

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



**EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD
POR ACCIÓN DE UNA BACTERIA ANTÁRTICA**

**PLAN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO/A
EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR/A:

CLARA ALEXANDRA PAZOS MORILLO

DIRECTOR:

ING. CARLA SANDOVAL, MSc.

**Ibarra – Ecuador
2022**



FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES

**CERTIFICACIÓN TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Ibarra, 28 de noviembre del 2022

Para los fines consiguientes, una vez revisado el documento en formato digital el trabajo de titulación: "EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD POR ACCIÓN DE UNA BACTERIA ANTÁRTICA", de autoría de la Srta. Clara Alexandra Pazos Morillo estudiante de la Carrera de **INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA** el tribunal tutor **CERTIFICAMOS** que el/la autor/a o autores han procedido a incorporar en su trabajo de titulación las observaciones y sugerencia realizadas por este tribunal.

Atentamente,

TRIBUNAL TUTOR

FIRMA

Ing. Carla Sandoval, MSc.
DIRECTOR TRABAJO TITULACIÓN

Ing. Tania Oña, MSc.
MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

Blgo. Sania Ortega, MSc
MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

Misión Institucional:

Contribuir al desarrollo educativo, científico, tecnológico, socioeconómico y cultural de la región norte del país. Formar profesionales críticos, humanistas y éticos comprometidos con el cambio social.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1003135652		
APELLIDOS Y NOMBRES:	PAZOS MORILLO CLARA ALEXANDRA		
DIRECCIÓN:	HUERTOS FAMILIARES CALLE 13 DE ABRIL Y GUAYAS 2-80		
EMAIL:	capazosm@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	062546904	TELÉFONO MÓVIL:	0939736542

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD POR ACCIÓN DE UNA BACTERIA ANTÁRTICA
AUTOR (ES):	PAZOS MORILLO CLARA ALEXANDRA
FECHA:	29 DE NOVIEMBRE DEL 2022
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA
ASESOR /DIRECTOR:	ING. CARLA SANDOVAL, MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 29 días del mes de noviembre del 2022

EL AUTOR



.....
Clara Alexandra Pazos Morillo

C.I.: 1003135652

PRESENTACIÓN

Yo, CLARA ALEXANDRA PAZOS MORILLO como autor(a) de la Tesis Titulada **“EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD POR ACCIÓN DE UNA BACTERIA ANTÁRTICA”**, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

AGRADECIMIENTO

Con la humildad eterna de un ser humano consciente, con el verdadero cariño nunca perdido; y con la acrisolada gratitud en mi corazón guardada; agradezco:

- Al creador del universo por darme la oportunidad y la fuerza para cumplir con mis sueños y obtener mis logros.
- A cada uno de los miembros de mi familia por su constante ayuda y motivación para culminar con éxito esta etapa de mi vida.
- Mi profundo agradecimiento a la Universidad Técnica del Norte por abrirme las puertas y brindarme el conocimiento intelectual y humano, haciendo de mí un elemento positivo para la sociedad a la cual nos debemos y pertenecemos.
- A la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA), a la carrera de Ingeniería en Biotecnología, al Laboratorio de Investigaciones Ambientales (LABINAM) y al laboratorio de Biotecnología Vegetal, por su confianza y compromiso en la enseñanza integral en todo el proceso de investigación.
- A la experiencia profesional de mi directora Ing. Carla Sandoval, MSc. y mis asesores: Blgo. Sania Ortega, MSc., Ing. Tania Oña MSc. y Blgo. Miguel Ángel Gualoto, PhD por su dirección, conocimiento y enseñanza que me permitió desenvolverme de mejor manera en el desarrollo y culminación de todo mi trabajo emprendido; y
- A mis ejemplares docentes que fueron el faro guía de mi vida para alcanzar mis objetivos propuestos.

DEDICATORIA

Cuando en el cíclico transcurrir de mi existencia, estoy llegando a la meta propuesta y quiero pedirle al creador omnipotente me conceda la inspiración de poeta, con las palabras más bellas que de mi corazón broten. Estructurar con ellas, el pedestal más grande de cariño y gratitud, a quienes contribuyeron al cumplimiento de una felicidad forjada con grandes y sublimes emociones, para alcanzar mis claros objetivos de superación para el futuro. Entonces con el superlativo respeto y reverencia, la ofrenda de mi tesis, ramillete de: estudios, esfuerzo y constancia, dedico:

- Al abnegado esfuerzo de mis padres: “Martha y Jorge”, expresión de anhelos en pro de risueños laureles de esperanza para sus hijos.
- A mis inolvidables hermanos: Patricio, Henry y Jorge, quienes con su ejemplo y apoyo me ayudaron día a día a seguir adelante y cristalizar mis metas.
- Al escritor Juan F. Ruales, amigo incondicional, que con sus enseñanzas dejó en mí una gran motivación para nunca rendirme.
- A toda mi familia por su apoyo y amistad, haciendo que me revista de un alto grado de espiritualidad para recordar el pasado, vivir el presente y forjar el futuro de mi vida, esfuerzo y dedicación; y
- A todo aquello que el tiempo se llevó, lo grabo en el pergamino del recuerdo y lo guardo en el cofre de mi corazón sensible a la gratitud.

"Distancia mas no es el tiempo, tan lejos en las estrellas

te fuiste mientras caía, volando sin decir adiós.

Anhelo que tengo envuelto de lianas rojas en llamas,

espera que el sol se apague y me veraz nuevamente”.

Alexandra Pazos Morillo

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
CAPÍTULO I	15
INTRODUCCIÓN	15
1.1 Antecedentes	15
1.2 Planteamiento del problema.....	16
1.3 Justificación.....	19
1.4 Pregunta directriz	21
1.5 Objetivos	21
1.5.1 Objetivo general	21
1.5.2 Objetivos específicos.....	21
1.6 Hipótesis.....	21
CAPÍTULO II	22
2 MARCO TEÓRICO	22
2.1 Contaminación por plásticos	22
2.1.1 Composición de los plásticos.....	22
2.1.2 Clasificación de los plásticos	23
2.1.3 Manejo de residuos plásticos	24
2.1.4 Tratamientos fisicoquímicos.....	24
2.1.5 Tratamientos biológicos.....	25
2.1.6 Estado actual de la contaminación por plásticos a nivel mundial.....	25
2.1.7 Problemática de la contaminación por plásticos en el Ecuador	26
2.2 Biodegradación de plásticos.....	27
2.2.1 Microorganismos aplicados a la biodegradación.....	27
2.2.2 Procesos de biodegradación	29

2.3	Microorganismos extremófilos como biodegradadores de plástico	31
2.3.1	Tipos de microorganismos extremófilos.....	32
2.3.2	La Antártida como fuente de microorganismos extremófilos.....	34
2.4	Caracterización de microorganismos con potencial aplicación en la biotecnología ambiental	34
2.4.1	Técnicas moleculares	34
2.5	Técnicas de la biodegradación de plásticos.....	35
2.5.1	Método estándar de Observación visual	35
2.5.2	Método estándar de Medición de pérdida de peso.....	37
2.5.3	Método estándar de Cambios de propiedades mecánicas y la masa molar.....	38
2.5.4	Método estándar de Evolución de CO ₂	38
2.5.5	Método estándar de Radiolabeling.....	39
2.5.6	Método estándar de Compostaje controlado.....	40
CAPÍTULO III.....		42
3	METODOLOGÍA.....	42
3.1	Descripción del Área de estudio.....	42
3.1.1	Muestreo	42
3.1.2	Conservación del material biológico	43
3.2	Caracterización del microorganismo antártico.....	43
3.2.1	Caracterización morfológica.....	43
3.2.2	Caracterización molecular de la bacteria.....	43
3.3	Pretratamiento al Polietileno	44
3.4	Diseño del biorreactor	46
3.4.1	Cinética de crecimiento	47
3.4.2	Emisión de CO ₂	49
3.5	Análisis de los cambios del polietileno	50
3.6	Análisis de datos, diseño de las variables de evaluación	52
CAPÍTULO IV.....		54
4	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	54
4.1	Identificación de microorganismo antártico.....	54
4.1.1	Identificación morfológica	54
4.1.2	Identificación molecular	55
4.2	Evaluación de pretratamientos al polietileno	56

4.3	Cinética de crecimiento bacteriano	58
4.4	Degradación de Polietileno	63
4.4.1	Pérdida de peso después de la degradación biológica	63
4.4.2	Cuantificación de CO ₂	66
4.4.3	Análisis microscópico del polímero	70
4.4.4	Análisis F-TIR de la estructura química del polietileno.....	71
CAPÍTULO V		74
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		74
5.1	Conclusiones	74
5.2	Recomendaciones.....	75
REFERENCIAS		77
ANEXOS		95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Tipos de bolsas usadas por los hogares para realizar sus compras.	17
Figura 2.	Estadística de Recaudación del Impuesto Redimible de Botellas Plásticas no retornables.....	18
Figura 3.	Estimación del peso de la biomasa y la masa antropogénica.. ..	19
Figura 4.	Clasificación de los tipos de plásticos.....	23
Figura 5.	Inadecuada disposición de los residuos plásticos a nivel mundial.....	26
Figura 6.	Etapas de la degradación microbiana de un material plástico.....	31
Figura 7.	Tipos de bacterias del norte del Frente Circumpolar Antártico Sur (SACCF).	32
Figura 8.	Ubicación general de la zona donde se obtuvo el material biológico	42
Figura 9.	Diseño de Esquema para el proceso de degradación de polietileno de baja densidad..46	
Figura 10.	Esquema del diseño experimental de bloques completo al azar en un arreglo factorial AXB	53
Figura 11.	Caracterización morfológica	54
Figura 12.	(A) Crecimiento bacteriano a partir de OD _{600nm} y (B) Recuento de células viables (UFC/ml) en medio Bushnell Hass Broth modificado con polietileno de baja densidad oxobiodegradable (LDPE ox) pretratado.	59
Figura 13.	Pérdida de peso del plástico pretratado en un biorreactor batch con <i>A. jonhsonii</i>	64
Figura 14.	CO ₂ liberado calculado mediante el Método Respirométrico (A) y la Absorbancia de fenolftaleína (B).	66
Figura 15.	Imágenes de las películas de plástico después de 52 días de degradación biológica en un biorreactor batch	71
Figura 16.	Espectro infrarrojo de las muestras plásticas después de la degradación biológica... 72	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Composición y estructura química de los plásticos sintéticos.....	22
Tabla 2	Degradación microbiana en polímeros plásticos.....	28
Tabla 3	Técnicas aplicadas en el método de observación visual.....	35
Tabla 4	Técnicas aplicadas en la pérdida de peso.....	37
Tabla 5	Técnicas aplicadas para determinar los cambios de propiedades mecánicas y la masa molar.....	38
Tabla 6	Técnicas aplicadas en el método de evolución de CO ₂	39
Tabla 7	Técnica aplicada en Radiolabeling.....	40
Tabla 8	Técnicas aplicadas en el compostaje controlado.....	40
Tabla 9	Composición de la muestra para análisis de PCR.....	44
Tabla 10	Pretratamientos aplicados al polietileno de baja densidad oxobiodegradable.....	45
Tabla 11	Condiciones generales para la recepción de ensayos en el laboratorio.....	52
Tabla 12	Tratamiento en el estudio de análisis de crecimiento bacteriano y la degradación del plástico.....	53
Tabla 13	Resumen de la caracterización molecular bacteriana.....	56
Tabla 14	Pérdida de peso de plástico después de la aplicación de pretratamientos.....	58
Tabla 15	Tasa de crecimiento y rendimiento de la biomasa.....	61
Tabla 16	Tasa de crecimiento bacteriano, tiempo de duplicación y coeficiente de correlación múltiple de <i>A. johnsonii</i>	62
Tabla 17	Tasa de degradación, Tasa de consumo del sustrato y tiempo de vida media del polietileno de baja densidad oxobiodegradable.....	65
Tabla 18	Liberación de CO ₂ durante el periodo de incubación mediante el método de titulación.....	67
Tabla 19	Velocidad de producción, tasa de producción y rendimiento de CO ₂	69

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Protocolo de Aislamiento bacteriano	95
Anexo 2.	Protocolo de Tinción de Gram	98
Anexo 3.	Protocolo de Identificación Molecular.....	101
Anexo 4.	Protocolo de Pretratamiento Tween 80.....	108
Anexo 5.	Protocolo de Peso seco.....	110
Anexo 6.	Protocolo de Diseño del biorreactor.....	112
Anexo 7.	Protocolo de Conteo en Placa	115
Anexo 8.	Protocolo de Titulación ácido-base.....	118
Anexo 9.	Protocolo de Preparación de SDS	120
Anexo 10.	Observación del gel electroforesis de las amplificaciones de PCR	122
Anexo 11.	Peso del plástico antes y después de la aplicación de pretratamientos	123

Anexo 12. (A) Crecimiento bacteriano a partir de OD _{600nm} y (B) Recuento de células viables de UFC/ml de los tratamientos, en medio Bushnell Hass Broth modificado con polietileno de baja densidad oxobiodegradable (LDPE ox) pretratado.....	123
Anexo 13. Relación de OD _{600nm} y UFC/ml de la cepa bacteriana <i>A. johnsonii</i>	124
Anexo 14. Crecimiento de <i>A. johnsonii</i> en los distintos tratamientos evaluados	125
Anexo 15. Peso del plástico antes y después del ingreso al biorreactor	126
Anexo 16. Valores de HCl de la titulación	126
Anexo 17. Datos de medición de absorbancia de fenolftaleína.....	126
Anexo 18. Curva estándar de la absorbancia de fenolftaleína.....	127
Anexo 19. Datos de la Concentración de NaOH	127
Anexo 20. Grupos funcionales de las muestras plásticas después de la degradación biológica	128
Anexo 21. Espectro infrarrojo de transmitancia de las muestras plásticas después de la degradación biológica	129

RESUMEN

El incremento de la población y el desarrollo industrial han generado una gran cantidad de desechos plásticos, volviéndose un problema debido a que, hasta el momento no existe un proceso de gestión de los desechos plásticos que no sea tóxico para el ambiente y la salud humana. En esta investigación, se evaluó la degradación de polietileno de baja densidad oxobiodegradable (LDPE ox), utilizando una bacteria extremófila aislada en la Antártida (*Acinetobacter johnsonii*). Inicialmente, previo a ingresar al biorreactor, se aplicó pretratamientos al polietileno. La degradación del plástico fue evaluada mediante un biorreactor, donde se midió la cinética de crecimiento bacteriana por espectrofotometría y conteo en placa; y la cantidad de CO₂ liberado mediante el método respirométrico. Los cambios del plástico fueron analizados mediante diversas técnicas que incluye peso seco, análisis microscópico y espectroscopía infrarroja (FTIR). De los pretratamientos evaluados en el plástico, el que tuvo mejor efecto fue de luz UV ya que se obtuvo una disminución de peso promedio de $8,41 \pm 0,02$ ^c %. La cinética de crecimiento reveló, que la bacteria alcanzó un rápido crecimiento en el medio que contenía plástico pretratado con Tween 80, mostrando una reducción de peso del plástico de $20,31 \pm 0,12$ ^f % y la liberación de CO₂ más alta de todos los tratamientos, con una media de $190,23 \pm 4,53$ ^b mg/L. Se concluyó que la cepa *A. johnsonii* presentó capacidad en la degradación de plástico, a pesar de tener índices bajos, es significativa la reducción del peso.

Palabras claves: Degradación biológica, polietileno, oxobiodegradable, pretratamientos, respirométrico, bacteria antártica.

ABSTRACT

Population increase and industrial development have generated a large amount of plastic waste, becoming a problem because so far, there is no plastic waste management process that is not toxic to the environment and human health. In this research, the degradation of oxo-biodegradable low-density polyethylene (LDPE ox) was evaluated using an extremophile bacterium isolated in Antarctica (*Acinetobacter johnsonii*). Initially, prior to entering the bioreactor, pretreatments were applied to the polyethylene. The degradation of the plastic was evaluated using a bioreactor, where the kinetics of bacterial growth was measured by spectrophotometry and plate counting; and the amount of CO₂ released by the respirometric method. Plastic changes were analyzed by various techniques including dry weight, microscopic analysis, and infrared spectroscopy (FTIR). Of the pretreatments evaluated on the plastic, the one that had the best effect was the UV light since an average weight decrease of $8,41 \pm 0,02$ c % was obtained. Growth kinetics revealed that the bacteria achieved rapid growth in the medium containing plastic pretreated with Tween 80, showing a plastic weight reduction of $20,31 \pm 0,12$ f % and the highest CO₂ release of all treatments with an average of $190,23 \pm 4,53$ b mg/L. It is concluded that the *A. johnsonii* strain presented capacity in plastic degradation, despite having low rates, the weight reduction is significant.

Key words: Biological degradation, polyethylene, oxobiodegradable, pretreatments, respirometric, Antarctic bacteria.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

A lo largo de los años, los plásticos de origen sintético han representado un problema mundial que genera una serie de impactos negativos al ambiente, en el 2017 se estimó una producción de alrededor de 8300 millones de toneladas métricas (Tm) de plástico. Aproximadamente el 9 % de plástico se recicló, el 12 % fue incinerado y el 79 % fue arrojado a vertederos de basura (Geyer et al., 2017), el porcentaje de plástico que es desechado corresponde a polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), poliestireno (PS), poliuretano (PU) y tereftalato de polietileno (PET), debido a que estos plásticos son de uso común para diferentes sectores industriales (Wilkes & Aristilde, 2017).

El polietileno es visto como una amenaza para el ambiente por su resistencia a la degradación (Singh et al., 2018), debido a que no penetra la pared celular microbiana por su gran tamaño (naturaleza polimérica), haciendo que las enzimas microbianas no puedan realizar el proceso de despolimerización y en consecuencia no puede ser biodegradado (Karthick et al., 2016; Mierzwa et al., 2019). La degradación eficiente del plástico es posible si se conoce la naturaleza del polímero, su peso molecular, movilidad, tacticidad, cristalinidad y el tipo de aditivo empleado. Por otra parte, también se debe tomar en cuenta la fisiología y metabolismo del microorganismo empleado, debido a tal virtud se han propuestos algunas soluciones (Muthukumar & Veerappapillai, 2015).

Los microorganismos se destacan en el proceso de descomposición por sus características metabólicas (Fesseha & Abebe, 2019), de manera que los géneros bacterianos *Pseudomona* spp. y *Bacillus* spp. (Fachrul et al., 2021) son los más conocidos con esta capacidad para degradar plástico de baja densidad. Un estudio realizado con el género *Pseudomona* spp. tuvo una reducción de peso del 17,8% de polietileno (Muhonja et al., 2018). Según Karthick et al., (2016) en su estudio con *Bacillus* spp. registró mayor eficiencia para degradar polietileno sin necesidad de aplicar un pretratamiento al plástico, la reducción de peso promedio más alta fue de $35,72 \pm$

40,01% en un periodo de incubación de 6 semanas a 28 °C y 37 °C. En otro estudio, se reportó una biofragmentación y bioasimilación del LDPE (Polietileno de baja densidad) en la formación de biomasa por especies bacterianas como *Pseudomona putida* IRN22, *Pseudomona putida* LS46, *Acinetobacter pittii* IRN19, *Micrococcus luteus* IRN20 (Mohan, Montazer, & Levin, 2020), sin embargo, las investigaciones de la bioasimilación y mineralización completa del polímero son muy limitadas (Maity et al., 2021).

Las investigaciones realizadas en el país con respecto a la degradación del plástico han aplicado microorganismos como *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus*, debido a que estas especies pueden colonizar rápidamente el material en condiciones extremas y degradar polietileno de baja densidad hasta un 30 % (Sáenz et al., 2019). Por tal motivo, instituciones nacionales e internacionales se han aliado para realizar estudios enfocados en la conservación del ambiente, como la Fundación Dominicana de estudios marinos. Esta institución en el 2010 permitió el aislamiento de las cepas *P. putida*, *Bacillus* spp. y *Bacillus sphaericus* para evaluar la tolerancia de los microorganismos antárticos con diferentes concentraciones de hidrocarburos, todos los microorganismos presentaron resultados alentadores para futuras investigaciones de biorremediación (Gualoto et al., 2017).

1.2 Planteamiento del problema

En la actualidad, el alto consumo del plástico genera grandes volúmenes al año, se estima que alrededor del 40% del material plástico tiene un periodo corto de vida útil (menos de 1 mes), por lo que la degradación del plástico representa un gran desafío en el área de la investigación, debido a que este compuesto es causante de daños ambientales (Hahladakis et al., 2018).

El océano es el que más afectación tiene ya que abarca entre 4,8 – 12,7 millones de toneladas de plásticos por año. Estos materiales absorben contaminantes tóxicos, como trazas de metales y contaminantes orgánicos persistentes (COP), que ocasionan daños físicos a las formas de vida acuática por su ingesta (Wang et al., 2019). Los animales se ven afectados por la obstrucción de su tracto intestinal, que en consecuencia termina con la muerte por inanición (Li et al., 2016). Otro de los impactos de la basura marina, es la ingesta indirecta de microplásticos a

través de la cadena trófica. Estos microplásticos representan un problema de seguridad alimentaria, debido al consumo de mariscos que son dieta principal para la población humana (Akhbarizadeh et al., 2019).

Los productos de consumo diario como aguas embotelladas y alimentos enlatados presentan partículas de microplásticos (0 y 10^4 partículas/ litro), que se acumulan en tejidos del hígado, riñón e intestino. Las pequeñas fracciones son capaces de atravesar las barreras epiteliales de los pulmones, intestinos, placenta y cerebro. La inhalación o ingesta de microplásticos en estudios *in vivo* indicaron efectos que incluían la toxicidad física, efectos neurotóxicos y metabólicos (Vethaak & Legler, 2021). Dependiendo de la posible toxicidad física y química de los microplásticos, se ve vulnerable la salud de las mujeres embarazadas y sus hijos. Un estudio realizado en ratones gestantes mostró, que la alta concentración de microplásticos podría generar trastornos metabólicos a su descendencia (Luo et al., 2019).

En el Ecuador, el impacto ambiental se debe al tipo de contenedores que regularmente usan los hogares ecuatorianos, tal como se señalan en los datos anuales que proporcionan los estadísticos del INEC en los años 2015-2019 (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2017). La información indica que el uso de bolsas plásticas en el 2019 disminuyó a 73,85% mientras que, las bolsas de tela y otro tipo de contenedor presentaron un porcentaje de 24,27% y 1,88% respectivamente, como se indica en la Figura 1. Los datos evidenciaron el consumismo de los hogares ecuatorianos como una fuente importante de contaminación; y la falta de conciencia en el manejo de sus desechos (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2020).



Figura 1. Tipos de bolsas usadas por los hogares para realizar sus compras. Adaptado de *Módulo de Información Ambiental en Hogares* por (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2020).

La economía en el país se ve afectada por la recaudación de impuestos creados para disminuir la degradación del entorno, tal como se señalan en los datos estadísticos presentes en el Servicio de Rentas Internas en los años 2015-2020. A la luz de los datos, la recaudación evidencia un alza significativa del impuesto redimible de botellas plásticas no retornables, como se indica en la Figura 2 (Servicio de rentas internas del Ecuador, 2019). A pesar de que la valoración monetaria fue enfocada para disminuir el impacto ambiental, este se ha direccionado a otros sectores de salud, educación, obras públicas o deudas del Estado (Campoverde Valencia et al., 2019).

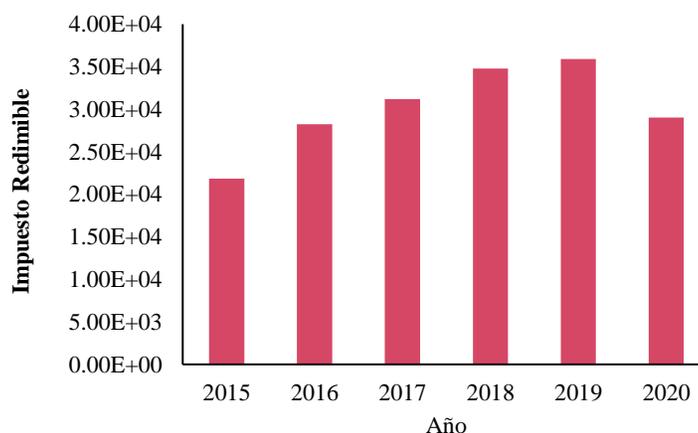


Figura 2. Estadística de Recaudación del Impuesto Redimible de Botellas Plásticas no retornables. Adaptado de *Estadísticas Generales de Recaudación por Servicio de rentas internas del Ecuador (2019)*.

La continua producción de materia antropogénica se ha duplicado en los últimos años provocando que supere la biomasa viva global, tal como se señala en los datos estimados desde principios del siglo XX (Figura 3), es decir que cada persona en promedio genera una masa antropogénica igual o mayor a la de su peso corporal (Elhacham et al., 2020).

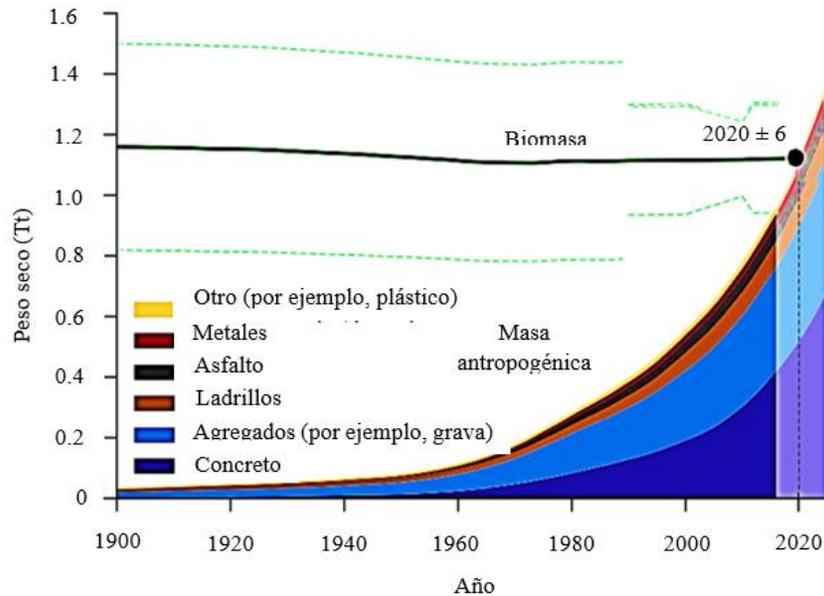


Figura 3. Estimación del peso de la biomasa y la masa antropogénica. Procedente de *Global human-made mass exceeds all living biomass* por Elhacham et al., (2020).

Por lo mencionado es pertinente encontrar una solución a este problema, para disminuir los impactos económicos y ambientales que preocupan a las instituciones ambientales. A pesar de que Ecuador ha impuesto políticas para la gestión del plástico, no se observa un cambio debido a que su efectividad se basa en las reacciones de las personas y empresas. El país necesita de centros de investigación enfocados al tratamiento de plástico, donde la biotecnología mediante el uso de microorganismos genere resultados prometedores que reduzcan la huella plástica.

1.3 Justificación

Durante décadas, el uso del plástico ha sido un proceso lineal, debido a que una vez empleado es descartado. La mala gestión de este contaminante ha provocado varias afectaciones al ambiente terrestre y acuático, a su vez está deteriorando la salud humana debido a la propagación de microplásticos, generando una gran preocupación a las asociaciones ambientales. El desarrollo de esta investigación contribuirá en el conocimiento para mejorar las técnicas de degradación.

Actualmente, las técnicas de degradación consisten en la incineración de los materiales para su eliminación (Ministerio del Ambiente, 2017), sin embargo, no se ha aplicado el uso de microorganismos o técnicas que sean amigables con el ambiente. Por tal motivo, el enfoque en este proyecto fue la aplicación de pretratamientos con Tween 80 y Luz UV debido a su bajo impacto con el entorno (Periche & Robles, 2016; Shahnawaz et al., 2019), utilizando la actividad de una bacteria antártica con la finalidad de evaluar su capacidad de degradación del plástico.

La evaluación de este estudio abarcará aspectos tecnológicos, científicos y ambientales. En el campo tecnológico busca una alternativa sostenible en la degradación de plásticos, en específico del polietileno por ser el responsable de graves efectos ambientales. Científicamente, permitirá la comprensión de los mecanismos del proceso de degradación; y algunas condiciones ambientales necesarias para el crecimiento de la bacteria. De manera ambiental, pretende implementar una alternativa biológica y amigable con el ambiente, para estudiar la actividad de degradación del plástico con un microorganismo antártico.

La degradación del plástico está vinculado a los programas de investigación del Laboratorio de Investigaciones Ambientales (LABINAM) de la Universidad Técnica del Norte, ejecutando en conjunto con el Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada (INOCAR). El INOCAR realiza anualmente expediciones a la Antártida, con la finalidad de caracterizar los espacios marítimos jurisdiccionales y no jurisdiccionales de interés nacional, al igual que desarrollar actividades de investigación científica (Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada, 2020). Los convenios han generado investigaciones, abarcando campos de microbiología, botánica, paleobotánica y limnología, estos proyectos son “Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos mediante el empleo de cepas bacterianas antárticas”; y “Estudio de líquenes antárticos y su adaptación al cambio climático” (FICAYA Emprende, 2016). Debido a que no se ha reportado investigaciones relacionados a la capacidad de microorganismos antárticos para degradar plástico (Danso et al., 2019), los microorganismos provenientes de la Antártica entran en el marco del programa como una manera sostenible para degradar el plástico.

1.4 Pregunta directriz

¿Los aislados antárticos son capaces de degradar el polietileno de baja densidad?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la degradación del polietileno de baja densidad por acción de una bacteria antártica

1.5.2 Objetivos específicos

- Evaluar los métodos de pretratamiento de Luz UV y Tween 80.
- Definir la cinética de crecimiento de la especie bacteriana.
- Comprobar la degradación del polietileno mediante el Método Respirométrico.

1.6 Hipótesis

Los microorganismos antárticos son capaces de degradar el polietileno de baja densidad aplicando un pretratamiento al plástico.

CAPÍTULO II

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Contaminación por plásticos

2.1.1 Composición de los plásticos

Los plásticos son polímeros sintéticos compuestos de carbono, hidrogeno, silicona, oxígeno, cloruro y nitrógeno (Yang et al., 2014). Los plásticos con mayor incidencia en la contaminación son el polietileno (PE), el polipropileno (PP), el poliestireno (PS) y el cloruro de polivinilo (PVC) (Mohanana, et al., 2020). Estos polímeros se componen de monómeros con doble enlace entre átomos de carbono (Tabla 1) (Alshehrei, 2017).

Tabla 1

Composición y estructura química de los plásticos sintéticos

Plásticos	Composición	Estructura química
Polietileno (PE)	Formado de largas cadenas de monómeros de etileno; dependiendo a su proceso de fabricación y disposición, el polímero puede tener diferente densidad y estructuras tridimensionales y físicas.	$(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n$
Polipropileno (PP)	Es el polímero de hidrocarburo lineal que tiene un grupo metilo en lugar de un hidrógeno. Se encuentra formado de cadenas de propileno como monómeros.	$(-\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}-)_n$
Poliestireno (PS)	Este polímero presenta una columna vertebral de carbono-carbono, unido a un grupo fenil.	$(-\text{CH}_2-\overset{\text{C}_6\text{H}_5}{\underset{ }{\text{CH}}}-)_n$
Cloruro de polivinilo (PVC)	Formado de enlaces de carbono, unido a un átomo de cloro	$(-\text{CH}_2-\overset{\text{Cl}}{\underset{ }{\text{CH}}}-)_n$

2.1.2 Clasificación de los plásticos

Los plásticos pueden fabricarse a partir de la modificación de sustancias naturales o son sintetizados de materias primas orgánicas e inorgánicas. En virtud de algunas características, los plásticos pueden dividirse en termoestables, elastómeros y termoplásticos (Figura 4). Por lo general los plásticos son termoplásticos que se caracterizan por reformarse a altas temperatura. El grupo de los termoestables se conforma de plásticos sintéticos como: PE (LDPE, HDPE, MDPE, LLDPE), el PP, el PS, el PVC, el PU, el PET, el tereftalato de polibutileno, los nylons, etc (Ram & Sangeeta, 2016). Otro grupo importante que se desarrolló a partir de estudios del plástico fueron los biodegradables, que están compuestos de materiales como plantas, animales y algas (Alshehrei, 2017).

