



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA,
ESPECIALIDAD Laboratorio Clínico**

TÍTULO:

**“Efecto de la temperatura en el crecimiento de dos cepas ATCC de
Pseudomonas sp. expuestas a polipropileno”**

ALUMNA(S):

Alania Vilcachagua, Yorka Masiel

Pérez Romero, Silvia Gabriela

ASESOR:

Agapito Panta, Juan Carlos

2017

Tabla de Contenidos:

INTRODUCCIÓN	6
MATERIALES Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	11
DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS.....	15
DECLARACIÓN DE FINANCIAMIENTO	15
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
ANEXOS.....	20

RESUMEN

Antecedentes: El uso de plásticos se ha incrementado gradualmente en la rutina diaria ocasionando mayor contaminación al medio ambiente. Actualmente, se conoce que especies del género *Pseudomonas* aisladas de suelo y basurales tienen la capacidad de biodegradar derivados del carbono, como petróleo y polipropileno. **Objetivo:** Evaluar el crecimiento a 2 temperaturas de dos cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *Pseudomonas sp.* N° 9027 y N° 10145, expuestas a polipropileno. **Materiales y métodos:** Se generó gráficas considerando el cambio de la absorbancia (DO) en función al tiempo (semanas). Debido al igual comportamiento cinético a 37°C en los ensayos con las cepas N° 9027 y N° 10145, se decidió agrupar las mediciones considerando la condición con polipropileno. Luego de comprobar los supuestos, se utilizó la prueba de T-Student para determinar diferencias de promedios de acuerdo a la condición y por cada medición de absorbancia a través del tiempo. Finalmente, usando los datos agrupados y modelos mixtos, se estimó los intervalos de confianza al 95% de las predicciones ajustadas por la interacción de la condición y tiempo para cada punto de medición de absorbancia. Todos los supuestos fueron corroborados, y la interacción fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). El análisis de datos fue realizado en Stata v14 (College Station, TX: StataCorp LP), considerando un $p < 0.05$ como significativo. **Resultados:** El comportamiento cinético de las dos cepas ATCC 9027 y ATCC 10145 frente a la presencia y ausencia del polipropileno y a dos temperaturas; tuvo mejor respuesta frente a 37°C. Asimismo, el análisis de las curvas de absorbancia tuvo como resultado absorbancias similares entre ellas frente al polipropileno. Se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa a partir de la tercera semana.

Conclusiones: Se puede concluir evaluando las absorbancias promedio de todas las muestras, que las curvas de crecimiento para ambas cepas ATCC expuestas a polipropileno a una temperatura de 37°C presentan un mejor crecimiento.

Palabras claves: Contaminación ambiental, plástico, temperatura, polipropileno, cepas ATCC, *Pseudomonas sp.*

“Effect of temperature on the growth of two ATCC strains of *Pseudomonas sp.* exposed to polypropylene”

SUMMARY

Background: The use of plastics has gradually increased in the daily routine causing greater pollution to the environment. It is now known that *Pseudomonas* species isolated from soil and landfills have the ability to biodegrade carbon derivatives such as petroleum and polypropylene.

Objectives: To evaluate the growth at two temperatures of two strains ATCC (American Type Culture Collection) of *Pseudomonas sp.* No. 9027 and No. 10145 exposed to polypropylene.

Materials and methods: Graphs were generated considering the change in absorbance (OD) as a function of time (weeks). Due to the same kinetic behavior at 37 ° C in the tests with strains No. 9027 and No. 10145, it was decided to group the measurements considering the condition with polypropylene. After checking the assumptions, we used the T-Student test to determine differences of averages according to the condition and by each measurement of absorbance over time. Finally, using the pooled data and mixed models, we estimated 95% confidence intervals of the predictions adjusted by the interaction of the condition and time for each absorbance measurement point. All assumptions were corroborated, and the interaction was statistically significant ($p < 0.001$). The data analysis was performed in Stata v14 (College Station, TX: StataCorp LP), **Results:** The kinetic behavior of the two strains ATCC 9027 and ATCC 10145 against the presence and absence of polypropylene and at two temperatures; had a better response than 37 ° C. In addition, the analysis of absorbance curves resulted in similar absorbances

between them versus polypropylene. It was determined that there is a statistically significant difference from the third week (0.0173) p-value <0.05 is significant.

Conclusions: Evaluating the average absorbances of all samples that the growth curves for both ATCC strains exposed to polypropylene at a temperature of 37°C show a better growth.

Key words: environment pollution, plastic, temperature, polypropylene, ATCC strains, *Pseudomona sp*

INTRODUCCIÓN

El bajo costo, la alta demanda y el prolongado tiempo de vida del plástico ha hecho posible que éste sea considerado un contaminante peligroso a nivel mundial. Debido a la insuficiente cantidad de rellenos sanitarios, muchos de los residuos plásticos son llevados al mar, originando de ésta manera la muerte de incontables especies. (1,2) Los plásticos sintéticos que constituyen alrededor del 80% del uso total son polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), poliestireno (PS), poliuretano (PU), tereftalato de polietileno (PET). (3) (Anexo1) La degradación natural de estos plásticos puede tardar entre 100 hasta 1000 años. Ésta resistencia a la degradación se puede evitar por factores físico químicos y capacidades microbianas. La temperatura es un factor crucial en el rendimiento y crecimiento de los microorganismos, especies del género *Pseudomonas* se han caracterizado por ser criófilas y mesófilas, muchas de éstas especies suelen crecer en un rango de 2 a 42 °C, sin embargo resulta imposible tener conocimiento sobre la temperatura óptima cuando se trata de cepas ATCC de *Pseudomonas sp*, debido a que no se especifica una temperatura adecuada para su crecimiento.(4)

Actualmente las especies del género *Pseudomonas* son usadas para procesos de biorremediación por derrame de petróleo, ya que tienen la capacidad de utilizar como parte de su metabolismo al carbono. Debido a ello, se han realizado diversos estudios con la finalidad de introducir nuevas metodologías que puedan ser aplicados en la reducción de plásticos. (5,6,7)

