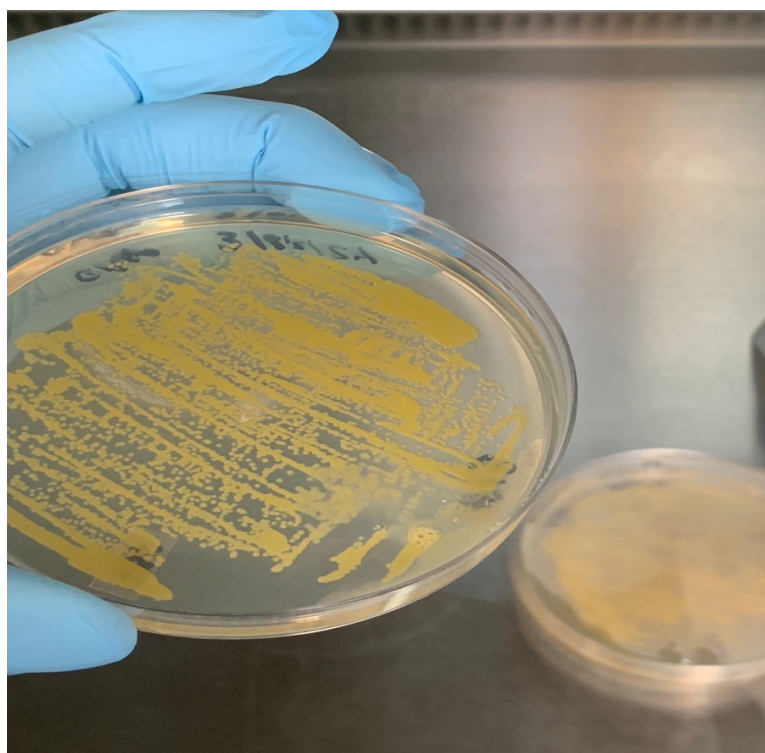


Prueba de catalasa

Según antes mencionado, se ha vinculado la presencia de la enzima catalasa con aquellos microorganismos que poseen la capacidad de degradar plástico. Para realizar esta prueba, se depositó cultivo puro (en caldo) de la bacteria en las fosas del plato y luego se le añadieron dos gotas de peróxido de hidrógeno (Figura 11). Los resultados positivos corresponden a aquellas bacterias que comenzaron a liberar gas producto del desdoblamiento de la molécula de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

Figura 11

Prueba de catalasa realizada a las bacterias



Microscopía electrónica de rastreo

Se visualizaron las células bacterianas aisladas y que degradan hidrocarburos con el microscopio electrónico de rastreo (SEM, por sus siglas en inglés). El método que se utilizó para preparar los especímenes fue el presentado por Sambolín-Pérez et al. (2023),

el cual consta de los siguientes pasos: (1) añadir 1ml de las bacterias en tubos de 1ml y se colocaron en la centrifuga por 4 minutos a 6000 RCF, (2) descartar el sobrenadante y mantener el *pellet*, (3) añadir PBS 1X p y centrifugar por 4 minutos a 600RCF (repetir 2 veces), (4) añadir 1ml de 1% de formaldehído e incubar por 1 hora a temperatura ambiental, (5) lavados con PBS 1X y centrifugar por 4 minutos a 6000 RCF (repetir 2 veces), (6) utilizar alcohol para deshidratar el *pellet* por 15 minutos en distintos por cientos de menor a mayor, empezando por 25, 50, 75, 85, 95 y 100%, (7) parte del *pellet* se añadió en una pieza con carbón y se colocó en el *Gold Coater*, para secarlo durante 30 minutos y luego añadirle la capa de oro y (8) se colocaron las muestras en el SEM para observar a las bacterias.

Extracción de ADN Genómico

La extracción del ADN genómico bacteriano y la amplificación del gen 16S rDNA se realizó siguiendo las especificaciones de los autores Obi et al. (2016), con algunas modificaciones. En el proceso de extracción del ADN genómico se utilizó el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit™ (Zymo Research) y los resultados de la extracción se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8% (85 v, 1 amp, 40 min).

Concentración del ADN genómico

La cuantificación de la concentración del ADN genómico se realizó con el espectrofotómetro BioSpec-Nano (Shimadazu Biotech). Para calibrar el equipo se utilizó 1µl de agua grado molecular (eluyente del DNA) como blanqueador previo a medir las concentraciones del ADN. Luego, siguiendo las indicaciones del manufacturero se procedió a colocar 1µl del ADN de las muestras en la ventana de medición. En este análisis cuantitativo y cualitativo del ADN se utiliza una largo de onda de 260/280 nm

para medir la absorbancia y la concentración de los ácidos nucleicos (ng/μL). Para este análisis, se tomó en consideración que un valor de relación de pureza A260/A280 cercano a 1.8 es lo esperado para una buena concentración de ADN y un alto nivel de pureza (Thermo Scientific, 2024).

Amplificación del gen 16S rDNA

El gen 16S rDNA se amplificó mediante la reacción de polimerasa en cadena (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y el cebador inverso 1492R (5'-GGTTACCTTGTTCAGACTT-3') (Chen et al., 2015). Los parámetros utilizados para la amplificación del gen en el termociclador fueron los siguientes: desnaturalización inicial de la temperatura 95°C, seguido de 25 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos, 72°C por 2 minutos, con una extensión final de 72°C por 5 minutos, y un *hold* de 4°C para preservar la integridad de los productos de PCR. Se utilizó la enzima Taq polimerasa de alta fidelidad (Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, NEB Biolabs) y el plásmido pGLO con cebadores específicos para GFP fueron utilizados como control positivo para la reacción de PCR. Luego de este proceso se verificaron los productos de PCR por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Método *Sanger sequencing* y bioinformática

El método *Sanger sequencing* del 16S rDNA se utilizó para secuenciar el producto de amplificación de los genes de las bacterias aisladas (Gavriilidou et al., 2021) utilizando los servicios de la compañía Genewiz. Las secuencias del gen amplificado, tanto Forward como Reverse, se almacenaron en archivos FASTA individuales. Al unirse estas secuencias, se formó un *contig* utilizando el *software Codon Code*, siguiendo el método

descrito en la investigación de Cole et al. (2014) con sus debidas modificaciones, los contigs generados presentaron un tamaño en promedio de 1,400 pares de bases. Por último, las secuencias se colocaron en el programa búsqueda de alineación local básica Blast en la base datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) para poder identificar las especies más cercanas (Obi et al., 2016). Se tomó en cuenta el % de identidad y el *query coverage* para asegurar la comparación completa de la región de interés con los genes 16S rDNA de la base de datos. Por último, para realizar el árbol filogenético se utilizó el software llamado MEGA (Kumar et al., 2008), aplicando el método de alineamiento por máxima verosimilitud con 100 Bootstrap, que es un software utilizado para métodos estadísticos en el análisis filogenético de secuencias de ADN y proteínas.

Identificación de genes encargados de degradar hidrocarburos

Para determinar la presencia de ciertos genes encargados de la degradación, se utilizó el método presentado por Chikere & Fenibo (2018) y Lima et al. (2020) con algunas variaciones. Se sub-cultivaron las bacterias en NA por un periodo de 48 horas a 35°C para obtener cultivos frescos. Se utilizó el kit de extracción descrito anteriormente para la extracción del ADN. El producto de la extracción será visualizado por medio una electroforesis de agarosa al 0.8% previo a amplificar con PCR las regiones del genoma correspondientes a los genes específicos que se han encontrado degradan LDPE. Estos genes han sido utilizados en investigaciones como la de Maroof et al. (2020) y son Lacasa (167 bp), AlkB1(330 bp) y AlkB2 (185 bp). En la tabla 1 se describen cuáles fueron los cebadores específicos utilizados. Los resultados de la amplificación de los genes serán confirmados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Tabla 1*Descripción de los cebadores específicos para los genes de interés*

Genes	Tamaño del producto	Secuencia	Annealing	CG content (%)
Lacasa	167bp	Lac-5'-GTTACGCGGATTGTGTTCCG-3'	35 ciclos; 94C por 2min	55
		Lac-R 5'-CGGCCCAATTGCAACATGAA3'	94C por 20s 60C por 10s, 72C por 30s y 72C por 5min	50
AlkB1	330bp	AlkB1-F 5'-TCGAGCACATCCGCGGCCACCA-3'	35 ciclos; 94C por 5min	68
		AlkB1-R 5'-CCGTAGTGCTCGACGTAGTT-3'	94C por 1min, 40C por 30s, 72C por 30s y 72C por 7min	55
AlkB2	185bp	AlkB2-F 5'-CATAATAAAGGGCATCACCGT-3'	35 ciclos; 94C por 5min	43
		AlkB2-R 5'-GATTTCATTCTCGAAACTCCAAAC - 3'	94C por 1min 40C por 30s, 72C por 30s y 72C por 7min	38

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para determinar el promedio de las lecturas de absorbancia cuando las bacterias estaban expuestas al hidrocarburo por un periodo de dos semanas. El proceso de exposición al plástico y las lecturas de absorbancia se realizaron por triplicado para calcular la media de los valores.

Resultados

Aislamiento y purificación de bacterias

Luego de procesar las muestras de los tres puntos de muestreo se aislaron y se seleccionaron un total de doce colonias representativas, las cuales se purificaron con la técnica de plato estriado en el medio de cultivo NA. Estos microorganismos se subcultivaron en el Bushnell agar suplementado con plástico y se seleccionaron dos bacterias por área que presentaron crecimiento en el medio (Tabla 2). Estas seis bacterias fueron utilizadas para continuar con el proceso de caracterización morfológica y análisis molecular para su identificación, y determinación de presencia de genes relacionados con la degradación de plástico.

Tabla 2

Bacterias seleccionadas para el estudio

Punto de Muestreo	Área de tierra
Tierra	9-C1106
	8-C2103Dup
Agua	11-A1x103
	10-A1x102
Fango	6-B1x102Dup
	13-B2102

Capacidad de degradación de plástico

Las seis bacterias seleccionadas fueron expuestas al caldo de Bushell con plástico para observar su crecimiento mediante lecturas de absorbancia durante dos semanas de incubación (Tabla 3). De acuerdo con el promedio de las lecturas de absorbancia de la primera semana, hubo un crecimiento aparente de todas las bacterias en comparación con el tiempo 0. Sin embargo, en la semana dos, las bacterias #6 y #10

mostraron una disminución en la absorbancia en comparación con los demás aislados y el tiempo cero.

