

Esta tesis esta dedicada a la
memoria del

Dr. M. A. Gerardo Ramírez Romero[†]



Gracias por todos los consejos que me diste y por
la motivación que me dabas para salir adelante y
cumplir con mis metas.

Pero sobre todo por la amistad y el cariño que
me brindaste.

Te voy a extrañar.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología

**Biodegradación de poliestireno por
microorganismos aislados de un basurero
municipal.**

TESIS

Para obtener el grado
Maestro en Biotecnología

Presenta

E. en B. Carlos Jiménez Pérez

Directores

Dr. M. A. Gerardo Ramírez Romero[†]

Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Asesores

M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

Dr. Luis Guillermo González Olivares

Ciudad de México, agosto de 2017



Ciudad de México, Agosto 2017

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis de maestría:

Biodegradación de poliestireno por microorganismos aislados de un basurero municipal

Presentada por

E. en B. Carlos Jiménez Pérez

Comité Tutorial:

Director: Dr. Gerardo Ramírez Romero[†]

Directora: Dra. Alma Elizabeth Cruz Guerrero

Asesora: M.C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

Asesor: Dr. Luis Guillermo González Olivares

Jurado de evaluación:

Dr. Octavio Loera Corral

Presidente

M.C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz

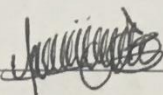
Secretaria

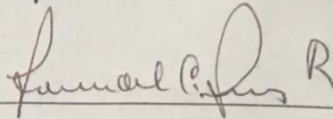
Dr. Sergio Andrés Alatorre Santamaría

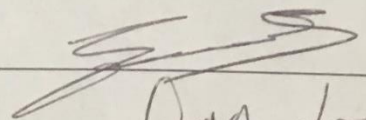
Vocal

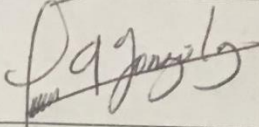
Dr. Luis Guillermo González Olivares

Vocal











Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00238
Matrícula: 2153804223

DEGRADACIÓN DE POLIESTIRENO
POR MICROORGANISMOS AISLADOS
DE UN BASURERO MUNICIPAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

30 AGO 2017

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 28 del mes de agosto del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
- DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA
- DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES
- M. EN C. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: CARLOS JIMENEZ PEREZ



CARLOS JIMENEZ PEREZ
ALUMNO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

VOCAL

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE
SANTAMARIA

VOCAL

DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

SECRETARIA

M. EN C. LORENA DEL CARMEN GOMEZ RUIZ



La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con la referencia 001465.

Este trabajo se realizó con el apoyo del CONACyT (No. de CVU/Becario 518291).



DEDICATORIAS

Mamá a ti te agradezco todo el esfuerzo que has hecho para que salga adelante a pesar de todos los momentos difíciles que pasamos y motivarme cada día durante este proyecto, pero gracias a todo tu apoyo logramos que este proyecto saliera adelante, así que una vez más el logro es de los dos.

A mis hermanos Fredy, Beto y Lucy que siempre me han apoyado e impulsado a ser una persona mejor cada día.

Monica, gracias por tu paciencia y apoyo durante estos años que llevamos de conocernos, no tengo palabras para agradecerte todo, quiero que sigamos cosechando más logros juntos. Te quiero muchísimo.

A Katy (mí hermanita) y la Sra. Eloísa gracias por apoyarme en todo momento y sobre todo por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir como en casa.

A mis amigos Liliana, Gerry, Omar, Delta, Ruth con los cuales pase momentos muy agradables y en especial que en los momentos difíciles ahí estuvieron para apoyarme.



AGRADECIMIENTOS

Dra. Alma gracias a todo su apoyo que nos brindó durante el momento tan difícil por el cual pasamos Monica y yo al inicio de este año 2017, más allá de habernos acogido en la planta piloto 2 para poder terminar nuestros proyectos de maestría, nos dio toda su amistad y apoyo en ese momento, no tengo palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por nosotros.

Gracias por permitirme continuar mi meta de ser un investigador el cual inicio junto al Dr. Gerardo Ramírez Romero (QEPD) y dejarme ser parte de su grupo de trabajo en la PP2, sabe que daré mi mayor esfuerzo y no la defraudare.

Dra. Hirán gracias por ser parte de todos estos años en los cuales me ha apoyado y dado consejos tanto para mi desarrollo profesional como el personal, a pesar de estos momentos difíciles que pasamos al final de este proyecto espero que sigamos frecuentándonos y poder compartir más logros contigo.

Maestra Lorena muchas gracias por ser parte de este proyecto y en especial por brindarme su apoyo durante el cierre de la maestría.

Dra. Gaby, Dr. Mariano, Dr. Sergio muchas gracias por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y por el apoyo que me han brindado en el cierre de este ciclo y saber que seguiré contando con su apoyo en este nuevo ciclo que estamos por iniciar.

Dr. Luis Guillermo y Dr. Loera gracias por los comentarios los cuales fueron de mucha ayuda para poder terminar mi tesis de maestría, espero poder seguir aprendiendo de ustedes.



RESUMEN

El poliestireno (PS) es uno de los polímeros termoplásticos más utilizados; debido a su gran resistencia se ha considerado como no biodegradable, existen diferentes tipos de PS, pero uno de los más utilizados es el PS expandido, ya que al ser ligero y resistente es empleado para el empaque y transporte principalmente de alimentos, los cuales son utilizados sólo una vez y desechados. En el año 2006 se reportó que en México se generaron 34.6 millones de toneladas de residuos sólidos urbanos de los cuales el 19% son residuos no aprovechables donde se encuentran todos los productos elaborados con PS. La acumulación de estos residuos genera problemas ambientales y al no haber estrategias adecuadas para su reciclaje o degradación, se han buscado alternativas que sean de bajo costo y amigables con el ambiente, donde una de ellas es la biodegradación de los polímeros sintéticos utilizando microorganismos.

En la presente investigación se realizó la evaluación de la biodegradación de dos tipos de PS en forma de cristal y expandido con tres bacterias aisladas de una muestra de PS expandido recolectado en el basurero del municipio de Chimalhuacán, Edo. de México (González-Martínez, 2015), mediante las pruebas de Sturm (monitoreo en la producción de CO₂) y la pérdida de peso, además se estudió el efecto del cobre en la producción de lacasa por las bacterias aisladas y su efecto en la biodegradación del PS.

Las bacterias utilizadas fueron identificadas por biología molecular realizando la extracción del ADN bacteriano y por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó la amplificación de la región del ARNr 16S y las secuencias se compararon en el BLAST de la base de datos de la NCBI obteniendo que las bacterias aisladas pertenecen al género de *Enterobacter*. Identificándolas como: *Enterobacter sp.* UAMI-C1, *Enterobacter sp.* UAMI-C2 y *Enterobacter sp.* C4. Confirmando que pertenecían a la familia de las enterobacterias por características morfológicas (micro y macroscópicas) y también por espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) donde se realiza desorción/ionización de las proteínas obteniendo los espectros de masas comparándolos con una base de datos.

La prueba de Sturm se realizó con la bacteria *Enterobacter sp.* UAMI-C1 y PS cristal. Obteniendo una producción de CO₂ de 2.31 mg/ml con una biodegradación del 0.062% a los 15 días. Sin embargo, la producción de CO₂ se mantuvo constante después del día 10 del ensayo. Debido a estos resultados se decidió no continuar con los ensayos con las otras enterobacterias.

Los resultados obtenidos de la prueba de pérdida de peso en un periodo de incubación de 30 días, mostraron que las tres enterobacterias tenían la capacidad de biodegradar los dos tipos de PS, siendo *Enterobacter sp.* UAMI-C1 con el 0.39% para los dos tipos de PS y *Enterobacter sp.* UAMI-C4 con el 0.42% para el PS cristal y de 0.40% para el PS expandido, las que presentaron la mayor pérdida de peso sin tener diferencias



significativas ($\alpha=0.05$) entre ellas pero ambas presentaron diferencias con *Enterobacter sp.* UAMI-C2. Al realizar la determinación de la actividad de la lacasa durante la prueba de biodegradación en los días 5 y 10, no se pudo determinar la actividad. Sin embargo, al adicionar sulfato de cobre (CuSO_4) en la mezcla de reacción enzimática de los días 15 y 30, se obtuvo actividad de la lacasa para las tres enterobacterias. De esta manera se demostró que el cobre es un activador de la lacasa.

Posteriormente, se evaluó el efecto del cobre en el crecimiento de las enterobacterias y en la producción de la lacasa por medio de cinéticas de crecimiento en medio sintético suplementado con glucosa al 1% (p/v) y CuSO_4 . En este ensayo, se observó que el cobre no inhibió el crecimiento de las bacterias y se dedujo que la producción de la lacasa estaba asociada al crecimiento.

Debido a que el cobre no inhibe el crecimiento de las enterobacterias, se realizaron los ensayos de pérdida de peso suplementándolos con CuSO_4 . En este caso, se obtuvo una mayor pérdida de peso del PS y con un aumento en la producción de lacasa en comparación con el ensayo sin cobre. Así que, la mayor pérdida de peso se obtuvo con *Enterobacter sp.* UAMI-C4 con el 0.71% para el PS cristal y del 0.85% con PS expandido y una actividad de lacasa de 9.673×10^{-3} y 9.803×10^{-3} U/ml respectivamente. Por los resultados obtenidos, es posible una relación entre la producción de lacasa y la pérdida de peso de PS.



ABSTRACT

Polystyrene (PS) is one of the most widely used thermoplastic polymers, because of its high resistance has been considered as non-biodegradable, there are different types of PS, but one of the most used is the expanded PS, since being light and resistant is used for packing and transport mainly foods, which are used only once and discarded. In 2006, it was reported that in Mexico 34.6 million tons of urban solid waste were generated, of which 19% are non-usable wastes where are found the products made with PS. The accumulation of these waste cause environmental problems and because there are no adequate strategies for recycling or degradation, alternatives have been sought that are low cost and environment friendly, where one of them is the biodegradation of synthetic polymers using microorganisms.

In the present research evaluate of biodegradation of two types of PS in the form of crystal and expanded with three bacteria isolated from an expanded PS sample collected in the municipal dump waste of Chimalhuacán, State of Mexico by the Sturm tests (monitoring of CO₂ production) and weight loss. In addition, was studied the effect of copper on the production of laccase by the isolated bacteria and their effect on the biodegradation of PS.

The bacteria used were identified by molecular biology performing extraction of bacterial DNA and using the technique of polymerase chain reaction (PCR) amplification of the region of 16S rRNA and sequences were compared in the BLAST of database of the NCBI obtaining that the isolated bacteria belong to the genus of *Enterobacter*. Identifying them as: *Enterobacter sp.* UAMI-C1, *Enterobacter sp.* UAMI-C2 and *Enterobacter sp.* C4. Confirming that they belonged to the family of enterobacteria by morphological characteristics (micro and macroscopic) and by mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) where the desorption/ionization of the proteins is carried out, obtaining the mass spectra comparing them with a database.

The Sturm test was performed with *Enterobacter sp.* UAMI-C1 and PS crystal. Was obtained CO₂ production of 2.31 mg / ml with a biodegradation of 0.062% at 15 days. However, CO₂ production remained constant after day 10 of the test. Due to these results, it was decided not to continue the trials with the other enterobacteria.

The results obtained from the weight loss test in a 30-day incubation period showed that the three enterobacteria had the ability to biodegrade the two types of PS, being *Enterobacter sp.* UAMI-C1 with 0.39% for both PS and *Enterobacter sp.* UAMI-C4 with 0.42% for PS crystal and 0.40% for expanded PS, which are presented the greatest weight loss without having significant differences ($\alpha = 0.05$) between them but both presented differences with *Enterobacter sp.* UAMI-C2. When determining the activity of the laccase during the biodegradation test on days 5 and 10, the activity could not be determined. However, by adding copper sulfate (CuSO₄) to the enzyme reaction mixture on days 15 and 30, laccase activity was obtained for the three enterobacteria. In this way, it was shown that copper is a laccase activator.



Subsequently, the effect of copper on bacterial growth and laccase production was evaluated by means of growth kinetics in synthetic medium supplemented with 1% (w/v) glucose and CuSO_4 . In this test, it was observed that copper did not inhibit the growth of the enterobacteria and it was deduced that laccase production was associated with growth.

Because copper didn't inhibit the growth of the enterobacteria, weight loss tests were supplemented with CuSO_4 . In this case, a greater loss of weight of the PS and with an increase in the production of lacasa was obtained in comparison with the test without copper. Thus, the greatest weight loss was obtained with *Enterobacter sp.* UAMI-C4 with 0.71% for crystal PS and 0.85% with expanded PS and a laccase activity of 9.673×10^{-3} and 9.803×10^{-3} U/ml respectively. By the results obtained, it is possible a relation between the production of lacasa and the loss of weight of PS.



ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Abstract	iii
Índice de figuras	viii
Índice de cuadros	viii
Índice de gráficos.....	ix
1 Introducción.....	1
2 Antecedentes	3
2.1 Polímeros	3
2.1.1 Poliestireno	4
2.2 Degradación de polímeros	6
2.2.1 Fotodegradación.....	7
2.2.2 Degradación termo-oxidativa	8
2.3 Biodegradación de polímeros	9
2.3.1 Métodos de cuantificación de la biodegradación de polímeros.....	10
2.4 Estudios de la biodegradación de polímeros con microorganismos.....	13
2.4.1 Biodegradación de polietileno	14
2.4.2 Biodegradación de poliestireno	14
2.4.3 Participación de las enzimas producidas por microorganismos en la biodegradación de polímeros	15
2.5 Importancia de las lacasas.....	18
2.5.1 Lacasas	18
2.5.2 Lacasas bacterianas.....	18
2.5.3 Lacasa producida por enterobacterias	19
2.5.4 Estructura de la lacasa	19
2.5.5 Mecanismo catalítico.....	21
2.5.6 Temperatura y pH óptimos de las lacasas	22
2.5.7 Efecto del cobre en la producción de lacasa	23
2.5.8 Efecto del cobre en la actividad de lacasa	23
2.6 Enterobacterias.....	25
3 Justificación	27
4 Hipótesis.....	28



5	Objetivo general	28
6	Objetivos particulares	28
7	Materiales y métodos	29
7.1	Conservación de las cepas bacterianas.....	29
7.2	Identificación de las bacterias	29
7.2.1	Descripción de la morfología colonial y microscópica de las bacterias	29
7.2.2	Identificación por biología molecular	30
7.2.2.1	Extracción del ADN bacteriano.....	30
7.2.2.2	Amplificación y purificación del ADN bacteriano	30
7.2.2.3	Secuenciación de ADN	32
7.2.2.4	Comparación filogenética de las bacterias	34
7.2.3	Identificación por espectrometría de masas (MALDI-TOF/MS)	34
7.3	Evaluación de la actividad enzimática.....	35
7.3.1	Determinación de la actividad de lacasa	35
7.3.2	Efecto del pH y la temperatura en la actividad de lacasa	36
7.4	Ensayos de biodegradación del poliestireno.....	37
7.4.1	Preparación de la muestra de poliestireno.....	37
7.4.2	Medio de cultivo para los ensayos de biodegradación	37
7.4.3	Preparación del inóculo	38
7.4.4	Prueba de Sturm	39
7.4.4.1	Montaje de la prueba.....	39
7.4.4.2	Biodegradación del PS por la prueba de Sturm.....	40
7.4.4.3	Determinación del grado de biodegradación	41
7.4.5	Pérdida de peso	42
7.4.5.1	Biodegradación del PS por la prueba de pérdida de peso	42
7.4.5.2	Determinación del grado de biodegradación	42
7.4.5.3	Determinación de la actividad de lacasa	43
7.5	Evaluación del efecto del cobre en la producción de lacasa	44
7.5.1	Efecto del cobre en el crecimiento microbiano y la producción de lacasa	44
7.5.2	Evaluación de la estabilidad de la lacasa.....	44
7.5.3	Efecto del cobre en la prueba de pérdida de peso	45
7.5.4	Análisis estadístico.....	45



8	Resultados y discusiones.....	46
8.1	Identificación de las bacterias	46
8.1.1	Morfología colonial y microscópica de las bacterias.....	46
8.1.2	Identificación por biología molecular	48
8.1.2.1	Comparación filogenética de las bacterias	48
8.1.3	Identificación por espectrometría de masas	49
8.2	Actividad de lacasa de Trametes versicolor.....	50
8.3	Ensayos de biodegradación.....	51
8.3.1	Prueba de Sturm	51
8.3.2	Pérdida de peso	52
8.3.2.1	Determinación de la actividad de lacasa	53
8.4	Efecto del cobre en el crecimiento microbiano y la producción de lacasa.....	56
8.4.1	Efecto del cobre en el crecimiento bacteriano	56
8.4.2	Cinéticas de crecimiento de las bacterias y su producción de lacasa.....	56
8.4.3	Estabilidad de la lacasa	58
8.4.4	Efecto de la adición de cobre sobre la biodegradación de PS.....	59
8.4.4.1	Determinación de la actividad de lacasa	61
9	Conclusiones.....	63
10	Perspectivas.....	64
11	Bibliografía	65
12	Anexo	69
12.1	Protocolo de extracción de ADN	69
12.2	Secuencias de las bacterias aisladas	70