Sin embargo para obtener una completa eliminación de éste polímero plástico se requiere una descomposición de polímeros a oligómeros más pequeños o monómeros, esto permitirá que pueda pasar a través de la membrana celular, seguido de la asimilación y posteriormente el metabolismo intracelular. Además es necesario que el microorganismo se encuentre en un hábitat adecuado, ya sea de manera natural o proporcionado por los investigadores, manteniendo ciertos

parámetros de pH, y sales que puedan permitir su viabilidad. (8,9,10) En el año 2009 se aisló *Pseudomonas* y *Sphingomonas sp.* de suelos y basurales, con el propósito de evaluar su capacidad de biodegradación de polietileno, luego de seis semanas se obtuvo una degradación de 43% del plástico total. (11) En México se realizó un estudio donde se utilizó sólo cepas de *Pseudomonas*, en seis semanas se obtuvo una degradación de polietileno del 58.18%. (12) En el año 2010 en un estudio realizado por la Universidad Mayor de San Marcos (UNMSM), donde se evaluó la biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano, entre ellos *Pseudomonas sp.* y hongos, y a un pH de 5.5 y 7; obtuvo como resultado que el peso perdido de polietileno por estas cepas aisladas fue de 4.8% para un pH de 5.5 y 5.4% para un pH de 7. (13) Otro estudio consistió en un pretratamiento con ácido nítrico, donde *Pseudomonas aeruginosa* fue capaz de biodegradar 0.25 de LDPE en un 50.5% en 2 meses. (14) Sin embargo, no se necesitó pretratamiento químico para *Pseudomonas sp.* AKS2 para degradar películas de LDPE, Aunque sólo el 5% de la masa total de 300 mg se degradó en 45 días. (15) Por lo tanto la degradación del plástico depende tanto de la disposición estructural del polímero como del tipo de cepas de *Pseudomonas* expuestas al polietileno, así como también la temperatura que ésta cepa requiera.

El presente estudio exploratorio tiene por objetivo evaluar el efecto de la temperatura en 2 cepas ATCC de *Pseudomonas sp.* N° 9027 y N° 10145 expuestas al polipropileno, debido a que éstas cepas ATCC no especifican una temperatura óptima, se ha seleccionado 2 temperaturas alejadas entre sí, con la intención de evaluar la viabilidad de las cepas en dos rangos diferentes; hasta la actualidad no se han realizado estudios sobre la exposición de cepas ATCC de *Pseudomonas* a polipropileno. Los resultados de este estudio buscan servir como un aporte en el campo de biotecnología y de salud pública, porque cómo se ha descrito anteriormente aún hay muchas

variables que deben ser investigadas a profundidad sobre la exposición de *Pseudomonas* a plásticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio. Estudio de tipo experimental.

Cepas certificadas: Se utilizó dos cepas ATCC de *Pseudomonas sp.* N° 9027 y N° 10145 adquiridas comercialmente

Reconstitución. Las cepas ATTC fueron almacenadas entre 2-8° C hasta su uso. La reconstitución y siembra de las cepas de referencia, fueron realizadas en medios de cultivo de enriquecimiento (TSB).

Método de identificación: A partir del medio de enriquecimiento, previo al proceso experimental, se realizó el aislamiento, la identificación y confirmación de las cepas mediante técnicas de microbiología convencional, utilizando baterías bioquímicas y medios de cultivo tales como agar Cetrimide y Tripticasa Soya Agar (TSA).

Preparación de la cepa. A partir de los cultivos positivos crecidos en agar TSA, se repicó un par de colonias de *Pseudomonas sp.* y se realizó una suspensión bacteriana equivalente a un patrón de 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 ufc/mL), el mismo que fue utilizado para la incorporación a los medios de cultivo.

Preparación del medio de cultivo: El medio de cultivo fue preparado de acuerdo a lo descrito en trabajos previos (3, 4,5) para ambas cepas. Se utilizaron como sales $(\text{NH}_4) \text{SO}_4$ (100 g/mL), NaNO_3 (100 g/mL), K_2HPO_4 (100 g/mL), KCl (100 g/mL), MgSO_4 (20 g/mL) y suplementado con 10 g/mL de levadura y 2g de perlas de tamaño de 2 mm de polipropileno obtenido de tubos Falcón previamente triturado en una estructura mecánica fabricado por el área de Desarrollo

Tecnológico del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN) y esterilizados por calor húmedo a 121°C por 15 minutos.

Se utilizó polipropileno por ser uno de los materiales plásticos usualmente presentes en los residuos sólidos que contaminan según las referencias bibliográficas (Alonso y col 1999). A la unión del medio de crecimiento con el polipropileno (llamado medio de enriquecimiento), se agregó un volumen de 1 ml de la cepa preparada en el paso anterior. Todos los cultivos fueron incubados durante 60 días a temperaturas de: 37°C y 4° C.

Controles de aislamiento. Se incluyeron controles sin inoculación de polipropileno para ambas condiciones; a fin de determinar solo crecimiento bacteriano de *Pseudomonas sp.* Así mismo, se descartó posible contaminación por otros microorganismos que den falsos positivos en la medición de la Absorbancia durante las 8 semanas. Para ello, se tomó una asada del cultivo positivo y se realizó una coloración Gram, dando como resultado bacilos Gram negativos y en los medios de cultivo de Agar Sangre y Agar Cetrimide dio crecimiento positivo. Para la identificación del género se realizaron pruebas bioquímicas, dando como resultado positivo a *Pseudomonas sp.*

Medición de absorbancia. A cada medio de cultivo contenido en un Erlenmeyer, se realizó mediciones de absorbancia (Ab) por espectrofotometría a 640nm. Las mediciones fueron realizadas con un espectrofotómetro que se encuentra ubicado en el Laboratorio Auxiliar de la Escuela de Tecnología Médica. Las calibraciones fueron ajustadas con un cultivo de número conocido de bacterias. Todas las lecturas fueron realizadas cada semana durante el lapso de ocho semanas por duplicado.