Tabla 3

Promedio de las lecturas de absorbancia de las bacterias

Bacterias	Absorbancia Tiempo 0	Absorbancia Semana 1	Absorbancia Semana 2
6-B1x102Dup	0.005	0.057	-0.070
8-C2103Dup	0.002	0.246	0.128
9-C1106	0.007	0.330	0.212
10-A1x102	0.006	0.093	-0.016
11-A1x103	0.005	0.181	0.036
13-B2102	0.005	0.187	0.136

Prueba de catalasa

En la tabla 4 se presentan los resultados de esta prueba realizada a las seis bacterias utilizadas para este estudio. Todos los cultivos de los microorganismos estudiados produjeron burbujas cuando se le añadió el reactivo (peróxido de hidrógeno), por lo que se infiere poseen la enzima catalasa.

Tabla 4

Resultados reacción de catalasa de las bacterias

Bacterias	Reacción de catalasa
6-B1x102Dup	Positiva
8-C2103Dup	Positiva
9-C1106	Positiva
10-A1x102	Positiva
11-A1x103	Positiva
13-B2102	Positiva

Tinción Gram y microscopía

Los resultados de la tinción Gram (Tabla 5) demostraron que la mayoría de las bacterias aisladas son Gram positivas, con excepción del aislado 13 que resultó ser una bacteria Gram negativa. En cuanto a su morfología, los seis aislados tuvieron una morfología de bacilos.

Tabla 5

Resultados de tinción Gram y morfología de bacterias

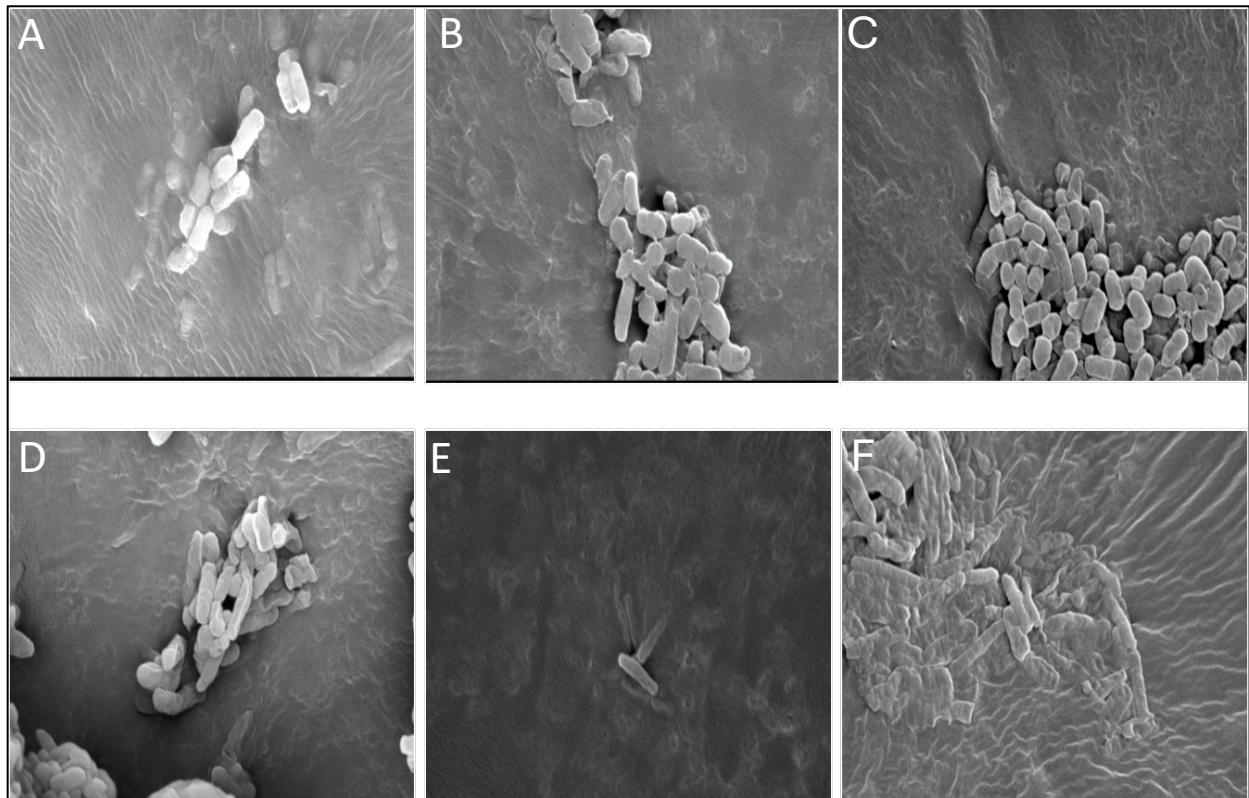
Bacteria	Tinción Gram	Morfología
6-B1x102Dup	Gram positivo	Bacilos largos
8-C2103Dup	Gram positivo	Bacilos
9-C1106	Gram positivo	Bacilos largos
10-A1x102	Gram positivo	Bacilos
11-A1x103	Gram negativo	Bacilos cortos
13-B2102	Gram positivo	Bacilos

Microscopía electrónica de rastreo (SEM)

Para confirmar la morfología observada en la tinción Gram de las seis bacterias aisladas y utilizadas en este estudio se utilizó el SEM. Además, estos resultados de la microscopía ayudarán a caracterizar mejor los microorganismos aislados de un medioambiente natural. Con esta técnica de microscopía se confirmó que, en efecto, todas las bacterias poseen una morfología de bacilos cortos y largos (Figura 12).

Figura 12

Visualización de las bacterias con microscopía de barrido (SEM)



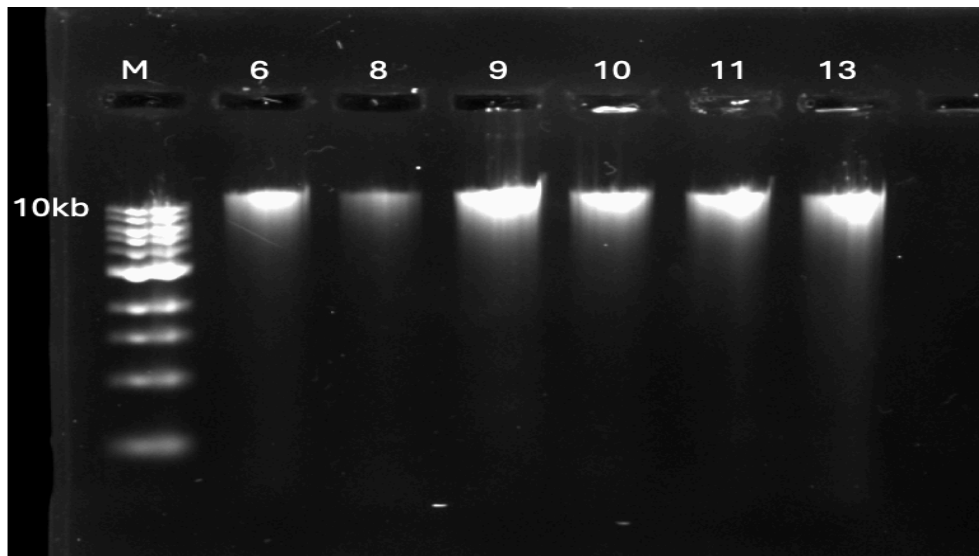
Nota. Las imágenes corresponden a la microcopia de barrido utilizada para visualizar la morfología de las bacterias: a) aislado #13, b) aislado #11, c) aislado #10, d) aislado # 8, e) aislado #9 y f) aislado #6.

Extracción de ADN genómico

El ADN genómico extraído de las seis bacterias utilizadas fue analizado mediante un gel de agarosa al 0.8% (85 V, 1 amp, 40 min) para confirmar su pureza e integridad (Figura 13). El resultado de la extracción demuestra que la mayoría de las bandas poseen un alto peso molecular al permanecer en la parte superior del gel. Sin embargo, la única que se aprecia que tiene poca concentración corresponde a la bacteria #8.

Figura 13

Gel de agarosa para visualizar extracción de ADN genómico



Concentración del ADN genómico

La concentración del ADN genómico fue determinada para asegurar tener una cantidad adecuada y de calidad del producto de la extracción. Los resultados presentados en la Tabla 6 demuestran que se obtuvo una buena concentración de material genético de las bacterias utilizadas en este estudio. La bacteria #8, tal cual se observó en el gel de electroforesis fue la que tuvo menor concentración de ADN.

Tabla 6

Concentración del ADN genómico de las bacterias

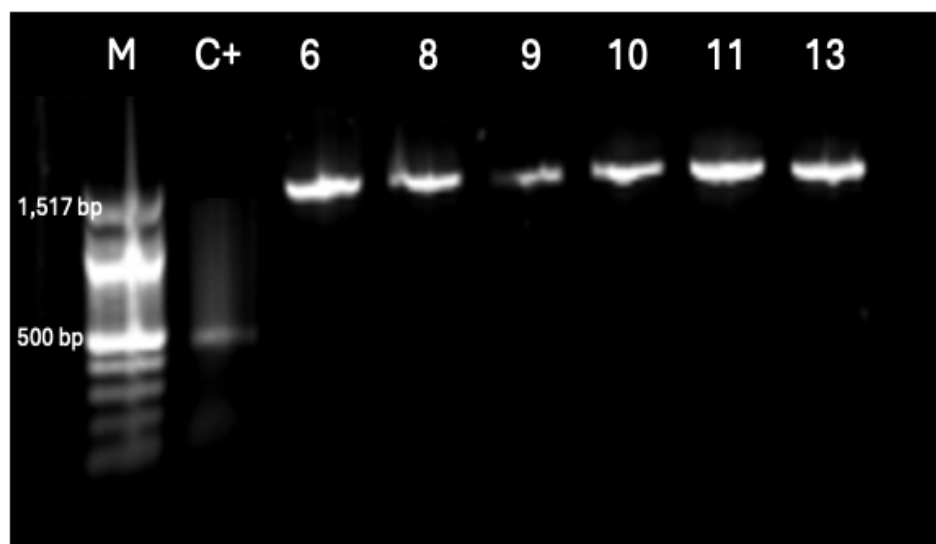
Bacteria	Concentración (ng/μl)	OD (260/280)
6	43.62	2.13
8	14.13	2.19
9	26.24	2.00
10	41.28	2.36
11	20.71	2.07
13	22.52	2.26

Amplificación y secuenciación del gen 16S rDNA

El producto de la amplificación del gen 16S rDNA se visualizó con una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 0.8% (Figura 14). Los resultados demuestran que para todas las bacterias se obtuvo un tamaño de banda de aproximadamente 1,500pb. El cual es representativo de la región del gen que se quería amplificar con relación a los cebadores que se utilizaron (27F y 1492R).