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Polimerización del estireno.	5
Figura 2. Estructura del poliestireno sindiotáctico (A) y atáctico (B).	5
Figura 3. Mecanismo general de la fotodegradación.	8
Figura 4. Reacción de pirólisis del poliestireno	8
Figura 5. Mecanismo propuesto de la biodegradación de polímeros.	9
Figura 6. Tipos de reacción en la degradación de polímeros: mecanismo de desplazamiento simple (I) y doble (II).....	10
Figura 7. Estructura tridimensional de la lacasa CotA de <i>Bacillus subtilis</i>	21
Figura 8. Ciclo catalítico de la lacasa usando sustratos fenólicos.....	22
Figura 9. Filtro de aire para regular el flujo de aire y eliminar impurezas y humedad.....	39
Figura 10. Sistema para el monitoreo de la producción de CO ₂ (prueba de Sturm).....	40
Figura 11. Ensayos de pérdida de peso con las tres bacterias y los dos tipos de PS.....	42
Figura 12. Reconstrucción filogenética de bacterias productoras de lacasa y las bacterias aisladas.....	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Polímeros de adición de uso frecuente	3
Cuadro 2. Polímeros de condensación de uso frecuente.....	4
Cuadro 3. Rutas de degradación de los polímeros	7
Cuadro 4. Microorganismos reportados que biodegradan polímeros sintéticos.....	13
Cuadro 5. Microorganismos y enzimas reportados que biodegradan polímeros termoplásticos.	16
Cuadro 6. Primers utilizados para la amplificación del fragmento del ADNr 16S	31
Cuadro 7. Mezcla de reacción para la amplificación de ADN por PCR.....	31
Cuadro 8. Condiciones para la reacción de PCR.....	31
Cuadro 9. Mezcla de reacción para la amplificación de ADN por PCR.....	32
Cuadro 10. Condiciones para la reacción de PCR por cada primer.....	33
Cuadro 11. Mezcla de reacción para determinar la actividad de la lacasa.....	36
Cuadro 12. Composición del medio sintético utilizado en los ensayos de biodegradación.	38



Cuadro 13. Mezcla de reacción para determinar la actividad de la lacasa en el extracto crudo del ensayo de pérdida de peso.	43
Cuadro 14. Descripción de la morfología colonial y microscópica de las bacterias aisladas.	46
Cuadro 15. Morfología colonia en los medios de cultivo diferenciales de las bacterias seleccionadas para los ensayos de biodegradación.	47
Cuadro 16. Identificación de las bacterias por la secuenciación del ADNr	48
Cuadro 17. Identificación de las bacterias por MALDI-TOF/MS	50
Cuadro 18. Pérdida de peso de los dos tipos de PS por las tres bacterias a los 30 días.	53
Cuadro 19. Pérdida de peso de la prueba con PS cristal y la actividad de la lacasa para cada bacteria a los 30 días.....	55
Cuadro 20. Pérdida de peso de la prueba con PS expandido y la actividad de la lacasa para cada bacteria a los 30 días.....	55
Cuadro 21. Pérdida de peso de los dos tipos de PS por las tres bacterias a los 30 días al suplementar el medio de cultivo con CuSO ₄	60
Cuadro 22. Pérdida de peso de la prueba con la adición de CuSO ₄ en el PS cristal y la actividad de la lacasa para cada bacteria a los 30 días.....	62
Cuadro 23 Pérdida de peso de la prueba con la adición de CuSO ₄ en el PS expandido y la actividad de la lacasa para cada bacteria a los 30 días.....	62

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Actividad de lacasa de <i>T. versicolor</i> a diferentes temperaturas y pH.	51
Gráfico 2. Cinética de CO ₂ producido por <i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C1 en la biodegradación de PS cristal.	52
Gráfico 3. Actividad de la lacasa de la prueba con PS cristal para las tres bacterias.....	54
Gráfico 4. Actividad de la lacasa de la prueba con PS expandido para las tres bacterias...55	
Gráfico 5. Cinética de crecimiento de <i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C1 en medio sintético (MS) y MS suplementados con cobre (MS+Cu).....	56
Gráfico 6. Cinética de crecimiento de <i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C1 y producción de lacasa..57	
Gráfico 7. Cinética de crecimiento de <i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C2 y producción de lacasa..57	
Gráfico 8. Cinética de crecimiento de <i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C4 y producción de lacasa..58	
Gráfico 9. Actividad residual de la lacasa cruda de las bacterias y lacasa de <i>T. versicolor</i> .59	
Gráfico 10. Efecto del cobre en la pérdida de peso para los dos tipos de PS.	60



Gráfico 11. Actividad de la lacasa de las tres bacterias en el ensayo con PS cristal al adicionar CuSO_4 al medio de cultivo.61

Gráfico 12. Actividad de la lacasa de las tres bacterias en el ensayo con PS expandido al adicionar CuSO_4 al medio de cultivo.62



1 INTRODUCCIÓN

Desde hace más de medio siglo los productos elaborados con plástico (polímero sintético) han sido utilizados para diferentes propósitos, por lo que, la demanda mundial de estos productos se ha incrementado anualmente (Ghosh y col., 2013). Aproximadamente el 30 % de los productos de plástico producidos a nivel mundial son utilizados para el empaque de alimentos, fármacos, cosméticos, detergentes y químicos. Dentro de los plásticos más utilizados para empaque están el polietileno, polipropileno, poliuretano, cloruro de polivinilo, tereftalato de polietileno y el poliestireno (PS) (Shah y col., 2008), siendo este último el más utilizado en la industria de los alimentos ya que proporciona protección y es resistente al calor; sin embargo, estos empaques son a menudo diseñados para un tiempo de servicio corto y o para ser empleados una sola vez.

Los plásticos se obtienen por reacciones de polimerización de uno o más monómeros principalmente derivados de productos petroquímicos generando polímeros de adición (sólo un monómero) o de condensación (varios monómeros). El PS es un polímero de adición formado por la unión de varias monómeros de estireno obteniendo cadenas largas de alto peso molecular. La gran resistencia a los factores ambientales de los polímeros depende principalmente del tipo de polímero y del tamaño (peso molecular) por lo cual tardan muchos años en degradarse. El fuerte contraste entre la notable durabilidad del PS y el tiempo de servicio corto de sus productos generan residuos que se han acumulado con el paso de los años en nuestro entorno. Además, hay una ausencia de métodos eficientes para su eliminación de forma segura lo que ha llevado a causar daños ecológicos en el ambiente.

Un ejemplo de ello es que en México se ha reportado que, en el 2006, hubo una generación de residuos sólidos urbanos (RSU) de 34.6 millones de toneladas, con una composición aproximada de 53% de materia orgánica, 28% de residuos potencialmente reciclables y el 19% de residuos no aprovechables donde se encuentran los productos elaborados con PS. Es por ello que la generación de RSU debe disminuir y es por esto que se han planteado varias estrategias. Una de ellas es la separación de los RSU reciclables y la degradación de los no aprovechables; sin embargo, se ha visto que el reciclado de los plásticos no ha logrado ser una alternativa muy viable, ya que para el 2012, sólo el 5% de los RSU en México fueron reciclados (Góngora Pérez, 2014). Por otro lado, los procesos de degradación física y química son muy costosos ya que algunos requieren de altas temperaturas y/o radiación de alta energía que a su vez generan otros contaminantes ambientales. Por lo que una de las alternativas más viables es la degradación por agentes biológicos (microorganismos) también llamada biodegradación.

En este sentido, diversos autores han estudiado la biodegradación del polietileno con hongos lignolíticos y bacterias, pero hay pocos estudios relacionados a la biodegradación del PS. Mor y Sivan (2008), reportaron que *Rhodococcus ruber* C208 tiene la capacidad de biodegradar el PS con una pérdida de peso de 0.5% en 4 semanas, siendo un proceso muy lento.



Por otra parte, se ha visto que los hongos lignolíticos como *Trametes versicolor* producen enzimas extracelulares (lacasa y peroxidasas principalmente) que participan en la degradación de la lignina (polímero natural). Mientras que Santo y colaboradores (2013) estudiaron la relación que tiene la lacasa producida por la bacteria *R. ruber* C208 en la biodegradación del polietileno.

Debido a esto, en el presente trabajo se estudió la biodegradación de dos tipos de PS en forma de cristales y expandido con tres cepas bacterianas aisladas de un trozo de PS expandido con evidencia de deterioro recolectado del basurero municipal de Chimalhuacán, Edo. de México (González-Martínez, 2015) así como la producción de lacasa por las bacterias aisladas y su posible relación con el proceso de biodegradación del PS.


2 ANTECEDENTES

2.1 POLÍMEROS

Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión repetida de una o varias moléculas unidas por enlaces covalentes. Dependiendo de su origen, los polímeros pueden ser naturales o sintéticos. Los sintéticos contienen entre uno y tres tipos de unidades que se repiten, mientras los naturales o biopolímeros (como la lignina, el ADN o las proteínas) presentan estructuras mucho más complejas (Ojeda, 2011). Los polímeros sintéticos son los de mayor interés para este estudio, en particular el poliestireno (PS).

Las moléculas que se combinan para formar los polímeros se denominan monómeros y las reacciones a través de las cuales éstos se obtienen se conocen como reacciones de polimerización, que pueden ser de: adición o condensación. En los polímeros de adición, la unidad estructural de repetición tiene la misma composición que la del monómero de partida, en cambio, los polímeros de condensación se forman a partir de monómeros polifuncionales a través de diversas reacciones. En los cuadros 1 y 2 se muestran ejemplos de polímeros de adición y condensación respectivamente (Beltrán y Marcilla, 2012).

Cuadro 1. Polímeros de adición de uso frecuente

Polímero	Abreviatura	Unidad de repetición
Polietileno	PE	$\left[\begin{array}{cc} \text{H} & \text{H} \\ & \\ -\text{C} & -\text{C}- \\ & \\ \text{H} & \text{H} \end{array} \right]_n$
Polipropileno	PP	$\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH}-\text{CH}_2- \end{array} \right]_n$
Poliestireno	PS	$\left[-\text{CH}_2-\text{CH}- \right]_n$ 
Policloruro de vinilo	PVC	$\left[\begin{array}{cc} \text{H} & \text{Cl} \\ & \\ -\text{C} & -\text{C}- \\ & \\ \text{H} & \text{H} \end{array} \right]_n$

Cuadro 2. Polímeros de condensación de uso frecuente

Polímero	Abreviatura	Unidad de repetición
Poliéster		$— R — OCO — R' — COO —$
Poliamida	PA	$— NH — R — NHCO — R' — CO —$
Tereftalato de polietileno	PET	
Poliuretano	PU	$— NH — COO — R — OCO — NH — R' —$

Los polímeros se clasifican de acuerdo con sus propiedades térmicas en dos grupos: termoplásticos y termoestables.

Los polímeros termoplásticos tienen un alto peso molecular que va desde los 20,000 a 500,000 g/mol y son aquellos que a temperaturas altas se vuelven flexibles y moldeables, es decir, se derriten cuando se calientan y se pueden verter en moldes que al enfriarse se endurecen conservando la forma del molde. El polietileno, polipropileno, poliestireno y cloruro de polivinilo son ejemplos de este tipo.

Por el contrario, los polímeros termoestables son aquellos que cuando se ha fundido en una forma particular, conservan una consistencia sólida que no puede ser modificada. En los polímeros termoestables, el cambio químico es irreversible y por lo tanto no son reciclables. Los ejemplos incluyen las siliconas, fenol-formaldehído, poliuretanos, caucho sintético etc.

2.1.1 Poliestireno

El poliestireno cristal o poliestireno de uso general es un polímero sólido incoloro, rígido, frágil y con flexibilidad limitada que se obtiene por la polimerización del estireno (Figura 1). A temperatura por debajo de los 100 °C, este polímero, mantiene su estado sólido, pero por encima de esta temperatura es fácilmente procesable y puede ser moldeable en múltiples formas.

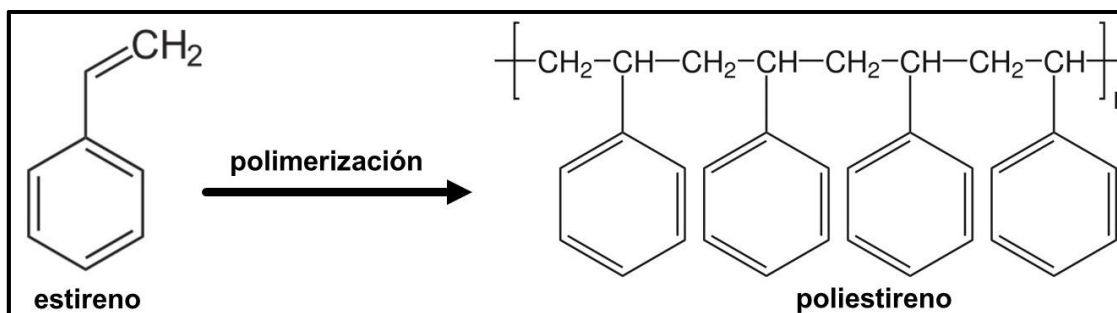


Figura 1. Polimerización del estireno (Ojeda, 2011).

El PS es un polímero lineal, siendo el producto comercial atáctico (Figura 2B); es decir, los grupos fenilo se distribuyen a uno u otro lado de la cadena central, sin ningún orden en particular. Por lo que es un polímero completamente amorfo (es decir no cristalino) (Fred y Billmeyer, 1975). Hay una nueva clase de PS llamado sindiotáctico (Figura 2A) y se obtiene por la polimerización catalizada por metallocenos. Es diferente porque los grupos fenilo de la cadena polimérica están unidos alternativamente a ambos lados de la misma, dándole una resistencia térmica mayor que el atáctico fundiendo a los 270 °C (Ojeda, 2011).

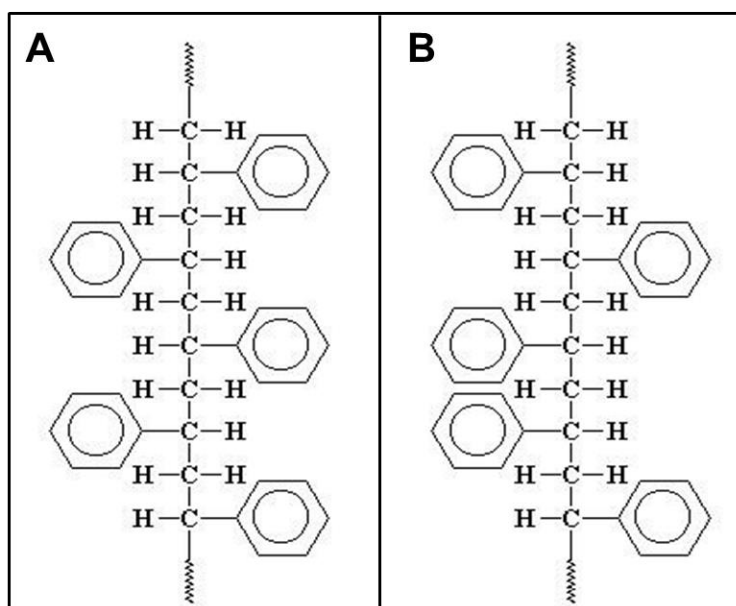


Figura 2. Estructura del poliestireno sindiotáctico (A) y atáctico (B). (Ojeda, 2011).

Existen cuatro tipos principales de poliestireno: el PS cristal, que es transparente, rígido y quebradizo; el PS de alto impacto (HIPS), resistente y opaco, el PS expandido (EPS), muy ligero, y el PS extrusionado (XPS), similar al expandido, pero más denso e impermeable. Las aplicaciones principales del PS cristal y el HIPS son la fabricación de envases mediante extrusión-termoformado, y de objetos diversos mediante moldeo por inyección. La forma expandida y extruida se emplean principalmente para el empaque y transporte de alimentos, como aislantes térmicos en construcción y para formar cubiertas de protección en los embalajes de objetos frágiles.



2.2 DEGRADACIÓN DE POLÍMEROS

La degradación de los polímeros se puede definir como una serie de procesos que inducen cambios en las propiedades del polímero (deterioro de la funcionalidad) debido a las reacciones químicas, físicas o biológicas resultantes en la escisión de enlaces químicos y las transformaciones posteriores. Los factores responsables de la degradación se pueden clasificar en mecánicos y químicos (Lucas y col., 2008).