Análisis de datos. Se generó gráficas considerando el cambio de la absorbancia (DO) en función al tiempo (semanas). Debido al igual comportamiento cinético a 37°C en los ensayos con las cepas N° 9027 y N° 10145, se decidió agrupar las mediciones considerando la condición con

polipropileno. Luego de comprobar los supuestos, se utilizó la prueba de T-Student para determinar diferencias de promedios de acuerdo a la condición y por cada medición de absorbancia a través del tiempo. Finalmente, usando los datos agrupados y modelos mixtos, se estimó los intervalos de confianza al 95% de las predicciones ajustadas por la interacción de la condición y tiempo para cada punto de medición de absorbancia. Todos los supuestos fueron corroborados, y la interacción fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). El análisis de datos fue realizado en Stata v14 (College Station, TX: StataCorp LP), considerando un $p < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS

Al sembrar las muestras en Agar Sangre y Cetrimide, se encontraron numerosas colonias y con olor característico de *Pseudomona*. Estas colonias fueron sometidas a un proceso de tinción Gram, por medio del cual se observó que eran bacilos Gram-negativas, debido a la coloración verduzca que adquirieron en los medios de cultivo que tenían un olor a manzana, esto es de suma relevancia, debido a que el olor es característico de la especie *Pseudomona*.

También, durante 8 semanas se realizaron por duplicado mediciones de absorbancia (DO) de las dos cepas en estudio ATCC N° 9027 y ATCC N° 10145 obteniendo un promedio de lectura para cada semana. Así mismo, se comparó las mediciones de las muestras con polipropileno y sin polipropileno.

En la Figura N° 1, se puede observar el resultado de la Absorbancia (Ab) promedio vs el tiempo obtenido al evaluar el comportamiento de la cepa N° 9027, al inicio del cultivo y durante las ocho semanas que duró el ensayo (T=0 hasta T=8); tanto en condiciones con y sin polipropileno y a las dos temperatura de 37°C y 4° C respectivamente. En este resultado se puede observar que la curva de crecimiento de la muestra a temperatura de 4°C es muy similar a la de 37°C sin polipropileno. Sin embargo, al evaluar el comportamiento de la cepa N° 10145, a las mismas condiciones del medio de cultivo previamente descritas, se observa que a la temperatura de 37°C, tuvo mejor crecimiento; en ese sentido se escogió la temperatura de 37°C para el análisis independiente de cada cepa (Figura N° 2) .

Asimismo, se realizó un análisis comparativo entre las curvas de crecimiento de ambas cepas (Figura N° 3) expuestas solo a una temperatura de 37°C; obteniéndose como resultado absorbancias muy similares entre ellas frente al polipropileno.

También se analizó la interacción entre condición (**con** y **sin** polipropileno) y tiempo, usando datos agrupados y modelos mixtos a fin de determinar los cambios de absorbancia; estas

estimaciones están con un intervalo de 95% de confianza y nos acredita que los supuestos fueron corroborados y la interacción fue estadísticamente significativa partir de la a tercera semana ($p < 0.001$) (Figura N° 5)

DISCUSIÓN

En otros estudios evaluaron como variable al peso (11, 12, 13, 15). Nuestro estudio no consideró está variable por una posible contaminación de las muestras al momento de realizar cada medición y que podría afectar los datos de absorbancia. Los estudios realizados por otros autores han incorporado esta variable con la finalidad de determinar el porcentaje que ha sido biodegradado con respecto al total del peso inicial donde se ha incluido ensayos fisicoquímicos (10, 11,12). Sin embargo, también ha habido una marcada diferencia tanto en la pérdida de peso como las velocidades de degradación absoluta y específica, utilizando estos plásticos. En este estudio se ha utilizado mediciones por absorbancia de espectrofotometría con la intención de evaluar crecimiento bacteriano, éste medición es válida y se considera como un argumento que indica el consumo del polímero por especies microbianas.(16) No obstante, dado que los microorganismos son capaces de usar sustancias de reserva y otras moléculas como impurezas, éste resultado no puede ser aceptado como una conclusión irrefutable, se deben utilizar diferentes técnicas microscópicas para refinar el análisis como por ejemplo microscopia de fuerza atómica para observar la topología superficial del polímero. Los estudios mencionados anteriormente (11, 12, 13,15) utilizan la pérdida de peso para estimar la biodegradabilidad, la cual esta estandarizado para pruebas de biodegradabilidad in situ (16), este tipo de medida no es representativo de una biodegradabilidad material, ya que ésta pérdida peso podría ser debido a la desaparición de impurezas volátiles y solubles. A pesar de haberse usado mediciones distintas, ambas son

aceptadas según protocolo para estimar biodegradabilidad, aún así se sugiere realizar estudios posteriores que puedan seguir aportando a éste estudio.

Esta investigación ha sido la primera en incluir dos cepas comerciales de *Pseudomonas* ATCC, obteniendo como resultado un crecimiento satisfactorio en los 2 meses que han sido expuestas a polipropileno; a diferencia del estudio realizado por otros autores donde utilizaron cepa *Pseudomonas sp.* aisladas de agua estancada donde la biodegradación fue del 58.18 % del peso inicial (11). Esta acción se debe a que las bacterias aisladas de basurales ya están habituadas a ese tipo de ecosistema donde su metabolismo está esencialmente basado en carbono; mientras que las cepas ATCC utilizadas en nuestro estudio tuvieron un crecimiento más lento, debido a que éstas pasaron por un proceso previo de activación y adaptación para posteriormente desarrollar en estos medios enriquecidos a base de sales y realizar un correcto metabolismo (11,21).

La mayor parte de los estudios están enfocados a evaluar *Pseudomonas* expuestas a polietileno, polipropileno también es considerado un plástico de uso común, es por ello que ha sido utilizado en éste proyecto; cada plástico tiene diferentes propiedades y características, la actividad microbiana no siempre es la misma, va a depender del tipo de plástico al que va a ser expuesto.(Anexo 2)

Los estudios de absorbancia evaluados durante las 8 semanas demostraron que hubo biodegradación del polipropileno en condiciones de laboratorio; sin embargo para hablar de una relación directamente proporcional entre el polipropileno y éstas bacterias sería recomendable realizar otros estudios que permitan comprender mejor los mecanismos.(16) Así mismo, otro punto importante a considerar para identificar procesos viables y eficaces que puedan llevarse a cabo en el campo biotecnológico, es la evaluación de diversas temperaturas a fin de identificar la más óptima, sobre la acción en el crecimiento de las cepas al ser expuestas a polipropileno.