Figura 14

Gel de agarosa con resultados de amplificación del gen 16S rDNA



Identificación de los microorganismos

Los productos de PCR de las seis bacterias fueron secuenciados y los resultados consultados en la base de datos de bioinformática Blast (Basic Local Alignment Search Tool) para obtener su identidad (Tabla 7). Se identificaron los siguientes géneros de bacterias: *Metabacillus indicus*, *Mesobacillus jeotgali*, *Bacillus altitudinis*, *Exigobacterium* sp., *Exigobacterium* sp. CNJ771PL04 y *Bacillus* sp. Todos los microorganismos obtuvieron sobre 99% de *query* e identidad cuando fueron comparados en la base de datos.

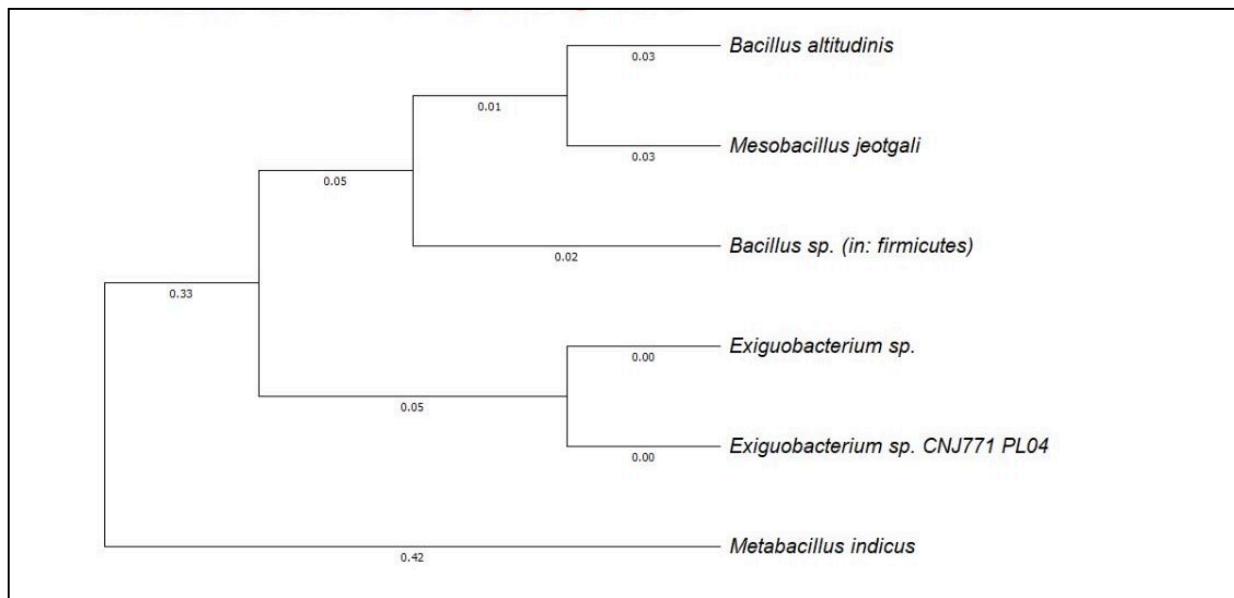
Tabla 7*Identidad de las bacterias*

Bacterias	Nombre científico	Query %	Identidad %	Accesion
6	<i>Metabacillus indicus</i>	99	99.79	MH283823.1
8	<i>Mesobacillus jeotgali</i>	99	98.60	KR347228.1
9	<i>Bacillus altitudinis</i>	99	99.16	MN543858.1
10	<i>Exiguobacterium</i> sp.	99	99.65	MW627401.1
11	<i>Exiguobacterium</i> sp.CNJ771PL04	100	99.44	DO448761.1
13	<i>Bacillus</i> sp.(in:firmitutes)	100	99.86	Ok1478131.1

Además, con las secuencias se desarrolló un árbol filogenético para obtener las relaciones evolutivas entre los organismos (Figura 15). Este árbol genera una comparación que presenta evolutivamente la cercanía y distancia entre los microorganismos comparados junto a posibles eventos de especiación. Esta representación gráfica muestra que *Bacillus altitudinis* y *Bacillus* sp. comparten ancestros con *Mesobacillus jeotgali*. Sin embargo, *B. altitudinis* está más relacionado con *M. jeotgali*, al igual que *Exiguobacterium* sp. comparte un ancestro en común con *Exiguobacterium* sp. CNJ771 PL04. La única bacteria que no está relacionada con las demás lo es *Metabacillus indicus*.

Figura 15

Árbol filogenético desarrollado de las seis bacterias



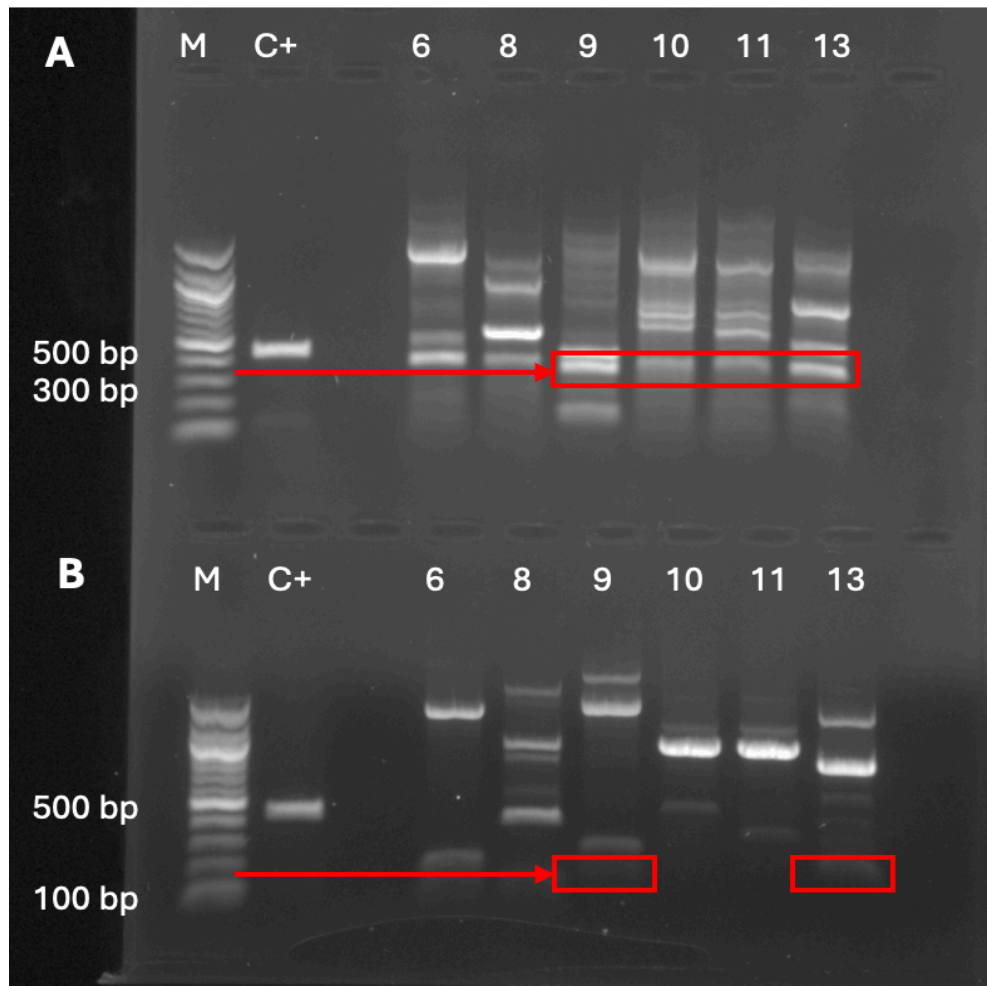
Nota. Árbol filogenético desarrollado utilizando el método de evolución mínima rápida que muestra las relaciones entre las seis bacterias utilizadas para esta investigación.

Detección de genes encargados de degradar plástico

Durante la amplificación de los genes *alkB1* y *alkB2* se observó la presencia de bandas no específicas como resultado de amplificaciones aleatorias en el genoma de las bacterias (Figura 16). No obstante, se visualizó la presencia de la banda de interés basado en el tamaño esperado que eran 365 y 161 pares de bases respectivamente. Para *ALKB1* las bacterias que presentaron las bandas fueron *Bacillus altitudinis*, *Exigoubacterium sp.*, *Exiguobacterium sp. CNJ771PL04* y *Bacillus sp.* y para el *ALKB2* fueron *Bacillus altitudinis* y *Bacillus sp.*

Figura 16

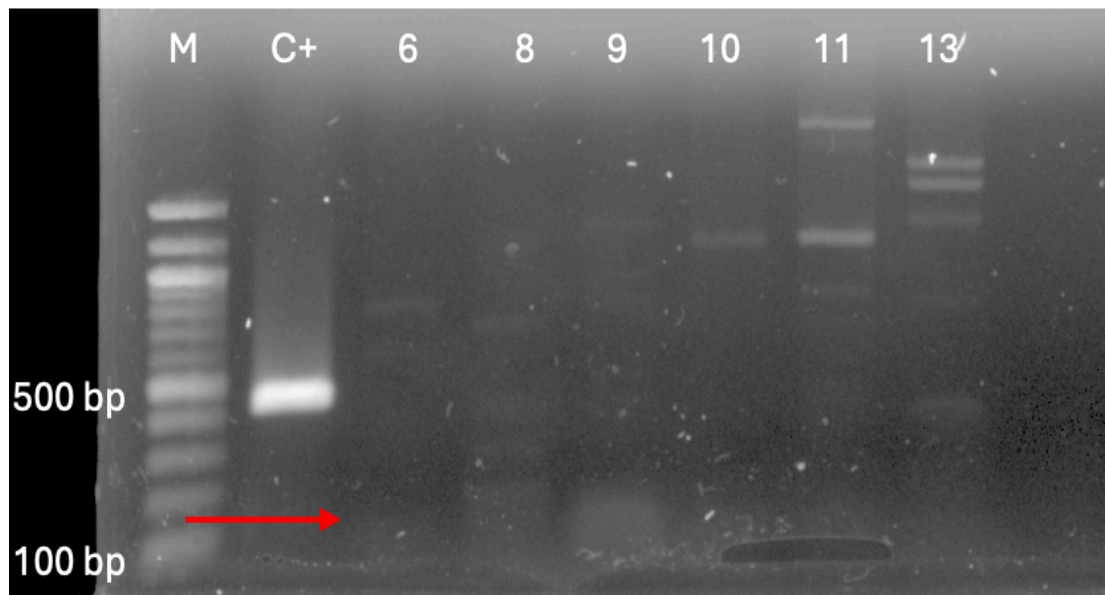
*Electroforesis del producto de PCR de los genes *alkB1*(A) y *alkB2* (B)*



Por otro lado, en la electroforesis del producto de amplificación del gen Lac, no se visualizaron bandas de interés en ninguno de los microorganismos. En el gel se aprecia el marcador utilizado, el control positivo y varias amplificaciones aleatorias en ciertas bacterias (Figura 17).