Los factores del tipo mecánico están asociados al proceso de transformación del polímero que resulta en un producto de utilidad. Durante la transformación éste es sometido a procesos de extrusión o inyección, acompañado de aumento de temperatura. Todo ello se lleva a cabo en presencia de oxígeno el cual provoca la ruptura de enlaces y la aparición de radicales inestables, por tanto, esto contribuye a su degradación.

Por otro lado, los principales agentes que tienen influencia en la degradación química son los ambientales como la humedad, el aire, la temperatura y la luz (principalmente la radiación por rayos UV). Debido a todos estos factores la degradación química se clasifica en fotodegradación y oxidación (San Andrés y col., 2010).

Se sabe que la degradación debida a agentes físicos o químicos es más rápida que la biodegradación (degradación por acción de microorganismos). También se ha visto que la degradación física y química facilitan el proceso de la biodegradación y puede ayudar a completar el proceso de mineralización del polímero, la cual es generalmente la última etapa en el proceso de la biodegradación (Shah y col., 2008). En el cuadro 3 se observan algunas de las características de las rutas de degradación de los polímeros.

En el caso de la biodegradación de los polímeros, ésta se lleva a cabo bajo las condiciones relacionadas a los microorganismos responsables de la degradación, los cuales difieren entre sí y tienen sus propias condiciones óptimas de crecimiento. Esta degradación, se rige por diferentes factores que incluyen las características del polímero tales como su movilidad, tactilidad, cristalinidad, peso molecular, tipo de grupos funcionales y sustituyentes presentes en su estructura y plastificantes o aditivos adicionados al polímero (Shah y col., 2008).

Cuadro 3. Rutas de degradación de los polímeros (Shah y col., 2008).

	Fotodegradación	Degradación termo-oxidativa	Biodegradación
Agente activo	Luz UV y oxígeno	Calor y oxígeno	Microorganismos
Requerimientos de calor	No se requiere	Más elevada que la temperatura ambiente	No se requiere
Tasa de degradación	La iniciación es lenta, pero la propagación es rápida	Rápida	Lenta
Otras consideraciones	Amigable con el ambiente si no se utilizan radiaciones de alta energía	No es ambientalmente amigable	Ambientalmente amigable
Aceptación general	Aceptable, pero costosa	No es aceptable	Aceptable y económica

2.2.1 Fotodegradación

La fotodegradación se basa en reacciones promovidas por la acción de una fuente de energía como la luz. Pueden ser fotolíticas provocadas por la acción exclusiva de la luz y las fotoquímicas que se deben a la acción combinada de la luz con algún otro agente, como el O₂ (fotooxidación) o la humedad.

Los procesos de fotodegradación y fotooxidación de los polímeros siguen un mecanismo en etapas con la formación de radicales libres (Figura 3). En la etapa de iniciación la formación de radicales libres es promovida por una fuente de energía térmica o radiante. Posteriormente en la etapa de propagación los radicales libres formados experimentan procesos sucesivos de oxidación formándose peróxidos e hidroperóxidos, ambos inestables. Finalmente, en la etapa de terminación estas especies inestables reaccionan entre sí y dan lugar a productos menos inestables.

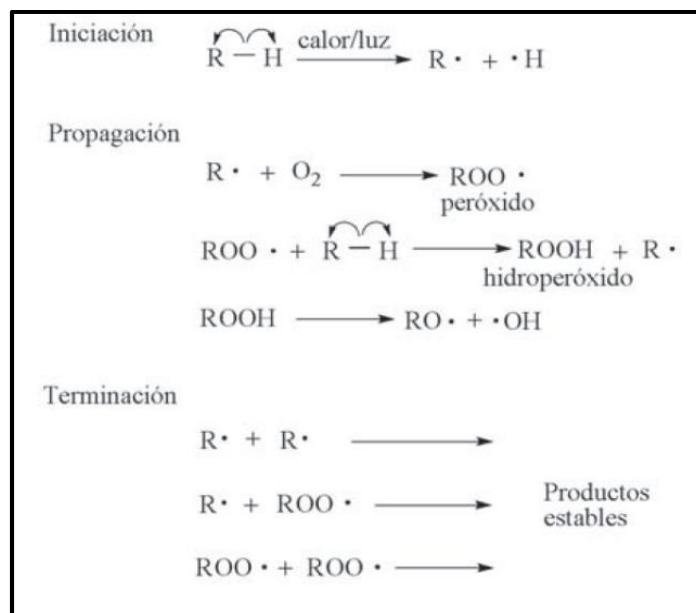


Figura 3. Mecanismo general de la fotodegradación (San Andrés y col., 2010).

2.2.2 Degradación termo-oxidativa

Las reacciones de termo descomposición o degradación térmica se producen en ausencia de oxígeno y son llamadas pirólisis (Figura 4) o en presencia de oxígeno llamadas termo-oxidación. La tendencia de los polímeros a experimentar reacciones de tipo pirolítico tiene relación con las energías de enlace asociadas a su composición química y para que esto ocurra se necesitan alcanzar niveles de temperatura muy altas, por ejemplo, para el poliestireno se necesita alcanzar una temperatura aproximada de 375 °C.

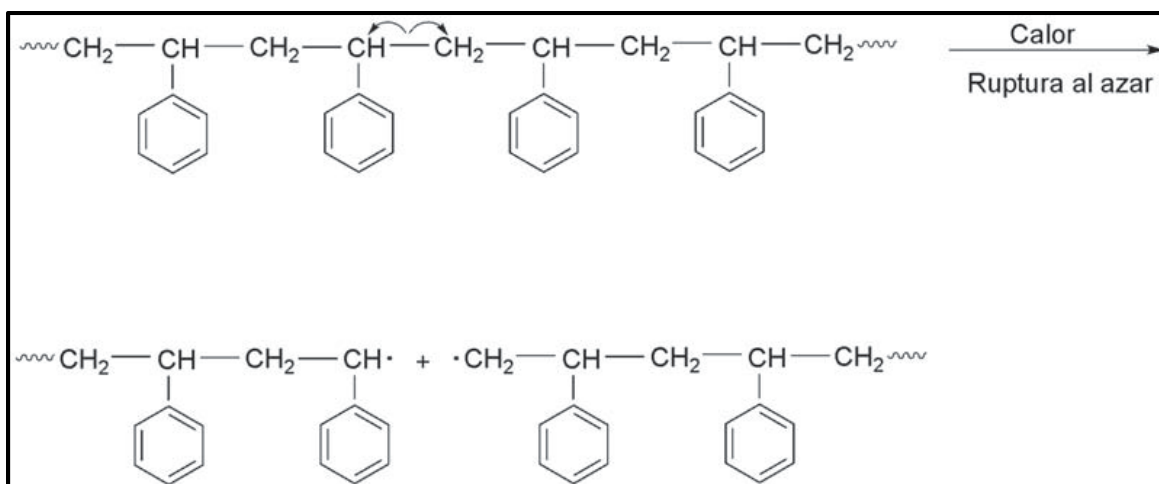


Figura 4. Reacción de pirólisis del poliestireno (San Andrés y col., 2010).

2.3 BIODEGRADACIÓN DE POLÍMEROS

La mayoría de los polímeros son demasiado grandes para pasar a través de las membranas celulares, por lo que primero deben ser despolimerizados a monómeros u oligómeros, antes de que puedan ser absorbidos y degradados dentro de las células microbianas (Shah y col., 2008). Algunos de los monómeros u oligómeros pueden ser solubles en agua (cuando son emulsionados) por lo que se degradan en intermedios orgánicos como ácidos, alcoholes y cetonas, etc. (Bhardwaj y col., 2013).

Así es que, la acción degradativa de los hongos y bacterias en el material polimérico es el resultado de la producción de diversas enzimas que influyen en el rompimiento de las estructuras de los sustratos sintéticos con el fin de suministrar nutrientes (Mohan y Srivastava, 2010). Entonces la susceptibilidad de los polímeros al ataque microbiano depende de la disponibilidad de la enzima, un sitio en los polímeros para el ataque de las enzimas, la especificidad de la enzima hacia el polímero y en ocasiones la presencia de una coenzima.

Bhardwaj y colaboradores, (2013) describen que hay una asociación en la biodegradación de los polímeros con enzimas microbianas, donde la degradación enzimática comprende dos pasos, primero las enzimas se adhieren a la superficie del polímero y después catalizan el rompimiento del polímero (Figura 5).

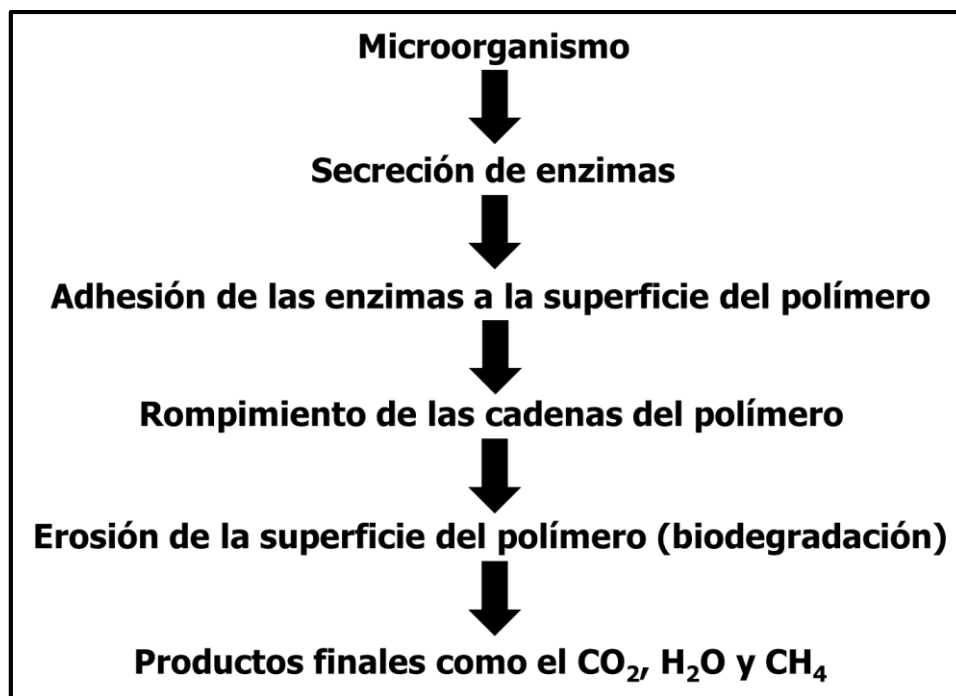


Figura 5. Mecanismo propuesto de la biodegradación de polímeros (Bhardwaj y col., 2013).

El tipo de reacción en la degradación enzimática de los polímeros es del tipo bimolecular donde la enzima cataliza la interacción del polímero y un reactivo de bajo peso molecular, donde las reacciones pueden ser por mecanismo de desplazamiento simple o doble. En el mecanismo de desplazamiento simple (Figura 6 I) los dos sustratos, A (polímero) y B (reactivo bajo peso molecular) se unen a la enzima libre (E_n) formando el complejo E_nAB para que éste se disocie en los productos C, D y E_n . Por otro lado, en el mecanismo de desplazamiento doble (Figura 6 II) solo un sustrato (A) se une a la vez a la enzima formando el complejo E_nAY este sufre una disociación unimolecular en un grupo funcional (Y) para formar un nuevo complejo E_nY entre la enzima y un fragmento de A, este complejo intermediario se combina con el segundo sustrato (B) y transfiere el fragmento Y a B (Mohan y Srivastava, 2010).

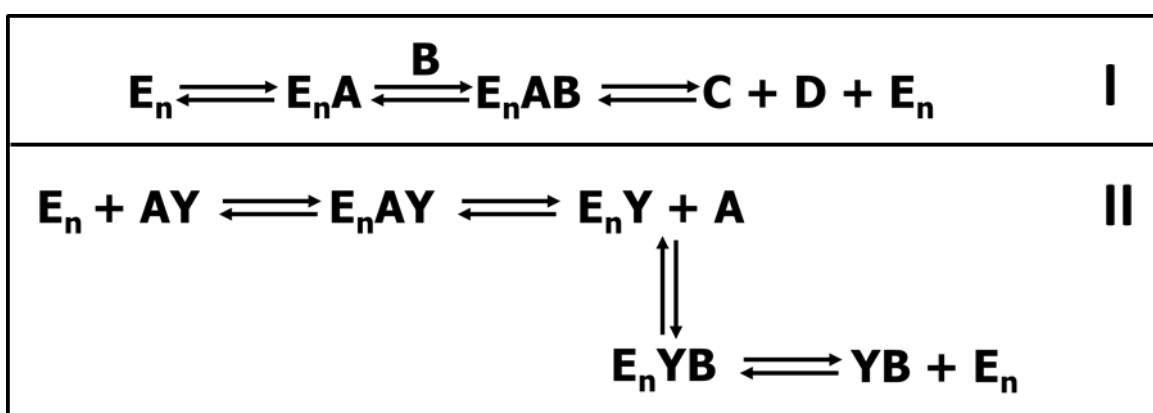


Figura 6. Tipos de reacción en la degradación de polímeros: mecanismo de desplazamiento simple (I) y doble (II) (Mohan y Srivastava, 2010).

2.3.1 Métodos de cuantificación de la biodegradación de polímeros

Existen algunos protocolos estandarizados para cuantificar la biodegradación de los polímeros, algunas de las organizaciones que han publicado estos protocolos son la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM), el Ministerio de Comercio Internacional e Industria (MITI) de Japón, y la Organización para la cooperación Económica y Desarrollo (OECD) (Andrady, 2007). La mayor desventaja de estos protocolos estandarizados para cuantificar la biodegradación en los polímeros plásticos, es que los experimentos pueden durar varios días, meses o incluso años, aunque la mayor parte de las pruebas están diseñadas para un periodo entre 28 a 30 días dependiendo de las indicaciones del protocolo utilizado (Eubeler y col., 2009).

También existen métodos de cuantificación de la biodegradación de plásticos no estandarizados, éstos se basan en la exposición del plástico a ciertos microorganismos específicos. Generalmente, estos métodos usan ciertas cepas de hongos y bacterias en el material de prueba o en cultivos líquidos. De los métodos más empleados para estimar el



grado de biodegradación son el monitoreo de la producción de CO_2 , la pérdida de peso del material y las observaciones visuales (Jayasekara y col., 2005).

A continuación, se describirán algunos de los métodos empleados para cuantificar la biodegradación en los polímeros.

Evolución en la producción de dióxido de carbono

En condiciones aerobias, los microorganismos usan el oxígeno para oxidar el carbono, formando dióxido de carbono (CO_2) como uno de los productos finales de su metabolismo, por esta razón el consumo de oxígeno (respirometría) o la formación de CO_2 (prueba de Sturm) son buenos parámetros indicadores de la degradación de un polímero plástico. Estas pruebas son las más utilizadas para la cuantificación de la biodegradación a nivel laboratorio, la precisión de estos métodos es buena debido a que usualmente se utiliza una muy baja cantidad de fuente de carbono adicional al polímero plástico en el medio mínimo sintético utilizado para realizar las pruebas.

Existen varias técnicas para la determinación del CO_2 producido, una de las más utilizadas son las trampas con solución de hidróxido de bario ($(\text{BaOH})_2$) o hidróxido de sodio (NaOH), las cuales van seguidas de una titulación manual o por medio de detectores, también se pueden utilizar detectores infrarrojos o paramagnéticos para cuantificar las concentraciones de O_2 y CO_2 (Shah y col., 2008).

Cuantificación de la pérdida de peso

La biodegradación de los polímeros puede ser cuantificada mediante la determinación de la pérdida de peso. Para una adecuada medición es necesario realizar lavados con soluciones que eliminen todo fragmento erosionado del material y rastros de microorganismos que se hayan adherido.

La determinación de la pérdida de peso es un método fácil y adecuado para la medición en materiales plásticos con bajos niveles de biodegradación, sin embargo, no es una prueba directa de la biodegradación en términos metabólicos.

La problemática principal de esta técnica se da cuando el polímero analizado se desintegra o cuando se lleva a cabo un proceso de limpieza inadecuado. Para muestras que se encuentran en forma de polvo, se debe de emplear una técnica de separación o extracción. (Shah y col., 2008).



Observaciones visuales

Este método consiste en la evaluación de los cambios visibles en la superficie de los plásticos y puede ser empleado en casi todas las pruebas de biodegradación, los efectos que pueden observarse en la superficie de los plásticos son la formación de hoyos y cuarteaduras, rugosidad, fragmentación, cambios en el color y la formación de biopelícula. Aunque estos cambios en la superficie del polímero no permiten medir el proceso de biodegradación en términos metabólicos si nos dan indicios del ataque microbiano en la superficie del polímero (Shah y col., 2008).