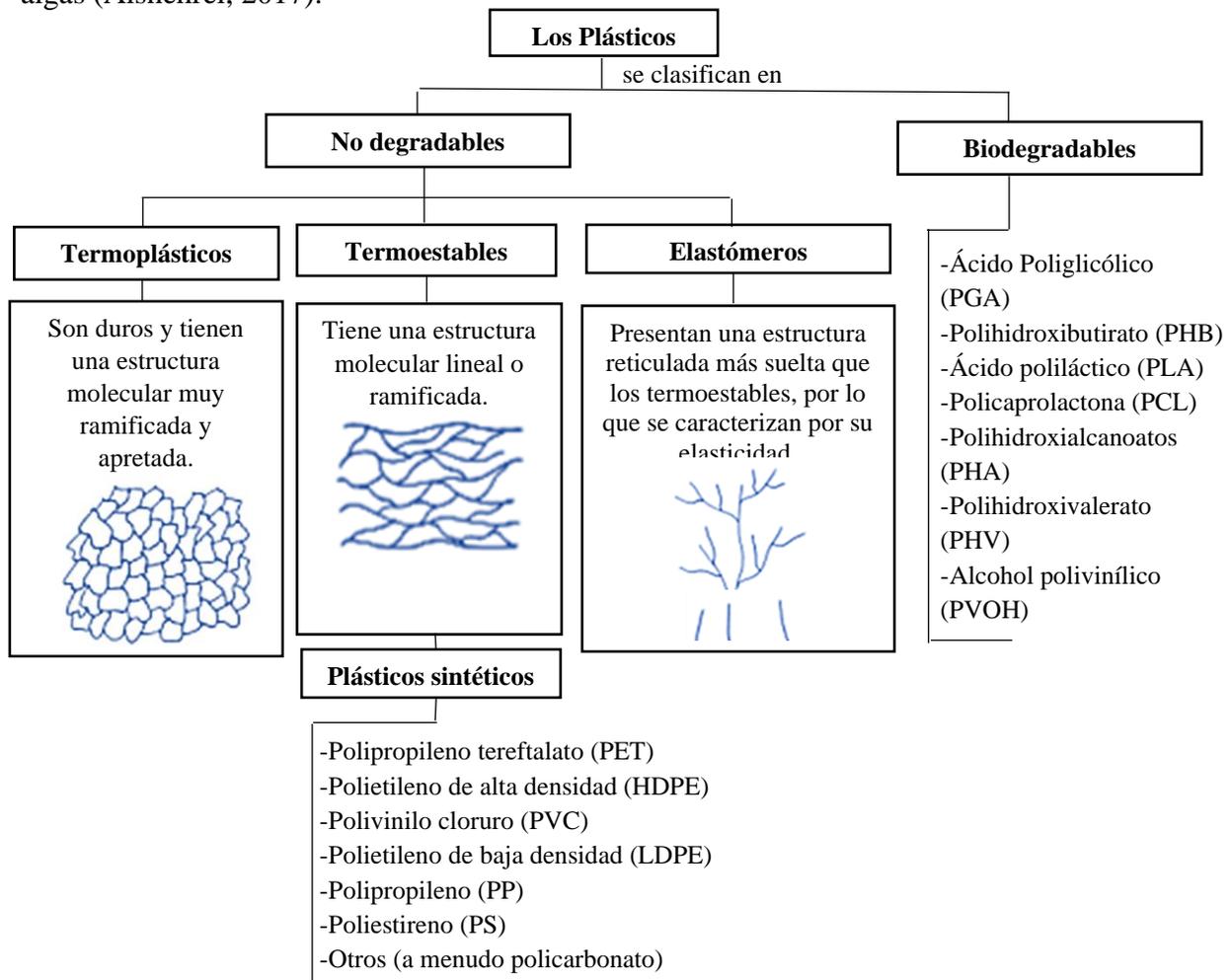


Figura 4. Clasificación de los tipos de plásticos. Adaptado de *Biodegradation of synthetic and natural plastic by microorganisms* por Alshehrei, (2017) y *The role of microbes in plastic degradation* por Rajendran, et al. (2016).

2.1.3 Manejo de residuos plásticos

El manejo de residuos plásticos siempre ha implicado varios desafíos por su creciente producción y falta de métodos adecuados de tratamiento, gestión y eliminación. Del plástico generado, solo el 60% se recicla y el resto es arrojado al ambiente. El reciclaje de un material plástico se lo puede realizar de 2 a 3 veces, debido a que con el tiempo el material tiende a deteriorarse por la presión térmica. Sin embargo, el reciclaje no es una solución segura porque el material reciclable es el más perjudicial para el ecosistema, por lo que se ha optado por otros métodos (Ministry of Housing and Urban Affairs, 2019).

No obstante, el manejo de estos residuos aparte del reciclaje se ha logrado mediante la degradación. La degradación del plástico de manera natural es un proceso muy lento, que se ve afectado por los parámetros ambientales como humedad, temperatura, pH, salinidad, presencia y ausencia de oxígeno, luz solar, agua, estrés y cultivo. Estos factores tienen gran influencia sobre el crecimiento bacteriano y la actividad enzimática (Kale et al., 2015).

2.1.4 Tratamientos fisicoquímicos

Fotooxidación

La fotooxidación térmica o penetración con luz UV en el plástico ha permitido la despolimerización de las cadenas de polietileno, dando como resultado productos con bajo peso molecular; de manera que los microorganismos los metabolice con ayuda de sus enzimas especializadas (Yang et al., 2014). Por tal motivo, el uso de luz UV es considerado como un método amigable con el medio ambiente (Shahnawaz et al., 2019).

Termooxidación

La termooxidación se realiza a altas temperaturas, superiores a 100 °C, debido a que la incorporación de aditivos antioxidantes en la fabricación del plástico impide la oxidación a bajas temperaturas. La degradación por este proceso se acelera por el estrés y el contacto con compuestos reactivos, como el ozono (Ali et al., 2021).

Prooxidantes

El empleo de prooxidantes (pro degradantes) permite acelerar la degradación del polietileno, este aditivo genera una descomposición parcial del plástico mediante reacciones en cadena de radicales libres. Las reacciones a menudo producen grupos funcionales como carboxilo, cetona y alcohol (Mierzwa et al., 2019).

2.1.5 Tratamientos biológicos

Biorremediación

La biorremediación es considerada la mejor técnica por utilizar la capacidad inherente de los microorganismos (algas, hongos y bacterias), permite transformar los compuestos inorgánicos en dióxido de carbono (CO₂), agua (H₂O) y metano (CH₄) (Bharagava et al., 2020). Los plásticos sirven como fuente de nutrientes para los organismos heterótrofos. Además, de manera natural requieren de otros factores fisicoquímicos para generar fragmentos más cortos del polímero; y puedan ser vulnerables al ataque de los microorganismos. Por lo tanto, la degradación abiótica precede de la biodegradación (Ghosh et al., 2019).

Microbiomas de invertebrados

Los invertebrados tienen la capacidad de degradar diferentes plásticos, adaptándose a las superficies y teniendo una vida más prolongada al ingerir plástico. Los invertebrados como orugas y larvas realizan una trituración mecánica, permitiendo que los microorganismos se adhieran mejor a las superficies (Danso et al., 2019).

2.1.6 Estado actual de la contaminación por plásticos a nivel mundial

El creciente consumo del plástico representa una amenaza para los ecosistemas terrestres y marinos. Debido a que este desecho absorbe sustancias químicas tóxicas, que ingresan en la cadena alimenticia mediante la ingesta de la fauna marina (Ram & Sangeeta, 2016).

La versatilidad del plástico ha generado gran impresión en la sociedad, la generación de plástico anual en el mundo encabeza India con 16%, seguido de China con 10% y Reino Unido

con 2,51% (Moharir & Kumar, 2019); a pesar de que cada país tiene su política de control de residuos, esto solo ha generado que el 9% de los 9.000 millones de toneladas plásticas de todo el mundo se destinen al reciclaje (Wilkes & Aristilde, 2017). Sin embargo, el porcentaje ha seguido aumentando lentamente y el problema de la contaminación a nivel global persiste, atribuido al fracaso de la aplicación de normativas. En la figura 5 se muestra la proporción mundial de residuos plásticos mal gestionados (Ncube et al., 2021).

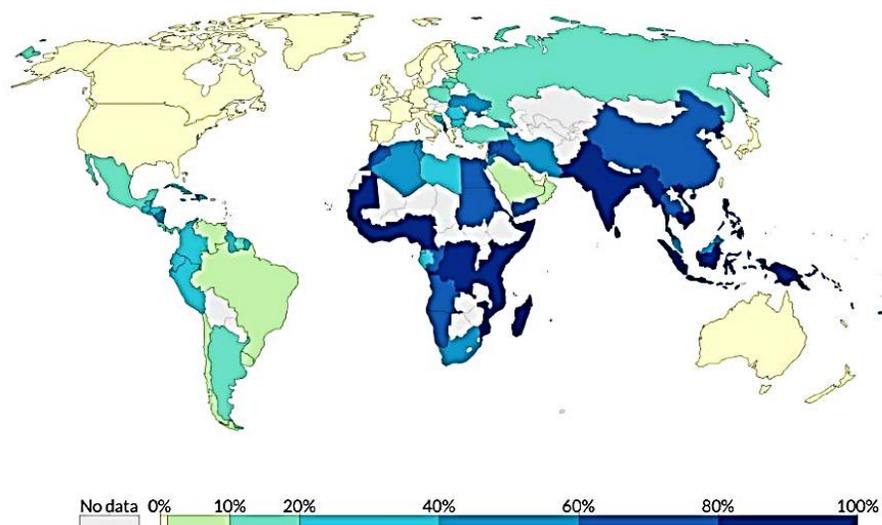


Figura 5. Inadecuada disposición de los residuos plásticos a nivel mundial. Adaptado de *An Overview of Plastic Waste Generation and Management in Food Packaging Industries* por Ncube et al., (2021).

2.1.7 Problemática de la contaminación por plásticos en el Ecuador

La ficha informativa de proyecto, dirigida por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MATE) en 2019, evaluó que los 15´520.973 habitantes ecuatorianos, generaron 4´139.512 Tm/año de residuos sólidos. Las cifras señalaron, que cada individuo generó 0,73 kg de desechos sólidos/día, de los cuales el 61 % eran residuos orgánicos, el 11 % plásticos, 9,4 % papel y cartón, 2,6 % vidrio, 2,2 % chatarra y el 13,3 % correspondía a otros residuos (Ministerio del Ambiente, 2019).

Las islas Galápagos se ven afectadas por la contaminación plástica, generando impactos negativos en la red alimentaria marina, servicios de los ecosistemas y economía costera. Galápagos alberga el 37 % de especies en peligro crítico de extinción, lo que ocasiona cada vez mayor preocupación debido a que se ve expuesto a este factor de contaminación (Jones et al., 2021). Por tal motivo, Ecuador junto con el programa Mares Limpios de la ONU, generó acuerdos oficiales en un esfuerzo para reducir la contaminación plástica en el océano (Brooks et al., 2020). De manera local, el gobierno a través del Instituto Nacional de Pesca (INP) promovió la campaña “¡No Más Plásticos en el mar!”; dando un alto a la fabricación, distribución y comercialización de plásticos de un solo uso (Ministerio del Ambiente, 2019).

2.2 Biodegradación de plásticos

La biodegradación es la capacidad metabólica de los microorganismos (hongos y bacterias), que les permite descomponer a componentes simples inocuos un contaminante; y emplearlo en calidad de fuente de carbono, energía para su crecimiento y desarrollo (Debruyne et al., 2015).

2.2.1 Microorganismos aplicados a la biodegradación

Los plásticos se consideran retos en el ambiente, por su naturaleza y propiedades fisicoquímicas debido a que son degradados más por conjuntos microbianos, que por cepas individuales. Por tal motivo, el microorganismo a utilizarse depende del tipo de polímero; sin embargo, los organismos individuales pueden mejorar de manera indirecta la biodegradación (Ali et al., 2021).

Algunas bacterias, hongos y algas son utilizados para degradar el plástico (Tabla 2); los hongos a través de los micelios fúngicos pueden penetrar en el material plástico y secretar enzimas extracelulares mayores a las bacterianas (Kale et al., 2015). No obstante, se ha demostrado que cepas bacterianas también presentan eficiencia de degradación frente a algunos polímeros plásticos. Por otra parte, diversas especies de algas se adhieren a la superficie del

residuo plástico, gracias a su alta disponibilidad de factores ambientales permite degradar el polímero, sin embargo, se necesita más investigación (Ali et al., 2021).

Tabla 2

Degradación microbiana en polímeros plásticos

Tipo de polímero	Microorganismo
Mezcla de celulosa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Phanerochaete chrysosporium</i> PVI
Láminas de PVC	
Poli-3-hidroxialcanoatos (PHA), Poli-bidroxibutirato (PHB)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Penicillium simplicissimum</i> • <i>Aspergillus fumigates</i>, • <i>Penicillium</i> spp., <i>Protozoa</i>, <i>lichens</i>) • <i>Aspergillus japonicas</i>, <i>Fusarium</i> spp. y <i>Aspergillus flavus</i> • <i>Arpergillus flavus</i> y <i>Aspergillus tubingensis</i> • <i>Penicillium oxalicum</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i> • <i>Zalerion maritimum</i> • <i>Arthrobacter</i> spp. GMB5 y <i>Pseudomonas</i> spp. GMB7 • <i>Serratia marcescen</i> • <i>Streptomyces</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp. • <i>Enterobacter</i> spp. y <i>Pantoea</i> spp. • <i>Pseudomonas</i> spp. • <i>Brevibacillus borstelensis</i> • <i>Microbulbifer hydrolyticus</i> IRE-31 • <i>Navicula pupula</i> (diatom) • <i>Scenedesmus dimorphus</i> (green microalgae) • <i>Anabaena spiroides</i> (cyanobacteria) • <i>Phormidium lucidum</i> • <i>Oscillatoria subbrevis</i> • <i>Nostoc carneum</i> (cyanobacteria) • <i>Pestalotiopsis microspora</i> • <i>Aspergillus flavus</i> • <i>Cladosporium cladosporioides</i>, <i>Leptosphaeria</i> spp., <i>Penicillium griseofulvum</i> and <i>Xepiculopsis graminea</i>
Polietileno (PE)	

Poliuretano (PU)

- *Geomyces pannorum*
- *Aspergillus tubingensis*
- *Yarrowia lipolytica*
- *Cladosporium pseudocladosporioides*, *Cladosporium tenuissimum*, *Cladosporium asperulatum*, *Cladosporium montecillanum*, *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum*
- *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*
- *Brevibacillus* spp. y *Aneurinibacillus* spp.
- *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Micrococcus* spp., *Arthrobacter* spp. y *Corynebacterium* spp.
- *Corynebacterium* spp., *BI2* y *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis*
- *Trichoderma DIA-T* spp.
- *Saccharomonospora viridis*
- *Penicillium funiculosum*
- *Pichia pastoris*
- *Aspergillus* spp.
- *Thermobifida fusca*
- *Ideonella sakaiensis*
- *Vibrio* spp.
- *Phaeodactylum tricornutum* (diatom)
- *Spirulina* spp. (cyanobacteria)

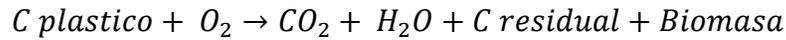
Tereftalato de polietileno (PET)

Adaptado de *Plastic wastes biodegradation: mechanisms, challenges, and future prospects* por Ali et al., (2021) y *Microbial Degradation of plastic: A review* por Kale et al., (2015).

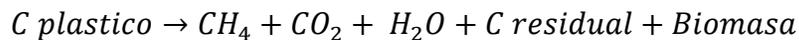
2.2.2 Procesos de biodegradación

De manera natural, los plásticos son degradados aeróbicamente y de manera anaerobia en sedimentos y vertederos. En la degradación aerobia los microorganismos utilizan al oxígeno

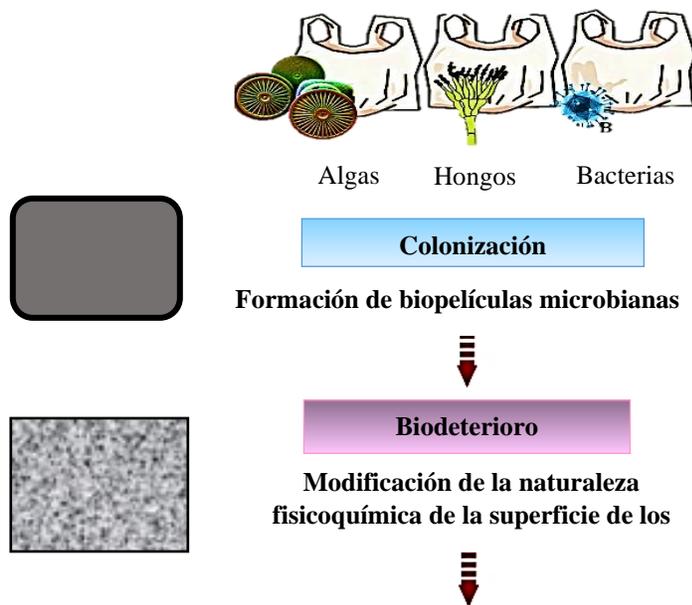
como aceptor de electrones, descomponiendo sustancias químicas orgánicas en compuestos simples. Los subproductos del proceso son el CO₂ y el agua (Alshehrei, 2017).



Por otra parte, la biodegradación anaeróbica permite que los microorganismos descompongan el contaminante orgánico en ausencia de oxígeno. Algunos microorganismos utilizan como aceptores de electrones el nitrato, el sulfato, el hierro, el manganeso y el CO₂ (Alshehrei, 2017).



El mecanismo de degradación de contaminantes (Figura 6) inicia por la colonización microbiana, formando biopelículas en la superficie del plástico, lo que provoca modificaciones en las características y propiedades del polímero (Ali et al., 2021). Este proceso da lugar a la biofragmentación mediante los procesos enzimáticos de hidrólisis y oxidación (hidrolasas y oxidorreductasas), las hidrolasas y oxidorreductasas rompen las estructuras laterales de los compuestos hidrofóbicos. A continuación, ocurre la etapa de asimilación donde la bacteria toma como fuente de carbono y energía a los monómeros producidos, para su crecimiento (Ali et al., 2021). El proceso de degradación finaliza con la mineralización, donde se genera una conversión intracelular de los productos asimilados en biomasa y subsecuente la liberación de CO₂ y agua (Mohan et al., 2020).



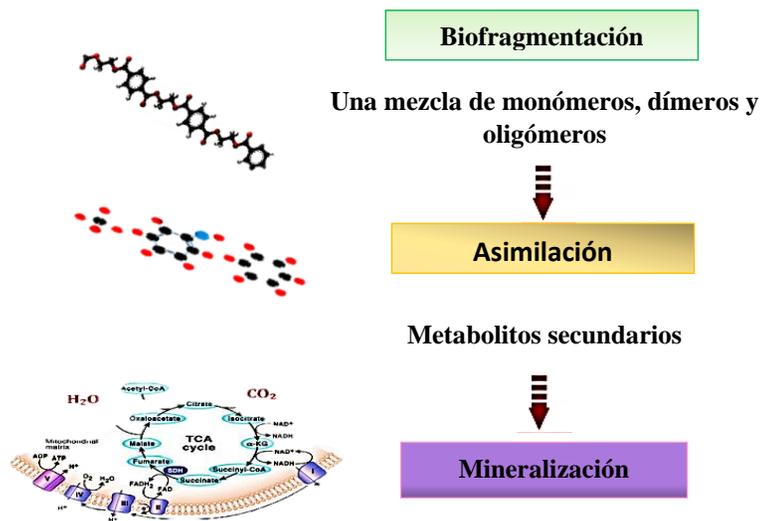


Figura 6. Etapas de la degradación microbiana de un material plástico. Tomado de *Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects* por Ali et al., (2021).

2.3 Microorganismos extremófilos como biodegradadores de plástico

Son microorganismos que se adaptan a condiciones físicas o geoquímicas inhóspitas para los organismos complejos (Znój et al., 2021). Las condiciones extremas incluyen temperatura, pH, potencial redox, salinidad, presión hidrostática y concentración de nutrientes. Estas modificaciones en sus rutas metabólicas han podido soportar el congelamiento, la desecación, falta de nutrientes, entre otros (Velásquez et al., 2018).

Estos microorganismos extremófilos, poseen enzimas especializadas de gran interés, debido a las propiedades únicas que presentan estos biocatalizadores para optimizar los procesos industriales (Gupta et al., 2014). La “biotecnología blanca” utiliza las enzimas para convertir los recursos renovables en productos como biopolímeros, biomaterial y biocombustibles. Así también aplica los biocatalizadores en el ámbito de la biorremediación de lugares contaminados (Raddadi et al., 2015).

2.3.1 Tipos de microorganismos extremófilos

Los estudios de diversidad microbiana de ecosistemas acuáticos de la Antártida se enfocan en comunidades extremófilas, debido a que la mayoría de ellos, en el norte del Frente Circumpolar Antártico Sur (SACCF) poseen genes que se relacionan con el metabolismo secundario, con potencial para la bioprospección. En la Figura 7 se destaca los microorganismos de estos ecosistemas (Dickinson et al., 2016).

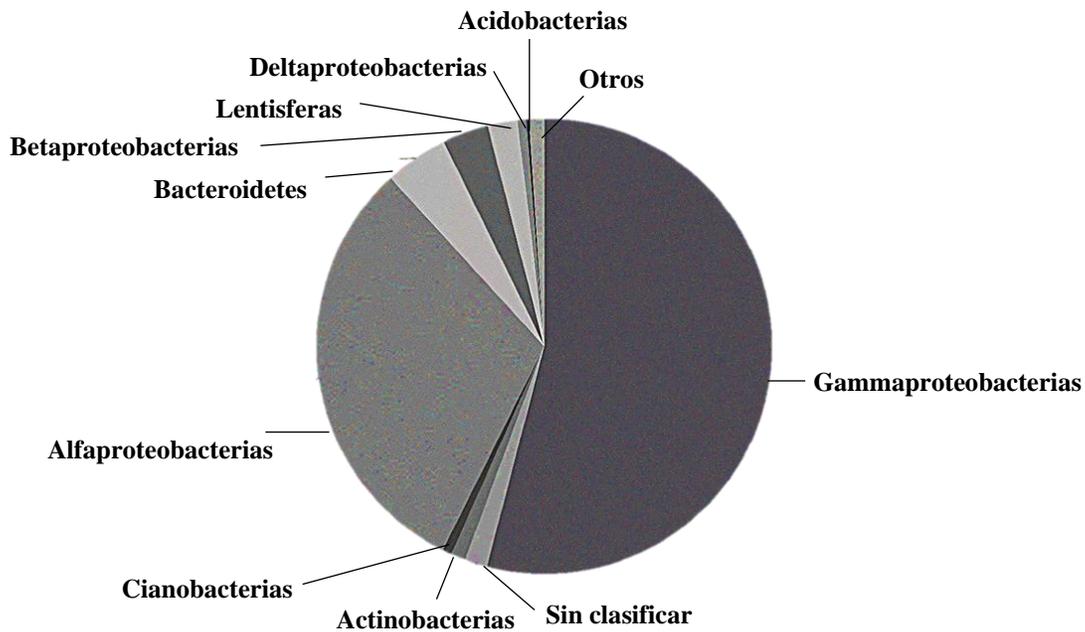


Figura 7. Tipos de bacterias del norte del Frente Circumpolar Antártico Sur (SACCF). El gráfico representa los tipos de microorganismos encontrados de 1,5 millones de lecturas mediante 454 pirosecuenciación con ARNr 16S; tomado de *Extremophiles in an Antarctic Marine Ecosystem* por Dickinson et al., (2016).

En relación con los suelos polares Antárticos, se han encontrado bacterias extremófilas en suelos con musgo y líquenes. La bacteria más destacable ha sido del grupo de los Actinomicetos, los cuales han logrado degradación de materia orgánica, también se han encontrado Bacilos y Micromicetos, que cumplen un papel importante en el ciclo de los elementos (agua, oxígeno, nitrógeno, carbono y fósforo) (Malcheva et al., 2020). Estas bacterias se caracterizan por ser absorbentes de nitrógeno mineral, debido a que pueden crecer en un medio inorgánico con iones de amonio como única fuente de nitrógeno (Velez et al., 2018). Sin embargo, en algunos suelos

puede ser deficiente porque los compuestos de nitrógeno se encuentran ligados a la materia orgánica que se descompone lentamente bajo las condiciones polares (Znój et al., 2021).

Otro grupo de bacterias, pertenecen a la familia Moraxellaceae del orden Pseudomonales, que abarca un grupo de bacterias heterogéneas. Se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente incluyendo a los géneros *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp. y *Psychrobacter* spp. (Dickinson et al., 2016). Estas bacterias no fermentadoras con catalasa positiva y citocromo oxidasa negativa, crecen mejor en condiciones aerobias que anaerobias, entre las cuales se destaca *A. johnsonii* por tener una reacción de catalasa positiva y oxidasa negativa. Estas células son bacilos gram negativos (-) de 0,9-1,6 µm de diámetro. Las bacterias crecen en un amplio rango de temperatura, la mayoría crece mejor a temperaturas de 20 °C – 30 °C (Martins & Carreira, 2014).

El crecimiento de la bacteria *A. johnsonii* depende de un amplio número de fuentes de energía y carbono orgánico. Entre los compuestos que puede metabolizar se encuentran alcoholes alifáticos, algunos aminoácidos, ácidos descarboxílicos y grasos, hidrocarburos no ramificados, azúcares y muchos compuestos aromáticos relativamente recalcitrantes como benzoato, mandelato, n-hexadecano, ciclohexanol y 2,3 butanodiol (Percival & Williams, 2014).

Acinetobacter spp. forma parte del 0,001% de las poblaciones de bacterias heterótrofas del suelo y agua. El género se ha utilizado en la biorremediación de aguas residuales, biodegradación de contaminantes orgánicos mediante la remediación biológica (Kämpfer, 2014). *A. johnsonii* ha presentado algunas aplicaciones en la producción de enzimas como dioxigenasas, oxacilinasas, fosfotransferasa entre otras (Figueiredo et al., 2012; Hofer et al., 2004; Itoh & Shiba, 2004), la bacteria también presenta la capacidad de desnitrificación utilizando diferentes materias orgánicas (Wen et al., 2019; Zhang et al., 2019). En el ámbito de la biorremediación, se ha estudiado la bacteria para la eliminación de impurezas inorgánicas de aceite usado (Jiang et al., 2012) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Jiang et al., 2018).

2.3.2 La Antártida como fuente de microorganismos extremófilos

El continente antártico se conoce como un ambiente distinto a otros debido a su topografía y profundidad. Estas condiciones ambientales permiten a las comunidades microbianas mostrar una compleja diversidad funcional, desarrollando mecanismos evolutivos para soportar las condiciones extremas (Malvé et al., 2014). Se ha determinado la existencia de una gran biodiversidad microbiana, específicamente en arqueas y hongos (Chong et al., 2012). Estos microorganismos se caracterizan por su metabolismo y diversidad, razón por la que son capaces de colonizar todos los medioambientes existentes y presentan un potencial de estudio en la Biotecnología (Instituto Antártico Ecuatoriano, 2016).

2.4 Caracterización de microorganismos con potencial aplicación en la biotecnología ambiental

2.4.1 Técnicas moleculares

De manera general las bacterias se identifican secuenciando el ARNr 16 S, el cual proporciona la identificación del género y la especie. Las secuencias de organismos distintamente relacionados tienen la posibilidad de alinearse con precisión; por tal motivo, se utiliza esta secuencia para determinar la taxonomía, la filogenia y estimar la relación evolutiva de las especies microbianas (Kamel, 2016).

El aislamiento de ADN se lo realiza utilizando un kit de extracción, siguiendo el procedimiento del fabricante. La sensibilidad de detección de PCR varía dependiendo del kit comercial que se utilice (Elijah et al., 2014). Los métodos de extracción ideal deben ser fáciles de manejar, ahorrar tiempo y ser asequibles; por lo que se recomienda que sean universales para reducir el número de procesos para la extracción. En la amplificación de los fragmentos 16 S rRNA se utilizan dos cebadores universales para la amplificación (directo e inverso) (Kamel, 2016).

La reacción de PCR tiene tres pasos, en primer lugar, la desnaturalización que permite romper los enlaces débiles de hidrógeno y separar las cadenas en ADN monocatenario cuando

alcanza una temperatura de 94 °C, la desnaturalización realiza 30 ciclos en 30 segundos. A continuación, el recocido, donde los cebadores se unen a una secuencia complementaria de ADN a una temperatura de 90 °C, que desciende hasta los 60 °C. Finalmente, la extensión dura 1 minuto a una temperatura de 72 °C, donde la enzima polimerasa agrega secuencialmente nucleótidos al cebador (Tomar et al., 2019).

2.5 Técnicas de la biodegradación de plásticos

El estudio de la biodegradación y los mecanismos implicados, representan una gran importancia para superar los problemas medioambientales relacionados con los plásticos, por tal motivo se han aplicado “métodos de prueba estándar” en los procesos de biodegradación (Shah et al., 2008).

2.5.1 Método estándar de Observación visual

Este proceso de degradación puede distinguirse por signos visuales, con el objetivo de interpretar los cambios en la superficie como la rugosidad, formación de grietas, fragmentación, cambio de color, manchas, pegajosidad, etc (Krieg et al., 2022). Para la observación de estos cambios se han aplicado las técnicas descritas en la Tabla 3.

Tabla 3

Técnicas aplicadas en el método de observación visual

Técnicas	Descripción	Bibliografía
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Es un instrumento para realizar análisis in situ de microáreas en el plástico	(Wen et al., 2021)
Microscopía de fuerza atómica	Es un instrumento para realizar análisis de superficies plásticas por medio de una sonda fina, obteniendo imágenes topográficas a nanoescala.	(Akhatova et al., 2022)
Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)	Es un instrumento que monitorea las biodegradaciones del plástico, esto se debe a su facilidad de encontrar enlaces de C=O, C-O, O-H siendo estos los principales enlaces que se	(Sandt et al., 2021)

	generan cuando un plástico pasa por el mencionado proceso.	
Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	Proceso que permite reconocer los cambios de calor y relajación estructural que sufren los materiales en su deformación.	(Meylan et al., 2020)
Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR)	Técnica que analiza las propiedades magnéticas en algunos núcleos atómicos, con esto se puede ver las propiedades fisicoquímicas de la estructura de varios polímeros.	(Pacákova & Virt, 2005)
Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)	Es una técnica precisa para verificar los enlaces químicos en las superficies de materiales como el plástico, sin embargo, se necesita una buena calibración para determinar la escala de energía de los enlaces.	(Greczynski & Hultman, 2020)
Difracción de rayos X (XRD)	Es una potente técnica que permite caracterizar en gran parte los parámetros estructurales (tamaño, fases, etc.) de los materiales., además de ilustrar los defectos y deformidades.	(Bunaciu et al., 2015)
Mediciones del ángulo de contacto	Es el método más barato para determinar los componentes del plástico, en este proceso se debe hallar el ángulo de contacto mediante una relación solución/polímero utilizando velocidad de cizallamiento.	(Aj & Mh, 2021)
Absorción de agua	Permite observar el desgaste, resistencia y dureza de los plásticos cuando este material se resiste a la humedad.	(Balan & Ravichandran, 2020)

En México se ha reportado un estudio de biodegradación de plástico, donde se empleó Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Difracción de Rayos X (DRX), evidenciando la acción de degradación en las películas del polímero. Mediante la técnica SEM, se pudo visualizar la aparición de microfracturas en la superficie; y con la técnica DRX se pudo determinar una mayor cristalinidad del componente lo que indica degradación del plástico (Peña et al., 2013).

2.5.2 Método estándar de Medición de pérdida de peso

La degradación del plástico puede ser calculado midiendo el desgaste de peso o pérdida de masa del área, mediante lo cual se puede establecer el tiempo de vida útil mediante un modelo matemático, para calcular la desintegración completa del polímero. Sin embargo, en ocasiones no permite obtener una prueba directa de la biodegradación, por problemas en la limpieza correcta del material (Science Advice for Policy by European Academies, 2016). Algunas de las técnicas aplicadas se mencionan en la Tabla 4.