Figura 17

Electroforesis del producto de PCR del gen Lac



Discusión de resultados

Se determinó la capacidad metabólica que poseen las bacterias aisladas de la Bahía de Guánica para degradar plástico. Los resultados del crecimiento de estos microorganismos luego de ser sub-cultivados en el medio de cultivo Bushnell suplementado con 0.1% de LDPE y su crecimiento fueron observado mediante lecturas de absorbancia durante dos semanas de incubación. Los resultados del crecimiento de las bacterias en este estudio son comparables con los presentados por Khampratueng et al. (2024). Donde los microorganismos *Bacillus* sp. AS3 y *Sphingobacterium* sp. AS8 aislados de un vertedero clandestino presentaron un crecimiento progresivo en los primeros siete días de ser cultivadas en un medio suplementado con LDPE. Sin embargo, las bacterias en esta investigación mostraron una disminución significativa en su absorbancia pasada la segunda semana de incubación en el medio de cultivo suplementado. Algo similar ocurrió en el estudio de Munir et al. (2018), donde asumieron que la disminución en el crecimiento luego de cuatro semanas de las bacterias se debe a la incapacidad de estas de utilizar el LDPE como fuente de carbono. No obstante, el autor suplementó el medio de cultivo utilizado con 0.5% de glucosa para promover el crecimiento de las bacterias utilizadas en su estudio y aisladas de un relleno sanitario. f

Por otro lado, en este estudio los resultados de las pruebas de catalasa demostraron que todos los aislados, luego de añadirle el reactivo, poseen la enzima. Esto guarda relación con estudios realizados para identificar que enzimas que participen de la biodegradación de hidrocarburos, donde se ha encontrado que la catalasa favorece la degradación de estos contaminantes del suelo (Kaushal et al., 2018). Demostrando así, que la catalasa mejora la eficacia de los procesos de remediación de suelos

contaminados con petróleo. Además, autores como Loaiza (2022) mencionan que existen bacterias como *Pseudomonas putida* que tienen la capacidad de adaptarse a diferentes fuentes de carbono y tiene una alta efectividad para degradar derivados de plásticos por su capacidad de secretar enzimas como la catalasa. A su vez, Gan et al. (2022) explican la importancia de esta enzima, que normalmente es producida por ciertas bacterias y otros organismos, y que se relaciona con la biodegradación de varios contaminantes ambientales tóxicos, entre los que se encuentran los tintes textiles, herbicidas/pesticidas, fenoles e hidrocarburos poliaromáticos (relacionados con los plásticos).

Además, se utilizó la tinción Gram para visualizar con microscopia de luz la morfología de las bacterias aisladas y que degradan derivados del petróleo y la microscopia electrónica de rastreo para confirmar esos detalles morfológicos de los seis microorganismos utilizados. Los resultados obtenidos demuestran que la morfología de todas las bacterias aisladas son bacilos largos y cortos, y Gram positivos. En estudios como el de Nedi et al. (2024) se aislaron y utilizaron un total de 52 bacterias de un vertedero en Etiopia, de las cuales 30 eran Gram positivas y 22 Gram negativas. Estos microorganismos con características morfológicas similares fueron utilizados en ensayos de degradación del plástico y muchos de ellos degradaban parcialmente el polietileno. A su vez, Ganesh & Lin (2009) aislaron siete bacterias Gram y una Gram negativa de un suelo contaminado con un derivado del petróleo, el diésel. Como resultado, encontraron que la bacteria Gram positiva del género *Paenibacillus* sp. que produce biosurfactante es más efectiva en la degradación de este tipo de combustible.

A su vez, la identificación de las bacterias se logró mediante la aplicación de herramientas moleculares que incluyeron la extracción del ADN, la amplificación de una región del gen específica, su secuenciación y su revisión en una base de datos de bioinformática. A continuación, se presentan y discuten los géneros de bacterias identificadas:

- ***Metabacillus indicus*** (previamente conocida como *Bacillus indicus*): Es una bacteria Gram positiva, en forma de bacilo, que no posee motilidad, formadora de endosporas y que produce colonias pigmentadas de color naranja-amarillento (Suresh et al., 2004). En la investigación realizada por George et al. (2023) se aislaron doce bacterias de suelos contaminados con aceite de motor y solo dos de estos microorganismos, *Lysinibacillus fusiformis* y *Metabacillus indicus* fueron capaces de producir polihidroxibutirato (PHB). El PHB es un polímero biodegradable por ciertos microorganismos como fuente de carbono y energía (Adnan et al., 2022). En otro estudio, donde se buscaban bioprospectos con enzimas hidrolíticas en la zona del litoral del Mar Negro, aislaron una comunidad de bacterias compuesta de sobre 185 géneros agrupados en 46 clases. De estos microorganismos, se encontraba la clase Bacilli con diversos géneros de bacterias, entre los que estaba *Metabacillus*. Un género que se presentó una tasa rápida de crecimiento bajo las condiciones de crecimiento utilizadas y una alta actividad pectinolítica (capacidad para degradar pectina) (Ruginescu et al., 2022). Por lo que en aplicaciones futuras este tipo de bacterias productoras de PHB y con capacidad de degradar pectina

se pueden explorar en varios campos, aprovechando sus propiedades únicas y su adaptabilidad en diversos entornos

- ***Mesobacillus jeotgali***: Esta es una bacteria marina Gram variable, anaerobia facultativa, motil y en forma de bacilos (Das et al., 2023). El mismo autor utilizó a una cepa de esta bacteria (*M. jeotgali* ADCG SIST 4) para sintetizar nanopartículas de oro, logrando buenos resultados con un tamaño promedio de partícula de 78.6nm. Sin embargo, en una investigación realizada por Shork et al. (2023) se aislaron 50 bacterias y 58 hongos de diversas fuentes (suelo salino, vertederos, agua de mar, entre otros) para estudiar su capacidad de producir bioplásticos (PHB). De estos, solo 14% de las bacterias y 8.6% de los hongos presentaron acumulación de PHB, por consiguiente, estos microorganismos fueron identificados molecularmente y entre ellos se encontraba *Mesobacillus jeotgali*. A su vez, Subramaniam et al. (2023) utilizaron a *M. jeotgali* por su capacidad de producir la enzima azoreductasa y determinar su efectividad para degradar tintes sulfonados, esto como una alternativa para proteger al medio ambiente de la acumulación de sustancias tóxicas. El microorganismo fue inmovilizado en una matriz de 4% de alginato de calcio, las esferas fueron expuestas a los tintes en diferentes intervalos de tiempo hasta alcanzar las 72 horas. Como resultado, se confirmó *Mesobacillus jeotgali* tiene una eficiencia de decoloración más efectiva para el azul de metileno que para el congo red.

- *Bacillus altitudinis*: Es una bacteria aerobia, Gram positivo y con forma de bacilo (Vettath et al., 2017). En estudios previos ha sido aislada como un microorganismo endófito en plantas y se ha recomendado como un promotor de crecimiento con posibles aplicaciones en la agricultura (Zhang et al., 2021). Sin embargo, Dini et al. (2024) utilizaron una cepa de *B. altitudinis* B538 para evaluar su capacidad potencial de degradar PET y PCL durante un tiempo de incubación de 10 días. Pasado este tiempo se evaluaron las condiciones de los plásticos y se determinó que la bacteria degradó mejor las láminas de PCL. Además, produce la enzima esterasa que ayuda en la síntesis, degradación y modificación de compuestos de carbohidratos (Comba-González et al., 2021). Por otro lado, en otro estudio esta bacteria fue aislada del lodo de una fábrica de pulpa y papel, y se demostró su capacidad para la degradación de lignina (Khan et al., 2022).
- *Exiguobacterium* sp.: Esta bacteria en forma de bacilo, Gram positiva, no formadora de spora, y anaerobio facultativo (Chen et al., 2017). En estudios se ha evaluado si especies de *Exigobacterium* DR11 y DR14 aisladas de un humedal tienen la capacidad de biodegradar poliestireno y utilizarlo como fuente de carbono (Chauhan et al., 2018). Los resultados demostraron que ambos microorganismos produjeron biopelículas sobre el plástico durante un periodo de 30 días de incubación. Las enzimas secretadas por las bacterias hidrolizaron y comenzaron el proceso de depolimerización del PS, lo que las hace una buena opción para el

desarrollo de futuros procesos de degradación de estos polímeros sintéticos.

- *Bacillus* sp.: Este género de bacterias se caracteriza por tener forma de bacilos, Gram positivas, formadoras de esporas y anaeróbicas facultativas (Maughan y Van der Auwera, 2011). Estas bacterias han sido ampliamente utilizadas en estudios para evaluar la tasa de biodegradación del plástico que estas poseen. Un ejemplo de ello lo es la investigación publicada por Fibriarti et al. (2021) donde utilizaron *Bacillus* spp. BP4 y BP6 aisladas del suelo de un basurero, para determinar la capacidad de estas de degradar LDPE luego de un periodo de 30 días. Los resultados demostraron que ambas especies de *Bacillus* obtuvieron porcentajes de degradación de sobre 7%. En el caso de Kumar y Devi (2019) exploraron las tasas de degradación del LDPE que tenían tres especies de *Bacillus* spp. ISJ51, ISJ55 y ISJ57. Se obtuvo que la cepa ISJ55 produjo biopelícula pasado los 60 días de incubación y ocurrió cambios morfológicos en la estructura del polímero utilizado. Siendo este aislado (ISJ55) el único que pudo colonizar, modificar y utilizar el LDPE como fuente de carbono.

A su vez, en este estudio se determinó, mediante amplificación con PCR, si las bacterias aisladas poseen genes específicos para degradar derivados de hidrocarburos. Los resultados de la electroforesis demostraron la presencia de bandas de interés relacionadas con el gen *alkB1* en *Bacillus altitudinis*, *Exiguobacterium* sp., *Exiguobacterium* sp. CNJ771PL04 y *Bacillus* sp. y con el gen *alkB2* en *Bacillus altitudinis* y *Bacillus* sp. Sin embargo, no se visualizó la banda del gen *Lac* al observar el gel de

electroforesis del PCR realizado. Al revisar la literatura no se encontraron estudios o información que relacionen las bacterias utilizadas en esta investigación con la presencia de los genes *alkB* y su capacidad para degradar contaminantes que derivan del petróleo. Esto podría implicar que los microorganismos aislados aún no han sido evaluados para determinar si poseen este tipo de genes, siendo estos resultados una aportación significativa a los esfuerzos para disminuir la presencia de plástico.