Actividad enzimática

Los polímeros sintéticos pueden ser biodegradados por medio de las enzimas que producen los microorganismos. La acción de las enzimas es reducir los polímeros complejos en moléculas más pequeñas mediante diferentes reacciones como la hidrólisis o la oxidación.

Una de las enzimas involucradas en la oxidación de algunos polímeros es la lacasa (Shah y col., 2008). La lacasa puede ser cuantificada por medio del consumo del guayacol (indicador de oxidación). Sheikhi y colaboradores (2012), realizaron la determinación de la actividad de la lacasa producida por *Bacillus subtilis* WPI utilizando guayacol a una concentración de 2 mM. En el siguiente capítulo se describirá más a detalle su participación en la biodegradación de los polímeros.



2.4 ESTUDIOS DE LA BIODEGRADACIÓN DE POLÍMEROS CON MICROORGANISMOS

El estudio de los microorganismos que intervienen en la biodegradación de los polímeros ha ido aumentando con el paso de los años, siendo una de las alternativas para controlar la acumulación de los desechos generados por los productos elaborados a base de polímeros, en el cuadro 4 se presentan algunos de los microorganismos reportados que tienen la capacidad de biodegradar polietileno y poliestireno.

Cuadro 4. Microorganismos reportados que biodegradan polímeros sintéticos.

Polímero	Microorganismo	Referencia
PE	<i>Rhodococcus ruber</i> C208	Gilan y col. (2004); Sivan y col. (2006)
	<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Hadad y col. (2005)
	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Brevibacillus parabrevis</i> <i>Pseudomonas citronellolis</i>	Pramila y col. (2012)
PS	<i>Rhodococcus ruber</i> C208	Mor y Sivan (2008)
	<i>Mycobacterium fortuitum</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Microbacterium sp.</i> <i>Gordonia polyisoprenivorans</i> <i>Microbacterium bacterium</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Ojeda y col. (2009)
	<i>Paenibacillus urinalis</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Atiq y col. (2010)

Poliestireno (PS); Polietileno (PE).

2.4.1 Biodegradación de polietileno

Gilan y colaboradores (2004), reportaron la biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE) con la bacteria *Rhodococcus ruber* C208. En ésta existe un pretratamiento irradiando el LDPE con luz UV para simular la exposición natural del sol. La pérdida de peso reportada haciende al 8% después de 30 días.

Por otro lado, Sivan y colaboradores (2006) estudiaron la cinética de la biodegradación del polietileno con *R. ruber* C208 mediante el método de tinción con cristal violeta, realizando diferentes ensayos de biodegradación como lo habían descrito Gilan y colaboradores (2004). Sus estudios fueron enfocados en la degradación del polímero, evaluándola cada 24 horas durante 60 días. En este estudio el nivel de degradación ascendió hasta el 0.86%.

Hadad y colaboradores (2005), reportaron que *Brevibacillus borstelensis* 707, una bacteria termofílica aislada del suelo tiene la capacidad de biodegradar LDPE al cual se le realizó un pretratamiento similar al reportado por Gilan y colaboradores (2004), donde se irradió con luz UV para simular la exposición natural del sol. Estudiaron el efecto de variar la concentración de la fuente de carbono (manitol) y/o nitrógeno (KNO_3). Encontraron que en medios libres de manitol obtuvieron la mayor pérdida de peso (11%).

Pramila y colaboradores (2012), estudiaron el potencial de biodegradar LDPE de algunas cepas bacterianas (*Acinetobacter baumannii*, *Brevibacillus parabrevis* y *Pseudomonas citronellolis*) aisladas de un tiradero de residuos sólidos. La preparación del LDPE para la prueba de Sturm (monitoreo de la producción de CO_2) fue disolviéndolo en xileno en ebullición. Los residuos fueron triturados para obtener polvo de LDPE y fue lavado con etanol para remover los residuos de xileno. Se monitoreo la producción de CO_2 con trampas de CO_2 que contenían una solución de hidróxido de potasio (KOH) 1 M. El ensayo lo realizaron por 48 horas donde determinaron el CO_2 producido mediante la titulación de KOH. Finalmente, ellos determinaron que la mayor producción de CO_2 se observó con *Acinetobacter baumannii* con una concentración de 1.06 mg CO_2 /ml, mientras que con *Brevibacillus parabrevis* y *Pseudomonas citronellolis* fue de 0.70 y 0.57 mg CO_2 /ml respectivamente.

2.4.2 Biodegradación de poliestireno

Mor y Sivan (2008), estudiaron la biodegradación de PS cristal utilizando la bacteria de *R. ruber* C208, la cual previamente fue reportada con capacidad de biodegradar el polietileno (Gilan y col., 2004; Sivan y col., 2006). Realizaron la prueba de pérdida de peso en medio sintético inoculado con la bacteria y adicionando los cristales por un periodo de 4 semanas. Obteniendo una pérdida de peso del 0.5%.

Ojeda y colaboradores (2009), estudiaron la biodegradación de PS con un consorcio de microorganismos (*Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans*, *Microbacteriaceae bacterium* y *Fusarium oxysporum*) obtenido



de una muestra de suelo de una refinería petroquímica. Emplearon placas de PS expandido con aditivos pro-oxidantes (manganeso y cobalto) sometidas a un pretratamiento con luz UV. Realizaron la prueba de respirometría en medio mineral inoculado con el consorcio microbiano y colocando las placas por un periodo de 3 meses a 30 °C. La mineralización la determinaron mediante la cuantificación del CO₂ producido. Obteniendo una mineralización del 5% y una disminución del PM de 286,000 a 14,300 g/mol.

Atiq y colaboradores (2010), estudiaron la biodegradación de PS expandido utilizando bacterias aisladas (*Paenibacillus urinalis*, *Bacillus* sp. y *Pseudomonas aeruginosa*) de una muestra de suelo del jardín de la Universidad Quaid-i-Azam en Pakistán, el PS expandido lo disolvieron en diclorometano obtuvieron placas de un grosor entre 0.3-0.5 mm. El ensayo de biodegradación se llevó a cabo a 30 °C. Identificaron los productos de degradación 1-fenil-1,2-etanodiol y 2-feniletanol por HPLC después de 4 semanas.

De los estudios más recientes, en la UAM-Iztapalapa González-Martínez (2015) realizaron el aislamiento de microorganismos de una muestra de PS expandido que mostraba un grado de deterioro y se aislaron diversos microorganismos (hongos, bacterias y levaduras). Se estudió la capacidad de biodegradación de PS cristal pulverizado con 8 bacterias. Obteniendo el mayor grado de biodegradación del PS con las bacterias identificadas como C2, C1 y C4 siendo del 1.13, 0.83 y 0.72% respectivamente a los 4 días de incubación.

2.4.3 Participación de las enzimas producidas por microorganismos en la biodegradación de polímeros

Entre los agentes biológicos, las enzimas microbianas son una de las herramientas más potentes para la biodegradación de los polímeros, donde el medio y nutrientes disponibles para los microorganismos son un factor determinante para el tipo de enzimas que producen. Las diversas enzimas de los microorganismos varían con las especies e incluso entre cepas de la misma especie. Las enzimas muestran especificidad por los sustratos, por lo que las diferentes enzimas ayudan en la degradación de diversos tipos de polímeros (Bhardwaj y col., 2013), dentro de la gran diversidad de enzimas, se encuentran las ligninolíticas (enzimas que degradan la lignina), entre ellas están la lacasa, las hemo peroxidasas como la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil (Dashtban y col., 2010). Se conoce también que la lacasa es producida principalmente por hongos degradadores de lignina, en los cuales es la responsable de catalizar la oxidación de los compuestos fenólicos y no fenólicos de la lignina (Mayer y Staples, 2002), en el cuadro 5 se presentan algunos microorganismos y las enzimas que producen que participan en la biodegradación de los polímeros.

Cuadro 5. Microorganismos y enzimas reportados que biodegradan polímeros termoplásticos.

Microorganismo	Enzima	Polímero que degradan	Referencia
<i>Azotobacter beijerinckii</i> HM121	Hidroquinona peroxidasa	PS	Kunichika y col. (1997)
<i>Trametes versicolor</i> IZU-154 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lacasa, Manganeso peroxidasa	PE	Iiyoshi y col. (1998)
<i>Trametes versicolor</i> IZU-154	Lacasa	PE	Fujisawa y col. (2002)
<i>Rhodococcus ruber</i> C208	Lacasa	PE	Santo y col. (2013)

Poliestireno (PS); Polietileno (PE).

De los primeros estudios reportados en la biodegradación de polímeros con la participación de enzimas está el de Kunichika y colaboradores (1997), donde realizaron ensayos de degradación del poliestireno (PS) empleando un sistema de solventes de dos fases (diclorometano-agua). Primero disolvieron el PS con el diclorometano, una vez disuelto, lo adicionaron a la mezcla de reacción enzimática que contiene la hidroquinona peroxidasa producida por *Azotobacter beijerinckii* HM121. La reacción enzimática la llevaron a cabo a 30 °C con agitación vigorosa durante 5 y 10 minutos, evaluando la degradación por la formación de productos de menor peso molecular (PM) mediante la técnica de cromatografía en capa fina. Obteniendo productos de PM de 1000 y 350 g/mol a los 5 y 10 minutos respectivamente para una muestra de 935,000 g/mol.

Iiyoshi y colaboradores (1998), estudiaron la capacidad de degradación de membranas de polietileno de alta densidad (HDPE) con *Trametes versicolor* IZU-154 y *Phanerochaete chrysosporium* los cuales producen enzimas lignolíticas (lacasa y manganeso peroxidasa). Primero crecieron los hongos (por separado) durante 7 días a 30 °C en agar y después se colocaron dos tiras de la membrana de HDPE e incubaron 7 días. La mayor disminución del peso molecular de la membrana de HDPE de 716,000 a 118,000 se obtuvo a los 12 días en presencia sulfato de manganeso con el hongo *T. versicolor* IZU-154.

Fujisawa y colaboradores (2002), estudiaron el efecto del 1-hidroxibenzotriazol (HBT) como mediador de la lacasa purificada de *T. versicolor* IZU-154. El ensayo de degradación de polietileno se realizó con diferentes concentraciones de HBT a 30 °C durante



tres días. Comprobando que la lacasa tiene la capacidad de degradar el polietileno, pero con la adición de HBT aumenta la degradación.

Santo y colaboradores (2013), estudiaron el efecto del cobre en la biodegradación del polietileno (PE) irradiado con luz UV por la bacteria *R. ruber* C208 durante 30 días, obteniendo una pérdida de peso del 2.5% siendo esta mayor que la obtenida en ausencia del cobre. Además, purificaron la lacasa y estudiaron la degradación del PE obteniendo una disminución del peso molecular de 116,453 a 93,646 g/mol.



2.5 IMPORTANCIA DE LAS LACASAS

Las lacasas se han utilizado en distintas industrias, tales como, la papelera, la textil, la alimentaria, en la biorremediación, en la síntesis de compuestos orgánicos etc. (Blánquez Moya, 2015), teniendo diversas aplicaciones biotecnológicas como, el análisis de fármacos para distinguir la morfina de la codeína, la clarificación del vino y, lo que es más importante, la degradación de varios contaminantes recalcitrantes como el triclorofenol, el bisfenol A y el fluoreno y moléculas tóxicas, además de la decoloración de colorantes azoicos sintéticos (Mayer y Staples, 2002).

Debido a la semejanza estructural del polímero de lignina con muchos compuestos contaminantes (hidrocarburos aromáticos policíclicos, benceno, tolueno, etilbenceno, xileno, bifenilos policlorados) conocidos por tener efectos carcinogénicos y mutagénicos derivados de las actividades industriales y persistentes en el medio ambiente, la lacasa ha sido una de las alternativas más utilizadas para la biorremediación, por lo cual es importante su estudio en la presente investigación en la degradación del poliestireno, catalogado como un polímero no biodegradable.

2.5.1 Lacasas

Las lacasas (EC. 1.10.3.2) pertenecen al grupo de las oxidoreductasas que contienen cobre en su sitio activo, tienen actividad fenoloxidasas es capaz de actuar sobre una gran variedad de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, utilizando el oxígeno molecular como aceptor final de electrones hasta la reducción a dos moléculas de agua. Se obtuvieron por primera vez del árbol de la laca, *Toxicodendron verniciflua* en Japón. Posteriormente se encontraron en otras plantas, varios insectos y en diferentes tipos de hongos. En particular, en los hongos basidiomicetos (géneros *Phanerochaete*, *Trametes*, *Pycnoporus*, *Nematoloma*, *Sporotrichum*, *Stropharia*, etc.), la mayoría de las lacasas estudiadas son proteínas extracelulares principalmente de hongos. Aunque las lacasas están ampliamente distribuidas en las plantas y los hongos, su actividad se ha reportado en pocas bacterias, incluyendo *Azospirillum lipoferum*, *Marinomonas mediterranea*, *Streptomyces griseus* y *Bacillus subtilis* (Madhavi y Lele, 2009).

2.5.2 Lacasas bacterianas

Las bacterias son microorganismos ubicuos, es decir, capaces de colonizar diversos ambientes por su versatilidad metabólica, esto las convierte en candidatos idóneos para la búsqueda de enzimas que resistan condiciones extremas, como la lacasa PcoA obtenida de la bacteria *Escherichia coli* y la CotA de *Bacillus subtilis* (Blánquez Moya, 2015).

Mongkolthananaruk y colaboradores (2012), aislaron diversas bacterias como *Rhodococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Delftia tsuruhatensis* de muestras de suelo, aguas residuales de industrias textiles y de papel. Reportando que estos microorganismos tienen la capacidad de producir lacasa.



Alexander y Zhulin (2000), realizaron la identificación de lacasas bacterianas, realizando la búsqueda de secuencias no redundantes de proteínas con la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST por sus siglas en inglés) de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) usando como referencia secuencias de lacasas de hongos. El análisis de las secuencias lo realizaron con diferentes programas para determinar la similitud de las secuencias de hongos con las de las bacterias. Encontrando similitudes con varias lacasas de bacterias como: *Mycobacterium tuberculosis* Rv0846c_2916905, *Escherichia coli* PcoA_1073341, *Enterobacter coli* Yack_2506227, *Rhodobacter capsulatus* 3128288, *Yersenia pestis* Contig_768 entre otras.

2.5.3 Lacasa producida por enterobacterias

Se ha estudiado la biodegradación de verde de malaquita (VM) en medios sintéticos, con *Enterobacter asburiae* XJHIX-4TM, la cual fue aislada de aguas residuales contaminadas con colorantes. Esta biodegradación está asociada a la actividad de varias enzimas, tales como: lacasa, lignina peroxidasa, tirosinasa, NADH-DCIP reductasa y VM reductasa. Sin embargo, la mayor decoloración (95 %) se presenta cuando hay una actividad presente de lacasa, NADH-DCIP reductasa y VM reductasa (Mukherjee y Das, 2014).

Adicionalmente, la producción de lacasa por *Enterobacter cloacae* KSB₄, ha sido estudiada en los procesos de oxidación de diferentes sustratos fenólicos (guayacol, p-cresol, p-aminofenol, p-fenildiamina, hidroquinona y tropoleno). Por otro lado, se ha demostrado que esta lacasa en particular es termoestable, probando que su actividad es del 65% a 80°C y del 56% al 58% a 121°C. Así es que se ha comprobado que la capacidad oxidante de esta enzima es directa sobre la degradación de guayacol, p-fenildiamina y la hidroquinona, después de encontrar una producción máxima de la enzima (8.3 U/ml) a los 5 días de fermentación (Devasia y Jayakumaran, 2017).

2.5.4 Estructura de la lacasa

La mayoría de las lacasas son glicoproteínas diméricas o tetraméricas con 4 átomos de cobre por monómero, que se agrupan en tres sitios de óxido-reducción denominados centros de cobre tipo T1, T2 y T3 (Blánquez Moya, 2015), a continuación, se describen a más detalle los tres centros de cobre.

Centro de cobre T1

El centro tipo 1 denominado cobre azul ya que presenta una absorción electrónica a 600 nm lo que le confiere el color azul, el máximo de absorción que presenta es debido a la unión covalente del átomo de cobre con el azufre de una cisteína que lo coordina. Se ha



determinado el potencial de este centro de cobre de distintas lacasas mediante estudios potenciométricos. Con lo que se han clasificado las lacasas en tres grupos:

- Potencial redox bajo con valores inferiores a 470 mV, entre las que se encuentran las lacasas de plantas y bacterias.
- Potencial redox medio (entre 470 y 710 mV), entre las que se encuentran lacasas producidas por ascomicetos y basidiomicetos.
- Potencial redox alto con valores superiores a 710 mV y las cuales son producidas principalmente basidiomicetos.