Tabla 4

Técnicas aplicadas en la pérdida de peso

Técnica	Descripción	Bibliografía
Análisis de tamizado	La aplicabilidad del tamizado es una forma utilizada para cuantificar partículas microplásticas grandes en sistemas de lodos y compost digeridos y deshidratados	(Schwinghammer et al., 2021)
Separación o extracción por flotación-hundimiento	Esta técnica permite separar los materiales en un fluido por su densidad.	(Jash et al., 2015)
Análisis estructural del material residual de los productos intermedios de bajo peso molecular	El peso molecular permite determinar el tiempo de fragmentación o descomposición del plástico	(Ronkay et al., 2021)

Un estudio reportado por Ronkay et al., (2021) evaluó la degradación de HDPE y PET aplicando un análisis matemático, en función con el peso molecular y el tiempo de fragmentación o descomposición. Para este proceso se analizó la estructura del material contaminante (PET y HDPE). Una vez obtenido las propiedades, se midió la resistencia que tenía el peso molecular plástico en condiciones marinas, generando una simulación de cuánto tiempo

puede tomarle al plástico envejecer en un periodo de 3 o 4 años, dando como resultado un envejecimiento del 37% en ese periodo.

2.5.3 Método estándar de Cambios de propiedades mecánicas y la masa molar

El proceso de degradación de las propiedades mecánicas puede generarse mediante fuerzas de cizallamiento (estrés), tensión y/o compresión; el polímero sufre un fenómeno en la molécula reduciendo el peso molecular promedio, dando cambios en la masa de la muestra (Niaounakis, 2015). Este método emplea las técnicas descritas en la Tabla 5.

Tabla 5

Técnicas aplicadas para determinar los cambios de propiedades mecánicas y la masa molar

Técnicas	Descripción	Bibliografía
Despolimerización inducida por enzimas	Proceso donde las enzimas microbianas generan cambios en la estructura química, peso molecular y grado de cristalinidad dando la despolimerización del plástico.	(Mohan et al., 2020)
Aplicación de procesos abióticos	Llamado proceso a la intemperie permite la reducción y elongación de los plásticos demostrando la degradación en condiciones naturales.	(Kane et al., 2016)

En la India se han ejecutado estudios de biodegradación de plástico con microorganismos autóctonos, donde se aplicaron procesos abióticos al plástico con radiación UV que permitió la reducción de un 50% del tamaño del polímero, el plástico tratado interactuó con un consorcio bacteriano para degradarse (Siddiqui, 2019).

2.5.4 Método estándar de Evolución de CO₂

Este método se puede aplicar cuando se realiza la captura y utilización del CO₂ (Pires da Mata Costa et al., 2021), la formación de CO₂ permite analizar los procesos de degradación de los polímeros; además de medir el consumo de O₂ biológico de organismos bajo condiciones

establecidas (Shah et al., 2008). Este método puede generarse mediante las técnicas descritas en la Tabla 6.

Tabla 6

Técnicas aplicadas en el método de evolución de CO₂

Técnicas	Descripción	Bibliografía
Captura convencional de CO ₂ en solución de Ba(OH)	Este método permite que el CO ₂ se transforme en BaCO ₃ y así poder analizar la tasa de evolución de esta solución, como resultado se obtiene la tasa de biodegradación y deterioro de un material.	(Al-Salem et al., 2019)
Sistemas cerrados sin aireación continua	Este método permite analizar la absorción y consumo de CO ₂ en los organismos o microorganismos, sin embargo, debe controlarse factores como la humedad y temperatura para evaluar también su crecimiento biológico.	(Gonome et al., 2022)
Respirometría	Esta técnica analiza el consumo de oxígeno biológico de organismos bajo condiciones establecidas, además permite monitorear la biodegradación de los hidrocarburos. La ventaja de esta técnica es la precisión de sus datos, existen diferentes tipos de respirómetros como manométrico, volumétrico, electrolítico y de entrada directa.	(Szaja et al., 2015) (Quiterio et al., 2017)

En un estudio para analizar la biodegradación de plástico, se utilizó un aparato experimental basado en la respirometría bajo condiciones de compostaje, para medir las emisiones de CO₂. En las pruebas la cantidad de CO₂ se registró automáticamente por los detectores de gas infrarrojos, este registro permitió obtener el 80% de biodegradación en un periodo de 20 días (Castellani et al., 2016).

2.5.5 Método estándar de Radiolabeling

Es una metodología de imagen que no altera las propiedades de la muestra a analizar, permite observar a nivel molecular los procesos de biocompatibilidad y biodegradabilidad (Díez

et al., 2021). En relación con el plástico, permite evaluar la evolución neta del CO₂, debido a que no está sujeto a interferencias por impurezas de la biodegradación o aditivos (Shah et al., 2008). La técnica más utilizada se describe en la Tabla 7.

Tabla 7

Técnica aplicada en Radiolabeling

Técnicas	Descripción	Bibliografía
Utilización de un contador de centelleo	En este proceso el CO ₂ se atrapa químicamente en una solución absorbente, luego se utiliza el centello líquido para determinar el contenido de carbono y así determinar mediante imagen los grupos carbonilos actuales y antiguos.	(Canducci, 2013)

El contador de centello se ha aplicado en métodos de evaluación del carbono, en muestras biológicas y atmosféricas. Según Canducci et al., (2013) en su estudio se analizó una muestra gaseosa, en primer lugar se realizó la congelación del componente gaseoso, mediante un destello de luz (centelleo) se midió la intensidad de la radiación de carbono que poseía el gas, mostrando una reducción de 13.5 g de carbono en un conteo de fondo en materiales de PTFE y PET.

2.5.6 Método estándar de Compostaje controlado

El compostaje es un proceso mayormente utilizado para la eliminación de plástico porque permite que la descomposición biológica sea más rápida. Además, se puede valorar los residuos sólidos y la evolución de CO₂ producido (Folino et al., 2020), las técnicas más empleadas se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8

Técnicas aplicadas en el compostaje controlado

Técnica	Descripción	Bibliografía
Digestores aeróbicos	Este tipo de descomposición es más rápida debido a que	(Gómez & Michel, 2013) (Karamanlioglu et al.,

	brinda las condiciones adecuadas de microorganismos	2017)
Digestores anaeróbicos	La importancia del uso de este digestor es que el proceso de biodegradación permite la formación de biogás, agua, sulfuro de hidrógeno y amoníaco. Algunas de las ventajas es la limitación la emisión de olores y que productos como el metano pueden utilizarse como fuente de energía	(Calabrò & Grosso, 2018) (Hegde et al., 2018) (Yagi et al., 2014)

En el estudio de Camacho & Hoyos, (2014) se determinó un proceso de biodegradación anaeróbica de un polímero, para esto se utilizó componentes orgánicos como la yuca, ácido poliláctico y policaprolactona. La combinación de estos desechos junto con el plástico pudo generar una reducción del polímero de hasta un 77.49% en un periodo de 15 días, demostrando las propiedades que generan las condiciones anaeróbicas.

CAPÍTULO III

3 METODOLOGÍA

3.1 Descripción del Área de estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales (LABINAM) y en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en el campus San Vicente de Paul UTM (17N 821298.3 38378.4) en Ibarra, en la calle Juan Montalvo y Cristóbal Colón, provincia Imbabura, Ecuador.

3.1.1 Muestreo

El material biológico, fue extraído por el Blgo. Miguel Gualoto, PhD en la estación Ecuatoriana Pedro Vicente Maldonado UTM (21N 358519.1 6927240.6) (Figura 8), ubicada en la Isla Greenwich que forma parte de las Islas Shetland del Sur, en la Punta Fort Williams UTM (21N 356723.6 6934827.7), frente a la isla Barrientos UTM (21N 358014.9 6922441.2) en la XVII Expedición Antártica 2012.

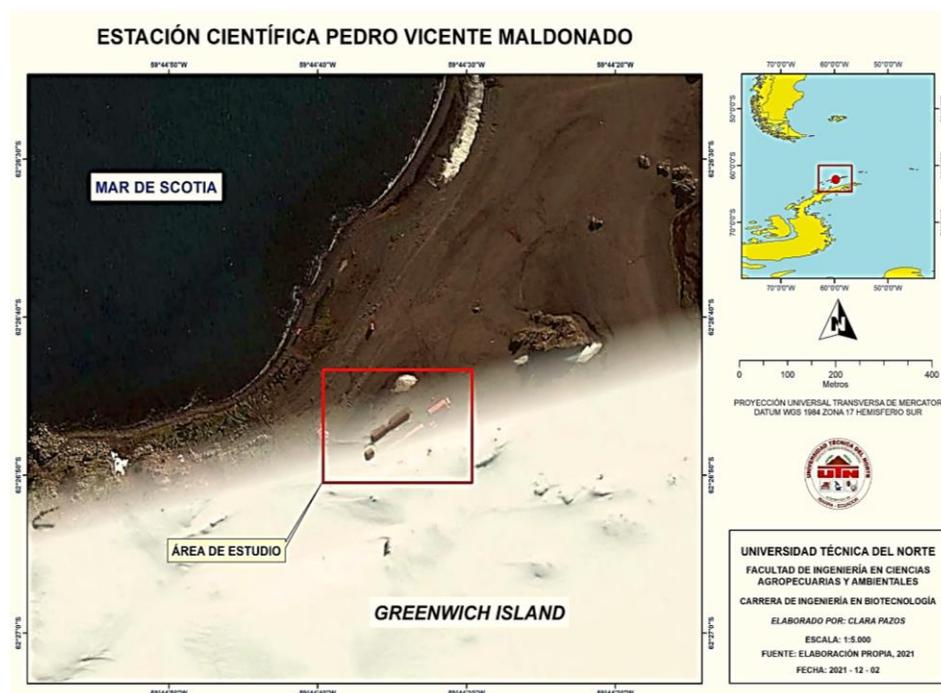


Figura 8. Ubicación general de la zona donde se obtuvo el material biológico

3.1.2 Conservación del material biológico

Las muestras entregadas por el LABINAM presentaban una posible contaminación. De acuerdo con las recomendaciones del laboratorio, se desarrolló resiembra de la muestra madre para obtener un cultivo puro. Para esta técnica, se hicieron diluciones seriadas ($10^{-1} - 10^{-9}$) en solución salina y se sembraron en Medio Agar Nutriente. A continuación, se realizó una siembra en la placa con el medio sólido (Serrano & Gutiérrez, 2018). Al finalizar, se obtuvo cultivos puros (B1) que fueron sembrados en caldo Luria Bertani y se mantuvo a una temperatura de 15 °C (Bonilla et al., 2016), tal como lo indica en el Anexo 1. Una vez obtenido el cultivo se procedió al inicio de la investigación.

3.2 Caracterización del microorganismo antártico

3.2.1 Caracterización morfológica

Se realizó una tinción Gram para diferenciar al grupo de bacterias (Gram+, Gram-) al que pertenecía, para este proceso se seleccionó una muestra de cultivo y se aplicó un colorante primario cristal violeta, lugol, alcohol-acetona y un colorante secundario safranina. Finalmente, se observó la muestra en un microscopio “Leica”, este proceso se realizó de acuerdo con la metodología establecida por Rodríguez & Arenas, (2018) (ver Anexo 2).

3.2.2 Caracterización molecular de la bacteria

Se caracterizó molecularmente a las bacterias siguiendo protocolos y metodologías de extracción, PCR, electroforesis y purificación de ADN (más información ver Anexo 3). Para la extracción de ADN, se utilizó el Kit MasterPure™®; se realizó modificaciones en las cantidades de los reactivos establecidos en el estudio de Riascos et al., (2018). Posteriormente, para analizar la integridad del ADN, se ejecutó electroforesis en un gel de agarosa, basándose en la metodología de Monroy et al., (2014).

En la amplificación del ADN, se preparó un volumen total de 29,5 µl que contenía GoTaq ® Green Master Mix, primers universales 16 S, agua pura y ADN (Tabla 9). Las condiciones de reacción se modificaron a 30 ciclos: 95 °C por 50 segundos, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 30 segundos y 72 °C por 10 minutos. Los resultados de la amplificación fueron visualizados en el gel de agarosa al 1,5% mediante la ayuda de un transiluminador Safe Imager™ 2.0; tomando como referencia a Famewo et al., (2016).

Tabla 9

Composición de la muestra para análisis de PCR

Componentes	Cantidad
GoTaq ® Green Master Mix	20 µl
27F (5'-GGT AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')	0.8 µl
518R (5'-ATT ACC GCG GCT GG-3')	0.8 µl
ADN	0.5 µl
Agua Ultrapura	7.4 µl
Volumen Final	29.5 µl

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el Kit de PCR (250) QIAGEN, siguiendo la metodología de (Qiagen, 2020). La muestra final se envió a secuenciar en un laboratorio público. El resultado se analizó *in silico* con los programas de alineamiento GENIOUS y Blast NCBI, tomando en cuenta el porcentaje de identidad y considerando el e-value para el reconocimiento de la secuencia (Donkor et al., 2014).

3.3 Pretratamiento al Polietileno

Se emplearon fundas de polietileno de baja densidad oxobiodegradable “AKI”, que fueron cortadas en tiras de 1 cm x 4 cm; el plástico fue esterilizado con etanol al 70 % y se secó por 15 minutos en una estufa “Memmert”. A continuación, se aplicaron pretratamientos (Tabla 10) al plástico inicial para facilitar la despolimerización de este y mejorar la degradación microbiana (Yang et al., 2020).

Tabla 10*Pretratamientos aplicados al polietileno de baja densidad oxobiodegradable*

Pretratamiento	Significado	Cantidad inicial (g)
A1	Plástico + Luz UV	5,28
A2	Plástico + Tween 80	5,45
A3	Plástico + Luz UV+Tween 80	5,84
		5,26

Las cantidades de plástico ingresaron a los biorreactores después de la aplicación de los pretratamientos. (punto verde) corresponde al plástico que ingresó a los biorreactores con bacteria y (cuadro azul) al plástico que ingresó a los biorreactores (control).

Para el pretratamiento con Luz UV, se colocaron tiras plásticas bajo una lámpara UV “Analytikjena (Long. de onda 254,302,365 nm)” a una exposición de 365 nm durante 4 semanas en un periodo de 6 horas; este protocolo fue modificado de Siddiqui, (2019). En el pretratamiento con Tween 80, se preparó 40 ml Tween 80 en 100 ml de agua destilada; a continuación, se agregaron las tiras plásticas y se dio agitación con ayuda de un Mini-Shaker 3D “Boeco Germany”. Posteriormente, se transfirieron las tiras plásticas a un vaso con agua destilada y se agitó nuevamente por 1 h. Finalmente, se limpió el plástico con etanol y se secó en la estufa (90 °C) durante toda la noche; para este proceso se siguió la metodología modificada de Singh et al., (2018), tal como se indica en el Anexo 4.

Una vez aplicado los pretratamientos, se empleó el método de peso seco para determinar la reducción de peso del plástico (Ecuación 1), para este proceso se midió el peso inicial y final del plástico con ayuda de una Balanza electrónica ADAM (Max 750 g d=0,001 g) (para más detalles ver Anexo 5) (Masura et al., 2015).

Ecuación 1

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} * 100$$

3.4 Diseño del biorreactor

En esta fase, se diseñó un biorreactor Batch anaerobio para medir la tasa de crecimiento y degradación. El biorreactor constó de dos compartimentos, el compartimento “A” (250 ml), contenía 100 ml de medio Difco™ Bushnell Haas Broth (BHB), plástico pretratado y 1 ml de caldo Luria con microorganismo inoculado. Se realizó el mismo proceso para los controles negativos, con la excepción de que no se inocularon las bacterias de acuerdo a lo establecido por Sadeghi et al., (2018). El compartimento “A” tenía dos secciones (conducto y manguera), el *conducto a* para tomar la muestra de medio, mientras que la manguera era una salida de CO₂ conectada al compartimento B (250 ml). El compartimento “B” contenía 100 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 1 N que permitió capturar el CO₂, adicionalmente tenía un *conducto c* que permitió extraer muestras para calcular la degradación (esquema detallado Figura 9). El biorreactor se mantuvo en una incubadora “Memmert” a 15 °C durante 52 días. Este protocolo (Anexo 6) se basó en lo establecido por Pitombo et al., (2018).

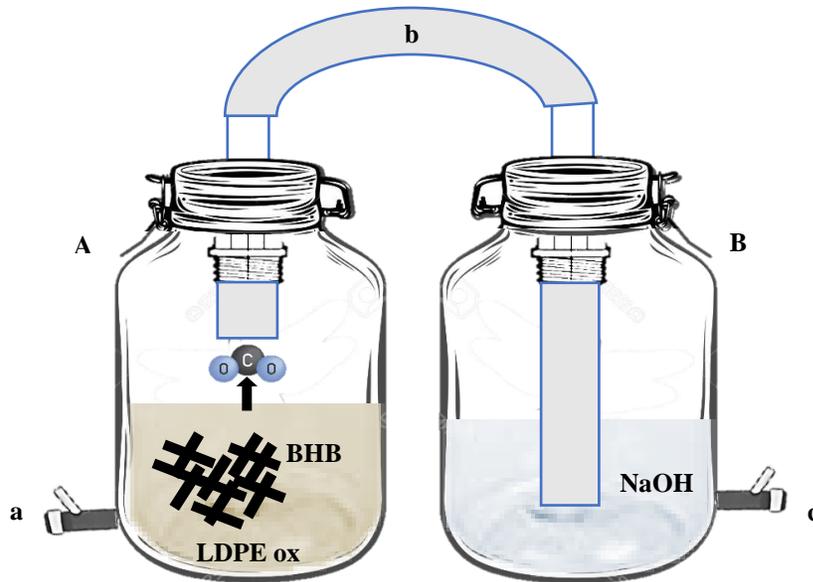


Figura 9. Diseño de Esquema para el proceso de degradación de polietileno de baja densidad. **A)** Compartimento del biorreactor para analizar el crecimiento bacteriano, **B)** Compartimento del biorreactor para analizar la liberación de CO₂, **a)** Conducto para toma de muestra para la cinética de crecimiento, **b)** Manguera de emisión de CO₂ que reacciona con NaOH, **c)** Conducto para toma de muestra para método respirométrico.

3.4.1 Cinética de crecimiento

Se tomó 200 μl del *conducto a* (Figura 9) utilizando una jeringa, 3 veces al día durante 52 días y se realizó una dilución de la muestra concentrada. La medición de absorbancia (OD), fue a una longitud de onda de 600 nm (Yin et al., 2020). Adicionalmente, se tomó del mismo *conducto a* 500 μl , durante 3 días a la semana para determinar la cantidad de UFC/ml mediante el recuento en placa de microorganismos basado en la formación de colonias. El conteo se realizó por diluciones seriadas 10^{-6} , se sembró un volumen conocido en cajas con medio Agar Nutriente y después de 48 h de incubación se realizó el conteo utilizando la Ecuación 2, de acuerdo con el método basado en Cerra et al., (2013) (Anexo 7).

Ecuación 2

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias por placa}}{\text{Volumen sembrado} \times \text{dilución}}$$

A partir de estos datos, se realizó una curva D_0/t , donde D_0 es absorbancia por unidad de tiempo (h). Adicionalmente, se empleó un modelo matemático para calcular el crecimiento bacteriano o unidades formadoras de colonia (Ecuación 3).

Ecuación 3

$$\frac{dN}{dt} = K \cdot N,$$

Al integrar la Ecuación 3, se obtiene la Ecuación 4.

$$\frac{dN}{N} = K \cdot dt$$

$$\ln \frac{N_2}{N_1} = K \cdot (t_2 - t_1)$$

Ecuación 4

$$K = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

Donde K (μ) es la tasa reproductiva por unidad de tiempo (días) y N es el número de bacterias (Gualano et al., 2017). A partir de los datos obtenidos, se realizó una curva D_0/UFC y se determinó el tiempo de duplicación (Pantoja Guerra et al., 2018) utilizando la fórmula:

Ecuación 5

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Mediante los datos de UFC/ml obtenidos, se calculó la tasa de crecimiento de biomasa (rx) (Ecuación 6), para indicar el incremento de la masa celular por unidad de tiempo (Doran, 2013). Además, se obtuvo el rendimiento para determinar la cantidad de biomasa generada en relación con la cantidad de masa consumida, aplicando la Ecuación 7 (Castañeda, 2019).

Ecuación 6

$$\frac{dVCx}{dt} = \int rxdV$$

Al integrar la ecuación 6, se obtiene la ecuación 7.

Ecuación 7

$$rx = \frac{(Cf - Ci)}{(t2 - t1)}$$

Ecuación 8

$$Y_s^x = \frac{rx}{rs}$$

3.4.2 Emisión de CO₂

Para medir la cantidad de CO₂ liberado, se tomó del *conducto c* (Figura 9) 1 ml de NaOH y se colocó en un microtubo Eppendorf, para evitar la interferencia con el ambiente. A continuación, se realizó una técnica de titulación, para este proceso se agregó 1 gota de fenolftaleína y se dispensó lentamente una solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 N en el microtubo, hasta que la solución de NaOH se volvió transparente; esta técnica se realizó el último día de cada semana durante el periodo de incubación, de acuerdo con la metodología aplicada por Morales et al., (2019) y Rodríguez et al., (2011) (Anexo 8). Finalmente, para la valoración de CO₂ se aplicó la Ecuación 9 basado en lo establecido por Keener et al., (2001).

Ecuación 9

$$mg \text{ de } CO_2 = \frac{(B - M) * F}{L \text{ total}}$$

Donde B es el volumen (ml) de HCl para titular el NaOH de los blancos (promedio), M es el volumen (ml) de HCl necesario para titular el NaOH de la muestra, F es el factor de conversión entre el CO₂ y HCl.

A partir de los datos de CO₂, con ayuda de un modelo matemático se obtuvo la velocidad de producción del componente mencionado (Ecuación 4). Adicionalmente, se calculó la tasa de producción (rp), para obtener la cantidad de CO₂ generado por unidad de tiempo (Ecuación 10) (Doran, 2013). Además, se calculó el rendimiento del producto (Y_s^p) (Ecuación 12) para indicar la relación entre la producción de CO₂ y el consumo de sustrato (Castañeda, 2019).

Ecuación 10

$$\frac{dVCp}{dt} = \int rpdV$$

Al integrar la ecuación 10, se obtiene la ecuación 11.

Ecuación 11

$$rp = \frac{(Cf - Ci)}{(t2 - t1)}$$

Ecuación 12

$$Y_s^p = \frac{rp}{rs}$$

A partir de los datos de absorbancia, se realizó una curva estándar de la absorbancia de fenolftaleína con concentraciones conocidas de NaOH (1 N, 0,7 N, 0,5 N, 0,3 N, 0,1 N, 0,05 N), de la cual se obtuvo la ecuación 13:

Ecuación 13

$$y = mx + b$$

Donde “y” es absorbancia de NaOH y “x” es la concentración de NaOH. Para calcular la concentración de NaOH, se midió la absorbancia a 550 nm de la muestra obtenida del *conducto c*, colocándola en una cubeta con una gota de fenolftaleína; este proceso se lo realizó basándose en Alonso et al., (2010); Blanco et al., (2009). Los valores obtenidos de absorbancia de NaOH fueron remplazados en "y" (Ecuación 13). Una vez obtenida la concentración de NaOH, se realizó una ecuación estequiométrica (Ecuación 14) para obtener la cantidad de CO_2 liberado.

Ecuación 14

$$1 \text{ mol NaOH} * \frac{1 \text{ mol } CO_2}{\frac{\text{mol}}{L} \text{ NaOH}} * \frac{PM \text{ } CO_2}{1 \text{ mol } CO_2} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$

3.5 Análisis de los cambios del polietileno

El plástico resultante del biorreactor fue lavado con dodecil sulfato de sodio acuoso (SDS) durante 4 h, para eliminar de la superficie los restos de la bacteria. En seguida, se

esterilizó con etanol 70 % y se lavó con agua destilada para dejar secando en el horno a 50 °C, basado en la metodología de Park & Kim., (2019) (Anexo 9).

Posteriormente, se pesó el plástico para realizar comparaciones entre las mediciones de peso de ingreso y salida tal como se mencionó en el literal 3.2 (Anexo 5) (Masura et al., 2015). Para determinar la cantidad de sustrato consumido en relación con el tiempo, con los valores obtenidos de peso se calculó la tasa de consumo de sustrato (rsu) (Ecuación 15) (Doran, 2013).

Ecuación 15

$$\frac{dVCsu}{dt} = \int rsudV$$

Al integrar la ecuación 15, se obtiene la ecuación 16.

Ecuación 16

$$rsu = \frac{(Cf - Ci)}{(t2 - t1)}$$

Adicionalmente, para determinar la velocidad de degradación del plástico se empleó un modelo cinético de primer orden (Ecuación 17) (Alcántara et al., 2015).

Ecuación 17

$$\ln \frac{Co}{C} = K * t$$

Donde K es la tasa de degradación y C es la concentración del compuesto. Posteriormente, se calculó el tiempo de vida medio para indicar la estabilidad del compuesto con el tiempo (Ecuación 18) (Garcés et al., 2005).

Ecuación 18

$$t = -\frac{\ln(0.5)}{k}$$

A continuación, se tomó una muestra de cada plástico tratado, se lo colocó en un portaobjetos y se visualizó la superficie del plástico mediante un Estereoscopio ® LEICA (2.0x). Finalmente, para determinar los grupos funcionales del polímero resultante de los tratamientos, se enviaron las muestras al laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela Politécnica Nacional, para realizar un análisis de espectroscopía infrarroja (FTIR); siguiendo las indicaciones de la proforma de la institución, que constan de las condiciones de envío y la cantidad adecuada para realizar el ensayo (Tabla 11).

Tabla 11

Condiciones generales para la recepción de ensayos en el laboratorio

Tipo de muestra	Ensayo	Cantidad mínima requerida	Condición del Envase
Polímero	FTIR Grupos Funcionales	10 g	Envase a elección del cliente

El tamaño de muestra indicado es el requerido para el análisis; no obstante, el cliente debe evaluar la cantidad que requiere para que su muestra sea significativa en su proceso. Adaptado del laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela Politécnica Nacional (2021).

3.6 Análisis de datos, diseño de las variables de evaluación

Se realizó un diseño experimental de bloques completo al azar en un arreglo factorial AXB, el factor A constó de tres métodos de degradación (A1=Luz UV, A2=Tween 80, A3= Luz UV-Tween 80) y el factor B de la bacteria (B1= bacteria 1). El diseño experimental tuvo tres repeticiones en cada uno de los tratamientos (Figura 10).

La combinación de estos factores dio un valor de 7 tratamientos y 21 unidades experimentales (Tabla 12), los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa InfoStat. En el ensayo se realizó un análisis de varianza ANOVA con un nivel de confianza del 95 %, mediante pruebas de significancia, esto permitió evaluar la tasa de crecimiento bacteriano y la

tasa de degradación. Para la evaluación de la cinética de crecimiento (UFC), se tomó como unidad experimental una alícuota de 200 µl de solución bacteriana; para este análisis se realizó el cumplimiento de los supuestos, la normalidad mediante Shapiro Wilks, la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Levene y la independencia. Para verificar la diferencia de alguno de los tratamientos se aplicó una prueba a posteriori, Tukey con un margen del 5 %.

Para la evaluación de la tasa de degradación, se tomó como unidad experimental una alícuota de 1 ml de solución NaOH. Para este análisis, se realizó el cumplimiento de los supuestos, la normalidad mediante Shapiro Wilks, la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Levene y la independencia. Para verificar la diferencia de alguno de los tratamientos, se aplicó una prueba a posteriori Tukey con un margen del 5 %.

Tabla 12

Tratamiento en el estudio de análisis de crecimiento bacteriano y la degradación del plástico

Tratamiento	Codificación	Significado
t1	A1B1	Luz UV+ Bacteria
t2	A2B1	Tween80+Bacteria
t3	A3B1	LuzUV+Tween80+Bacteria
t4	A1	Luz UV (Control)
t5	A2	Tween80 (Control)
t6	A3	Luz UV+Tween80 (Control)
t7	B1	Bacteria (Control)

La descripción indica las combinaciones generadas por cada nivel de factor en estudio

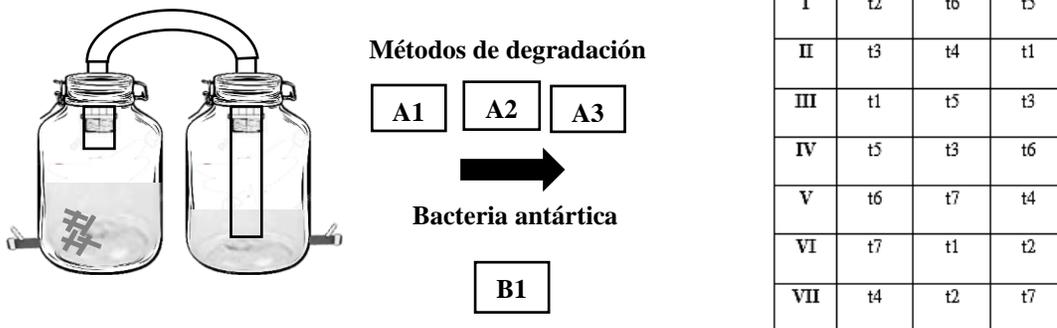


Figura 10. Esquema del diseño experimental de bloques completo al azar en un arreglo factorial AXB

CAPÍTULO IV

4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Identificación de microorganismo antártico

4.1.1 Identificación morfológica

Mediante la replica de la muestra madre se observó crecimiento de un cultivo puro (B1). A partir de este cultivo, se identificó al microorganismo antártico de acuerdo a su morfología mediante procedimientos *in vitro* (Figura 11).

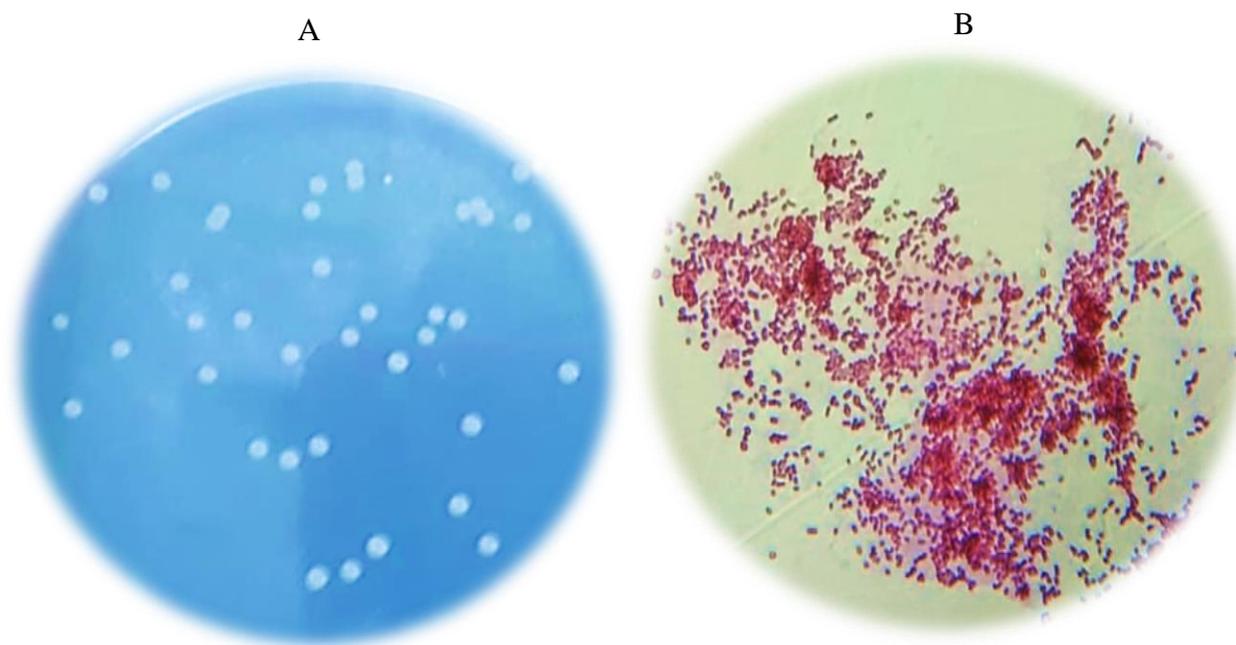


Figura 11. Caracterización morfológica. A) Estructura macroscópica del microorganismo. B) Observación microscópica de Tinción Gram

La bacteria ilustrada (Figura 11) presentó una morfología semejante al género *Acinetobacter* spp., en “A” se observó la vista inferior de la bacteria en la placa, mostrando una coloración grisasea con algo de mucosidad (Zuleima & Nieves, 2005). Se apreció la formación de colonias lisas sin esporas con bordes enteros; sin embargo, estas características pueden cambiar dependiendo del medio que se emplee debido a su taxonomía compleja (Qin et al., 2021). En “B”, se visualizó bacterias que se tiñeron de color rosado, de acuerdo a su forma

diferenciada, se identificaron como bacilos Gram negativos (-), característica determinante del género bacteriano (Almasaudi, 2018).