No obstante, otros estudios presentan y describen otras bacterias capaces de degradar derivados del petróleo, las cuales se discuten a continuación. En una investigación doctoral realizada en Puerto Rico, la investigadora encontró varios géneros de bacterias relacionadas con la degradación de alcanos *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Cupriavidus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Shigella* y *Streptomyces* (Bernier-Casillas, 2019). De este grupo, la bacteria del género *Rhodococcus* spp. se ha encontrado que puede degradar compuestos de hidrocarburos y ha recomendada como un organismo esencial para los procesos de biorremediación por la presencia de los genes *alkB* (Filippovna et al., 2022).

Otra bacteria que ha sido asociada con estos genes es *Pseudomonas* spp. en el estudio de Muriel-Millán et al. (2019) donde se aisló una cepa (GOM1) de este microorganismo que mostró una alta eficiencia en la degradación de alcanos de cadenas largas. Por otro lado, en el caso del estudio realizado por Jeon & Kim (2016) se insertaron los genes *alkB1* y *alkB2* en la bacteria *P. aeruginosa* cepa E7 para evaluar la efectividad de estos en términos de biodegradación. Con los resultados obtenidos concluyeron que

el gen *alkB2* es más efectivo que el *alkB1* para degradar polietileno de bajo peso molecular.

Conclusiones

A continuación, se presentan las conclusiones relacionadas con el análisis de los resultados obtenidos en esta investigación:

- Los análisis microbiológicos tradicionales y los moleculares son esenciales para caracterizar a microorganismos con posibles aplicaciones de biodegradación en el futuro.
- Las bacterias utilizadas para este estudio en su mayoría se han asociado con procesos relacionados a la degradación de contaminantes como lo son los plásticos.
- Los resultados demuestran que existen la presencia de bacterias en lugares previamente contaminados con petróleo que tienen la capacidad de biodegradar plásticos.
- Estos microorganismos tienen la capacidad de ser utilizados como bioprospectos para el desarrollo de procesos efectivos para reducir la presencia de plástico en los ecosistemas.

Recomendaciones

Se recomienda continuar estudiando a los microorganismos aislados y la abundancia de sus genes, para evaluar capacidad de degradar otros derivados del petróleo. En estos experimentos se deben tomar en consideración los factores como la temperatura, pH, y la presencia de otros sustratos para optimizar la tasa de degradación de los microorganismos con el polímero. Además, de determinar si estas bacterias poseen enzimas y otros genes asociados a estos procesos metabólicos de importancia.

Referencias

- Acosta, G., Carillo, D. & Caballero, J. (2022). Microplásticos en agua y en organismos. *Ciencia Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, 73(2), 14-21.
- Adekanmbi, A. A., Dale, L., Shaw, L., & Sizmur, T. (2023). Differential temperature sensitivity of intracellular metabolic processes and extracellular soil enzyme activities. *Biogeosciences*, 20(11), 2207–2219. <https://doi.org/10.5194/bg-20-2207-2023>.
- Adnan, M., Siddiqui, A. J., Ashraf, S. A., Snoussi, M., Badraoui, R., Alreshidi, M., Elsbali, A. M., Al-Soud, W. A., Alharethi, S. H., Sachidanandan, M., & Patel, M. (2022). Polyhydroxybutyrate (PHB)-based biodegradable polymer from *Agromyces indicus*: Enhanced production, characterization, and optimization. *Polymers*, 14(19), 3982. <https://doi.org/10.3390/polym14193982>
- Agencia Europea de Medio Ambiente. (2020). *La contaminación de la tierra y del suelo: generalizada, nociva y creciente*. <https://www.eea.europa.eu/es/senales/senales-5+de-la-aema-2020/articles/la-contaminacion-de-la-tierra>
- Aryal, S. (2022). Polymerase Chain Reaction (PCR)- Principle, Steps, Applications. Microbe Notes; Sagar Aryal. <https://microbenotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-steps-applications/>
- Ahmaditabatabaei, S., Kyazze, G., Iqbal, H. M. N., & Keshavarz, T. (2021). Fungal enzymes as catalytic tools for polyethylene terephthalate (PET) degradation. *Journal of Fungi*, 7(11), 931. <https://doi.org/10.3390/jof7110931>
- Alban, V. (2022, enero 12). *Hongos de la podredumbre blanca: Potencial biotecnológico en la degradación de xenobióticos*. FungiLand.

<https://www.thefungiiland.com/funginews/hongos-de-la-podredumbre-blanca-potencial-biotecnologico-en-la-degradacion-de-xenobioticos/>

- Aldana, D., Enríquez, M. & Castillo, V. (2022). El Caribe y su contaminación por plásticos. *Ciencia Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*. 73(2), 14-21.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1596–1605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>
- Ankola, K., Mahadevegowda, L., Melichar, T., & Boregowda, M. H. (2021). DNA barcoding: Nucleotide signature for identification and authentication of livestock. En *Advances in Animal Genomics*, 299–308. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820595-2.00018-7>
- Asiandu, A. P., Wahyudi, A., & Sari, S. W. (2022). Aquatic plastics waste biodegradation using plastic degrading microbes. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11(5), 1-10. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.3724>
- Atanasova, N., Stoitsova, S., Paunova-Krasteva, T., & Kambourova, M. (2021). Plastic degradation by extremophilic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms22115610>
- Baldera-Moreno, Y., Pino, V., Farres, A., Banerjee, A., Gordillo, F., & Andler, R. (2022). Biotechnological aspects and mathematical modeling of the biodegradation of plastics under controlled conditions. *Polymers*, 14(3), 375. <https://doi.org/10.3390/polym14030375>
- Bekhedda, A., & Merbouh, M. (2022). Recycling of plastic waste polyethylene terephthalate (PET) as a modifier in asphalt mixture: Study of creep-recovery at

- low, medium, and hot temperatures. *Frattura ed Integrità Strutturale*, 60, 438–450.
<https://doi.org/10.3221/igf-esis.60.30>
- Bernier-Casillas, Y. (2019). *Hexadecane-Degrading Bacteria from the Banks of Caño Martín Peña Canal Suggest Potential Bioremediation Processes* (Order No. 13885924). Available from ProQuest One Academic. (2586468486)
- Bianco, C., Isso, F., & Moskat, M. (2021). *Plásticos en América Latina: Breve reseña de su producción, consumo e impactos ambientales*. No-burn.org. <https://www.no-burn.org/wp-content/uploads/2022/03/Plasticos-en-America-Latina-2022.pdf>
- Biscéré, T., Lorrain, A., Rodolfo-Metalpa, R., Gilbert, A., Wright, A., Devissi, C., Peignon, C., Farman, R., Duvieilbourg, E., Payri, C., & Houlbrèque, F. (2017). Nickel and ocean warming affect scleractinian coral growth. *Marine Pollution Bulletin*, 120(1–2), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.05.025>
- Cai, Z., Li, M., Zhu, Z., Wang, X., Huang, Y., Li, T., Gong, H., & Yan, M. (2023). Biological degradation of plastics and microplastics: A recent perspective on associated mechanisms and influencing factors. *Microorganisms*, 11(7), 1661. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071661>
- Campos Granados, M. (2021). *Biodegradación de plásticos convencionales: Estrategias y perspectivas*. Universidad de Almería. <http://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/13496/CAMPOS%20GRANADOS%2C%20MIGUEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chauhan, D., Agrawal, G., Deshmukh, S., Roy, S. S., & Priyadarshini, R. (2018). Biofilm formation by *Exiguobacterium* sp. DR11 and DR14 alter polystyrene surface

- properties and initiate biodegradation. *RSC Advances*, 8(66), 37590–37599.
<https://doi.org/10.1039/c8ra06448b>
- Chen, Y.L., Lee, C.C., Lin, Y.L., Yin, K.M., Ho, C.L., & Liu, T. (2015). Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*, 16(S18). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-16-s18-s13>
- Chen, X., Wang, L., Zhou, J., Wu, H., Li, D., Cui, Y., & Lu, B. (2017). *Exiguobacterium* sp. A1b/GX59 isolated from a patient with community-acquired pneumonia and bacteremia: genomic characterization and literature review. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 508. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2616-1>
- Chikere, C. B., & Fenibo, E. O. (2018). Distribution of PAH-ring hydroxylating dioxygenase genes in bacteria isolated from two illegal oil refining sites in the Niger Delta, Nigeria. *Scientific African*, 1(e00003), e00003.
<https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2018.e00003>
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- Collard, F., & Ask, A. (2021). Plastic ingestion by Arctic fauna: A review. *The Science of the Total Environment*, 786(147462), 1-14.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147462>
- Comba González, N. B., Montoya Castaño, D., & Montaña Lara, J. S. (2021). Genome sequence of the epiphytic bacteria *Bacillus altitudinis* strain 19_A, isolated from the

- marine macroalga *Ulva lactuca*. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 30(e00634), e00634. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00634>
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
- Church, D. L. (2013). Principles of capillary-based sequencing for clinical microbiologists. *Clinical Microbiology Newsletter*, 35(2), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2012.12.003>
- Daly, P., Cai, F., Kubicek, C. P., Jiang, S., Grujic, M., Rahimi, M. J., Sheteiwy, M. S., Giles, R., Riaz, A., de Vries, R. P., Akcapinar, G. B., Wei, L., & Druzhinina, I. S. (2021). From lignocellulose to plastics: Knowledge transfer on the degradation approaches by fungi. *Biotechnology Advances*, 50(107770), 107770. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107770>
- Das, C. G. A., Kumar, V. G., & Kode, J. (2023). Green nanotechnology approaches using *Mesobacillus jeotgali* ADCG SIST 4 strain synthesized gold nanoparticles for anticancer studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 88(104976), 104976. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104976>
- De Miccolis-Angelini, R. M., Landi, L., Raguseo, C., Pollastro, S., Faretra, F., & Romanazzi, G. (2022). Tracking of diversity and evolution in the brown rot fungi *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, and *Monilinia laxa*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 854852. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.854852>