Centro de cobre tipo T2

Es un centro binuclear formado por dos átomos de cobre acoplados antiferromagnéticamente. Cada átomo está coordinado por tres histidinas unidos mediante puentes de hidrógeno con sus extremos hidroxilos. El centro de cobre T3 se encuentra localizado cerca de este centro, formando un centro trinuclear T2/T3 donde tiene lugar la reducción molecular del oxígeno a agua, por diversos estudios se ha identificado los canales de entrada del oxígeno (próximo al centro T3) y de salida del agua (próximo al centro T2).

Centro de cobre tipo T3

Este centro presenta una ligera absorción en la región visible, está coordinado con dos histidinas y una molécula de agua y muestra afinidad por aniones como F^- , N^- y CN^- , que actúan como inhibidores de la enzima.

En la figura 7 se representa la estructura tridimensional de la lacasa CotA de *Bacillus subtilis*, los centros de cobre se representan por las esferas naranjas. El recorrido del oxígeno desde la parte superior hasta la reducción a agua y salida por la parte inferior de la molécula se representan por las esferas rojas.

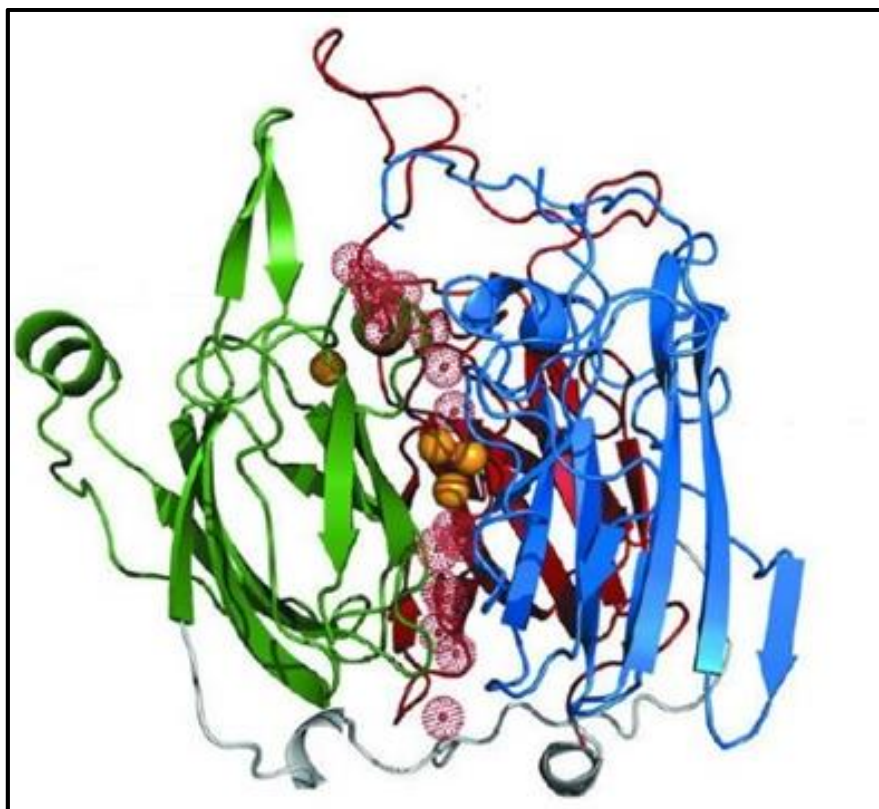


Figura 7. Estructura tridimensional de la lacasa CotA de *Bacillus subtilis* (Blázquez Moya, 2015).

A pesar de que la mayoría de las lacasas presentan los tres centros de cobre, se han descrito lacasas amarillas carentes del cobre T1, algunos autores han sugerido que las lacasas amarillas son el resultado de la unión de compuestos aromáticos (productos de la degradación de la lignina) a lacasas azules durante el crecimiento fúngico. La desaparición del color azul se debe a la reducción de los cobres T1 y T2 del centro activo. Varias lacasas amarillas han sido aisladas de ascomicetos y basidiomicetos, donde algunas lacasas amarillas han mostrado la capacidad de oxidar compuestos no fenólicos en ausencia de mediadores (Blázquez Moya, 2015).

2.5.5 Mecanismo catalítico

El mecanismo de acción es la oxidación de sustratos mediante la remoción de un electrón, generando a su vez radicales libres. La enzima retiene cuatro electrones en su estado totalmente reducido, de esta manera la enzima puede transferir estos electrones a una molécula de oxígeno para formar dos moléculas de agua. El centro de cobre tipo 1 es reducido por un sustrato que se oxida. Este átomo de cobre extrae un electrón del fenol, el electrón se transfiere internamente del centro de cobre T1 al centro trinuclear T2/T3 a través de un complejo de cisteína e histidinas, una vez transferido el electrón, un segundo sustrato

reduce al centro de cobre T1 y el electrón es transferido al centro trinuclear T2/T3 ahí es donde se lleva a cabo la reducción del O_2 a H_2O , la enzima tiene la capacidad de oxidar cuatro sustratos para producir dos moléculas de agua (Figura 8) (Loera y col., 2006)

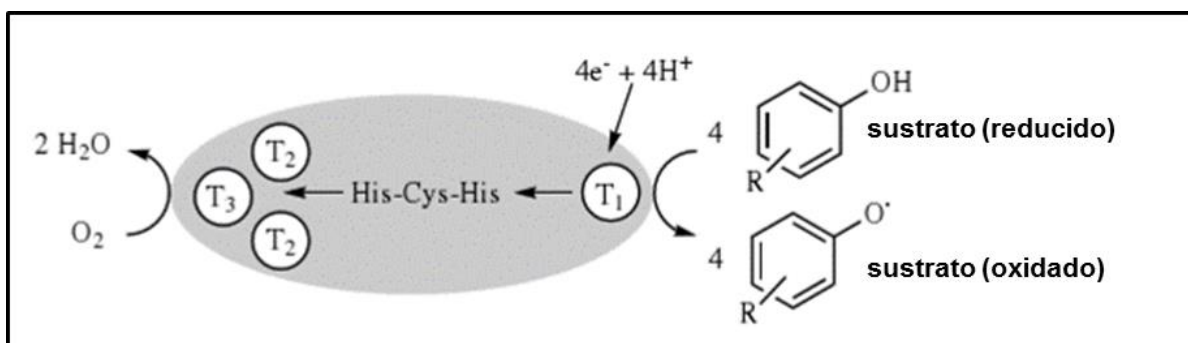


Figura 8. Ciclo catalítico de la lacasa usando sustratos fenólicos (Loera y col., 2006).

Las lacasas son inespecíficas con respecto a la oxidación de sustratos. Catalizan la oxidación de varios sustratos orgánicos, incluidos *o*-difenoles y *p*-difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, metoxifenoles, ligninas y algunos iones inorgánicos, con la reducción simultánea directa de oxígeno a agua y sin la producción del intermediario peróxido de hidrógeno. La oxidación de sustratos crea radicales libres activos que pueden continuar reacciones no enzimáticas (Mayer y Staples, 2002).

2.5.6 Temperatura y pH óptimos de las lacasas

El pH óptimo de las lacasas es altamente dependiente del sustrato. La acción de la lacasa frente a compuestos fenólicos es dependiente del pH ya que el potencial redox de estos compuestos disminuye al aumentar el pH, siendo los valores óptimos de pH para lacasas producidas por hongos inferiores a 5 (Blánquez Moya, 2015). En general, la actividad de lacasa tiene un perfil en forma de campana con un pH óptimo que varía considerablemente. Esta variación puede ser debido a cambios en la reacción causados por el sustrato, el oxígeno, o la propia enzima. La diferencia en el potencial redox entre el sustrato fenólico y cobre T1 podría aumentar la oxidación del sustrato a valores altos de pH, pero la unión del anión hidroxilo (OH^-) a los cobres T2/T3 resulta en una inhibición de la actividad de la lacasa debido a la interrupción de la transferencia de electrones entre el cobre T1 y los cobres T2/ T3 (Mohan y Srivastava, 2010).

Madhavi y Lele (2009), reportaron para lacasa purificada de *Trametes versicolor* un pH óptimo de 4.6 utilizando 1,2-dihidroxibenceno (catecol) como sustrato. Daassi y colaboradores (2013), realizaron estudios en lacasa purificada del hongo *Trametes sp.* reportando que el pH y temperatura óptimos son de 4.0 y 60 °C utilizando como sustrato 2,6-dimetoxifenol. Santo y colaboradores (2013), reportaron un pH de 7.0 y una



temperatura de 70 °C como los óptimos para la lacasa purificada de la bacteria *Rhodococcus ruber* C208.

Mongkoltharuk y colaboradores (2012), evaluaron las condiciones óptimas de temperatura y pH para las lacasas producidas por las bacterias *Rhodococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Delftia tsuruhatensis*. Reportando una temperatura óptima de 37 °C para las lacasas de *Rhodococcus sp.* y *D. tsuruhatensis*, de 32 °C para la lacasa de *S. saprophyticus* y con un pH óptimo de 3.0 para las tres bacterias. Mientras que la mayor temperatura se obtuvo en la lacasa de *Enterobacter sp.* siendo de 45 °C y un pH de 5.0.

2.5.7 Efecto del cobre en la producción de lacasa

Se ha observado que la presencia de iones metálicos como el cobre, la plata y el manganeso incrementan la producción de lacasa (Blánquez Moya, 2015). Mouso y colaboradores (2003), estudiaron el efecto combinado del cobre y el pH en la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum*, obteniendo que a una concentración de 250 µM de CuSO₄ y pH de 5.5 se obtuvo la mayor producción de las enzimas lignolíticas.

Preussler y colaboradores (2009), mencionan que cualquier enzima o grupo de enzimas capaces de atacar inicialmente la lignina, deben de ser extracelulares e inespecíficas y que la expresión de genes de lacasa en algunos hongos puede ser estimulada por inductores, esta expresión difiere de un microorganismo a otro, reportando que el hongo *Trametes villosa* produce lacasa de manera extracelular con un máximo de 81 U/L a los 10 días de cultivo sin la adición de un inductor y al suplementar el medio con 1 mM de CuSO₄ se produjo un incremento de 10 veces.

Mongkoltharuk y colaboradores (2012), estudiaron el efecto del cobre en la producción de la lacasa por las bacterias *Rhodococcus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Delftia tsuruhatensis* y reportaron la inducción de la enzima en todas las bacterias.

Santo y colaboradores (2013), estudiaron el papel del cobre al inducir la producción de lacasa de *R. ruber* C208 en la biodegradación del polietileno. Obteniendo la mayor producción de lacasa con la concentración de 20 µM de CuSO₄.

2.5.8 Efecto del cobre en la actividad de lacasa

Las enzimas son expresadas por los hongos como un proceso idiofásico (fase del crecimiento donde hay producción de metabolitos secundarios), donde la actividad de ellas se incrementa por la adición de iones metálicos, por ejemplo, la acción del cobre sobre la actividad de la lacasa. Además, como muchas de ellas son enzimas extracelulares, se ha estudiado el uso de un protector enzimático como el Tween 80 para recubrir a la enzima y evitar la desnaturalización por la acción mecánica. De esta forma se ha observado un



incremento en la actividad de la lacasa del hongo *Trametes versicolor* LAC 2M de 4.47 a 4.99 utilizando una concentraciones de 5 y 12 mM de CuSO_4 respectivamente y 0.02% (v/v) de Tween 80 (Gómez Dorado y col., 2005).

Adicionalmetne al *Trametes versicolor* LAC 2M, se han hecho estudios para identificar el incremento de activida de lacasa producida por otros hongos en presencia de cobre. En el caso específico de *Rhodococcus sp*, se sabe que el aumento de actividad asciende a 4.8 veces al utilizar una concentración 1 mN de CuSO_4 (Mongkolthanaruk y col., 2012).



2.6 ENTEROBACTERIAS

El orden de las enterobacterias está conformado por la familia de las *Enterobacteriaceae* siendo bacterias Gram negativas que contienen más de 30 géneros entre los que se encuentran *Escherichia* y *Enterobacter*. Su morfología varía dependiendo el género, pueden ser bacilos o cocos y su tamaño esta entre 0.6 a 3.0 μm , su movilidad es a través de flagelos y no forman esporas, las colonias tienen una pigmentación que varía de un color crema (amarillo pálido) a amarillo, con un tamaño que está entre 2 a 3 mm y una forma plana o ligeramente elevada con bordes irregulares. Son anaerobias facultativas y quimiorganotróficas. Son fermentadores de carbohidratos (en especial glucosa y lactosa) en condiciones anaerobias con o sin la producción de gas (generalmente CO_2), sin embargo, también pueden obtener energía de otras fuentes de carbono como: arabinosa, manitol, fructosa, galactosa, xilosa entre otras, teniendo la capacidad de oxidar una amplia gama de sustratos en condiciones aerobias. La temperatura óptima de crecimiento varía dependiendo la especie y está entre los 22 y 37 °C. Todas las especies se encuentran en el medio ambiente incluyendo agua, aguas residuales, suelo, plantas, heces humanas y animales (Grimont y Grimont 2015).

Los medios de cultivo utilizados en laboratorio para su reproducción son: sangre agar 5%, TSA agar y agar nutritivo. A menudo se utilizan medios diferenciales que no son inhibidores para las *Enterobacteriaceae*. Se trata de agar de bromotimol azul-lactosa, agar rojo de fenol-lactosa, agar de lactosa de Drigalski, agar azul de eosina-metileno (EMB agar) o agar MacConkey. Debe recordarse que algunas cepas de una especie que se sabe que producen ácido a partir de lactosa podrían no hacerlo y así dar colonias de lactosa negativa en medios diferenciales. (Grimont y Grimont 2015).

Agar de MacConkey. Este medio se utiliza para el aislamiento de microorganismos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* se desarrollan en este medio. En la composición del medio de cultivo las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro) en las colonias desde un tono rosado a violeta. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Agar con eosina y azul de metileno. Es una combinación del medio de Levine y el de Holt-Harris y Teague, contiene una mezcla de peptonas según Levine y presenta dos carbohidratos lactosa y sacarosa. Este medio de cultivo permite una diferenciación muy clara entre las colonias de organismos fermentadores de lactosa y aquellos que no la fermentan; el contenido de eosina y azul de metileno inhiben en cierto grado organismos Gram positivos. La presencia de sacarosa permite para algunos miembros del grupo coliforme



fermentarla con más facilidad que la lactosa. Las colonias lactosa positiva son azules a moradas con brillo metálico o poseen centros oscuros con periferias transparentes incoloras y las que son negativas en lactosa o sacarosa, se observan incoloras o rosa pálido transparentes.

3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad es difícil prescindir de los productos de plásticos, no solo por su utilidad en diversas industrias como la alimentaria, farmacéutica, construcción, etc., sino también por la importancia económica. Además, los productos plásticos más empleados para transportar y conservar los alimentos son elaborados a base de poliestireno (PS) y en particular el unigel (poliestireno expandido). Estos productos tienen un periodo de uso muy corto sin ser reutilizados, lo que ha provocado que exista una acumulación en el medio ambiente. Aunado a ello tienen un periodo de degradación muy largo de entre 100 y 500 años.

Solo en México la producción de plásticos supero los 4000 millones de toneladas en el 2006 con lo que se calcula que anualmente cada persona en México consume 49 kg de plástico (Ortíz-Hernández, 2013). Así también, se reportó un aumento en la generación de residuos sólidos urbanos (RSU) del año 2001 al 2012 en un 33%. Dentro de estos RSU el 19% del total son los catalogados como residuos no aprovechables, donde se encuentran los productos elaborados con PS.

Debido a la falta de estrategias adecuadas para el manejo y reciclaje de los RSU, se han acumulado este tipo de residuos en basureros municipales, y en particular los residuos de los productos de PS que están expuestos a las condiciones ambientales (luz UV, humedad, calor, corrientes de aire, etc.). Esta exposición climática, provoca procesos de degradación lentos (físicos y químicos principalmente), los cuales provocan la erosión de la superficie del PS generando micropartículas (monómeros u oligómeros inestables) que son arrastrados por el viento contaminando suelos, ríos y mares, además de causar daños en la salud humana y en la de los animales.

Por otro lado, no se encuentran reportados muchos métodos adecuados para la degradación de los polímeros sintéticos, ya que son procesos muy costosos, los cuales requieren altos niveles de energía como los rayos UV o altas temperaturas. Es por ello de la necesidad de buscar alternativas de degradación que sean amigables con el medio ambiente, siendo una de ellas la utilización de microorganismos con capacidad de biodegradar los polímeros sintéticos.