Por otra parte, la muestra de origen fue obtenida de un suelo de ecosistema frío, esta característica es típica en el crecimiento de estos microorganismos como se menciona en el estudio de Xue et al., (2019); el cual identificó a esta bacteria en un ecosistema frío marino, en las profundidades del Mar de China. De acuerdo con Margesin et al., (2003), los géneros *Rhodococcus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. crecen en los ambientes alpinos, árticos y antárticos. No obstante, la identificación de la especie se complementó mediante las pruebas moleculares.

4.1.2 Identificación molecular

La muestra fue amplificada con los cebadores 27 F/ 518 R (16 S), donde se visualizó bandas con un peso molecular aproximado de 1500 pb (Anexo 10), lo que indica la amplificación del gen 16S (Jung & Park., 2015). Una vez que los datos de la secuencia de la cepa fueron obtenidos, se confirmó a través de los programas de alineamiento que el microorganismo antártico (B1) pertenecía a la especie *A. johnsonii* (Tabla 13).

El uso de cebadores 16 S en la investigación, permitió identificar el aislamiento de *Acinetobacter* spp. a nivel de especie (Jung & Park., 2015; Khosravi et al., 2015), debido a que el gen 16 S presenta múltiples subregiones para la identificación distintiva de varios procariotas, convirtiéndolo en un marcador útil para clasificación taxonómica (Kamble et al., 2020). Esto se confirma en el estudio de Wang et al., (2019), donde aplicó cebadores 16 S para determinar la secuenciación genómica de *A. johnsonii* en un ecosistema de suelos agrícolas contaminados en China.

A. johnsonii tiene un pangenoma abierto y una gran adaptabilidad a diferentes ambientes, por lo que puede distribuirse ampliamente en entornos naturales y clínicos (Jia et al., 2022). El género *Acinetobacter* spp. forma parte del 0,001 % de las poblaciones de bacterias heterótrofas en el ambiente (Kämpfer, 2014) y el 1,7 % se encuentra como *A. johnsonii* en el ámbito clínico

por lo que se sugiere apreciar mejor su diversidad genómica (Castillo et al., 2020), por tal motivo la identificación de esta especie es de gran importancia debido a que es el primer registro de *A. johnsonii* en la Antártica. La ventaja de estudiar esta bacteria es que tiene la capacidad de adaptarse a cualquier tipo de estrés en diferentes condiciones de medio, por lo que se ven obligadas a secretar enzimas claves para la degradación de cualquier fuente potencial de carbono (Centurion et al., 2021).

Tabla 13

Resumen de la caracterización molecular bacteriana

Código	Organismo	Descripción	valor-E	Grado	Acceso NCBI
B1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i> strain NF70 16S	0.0	99.8%	KP772093.1

Tomado de Genious Prime (2021)

4.2 Evaluación de pretratamientos al polietileno

La pérdida de peso del polietileno fue diferente después de la aplicación de los pretratamientos (Tabla 14), obteniéndose una disminución de peso en comparación con el peso inicial (Anexo 11). Por las propiedades químicas que presentan los procesos aplicados, se observó que el porcentaje de pérdida más alto fue de $8,40 \pm 0,016^d$ % con el pretratamiento de Luz UV y el que tuvo menor disminución fue de $5,57 \pm 0,012^c$ % con el pretratamiento con Luz UV+ Tween 80.

Todos los pretratamientos presentaron diferencias significativas en su análisis ($F=14925.91$, $gl=12$, $p\text{-valor}=<0,0001$). Con los resultados obtenidos, se puede interpretar que el porcentaje de pérdida de peso del plástico pretratado con Luz UV (Tabla 14) fue mayor, posiblemente a que la composición del polietileno oxobiodegradable permitió al plástico absorber la radiación UV (Siddiqui, 2019). Los datos obtenidos con luz UV (A1B1 y A1B1 control) (Tabla 14) muestran los más altos porcentajes de pérdida de peso $8,40 \pm 0,016^d$ % y $10,03 \pm 0,069^e$ %, a pesar de que ambos fueron tratados en las mismas condiciones, difieren en sus valores debido a la forma en como fueron expuestas a la luz ultravioleta, siendo el plástico

que se encontraba en la parte intermedia el que recibió mayor exposición en comparación al plástico colocado en los extremos.

Esta absorción se debe a la presencia de prooxidantes en el plástico oxobiodegradable (Kalia & M.S, 2021), que son activados en contacto con la luz ultravioleta (UV) provocando la aceleración de los procesos de ruptura del polímero para obtener compuestos de bajo peso molecular (Gomes et al., 2014) dando como resultado la disminución del peso del plástico. Sin embargo, esta disminución de $8,40 \pm 0,016^d$ % no fue tan alta probablemente a que se necesita una mayor exposición de luz ultravioleta para lograr una escisión en la cadena del polímero (Therias et al., 2021). No obstante, se destaca la disminución de peso con luz UV en esta investigación debido a que Shah et al., (2008), mencionó que una exposición de radiación de alta energía puede ser nociva para el ambiente.

En el pretratamiento con Tween 80 se obtuvo una reducción de peso de plástico menor de $5,57 \pm 0,012^c$ % (Tabla 14), esto posiblemente ocurrió debido a que el Tween 80 presenta una viscosidad alta de 300 - 500 mm²/s, que pudo haberle otorgado peso al plástico impidiendo que este disminuya. Esto se comprueba en el estudio realizado por Jiang et al., (2019) , donde se evaluó el efecto del surfactante Tween 80 en superficies plásticas, obteniendo un incremento de peso de hasta un 18 %. Este comportamiento es atribuido al efecto plastificante del surfactante que varía según la concentración, es decir, mientras más baja la concentración de Tween 80, menor será el volumen del plástico (Delgado et al., 2016).

Además, la composición del Tween 80 al presentar moles de óxido de etileno, estos compuestos permiten que cuando entre en contacto con el plástico, los espacios libres del polímero sean ocupados por la sustancia (Karjiban et al., 2012). Esta reacción hace que el óxido de etileno actúe de mejor manera cuando un plástico es termosensible, caso contrario se acumula en el plástico (Omnexus, 2022).

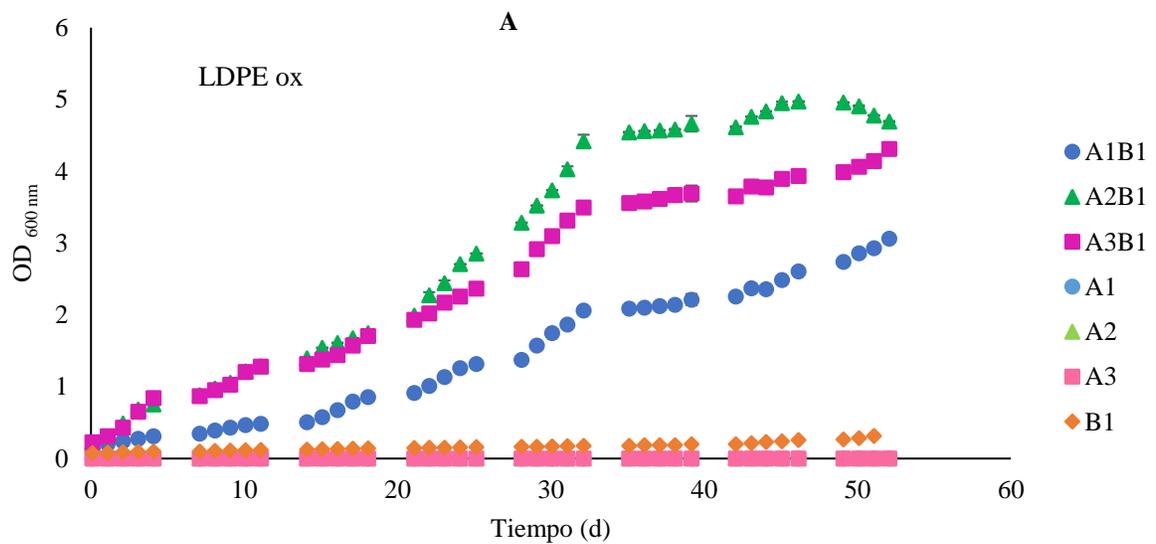
Tabla 14

Pérdida de peso de plástico después de la aplicación de pretratamientos

F=14925.91; gl=12; p= >0,0001		
Pretratamiento	Significado	% Pérdida de peso
A1PE	Plástico +Luz UV	8,40 ± 0,016 ^d
A2PE	Plástico +Tween80	5,57 ± 0,012 ^c
A3PE	Plástico +LuzUV+Tween80	4,27 ± 0,019 ^a
A1PE c	Plástico +Luz UV (Control)	10,03 ± 0,069 ^e
A2PE c	Plástico +Tween80 (Control)	5,43 ± 0,015 ^b
A3PE c	Plástico +LuzUV+Tween80 (Control)	4,32 ± 0,018 ^a

4.3 Cinética de crecimiento bacteriano

La cinética de cada tratamiento se obtuvo mediante la medición de (OD_{600nm}) y conteo en placa (Figura 12) durante los 52 días de funcionamiento del biorreactor.



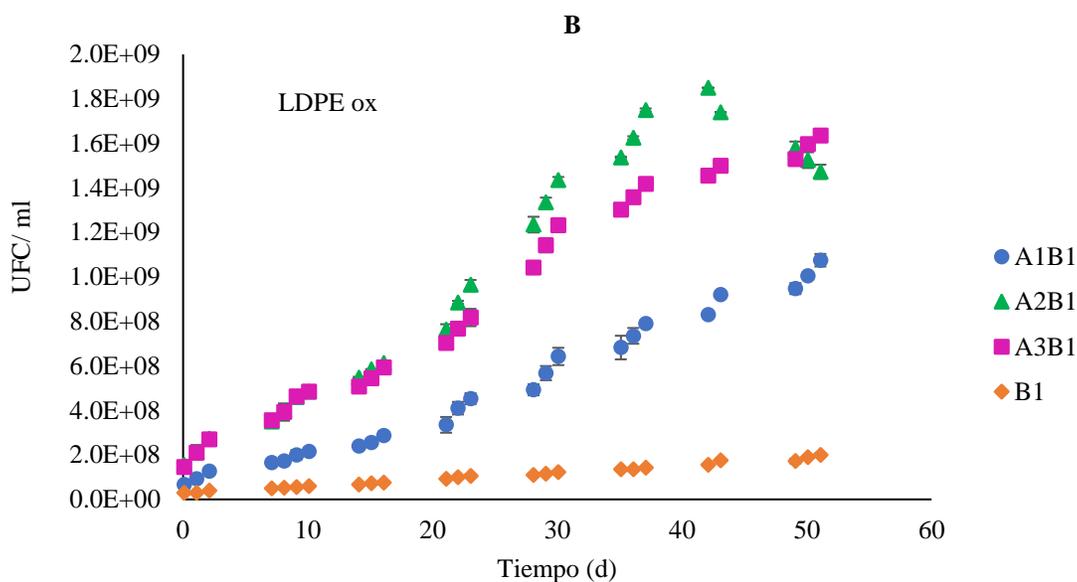


Figura 12. (A) Crecimiento bacteriano a partir de OD_{600nm} y (B) Recuento de células viables (UFC/ml) en medio Bushnell Hass Broth modificado con polietileno de baja densidad oxobiodegradable (LDPE ox) pretratado. (Círculo azul) Fuente de carbono, plástico pretratado con Luz UV + Bacteria, (Círculo celeste) Fuente de carbono, plástico pretratado con luz UV (Control); (Triángulo verde oscuro) Fuente de carbono, plástico pretratado con Tween 80 + Bacteria, Fuente de carbono, (Triángulo verde claro) plástico pretratado con Tween 80 (Control); (Cuadrado morado) Fuente de carbono, plástico pretratado con Luz UV + Tween 80 + Bacteria, (Cuadrado rosado) Fuente de carbono, plástico pretratado con Luz UV + Tween 80 (Control) y (Rombo naranja) Bacteria sin fuente de carbono.

En la Figura 12, se observó que el crecimiento de la cepa del tratamiento A2B1 y A3B1 presentaron los valores de OD_{600nm} y UFC/ml más altos de $(4,69 \pm 0,010^d - 1,47 \times 10^9 \pm 3,18 \times 10^7^c \text{ UFC/ml})$ y $(4,31 \pm 0,007^c - 1,64 \times 10^9 \pm 1,41 \times 10^7^d \text{ UFC/ml})$ respectivamente, en comparación con los otros tratamientos (Anexo 12). Posiblemente a que la acción del Tween 80 sobre el plástico, permitió a la bacteria asimilar de mejor manera los compuestos adheridos en la superficie del polímero, por efecto de la aplicación del pretratamiento. El Tween 80 presenta grupos lipofílicos (Karjiban et al., 2012), estos grupos pueden ser utilizados como fuente de carbono para los microorganismos debido a que posee enlaces más cortos, por lo que es probable que las células bacterianas entraron en contacto con el grupo de ácidos grasos, utilizándolo como fuente de crecimiento (Reitermayer et al., 2018).

En el tratamiento A1B1 (Figura 12) se pudo observar un crecimiento bajo de la bacteria de $3,07 \pm 0,003$ ^b OD_{600nm}– $1,08 \times 10^9 \pm 2,83 \times 10^7$ ^b UFC/ ml, posiblemente a que los plásticos industriales contienen aditivos que al momento que se irradian con luz ultravioleta, producen inhibición en el crecimiento de la bacteria (Davidson & van der Heijden, 2000). De acuerdo con Lear et al., (2021), este efecto provoca un impacto tóxico en el crecimiento celular de las comunidades bacterianas. No obstante, la bacteria probablemente presentó mecanismos propios para resistir la radiación UV del plástico ya que, según Znój et al., (2021) de manera natural en la Antártida las bacterias se exponen a elevadas radiaciones UV. Esta resistencia se debe a que cuentan con un sistema de defensa antioxidante conformado por enzimas catalasas, que juegan un papel importante en la tolerancia de la radiación (Di Capua et al., 2011). Sin embargo, esta capacidad de defensa para la supervivencia de *Acinetobacter* spp. puede variar enormemente dependiendo de su especie (Hare et al., 2012).

Por otra parte, el tratamiento menos eficiente fue B1 (Figura 12), ya que la bacteria fue incapaz de crecer en el medio, mostrando valores de OD_{600nm} y UFC/ml bajos de $0,32 \pm 0,006$ ^a y $2,00 \times 10^8 \pm 7,07 \times 10^6$ ^a UFC/ml, esto ocurrió debido a que el medio de cultivo no tenía polietileno como fuente de carbono, a diferencia de los otros tratamientos. Tomando en cuenta que *Acinetobacter* spp. tiene la capacidad de utilizar polietileno de baja densidad como única fuente de carbono y energía para su crecimiento (Mohan et al., 2020), sin la presencia del plástico u otra fuente de carbono, no sería capaz de crecer en el medio de acuerdo a los estudios mencionados por Yin et al., (2020). Por tal motivo se resalta la bacteria *Acinetobacter* spp., ya que al ser heterótrofa (Kämpfer, 2014) necesita de una fuente de carbono externa aparte de macro y micronutrientes (Caycedo et al., 2021) para su crecimiento y metabolismo (Wang et al., 2019).

Se realizó una curva (Anexo 13) relacionando las medidas de OD_{600nm} con las medidas de UFC/ml (Figura 12), debido a que el valor de OD_{600nm} obtenido se debe completamente a la luz dispersada de la muestra. Por tal motivo es necesario correlacionar la absorbancia con la concentración de células en el cultivo (Ikonen et al., 2013), donde se obtuvo coeficientes de correlación (P) cercanos a 1(Anexo 13). Estos valores de correlación presentaron un alto grado

de asociación entre ambas mediciones, lo que indica un buen modelo de ajuste como lo menciona Guzmán et al., (2012).

En la tabla 15 se muestra la tasa de crecimiento de biomasa (rx) y el rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato (Y_s^x). Los datos indicaron que la mayor tasa de crecimiento de biomasa correspondía al tratamiento A2B1 con $4,31 \times 10^7 \pm 7,64 \times 10^5$ UFC/d, presentando el mayor número de células en el medio a diferencia de los demás tratamientos. Esto probablemente se deba a que el Tween 80 otorgó otra fuente de carbono a parte del plástico para ser asimilado por la bacteria (Reitermayer et al., 2018), favoreciendo el incremento de la biomasa bacteriana (Rincón et al., 2019). En relación con el rendimiento, se observó la relación de consumo del plástico y la producción de biomasa, siendo el tratamiento A2B1 el que presentó el rendimiento más alto de $2,16 \times 10^6 \pm 8,64 \times 10^4$ UFC X/mgd S. Esta relación ocurre porque la bacteria necesita de un sustrato para adaptarse y poder crecer, por lo tanto a medida que la cantidad de UFC/ml aumentaba, el plástico se consumía reduciendo su peso (Doran, 2013).

Tabla 15

Tasa de crecimiento y rendimiento de la biomasa

Tratamiento	rx (UFC/d)	Y_s^x (UFC X/mgd S)
A1B1	$1,95 \times 10^7 \pm 9,56 \times 10^4$	$1,84 \times 10^6 \pm 1,06 \times 10^5$
A2B1	$4,31 \times 10^7 \pm 7,64 \times 10^5$	$2,16 \times 10^6 \pm 8,69 \times 10^4$
A3B1	$3,44 \times 10^7 \pm 2,87 \times 10^5$	$1,78 \times 10^6 \pm 1,16 \times 10^5$
B1	$3,04 \times 10^6 \pm 2,87 \times 10^5$	

Con los datos obtenidos de absorbancia y UFC/ml se analizaron tres días importantes de la fase de crecimiento de la bacteria (Anexo 14). El día uno corresponde a la fase de latencia, fase donde las bacterias se adaptan al medio de cultivo, esto permitió observar en que tratamiento se adaptó más rápido la bacteria. El día 26 de crecimiento donde las bacterias estaban en su fase exponencial, se pudo observar el crecimiento activo del microorganismo. Finalmente, el día 52 donde algunas bacterias llegaron a la fase estacionaria, la población bacteriana empezó a disminuir por agotamiento de nutrientes, este día permitió observar cual de la cepa bacteriana fue la que presentó el mayor crecimiento.

En el Anexo 14 se pudo observar que la cepa bacteriana del tratamiento A2B1 fue la que alcanzó el mayor crecimiento de acuerdo con sus valores de OD_{600nm} y UFC/ml mostrando las medias más altas de $0,19 \pm 0,007^c$ - $1,55 \times 10^8 \pm 2,12 \times 10^7^b$ UFC/ml y $2,85 \pm 0,003^d$ - $9,65 \times 10^8 \pm 2,12 \times 10^7^d$ UFC/ml durante la fase de latencia y exponencial respectivamente, siendo estadísticamente diferente a los demás tratamientos. Sin embargo, en el día 52 se observó que la cantidad de UFC/ml presente de la cepa A2B1 fue de $1,47 \times 10^9 \pm 3,18 \times 10^7^c$ UFC/ml, cantidad menor a la de A3B1 con $1,64 \times 10^9 \pm 1,41 \times 10^7^d$ UFC/ml. Estos valores se ven influenciados por la tasa de crecimiento específica (μ), el tiempo de duplicación (td) y el coeficiente de correlación múltiple (R^2) de la especie bacteriana (Tabla 16).

En la tabla 16 se observa que la cepa del tratamiento A1B1 fue la que tuvo el crecimiento más rápido de acuerdo a su μ y td . A pesar de que la cepa del tratamiento A2B1 y A3B1 tenían un crecimiento más lento, presentaron concentraciones más altas de biomasa (Tabla 15) durante la fase exponencial, posiblemente esto ocurre debido a la baja concentración de algún nutriente (Allen & Waclaw, 2019), en este caso la disminución de los ácidos grasos del Tween 80. Además, al finalizar la fase exponencial, el valor de μ comienza a disminuir lo que indica que en esos días los cultivos ya se encontraban en fase estacionaria (Olivia et al., 2007). Por otra parte, en el coeficiente de correlación múltiple (R^2) (Tabla 16), se obtuvo una correspondencia alta en las mediciones de OD_{600nm} y UFC/ml en los tratamientos A1B1 de $0,93 \pm 0,005$ - $0,93 \pm 0,008$ y B1 de $0,98 \pm 0,002$ - $0,94 \pm 0,017$, a diferencia de los tratamientos A2B1 que tuvo un valor de $0,84 \pm 0,012$ - $0,85 \pm 0,031$ y A3B1 de $0,84 \pm 0,009$ - $0,89 \pm 0,014$. Sin embargo, todos los coeficientes mostraron valores cercanos a 1 demostrando que el modelo lineal es bueno, ya que mientras mayor sea el R^2 , mejor será el ajuste de los datos (Rincón et al., 2019) y las estimaciones más fiables (Rohim et al., 2020).

Tabla 16

Tasa de crecimiento bacteriano, tiempo de duplicación y coeficiente de correlación múltiple de A. johnsonii

OD_{600 nm}			
Tratamiento	μ (1/d)	td (d)	R^2
A1B1	$0,0540 \pm 0,0003$	$18,51 \pm 0,101$	$0,93 \pm 0,005$
A2B1 (fase exponencial)	$0,0642 \pm 0,003$	$15,60 \pm 0,61$	$0,90 \pm 0,018$

A2B1 (fase estacionaria)	0,0502 ± 0,0006	19,92 ± 0,220	0,84 ± 0,012
A3B1	0,0452 ± 0,0005	22,15 ± 0,248	0,84 ± 0,009
B1	0,0223 ± 0,0005	44,82 ± 1,019	0,98 ± 0,002
UFC/ml			
Tratamiento	μ (1/d)	<i>td</i> (d)	R^2
A1B1	0,0483 ± 0,002	20,71 ± 0,715	0,93 ± 0,008
A2B1 (fase exponencial)	0,057 ± 0,004	17,46 ± 1,16	0,96 ± 0,007
A2B1 (fase estacionaria)	0,0424 ± 0,001	23,61 ± 0,417	0,85 ± 0,031
A3B1	0,0415 ± 0,001	24,13 ± 0,772	0,89 ± 0,014
B1	0,0343 ± 0,001	24,14 ± 1,107	0,94 ± 0,017

De acuerdo con los valores obtenidos de cinética se determinó que la bacteria *A. johnsonii* tiene la capacidad de degradar el polietileno de baja densidad oxobiodegradable para su adaptación y crecimiento. Este desempeño biológico de la cepa en la degradación está confirmado en otros estudios, donde la bacteria en procesos de biorremediación puede metabolizar compuestos inorgánicos como hidrocarburos aromáticos, impurezas de aceites, aminoácidos, entre otros para generar metabolitos secundarios o gas carbónico (Jiang et al., 2018; Percival & Williams, 2014).

4.4 Degradación de Polietileno

4.4.1 Pérdida de peso después de la degradación biológica

El peso del polietileno después del tratamiento (Anexo 15) fue diferente al peso de ingreso al biorreactor, observándose una disminución del plástico después de la degradación biológica (Figura 13). El tratamiento que contenía plástico pretratado con Tween 80 + Bacteria (A2B1), obtuvo el porcentaje de pérdida de peso más alto de $20,31 \pm 0,12^f$ % en comparación con los demás tratamientos. Por lo contrario, el porcentaje más bajo fue de $11,58 \pm 0,153^d$ %, que correspondió al tratamiento que tenía plástico pretratado con Luz UV + Bacteria (A1B1). Se pudo observar que todos los tratamientos que tenían bacteria presentaron disminución en el peso del plástico en comparación con sus controles.

Después de obtener los porcentajes de pérdida de peso, se observó diferencias significativas en todos los datos ($F=6055.14$, $gl=12$, $p\text{-valor}=<0,0001$) (Figura 13) el porcentaje de pérdida de peso final para el plástico pretratado con Tween 80 y expuesto a la acción microbiana (A2B1) obtuvo un valor del $20,31 \pm 0,12^f$ %. Esta disminución de peso posiblemente sucede porque las propiedades del surfactante (Tween 80) tuvieron un efecto positivo en la “oxidación del plástico”. Esto concuerda con otros estudios en donde el Tween 80 al entrar en contacto con una solución acuosa (Medicines Agency, 2018), ocasiona que el surfactante sea más soluble y disminuya su viscosidad (Karjiban et al., 2012), permitiendo que los microorganismos tengan mayor biodisponibilidad con el plástico para que se lleve a cabo la biodegradación (Periche & Robles, 2016).

El porcentaje de pérdida de peso para el plástico pretratado con Luz UV+ Bacteria (A1B1) (Figura 13) fue de $11,58 \pm 0,153^d$ %, este tratamiento tuvo una leve disminución en el peso del plástico debido a que la bacteria tuvo un crecimiento lento en este medio. Sin embargo, la luz ultravioleta ayudo a la despolimerización del plástico, porque este proceso por sí solo puede actuar como un inductor foto-oxidativo en la degradación abiótica del plástico, para que la bacteria pueda metabolizar al polímero (Montazer et al., 2018). Esta acción de foto-oxidación concuerda con otros estudios enfocados en la degradación de plásticos, donde la presencia de prooxidantes en el polímero permite acelerar el envejecimiento (Mohan et al., 2020), producto de la absorción de la radiación ultravioleta (Kalia & M.S, 2021).

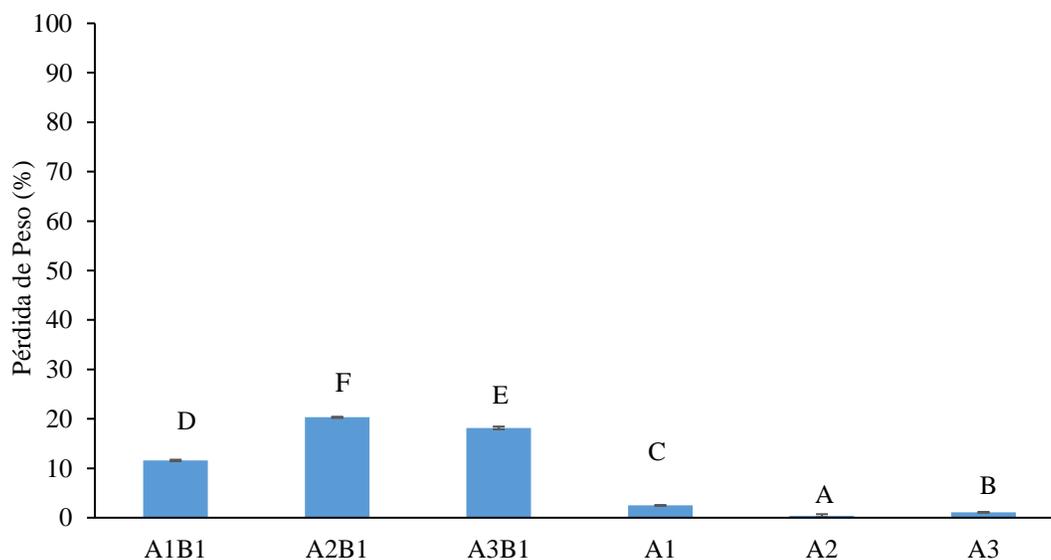


Figura 13. Pérdida de peso del plástico pretratado en un biorreactor batch con *A. johnsonii*.

Mediante los datos obtenidos, se calculó la tasa de degradación del plástico (k), la tasa de consumo del sustrato (rsu) y el tiempo de vida media del plástico (tm) (Tabla 17). El tratamiento A2B1 presentó la tasa de consumo de sustrato más alta de $0,020 \pm 0,0004$ g/d en comparación con los otros tratamientos, esto ocurre posiblemente a que las células necesitan consumir nutrientes tomados del entorno. En este caso el plástico se convierte en el nutriente limitante además del aditivo “Tween 80”, debido a que sus cadenas de carbono son cortas (Medicines Agency, 2018), por lo que el Tween 80 también tomó el papel de sustrato. Por lo tanto se puede afirmar, que el pretratamiento aplicado contribuyó en la disminución de peso del plástico en un 20% en un periodo de 52 días. De manera general en todos los tratamientos, se pudo observar que la cantidad de biomasa aumentó con el consumo de sustrato (Wang et al., 2007), produciendo un nuevo material celular, además de dedicarse al mantenimiento de las células (Mazzeo & Piemonte, 2019).

En la investigación, la temperatura influyó en el microorganismo creciendo en un ambiente frío de 15° C, debido a que los índices de degradación tienden a ser menores en temperaturas bajas y disponibilidad de oxígeno (Mohanan et al., 2020). La disponibilidad de nutrientes también es necesaria para el crecimiento, debido a que el biorreactor no era de alimentación constante, la reducción de medio también pudo afectar en el proceso de degradación (Poznyak et al., 2019). Otro de los factores que influyó fue el tamaño y forma del material a degradar, ya que las muestras que tienen la misma composición y masa, pero diferente superficie, puede presentar índices de degradación diferentes (Chamas et al., 2020). En cuanto al tiempo de vida media (Tabla 17) representó el tiempo que se requería para que se degrade la mitad del plástico inicial. Sin embargo, el tiempo de degradación no se mantiene constante ya que pueden variar los tiempos estimados aplicando otras condiciones (Chamas et al., 2020).

Tabla 17

Tasa de degradación, Tasa de consumo y tiempo de vida media del polietileno de baja densidad oxobiodegradable

Tratamientos	k (1/d)	rsu (g/d)	tm (año)
A1B1	$0,0002 \pm 2,92E-06$	$0,010 \pm 0,0005$	$10,68 \pm 0,18$
A2B1	$0,0004 \pm 0,00011$	$0,020 \pm 0,0004$	$4,48 \pm 0,97$
A3B1	$0,0003 \pm 6,83E-06$	$0,019 \pm 0,0010$	$5,93 \pm 0,13$

4.4.2 Cuantificación de CO₂

En la Figura 14 se muestra la cantidad de CO₂, que fue calculada a partir de las mediciones de titulación (A) y absorbancia de fenolftaleína (B).