- Dini, M. R., Nurcholis, M., Ulfah, M., Sabbathini, G. C., Wulandari, S. R., & Helianti, I. (2024). The Potential of *Bacillus altitudinis* B538 and *Alcaligenes faecalis* B947 in PET and PCL Plastic Degradation. *Hayati: Journal of Biosciences*, 31(4), 621–629. <https://doi.org/10.4308/hjb.31.4.621-629>
- Dewey, F. E., Pan, S., Wheeler, M. T., Quake, S. R., & Ashley, E. A. (2012). DNA sequencing: Clinical applications of new DNA sequencing technologies. *Circulation*, 125(7), 931–944. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.972828>
- Dwipa, R., Maneebon, T., Chuaysrinule, C., & Mahakarnchanakul, W. (2022). Interactive inhibition of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* by *Aspergillus oryzae* under fluctuating temperatures. *Microbiology Research*, 13(1), 114-127. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13010009>
- Edmond, C. (2022). *We know plastic pollution is bad – But how exactly is it linked to climate change?* World Economic Forum. <https://www.weforum.org/agenda/2022/01/plastic-pollution-climate-change-solution/>
- Eren, K., Taktakoglu, N., Pirim, I. (2023). DNA sequencing methods: From past to present. *The Eurasian Journal of Medicine*, 54(Supp1), S47–S56. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2022.22280>
- Evode, N., Qamar, S. A., Bilal, M., Barceló, D., & Iqbal, H. M. N. (2021). Plastic waste and its management strategies for environmental sustainability. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 4(100142). <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100142>

- FAO. (2016). *Estado Mundial del Recurso Suelo (EMRS) – Resumen Técnico*.
Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura.
<https://www.fao.org/3/i5126s/i5126s.pdf>
- FAO & PNUMA. (2022). Evaluación mundial de la contaminación del suelo - Resumen para los formuladores de políticas, Roma, Italia. <https://doi.org/10.4060/cb4827es>
- Fesseha, H., & Abebe, F. (2019). Degradation of plastic materials using microorganisms: A review. *Public Health Open Journal*, 4(2), 57–63.
<https://doi.org/10.17140/phoj-4-136>
- Fibriarti, B. L., Feliatra, F., Amin, B., & Darwis, D. (2021). Biodegradation of LDPE plastic by local strain of *Bacillus* sp. isolated from dump soil of Pekanbaru, Indonesia. *Biodiversitas: journal of biological diversity*, 22(12).
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d221232>
- Filippovna, P. I. (2022). Diversity of Alkane-1-Monooxygenase Genes in Actinobacteria of the Genus *Rhodococcus*. *American journal of biomedical science & research*, 16(4), 413–415. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2022.16.002246>
- Flury, M., & Narayan, R. (2021). Biodegradable plastic as an integral part of the solution to plastic waste pollution of the environment. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 30(100490), 100490.
<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100490>
- Gan, J., Ashraf, S. S., Bilal, M., & Iqbal, H. M. N. (2022). Biodegradation of environmental pollutants using catalase-based biocatalytic systems. *Environmental Research*, 214(Pt 2), 113914.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113914>

- Ganesh-Kumar, A., Anjana, K., Hinduja, M., Sujitha, K., & Dharani, G. (2020). Review on plastic wastes in marine environment - Biodegradation and biotechnological solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 150(110733).
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110733>
- Ganesh, & Lin. (2009). Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), 5847–5854.
<https://doi.org/10.5897/ajb09.811>
- García-Benítez, C., Melgarejo, P., Sandin-España, P., Sevilla-Morán, B., & De Cal, A. (2019). Degrading enzymes and phytotoxins in *Monilinia* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 154(2), 305–318. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01657-z>
- Gavriilidou, A., Mackenzie, T. A., Sánchez, P., Tormo, J. R., Ingham, C., Smidt, H., & Sipkema, D. (2021). Bioactivity screening and gene-trait matching across marine sponge-associated bacteria. *Marine Drugs*, 19(2), 75.
<https://doi.org/10.3390/md19020075>
- Geneva Environment Network. (2022). Plastic Pollution Around the World | Plastics and the Environment Series.
<https://www.genevaenvironmentnetwork.org/resources/updates/plastic-pollution-around-the-world/>
- George, A. E., Antia, U. E., Adeleke, A. J., & Fatunla, O. K. (2023). Optimisation of polyhydroxy butyrate production by *Lysinibacillus fusiformis* and *Metabacillus indicus* isolated from spent engine-oil contaminated soil. *UMYU Journal of Microbiology Research (UJMR)*, 8(2), 30–39.
<https://doi.org/10.47430/ujmr.2382.005>

- Goredema, N., Ndowora, T., Shoko, R., & Ngadze, E. (2020). Morphological and molecular characterisation of *Streptomyces* spp. which suppress pathogenic fungi. *African crop science journal*, 28(4), 555–566. <https://doi.org/10.4314/acsj.v28i4.6>
- Guibert, L. M. (2015). *Biodegradación de hidrocarburos alifáticos en sedimentos marinos subantárticos: Estudios poblacionales y metagenómicos*. Universidad Nacional de Rosario. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.
- Habibullah-Al-Mamun, M., Tanima, S. A., Paul, B., Al Zahid, M., Kabir, M. H., Ahmed, S., Mandal, S. C., & Hossain, A. (2022). Occurrence of organochlorine pesticides (OCPs) residues in farmed and wild fish in Bangladesh and implications for human health. *Exposure and Health*. <https://doi.org/10.1007/s12403-022-00501-4>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Helal, E., El-Atti, A. & M. Ekraim, Y. (2018). Harmful effects of water pollution on some physiological responses of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in both Qarun and Burullus Lakes. *Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 72(2), 4021–4025. <https://doi.org/10.21608/ejhm.2018.9092>
- Heshmati, H. (2020). Impact of climate change on life. En *Environmental Issues and Sustainable Development*. IntechOpen.
- Hossain, M., & Patra, P. K. (2020). Water pollution index – A new integrated approach to rank water quality. *Ecological Indicators*, 117(106668). <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106668>

- Huang, S., Wang, H., Ahmad, W., Ahmad, A., Ivanovich Vatin, N., Mohamed, A. M., Deifalla, A. F., & Mehmood, I. (2022). Plastic waste management strategies and their environmental aspects: A scientometric analysis and comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(8), 4556. <https://doi.org/10.3390/ijerph19084556>
- Ibor, O. R., Mpama, N.-O. L., Okoli, C. P., Ogarekpe, D. M., Edet, U. O., Ajang, R. O., Onyezobi, C. E., Anyanti, J., Idogho, O., Aizobu, D., & Arukwe, A. (2023). Occurrence, identification and characterization of plastic pollution from an open solid waste dumpsite in Calabar, Southern Nigeria. *Environmental Advances*, 11(100338), 100338. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100338>
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768–771. <https://doi.org/10.1126/science.1260352>
- Jeon, H. J., & Kim, M. N. (2016). Comparison of the functional characterization between alkane monooxygenases for low-molecular-weight polyethylene biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.06.012>
- Jones, H., Saffar, F., Koutsos, V., & Ray, D. (2021). Polyolefins and polyethylene terephthalate package wastes: Recycling and use in composites. *Energies*, 14(21), 7306. <https://doi.org/10.3390/en14217306>
- Jutinico-Shubach, L. M., Castaño, J. D., Juarez, T., Mariño, M., Gómez-León, J., & Blandón, L. M. (2022). A novel basydiomycete isolated from mangrove swamps in

- the Colombian Caribbean shows promise in dye bioremediation. *Bioremediation Journal*, 26(3), 179–197. <https://doi.org/10.1080/10889868.2021.1964426>
- Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A., & Arya, S. K. (2018). Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.035>
- Khampratueng, P., Rice, D., & Anal, A. K. (2024). Biodegradation of low-density polyethylene by the bacterial strains isolated from the dumping site community. *Discover Applied Sciences*, 6(7). <https://doi.org/10.1007/s42452-024-06052-4>
- Khan, S. I., Zarin, A., Ahmed, S., Hasan, F., Belduz, A. O., Çanakçı, S., Khan, S., Badshah, M., Farman, M., & Shah, A. A. (2022). Degradation of lignin by *Bacillus altitudinis* SL7 isolated from pulp and paper mill effluent. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 85(1), 420–432. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.610>
- Khandelwal, P. (2016, diciembre 2). Factors affecting enzyme activity. A Level Biology. <https://alevelbiology.co.uk/notes/factors-affecting-enzyme-activity/>
- Krueger, M. C., Harms, H., & Schlosser, D. (2015). Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(21), 8857–8874. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6879-4>
- Kuang, S., Fan, X., & Peng, R. (2018). Quantitative proteomic analysis of *Rhodococcus ruber* responsive to organic solvents. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 32(6), 1418–1430. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1533432>

- Kulakov, L. A., Chen, S., Allen, C. C. R., & Larkin, M. J. (2005). Web-type evolution of Rhodococcus gene clusters associated with utilization of naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 1754–1764.
<https://doi.org/10.1128/aem.71.4.1754-1764.2005>
- Kumar, K., & Devi, D. (2019). Biodegradation of low-density polyethylene by selected Bacillus sp. *Gazi University Journal of Science*, 32(3), 802–813.
<https://doi.org/10.35378/gujs.496392>
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 299–306. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn017>
- Kumar, N., Ramirez-Ortiz, D., Solo-Gabriele, H. M., Treaster, J. B., Carrasquillo, O., Toborek, M., Deo, S., Klaus, J., Bachas, L. G., Whittall, D., Daunert, S., & Szapocznik, J. (2016). Environmental PCBs in Guánica Bay, Puerto Rico: implications for community health. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(3), 2003–2013. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4913-9>
- Kumi-Larbi, A., Jnr, Yunana, D., Kamsouloum, P., Webster, M., Wilson, D. C., & Cheeseman, C. (2018). Recycling waste plastics in developing countries: Use of low-density polyethylene water sachets to form plastic bonded sand blocks. *Waste Management*, 80, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.003>
- Kunlere, I. O., Fagade, O. E., & Nwadike, B. I. (2019). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by certain indigenous bacteria and fungi. *The International*

Journal of Environmental Studies, 76(3), 428–440.

<https://doi.org/10.1080/00207233.2019.1579586>

Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. R. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus* – Masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3), 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.04.007>

Lebonah, D. E., Dileep, A., Chandrasekhar, K., Sreevani, S., Sreedevi, B., & Pramoda Kumari, J. (2014). DNA barcoding on bacteria: A review. *Advances in Biology*, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2014/541787>

Leighton, R. E., Correa Vélez, K. E., Xiong, L., Creech, A. G., Amirichetty, K. P., Anderson, G. K., Cai, G., Norman, R. S., & Decho, A. W. (2022). *Vibrio* parahaemolyticus and *Vibrio vulnificus* in vitro colonization on plastics influenced by temperature and strain variability. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1099502. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1099502>

Lima, S. D., Oliveira, A. F., Golin, R., Lopes, V. C. P., Caixeta, D. S., Lima, Z. M., & Morais, E. B. (2020). Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 80(2), 354–361. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.208611>

Lloyd, J. (2022). PPE, plastics, and the environment: A cautionary note. *Australian Nursing & Midwifery Journal*, 27(7), 11.