Del presente estudio se concluye que en ambas cepas de *Pseudomonas* existe un mejor crecimiento a una temperatura de 37°C que a una de 4°C en presencia de polipropileno. Además el crecimiento visualizado mediante las curvas está libre de agentes contaminantes, de ésta forma y gracias a la corroboración estadística se puede establecer una relación directa de la cinética de crecimiento de *Pseudomonas* ATCC 9027 y ATCC 10145 con la degradación de polipropileno, evidenciando de ésta forma la capacidad de estos microorganismos para degradar polipropileno.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores involucrados en la realización de este estudio declaramos no tener conflictos de interés.

DECLARACIÓN DE FINANCIAMIENTO

El proyecto fue financiado por el Fondo de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Medicina Alberto Hurtado. Categoría Alumno. Año 2014.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

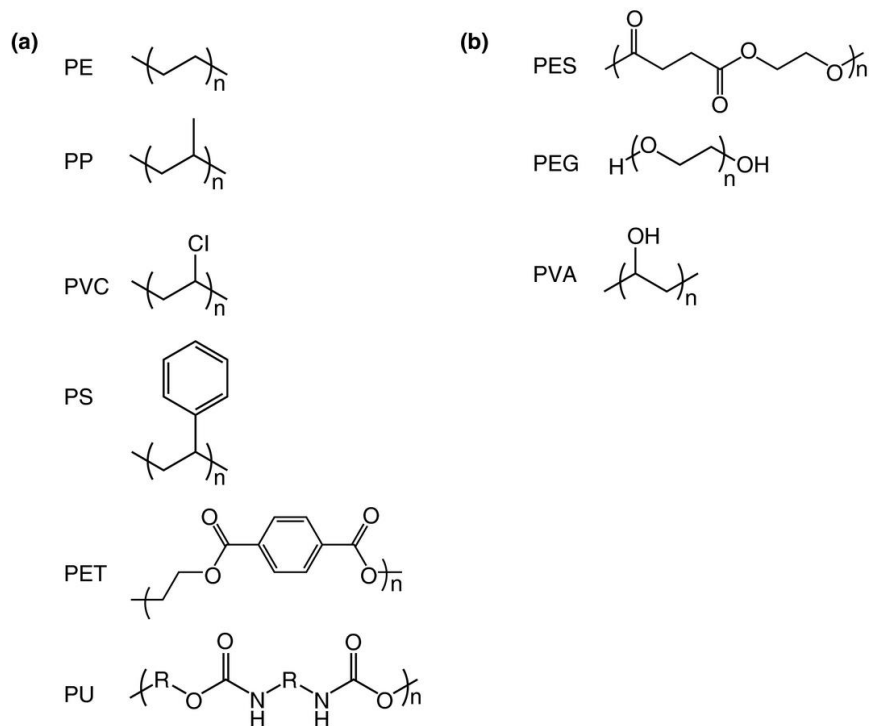
1. Fondo Nacional del Ambiente. Residuos Sólidos. En: Network en español. <http://www.fonamperu.org/general/agua/residuos.php> (Acceso Abril 2014).
2. DIGESA. Rellenos Sanitarios en el Perú. Diario La República. 2013. En Network en español. <http://www.larepublica.pe/04-12-2013/10-rellenos-sanitarios-no-son-suficientes-para-tratar-toneladas-de-basura-en-peru>
3. PlasticsEurope. Plastics- The Facts 2015. Un análisis de la producción europea de plásticos, información de demanda y residuos. Disponible en: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics-the-facts-2015.aspx>
4. Devi RS, Kannan VR, Natarajan K, Divan D., Kannan K., Chandru S. y Antony AR. El papel de los microbios en la degradación plástica. Environ Waste Manageed Chandra R. Estados Unidos 2016 p. 341-370
5. Tribedi P., Sarkar S., Mukherjee K., Sil AK. Aislamiento de una novela de *Pseudomonas* sp. de suelo que puede degradar eficazmente el polietileno succinato. Env Sci Pollut Res. 2012. 19(1) 2115-2124
6. Dash HR., Mangwani N., Chakraborty J., Kumari S., Das S. Las bacterias marinas potenciales candidatos para la biorremediación mejorada. 2013. 97(1) 561-571
7. Wierckx N., Prieto MA., Pomposiello P., de Lorenzo V., O connor K., Blank LM., Residuos de plástico como un nuevo sustrato para la biotecnología industrial. Microb Biotechnol 2015. 8(1) 900-903
8. Lucas N., Bienna, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F. y Nava-Saucedo, JE. Biodegradación de polímeros: mecanismos y técnicas de estimación. Chemosphere 2008. 73(1) 429 – 442

9. Singh B. y Sharma, N. Implicaciones mecánicas de la degradación del plástico .Polym Degrad Stab 2008. 93(1) 561- 584 .
10. Kolvenbach, BA , Helbling, DE , Kohler, HE y Corvini, PF X. Productos químicos emergentes y evolución de las capacidades y vías de biodegradación en bacterias . Curr Opin Biotechnol 2014. 27(1) 8 – 14
11. Burd D. Plastic not fantastic.
2008.<http://wwsef.uwaterloo.ca/archives/2008/08BurdReport.pdf>
12. Universidad Autónoma de México. Evaluación de la bacteria Pseudomonas como degradador de polietileno. XVIII Concurso Universitario. 2009
13. Uribe D., Giraldo D., Gutiérrez S. & Merino F. ‘Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario’ Revista Peruana de Biología 2010. 17(1):133-136
14. Rajandas H., Parimannan S., Sathasivam K., Ravichandran M., Su Yin L. Una nueva técnica basada en espectroscopía FTIR-ATR para la estimación de la biodegradación de polietileno de baja densidad. Polym Test 2012. 31(1) 1094-1099.
15. Tribedi P. y Sil, AK Degradación de polietileno de baja densidad por *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm. Env Sci Pollut Res 2013. 20(1) 4146-4153
16. Lucas N., Bienna C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F., Nava-Saucedo JE. Biodegradación de polímeros: mecanismos y técnicas de estimación .Chemosphere 2008. 73(1) 429 – 442
17. IMP. Instituto Mexicano del Petróleo. México. D. F. (2008) Recuperado el 11 de Enero del 2010 de <http://www.imp.mx/>