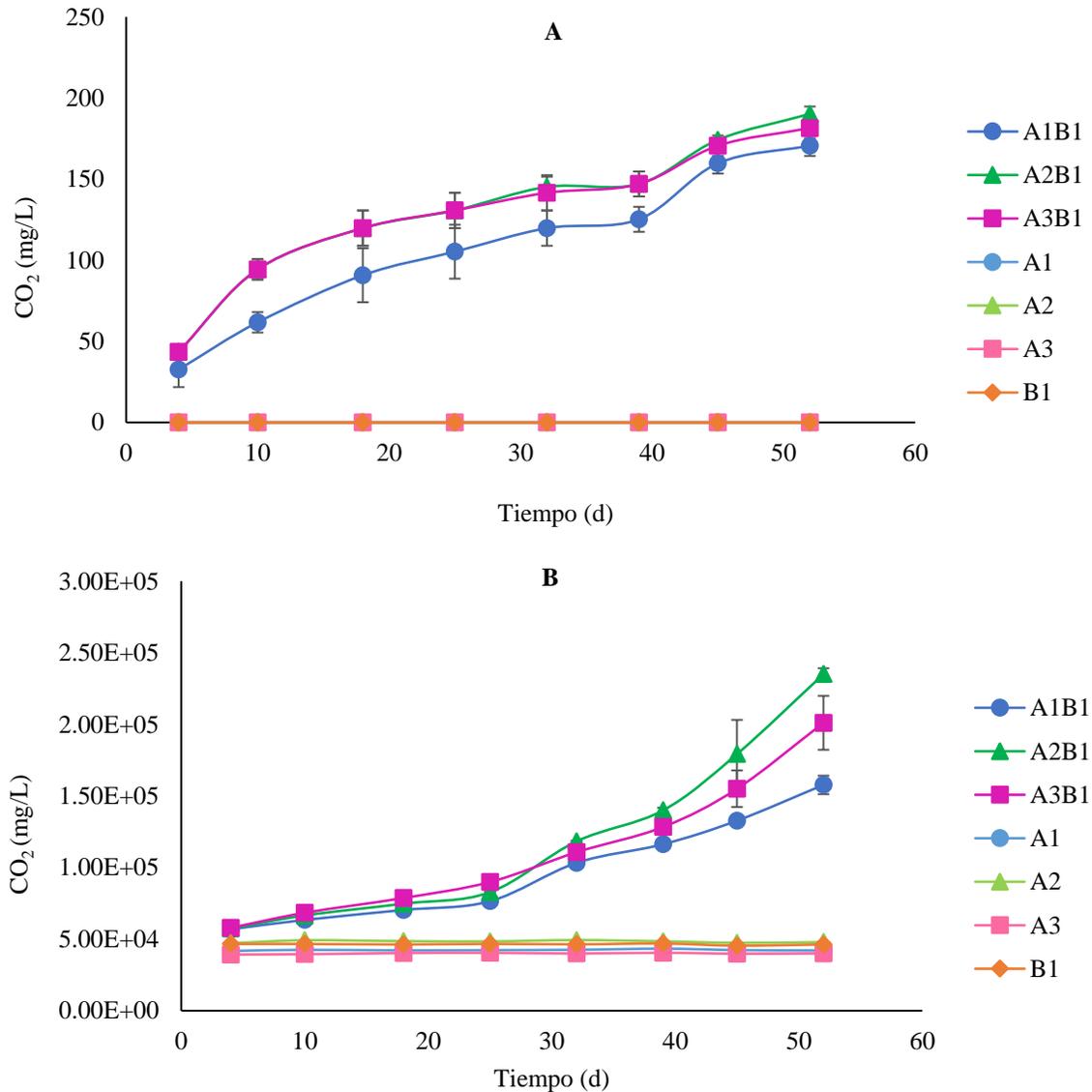


Figura 14. CO₂ liberado calculado mediante el Método Respirométrico (A) y la Absorbancia de fenolftaleína (B).

El CO₂ calculado (Figura 14) por los procesos de titulación y absorbancia de fenolftaleína, producto de la degradación y del metabolismo de mantenimiento de la bacteria, mostró valores de CO₂ bajos en el tratamiento A1B1 en comparación con los tratamientos A2B1 y A3B1 que presentaron mayor liberación de gas carbónico. Los valores difieren bastante en

ambos procesos por el error de medición humano, sin embargo, a pesar de que la titulación por el método volumétrico presentó sesgos e incertidumbres (Morales et al., 2019) resultó ser el mejor a comparación con el proceso de absorbanza de fenolftaleína. Este método presentó datos muy altos de CO₂, posiblemente a que las mediciones de fenolftaleína variaban constantemente. Esto ocurre debido a que las soluciones acuosas de fenolftaleína no son estables (Goel & Nene, 1995), precipitándose con el tiempo y generando errores en las estimaciones (Vargas et al., 2015).

A partir de los datos de HCl (Anexo 16) obtenidos de la titulación se calculó la cantidad de CO₂ liberado (Figura 14A), donde se observó mayor liberación de gas carbónico de 190,23 ± 4,53^{bc} mg/L y 181,52 ± 6,29^c mg/L en el tratamiento A2B1 y A3B1 respectivamente, en comparación con el tratamiento A1B1 que presentó una liberación de CO₂ de 170,63 ± 6,29^b mg/L. Sin embargo, estos 3 tratamientos tuvieron diferencias significativas en comparación con los blancos (Tabla 18) lo que indica que el plástico pretratado también influyó en la liberación de CO₂.

Tabla 18

Liberación de CO₂ durante el periodo de incubación mediante el método de titulación

	Día 4	Día 25	Día 52
	F=83.00, gl=14, p=0,0001	F=177.34, gl=14, p=0,0001	F=1975.74, gl=14, p=0,0001
Tratamiento	CO₂ mg/L	CO₂ mg/L	CO₂ mg/L
A1B1	32,67 ± 10,89 ^b	105,28 ± 16,64 ^b	170,63 ± 6,29 ^b
A2B1	43,56 ± 8,70E-15 ^b	130,69 ± 10,89 ^c	190,23 ± 4,53 ^{bc}
A3B1	43,56 ± 8,70E-15 ^b	130,69 ± 10,89 ^c	181,52 ± 6,29 ^c
A1	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
A2	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
A3	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
B1	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a

El tratamiento A2B1 (Figura 14A) presentó los valores más altos de liberación de CO₂ de 190,23 ± 4,53^{bc} mg/L, posiblemente a que la bacteria tomó como fuente de carbono una parte de los residuos, producto del pretratamiento con Tween 80 y otra parte pudo tomarla de las cadenas de carbono del plástico. Las propiedades del surfactante permitieron la adherencia del

microorganismo en el plástico (Wilkes & Aristilde, 2017), la bacteria se fija en la superficie donde se encuentran los grupos lipofílicos del Tween 80; y por presentar cadenas cortas pueden pasar al interior de la célula bacteriana (Alshehrei, 2017). Finalmente, se integra al metabolismo como fuente de carbono y energía en el ciclo de los ácidos grasos por beta-oxidación (Lucas et al., 2008; Shah et al., 2008) o en el ciclo de ácido tricarbóxico generando CO₂ (Houten et al., 2016; Knieneyer & Heider, 2001; Hamme et al., 2003).

La menor liberación de CO₂ fue de $170,63 \pm 6,29^b$ mg/L en el tratamiento A1B1 (Figura 14A), posiblemente a que la previa oxidación del plástico con luz UV permitió la formación de pocos radicales libres. La bacteria pudo haber tomado estos radicales como energía para su crecimiento y para generar CO₂, debido a que el oxígeno y la radiación ultravioleta son determinantes importantes que inician con la escisión del polímero (Montazer et al., 2018). De esta manera, los productos generados de este proceso son más susceptibles de ser degradados por la bacteria (Moharir & Kumar, 2019). El microorganismo emplea el metabolismo central del carbono para luego entrar a la beta-oxidación y al ciclo del TCA para la generación de CO₂ (Ghosh et al., 2019).

En base a los datos de CO₂ obtenidos por titulación, se calculó la velocidad de producción de CO₂ (m), la tasa de producción de CO₂ (rp) y el rendimiento del CO₂ (Y_s^p) (Tabla 19). Se observó que la velocidad de producción (m) fue de $0,031 \pm 0,0054$ d⁻¹ que correspondió al tratamiento A1B1, mientras que la del tratamiento A2B1 fue menor $0,024 \pm 0,0006$ d⁻¹, sin embargo, presentaba la mayor tasa de producción de CO₂ de $3,06 \pm 0,09$ (m/L)/d. La tasa de producción (rp) indicó la cantidad de CO₂ liberada como producto final del proceso metabólico de la bacteria (Poznyak et al., 2019), observándose valores bajos, posiblemente esto ocurrió por la manipulación del biorreactor generando pérdida de CO₂ durante el proceso de funcionamiento. En cuanto al rendimiento (Y_s^p), se pudo observar la relación entre el sustrato y la producción de CO₂, esta relación se da ya que el consumo de sustrato no sólo se dedica al mantenimiento de la bacteria, sino también en parte a la producción de un nuevo material celular (Mazzeo & Piemonte, 2019). Se pudo observar que el mayor rendimiento de $0,27 \pm 0,004$ mg P/ mg S en el tratamiento A1B1, esto posiblemente ocurre porque la bacteria aún se mantenía en la fase exponencial a diferencia de los otros tratamientos.

Tabla 19*Velocidad de producción, tasa de producción y rendimiento de CO₂*

Tratamiento	m (1/d)	rp ((m/L)/d)	Y_s^p (mg P/mg S)
A1B1	0,031 ± 0,0054	2,87 ± 0,26	0,27 ± 0,004
A2B1	0,024 ± 0,0006	3,06 ± 0,09	0,15 ± 0,00
A3B1	0,023 ± 0,0011	2,87 ± 0,13	0,15 ± 0,001

Por otra parte, para la medición de CO₂ (Figura 14B) se midió la absorbancia de NaOH con fenolftaleína (Anexo 17). La curva estándar obtenida de la absorbancia (Anexo 18) mostró el comportamiento de la fenolftaleína con diferentes concentraciones de NaOH. Esta concentración se midió debido a que el hidróxido es una sustancia utilizada para capturar el CO₂ liberado (Alonso et al., 2010; Blanco et al., 2009). A partir de la ecuación de la curva estándar, se obtuvo la concentración de NaOH de cada tratamiento (Anexo 19), donde se observó una disminución de la concentración de la base con el transcurso del tiempo. Esto ocurre por la reacción entre el CO₂ con la base álcali que provoca que se consuman los iones hidroxilo de NaOH, a medida que se absorbe el CO₂, porque el CO₂ se difunde en la fase líquida y es absorbido químicamente por el NaOH (Ruiz Salmón et al., 2018). Finalmente la reacción forma bicarbonato de sodio NaHCO₃ (Mahmoudkhani & Keith, 2009), la formación de este producto depende del contacto entre ambos compuestos (Prada & Cortés, 2011).

Otro de los factores de análisis fue el pH que disminuyó en el transcurso del tiempo, se observó que el tratamiento A2B1 obtuvo el valor más bajo de (pH 4), seguido del tratamiento A3B1 y A1B1 con (pH 4,5 y 5) respectivamente, posiblemente este proceso ocurrió debido al metabolismo de la bacteria y medio utilizado. El factor que corresponde a la composición del medio influye en la evolución del pH dependiendo de las fuentes utilizadas (Sánchez et al., 2020), ya que el propio metabolismo de la bacteria puede modificar el pH durante la fase de crecimiento y adaptación, hasta que la bacteria alcance un pH óptimo (Sánchez et al., 2018). De acuerdo a Ram & Sangeeta, (2016), el pH adecuado para el desarrollo de una bacteria se encuentra en un rango ácido, por los valores obtenidos en el estudio, el microorganismo se encuentra en el grupo de los acidófilos ya que pudieron crecer a un pH bajo (Jin & Kirk, 2018).

4.4.3 Análisis microscópico del polímero

Mediante un análisis de microscopía con ayuda de un estereoscopio se pudo visualizar cambios físicos del plástico después de aplicar el proceso de degradación (Figura 15). Físicamente, se observó señales de envejecimiento en el plástico en comparación con los blancos. El plástico tratado con A2B1 y A3B1 presentaron superficies con líneas más pronunciadas y un cambio de color; por lo contrario, el tratamiento A1B1 mostró cambios leves en su superficie plástica.

Los cambios en el plástico (Figura 15) pueden generarse debido a la aplicación de tecnologías fisicoquímicas como la luz UV, haciendo que la cadena del polímero se reduzca, generando modificaciones en la morfología del polímero (Ghatge et al., 2020). Además, durante la degradación en diferentes condiciones, los aditivos oxodegradables del plástico se liberan en el medio y como resultado la superficie del plástico cambio de color, esto indica que tuvo alguna modificación por los tratamientos (Dang et al., 2018).

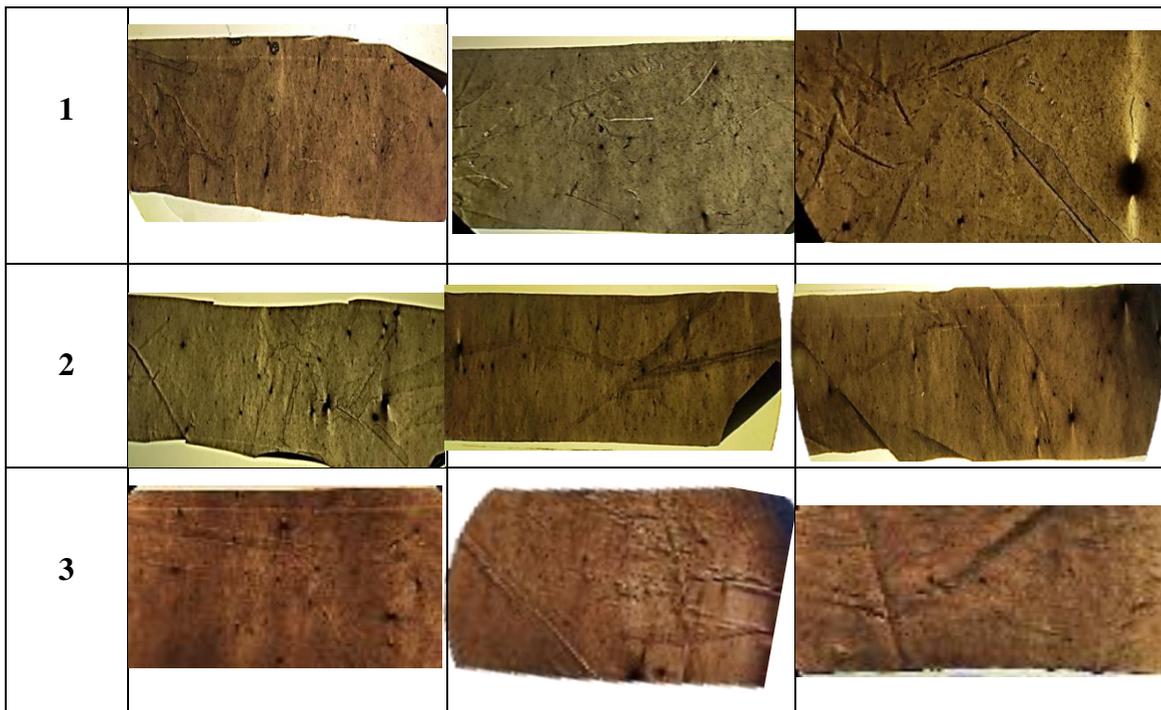
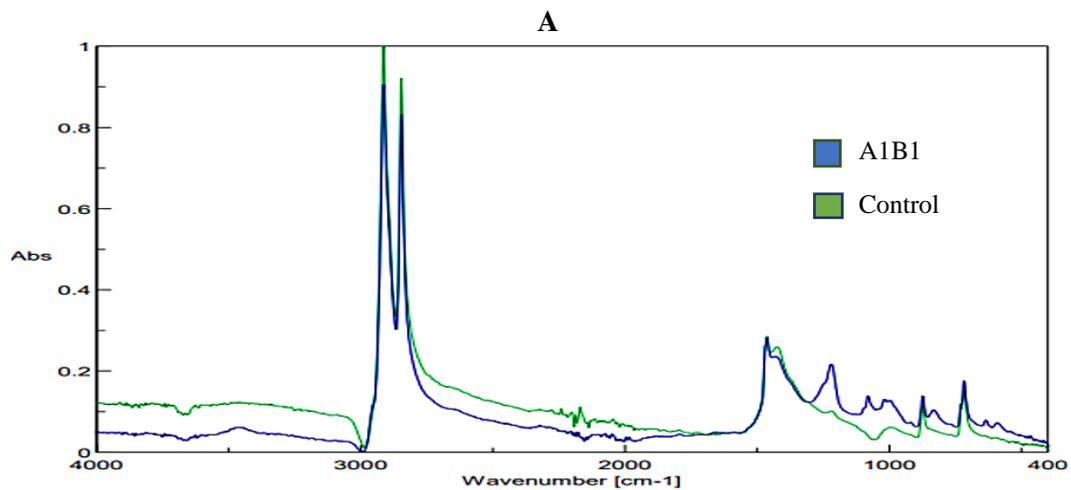




Figura 15. Imágenes de las películas de plástico después de 52 días de degradación biológica en un biorreactor batch. 1, 2 y 3 corresponde a las repeticiones realizadas

4.4.4 Análisis F-TIR de la estructura química del polietileno

Los cambios en la estructura del polímero luego de la aplicación de cada uno de los tratamientos fueron evaluados mediante la técnica F-TIR (Figura 16). Se pudo observar los picos de absorbancia y transmitancia del plástico, en base a el número de onda (cm^{-1}) después de la aplicación de tratamientos en comparación con el control, mediante los cuales se pudo identificar el grupo funcional.



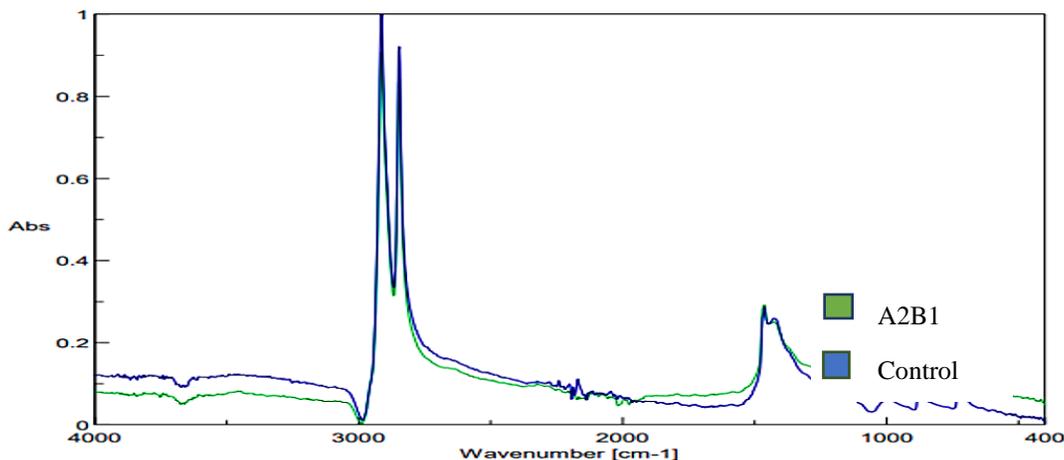


Figura 16. Espectro infrarrojo de las muestras plásticas después de la degradación biológica. Gráficas obtenidas del laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela Politécnica Nacional (2021).

En la Figura 16 se muestra una descripción general de los espectros F-TIR, en el cual las señales de LDPE ox después de la degradación biológica presentaba rangos de (2913.91-2846.42) cm^{-1} , que corresponden a movimientos de estiramiento, movimiento de deformación de 1461.78 cm^{-1} y un movimiento de vibración esquelética de 717.39 cm^{-1} . Estas frecuencias vibracionales, determinan el grupo químico del elemento (Berthomieu & Hienerwadel, 2009), de acuerdo con su absorción corresponden a bandas característicos del polietileno de baja densidad (LDPE) (Velandia, 2017).

Los picos del plástico más fuertes fueron de 2913.91 cm^{-1} , esto permitió asignar que el polímero presentaba grupos alcanos ($\text{R}(\text{CH}_2)_4\text{-C}$), debido a que existió mayor absorción de luz por la molécula (Velandia, 2017), lo que explicaría el estiramiento asimétrico (Anexo 20). En cuanto a los picos que presentaron porcentajes cercanos a 100% (Anexo 21), corresponden a ruidos de medición que representan otros residuos, producto de los pretratamientos en el plástico que generalmente aparecen cuando se realizan procesos de degradación (Prushan, 2017). Estas vibraciones fueron determinados por el laboratorio de Análisis Instrumental como impurezas, debido a que son picos que tienen una baja intensidad y no corresponden a los grupos funcionales del polímero.

Las tiras plásticas (Figura 16), presentaron leves cambios en sus espectros en comparación con los controles, lo que indica que hubo alguna alteración de ellos por la aplicación de pretratamientos y la acción de la bacteria. No obstante, aparte de visualizarse

bandas de vibraciones de enlaces simples, también pueden surgir picos de grupos carbonilo, deformación de grupos alcanos (CH_3), bandas de conjugación ($\text{C}=\text{C}$) (Mahalakshmi et al., 2012), cetonas ($\text{C}=\text{O}$), enlace ($\text{C}-\text{O}$) (Veerasingam et al., 2021), así también deben aparecer otros grupos como ácidos carboxílicos ($\text{R}-\text{COOH}$) y alcoholes ($\text{R}-\text{OH}$) (Jayaprakash & Palempalli, 2018; Skariyachan et al., 2016). Por lo tanto, para evaluar el grado de degradación, debe haber una disminución e intensidad en las bandas para confirmar la oxidación completa del plástico (Markowicz & Szymańska, 2021).

En el análisis de grupos funcionales (Anexo 20) se encontraron impurezas, posiblemente generadas por la aplicación de pretratamientos, debido a que estos generan productos de oxidación del polietileno (Koutny et al., 2006; Ojeda et al., 2009). Estas impurezas provienen de sustancias que se añaden al plástico para mejorar su disponibilidad como el EDTA, aceite mineral y diferentes Tweens (Hua et al., 2007), además de los procesos de exposición UV (Montazer et al., 2018). Los productos de oxidación posiblemente pudieron interferir en la degradación microbiana del polietileno, porque pueden ser consumidos por los microorganismos como fuente de carbono. Sin embargo, la bacteria si pudo consumir las cadenas del plástico, lo que explicaría la baja reducción del peso y cantidad de CO_2 liberada (Montazer et al., 2020).

CAPÍTULO V

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Los pretratamientos aplicados permitieron evaluar el efecto que tenían en el peso del plástico. La luz UV fue el mejor entre todos los pretratamientos, obteniendo el porcentaje de pérdida de peso más alto de $8,40 \pm 0,016^d$ %, esto resultó debido a que la composición del polietileno requiere de la radiación para dar inicio al proceso de degradación.

La cinética de crecimiento de la especie *A. johnsonii* utilizando como fuente de carbono plástico pretratado fue diferente en cada uno de los tratamientos. El pretratamiento con Tween 80 obtuvo el crecimiento más alto de la bacteria, presentando la mayor cantidad de células $1,47 \times 10^9 \pm 3,18 \times 10^7^c$ UFC/ml, alcanzando rápidamente la fase estacionaria. Esto se debió a que la acción oxidativa del compuesto mejoró las condiciones en el medio, otorgándole a la bacteria otra fuente de carbono para su crecimiento.

El CO₂ calculado a partir del método respirométrico, se generó a partir del metabolismo propio de la bacteria, tomando como carbono los productos de oxidación formados después de la aplicación de pretratamientos., el tratamiento con plástico pretratado con Tween 80 y expuesto a la acción bacteriana, mostró mayor liberación de CO₂ de $190,23 \pm 4,53$ mg/L.

En los espectros obtenidos del análisis F-TIR, se observó bandas de vibraciones, siendo los grupos alcanos (R(CH₂)₄-C) el grupo químico del polímero, indicativo de la alteración del plástico después de la aplicación de los tratamientos. No obstante, también fue necesaria la formación de otros grupos funcionales como ácidos carboxílicos (R-COOH), alcoholes (R-OH) y cetonas (C=O) para confirmar una oxidación completa del plástico.

El polietileno de baja densidad oxobiodegradable presentó “impurezas” de acuerdo con el análisis F-TIR, estas impurezas corresponden a cadenas cortas de carbono no pertenecientes al

grupo funcional del plástico. Generalmente suelen aparecer en los polímeros debido a la falta de procesos de eliminación de materia en el polímero pretratado, por lo que probablemente el microorganismo consumió estos residuos de carbono además del plástico.

La acción oxidativa del tratamiento de Tween 80+ Bacteria permitió que la especie *A. johnsonii* sea capaz de degradar el polietileno de baja densidad, haciendo que el peso del plástico disminuya. La bacteria presentó una capacidad de degradación baja debido a su metabolismo lento. No obstante, esta capacidad es significativa porque redujo en un $20,31 \pm 0,12^f$ % el peso del polietileno de baja densidad.

5.2 Recomendaciones

Realizar el mismo estudio variando otras condiciones del medio de cultivo como aireación, temperatura y pH para aumentar la capacidad de degradación de *A. johnsonii*. Además, se debería realizar una constante alimentación de medio de cultivo Bushnell Hass Broth, para poder aumentar el tiempo de análisis, por el motivo que se extrae constantemente muestras del medio para llevar a cabo las mediciones.

Utilizar otros surfactantes diferentes al Tween 80 que no presenten propiedades de adhesión como el EDTA o aceite mineral, para evitar interferencias de otras fuentes de carbono en la degradación.

Desarrollar el mismo estudio utilizando un medidor de demanda biológica de oxígeno (DBO) para calcular la cantidad de CO₂. También se puede emplear un aparato de medición de concentración de CO₂ “PBA-W M” para obtener de manera precisa la cantidad del componente y evitar cualquier error de medición durante el proceso de análisis.

Emplear procesos de limpieza que incluya el uso de etanol, agua destilada y cloruro de sodio cristalino (NaCl), para disminuir cualquier residuo y materia orgánica adherida que no corresponda a los grupos funcionales; y así evitar interferencias en el proceso de degradación bacteriana.

Emplear en este estudio consorcios bacterianos que incluyan a los géneros *Pseudomona* spp. y *Bacillus* spp., para aumentar la capacidad de degradación del plástico, además que esto permitirá que el crecimiento y flujo cíclico de nutrientes sea más eficiente en el biorreactor.

Aplicar ensayos de tracción para analizar la resistencia y rigidez del polímero después de la aplicación de Tween 80, esto permitirá comprender como el plástico se oxida al momento de emplear este surfactante.

REFERENCIAS

- Aj, J., & Mh, A.-M. (2021). *Easy and Simple Method to Measure Contact Angle of Polymer/Solution*. <https://doi.org/10.36266/JCET/134>
- Akhatova, F., Ishmukhametov, I., Fakhrullina, G., & Fakhrullin, R. (2022). Nanomechanical Atomic Force Microscopy to Probe Cellular Microplastics Uptake and Distribution. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020806>
- Akhbarizadeh, R., Moore, F., & Keshavarzi, B. (2019). Investigating microplastics bioaccumulation and biomagnification in seafood from the Persian Gulf: a threat to human health? *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 36(11), 1696–1708. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1649473>
- Alcántara, T., Sadith, Y., Mauricio, J., & Ruiz, V. (2015). *DEGRADATION KINETICS COMPOUNDS PHENOLS AND ANTHOCYANINS IN A FUNCTIONAL BEVERAGE BASED BLUEBERRY (Vaccinium corymbosum L.)*.
- Ali, S., Elsamahy, T., Koutra, E., Kornaros, M., El-Sheekh, M., Abdelkarim, E. A., Zhu, D., & Sun, J. (2021). Degradation of conventional plastic wastes in the environment: A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. *Science of the Total Environment*, 771, 144719. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144719>
- Allen, R. J., & Waclaw, B. (2019). Bacterial growth: A statistical physicist's guide. In *Reports on Progress in Physics* (Vol. 82, Issue 1). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/1361-6633/aae546>
- Almasaudi, S. B. (2018). Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 25, Issue 3, pp. 586–596). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009>
- Alonso, M., Chapela, S. P., Cristaldo, M. L., Nievas, I., Gamondi, H. I. B., & Stella, C. A. (2010). Determination of the pKa Value of Phenolphthalein by Means of Absorbance Measurements. *Creative Education*, 01(02), 130–133. <https://doi.org/10.4236/ce.2010.12020>
- Al-Salem, S. M., Al-Nasser, A., Sultan, H., & Karam, H. (2019). In Situ Aerobic Biodegradation in Soil Contact Using the Standard Test Method of ASTM D 5988-12. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 291(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/291/1/012011>
- Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5(1), 8–19. <https://doi.org/10.12691/jaem-5-1-2>
- Balan, S. G., & Ravichandran, M. (2020). *Investigation on water absorption and wear characteristics of waste plastics and seashell powder reinforced polymer composite*

Polymer Matrix Composites View project Powder Metallurgy Steels View project.
<https://www.researchgate.net/publication/348167986>

- Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. In *Photosynthesis Research* (Vol. 101, Issues 2–3, pp. 157–170).
<https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>
- Bharagava, R. N., Saxena, G., & Mulla, S. I. (2020). Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety. In G. Saxena & R. N. Bharagava (Eds.), *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Vol. I* (Environmen). <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3426-9>
- Blanco, A., García-Abuín, A., Gómez-Díaz, D., Navaza, J. M., Sanjurjo, B., & Vidal-Tato, I. (2009). Absorción de CO₂ en columna de burbujeo por reacción con álcalis. *Afinidad*, 66(544), 454–457.
- Bonilla, M., Pajares Moreno, S., Viguera Ramírez, J. G., Sigala Alanís, J. C., & le Borgne, S. (2016). *Manual De Practicas De Microbiología Básica*.
- Brooks, A., Jambeck, J., & Mozo-Reyes, E. (2020). Plastic Waste Management and Leakage in Latin America and the Caribbean. *Inter-American Development Bank, IDB-TN-02058*.
- Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E. gabriela, & Aboul-Enein, H. Y. (2015). X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. In *Critical Reviews in Analytical Chemistry* (Vol. 45, Issue 4, pp. 289–299). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616>
- Calabrò, P. S., & Grosso, M. (2018). Bioplastics and waste management. In *Waste Management* (Vol. 78, pp. 800–801). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.06.054>
- Camacho, R., & Hoyos, J. (2014). Biodegradación anaerobia de un material biodegradable bajo digestión anaerobia termófila. In *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* (Vol. 12, Issue 2). Julio-Diciembre.
- Campoverde Valencia, G. T., Varas Valencia, S. A., & Cadena Piedrahita, L. O. (2019). Impacto económico del Impuesto Verde Impact of the Green Tax. *Pro Sciences: Revista de Producción Ciencias e Investigación*, 3, 31–37.
- Canducci, C. (2013). Upgrade of the CO₂ Direct Absorption Method for Low-Level ¹⁴C Liquid Scintillation Counting. *Radiocarbon*, 55(3–4). https://doi.org/10.2458/azu_js_rc.55.16319
- Castañeda, M. (2019). *Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano*.
<http://www.LaTeXTemplates.com>
- Castellani, F., Esposito, A., Stanzione, V., & Altieri, R. (2016). Measuring the biodegradability of plastic polymers in olive-mill waste compost with an experimental apparatus. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6909283>

- Castillo, S., Mateo-Estrada, V., Gonzalez-Rocha, G., & Opazo-Capurro, A. (2020). *Phylogeographical Analyses and Antibiotic Resistance Genes of Acinetobacter johnsonii Highlight Its Clinical Relevance*. <https://doi.org/10.1128/mSphere>
- Caycedo, L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, *19*(36), 49–94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Centurion, V. B., Lacerda-Júnior, G. v., Duarte, A. W. F., Silva, T. R., Silva, L. J., Rosa, L. H., & Oliveira, V. M. (2021). Dynamics of microbial stress responses driven by abiotic changes along a temporal gradient in Deception Island, Maritime Antarctica. *Science of the Total Environment*, *758*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143671>
- Cerra, H., Aversa, N., Carbone, N., Carnevali, S., Chiesa, C., Covo, M., D'Aquino, M., Degrossi, J., Denoya, C., Domínguez, P., Fernández, M. C., Franco, M., Giampaolo, B., Horak, C., Teves, S., Torno, G., Vázquez, A., Zarankin, E., & Zaresky, A. (2013). *Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos*.
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, *8*(9), 3494–3511. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>
- Chong, C. W., Pearce, D. A., Convey, P., Yew, W. C., & Tan, I. K. P. (2012). Patterns in the distribution of soil bacterial 16S rRNA gene sequences from different regions of Antarctica. *Geoderma*, *181–182*, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.02.017>
- Dang, T. C. H., Nguyen, D. T., Thai, H., Nguyen, T. C., Hien Tran, T. T., Le, V. H., Nguyen, V. H., Tran, X. B., Thao Pham, T. P., Nguyen, T. G., & Nguyen, Q. T. (2018). Plastic degradation by thermophilic *Bacillus* sp. BCBT21 isolated from composting agricultural residual in Vietnam. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, *9*(1). <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aaabaf>
- Danso, D., Chow, J., & Streita, W. R. (2019). Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 85, Issue 19). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.01095-19>
- Davidson, A. T., & van der Heijden, A. (2000). *Exposure of natural Antarctic marine microbial assemblages to ambient UV radiation: effects on bacterioplankton* (Vol. 21).
- Debruyne, J., Bandopadhyay, S., Hayes, D., Inglis, D., & Miles, C. (2015). Biodegradation – Putting Biology to Work. *Performance and Adoptability Biodegradable Mulch*.
- Delgado, K. L., Varona, G. A., Montilla, C. E., & Villada, H. S. (2016). Efecto del aditivo Tween 80 y de la temperatura de procesamiento en las propiedades mecánicas de tensión de Películas flexibles elaboradas a partir de almidón de yuca termoplástico. *Informacion Tecnológica*, *27*(6), 145–152. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600015>

- Di Capua, C., Bortolotti, A., Farías, M. E., & Cortez, N. (2011). UV-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from Andean wetlands display high catalase activity. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 317, Issue 2, pp. 181–189). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02231.x>
- Dickinson, I., Goodall-Copestake, W., Thorne, M. A. S., Schlitt, T., Ávila-Jiménez, M. L., & Pearce, D. A. (2016b). Extremophiles in an antarctic marine ecosystem. *Microorganisms*, *4*(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010008>
- Díez, S., Pellico, J., Gómez-Lado, N., Grijalvo, S., Alijas, S., Eritja, R., Herranz, F., Aguiar, P., & de la Fuente, M. (2021). Biodistribution of 68/67Ga-radiolabeled sphingolipid nanoemulsions by pet and spect imaging. *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 5923–5935. <https://doi.org/10.2147/IJN.S316767>
- Donkor, E. S., Dayie, N. T. K. D., & Adiku, T. K. (2014). Bioinformatics with basic local alignment search tool (BLAST) and fast alignment (FASTA). *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*, *6*(1), 1–6. <https://doi.org/10.5897/ijbc2013.0086>
- Doran, M. P. (2013). Bioprocess Engineering Principles. In *Academic Press*.
- Elhacham, E., Ben-Uri, L., Grozovski, J., Bar-On, Y. M., & Milo, R. (2020). Global human-made mass exceeds all living biomass. *Nature*, *588*(7838), 442–444. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3010-5>
- Elijah, A. I., Atanda, O. O., Popoola, A. R., & Uzochukwu, S. V. A. (2014). Molecular Characterization and Potential of Bacterial Species Associated with Cassava Waste. *Nigerian Food Journal*, *32*(2), 56–65. [https://doi.org/10.1016/s0189-7241\(15\)30118-1](https://doi.org/10.1016/s0189-7241(15)30118-1)
- Fachrul, M. F., Rinanti, A., Tazkiaturrizki, T., Salmiati, S., & Sunaryo, T. (2021). DEGRADATION OF POLYETHYLENE PLASTIC WASTE BY INDIGENOUS MICROBIAL CONSORTIUM AND FUNGI. *INDONESIAN JOURNAL OF URBAN AND ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY*, 86–103. <https://doi.org/10.25105/urbanenvirotech.v5i1.10749>
- Famewo, E. B., Clarke, A. M., & Afolayan, A. J. (2016). Identification of bacterial contaminants in polyherbal medicines used for the treatment of tuberculosis in Amatole District of the Eastern Cape Province, South Africa, using rapid 16S rRNA technique. *Journal of Health, Population and Nutrition*, *35*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s41043-016-0064-y>
- Fesseha, H., & Abebe, F. (2019). Open Journal Article information Degradation of Plastic Materials Using Microorganisms: A Review Review. *Public Health Open J*, *4*(2), 57–63. <https://doi.org/10.17140/PHOJ-4-136>
- FICAYA Emprende. (2016). *Biodiversidad*. www.utn.edu.ec/icayaemprende
- Figueiredo, S., Bonnin, R. A., Poirel, L., Duranteau, J., & Nordmann, P. (2012). Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*.