Debido a estudios previos sobre la biodegradación de PS y a la evidencia generada de deterioro por microorganismos aislados de un basurero, en la UAM-Iztapalapa se pretende continuar con los estudios de biodegradación. Por ello el objetivo de este trabajo fue evaluar el grado de degradación del PS con tres especies bacterianas diferentes evaluando al mismo tiempo la producción de lacasa, tanto en medios preparados con PS cristal como expandido, como única fuente de carbono.



4 HIPÓTESIS

Los microorganismos aislados del basurero municipal de Chimalhuacán, Edo. de México tienen la capacidad de biodegradar el poliestireno y producir lacasa la cual está asociada al proceso de biodegradación.

5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la biodegradación del poliestireno mediante los microorganismos aislados del basurero municipal y su posible relación con la producción de lacasa.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los microorganismos seleccionados por biología molecular y por espectrometría de masas (MALDI-TOF/MS).
- Estudiar la biodegradación del poliestireno mediante el monitoreo en la producción de CO₂ (prueba de Sturm) y la pérdida de peso.
- Cuantificar la lacasa producida durante el crecimiento de los microorganismos aislados del tiradero municipal en los ensayos de biodegradación.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Las bacterias seleccionadas para realizar los ensayos de biodegradación del PS, que fueron aisladas de una muestra de PS expandido recolectada del basurero del municipio de Chimalhuacán, Edo. de México por González-Martínez (2015), son las cepas bacterianas C1, C2 y C4, ya que éstas, fueron reportadas previamente como las que presentaron mayor biodegradación.

El inóculo bacteriano se preparó de la siguiente manera:

En tubos de ensayo con 9 ml de caldo nutritivo (BD Bioxon, México) previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos, se inocularon con 1 ml del cultivo bacteriano (C1, C2 y C4).

Una vez inoculados se incubaron a 35 °C y 200 rpm (Incubadora de hibridación Combi SV12 marca FINEPCR) durante 24 horas. Los inóculos preparados se conservaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C para su posterior utilización en los ensayos de biodegradación.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

7.2.1 Descripción de la morfología colonial y microscópica de las bacterias

Se prepararon cajas Petri con diferentes medios de cultivo: agar nutritivo, MacConkey agar y EMB agar. Los medios de cultivo fueron esterilizados a 121 °C por 15 minutos, para posteriormente vaciar el medio estéril en las cajas Petri estériles en una campana de flujo laminar.

Para observar la morfología de las bacterias se realizó la siembra por estría cruzada y se incubó a 35 °C por 24 horas.

A las 24 horas se realizó la tinción de Gram para cada bacteria de los cultivos en las cajas de agar nutritivo, observándolas en un microscopio para describir su morfología microscópica. También se describió la morfología de las colonias de cada bacteria.

Se observaron las diferencias de las colonias obtenidas (coloración) de los medios diferenciales para cada bacteria.



7.2.2 Identificación por biología molecular

El análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada para la identificación taxonómica de bacterias, proporcionando información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas (Fernández Olmos y col., 2010).

7.2.2.1 Extracción del ADN bacteriano

Se realizó la extracción del ADN con el kit de extracción de ADN PowerSoil® DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, EUA.) siguiendo el protocolo del fabricante con las siguientes modificaciones:

Del cultivo bacteriano (secc. 7.1) se adicionó 1 ml en un tubo de 1.5 ml y se centrifugó a 6000 rpm (Mini centrifuga Premiere) durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se volvió a adicionar 1 ml del cultivo centrifugando nuevamente. Esto se realizó tres veces para obtener la mayor concentración de biomasa (pellet celular) para realizar la extracción de ADN. Y se resuspendió en 500 µl de la solución amortiguadora de extracción.

Para extraer el ADN se adicionaron 500 µl de pellet celular en tubos Eppendorf con perlas de cerámica de 0.1 mm suspendidas en una solución amortiguadora (que contiene agentes que protegen el ADN) y se homogenizó con la ayuda de un vórtex a velocidad media por 30 segundos.

Después de haber agitado los tubos se le adicionó 60 µl de la solución C1 (obtenida del kit de extracción) la cual contiene agentes para continuar con la lisis celular. El tubo se agitó con la ayuda de un vórtex a velocidad máxima (2500 rpm) durante 2 minutos, una vez agitado el tubo se continuó con los pasos del protocolo de extracción (Anexo 11.1).

7.2.2.2 Amplificación y purificación del ADN bacteriano

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica molecular que tiene como principal objetivo sintetizar varias veces un fragmento de ADN a partir de una molécula, simulando en un tubo la replicación que se lleva a cabo en una célula.

Se realizó la amplificación por PCR del fragmento del ARNr 16S del ADN bacteriano extraído con el kit PowerSoil® DNA Isolation utilizando los primers universales para bacterias E9F y E1492R (Cuadro 6) los cuales son específicos para secuencias de ARNr 16S.

Cuadro 6. Primers utilizados para la amplificación del fragmento del ADNr 16S (Soergel y col., 2012)

Primer	Longitud (bases)	Diana		Secuencia
		E. coli 5´	E. coli 3´	
E9F	19	9	27	5´ GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3´
E1492R	15	1478	1492	5´ ACCTTGTTACGACTT 3´

La amplificación se realizó en un termociclador T100 (Bio Rad), mediante la mezcla de reacción como se describe en el cuadro 7 para llegar a un volumen final de 25 µl en tubos de 200 µl.

Cuadro 7. Mezcla de reacción para la amplificación de ADN por PCR.

Componente	Volumen (µl)
Taq 5X Master Mix	12.5
Primer E9F (10 µM)	0.7
Primer E1492R (10 µM)	0.7
ADN bacteriano (50 ng/ml)	4.0
Agua libre de nucleasas	7.1

La reacción de PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos (con 3 etapas: desnaturalización, alineamiento y elongación) a las condiciones que se presentan en el cuadro 8:

Cuadro 8. Condiciones para la reacción de PCR.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	94	3
Desnaturalización	94	0.5
Alineamiento	45	0.5
Elongación	72	1
Elongación final	72	5



La purificación de los fragmentos de ADN_r obtenidos, se llevó a cabo con filtros para centrifuga Montage[®] PCR (Millipore, EUA) siguiendo el protocolo del fabricante con la modificación del volumen de la muestra cómo se describe a continuación:

En el tubo Eppendorf de 1.5 ml con el filtro colector de ADN, se adicionó en el centro del filtro 380 μ l de agua libre de nucleasas y 20 μ l del fragmento de ADN_r centrifugándolo a 10,000 x g durante 15 minutos, descartando el agua contenida en el fondo del tubo.

Después de la centrifugación se adicionó 20 μ l de agua libre de nucleasas en el centro del filtro y se traspasó a un nuevo tubo de 1.5 ml de forma invertida centrifugando a 10,000 x g durante 2 minutos, la muestra colectada en el fondo del tubo (fragmentos de ADN purificados) se almacenó en congelación a -20 °C.

7.2.2.3 Secuenciación de ADN

La secuenciación de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Para la secuenciación se utilizó el método de terminación de cadena de Sanger, utilizando dideoxinucleótidos (ddNTP) los cuales carecen del hidroxilo terminal (3'-OH) marcados con cuatro fluoróforos distintos para cada ddNTP, en combinación con los nucleótidos presentes y ADN polimerasa para formar fragmentos de diferentes longitudes durante la elongación normal del ADN por la técnica de PCR. El secuenciador lleva a cabo una separación (por electroforesis capilar) del ADN basada en el tamaño de las cadenas obtenidas. Cada uno de los cuatro ddNTP presentes al final de la cadena fluoresce en un color diferente cuando es iluminado por un láser que como respuesta provee de una secuencia de bases impresa.

La amplificación se realizó en un termociclador T100 (Bio Rad), mediante la mezcla de reacción como se describe en el cuadro 7 para llegar a un volumen final de 10 μ l en tubos Eppendorf de 200 μ l.

Cuadro 9. Mezcla de reacción para la amplificación de ADN por PCR.

Componente	Volumen (μ l)
Big Dye terminator V 3.0	1
Buffer 2.5X para Big Dye	2
Primer E9F o E1492R	1
ADN _r	2.5
Agua libre de nucleasas	2.5



La reacción de PCR se llevó a cabo durante 25 ciclos sin desnaturalización inicial y elongación final, a las condiciones que se presentan en el cuadro 10:

Cuadro 10. Condiciones para la reacción de PCR por cada primer.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	96	10 segundos
Alineamiento	50	5 segundos
Elongación	60	4 minutos

La purificación del producto de PCR de secuenciación se realizó en una placa Centrisep 96 como se describe a continuación:

Se hidrataron 10 g de sephadex (6.5 % p/v) con agua libre de nucleasas durante 2 horas en refrigeración a 4 °C. Antes de utilizar el sephadex se dejó fuera del refrigerador para que estuviera a temperatura ambiente.

La placa Centrisep de 96 pozos se colocó sobre una placa colectora (verificando la orientación alfanumérica de las placas coincidan) adicionándole 360 µl del sephadex hidratado (agitándolo constantemente) y se centrifugó a 2900 rpm por 2 minutos desechando el líquido que quedó en la placa colectora.

Al producto de PCR se le adicionaron 10 µl de agua libre de nucleasas, los 20 µl obtenidos se colocaron en el centro de los pozos de la placa, evitando hacer contacto con el gel y se centrifugó a 2900 rpm por 2 minutos. Los productos de PCR purificados quedaron en la placa colectora.

Los productos de PCR purificados se desnaturalizaron adicionando 1.5 µl de formamida Hi Di. Una vez desnaturalizados se colocaron las placas en el secuenciador ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron analizadas y editadas con los programas Chromas 2.5.1 (Technelysium Pty Ltd) y BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5.

Una vez editadas las secuencias, se realizó la comparación con las secuencias registradas en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST por sus siglas en inglés).



7.2.2.4 Comparación filogenética de las bacterias

Se realizó la comparación de los géneros de las bacterias, mediante la búsqueda de secuencias de la base de datos del NCBI de diferentes bacterias. Se realizó la selección de algunas de las bacterias reportadas por Mongkolthanaruk y colaboradores 2012 y otras bacterias reportadas como productoras de lacasa, haciendo la búsqueda de las secuencias de la región ADNr 16S en el GenBank de la NCBI.

Con las secuencias de cada bacteria, se realizó la reconstrucción filogenética utilizando el programa MEGA versión 7.0.26 y mediante el método de máxima verosimilitud con el modelo de Kimura de 2 parámetros.

7.2.3 Identificación por espectrometría de masas (MALDI-TOF/MS)

Se empleó la técnica de desorción/ionización láser asistida en la matriz con detección de espectros de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF/MS, por sus siglas en inglés), para lo que fue necesario dos pasos previos: la obtención de una colonia aislada y la adición de una matriz que se cristaliza al contacto con el aire (generalmente una solución saturada de ácido ciano-hidroxicinámico (HCCA), acetonitrilo y ácido trifluoroacético) la cual tiene como propósito exponer las proteínas intracelulares mediante la ruptura de la membrana celular y así facilitar la desorción/ionización.

Se utilizó el procedimiento de transferencia directa extendida como se describe a continuación:

De los cultivos en agar nutritivo de las bacterias (sec. 7.2.1) con un asa de inoculación se tomó con cuidado una muestra de una colonia de cada bacteria, esparciéndola sobre un punto de la placa de análisis MALDI-TOF/MS (Brunker Daltonik, Alemania) de manera uniforme para obtener una película delgada.

Una vez esparcidas las muestras en la placa de análisis se adicionó 1 μ l de ácido fórmico (70% v/v) asegurándose que se haya esparcido en todo el punto de la placa y dejando secar por unos minutos. Posteriormente se colocó 1 μ l de la solución matriz de HCCA (Brunker Daltonik, Alemania). Las muestras se analizaron en el equipo *autoflex speed* (comandado por el programa FlexControl Brunker Daltonik, Alemania).

Cada espectro de masas obtenido fue comparado con la base de datos MALDI Biotyper Database: del programa MBT Compass (Bruker Daltonik, Alemania). La identificación se realiza a través de la comparación del resultado de una bacteria con todos los espectros de masas que contiene la base de datos MALDI Biotyper Species List DB-5627.



En los resultados del programa MBT Compass con la identificación del género y especie de la bacteria encontrados, muestra un puntaje que representa su correlación, la confiabilidad de dicho valor para la identificación de microorganismos se determina de acuerdo con lo establecido por el fabricante:

- 0.000 a 1.699 identificación no fiable
- 1.700 a 1.999 probable identificación de género
- 2.000 a 2.299 identificación de género segura y probable identificación de especie
- 2.299 a 3.000 alta probabilidad de identificación de especie

Para calibrar el equipo y como control positivo en la validación de los análisis se realizaron ensayos utilizando un estándar de prueba bacteriano (BTS, por sus siglas en inglés, Bacterial Test Standar) con una cepa de *Escherichia coli* DH5 alfa (Bruker BTS, Bruker Daltonik, Alemania) que muestra un perfil de péptidos y proteínas característico en el espectro de masas.

7.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

7.3.1 Determinación de la actividad de lacasa

Las lacasas estudiadas en la degradación de contaminantes de origen fenólico son principalmente producidas por hongos lignolíticos, sin embargo, se ha incrementado el estudio de lacasas de origen bacteriano en la degradación de estos contaminantes. Debido a la similitud en las características de las lacasas bacterianas con las producidas por los hongos como *Trametes versicolor* (Iioshi y col., 1998; Fujisawa y col., 2002) ésta se empleó en el presente trabajo con el propósito de compararla con la lacasa producida durante la degradación de poliestireno.

La actividad de lacasa de *T. versicolor* (E.C. 1.10.3.2; 0.87 U/mg; Sigma-Aldrich, Alemania) se realizó de acuerdo a lo reportado por Hu y colaboradores (2014) con ligeras modificaciones como se describe a continuación:

Se preparó una solución de guayacol 1.76 mM (2-metoxifenol; Sigma-Aldrich, EUA). En un vaso de precipitados se colocaron 50 ml de solución amortiguadora (acetato de sodio 10 mM para pH de 3.0, 4.0 y 5.0; fosfato de potasio 50 mM para pH de 6.0 y 7.0).

Se adicionaron 24.6 µl de guayacol, la solución se homogenizó con un agitador magnético por 5 minutos, una vez que la mezcla estuvo completamente homogénea, se aforó a 100 ml con la solución amortiguadora.

Para la solución de lacasa de *T. versicolor* se pesó 1.0 mg de lacasa en una balanza analítica (AEADAM modelo PW 124) y se le adicionó 1 ml de solución amortiguadora (acetato de sodio 10 mM para pH de 3.0, 4.0 y 5.0; fosfato de potasio 50 mM para pH de 6.0 y 7.0).



La mezcla de reacción (Cuadro 11) se llevó a cabo en celdas de vidrio para espectrofotómetro de 1 ml y 1 cm de espesor.

Cuadro 11. Mezcla de reacción para determinar la actividad de la lacasa.

Reactivo	Volumen (ml)
Solución amortiguadora	0.78
Solución de guayacol	0.20
Solución de lacasa	0.02

La reacción se realizó durante 15 minutos en un espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu UV-1601) el cual tiene el accesorio para controlar la temperatura (Shimadzu TCC-240^a) registrando las absorbancias a 470 nm cada minuto.

La actividad de lacasa se calculó con la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta abs * Volumen\ de\ reacción(ml) * FD}{\epsilon * b * t * ml\ enzima} \times \left(\frac{1}{ml\ medio} \right)$$

Donde:

Δabs =cambio de la absorbancia a 470 nm en el tiempo de reacción (t)

ϵ =coeficiente de extinción del guayacol (26.6 mM cm⁻¹)

t= tiempo de la reacción (min)

b=espesor de la celda (1 cm)

FD= factor de dilución

Una unidad de lacasa esta expresada como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ M de guayacol por minuto a 35 °C y pH 7.

7.3.2 Efecto del pH y la temperatura en la actividad de lacasa

Se evaluó la actividad de lacasa de *T. versicolor* con guayacol en el intervalo de pH de 3.0 a 7.0. También se estudió el efecto de la temperatura en un intervalo de 30 a 60 °C para cada pH.

Las soluciones amortiguadoras empleadas fueron las siguientes:

- Acetato de sodio 10 mM para pH de 3.0, 4.0 y 5.0
- Fosfato de potasio 50 mM para pH de 6.0 y 7.0

El pH de las soluciones amortiguadoras se ajustó empleando un potenciómetro (Conductronic pH 120).



7.4 ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN DEL POLIESTIRENO

Para determinar el potencial de biodegradación de las tres bacterias seleccionadas se emplearon dos tipos de poliestireno (cristal y expandido). La biodegradación se estudió mediante dos metodologías: la prueba de Sturm que consiste en realizar el monitoreo de la producción de CO₂ de las bacterias, y la prueba por pérdida de peso en donde se analizó la disminución del peso por gravimetría. Además, se estudió si las bacterias seleccionadas producían lacasa.