18. Tecnología de los Plásticos. Polietileno. En: Network en Español. 16 de julio de 2012. <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2012/07/polietileno-pe.html>. (Acceso el 27 de octubre de 2013).
19. Palleroni, N. Introduction to the family Pseudomonadaceae. In "The Prokaryotes". Vol. 1. Berlin: Springer- Verlag 1981. p. 655-665.
20. Cabello, R. Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Vol. 1. 3° ed. México: Ed. Médica Panamericana, 2007.
21. Song, C. "Estimating the numbers of microorganisms that degrade biodegradable plastics in natural environments". Food and Fertilizer Technology Center (Internet) 2004. <http://www.fftc.agnet.org/library.php?func=view&style=type&id=20110718191203>. (Acceso el 27 de octubre de 2013).
22. Seneviratne G., N. S. Tennakoon, M. L. M. A. W. Weerasekara *et al.* Polyethylene biodegradation by a developed Penicillium-Bacillus biofilm. Current Science 20016. 90 (1): 20-21.
23. Segura, D., Noguez, R., Espín, G. Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. Biotecnología 2007; 361-372.
24. Lozano A, Madregal S, Vilte E, Apaza A, Saravia J. 2002.Degradación de poliestireno y polipropileno con microorganismos de Vermicompost. Universidad Nacional de Jujuy.Argentina.
25. Pastor R. La minimización de envases y residuos de envases. Planes empresariales de prevención. Alimentación: Equipos y Tecnología 2001: 20(1): 93-100.
26. Orozco C. Contaminación ambiental, una visión desde la química. Vol 1. Ed. Madrid. Thomson Editores/Paraninfo. 2011.
27. Brown, P. Contaminación global. Vol 1. 1° ed. España. Ediciones Morata. 2009.

28. Guevara J, Castañeda I, Juárez J, Mendoza A. Efecto de la temperatura y pH sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBLA-04 en solución mínima de sales con detergente Ace. Revista REBIOL 2013; Vol . 33(1): 1-8
29. Environmentally relevant concentrations of microplastic particles influence larval fish ecology. O.M. Lönnstedt, P. Eklöv. Science. 3 june 2016
<http://science.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aaf8697>
30. Sonil N. Smiti S. Jayanthi A. Studies on the biodegradation of natural and synthetic polyethylene by *Pseudomonas* spp. Sci. Environ. Manage. 2010; 14(2): 57-60

ANEXOS



ANEXO 1: Estructuras de polietileno de plástico sintético (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), poliestireno (PS), poli (tereftalato de etileno) y poliuretano (PU), y (b) polietileno de plástico más hidrolizable Succinato (PES), polietilenglicol (PEG) y alcohol polivinílico (PVA). Los grupos R en PU pueden representar una serie de grupos funcionales que se usan para subclasificar las UPs como aromáticos, alifáticos, poliéster, poliéter o policaprolactona.

El plástico	Microorganismo	Enzima	Referencia
Poliétileno (PE)			
LDPE	<i>Pseudomonas</i> sp. AKS2	Hidrolasa	Tribedi y Sil (2013c)
LMWPE	<i>Pseudomonas</i> sp. E4	Alkane hidroxilasa	Yoon <i>et al</i> . (2012)
Poliestireno (PS)			
Alto impacto	<i>Pseudomonas</i> sp.	Esterasa	Mohan <i>et al</i> . (2016)
Cloruro de vinilo	<i>P. putida</i> AJ	Alkene monooxygenase	Danko <i>et al</i> . (2004)
Poliuretano (PUR)			
Poliéster	<i>P. chlororaphis</i>	Poliuretanasas	Ruiz <i>et al</i> . (1999)
Poliéster	<i>P. aeruginosa</i>	Esterasa	Mukherjee <i>et al</i> . (2011)
Poliéster	<i>P. aeruginosa</i> MZA-85	Esterasa	Shah <i>et al</i> . (2013)
Poliéster	<i>Pseudomonas</i> sp.	Lipasa	Biffinger <i>et al</i> . (2015)

ANEXO 2:

Lista de *Pseudomonas* y enzimas asociadas en la biodegradación de algunos tipos de plástico. No se encontró referencia de enzimas asociadas a polipropileno.

Journal of Applied Microbiology
 0147, 31 MAY 2017 DOI: 10.1111/jam.13472
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13472/full#jam13472-fig-0001>