- Clinical Microbiology and Infection*, 18(9), 907–913. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03708.x>
- Folino, A., Karageorgiou, A., Calabrò, P. S., & Komilis, D. (2020). Biodegradation of wasted bioplastics in natural and industrial environments: A review. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 12, Issue 15). MDPI. <https://doi.org/10.3390/su12156030>
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Śtepień, K., Leszczewicz, M., Tintino, S. R., de Souza, V. C. A., Sharifi-Rad, J., Melo Coutinho, H. D., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Garcés, C., Fernando, L., Franco, M., Alejandro, E., Mesa, P., & Antonio, G. (2005). *Revista Lasallista de Investigación*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69520104>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), 25–29. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Ghatge, S., Yang, Y., Ahn, J. H., & Hur, H. G. (2020). Biodegradation of polyethylene: a brief review. *The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 63(1). <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00511-3>
- Ghosh, S., Qureshi, A., & Purohit, H. J. (2019). Microbial degradation of plastics: Biofilms and degradation pathways. In *Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation* (pp. 184–199). Agro Environ Media - Agriculture and Environmental Science Academy, Haridwar, India. <https://doi.org/10.26832/aesa-2019-cae-0153-014>
- Goel, A., & Nene, S. N. (1995). *Modifications in the Phenolphthalein Method for Spectrophotometric Estimation of Beta Cyclodextrin*.
- Gomes, L. B., Klein, J. M., Brandalise, R. N., Zeni, M., Zoppas, B. C., & Grisa, A. M. C. (2014). Study of oxo-biodegradable polyethylene degradation in simulated soil. *Materials Research*, 17, 121–126. <https://doi.org/10.1590/1516-1439.224713>
- Gómez, E. F., & Michel, F. C. (2013). Biodegradability of conventional and bio-based plastics and natural fiber composites during composting, anaerobic digestion and long-term soil incubation. *Polymer Degradation and Stability*, 98(12), 2583–2591. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.09.018>
- Gonome, H., Yamada, J., Nishimura, N., Arai, Y., Hirai, M., Kumagai, N., Rajagopalan, U. M., & Kono, T. (2022). A simple adaptive difference algorithm with CO₂ measurements for evaluating plant growth under environmental fluctuations. *BMC Research Notes*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-022-05929-0>
- Greczynski, G., & Hultman, L. (2020). X-ray photoelectron spectroscopy: Towards reliable binding energy referencing. In *Progress in Materials Science* (Vol. 107). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2019.100591>

- Gualano, L., Graieb, A., Baragatti, E., & Andrini, L. R. (2017). *Matemáticas y crecimiento bacteriano: un trabajo de laboratorio para el aprendizaje significativo*. 1–8.
- Gualoto, A., Oña Rocha, T. E., & Gómez García, A. I. (2017). Editores : Guaiquil, Isolina Leppe, Marcelo Rojas, Paulina Canales, Reiner. In *Visiones sobre Ciencia Antártica Libro de Resúmenes IX Congreso Latinoamericano de Ciencias Antártica* (pp. 1–932).
- Gupta, G. N., Srivastava, S., Khare, S. K., & Prakash, V. (2014). Extremophiles: An Overview of Microorganism from Extreme Environment. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(2), 371. <https://doi.org/10.5958/2230-732x.2014.00258.7>
- Guzmán, D., Salazar, J., Correa, J., & Zuluaga, C. (2012). *AS MEASURES OF GOODNESS OF FIT IN LINEAR MIXED MODELS*.
- Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidou, E., & Purnell, P. (2018). An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179–199. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.014>
- Hare, J. M., Bradley, J. A., Lin, C. L., & Elam, T. J. (2012). Diverse responses to UV light exposure in *Acinetobacter* include the capacity for DNA damage-induced mutagenesis in the opportunistic pathogens *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter ursingii*. *Microbiology*, 158(3), 601–611. <https://doi.org/10.1099/mic.0.054668-0>
- Hegde, S., Dell, E., Lewis, C., Trabold, T. A., & Diaz, C. A. (2018). *Anaerobic Biodegradation of Bioplastic Packaging Materials*.
- Hofer, H., Mandl, T., & Steiner, W. (2004). Diketone cleaving enzyme Dke1 production by *Acinetobacter johnsonii* - Optimization of fermentation conditions. *Journal of Biotechnology*, 107(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.09.010>
- Holmberg, K. (2019). Surfactants. *Analytical Chemistry*, 55(5), 93–102. https://doi.org/10.1002/14356007.a25_747.pub2
- Houten, S. M., Violante, S., Ventura, F. v., & Wanders, R. J. A. (2016). The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 78, pp. 23–44). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105045>
- Hua, Z., Song, R., Du, G., Li, H., & Chen, J. (2007). Effects of EDTA and Tween60 on biodegradation of n-hexadecane with two strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Engineering Journal*, 36(1), 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.06.008>
- Ikonen, J., Pitkänen, T., & Miettinen, I. T. (2013). Suitability of optical, physical and chemical measurements for detection of changes in bacterial drinking water quality. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(11), 5349–5363. <https://doi.org/10.3390/ijerph10115349>

- Instituto Antártico Ecuatoriano. (2016). *Revista-Ecuador-Antartico-2016.pdf*.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2017). *Módulo de Información Ambiental en Hogares*. 14.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2020). *Modulo de Informacion Ambiental en Hogares - ESPND, 2019*. 15.
- Instituto Oceanográfico y Antártico de la Armada. (2020). *Misión y visión*. Obtenido de <https://www.inocar.mil.ec/web/index.php>
- Itoh, H., & Shiba, T. (2004). Polyphosphate synthetic activity of polyphosphate:AMP phosphotransferase in *Acinetobacter johnsonii* 210A. *Journal of Bacteriology*, 186(15), 5178–5181. <https://doi.org/10.1128/JB.186.15.5178-5181.2004>
- Jash, P., Ruj, B., Pandey, V., & Srivastava, V. K. (2015). Sorting of plastic waste for effective recycling. *Journal of Applied Sciences and Engineering Research*, 4. <https://doi.org/10.6088/ijaser.04058>
- Jayaprakash, V., & Palempalli, U. M. D. (2018). Effect of palmitic acid in the acceleration of polyethylene biodegradation by *Aspergillus oryzae*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(4), 2259–2268. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.4.66>
- Jia, J., Liu, M., Feng, L., & Wang, Z. (2022). Comparative genomic analysis reveals the evolution and environmental adaptation of *Acinetobacter johnsonii*. *Elsevier*.
- Jiang, J., Mei, C., Pan, M., & Cao, J. (2019). How does pickering emulsion pre-treatment influence the properties of wood flour and its composites with high-density polyethylene? *Polymers*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/polym11071115>
- Jiang, Y., Qi, H., Zhang, X., & Chen, G. (2012). Inorganic impurity removal from waste oil and wash-down water by *Acinetobacter johnsonii*. *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 289–293. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.076>
- Jiang, Y., Zhang, Z., & Zhang, X. (2018). Co-biodegradation of pyrene and other PAHs by the bacterium *Acinetobacter johnsonii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.065>
- Jin, Q., & Kirk, M. F. (2018). pH as a primary control in environmental microbiology: 1. thermodynamic perspective. *Frontiers in Environmental Science*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00021>
- Jones, J. S., Porter, A., Muñoz-Pérez, J. P., Alarcón-Ruales, D., Galloway, T. S., Godley, B. J., Santillo, D., Vagg, J., & Lewis, C. (2021). Plastic contamination of a Galapagos Island (Ecuador) and the relative risks to native marine species. *Science of the Total Environment*, 789, 147704. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147704>
- Jung, J., & Park, W. (2015). *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. In *Applied Microbiology and Biotechnology*

- (Vol. 99, Issue 6, pp. 2533–2548). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6439-y>
- Kale, S. K., Deshmukh, A. G., Dudhare, M. S., & Patil, V. B. (2015). Microbial Degradation Of Plastic - A Review. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 13(01), 952–961. <https://doi.org/10.31838/ijpr/2021.13.01.245>
- Kalia, A., & M.S, D. (2021). Biodegradation of Ultra-violet Irradiated Waste Polyethylene Bags by Bacterial Community from Soil around Coal -fired Thermal Power Plant. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 18(2), 347–355. <https://doi.org/10.13005/bbra/2921>
- Kamble, A., Sawant, S., & Singh, H. (2020). 16S ribosomal RNA gene-based metagenomics: A review. *Biomedical Research Journal*, 7(1), 5. https://doi.org/10.4103/bmrj.bmrj_4_20
- Kamel, M. S. (2016). Characterization and Molecular Identification of Unknown Bacteria Isolated From Outlet of Arab El Madabegh Sewage Treatment Plant in Assiut City, Egypt. *Journal of Ecology of Health & Environment An International Journal*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.18576/jehe/040101>
- Kämpfer, P. (2014). Acinetobacter. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 1, 11–17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00002-1>
- Kane, S. N., Mishra, A., & Dutta, A. K. (2016). Preface: International Conference on Recent Trends in Physics (ICRTP 2016). In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 755, Issue 1). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/755/1/011001>
- Karamanlioglu, M., Preziosi, R., & Robson, G. D. (2017). Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): A review. In *Polymer Degradation and Stability* (Vol. 137, pp. 122–130). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.009>
- Karjiban, R. A., Basri, M., Rahman, M. B. A., & Salleh, A. B. (2012). Structural Properties of Nonionic Tween80 Micelle in Water Elucidated by Molecular Dynamics Simulation. *APCBEE Procedia*, 3, 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.084>
- Karthick, T., Sumithra, B., Bhuvaneshwari, K. P., Gurujeya, B., & Jaya Barath, J. (2016). Biodegradation of Plastic by Bacillus Subtilis Isolated From Polythene Polluted Soil. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(4), 1148–1153. https://wjpr.net/abstract_file/4945?fbclid=IwAR2E1_EE_EfKtgAL8dGCwcUg4ge2WOqKopX7SpCr1syvhymSDNo905DjwsY
- Keener, K. M., LaCrosse, J. D., & Babson, J. K. (2001). Chemical method for determination of carbon dioxide content in egg yolk and egg albumen. *Poultry Science*, 80(7), 983–987. <https://doi.org/10.1093/ps/80.7.983>
- Khosravi, A. D., Sadeghi, P., Shahraki, A. H., Heidarieh, P., & Sheikhi, N. (2015). Molecular methods for identification of acinetobacter species by partial sequencing of the rpoB and

- 16S rRNA genes. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(7), 9–13. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13867.6188>
- Kniemeyer, O., & Heider, J. (2001). Ethylbenzene Dehydrogenase, a Novel Hydrocarbon-oxidizing Molybdenum/Iron-Sulfur/Heme Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 21381–21386. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101679200>
- Koutny, M., Lemaire, J., & Delort, A. M. (2006). Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives. In *Chemosphere* (Vol. 64, Issue 8, pp. 1243–1252). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.060>
- Krieg, T., Mazzon, C., & Gómez-Sánchez, E. (2022). Material analysis and a visual guide of degradation phenomena in historical synthetic polymers as tools to follow ageing processes in industrial heritage collections. *Polymers*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/polym14010121>
- Lear, G., Kingsbury, J. M., Franchini, S., Gambarini, V., Maday, S. D. M., Wallbank, J. A., Weaver, L., & Pantos, O. (2021). Plastics and the microbiome: impacts and solutions. In *Environmental Microbiomes* (Vol. 16, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00371-w>
- Li, H., Li, L., Chi, Y., Tian, Q., Zhou, T., Han, C., Zhu, Y., & Zhou, Y. (2020). Development of a standardized Gram stain procedure for bacteria and inflammatory cells using an automated staining instrument. *MicrobiologyOpen*, 9(9). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1099>
- Li, W. C., Tse, H. F., & Fok, L. (2016). Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Science of the Total Environment*, 566–567, 333–349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.084>
- Li, X., Tu, Z. C., Sha, X. M., Ye, Y. H., & Li, Z. Y. (2020). Flavor, antimicrobial activity, and physical properties of composite film prepared with different surfactants. *Food Science and Nutrition*, 8(7), 3099–3109. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1526>
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J. E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. In *Chemosphere* (Vol. 73, Issue 4, pp. 429–442). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>
- Luo, T., Zhang, Y., Wang, C., Wang, X., Zhou, J., Shen, M., Zhao, Y., Fu, Z., & Jin, Y. (2019). Maternal exposure to different sizes of polystyrene microplastics during gestation causes metabolic disorders in their offspring. *Environmental Pollution*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113122>
- Mahalakshmi, V., Siddiq, A., & Andrew, S. N. (2012). Analysis of Polyethylene Degrading Potentials of Microorganisms Isolated From Compost Soil. In *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* (Vol. 3, Issue 5). www.ijpba.info

- Mahmoudkhani, M., & Keith, D. W. (2009). Low-energy sodium hydroxide recovery for CO₂ capture from atmospheric air-Thermodynamic analysis. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 3(4), 376–384. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2009.02.003>
- Maity, S., Banerjee, S., Biswas, C., Guchhait, R., Chatterjee, A., & Pramanick, K. (2021). Functional interplay between plastic polymers and microbes: a comprehensive review. In *Biodegradation* (Vol. 32, Issue 5, pp. 487–510). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s10532-021-09954-x>
- Malcheva, B., Nustorova, M., Zhiyanski, M., Sokolovska, M., Yaneva, R., & Abakumov, E. (2020). Diversity and activity of microorganisms in antarctic polar soils. *One Ecosystem*, 5, 1–16. <https://doi.org/10.3897/oneeco.5.e51816>
- Malvé, M. E., Gordillo, S., & Rivadeneira, M. M. (2014). Estructurada de las comunidades bontónicas en tres sitios de las islas Shetland del sur (Antártida): Patrones de diversidad, composición y tamaños corporales. *Anuales Del Instituto de La Patagonia*, 42(1), 53–62. <https://doi.org/10.4067/s0718-686x2014000100004>
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C. W., & Whyte, L. G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3085–3092. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3085-3092.2003>
- Markowicz, F., & Szymańska-Pulikowska, A. (2021). Assessment of the decomposition of oxo- and biodegradable packaging using ftir spectroscopy. *Materials*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/ma14216449>
- Martins, L., & Carreira, V. L. (2014). The prokaryotes: Gammaproteobacteria. In E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Family Moraxellaceae* (pp. 1–768). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1>
- Masura, J., Baker, J., Foster, G., & Arthur, C. (2015). *Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments* (C. Herring, Ed.; NOAA Marin, Issue July).
- Mazzeo, L., & Piemonte, V. (2019). Fermentation and biochemical engineering: Principles and applications. In *Studies in Surface Science and Catalysis* (Vol. 179, pp. 261–285). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64337-7.00015-X>
- Medicines Agency, E. (2018). *Information for the package leaflet regarding polysorbates used as excipients in medicinal products for human use*. www.ema.europa.eu/contact
- Meylan, C. M., Orava, J., & Greer, A. L. (2020). Rejuvenation through plastic deformation of a La-based metallic glass measured by fast-scanning calorimetry. *Journal of Non-Crystalline Solids: X*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.nocx.2020.100051>

- Mierzwa, M., Gondek, K., & Kopeć, M. (2019). Degradation of Polyethylene and Biocomponent-Derived Polymer Materials: An Overview. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(3), 600–611. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01368-4>
- Ministerio del Ambiente, A. y T. E. (2017). *Codigo del ambiente*. 1–92. <http://www.competencias.gob.ec/wp-content/uploads/2017/06/05NOR2017-COA.pdf>
- Ministerio del Ambiente, A. y T. E. (2019). *MAATE-Programa Nacional para la Gestión Integral de Desechos Sólidos (MAATE-PNGIDS) DATOS GENERALES*.
- Ministry of Housing and Urban Affairs. (2019). *Plastic Waste Management Issues, solutions & case studies*. 105–113.
- Mohanan, N., Montazer, Z., & Levin, D. B. (2020). Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709>
- Moharir, R. v., & Kumar, S. (2019). Challenges associated with plastic waste disposal and allied microbial routes for its effective degradation: A comprehensive review. In *Journal of Cleaner Production* (Vol. 208, pp. 65–76). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.059>
- Monroy, E. X., Fernández Andreu, C. M., Díaz Rodríguez, R., Martínez Machín, G., Illnait Zaragoza, M. T., & Perurena Lancha, M. (2014). Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de histoplasma capsulatum y su uso en reacciones de PCR. *VacciMonitor*, 23(2), 49–56.
- Montazer, Z., Habibi Najafi, M. B., & Levin, D. B. (2020). Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene. *Polymers*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/polym12010123>
- Montazer, Z., Habibi-Najafi, M. B., Mohebbi, M., & Oromiehei, A. (2018). Microbial Degradation of UV-Pretreated Low-Density Polyethylene Films by Novel Polyethylene-Degrading Bacteria Isolated from Plastic-Dump Soil. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(9), 3613–3625. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1245-0>
- Morales, L., González, I., Abella, J., & Ahumada, D. (2018). Química Aplicada y Analítica Técnicas de titulación ácido-base: consideraciones metrológicas. *Revista Colombiana de Química*, 48(1), 26–34.
- Morales, L. v., González-Cárdenas, I. A., Abella-Gamba, J. P., & Ahumada-Forigua, D. A. (2019). Acid-base titration techniques: Metrological considerations. *Revista Colombiana de Química*, 48(1), 26–34. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n1.72401>
- Muhonja, C. N., Makonde, H., Magoma, G., & Imbuga, M. (2018). Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. *PLoS ONE*, 13(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446>
- Muthukumar, A., & Veerappapillai, S. (2015). Biodegradation of plastics – A brief review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 31(2), 204–209.

- Nageeb, W., Kamel, M., Zakaria, S., & Metwall, L. (2014). *Phenotypic characterization of Acinetobacter baumannii isolates from intensive care units at a tertiary-care hospital in Egypt* (Vol. 20, Issue 3).
- Ncube, L. K., Ude, A. U., Ogunmuyiwa, E. N., Zulkifli, R., & Beas, I. N. (2021). An overview of plasticwaste generation and management in food packaging industries. *Recycling*, 6(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/recycling6010012>
- Niaounakis, M. (2015). Properties. In *Biopolymers: Processing and Products* (pp. 79–116). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-26698-7.00002-7>
- Ojeda, T., Freitas, A., Dalmolin, E., Pizzol, M. D., Vignol, L., Melnik, J., Jacques, R., Bento, F., & Camargo, F. (2009). Abiotic and biotic degradation of oxo-biodegradable foamed polystyrene. *Polymer Degradation and Stability*, 94(12), 2128–2133. <https://doi.org/10.1016/j.polyimdeggradstab.2009.09.012>
- Olivia, B., Vega, A., & Voltolina, D. (2007). *CAPÍTULO 2 CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO*.
- Omnexus. (2022). *Sterilization Resistance (Repeated)*. Obtenido de SpecialChem SA: <https://omnexus.specialchem.com/polymer-properties/properties/sterilization-resistance-repeated>
- Pacáková, V., & Virt, J. (2005). *Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition* (pp. 180–187).
- Pantoja Guerra, M. F., Mendoza Reyes, S., & Valero Valero, N. O. (2018). Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de Microbacterium sp. (BSC3) para la generación de materia orgánica humificada a partir de lignito. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 31–41. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.62764>
- Park, S. Y., & Kim, C. G. (2019). Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site. *Chemosphere*, 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.159>
- Peña, E., Fortich, D., & Machado, G. (2013). *Revista Colombiana de Materiales N.4. Abril de 2013 pp EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN AMBIENTAL DE PELÍCULAS DE POLIPROPILENO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)*.
- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Acinetobacter. In *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition* (Second Edi). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00002-0>
- Periche, D., & Robles, H. (2016). Efecto de las concentraciones del surfactante Polioxietileno (20) Monooleato de sorbitán “ Tween 80 ” en la biodegradación de petróleo Diesel II en suelo por Pseudomonas aeruginosa. *Rebiol*, 36(1), 10–18.
- Pires da Mata Costa, L., Micheline Vaz de Miranda, D., Couto de Oliveira, A. C., Falcon, L., Stella Silva Pimenta, M., Guilherme Bessa, I., Juarez Wouters, S., Andrade, M. H. S., &

- Pinto, J. C. (2021). Capture and reuse of carbon dioxide (Co₂) for a plastics circular economy: A review. In *Processes* (Vol. 9, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pr9050759>
- Pitombo, L. M., Ramos, J. C., Quevedo, H. D., do Carmo, K. P., Paiva, J. M. F., Pereira, E. A., & do Carmo, J. B. (2018). Methodology for soil respirometric assays: Step by step and guidelines to measure fluxes of trace gases using microcosms. *Elsevier*, 5, 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.06.008>
- Poznyak, T. I., Chairez Oria, I., & Poznyak, A. S. (2019). Biodegradation. In *Ozonation and Biodegradation in Environmental Engineering* (pp. 353–388). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812847-3.00023-8>
- Prada, A., & Cortés, C. E. (2011). Universidad de los Llanos-Villavicencio, Meta. Colombia Volumen 15-N o 1-Año. In *Orinoquia* (Vol. 15, Issue 1).
- Prushan, M. J. (2017). *Instrumental Analysis Lab Manual*.
- Qiagen. (2020). *QIAquick® Spin Handbook*.
- Qin, J., Feng, Y., Lü, X., & Zong, Z. (2021). *Precise Species Identification for Acinetobacter: a Genome-Based Study with Description of Two Novel Acinetobacter Species*. <https://doi.org/10.1128/mSystems>
- Quiterio, G. M., Matos Cruz, J., Montagnolli, R. N., & Bidoia, E. D. (2017). *Bioremediation of diesel/biodiesel blends in soil: a respirometric approach*. 1–10. <https://pdfs.semanticscholar.org/0c42/8e8a7a3294b7ddb8c94e98aeb0e593f6a58a.pdf>
- Rabe, M., Kerth, A., Blume, A., & Garidel, P. (2020). Albumin displacement at the air–water interface by Tween (Polysorbate) surfactants. *European Biophysics Journal*, 49(7), 533–547. <https://doi.org/10.1007/s00249-020-01459-4>
- Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., & Fava, F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), 7907–7913. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>
- Rajendran, S., Velu, R., Krishnan, N., Duraisamy, N., Kanthaiah, K., Sekar, C., & Arokiaswamy, R. (2016). The role of microbes in plastic degradation. En Taylor & Francis Group, LLC, *Environmental Waste Management*. New York: CRC Press.
- Ram, C., & Sangeeta, Y. (2016). The Use of PMDE with Sugar Industries Pressmud for Composting: A Green Technology for Safe Disposal in the Environment. In Taylor & Francis Group (Ed.), *Environmental Waste Management* (p. 606).
- Ramírez S, J. A., Parra V., J. A., & Alvarez Aldana, A. (2017). Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. *Mente Joven*, 6, 01–08. https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3665

- Reitermayer, D., Kafka, T. A., Lenz, C. A., & Vogel, R. F. (2018). Interrelation between Tween and the membrane properties and high pressure tolerance of *Lactobacillus plantarum*. *BMC Microbiology*, *18*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1203-y>
- Riascos, L., Geerts, A. N., Oña, T., Goethals, P., Cevallos-Cevallos, J., Vanden Berghe, W., Volckaert, F. A. M., Bonilla, J., Muylaert, K., Velarde, E., Boets, P., & Van der heyden, C. (2018). DNA-based monitoring of the alien invasive North American crayfish *Procambarus clarkii* in Andean lakes (Ecuador). *Limnologica*, *70*, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2018.02.002>
- Rincón Santamaría, A., Cuellar Gil, J. A., Valencia Gil, L. F., & Sánchez Toro, O. J. (2019). Kinetics of gluconacetobacter diazotrophicus growth using cane molasses and sucrose: Assessment of kinetic models. *Acta Biologica Colombiana*, *24*(1), 38–57. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n1.70857>
- Rodriguez, H., Mello, L., Salvagnini, W., & de Paiva, J. L. (2011). Absorption of carbon dioxide into aqueous solutions of alkanolamines in a wetted wall column with film promoter. *Chemical Engineering Transactions*, *25*, 51–55. <https://doi.org/10.3303/CET1125009>
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica*, *16*(2), 166–167.
- Rohim, R. A. A., Ahmad, W. M. A. W., Ismail, N. H., Ghazali, F. M. M., & Alam, M. K. (2020). Modeling the growth of bacteria streptococcus sobrinus using exponential regression. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria e Clinica Integrada*, *20*, 1–7. <https://doi.org/10.1590/pboci.2020.108>
- Ronkay, F., Molnar, B., Gere, D., & Czigany, T. (2021). Plastic waste from marine environment: Demonstration of possible routes for recycling by different manufacturing technologies. *Waste Management*, *119*, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.029>
- Ruiz Salmón, I., Cambier, N., & Luis, P. (2018). CO₂ capture by alkaline solution for carbonate production: A comparison between a packed column and a membrane contactor. *Applied Sciences (Switzerland)*, *8*(6). <https://doi.org/10.3390/app8060996>
- Sadeghi, S., Burckhard, S., & Schmit, C. (2018). *Respirometry Test Manual. WEERC Laboratory, February*, 1–17. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25579.80163>
- Sáenz, M., Borodulina, T., Diaz, L., & Banchon, C. (2019). Minimal conditions to degrade low density polyethylene by *Aspergillus terreus* and *niger*. *Journal of Ecological Engineering*, *20*(6), 44–51. <https://doi.org/10.12911/22998993/108699>
- Sánchez, R., Guijo, M. I., Nogales, J., & Blasco, R. (2020). Carbon source influence on extracellular ph changes along bacterial cell-growth. *Genes*, *11*(11), 1–17. <https://doi.org/10.3390/genes11111292>

- Sánchez, R., Igeño, M. I., Población, A. G., Guijo, M. I., Merchán, F., & Blasco, R. (2018). *Study of pH Changes in Media during Bacterial Growth of Several Environmental Strains*. 1297. <https://doi.org/10.3390/proceedings2201297>
- Sandt, C., Waeytens, J., Deniset-Besseau, A., Nielsen-Leroux, C., & Réjasse, A. (2021). Use and misuse of FTIR spectroscopy for studying the bio-oxidation of plastics. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119841>
- Schwartzberg, L. S., & Navari, R. M. (2018). Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. *Advances in Therapy*, 35(6), 754–767. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0707-z>
- Schwinghammer, L., Krause, S., & Schaum, C. (2021). Determination of large microplastics: Wet-sieving of dewatered digested sludge, co-substrates, and compost. *Water Science and Technology*, 84(2), 384–392. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.582>
- Science Advice for Policy by European Academies. (2016). *Biodegradability of plastics in the open environment*. <https://doi.org/10.26356/biodegradabilityplastics>
- Serrano, C., & Gutiérrez, R. (2018). *Manual de microbiología*. Santiago: Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Servicio de rentas internas del Ecuador. (2019). *Estadísticas Generales de Recaudación*. Obtenido de <https://www.sri.gob.ec/web/guest/estadisticas-generales-de-recaudacion>
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. In *Biotechnology Advances* (Vol. 26, Issue 3, pp. 246–265). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shahnawaz, Mohd., Sangale, M. K., & Ade, A. B. (2019). *Bioremediation Technology for Plastic Waste*. Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-7492-0>
- Siddiqui, M. A. (2019). *Biodegradation of plastic after UV treatment by composting using vegetable waste*. *Biodegradation of plastic after UV treatment by composting using vegetable waste*. January, 2–9.
- Singh, P., Mir, I. H., & Sharma, M. K. (2018). Biodegradation of Plastics By Microorganisms As Plastic Degradation Agents. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(17), 490. <https://doi.org/10.20959/wjpr201817-13388>
- Skariyachan, S., Manjunatha, V., Sultana, S., Jois, C., Bai, V., & Vasist, K. S. (2016). Novel bacterial consortia isolated from plastic garbage processing areas demonstrated enhanced degradation for low density polyethylene. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18307–18319. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7000-y>
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). *Gram Stain Protocols*. www.asmscience.org

- Szaja, A., Aguilar, J. A., & Łagód, G. (2015). Estimation of Chemical Oxygen Demand Fractions of Municipal Wastewater by Respirometric Method – Case Study. *Middle Pomeranian Scientific Society of the Environment Protection*, 17, 289–299.
- Therias, S., Rapp, G., Masson, C., & Gardette, J. L. (2021). Limits of UV-light acceleration on the photooxidation of low-density polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 183, 109443. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109443>
- Tomar, P., Arunachalam, K. D., Vinuprakash, K. C., & Thakur, H. (2019). Isolation, characterization and molecular identification of bacteria from commercial source using 16S Rna sequencing for domestic waste water treatment. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering*, 8(6), 473–481.
- Tulasi Prasad, N., Ajaya, B., & Sujeet Kumar, C. (2014). Sodium dodecyl sulphate: A very useful surfactant for Scientific Investigations. *The Journal of Knowledge and Innovation*, July, 111–113.
- van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503–549. <https://doi.org/10.1128/mnbr.67.4.503-549.2003>
- Vargas, M., Eduardo Obaya Valdivia, A., & Iveth Vargas Rodríguez, G. (2015). *Regresión polinómica, una competencia indispensable para el tratamiento de datos en Cinética Química*.
- Veerasingam, S., Ranjani, M., Venkatachalapathy, R., Bagaev, A., Mukhanov, V., Litvinyuk, D., Mugilarasan, M., Gurumoorthi, K., Gunganathan, L., Aboobacker, V. M., & Vethamony, P. (2021). Contributions of Fourier transform infrared spectroscopy in microplastic pollution research: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 51(22), 2681–2743. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1807450>
- Velandia, J. (2017). Identificación de polímeros por espectroscopia infrarroja. *Revista Ontare*, 5, 115–140.
- Velásquez, A., Quintero, M., Jiménez-Vergara, E., Blandón, L., & Gómez-León, J. (2018). Microorganismos marinos extremófilos con potencial interés en estudios de bioprospección. *Revista de La Facultad de Ciencias*, 7, 9–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v7n2.67360>
- Velez, P., Espinosa-Asuar, L., Figueroa, M., Gasca-Pineda, J., Aguirre-von-Wobeser, E., Eguiarte, L. E., Hernandez-Monroy, A., & Souza, V. (2018). Nutrient dependent cross-kingdom interactions: Fungi and bacteria from an oligotrophic desert oasis. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01755>
- Vethaak, A. D., & Legler, J. (2021). Microplastics and Human Health. *Science*, 37(6530). <https://doi.org/10.1126/science.abe5041>

- Wang, J., Fang, F., & Yu, H. Q. (2007). Substrate consumption and biomass growth of *Ralstonia eutropha* at various S0/X0 levels in batch cultures. *Bioresource Technology*, *98*(13), 2599–2604. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.005>
- Wang, M., He, Y., & Sen, B. (2019). Research and management of plastic pollution in coastal environments of China. *Environmental Pollution*, *248*, 898–905. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.098>
- Wang, W., Chen, X., Yan, H., Hu, J., & Liu, X. (2019). Complete genome sequence of the cyprodinil-degrading bacterium *Acinetobacter johnsonii* LXL_C1. *Microbial Pathogenesis*, *127*(October 2018), 246–249. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.016>
- Wang, X., Xia, K., Yang, X., & Tang, C. (2019). Growth strategy of microbes on mixed carbon sources. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09261-3>
- Wen, G., Wang, T., Li, K., Wang, H., Wang, J., & Huang, T. (2019). Aerobic denitrification performance of strain *Acinetobacter johnsonii* WGx-9 using different natural organic matter as carbon source: Effect of molecular weight. *Water Research*, *164*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114956>
- Wen, S., Liu, J., & Deng, J. (2021). Methods for the detection and composition study of fluid inclusions. In *Fluid Inclusion Effect in Flotation of Sulfide Minerals* (pp. 27–68). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819845-2.00003-x>
- Wilkes, R. A., & Aristilde, L. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *Journal of Applied Microbiology*, *123*(3), 582–593. <https://doi.org/10.1111/jam.13472>
- Wołowicz, A., & Staszak, K. (2020). Study of surface properties of aqueous solutions of sodium dodecyl sulfate in the presence of hydrochloric acid and heavy metal ions. *Journal of Molecular Liquids*, *299*. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112170>
- Xue, D., Zeng, X., Lin, D., & Yao, S. (2019). Thermostable ethanol tolerant xylanase from a marine cold-adapt *Acinetobacter johnsonii*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, *27*(5), 1166–1170. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.06.019>
- Yagi, H., Ninomiya, F., Funabashi, M., & Kunioka, M. (2014). Mesophilic anaerobic biodegradation test and analysis of eubacteria and archaea involved in anaerobic biodegradation of four specified biodegradable polyesters. *Polymer Degradation and Stability*, *110*, 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.08.031>
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W., Zhao, J., & Jiang, L. (2014). Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. <https://doi.org/10.1021/es504038a>
- Yang, Y., Ru, J., & Huo, Y. (2020). Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442>

- Yin, C. F., Xu, Y., & Zhou, N. Y. (2020). Biodegradation of polyethylene mulching films by a co-culture of *Acinetobacter* sp. strain NyZ450 and *Bacillus* sp. strain NyZ451 isolated from *Tenebrio molitor* larvae. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 155(September), 105089. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105089>
- Zhang, Y., Wang, X., Wang, W., Sun, Z., & Li, J. (2019). Investigation of growth kinetics and partial denitrification performance in strain *Acinetobacter johnsonii* under different environmental conditions. *Royal Society Open Science*, 6(12). <https://doi.org/10.1098/rsos.191275>
- Znój, A., Gawor, J., Gromadka, R., Chwedorzewska, K. J., & Grzesiak, J. (2021). Root-Associated Bacteria Community Characteristics of Antarctic Plants: *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*—a Comparison. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01891-9>
- Zuleima Salazar De Vegasa, E., & Nieves, B. (2005). *Acinetobacter spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos*.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Aislamiento bacteriano

	UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE INVESTIGACIONES AMBIENTALES
	AISLAMIENTO BACTERIANO
Título de Tesis	Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por acción de una bacteria antártica
Autor de la Tesis	Clara Pazos

Objetivo

- Evaluar los métodos de pretratamiento de Luz UV y Tween 80.