7.4.1 Preparación de la muestra de poliestireno

El poliestireno (PS) utilizado fue PS cristal (PM=192,000; Sigma-Aldrich, EUA) y PS expandido el cual se obtuvo de un vaso comercial.

Las muestras de PS fueron preparadas de la siguiente manera:

- Se pesó aproximadamente 1 g de PS cristal y trozos de PS expandido de 2 X 3 cm.
- Se desinfectaron por inmersión en una solución de etanol (96°) al 70% (v/v) durante 30 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril.
- Después de haber desinfectado las muestras, éstas se llevaron a peso constante en una estufa (Felisa modelo FE-291AD) a 60 °C durante 12 horas.
- Una vez transcurrido el tiempo de secado las muestras se colocaron en un desecador por 15 minutos y se pesaron en una balanza analítica.
- Las muestras se volvieron a introducir a la estufa a 60 °C por 1 hora, esto para verificar el peso constante.

7.4.2 Medio de cultivo para los ensayos de biodegradación

Se preparó el medio sintético (MS) de acuerdo con lo reportado por González-Martínez (2015) con ligeras modificaciones.

En un matraz de 1 litro con 800 ml de agua destilada se adicionaron cada uno de los compuestos en el orden en que se presentan en el cuadro 12. La solución se mantuvo en agitación y calentamiento moderado hasta que estuvo completamente homogénea y se aforó a 1 litro con agua destilada.

Se adicionaron 100 ml de MS en matraces Erlenmeyer de 125 ml (para la prueba de pérdida de peso) y en matraces Erlenmeyer de 250 ml (para la prueba de Sturm) y se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos.



Cuadro 12. Composición del medio sintético utilizado en los ensayos de biodegradación.

Compuesto	Cantidad (g/L)
Tween 80 (J.T. Baker, EUA)	0.02
NH ₄ NO ₃ (J.T. Baker, EUA)	1.0
MgSO ₄ • 7H ₂ O (Sigma-Aldrich, Japón)	0.2
K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker, EUA)	1.0
CaCl ₂ • 2H ₂ O (J.T. Baker, EUA)	0.1
KCl (J.T. Baker, EUA)	0.15
Extracto de levadura (BD Bioxon, México)	0.1
Peptona de gelatina (BD Bioxon, México)	0.1
FeSO ₄ • 6H ₂ O (J.T. Baker, EUA)	0.001
ZnSO ₄ • 7H ₂ O (Sigma-Aldrich, Japón)	0.001
MnSO ₄ monohidratado (Sigma-Aldrich, Japón)	0.001

7.4.3 Preparación del inóculo

En un matraz Erlenmeyer de 125 ml se adicionaron 50 ml de caldo nutritivo esterilizándolo a 121 °C por 15 minutos.

De las bacterias conservadas en refrigeración a 4 °C, se tomaron 5 ml y se inocularon al matraz con los 50 ml de caldo nutritivo estéril y se incubaron a 200 rpm a 35 °C durante 24 horas. Se registró la absorbancia a 600 nm (abs_{600nm}) a las 24 horas y de ser necesario se incubó por más tiempo hasta alcanzar una absorbancia de 1.0.

Después de la incubación el cultivo bacteriano se transfirió a un tubo de centrifuga previamente esterilizado (121 °C por 15 minutos) y se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C (centrifugadora Eppendorf modelo 5804R), descartando el sobrenadante (caldo nutritivo) y conservando el pellet celular.

El pellet celular se resuspendió con 20 ml de medio sintético (MS) para eliminar los residuos de caldo nutritivo, se homogenizó el medio con la ayuda de un vórtex a máxima agitación, una vez homogéneo el medio se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones desechando el MS y conservando el pellet celular.

Se estandarizó la concentración del inóculo a una concentración de 7 veces (7X) la absorbancia inicial empleando MS estéril.

7.4.4 Prueba de Sturm

7.4.4.1 Montaje de la prueba

Para realizar este ensayo de biodegradación, primero se necesitó eliminar las impurezas y humedad presentes en el flujo de aire por lo que se colocó un filtro de aire (Figura 9) el cual también ayudó a regular el flujo de aire en el sistema de la prueba de Sturm.



Figura 9. Filtro de aire para regular el flujo de aire y eliminar impurezas y humedad.

El armado del sistema (Figura 10) consistió en una serie de conexiones con mangueras de plástico (Tubo de PVC de 6 X 11 mm, Nalgene, EUA).

De la manguera que proviene del filtro de aire se conectó a una trampa de CO₂ con 500 ml de NaOH 1 N (J.T. Baker, EUA) (Figura 10 A) la cual removi6 las trazas de CO₂ que pudieron aún estar en el aire filtrado, la solución de NaOH se cambi6 cada dos días para asegurar la eliminación del CO₂. De la trampa de CO₂ salen dos mangueras las cuales se conectan a los reactores del ensayo (prueba de biodegradación y control negativo).

A los reactores (matraces Erlenmeyer) se les coloc6 un tap6n de silic6n incorporándole dos mangueras de plástico. Una de las mangueras del tap6n proviene de la trampa de CO₂ con NaOH 1N y su extremo final se coloc6 de manera que estuviera sumergido en el medio sintético contenido en el reactor.

La segunda manguera del tap6n, uno de sus extremos se coloc6 de forma que estuviera en el espacio de cabeza del matraz y el otro extremo se conect6 a una serie de tres trampas de CO₂ con 100 ml de NaOH 0.05 N conectadas por mangueras de plástico (matraces de plástico de 250 ml con tapa de rosca; Figura 10 B) con la finalidad de capturar el CO₂ producido. Todas las conexiones fueron selladas con silic6n y cinta tefl6n para evitar fugas de aire y del CO₂ producido.

Para poder controlar la temperatura del ensayo el sistema se armó dentro de una caja de madera que contiene en sus paredes un elastómero que funciona como aislante térmico y para mantener la agitación se utilizaron parrillas de agitación magnética.

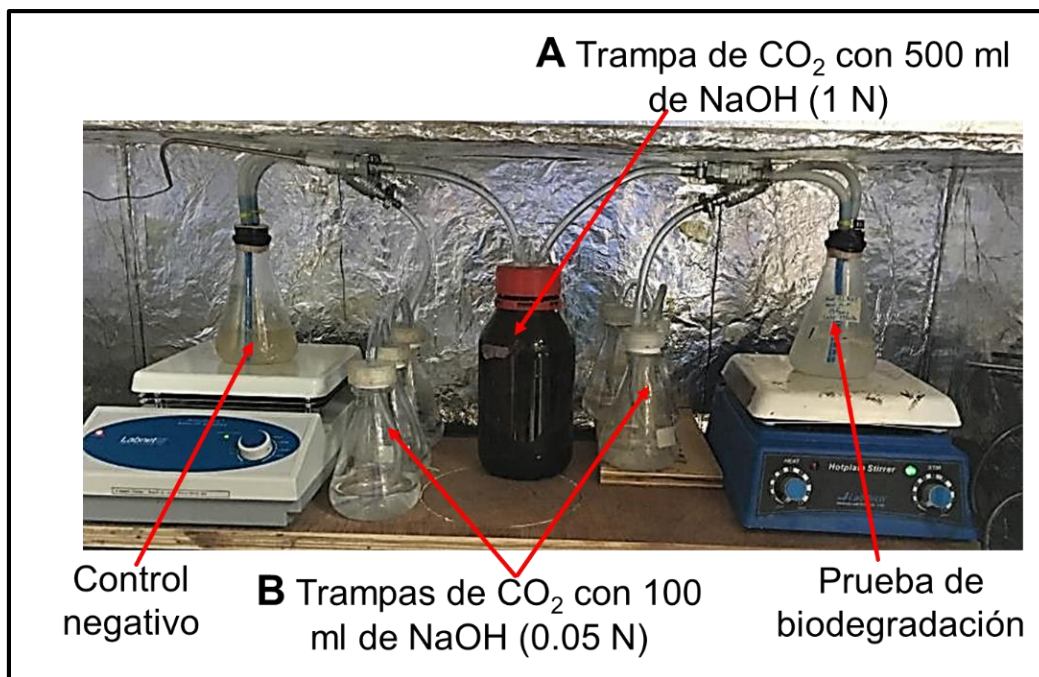


Figura 10. Sistema para el monitoreo de la producción de CO₂ (prueba de Sturm).

7.4.4.2 Biodegradación del PS por la prueba de Sturm

En un matraz de 250 ml (reactor) se le incorporó un agitador magnético y se le adicionaron 100 ml de medio sintético, se le colocó el tapón de silicón con las dos mangueras de plástico y los extremos de las mangueras que quedaron fuera del matraz se cubrieron con algodón y gasa. Una vez armado el reactor se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos.

Una vez estéril el reactor, en una campana de flujo laminar se inoculó con 5 ml del cultivo bacteriano (7X) y utilizando guantes estériles se incorporó la muestra de poliestireno previamente desinfectada.

Como la muestra de PS expandido tiende a flotar en el medio, se incorporó al matraz un globo (# 7) previamente desinfectado con etanol al 70% por 30 minutos, el cual se llenó con medio sintético estéril, esto para sumergir el trozo de unigel en el medio de cultivo.

La prueba se llevó a cabo a 35 °C y una agitación de 200 rpm durante 15 días, cambiando los matraces de las trampas de CO₂ con NaOH 0.05 N cada 2 días y reservando las trampas removidas para la determinación del CO₂ producido.

Por cada prueba de biodegradación se llevó a cabo en paralelo un control negativo sin inocular.



7.4.4.3 Determinación del grado de biodegradación

Para cuantificar el CO₂ producido de cada una de las trampas con NaOH 0.05 N se tomaron 3 alícuotas de 10 ml en matraces Erlenmeyer de 125 ml y se les agregaron 2 gotas de fenolftaleína al 1 % (Sigma-Aldrich, EUA) como indicador a cada una.

Las alícuotas se titularon con HCl 0.05 N (J.T. Baker, EUA) hasta que la solución viró de rosa a incoloro. La concentración de CO₂ se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$CO_2 \text{ producido (mg)} = [N_{HCl}(A_{NaOH} - V_{HCl})] \times \frac{V_{NaOH}}{A_{NaOH}}$$

Donde:

N_{HCl}= Normalidad del HCl

A_{NaOH}= Alícuota de la trampa de NaOH (ml)

V_{HCl}= Volumen del HCl gastado en la titulación (ml)

V_{NaOH}= Volumen total de la trampa de CO₂ (ml)

Para cuantificar la biodegradación se utilizó la fórmula que se describe en el método 301 B: Evolución de CO₂ de la guía de la OECD para el ensayo de productos químicos (OECD 1992).

$$Degradación PS (\%) = \frac{CO_2 \text{ producido (mg)}}{TeCO_2 \times muestra de PS (mg)} \times 100$$

TeCO₂ es la cantidad de CO₂ teórico que puede ser generado por la sustancia utilizada en la prueba como fuente de carbono. El TeCO₂ teórico del PS se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$TeCO_2 = muestra de PS (g) \times M_C \times \left(\frac{MM_{CO_2}}{MM_C} \right)$$

Donde:

M_C= Contenido de carbono expresado en fracción másica el cual puede ser obtenido por medio de la fórmula química.

MM_{CO₂}= Masa molecular del CO₂

MM_C= Masa molecular del carbono

7.4.5 Pérdida de peso

7.4.5.1 Biodegradación del PS por la prueba de pérdida de peso

Este ensayo de biodegradación consistió en adicionar 100 ml de medio sintético a un matraz de 125 ml (reactor), y se le colocó un tapón de algodón con gasa. Se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos.

Una vez estéril el reactor, en una campana de flujo laminar se inoculó con 5 ml del cultivo bacteriano (concentración 7X; secc. 7.4.3) y utilizando guantes estériles se incorporó la muestra de poliestireno (PS) previamente desinfectada.

Este ensayo se realizó por duplicado para cada bacteria y tipo de PS, con un control negativo por cada muestra de PS, los cuales se colocaron en una incubadora con agitación orbital (Figura 11) a 35 °C y 200 rpm. El ensayo se realizó por un periodo de 30 días tomando dos muestras de 1 ml del medio de cada reactor cada 5 días para realizar la determinación de la producción de lacasa.



Figura 11. Ensayos de pérdida de peso con las tres bacterias y los dos tipos de PS.

7.4.5.2 Determinación del grado de biodegradación

Una vez transcurridos los 30 días de la prueba de biodegradación, se realizó la separación de las muestras de PS del medio de cultivo reservándolo para determinar la biomasa final en peso seco. Una vez separadas éstas se enjuagaron con agua destilada estéril para eliminar rastros del medio sintético.



Las muestras ya sin medio sintético se suspendieron en una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2% (Ibi scientific, EUA) y se colocaron en la incubadora con agitación a 50 °C y 200 rpm por 4 horas, esto para remover todo el rastro de células que pudieron adherirse a la superficie de la muestra. Una vez transcurridas las 4 horas las muestras se enjuagaron con agua destilada estéril para retirar todo rastro de células y la solución de SDS. Las muestras enjuagadas se llevaron a peso constante como se describe en la preparación de las muestras. Una vez en peso constante se calculó la pérdida de peso mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{P_{\text{inicial del PS (g)}} - P_{\text{final del PS (g)}}}{P_{\text{inicial del PS (g)}}} \times 100$$

Donde:

P_{inicial} = Peso de la muestra de PS desinfectada y en peso constante antes de introducirlo en el reactor.

P_{final} = Peso de la muestra de PS al finalizar el ensayo y tratada con la solución de SDS y llevada a peso constante.

7.4.5.3 Determinación de la actividad de lacasa

Para determinar la actividad de lacasa de las muestras tomadas cada 5 días durante el ensayo de pérdida de peso, se realizó una solución de guayacol 1.76 mM y CuSO_4 50 μM en solución amortiguadora de fosfatos de potasio 50 mM pH 7.0. Las alícuotas de medio sintético tomadas del ensayo de pérdida de peso fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 5 minutos y tomando una alícuota del sobrenadante para la mezcla de reacción que se describe en el cuadro 13, ésta se realizó en tubos Eppendorf nuevos de 1.5 ml.

Cuadro 13. Mezcla de reacción para determinar la actividad de la lacasa en el extracto crudo del ensayo de pérdida de peso.

Reactivo	Volumen (ml)
Medio sintético (extracto crudo)	0.80
Solución de guayacol	0.20

Los tubos se colocaron en la incubadora con agitación orbital a 35 °C y 200 rpm, y se monitorearon cada hora hasta observar el cambio de color de incoloro a rojizo, el cual indica que la lacasa oxidó al guayacol y se leyó la absorbancia a 470 nm. La actividad de lacasa se determinó empleando la fórmula que se describe en la sección 7.3.1.



7.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL COBRE EN LA PRODUCCIÓN DE LACASA

Diversos autores han estudiado el efecto que tiene el cobre en inducir la producción de lacasa por hongos lignolíticos (Gómez Dorado y col., (2005); Preussler y col., (2009) Mouso y col., (2013); Hu y col., (2014)) y en particular Santo y colaboradores, (2013) reportaron el efecto del cobre en la inducción de la lacasa empleando la bacteria *R. ruber* C208. Por lo que se estudió el efecto del cobre en el crecimiento de las bacterias estudiadas, así como el efecto en la producción de lacasa.

7.5.1 Efecto del cobre en el crecimiento microbiano y la producción de lacasa

En un matraz Erlenmeyer de 125 ml se adicionó 100 ml de medio sintético suplementado con glucosa al 1% (p/v) y se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos.

Al matraz con medio sintético suplementado con glucosa se le adicionó 100 µl de CuSO₄ 50 mM estéril (121°C por 15 minutos). Adicionando 5 ml del inóculo preparado en la sección 7.4.3. Esto se realizó para cada bacteria.

Los matraces se colocaron en una incubadora con agitación orbital a 35 °C y 200 rpm durante 24 horas, tomando muestras de 1 ml en tubos Eppendorf de 1.5 ml cada hora durante las primeras 6 horas de crecimiento, posteriormente se realizó el muestreo cada 2 horas hasta las 12 horas de crecimiento, finalmente se tomó la última muestra a las 24 horas (se realizó por duplicado).

El crecimiento bacteriano se determinó leyendo la absorbancia de las muestras a 600 nm, para después centrifugarlas a 6000 rpm durante 5 minutos.

Del sobrenadante se tomó una alícuota de 0.8 ml para determinar la actividad de lacasa (sin purificar) como se describe en el ensayo de pérdida de peso (Sec. 7.4.5.3).