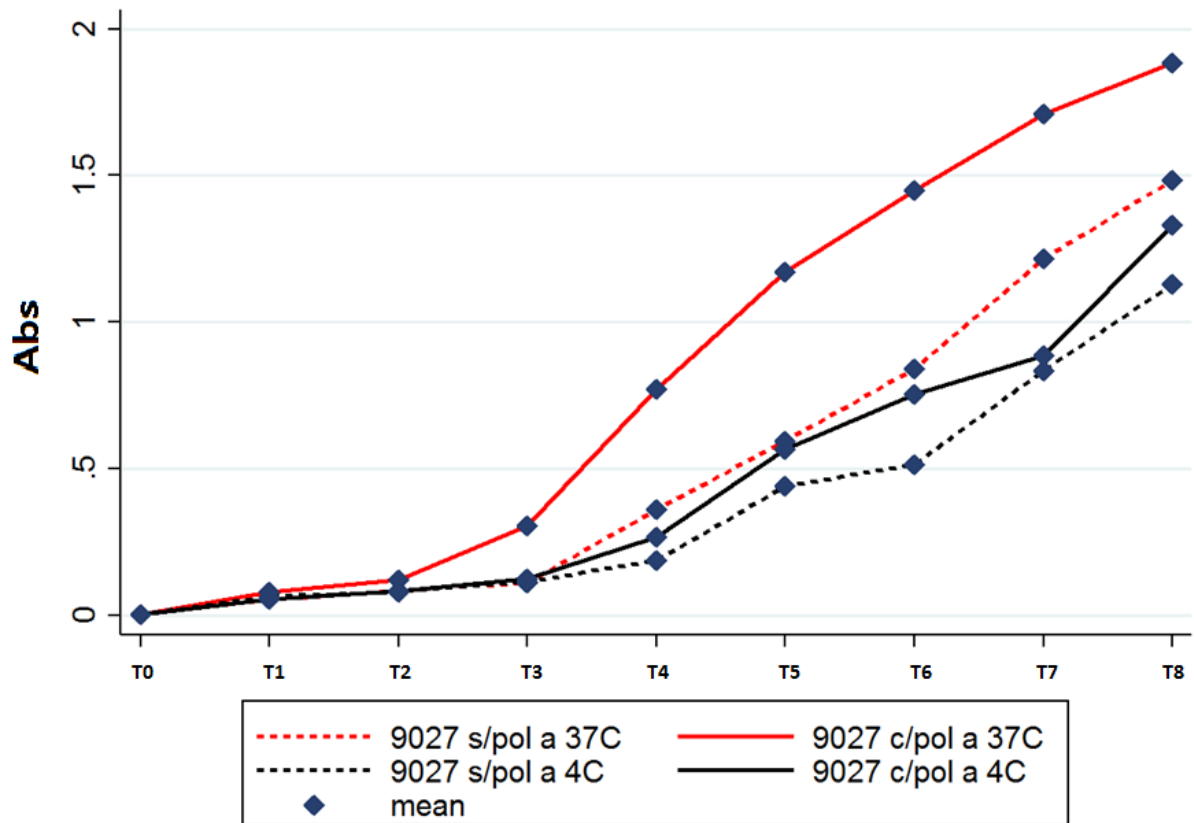


FIGURA 1: Comparación de la absorbancia de la cepa *Pseudomona* ATCC 9027.

Se describe las Ab promedio obtenidas en mediciones por duplicado al inicio del cultivo y durante cada semana; tanto en el medio con polipropileno, sin polipropileno y a temperaturas de 37°C y 4°C.

S/pol: Sin polipropileno

C/pol: con polipropileno

Mean: media-promedio

T0...T8: Tiempo en semanas

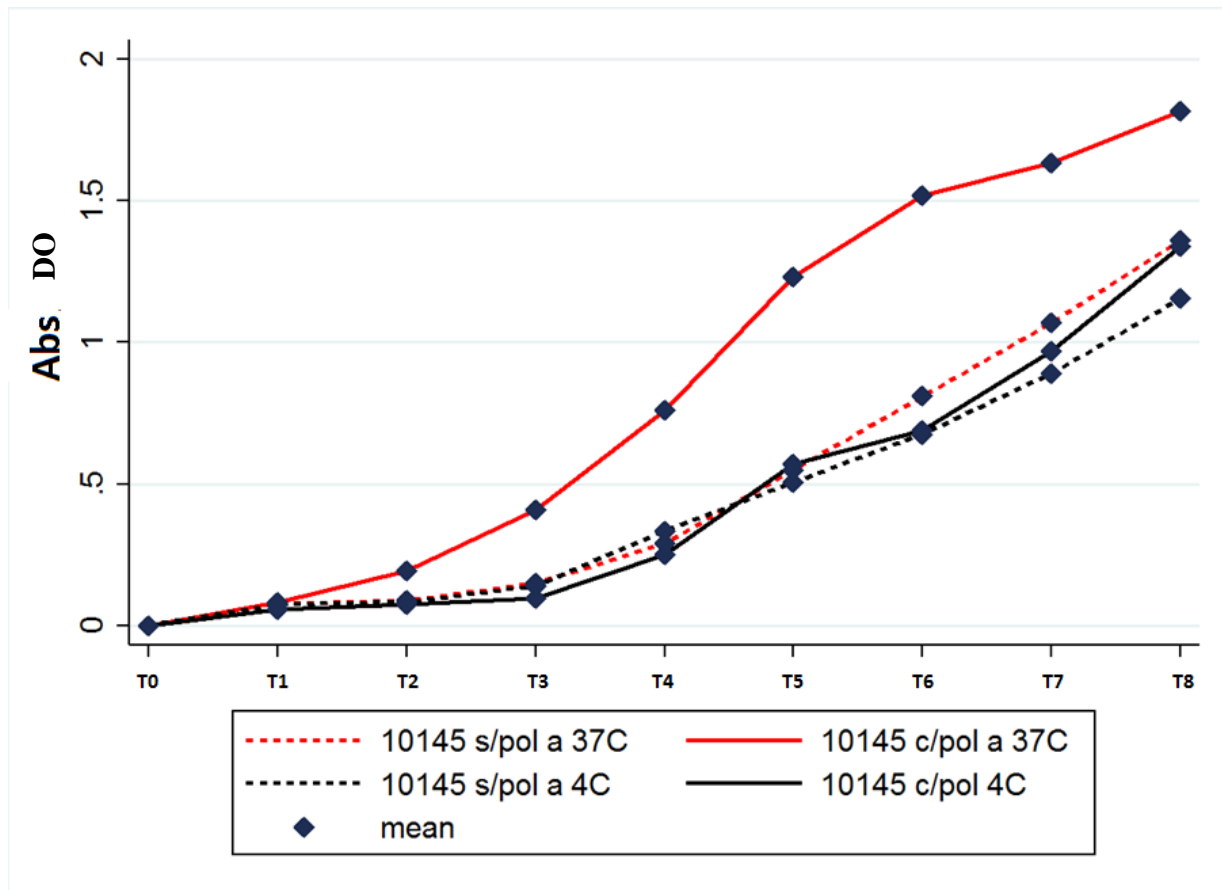


FIGURA 2: Comparación de la absorbancia de la cepa *Pseudomonas* ATCC 10145.