Loaiza, D. (2022). Análisis de la aplicación de microorganismos para la degradación de plásticos. Fundación Universidad De América, [Tesis].

<https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8964/1/553555-2022-1-GA.pdf>

- Luise, D., Bosi, P., Raff, L., Amatucci, L., Viridis, S., & Trevisi, P. (2022). *Bacillus* spp. Probiotic strains as a potential tool for limiting the use of antibiotics, and improving the growth and health of pigs and chickens. *Frontiers in Microbiology*, 13(801827), 1-19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.801827>
- Maganhotto de Souza Silva, C. M., Soares de Melo, I., & Roberto de Oliveira, P. (2005). Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(3), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.007>
- Mahalingam, P. & Sampath, N. (2014). Optimization of growth condition for diesel oil degrading bacterial strains. *Advances in Applied Science Research*, 5(6), 91-96.
- Margeta, A., Šabalja, Đ., & Đorđević, M. (2021). The presence and danger of microplastics in the oceans. *Journal of Maritime Studies*, 35(2), 224–230. <https://doi.org/10.31217/p.35.2.4>
- Maroof, L., Khan, I., Yoo, H. S., Kim, S., Park, H.-T., Ahmad, B., & Azam, S. (2020). Identification and characterization of low density polyethylene-degrading bacteria isolated from soils of waste disposal sites. *Environmental Engineering Research*. <https://doi.org/10.4491/eer.2020.167>
- Martínez-Ruiz, M., Molina-Vázquez, A., Santiesteban-Romero, B., Reyes-Pardo, H., Villaseñor-Zepeda, K. R., Meléndez-Sánchez, E. R., Araújo, R. G., Sosa-Hernández, J. E., Bilal, M., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldivar, R. (2022). Microalgae assisted green bioremediation of water pollutants rich leachate and source

products recovery. *Environmental Pollution*, 306(119422).

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119422>

Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011). Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 11(5), 789–797. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>

Maurya, P. K., Ali, S. A., Ahmad, A., Zhou, Q., da Silva Castro, J., Khane, E., & Ali, A. (2020). An introduction to environmental degradation: Causes, consequence and mitigation. En *Environmental Degradation: Causes and Remediation Strategies* (pp. 1–20). Agro Environ Media - Agriculture and Ennvironmental Science Academy, Haridwar, India.

Morey, M., Fernández-Marmiesse, A., Castiñeiras, D., Fraga, J. M., Couce, M. L., & Cocho, J. A. (2013). A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. *Molecular Genetics and Metabolism*, 110(1–2), 3–24. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.04.024>

Munir, E., Sipayung, F.C., Priyani, N. & Suryanto, D. (2018). Potential of bacteria isolated from landfill soil in degrading low density polyethylene plastic. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 126, 1-8. doi:10.1088/1755-1315/126/1/012144

Murab, T., Gothwal, R. & Tripathi, N. (2021). Poly-hydroxyalkanoates (Pha): Biological competition to plastic world. *Journal of Advanced Scientific Research*, 12, 34-43. <https://doi.org/10.55218/ASR.s12021121sup202>

- Muriel-Millán, L. F., Rodríguez-Mejía, J. L., Godoy-Lozano, E., Rivera-Gómez, N., Gutierrez-Rios, R., Morales-Guzmán, D., Trejo-Hernández, M., R., Estradas-Romero, A., & Pardo-López, L. (2019). Functional and Genomic Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Strain Isolated From the Southwestern Gulf of Mexico Reveals an Enhanced Adaptation for Long-Chain Alkane Degradation. *Frontiers in Marine Science*, <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00572>
- Nademo, Z. M., Shibeshi, N. T., & Gemed, M. T. (2023). Isolation and screening of low-density polyethylene (LDPE) bags degrading bacteria from Addis Ababa municipal solid waste disposal site “Koshe”. *Annals of Microbiology*, 73(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01711-0>
- National Centers for Coastal Ocean Science. (2017). Baseline assessment of Guanica Bay, Puerto Rico in support of watershed restoration. NCCOS Coastal Science Website. <https://coastalscience.noaa.gov/project/baseline-assessment-guanica-bay-puerto-rico/>
- Nedi, E. G., Ebu, S. M., & Somboo, M. (2024). Identification and molecular characterization of Polyethylene degrading bacteria from garbage dump sites in Adama, Ethiopia. *Environmental Technology & Innovation*, 33(103441), 103441. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103441>
- Novarini, Kurniawan, S., Rusdianasari, & Bow, Y. (2021). Waste-to-Energy (WTE) method to mitigate harmful environmental and health consequences due to LDPE plastic waste. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science*, 810(1), 012014. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/810/1/012014>

- Obi, L. U., Atagana, H. I., & Adeleke, R. A. (2016). Isolation and characterization of crude oil sludge degrading bacteria. *SpringerPlus*, 5(1946), 1-13.
<https://doi.org/10.1186/s40064-016-3617-z>
- OECD. (2022). *Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options*, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/de747aef-en>
- Park, J.-W., & Crowley, D. E. (2006). Dynamic changes in nahAc gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(6), 1322–1329.
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0423-5>
- Pattiaratchi, C., van der Mheen, M., Schlundt, C., Narayanaswamy, B. E., Sura, A., Hajbane, S., White, R., Kumar, N., Fernandes, M., & Wijeratne, S. (2022). Plastics in the Indian Ocean – Sources, transport, distribution, and impacts. *Ocean Science*, 18(1), 1–28. <https://doi.org/10.5194/os-18-1-2022>
- Perera, M., Wijesundera, S., Wijayarathna, C. D., Seneviratne, G., & Jayasena, S. (2022). Identification of long-chain alkane-degrading (LadA) monooxygenases in *Aspergillus flavus* via in silico analysis. *Frontiers in Microbiology*, 13, 898456.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.898456>
- Phelan, A. (anya), Meissner, K., Humphrey, J., & Ross, H. (2022). Plastic pollution and packaging: Corporate commitments and actions from the food and beverage sector. *Journal of Cleaner Production*, 331(129827), 129827.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129827>

- Pischedda, A., Tosin, M., & Degli-Innocenti, F. (2019). Biodegradation of plastics in soil: The effect of temperature. *Polymer Degradation and Stability*, 170(109017), 109017. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2019.109017>
- Purohit, J., Chattopadhyay, A., & Teli, B. (2020). Metagenomic exploration of plastic degrading microbes for biotechnological application. *Current Genomics*, 21(4), 253–270. <https://doi.org/10.2174/1389202921999200525155711>
- Rhodes, C. J. (2018). Plastic pollution and potential solutions. *Science Progress*, 101(3), 207–260. <https://doi.org/10.3184/003685018X15294876706211>
- Ritchie, H., & Roser, M. (2018). Plastic Pollution. *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/plastic-pollution>
- Rodrigues - da Luz, J. M., Días-Nunes, M., Albino-Paes, S., Pereira-Torres, D. P., Soares da Silva, M., & Megumi-Kasuya, M. C. (2012). Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1508–1515. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400035>
- Rodríguez-Carreón, A., Ortiz-Rivera, Y., Hernández-Peña, C. C., & Figueroa, C. (2021). Biodegradación de espumas plásticas por larvas de insectos: ¿Una estrategia sustentable? *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24, 1-10. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.311>
- Rodríguez-Gonzales, A., Zárate-Villarroe, S. G., & Bastida-Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), 178–208. <https://doi.org/10.15359/rca.56-1.9>

- Ruginescu, R., Lavin, P., Iancu, L., Menabit, S., & Purcarea, C. (2022). Bioprospecting for novel bacterial sources of hydrolytic enzymes and antimicrobials in the Romanian littoral zone of the Black Sea. *Microorganisms*, 10(12), 2468.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10122468>
- Sambolín Pérez, C. A., Aybar Batista, R., Morales Marrero, S., Andino Santiago, D., Reyes Colón, A., Negrón Berríos, J. A., Núñez Marrero, Á., & Arun, A. (2023). Biochemical and molecular characterization of *Musa* sp. Cultured in temporary immersion bioreactor. *Plants*, 12(21), 3770.
<https://doi.org/10.3390/plants12213770>
- Santos, R. G., Machovsky-Capuska, G. E., & Andrades, R. (2021). Plastic ingestion as an evolutionary trap: Toward a holistic understanding. *Science*, 373(6550), 56–60.
<https://doi.org/10.1126/science.abh0945>
- Sarker, R. K., Paul, P., Das, S., Chatterjee, S., Chakraborty, P., & Tribedi, P. (2021). Exploration of strategies for the enhanced biodegradation of Low-density polyethylene (LDPE) by A soil bacterium *Enterobacter cloacae* AKS7. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 15(3), 1266–1278.
<https://doi.org/10.22207/jpam.15.3.16>
- Sarkhel, R., Sengupta, S., Das, P., & Bhowal, A. (2020). Comparative biodegradation study of polymer from plastic bottle waste using novel isolated bacteria and fungi from marine source. *Journal of Polymer Research*, 27(16).
<https://doi.org/10.1007/s10965-019-1973-4>
- Sherri, M. (2021). Plastic, plastic Everywhere: Why microplastics are a mega problem. *Nutrition Action Health Letter*, 48(3), 8-10.

- Shilpa, Basak, N., & Meena, S. (2022). Microbial biodegradation of plastics: Challenges, opportunities, and a critical perspective. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 16(12), 1-22. <https://doi.org/10.1007/s11783-022-1596-6>
- Shokr, A., Abd-El salam, O., Hamedo, H., & Elshafey, N. (2023). Isolation and identification of Polyhydroxybutyrate (PHB)-producing microorganisms from various sources in North Sinai. *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*, 27(1), 23–31. <https://doi.org/10.21608/cat.2023.295260>
- Shrestha, A. (2022). Sanger sequencing method: Principle and steps. Microbe Online. <https://microbeonline.com/dna-sequencing-sanger-sequencing-method/>
- Singh, D., & Chen, S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(3), 399–417. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1706-9>
- Smith, C. B., Tolar, B. B., Hollibaugh, J. T., & King, G. M. (2013). Alkane hydroxylase gene (alkB) phylotype composition and diversity in northern Gulf of Mexico bacterioplankton. *Frontiers in Microbiology*, 4, 370. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00370>
- Son, H. F., Cho, I. J., Joo, S., Seo, H., Sagong, H.-Y., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K.-J. (2019). Rational protein engineering of Thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation. *ACS Catalysis*, 9(4), 3519–3526. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b00568>
- Soriano-Ortega, B. (2020). Biodegradación de plásticos en ambientes naturales. e_BUAH. Biblioteca digital Universidad de Alcalá.