Introducción

De manera general, las muestras presentan una naturaleza mixta, por lo que para poder aislar microorganismos se debe obtener un cultivo puro se debe realizar resiembras en un medio sólido (Bonilla et al., 2016). La siembra o inoculación permite introducir a los microorganismos en medios de cultivo estériles para su crecimiento y aislamiento. La preparación de los medios de cultivo debe mantenerse en condiciones de asepsia para obtener un cultivo microbiológico puro y evitar los contaminantes ambientales (Serrano & Gutiérrez, 2018).

Palabras Claves:

Inoculación, aislamiento, asepsia, microorganismos

Metodología:

Materiales

- Medios: -Himedia® Agar Nutriente
- NaCl (Novachem Ecuador)
- Difco™ LB Broth, Miller (Luria - Bertani)
- Agua destilada

-
- Cajas petri 80x15 **MM** vidrio (Novachem del Ecuador)
 - Frascos de vidrio 100 **ml** Boeco
 - Tubos de ensayo vidrio (Novachem del Ecuador)
 - B1 inoculada en Difco™ LB Broth, Miller (Luria - Bertani)
 - Parafilm “M” Laboratory Film
 - Espátula
 - Asa metálica
 - Gradillas
 - Corning™ Pipeta monocanal Lambda Plus
 - Fisherbrand™ Agitador con placa calefactora Isotemp™
 - Autoclave vertical
 - Cámara de flujo laminar
 - Incubadora Memmert
 - XB 220A Precisa Balanza Analítica

Procedimiento

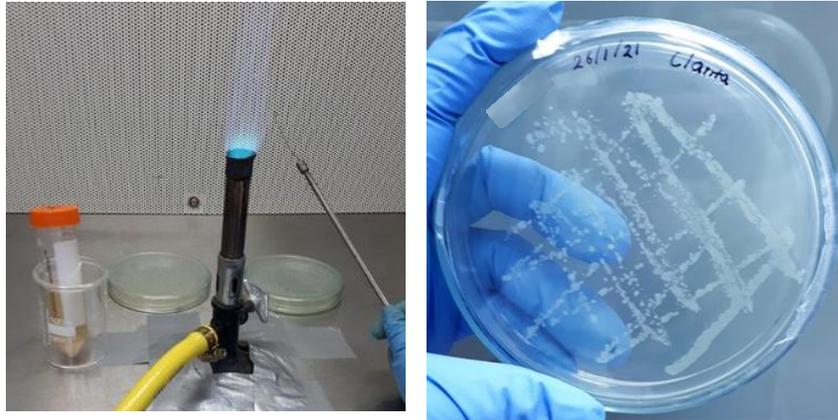
1. Preparar 0.9 **g** de NaCl en 360 **ml** de agua destilada.
 2. Preparar 2 **g** de Agar Nutriente en 72 **ml** de agua destilada.
 3. Preparar 2.5 **g** de Caldo Luria Bertani (LB) en 100 **ml** de agua destilada.
 4. Calentar los medios preparados en el agitador, dispensar NaCl en los tubos de ensayo y autoclavar.
 5. Dispensar en cajas petri el medio.
 6. Realizar diluciones seriadas (hasta 10^{-9}) tomando una suspensión bacteriana de B1.
 7. Tomar 100 ul y sembrar con ayuda de un asa de Digralsky en las cajas petri las diluciones 10^{-6} y 10^{-9} .
 8. Incubar las cajas por 24 h.
 9. Tomar con el asa una colona y extenderla a manera de estrías en las cajas con medio Agar Nutriente.
 10. Incubar las cajas en posición invertida durante 24 a 48 horas.
 11. Comprobar el crecimiento bacteriano.
-

12. Al obtener un cultivo puro sembrar en caldo LB e incubar a 15°C.

Observaciones:

*Realizar resiembras hasta obtener una muestra pura de la bacteria.

Anexos:



Bibliografía:

Bonilla Salinas, M., Pajares Moreno, S., Viguera Ramírez, J. G., Sigala Alanís, J. C., & Le Borgne, S. (2016). *Manual De Practicas De Microbiología Básica*.

Serrano Berríos, C., & Gutiérrez Ilabaca, R. (2018). *Manual de microbiología*. Santiago: Ediciones Universidad Católica de Chile.

Anexo 2. Protocolo de Tinción de Gram

	UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE INVESTIGACIONES AMBIENTALES
	TINCIÓN DE GRAM
Título de Tesis	Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por acción de una bacteria antártica
Autor de la Tesis	Clara Pazos

Introducción

La tinción de Gram se conoce como el proceso que permite visualizar los núcleos de algunas células (Smith & Hussey, 2005), además de que es una prueba subjetiva que permite la distinción de muestras clínicas y ambientales (Li et al., 2020); entre las muestras ambientales se ha detectado las especies del género *Acinetobacter* spp. por lo que se considera una prueba ideal para caracterizar de manera fenotípica (Nageeb et al., 2014).

Palabras Claves:

Células, tinción, *Acinetobacter*, fenotípica

Metodología:

Materiales

- Mechero bunsen para gas Garmin
 - Microscopio óptico Leica
 - Portaobjetos 25.4 x76.2 **mm** Microscope Slides
 - Cubreobjetos 18x18 **mm** 100 PCS Thickness 0.13-0.17 **mm**
 - Cajas inoculadas
 - Asa metálica
 - Parafilm “M” Laboratory Film
 - Agua destilada
-

-
- Cristal violeta
 - Lugol
 - Alcohol/ Acetona
 - Safranina
 - Aceite de inmersión

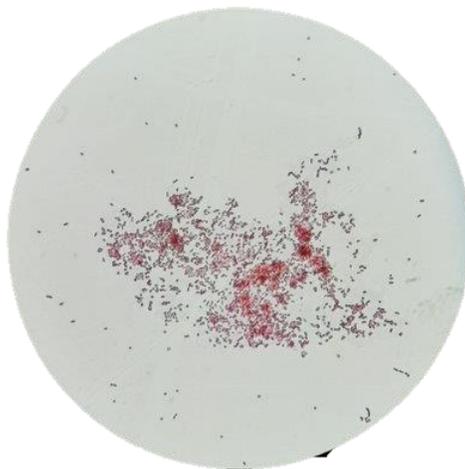
Procedimiento

1. En un portaobjetos colocar una gota de agua con un asa de cultivo y sobre ella hacer una extensión de una pequeña muestra tomada del cultivo sólido. Dejar secar **5 min**.
2. Añadir cristal violeta y dejar actuar durante 1 **min**. Lavar suavemente con agua destilada.
3. Añadir lugol y dejar actuar durante 1 **min** . Lavar con agua destilada.
4. Añadir Alcohol al 96 % o alcohol acetona y lavar con abundante agua.
5. Añadir safranina y dejar actuar el colorante por 1 **min**. Lavar con agua y secar.
6. Colocar el portaobjetos en el microscopio y añadir una gota de aceite de inmersión sobre el cubre.
7. Observar la tinción con ayuda del microscopio óptico (**100 x**)

Observaciones:

*Las bacterias Gram (-) se tornarán de color rojo por la safranina, mientras que las bacterias Gram (+) presentarán un color similar al cristal violeta.

Anexos:



Bibliografía:

- Li, H., Li, L., Chi, Y., Tian, Q., Zhou, T., Han, C., Zhu, Y., & Zhou, Y. (2020). Development of a standardized Gram stain procedure for bacteria and inflammatory cells using an automated staining instrument. *MicrobiologyOpen*, 9(9). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1099>
- Nageeb, W., Kamel, M., Zakaria, S., & Metwall, L. (2014). *Phenotypic characterization of Acinetobacter baumannii isolates from intensive care units at a tertiary-care hospital in Egypt* (Vol. 20, Issue 3).
- Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica*, 16(2), 166–167.
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). *Gram Stain Protocols*. www.asmscience.org
-

Anexo 3. Protocolo de Identificación Molecular

	UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE INVESTIGACIONES AMBIENTALES
	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR
Título de Tesis	Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por acción de una bacteria antártica
Autor de la Tesis	Clara Pazos

Introducción

Los microorganismos representan gran importancia por sus características únicas que permiten la producción de antibióticos, hormonas, proteínas entre otras aplicaciones. Sin embargo, también pueden actuar como agentes patógenos; por lo que los factores que determinan el uso de los microorganismos son sus características genéticas y capacidad bioquímicas siendo necesario una identificación taxonómica y sistemática. De manera tradicional, la identificación de microorganismos es mediante la caracterización morfológica, fisiológica, química y bioquímica. La manera de obtener una identificación más precisa y reducir el tiempo es el uso de técnicas de biología molecular. La identificación de las especies bacterianas mediante métodos moleculares se basa en el análisis de ADN, desde la amplificación del ADN hasta métodos donde se analiza los fragmentos de restricción, secuencia de genoma completo, etc. La elección de estas técnicas dependerá de factores como el tipo de muestra, la precisión de los resultados, los recursos y factores de costo y el tiempo de análisis (Franco-Duarte et al., 2019).

Palabras Claves:

Identificación, técnicas moleculares, ADN, análisis

Metodología:

1. Extracción de ADN

Materiales

- Kit MasterPure™
 - Corning™ Pipeta monocanal Lambda Plus
-

-
- Puntas con filtro 100 μl Pk/1000. AXYGEN
 - Microtubos Eppendorf™ 2 ml Boeco
 - Cajas inoculadas
 - Asa metálica
 - Isopropanol (Novachem del Ecuador)
 - Etanol 96 % (Novachem del Ecuador)
 - Agua ultrapura
 - Baño Maria memmert
 - Cámara de flujo laminar
 - Corning® LSE Vortex Mixer
 - Thermoblock Boeco
 - Congelador (-10 °C) Serie X-COLD BT
 - MPW-352R Centrifuge

Procedimiento

1. Calentar agua a 65 °C en Baño Maria.
 2. Añadir en microtubos Eppendorf de 2 ml , 200 μl de agua purificada.
 3. En cada microtubo (que contiene una colonia bacteriana) colocar 300 μl de Buffer de extracción y 2 μl de proteinasa K. Vortex para ayudar a la homogenización.
 4. Añadir con cuidado una bola de cristal en cada muestra y poner a agitar en el Vortex.
 5. Incubar a 65 °C durante 30 minutos, dando Vortex (5 segundos) cada 10 minutos.
 6. Dejar a temperatura ambiente por 3 minutos y vortex por 5 segundos.
 7. Incubar en el thermoblock a 37 °C por 10 min.
 8. Poner la muestra en el congelador por 5 minutos.
 9. Añadir 175 μl de MPC (Reactivo de precipitación de proteínas para el lisado celular tratado con RNasa A) y vortex por 10 segundos.
 10. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
 11. Sacar con cuidado el sobrenadante y transferirlo a un microtubo estéril.
 12. Añadir en los microtubos 300 μl de isopropanol y agitar manualmente de 30 a 40 veces.
 13. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C.
-

-
14. Remover el isopropanol residual con una pipeta teniendo cuidado con el DNA pellet.
 15. Añadir 300 μl de etanol y agitar manualmente varias veces. Centrifugar a 13000 *rpm* por 60 segundos a 4 °C.
 16. Repetir el paso 15. Remover el etanol residual con una pipeta y colocar en el thermoblock por 15 minutos a 50 °C para evaporar el etanol completamente.
 17. Resuspender el ADN en 60 μl de agua ultrapura estéril y almacenar en el congelador.

2. Pureza de ADN

Materiales

- NanoDrop One Thermo Scientific
- Pipeta sartorius proline
- Cubetas para espectrofotometría deltalab
- Muestra de ADN
- Blanco (Buffer Tissue and Cell Lysis Solution)
- Toallas de papel ELITE

Procedimiento

1. Configurar el sistema para medir ácidos nucleicos.
 2. Colocar 1-2 μl de solución blanco en el pedestal y bajar la tapa.
- Nota: *Si utiliza una cubeta alinear correctamente la cubeta con el instrumento.
3. Presionar la opción Blanco para la medición.
 4. Levantar la tapa y limpiar con una toalla.
 5. Colocar 1-2 μl de solución de la muestra en el pedestal, caso contrario utilice la cubeta.
 6. Bajar la tapa y presionar la opción Medición.
 7. Analizar los valores proporcionados.
 8. Terminado de medir las muestras, presione Finalizar experimento.
 9. Limpiar adecuadamente el pedestal.

3. PCR y electroforesis

Materiales

- GoTaq® Green Master Mix Thermo Scientific
- Primers universales ARNr- **16 S** Invitrogen
- Generuler 1 **Kb** DNA Ladder, Readytouse Thermo Scientific
- DNA Gel Loading Dye (**6X**) Thermo Scientific
- ADN bacteriano
- Pipeta Boeco
- Pipeta sartorius proline
- Microtubos Eppendorf™ (0.2 - 2) **ml** Boeco
- UltraPure™ LMP Agarose Thermo Scientific
- SYBR® Safe DNA Gel Stain Invitrogen
- UltraPure™ TBE Buffer, **10X** Thermo Scientific
- Agua ultrapura
- Matraz Erlenmeyer 250 **ml**
- Espatula
- Biological Safety Cabinet BIOBASE
- Eppendorf Mastercycler Nexus Thermal Cyclers
- Cole-Parmer Personal Microcentrifuge 220 VAC
- Balanza electrónica ADAM®
- Microondas Whirlpool
- Mupid® One Electrophoresis System
- Transiluminador Safe Imager™ 2.0.

Procedimiento

1. Antes de empezar colocar en Luz UV todos los materiales a utilizar.
 2. Preparar el volumen de reacción total en un microtubo Eppendorf de 2 **ml**.
 3. Distribuir en partes iguales el volumen de la reacción en microtubos Eppendorf de 0.2 **ml**.
 4. Colocar 0.5 **µl** de ADN y centrifugar por 5 segundos.
 5. Realizar las reacciones de PCR en el termociclador de acuerdo con las condiciones
-

establecidas.

6. Preparar 1.5 % de gel de electroforesis mezclando 0.75 **g** de agarosa y 500 **ml** de TBE teñido con 5 **μl** de SYBER safe.
7. Cargar las muestras y correr a 100 **V** durante 30 minutos.
8. Visualizar el gel con el transiluminador UV.

4. Purificación de ADN

Materiales

- QIAquick PCR Purification Kit (250) QIAGEN
- QIAquick Spin Columns (100) QIAGEN
- Generuler 1 **Kb** DNA Ladder, Readytouse Thermo Scientific
- DNA Gel Loading Dye (**6X**) Thermo Scientific
- Muestra de PCR
- Acetato de sodio Alpha Chemika
- MPW-352R Centrifuge
- Microtubos de colección de 2 **ml**
- Congelador (-10 °C) Serie X-COLD BT
- UltraPure™ LMP Agarose Thermo Scientific
- SYBR ® Safe DNA Gel Stain Invitrogen
- UltraPure™ TBE Buffer, **10X** Thermo Scientific
- Matraz Erlenmeyer 250 **ml**
- Espatula
- Parafilm “M” Laboratory Film
- Balanza electrónica ADAM ®
- Microondas Whirlpool
- Mupid® One Electrophoresis System
- Transiluminador Safe Imager™ 2.0.

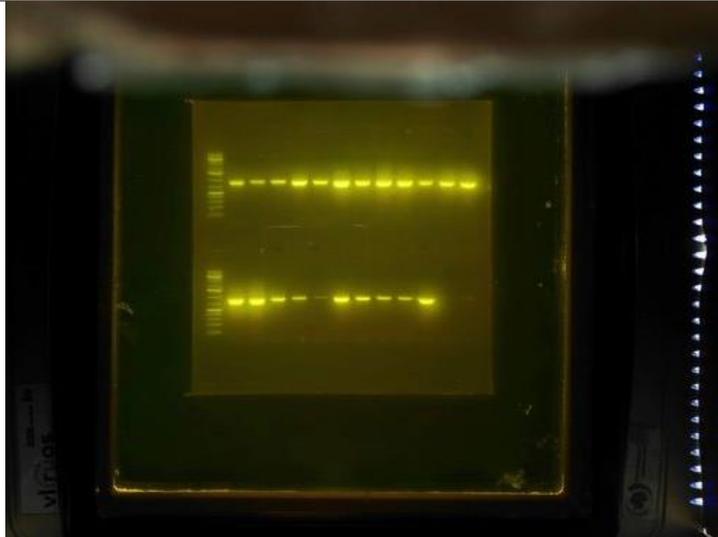
Procedimiento

-
1. Agregar 5 volúmenes de Buffer PB (Binding Buffer) a 1 volumen de muestra de PCR. El color de la muestra se volverá amarillo.
 2. Agregar 10 μl de acetato de sodio 3M en caso de que la mezcla sea naranja o violeta.
 3. Colocar la columna en el microtubo de colección de 2 ml.
 4. Para unir el ADN, transferir la muestra a la columna y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
 5. Descartar el filtrado y colocar la columna nuevamente en el mismo microtubo.
 6. Para lavar, añadir 750 μl de Buffer PE (Wash Buffer) en el centro de la columna.
 7. Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto y descartar el filtrado y regresar la columna al microtubo.
 8. Centrifugar nuevamente a 13000 rpm por 1 minuto. Remover el buffer de lavado residual.
 9. Transferir la columna a un nuevo microtubo de 2 ml.
 10. Para la elución, agregar 50 μl de Buffer EB (Elution Buffer) o agua en el centro de la columna.
 11. Incubar por 1 minuto. Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
 12. Conservar a 4 °C o a -20 °C.
 13. Analizar la muestra en gel de agarosa.
 14. Preparar 0.4 g de agarosa en 500 ml de TBE.
 15. Para preparar la muestra, colocar en un parafilm 1 μl de buffer de carga y 4 μl de muestra.
 16. Mezclar la muestra y cargar en cada pocillo del gel. Programar la corrida a 100 V por 30 minutos.
 17. Visualizar el gel con el transiluminador UV.

Observaciones:

*Esterilizar el material adecuadamente para evitar la contaminación de los reactivos a utilizar.

Anexos:



Bibliografía:

- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stepień, K., Leszczewicz, M., Tintino, S. R., de Souza, V. C. A., Sharifi-Rad, J., Melo Coutinho, H. D., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. *Microorganisms*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Monroy Vaca, E. X., Fernández Andreu, C. M., Díaz Rodríguez, R., Martínez Machín, G., Illnait Zaragoza, M. T., & Perurena Lancha, M. (2014). Evaluación de cuatro métodos de extracción del ADN de *histoplasma capsulatum* y su uso en reacciones de PCR. *VacciMonitor*, 23(2), 49–56.
- Qiagen. (2020). *QIAquick® Spin Handbook QIAGEN* (Issue March). <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=95f10677-aa29-453d-a222-0e19f01ebe17&lang=en>
- Riascos, L., Geerts, A. N., Oña, T., Goethals, P., Cevallos-Cevallos, J., Vanden Berghe, W., Volckaert, F. A. M., Bonilla, J., Muylaert, K., Velarde, E., Boets, P., & Van der heyden, C. (2018). DNA-based monitoring of the alien invasive North American crayfish *Procambarus clarkii* in Andean lakes (Ecuador). *Limnologica*, 70, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2018.02.002>
-

Anexo 4. Protocolo de Pretratamiento Tween 80

	UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE INVESTIGACIONES AMBIENTALES
	TWEEN 80
Título de Tesis	Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por acción de una bacteria antártica
Autor de la Tesis	Clara Pazos

Objetivo

- Evaluar los métodos de pretratamiento de Luz UV y Tween 80.

Introducción

El polisorbato 80 o Tween 80 es un tensioactivo formado de ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán (Schwartzberg & Navari, 2018). Generalmente, se lo utiliza para el desarrollo de fármacos proteicos parenterales por su estabilización (Rabe et al., 2020). Las soluciones acuosas del tensioactivo pueden sufrir una autooxidación con el tiempo. El Tween 80 cuenta con dos fracciones hidrofóbicas e hidrofílicas, los parámetros como la tensión superficial se utilizan para establecer la degradación en las cadenas hidrófilas. El efecto de los tensioactivos puede influenciar en las propiedades físicas y estructura molecular de películas compuestas (Li et al., 2020).

Palabras Claves:

Tween 80, tensioactivo, autooxidación, degradación

Metodología:

Materiales

- Tween ® -80 Lobachemie
- Agua destilada
- Fundas oxobiodegradable AKI
- Etanol 70 % (Novachem del Ecuador)
- Frascos de vidrio 250 *ml* Boeco
- Vaso de precipitación 250 *ml* Boeco

-
- Cajas petri 80x15 **MM** vidrio (Novachem del Ecuador)
 - Mini-Shaker 3D Boeco Germany
 - Incubadora Memmert

Procedimiento

1. Preparar en un frasco boeco 40 **ml** de Tween 80 con agua destilada
2. Añadir las tiras plásticas.
3. Agitar por 30 a 60 minutos en el Mini-Shaker 3D
4. Transferir las tiras a un vaso de precipitación con agua destilada.
5. Agitar en el Mini-Shaker 3D por 1 **h**.
6. Lavar las tiras con etanol al 70 % por 30 minutos.
7. Colocar el plástico en una caja petri y secar durante toda la noche.

Anexos:



Bibliografía:

- Rabe, M., Kerth, A., Blume, A., & Garidel, P. (2020). Albumin displacement at the air–water interface by Tween (Polysorbate) surfactants. *European Biophysics Journal*, 49(7), 533–547. <https://doi.org/10.1007/s00249-020-01459-4>
- Li, X., Tu, Z. C., Sha, X. M., Ye, Y. H., & Li, Z. Y. (2020). Flavor, antimicrobial activity, and physical properties of composite film prepared with different surfactants. *Food Science and Nutrition*, 8(7), 3099–3109. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1526>
- Schwartzberg, L. S., & Navari, R. M. (2018). Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. *Advances in Therapy*, 35(6), 754–767. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0707-z>
- Singh, P., Mir, I. H., & Sharma, M. K. (2018). Biodegradation of Plastics By Microorganisms As Plastic Degradation Agents. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(17), 490. <https://doi.org/10.20959/wjpr201817-13388>

Anexo 5. Protocolo de Peso seco

  	UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE INVESTIGACIONES AMBIENTALES
	PESO SECO
Título de Tesis	Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por acción de una bacteria antártica
Autor de la Tesis	Clara Pazos

Objetivo

- Evaluar los métodos de pretratamiento de Luz UV y Tween 80.

Introducción

En el estudio de biodegradación de los plásticos se debe reportar el peso promediada en peso. Durante la degradación las cadenas adyacentes del PE son el primer punto de inicio para que las bacterias secreten enzimas dando paso a una degradación parcial del polímero. Por lo que, la manera más sencilla de controlar la biodegradación es mediante las mediciones de la pérdida de peso con ayuda de balanzas suficientemente sensibles. Sin embargo, este factor no puede ser resultado del consumo de material del polímero y no indicativo de la biodegradación completa por lo que se deben aplicar otros métodos de comprobación (Montazer et al., 2020).

Palabras Claves:

Biodegradación, plástico, balanza, masa molar

Metodología:

Materiales

- Fundas oxobiodegradable AKI
 - Recipiente hermético
 - Etanol 70 % (Novachem del Ecuador)
 - Crisol de porcelana (Novachem del Ecuador)
-

-
- Estufa Memmert
 - XB 220A Precisa Balanza Analítica

Procedimiento

1. Encerar la balanza.
2. Limpiar con etanol las tiras plásticas.
3. Pesar un crisol limpio y seco.
4. Colocar dentro del crisol las tiras plásticas.
5. Colocar el crisol a 90 °C horno de secado durante 24 horas o más.
6. Dejar enfriar en un recipiente sellado para reducir la interferencia.
7. Determinar el peso del crisol con el plástico con ayuda de una balanza analítica.
8. Con los datos obtenidos calcular el porcentaje de pérdida de peso.

Anexos:



Bibliografía:

- Masura, J., Baker, J., Foster, G., & Arthur, C. (2015). *Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments* (C. Herring (ed.); NOAA Marin, Issue July).
- Montazer, Z., Habibi Najafi, M. B., & Levin, D. B. (2020). Challenges with verifying microbial degradation of polyethylene. *Polymers*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/polym12010123>
-

Anexo 6. Protocolo de Diseño del biorreactor

	UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE INVESTIGACIONES AMBIENTALES
	DISEÑO DEL BIORREACTOR
Título de Tesis	Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por acción de una bacteria antártica
Autor de la Tesis	Clara Pazos

Objetivo

- Definir la cinética de crecimiento de la especie bacteriana.
- Comprobar la degradación del polietileno mediante el Método Respirométrico.

Introducción

El diseño de biorreactores es un proceso complejo debido a que se basa en principios científicos y de ingeniería. La manera como se diseña tiene un impacto en el rendimiento global del proceso, por lo que, es importante conocer la cinética de las reacciones para entender el funcionamiento de los biorreactores (Doran, 2013). Los métodos utilizados para evaluar la degradación son mediante el diseño de un biorreactor respirométrico. Este método se basa en la medición de CO₂ atrapado en un álcali fuerte después de la mineralización del carbono por los microorganismos (Pitombo et al., 2018).

Palabras Claves:

Biorreactor, rendimiento, proceso, degradación, respirométrico

Metodología:

Materiales

- Difco™ Bushnell Haas Broth
 - Difco™ LB Broth, Miller (Luria - Bertani)
 - B1 inoculada en Difco™ LB Broth, Miller (Luria - Bertani)
-

-
- NaOH (Novachem del Ecuador)
 - Agua destilada
 - Fundas oxobiodegradable AKI tratadas
 - Frascos de vidrio 250 *ml*
 - Pipeta de Vidrio de 10 *ml*
 - Matraz Erlenmeyer 250 *ml* Boeco
 - Parafilm “M” Laboratory Film
 - Espatula
 - Manguera de silicona transparente
 - Racor
 - Equipo de Venoclipsis para sueros Herenco medical products
 - Autoclave vertical

Procedimiento

1. En un frasco de vidrio conectar un tubo de escape y unirlo con una manguera a otro frasco de vidrio.
2. Colocar un conducto de venoclisis a cada costado de los frascos.
3. Sellar herméticamente las tapas de los recipientes para evitar la salida de CO_2 .

En el compartimento A:

4. Preparar 100 *ml* de medio Bushnell Haas Broth.
5. Modificar el medio con polietileno previamente tratado.
6. Agregar 1 *ml* de caldo Luria Bertani con microorganismo inoculado.

En el compartimento B:

7. Preparar 100 *ml* de NaOH 1N.
-

Anexos:



Bibliografía:

Doran, M. P. (2013). *Bioprocess Engineering Principles*. In *Academic Press*.

Pitombo, L. M., Ramos, J. C., Quevedo, H. D., do Carmo, K. P., Paiva, J. M. F., Pereira, E. A., & do Carmo, J. B. (2018). Methodology for soil respirometric assays: Step by step and guidelines to measure fluxes of trace gases using microcosms. *Elsevier*, 5, 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.06.008>

Sadeghi, S., Burckhard, S., & Schmit, C. (2018). *Respirometry Test Manual*. *WEERC Laboratory*, February 1–17. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25579.80163>

Anexo 7. Protocolo de Conteo en Placa

  	UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE INVESTIGACIONES AMBIENTALES
	CONTEO EN PLACA
Título de Tesis	Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por acción de una bacteria antártica
Autor de la Tesis	Clara Pazos

Objetivo

- Definir la cinética de crecimiento de la especie bacteriana.

Introducción

El proceso de recuento en placa se basa en calcular el número de colonias formadas en un medio agarizado; además de ser el método más utilizado para determinar el número de microorganismos, permite saber la posible cantidad que existe en un ml de muestra y saber si una muestra líquida es viable o no (Cerra, Aversa, et al., 2013; Ramírez S et al., 2017).