Se describe las Ab promedio obtenidas en mediciones por duplicado al inicio del cultivo y durante cada semana; tanto en el medio con polipropileno, sin polipropileno y a temperaturas de 37°C y 4°C. No se observa gran diferencia de crecimiento en las curvas a 4°C y 37°C sin polipropileno.

S/pol: Sin polipropileno

C/pol: con polipropileno

Mean: media-promedio

T0...T8: Tiempo en semanas

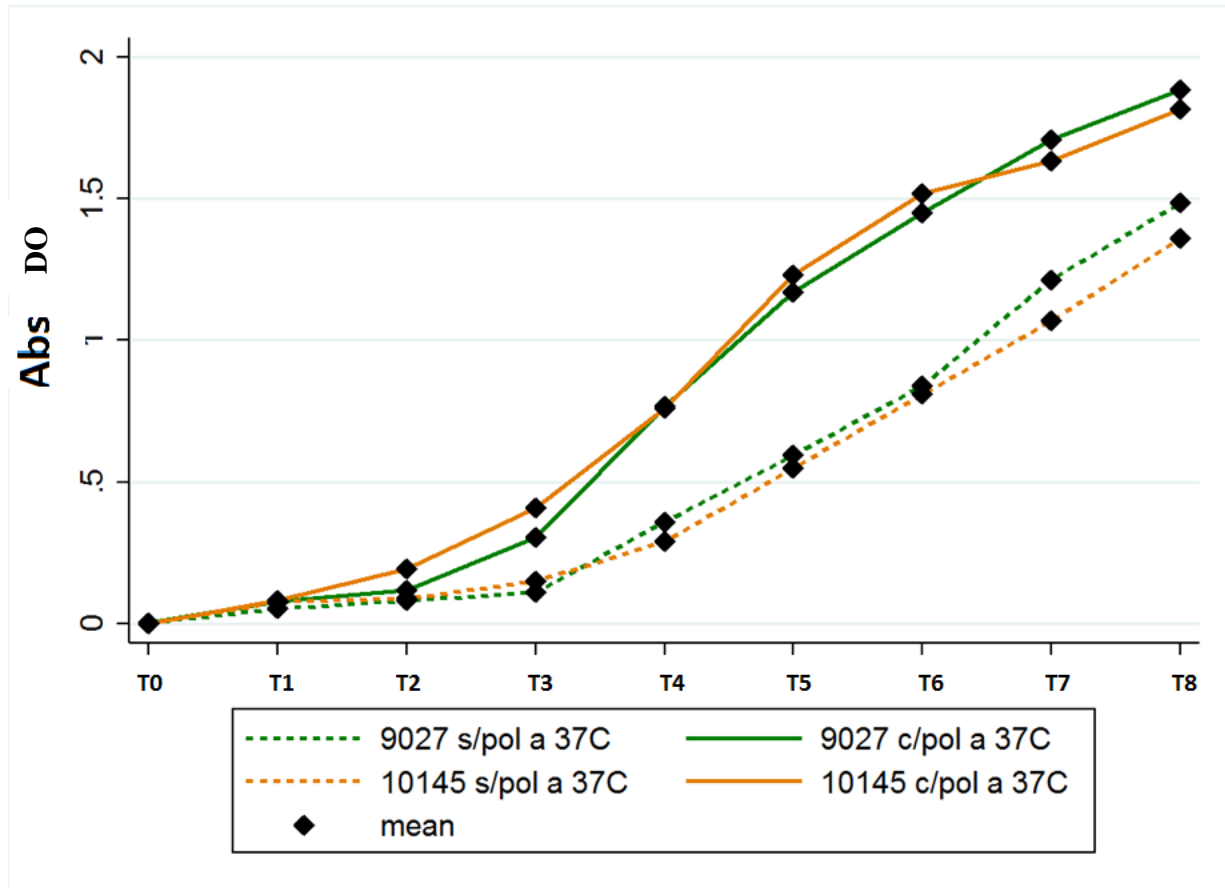


FIGURA 3: Comparación de absorbancia de la cepas *Pseudomona* ATCC 9027 y 10145.

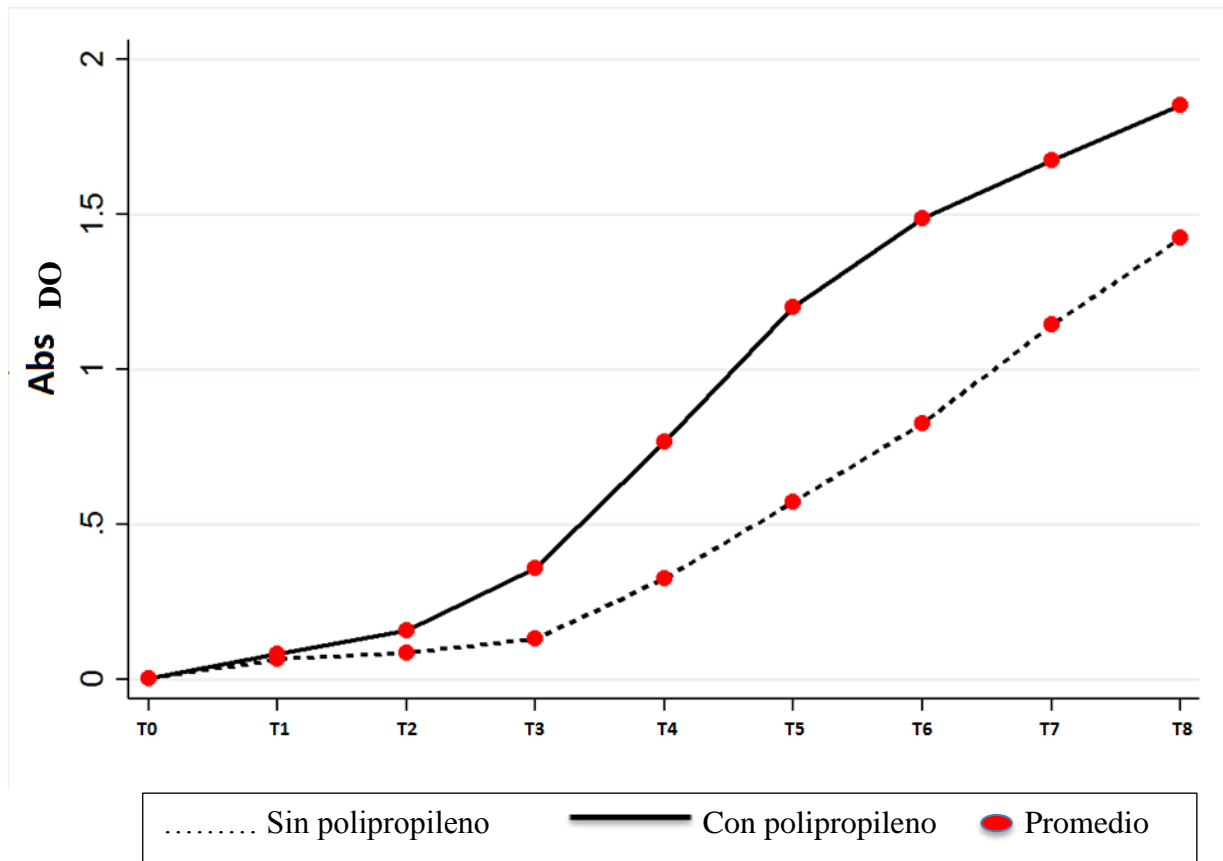
Se describe las Ab promedio obtenidas en mediciones por duplicado al inicio del cultivo y durante cada semana; tanto en las muestras con polipropileno, sin polipropileno y a una temperatura de 37°C. Se observa diferencia entre las curvas de crecimiento de las muestras sin polipropileno, con polipropileno.