- Srikanth, M., Sandeep, T. S. R. S., Sucharitha, K., & Godi, S. (2022). Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(42). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00532-4>
- Sriyapai, P., Chansiri, K. & Sriyapai, T. (2018). Isolation and characterization of polyester-based plastics-degrading bacteria from compost soils. *Microbiology*, 87(2), 290-300. <https://doi.org/10.1134/S002626171802015>
- Subramaniam, S., Velu, G., Palaniappan, M., & Jackson, K. M. (2023). Decolourization of azo dyes using immobilized bacterial isolates from termite mound ecosystem. *Total Environment Research Themes*, 6(100041), 100041. <https://doi.org/10.1016/j.totert.2023.100041>
- Suresh, K., Prabakaran, S. R., Sengupta, S., & Shivaji, S. (2004). *Bacillus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium isolated from an aquifer in West Bengal, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 4), 1369–1375. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.03047-0>
- Tamargo, A., Molinero, N., Reinosa, J. J., Alcolea-Rodriguez, V., Portela, R., Bañares, M. A., Fernández, J. F., & Moreno-Arribas, M. V. (2022). PET microplastics affect human gut microbiota communities during simulated gastrointestinal digestion, first evidence of plausible polymer biodegradation during human digestion. *Scientific Reports*, 12(528), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04489-w>
- Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., & Oda, K. (2016). *Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly (ethylene terephthalate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(8), 2813–2818. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001058>

- Tekman, M. B., Walther, B. A., Peter, C., Gutow, L., & Bergmann, M. (2022). *Impacts of plastic pollution in the oceans on marine species, biodiversity and ecosystems*. 1-221, WWF Germany, Berlin. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.5898683>
- Temporiti, M. E. E., Nicola, L., Nielsen, E., & Tosi, S. (2022). Fungal enzymes involved in plastics biodegradation. *Microorganisms*, 10(6), 1180. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061180>
- Thermo Scientific. (2024). Evaluating DNA Purity for Molecular Cloning Quality Control. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Application-Notes/nanodrop-lite-plus-molecular-an-1502693.pdf>
- UNEP. (2022). *Plastic pollution*. UNEP - UN Environment Programme. <https://www.unep.org/plastic-pollution>
- United States Environmental Protection Agency. (2022). Learn about polychlorinated biphenyls (PCBs). <https://www.epa.gov/pcbs/learn-about-polychlorinated-biphenyls-pcbs>
- Van Kleunen, M., Brumer, A., Gutbrod, L., & Zhang, Z. (2020). A microplastic used as infill material in artificial sport turfs reduces plant growth. *Plants People Planet*, 2(2), 157–166. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10071>
- Vettath, V. K., Junqueira, A. C. M., Uchida, A., Purbojati, R. W., Houghton, J. N. I., Chénard, C., Drautz-Moses, D. I., Wong, A., Kolundžija, S., Clare, M. E., Lau, K. J. X., Gaultier, N. E., Heinle, C. E., Premkrishnan, B. N. V., Gusareva, E. S., Acerbi, E., Yang, L., & Schuster, S. C. (2017). Complete genome sequence of *Bacillus altitudinis* type strain SGAir0031 isolated from tropical air collected in Singapore. *Genome Announcements*, 5(45). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01260-17>

- Viljakainen, V. R., & Hug, L. A. (2021). New approaches for the characterization of plastic-associated microbial communities and the discovery of plastic-degrading microorganisms and enzymes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 6191–6200. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.11.023>
- Wang, P., Shen, C., Cong, Q., Xu, K., & Lu, J. (2021). Enzyme-catalyzed biodegradation of penicillin fermentation residues by β -lactamase OtLac from *Ochrobactrum tritici*. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01606-2>
- Wang, R.-F., Cao, W.-W., & Cerniglia, C. E. (1997). A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 83(6), 727–736. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00300>
- WHO. (2022). Air pollution. In Compendium of WHO and other UN guidance on health and environment. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/tools/compendium-on-health-and-environment#:~:text=The%20Compendium%20is%20a%20comprehensive,about%20health%20and%20environment%20interventions.>
- Willard-Stepan, M., Fong, A., & Sabaa, Y. (2021). Changing climate change: Examining efficacy of community based initiatives and micro-scale climate action. *McGill Science Undergraduate Research Journal*, 16(1), 88–91. <https://doi.org/10.26443/msurj.v16i1.66>
- Wise, S. S., Xie, H., Fukuda, T., Douglas Thompson, W., & Wise, J. P. (2014). Hexavalent chromium is cytotoxic and genotoxic to hawksbill sea turtle cells.

Toxicology and Applied Pharmacology, 279(2), 113–118.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.008>

Yang, F., Ding, F., Chen, H., He, M., Zhu, S., Ma, X., Jiang, L., Li, H. (2018). DNA barcoding for the identification and authentication of animal species in traditional medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-19.

<https://doi.org/10.1155/2018/5160254>

Yoon, M., Jeon, H., & Kim, M. (2012). Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and AlkB cloned recombinant cell. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 03(145), 1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000145>

Zhang, D., Xu, H., Gao, J., Portieles, R., Du, L., Gao, X., Borroto Nordelo, C., & Borrás-Hidalgo, O. (2021). Endophytic *Bacillus altitudinis* strain uses different novelty molecular pathways to enhance plant growth. *Frontiers in Microbiology*, 12, 692313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.692313>

Zhao, S., Wang, C., Bai, B., Jin, H., & Wei, W. (2022). Study on the polystyrene plastic degradation in supercritical water/CO₂ mixed environment and carbon fixation of polystyrene plastic in CO₂ environment. *Journal of Hazardous Materials*, 421(126763). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126763>

Zhong, X., Zhao, X., Qian, Y., & Zou, Y. (2018). Polyethylene plastic production process. *Insight - Material Science*, 1(1), 1. <https://doi.org/10.18282/ims.v1i1.104>

Apéndice 1: Contigs utilizados en la investigación

>*Metabacillus indicus*

TTAGGCGGCTGGCTCCTTGCGGTTACCCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGT
GTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGCAGGCG
AGTTGCAGCCTGCAATCCGAACCTGAGAATGGTTTTATGGGATTGGCTAAACCTCGCGGTCTCGCAGCCCTTTGT
ACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCYTCCTCC
SGTTTGTACCGGCAGTCACYTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGTCCCCGAAGGG
GAACCTTCTATCTCTAGAAGTGGCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACC
ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTTCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGG
AGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCG
CCTTCGCCACTGGTGTCTCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGC
ACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAACGCC
TGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGCTAGT
TAGCCGTGGCTTTCTGGTCAGGTACCGTCAAGGTGCCGGCAGTTACTCCGGCACTTGTTCTTCCCTGACAACAG
AGTTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTTCGTCCATTGCGGAAGATTC
CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGGCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTGCGGT
ACGCATCGTCGCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTGTAAGTGACAGC
CGAAACCGTCTTTGAATGTCAAACCATGCGGTTTGACATAGTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTAT
CCCAGTCTTACAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGTGACCTCCGAAGAGGTCCGCTCGACT
GCANGTNTNG

>*Mesobacillus jeotgali*

CNATACNTGCAGTCGAGCGGATCTTCATTAGCTTGCTTTTGAAGATCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTCCCTCTCATGAG
GGAAAGCTGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACG
GCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
AAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTA
CCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAAGTCTGATNNNNNNNNCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC
ATTGGAAACTGGGGAACCTTGAKKGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGNGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTG
CTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCNTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG
ACAACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCACTCT
AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGATGGAACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGAGCCAATCCCATAAATCCATTCTC
AGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT
GAATACGTTCGCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGGTA
ACCNNNNNAGCCAGCCGCCTAA

>*Bacillus altitudinis*

GNNCTANNCTGCAGTCNAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT
GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTTCTTGAACCGCATG
GTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAG
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA

TGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGG
TACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCANGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGT
CATTGGAAACTGGGAAACTTGRSTGCAGAAGARGARAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAANNCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCCGTTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCNNTA
GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCT
CTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTC
TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCACAAATCTGTTCT
CAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGG
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGT
AACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGA

>Exiguobacterium sp.

GNNNNNNNATACTGCAGTCGAGCGCAGGAAACCGTCTGAACCCTTCGGGGGGACGACGGCGGAATGAGCGGCGGA
CGGGTGAGTAACACGTAAAGAACCTGCCCATAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGT
GTCATCGGACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCT
AGTTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAA
CGCCCGCTGAACGATGAAGGCTTTTCGGGTCTGTAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTCCCGCAGGCAATGG
CGGCACCTTGACGGTACCTTGCGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGC
TCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTTGAGTATAGGAGAGAAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGA
AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGG
TTYCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAA
CTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCTTCGGGGGACAGGGGTGACAGGTGGTGCATGGT
TGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCA
TTTAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGAGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATC
CCAGAAAGCCGTTCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAG
GTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACC
CGAAGTCGGTGAGGTAACCGTAAGGAGCCAGCCGCCGAANNNGC

>Exiguobacterium sp. CNJ771 PL04

GNNNCNANNNTGCAGTCGAGCGCAGGAAACCGTCTGAACCCTTCGGGGGGACGACGGCGGAATGAGCGGCGGAC
GGGTGAGTAACACGTAAAGAACCTGCCCATAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGTG
TCATCGGACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTA
GTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAAC
GCCGCGTGAACGATGAAGGCTTTTCGGGTCTGTAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTCCCGCAGGCAATGGC
GGCACCTTGACGGTACCTTGCGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTC
AACCAGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGANGCTTGAGTATAGGAGAGAAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAMCACCAGTGGCGAARGCGACTCTTTGGCCTATAACTGACGCTGAAGGCGCGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCNGGTAGNCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTT
TCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAA
GGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAACT

CTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGGGCAGGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTG
TCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCATT
CAGTTGGGCACTCTAGGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGAGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCC
AGAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGT
CAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCG
AAGTCGGTGAGGTAACCGTAAGGAGCCAGCCGCCGAANNNG

>Bacillus sp. (in: firmicutes)

GGNNNNCNATACNTGCAGTCGAGCGGANCTCTTCGGAGGTGACGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACC
TGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACTATGTCAAACCGCATGGTTTGACA
TTCAAAGACGGTTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCAC
CAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTGCCGGAGTAAGTGC CGGCGCCTTGACGGTACCTGAC
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
AGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGC
TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGCCACTTC
TAGAGATAGAAGGTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTGAGTCTGTGCTGAGA
TGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGA
CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGG
ATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCGCAA
GGAGCCAGCCGCCTA