Palabras Claves:

Recuento, colonias, microorganismos, muestra

Metodología:

Materiales

- Medios: -Himedia ® Agar Nutriente
 - Agua destilada
 - Cajas petri 80x15 **MM** vidrio (Novachem del Ecuador)
 - Frascos de vidrio 100 **ml** Boeco
 - Tubos de ensayo vidrio (Novachem del Ecuador)
 - NaCl (Novachem del Ecuador)
-

-
- Corning™ Pipeta monocanal Lambda Plus
 - Gradillas
 - Parafilm “M” Laboratory Film
 - Espátula
 - Asa metálica
 - Fisherbrand™ Agitador con placa calefactora Isotemp™
 - Autoclave vertical
 - Cámara de flujo laminar
 - XB 220A Precisa Balanza Analítica
 - Incubadora Memmert

Procedimiento

1. Preparar 10,08 **g** de Agar Nutriente en 360 **ml** de agua destilada.
2. Calentar el medio en el agitador y autoclavar.
3. Dispensar en cajas petri el medio.
4. Preparar 22,5 **g** de NaCl en 2,5 **L** de agua destilada.
5. Calentar el medio en el agitador, dispensar en los tubos de ensayo y autoclavar.
6. Realizar diluciones seriadas (hasta 10^{-6}) tomando una suspensión bacteriana de los biorreactores.
7. Tomar 50 ul y sembrar con ayuda de un asa de Digrafsky en las cajas petri las diluciones 10^{-6} .
8. Incubar las cajas por 48 h.
9. Calcular la concentración de **UFC/ml** aplicando la siguiente formula:

$$\frac{\mathbf{UFC}}{\mathbf{ml}} = \frac{\mathbf{N^\circ de colonias por placa}}{\mathbf{Volumen sembrado x diluci3n}}$$

Anexos:



Bibliografía:

Cerra, H., Fernández, M. C., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., & Zarankin, E. (2013). *Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos* (Subcomisión). <http://www.aam.org.ar/>

Ramírez S, J. A., Parra V., J. A., & Alvarez Aldana, A. (2017). Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. *Mente Joven*, 6, 01–08. https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3665

Anexo 8. Protocolo de Titulación ácido-base

  	UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE INVESTIGACIONES AMBIENTALES
Título de Tesis	TITULACIÓN
Autor de la Tesis	Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por acción de una bacteria antártica Clara Pazos

Objetivo

- Comprobar la degradación del polietileno mediante el Método Respirométrico.

Introducción

Se conoce como la técnica que evalúa la adsorción, constantes de equilibrio, evaluación de acidez y en la industria en el análisis de CO₂. Por otra parte, debido al proceso gravimétrico que se emplea en este método, se genera cadenas de trazabilidad más corta, generando incertidumbre en la toma de datos (Morales et al., 2018; Rodriguez et al., 2011).

Palabras Claves:

Equilibrio, acidez, CO₂, gravimétrico

Metodología:

Materiales

- Jeringa 5 **ml** (Novachem del Ecuador)
- Jeringa 1 **ml**
- Vaso de precipitación 250 **ml** Boeco
- Solución de 100 ml **HCl** 1 N
- Muestra de NaOH
- Microtubos Eppendorf™ 2 **ml** Boeco

-
- Fenolftaleína
 - Indicador de pH
 - Gotero (Novachem del Ecuador)

Procedimiento

1. Extraer 1 **ml** de NaOH del Compartimento B
2. Colocar en un microtubo Eppendorf de 2 **ml**
3. Agregar 1 gota de fenolftaleína
4. Cargar la jeringa con la disolución de **HCl**
5. Dispensar lentamente la solución de la jeringa al microtubo Eppendorf
6. Agitar continuamente la mezcla de reacción hasta volverse transparente
7. Registrar los volúmenes dispensados de **HCl**

Anexos:



Bibliografía:

- Morales-Erazo, L. V., González-Cárdenas, I. A., Abella-Gamba, J. P., & Ahumada-Forigua, D. A. (2019). Acid-base titration techniques: Metrological considerations. *Revista Colombiana de Química*, 48(1), 26–34. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n1.72401>
- Rodriguez, H., Mello, L., Salvagnini, W., & De Paiva, J. L. (2011). Absorption of carbon dioxide into aqueous solutions of alkanolamines in a wetted wall column with film promoter. *Chemical Engineering Transactions*, 25, 51–55. <https://doi.org/10.3303/CET1125009>
-

Anexo 9. Protocolo de Preparación de SDS

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES LABORATORIO DE INVESTIGACIONES AMBIENTALES</p> <p style="text-align: center;">DODECIL SULFATO DE SODIO ACUOSO (SDS)</p>
Título de Tesis	Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad por acción de una bacteria antártica
Autor de la Tesis	Clara Pazos

Objetivo

- **Evaluar los métodos de pretratamiento de Luz UV y Tween 80.**

Introducción

El sulfato dodecil de sodio (SDS) es un tensioactivo aniónico basado en el dodecanol lineal, que se caracteriza por eliminar hasta el 7% de lípidos a una solución del 2% durante un periodo corto (Holmberg, 2019). Se lo obtiene a partir de alcohol dodecílico y dodecanol en reacción con el ácido sulfúrico. El SDS tiene muchas aplicaciones en los sectores industriales e investigativos por sus propiedades químicas y fisicoquímicas (Wołowicz & Staszak, 2020). En concentraciones bajas se utiliza como agente limpiador para eliminar partículas de suciedad fácilmente. Sin embargo, a concentraciones altas puede ser considerado de carácter cancerígeno (Tulasi Prasad et al., 2014).

Palabras Claves:

SDS, lípidos, limpieza, concentración

Metodología:

Materiales

- Fundas oxobiodegradable AKI
 - Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (Novachem del Ecuador)
-

-
- Etanol 70 % (Novachem del Ecuador)
 - Agua destilada estéril
 - Frascos de vidrio 1000 **ml** Boeco
 - Espatula
 - Fisherbrand™ Agitador con placa calefactora Isotemp™
 - Autoclave vertical
 - Cámara de flujo laminar
 - XB 220A Precisa Balanza Analítica

Procedimiento

1. Preparar 2 % de Dodecil Sulfato de sodio acuoso en 480 **ml** de agua destilada estéril.
2. Calentar el medio en el agitador.
3. Lavar las tiras plásticas con la solución de SDS durante 4 **h**.
4. Esterilizar con etanol al 70 %.
5. Lavar con agua destilada.

Anexos:



Bibliografía:

Holmberg, K. (2019). Surfactants. *Analytical Chemistry*, 55(5), 93–102.
<https://doi.org/10.5650/jos1956.34.1041>

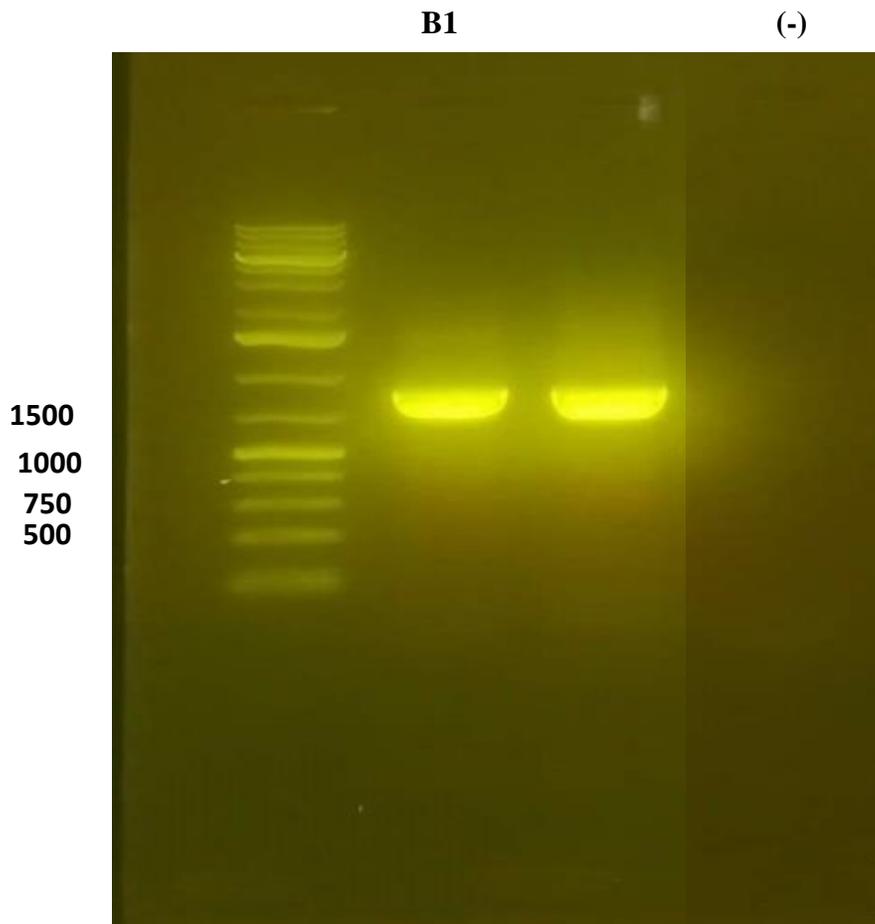
Park, S. Y., & Kim, C. G. (2019). Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial

colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site. *Chemosphere*, 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.159>

Tulasi Prasad, N., Ajaya, B., & Sujeet Kumar, C. (2014). Sodium dodecyl sulphate: A very useful surfactant for Scientific Investigations. *The Journal of Knowledge and Innovation*, July, 111–113.

Wołowicz, A., & Staszak, K. (2020). Study of surface properties of aqueous solutions of sodium dodecyl sulfate in the presence of hydrochloric acid and heavy metal ions. *Journal of Molecular Liquids*, 299. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112170>

Anexo 10. Observación del gel electroforesis de las ampliaciones de PCR

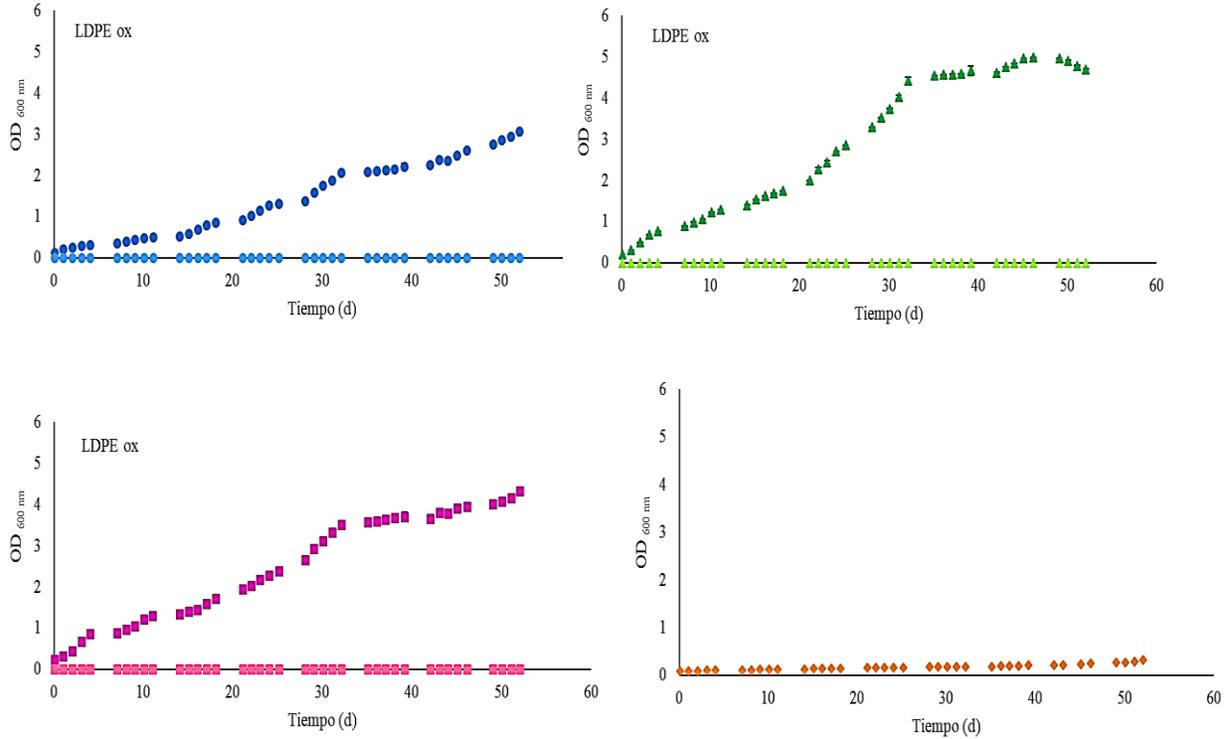


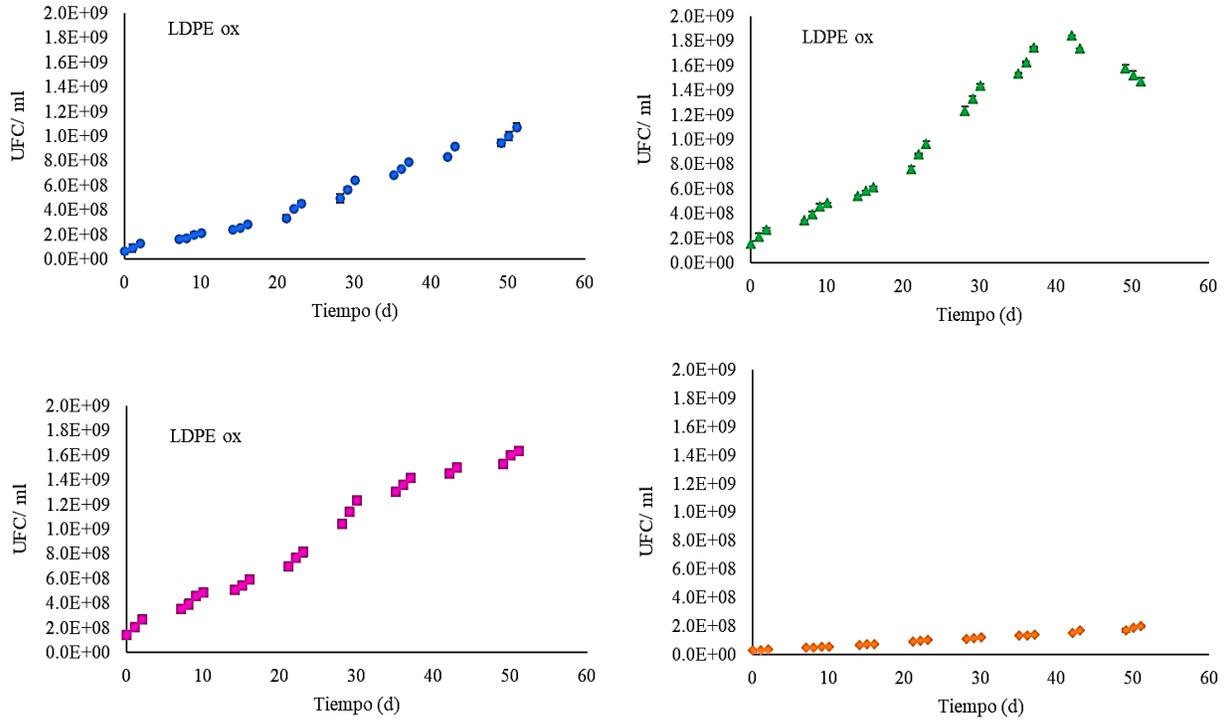
Anexo 11. Peso del plástico antes y después de la aplicación de pretratamientos

	PESO DE PLÁSTICO INICIAL: Plástico sin pretratamientos (g)		PESO DE PLÁSTICO FINAL: Plástico después del pretratamiento (g)	
1	Plástico sin Luz UV	5,28 ± 0,275	Plástico + Luz UV	4,83 ± 0,252
2	Plástico sin Tween 80	5,45 ± 0,085	Plástico + Tween 80	5,15 ± 0,080
3	Plástico sin Luz UV+Tween 80	5,84 ± 0,379	Plástico + Luz UV + Tween 80	5,59 ± 0,364
4	Plástico sin Luz UV (Blanco)	5,00 ± 0,701	Plástico + Luz UV (Blanco)	4,51 ± 0,629
5	Plástico sin Tween 80 (Blanco)	4,98 ± 0,253	Plástico + Tween 80 (Blanco)	4,71 ± 0,240
6	Plástico sin Luz UV+Tween 80 (Blanco)	5,26 ± 0,134	Plástico + Luz UV + Tween 80 (Blanco)	5,03 ± 0,129

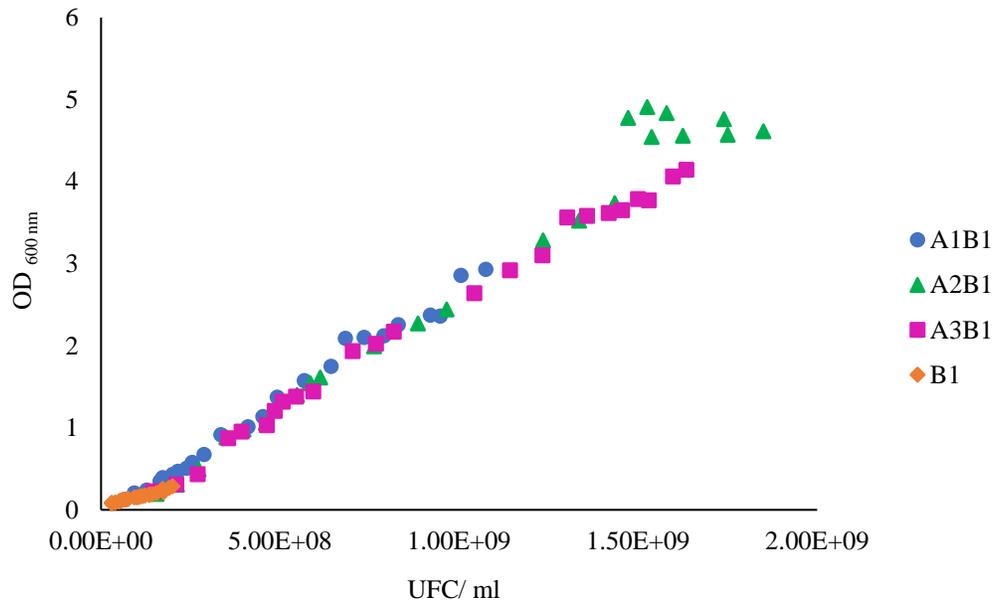
Anexo 12. (A) Crecimiento bacteriano a partir de OD_{600nm} y **(B)** Recuento de células viables de UFC/ml de los tratamientos, en medio Bushnell Hass Broth modificado con polietileno de baja densidad oxobiodegradable (LDPE ox) pretratado

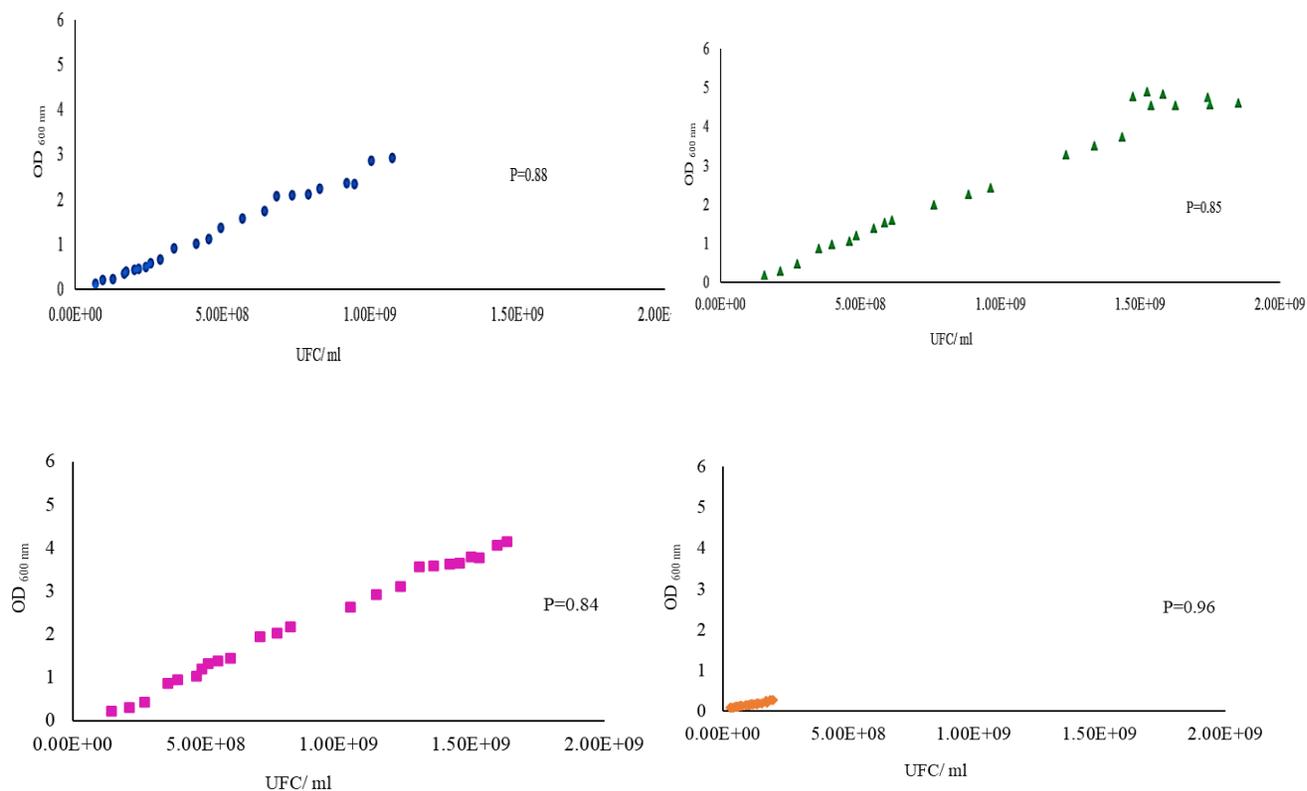
A



B

Anexo 13. Relación de OD_{600nm} y UFC/ml de la cepa bacteriana *A. johnsonii*





Anexo 14. Crecimiento de *A. johnsonii* en los distintos tratamientos evaluados

Tratamiento	Día 1		Día 26		Día 52	
	OD _{600nm}	UFC/ml	OD _{600nm}	UFC/ml	OD _{600nm}	UFC/ml
A1B1	0,13 ± 0,003 ^b	6,75 x 10 ⁷ ± 1,06 x 10 ⁷ ^a	1,32 ± 0,001 ^b	4,53 x 10 ⁸ ± 2,47 x 10 ⁷ ^b	3,07 ± 0,003 ^b	1,08 x 10 ⁹ ± 2,83 x 10 ⁷ ^b
A2B1	0,19 ± 0,007 ^c	1,55 x 10 ⁸ ± 2,12 x 10 ⁷ ^b	2,85 ± 0,003 ^d	9,65 x 10 ⁸ ± 2,12 x 10 ⁷ ^d	4,69 ± 0,009 ^d	1,47 x 10 ⁹ ± 3,18 x 10 ⁷ ^c
A3B1	0,23 ± 0,002 ^d	1,45 x 10 ⁸ ± 7,07 x 10 ⁶ ^b	2,37 ± 0,0005 ^c	8,18 x 10 ⁸ ± 3,89 x 10 ⁷ ^c	4,31 ± 0,007 ^c	1,64 x 10 ⁹ ± 1,41 x 10 ⁷ ^d
B1	0,08 ± 0,004 ^a	3,00 x 10 ⁷ ± 7,07 x 10 ⁶ ^a	0,16 ± 0,001 ^a	1,05 x 10 ⁸ ± 7,07 x 10 ⁶ ^a	0,32 ± 0,006 ^a	2,00 x 10 ⁸ ± 7,07 x 10 ⁶ ^a

Anexo 15. Peso del plástico antes y después del ingreso al biorreactor

Código	Tratamiento	PESO DE INGRESO	PESO DE SALIDA DEL
		AL REACTOR	REACTOR (g)
		(g)	(g)
A1B1	Plástico + Luz UV + Bacteria	4,83 ± 0,25	4,27 ± 0,23
A2B1	Plástico + Tween 80+ Bacteria	5,15 ± 0,08	4,10 ± 0,06
A3B1	Plástico + Luz UV + Tween 80 + Bacteria	5,59 ± 0,36	4,58 ± 0,31
A1	Plástico + Luz UV (Blanco)	4,51 ± 0,63	4,39 ± 0,62
A2	Plástico + Tween 80 (Blanco)	4,71 ± 0,24	4,69 ± 0,23
A3	Plástico + Luz UV + Tween 80 (Blanco)	5,03 ± 0,13	4,97 ± 0,13

Anexo 16. Valores de HCl de la titulación

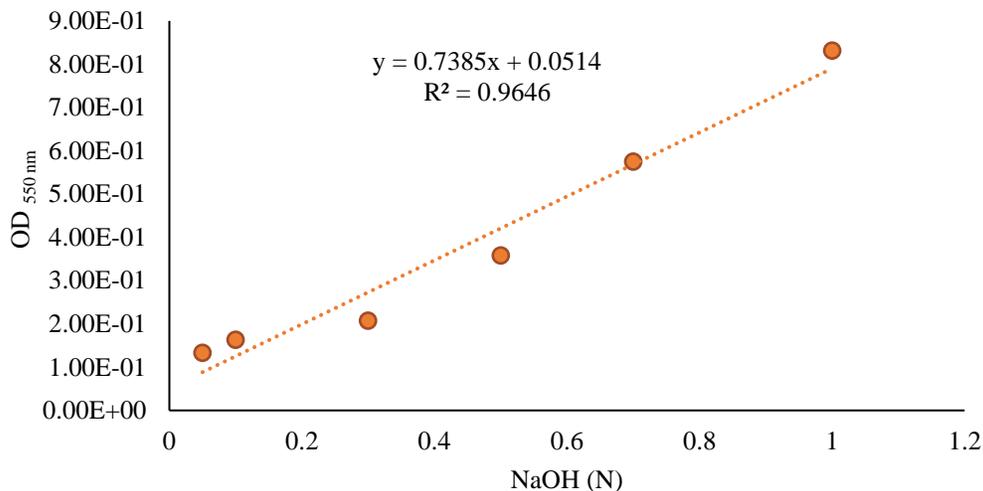
Tratamiento	HCl (ml)							
	Día 4	Día 10	Día 18	Día 25	Día 32	Día 39	Día 45	Día 52
A1B1	0,85 ± 0,05	0,72 ± 0,03	0,58 ± 0,08	0,52 ± 0,08	0,45 ± 0,05	0,43 ± 0,04	0,27 ± 0,03	0,22 ± 0,03
A2B1	0,80 ± 0,00	0,57 ± 0,03	0,45 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,33 ± 0,03	0,33 ± 0,04	0,20 ± 0,00	0,13 ± 0,02
A3B1	0,80 ± 0,00	0,57 ± 0,03	0,45 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,35 ± 0,05	0,33 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,17 ± 0,03
A1	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00
A2	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00
A3	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00
B1	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00	1 ± 0,00

Anexo 17. Datos de medición de absorbancia de fenolftaleína

Tratamiento	OD _{550nm}							
	Día 4	Día 10	Día 18	Día 25	Día 32	Día 39	Día 45	Día 52
A1B1	0.62 ± 0,00	0.56 ± 0,001	0.51 ± 0,001	0.48 ± 0,002	0.37 ± 0,001	0.33 ± 0,005	0.29 ± 0,006	0.26 ± 0,009
A2B1	0.62 ± 0,001	0.54 ± 0,001	0.49 ± 0,001	0.44 ± 0,002	0.33 ± 0,001	0.28 ± 0,003	0.24 ± 0,026	0.19 ± 0,002
A3B1	0.61 ± 0,002	0.53 ± 0,001	0.47 ± 0,002	0.41 ± 0,002	0.35 ± 0,001	0.31 ± 0,011	0.26 ± 0,018	0.21 ± 0,016
A1	0.83 ± 0,002	0.82 ± 0,001	0.82 ± 0,003	0.82 ± 0,001	0.82 ± 0,002	0.80 ± 0,017	0.82 ± 0,006	0.83 ± 0,011
A2	0.74 ± 0,001	0.71 ± 0,002	0.72 ± 0,007	0.72 ± 0,002	0.71 ± 0,001	0.72 ± 0,010	0.74 ± 0,007	0.73 ± 0,006
A3	0.88 ± 0,001	0.88 ± 0,001	0.86 ± 0,001	0.86 ± 0,001	0.87 ± 0,001	0.86 ± 0,001	0.87 ± 0,001	0.86 ± 0,001

	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,021	0,007	0,003
B1	0,75 ±	0,75 ±	0,75 ±	0,75 ±	0,75 ±	0,74 ±	0,77 ±	0,75 ±
	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,006	0,026	0,003

Anexo 18. Curva estándar de la absorbancia de fenoltaleína



Anexo 19. Datos de la Concentración de NaOH

Tratamiento	Concentración de NaOH (N)							
	Día 4	Día 10	Día 18	Día 25	Día 32	Día 39	Día 45	Día 52
A1B1	0,77 ± 0,001	0,69 ± 0,001	0,63 ± 0,002	0,58 ± 0,002	0,43 ± 0,001	0,38 ± 0,007	0,33 ± 0,009	0,28 ± 0,012
A2B1	0,77 ± 0,001	0,66 ± 0,001	0,59 ± 0,001	0,53 ± 0,002	0,37 ± 0,002	0,32 ± 0,004	0,25 ± 0,036	0,19 ± 0,003
A3B1	0,76 ± 0,002	0,64 ± 0,001	0,56 ± 0,002	0,49 ± 0,002	0,39 ± 0,002	0,34 ± 0,014	0,29 ± 0,025	0,22 ± 0,022
A1	1,06 ± 0,002	1,04 ± 0,002	1,05 ± 0,004	1,04 ± 0,001	1,03 ± 0,002	1,01 ± 0,023	1,04 ± 0,008	1,05 ± 0,015
A2	0,93 ± 0,001	0,89 ± 0,003	0,91 ± 0,010	0,91 ± 0,002	0,89 ± 0,001	0,91 ± 0,013	0,93 ± 0,010	0,92 ± 0,008
A3	1,12 ± 0,001	1,12 ± 0,002	1,09 ± 0,002	1,09 ± 0,002	1,10 ± 0,002	1,09 ± 0,028	1,11 ± 0,009	1,09 ± 0,004
B1	0,95 ± 0,002	0,94 ± 0,001	0,95 ± 0,002	0,94 ± 0,001	0,95 ± 0,002	0,94 ± 0,009	0,97 ± 0,036	0,95 ± 0,004

Anexo 20. Grupos funcionales de las muestras plásticas después de la degradación biológica

Muestra	Enlace	Grupo Funcional (GF)	Nombre GF	Rango (cm ⁻¹)	Modo de vibración
A1B1- A2B1-A3B1	N.A	N.A	Impureza	N.A	N.A
	CH	R(CH ₂) ₄ -C	Alcano	2936-2916	Estiramiento asimétrico
	CH	R(CH ₂) ₄ -C	Alcano	2863-2843	Estiramiento asimétrico
	CH	R(CH ₂) ₄ -C	Alcano	1485-1445	Deformación
	N.A	N.A	Impureza	N.A	N.A
	N.A	N.A	Impureza	N.A	N.A
	N.A	N.A	Impureza	N.A	N.A
	N.A	N.A	Impureza	N.A	N.A
	CC	R(CH ₂) ₄ -C	Alcano	750-720	Vibración esquelética
	LDPE puro	N.A	N. A	Impureza	N. A
CH		R(CH ₂) ₄ -C	Alcano	2936-2916	Estiramiento asimétrico
CH		R(CH ₂) ₄ -C	Alcano	2863-2843	Estiramiento asimétrico
N.A		N. A	Impureza	N. A	N.A
N.A		N. A	Impureza	N. A	N.A
N.A		N. A	Impureza	N. A	N.A
CH		R(CH ₂) ₄ -C	Alcano	1485-1445	Deformación
N.A		N. A	Impureza	N. A	N.A
N.A		N. A	Impureza	N. A	N.A
CC		R(CH ₂) ₄ -C	Alcano	750-720	Vibración esquelética

Adaptado del laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela Politécnica Nacional (2021)

Anexo 21. Espectro infrarrojo de transmitancia de las muestras plásticas después de la degradación biológica