S/pol: Sin polipropileno

C/pol: con polipropileno

Mean: media-promedio

T0...T8: Tiempo en semanas



	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8
ttest	0.5703	0.0686	0.0173	0.0014	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	0.0001

FIGURA 4: Comparación de ambas condiciones (Sin polipropileno, Con polipropileno) a 37°C, utilizando el test T student.

Para esta figura se decidió agrupar las mediciones de acuerdo a la condición de las muestras. Se tomó un valor $p < 0.05$ como significativo.

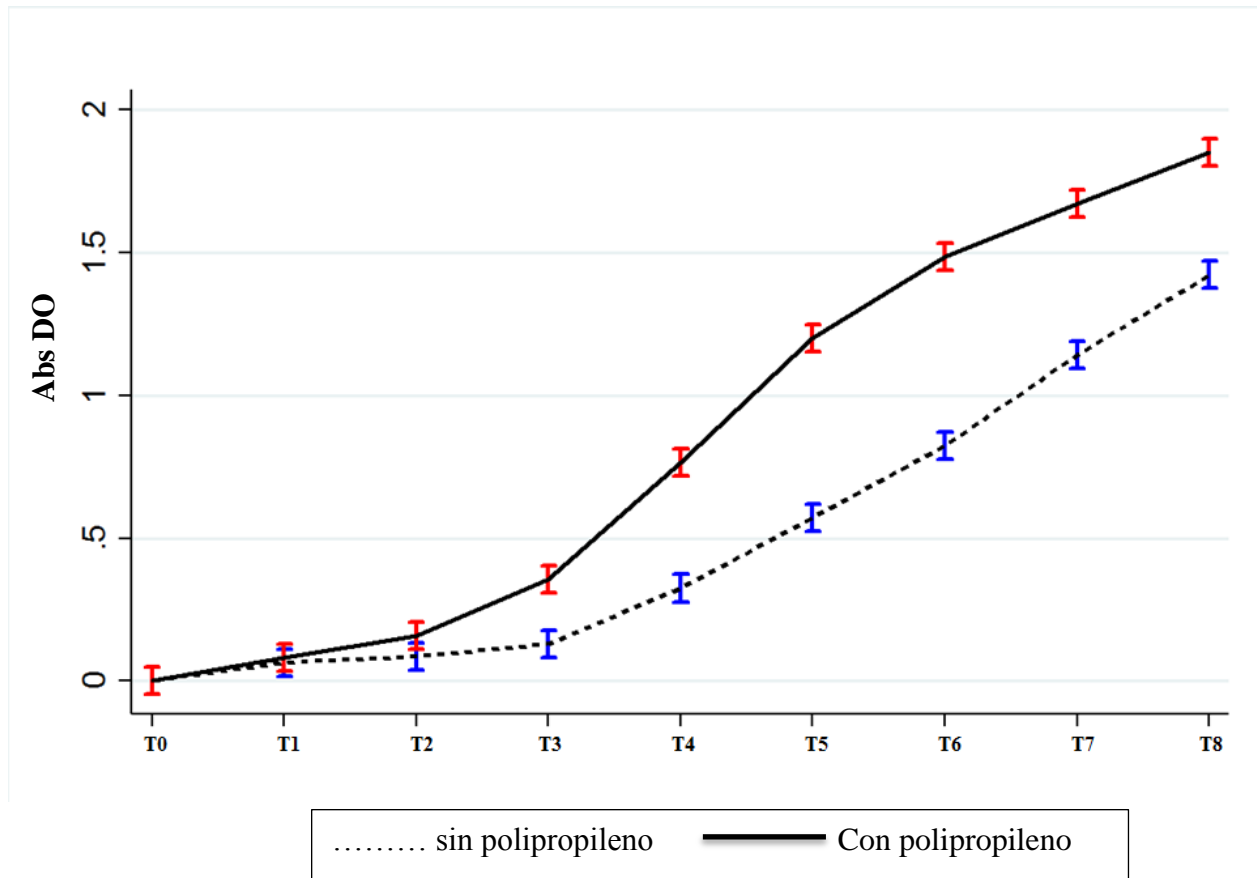


FIGURA 5: Interacción de condición y tiempo con un intervalo del 95% de confianza. Utilizando modelos mixtos con datos agrupados, todo es a 37°C y sin considerar cepas. Solo comparando condición de las muestras; se observa diferencia de condición: "Sin polipropileno", "Con polipropileno" a la tercera semana.

FLUJOGRAMA DE TRABAJO