7.5.2 Evaluación de la estabilidad de la lacasa

Se evaluó la estabilidad de la lacasa en presencia de un trozo de PS expandido para lo cual se realizó lo siguiente:

- Se cortaron trozos de un vaso de PS de 0.5 X 10 cm los cuales fueron desinfectados en etanol al 70% durante 30 minutos y secados en una estufa a 60 °C durante 12 horas.
- Una vez transcurrido el tiempo de secado las muestras se colocaron en un desecador por 15 minutos y se pesaron en una balanza analítica. Las muestras se volvieron a introducir a la estufa a 60 °C por 1 hora, esto para verificar el peso constante.
- El cultivo bacteriano que se obtuvo en la evaluación del efecto del cobre en el crecimiento y la producción de lacasa (Sec. 7.5.1) se centrifugó a 6000 rpm a 4 °C durante 15 minutos, separando el sobrenadante del pellet celular.



- El sobrenadante se filtró con una membrana de nylon de 0.2 μm (filtros Titan2, Thermo Scientific) y se colocaron 10 ml del sobrenadante filtrado en tubos de ensayo que contienen una tira de PS expandido.
- Para comparar la lacasa de las bacterias estudiadas con la lacasa purificada de *T. versicolor* se pesó 1.0 mg de lacasa en una balanza analítica y se le adicionó 1 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM (pH 5.0), determinando su actividad como se describe en la sección 7.3.1.
- Una vez determinada la actividad de lacasa de *T. versicolor* se realizó la dilución necesaria utilizando la solución amortiguadora de acetato de sodio 10 mM (pH 5.0) para igualar las unidades enzimáticas de la lacasa de las bacterias estudiadas (sec. 7.5.1). Una vez con la concentración adecuada se adicionaron 10 ml de la solución a tubos de ensayo de 10 ml que contienen la tira de PS expandido.
- Los tubos con las muestras de PS y las soluciones enzimáticas se colocaron en una incubadora a 35 °C y 200 rpm, tomando alícuotas de 0.8 ml cada 24 horas durante 5 días.
- La actividad de lacasa se determinó como se describe en el ensayo de pérdida de peso (Sec. 7.4.5.3).

7.5.3 Efecto del cobre en la prueba de pérdida de peso

Este ensayo consistió en adicionar 100 ml de medio sintético a un matraz de 125 ml y se le colocó un tapón de algodón con gasa. Se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos.

Una vez estéril el medio de cultivo, en una campana de flujo laminar se inoculó con 5 ml del cultivo bacteriano (concentración 7X; secc. 7.4.3) y se le adicionó 100 μl de CuSO_4 50 mM estéril (121 °C por 15 minutos), esto para obtener una concentración final de 50 μM de CuSO_4 en el medio, las muestras de poliestireno (PS) previamente desinfectada (sec. 7.4.1) se adicionaron a los matraces con el medio utilizando guantes estériles.

Este ensayo se realizó por duplicado para cada bacteria y tipo de PS, con un control negativo por cada muestra de PS, los cuales se colocaron en una incubadora con agitación orbital a 35 °C y 200 rpm. El ensayo se realizó por un periodo de 30 días tomando dos muestras de 1 ml del medio de cada reactor cada 5 días para realizar la determinación de la producción de lacasa.

7.5.4 Análisis estadístico

Se realizaron las comparaciones de las medias de todos los resultados obtenidos de los ensayos de la pérdida de peso para las dos muestras de PS y las determinaciones de la actividad de lacasa por medio de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de significancia del 95%. Con el programa Minitab 17.

8 RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

8.1.1 Morfología colonial y microscópica de las bacterias

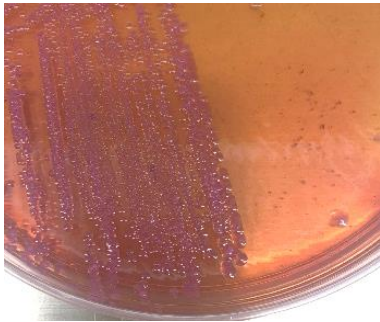

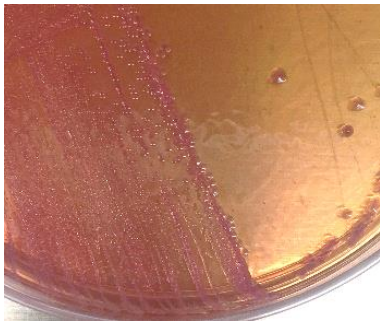
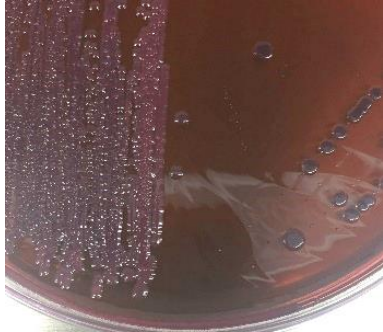

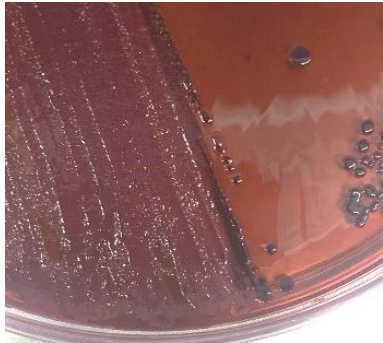
Se realizó el cultivo de las bacterias de acuerdo con las condiciones reportadas por González-Martínez (2015). En el cuadro 14 se describe la morfología colonial de las bacterias las cuales concuerdan con la descripción de las enterobacterias en el manual de Bergey (Grimont y Grimont, 2015). Aquí se reportan colonias de color crema (amarillo pálido) a amarillas y de un tamaño de entre 2 y 3 mm con superficie lisa y pudiendo tener una elevación convexa. En la morfología microscópica se describen cocos o bacilos Gram negativos, observando que entre las bacterias C1 y C4 no existe ninguna diferencia en cambio la bacteria C2 presenta diferencias en la forma y elevación con las otras dos bacterias.

En el cuadro 15 se presentan los resultados obtenidos en los medios diferenciales, observando que las bacterias C1 y C2 no mostraron diferencias en ambos medios (MacConkey y EMB), presentando colonias con coloración violeta en el medio de MacConkey y un morado oscuro en el EMB, lo cual es similar a lo descrito en el manual de Bergey donde una coloración violeta-morado indica que las bacterias fermentan la lactosa una característica de las enterobacterias, en el caso para la bacteria C4 en el medio de MacConkey se observa que las colonias comenzaron a perder la coloración violeta, sin embargo, en el medio EMB se presentó la coloración morada. Con estos resultados se puede decir que las bacterias aisladas pueden pertenecer a la familia de las *Enterobacteriaceae*.

Cuadro 14. Descripción de la morfología colonial y microscópica de las bacterias aisladas.

Cepa aislada	Textura	Color	Forma	Elevación	Tinción	Forma
C1	cremosa	amarilla	circular	convexa	Gram (-)	cocos
C2	cremosa	amarilla	irregular	Plana	Gram (-)	cocos
C4	cremosa	amarilla	circular	convexa	Gram (-)	cocos

Cuadro 15. Morfología colonia en los medios de cultivo diferenciales de las bacterias seleccionadas para los ensayos de biodegradación.

Cepa	Medio MacConkey	Medio EMB
<p>Bacteria C1</p>		
<p>Bacteria C2</p>		
<p>Bacteria C4</p>		

8.1.2 Identificación por biología molecular

Las secuencias de las tres bacterias aisladas (Anexo 11.2) obtenidas en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa fueron editadas con los programas Chromas 2.5.1 y BioEdit.

En el cuadro 16 se muestran las bacterias identificadas al comparar las secuencias obtenidas del ADNr con la herramienta BLAST de la base de datos de nucleótidos del NCBI. Encontrando la mayor identidad con la familia de las *Enterobacteriaceae* y en específico con un 96% de identidad con *Enterobacter sp.* para la cepa C1, 97% con *Enterobacter sp.* para las cepas C2 y C4. Con lo que se puede concluir que las bacterias aisladas pertenecen al género *Enterobacter* sin poder asegurar especie ya que no se obtuvo mínimo el 99% de identidad en ninguna cepa.

Debido a que uno de los objetivos de esta investigación fue determinar la producción de lacasa por las bacterias aisladas, el género bacteriano identificado puede tener la capacidad de producir lacasa al compararlo con lo reportado por Devasia y Jayakumaran (2017), quienes estudiaron la producción de lacasa por *Enterobacter cloacae* KSB₄ y también con lo reportado por Mukherjee y Das (2014), quienes aislaron de aguas residuales contaminadas con colorantes la bacteria *Enterobacter asburiae* XJUH-4TM con capacidad de producir lacasa.

Cuadro 16. Identificación de las bacterias por la secuenciación del ADNr

Cepa aislada	Longitud de secuencia (pb)	Bacteria identificada	Identidad (%)	Código de identificación asignado
C1	1321	<i>Enterobacter sp.</i>	96	<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C1
C2	1350	<i>Enterobacter sp.</i>	97	<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C2
C4	1254	<i>Enterobacter sp.</i>	97	<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C4

8.1.2.1 Comparación filogenética de las bacterias

Se realizó la reconstrucción filogenética (Figura 12) con las secuencias de las bacterias identificadas en este estudio y las secuencias de las bacterias reportadas por como productoras de lacasa (Mongkoltharuk y colaboradores (2012); Sheikhi y colaboradores (2012); Mukherjee y Das (2014)) y con la bacteria *R. ruber* C208 reportada por Santo y colaboradores (2013) con la capacidad de biodegradador de polietileno asociada a la lacasa. Observando que en el primer clado del árbol filogenético separa las bacterias Gram positivas

de las negativas. En el primer clado de las bacterias Gram negativas con una certeza del 84% se determina que las tres bacterias empleadas en esta investigación están dentro de la familia de las *Enterobacteriaceae*, con un 66% de certeza se encuentran dentro del género *Enterobacter*. Con estos resultados se observa que las enterobacterias utilizadas en esta investigación pueden estar relacionadas con *Enterobacter asburiae* XJUHX-4TM reportada como productora de lacasa (Mukherjee y Das, 2014).

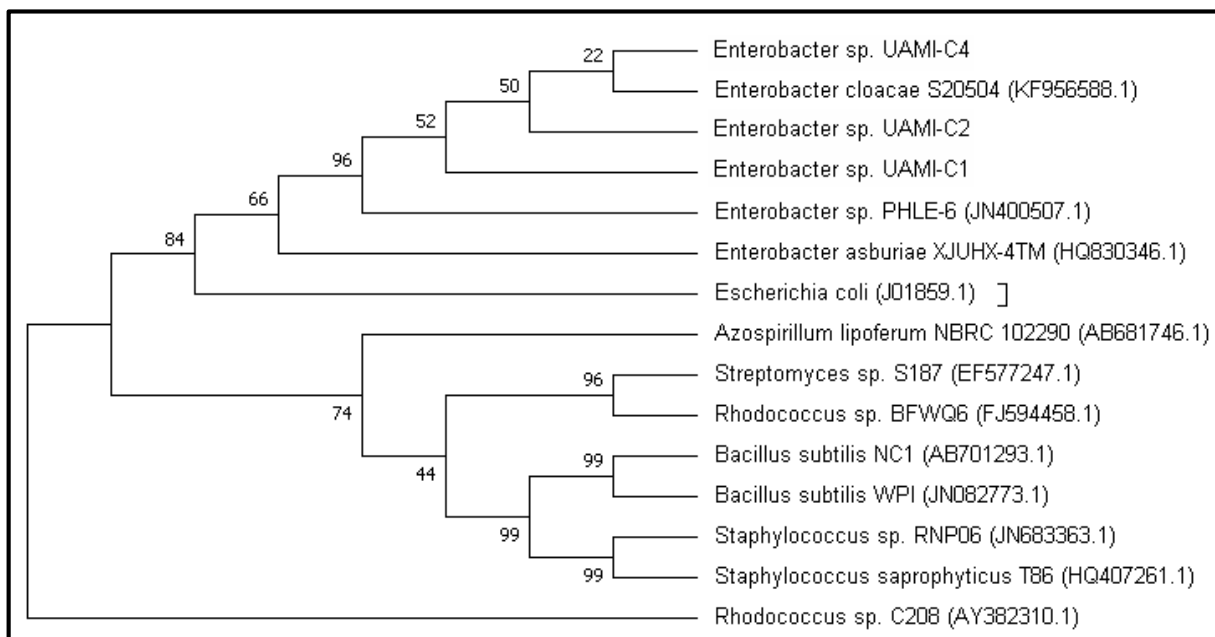


Figura 12. Reconstrucción filogenética de bacterias productoras de lacasa y las bacterias aisladas.

8.1.3 Identificación por espectrometría de masas

El MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Alemania) identifica microorganismos usando MALDI-TOF/MS para obtener una huella molecular única de cada organismo midiendo las proteínas más abundantes. Los patrones característicos de estas proteínas se utilizan para determinar, de forma fiable y precisa, la identidad de un microorganismo hasta el nivel de especie.

En el cuadro 17 se presentan los resultados obtenidos en el Laboratorio Divisional de Espectrofotometría de Masas de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Se encontró que el género de las bacterias de estudio es *Enterobacter* debido a que el puntaje obtenido es menor a 2.299. Confirmando los resultados obtenidos en la identificación por morfología y biología molecular que las bacterias aisladas pertenecen a la familia de las *Enterobacteriaceae* y al género de *Enterobacter*. Esta técnica ha sido validada por diversos autores como satisfactoria y comparada con resultados obtenidos con la técnica de biología molecular determinándola



como una prueba rápida, precisa y económica (Sogawa y col., 2011, Braga y col., 2013, Kern y col., 2013).

Cuadro 17. Identificación de las bacterias por MALDI-TOF/MS

Cepa aislada	Bacteria identificada	Puntaje
C1	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.00
C2	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.00
C4	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.11

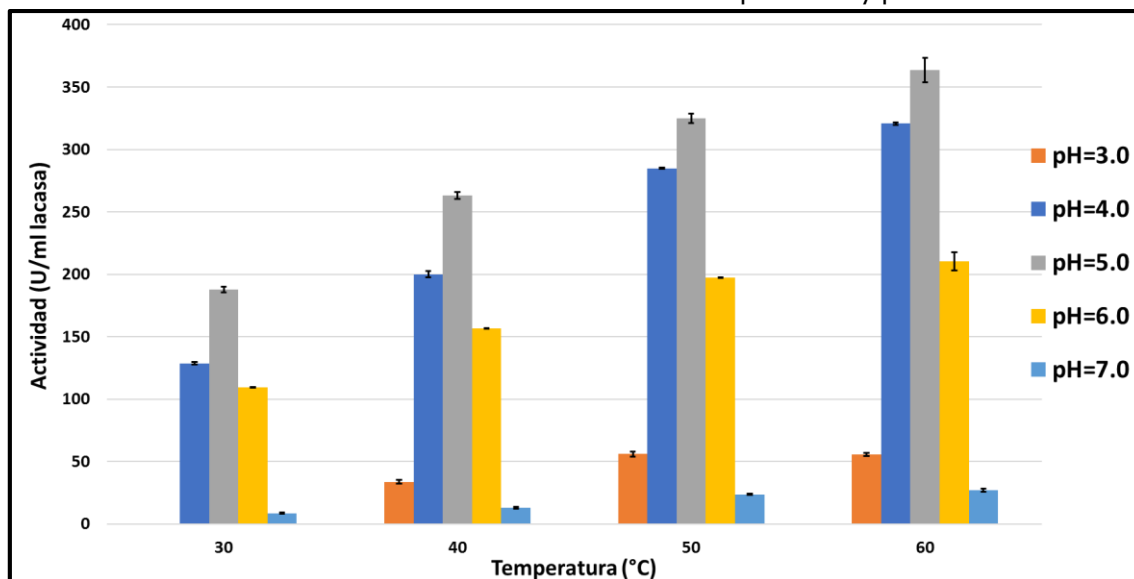
8.2 ACTIVIDAD DE LACASA DE *TRAMATES VERSICOLOR*

Se realizaron varios ensayos para determinar el efecto que tiene el pH y la temperatura en la actividad de la lacasa de *T. versicolor*, empleando guayacol (2-metoxifenol) un sustrato de naturaleza fenólica. Se llevaron a cabo las reacciones enzimáticas variando la temperatura en el intervalo de 30 a 60 °C y el pH de 3.0 a 7.0.

Los resultados obtenidos se presentan en el gráfico 1, y como se puede observar hay un perfil en forma de campana para cada una de las temperaturas estudiadas con respecto a la variación del pH, esto coincide con lo reportado por Blánquez Moya (2015). La mayor actividad enzimática se presentó a pH de 5.0 independientemente de la temperatura y estos resultados son similares a los reportados por Madhavi y Lele (2009), donde obtuvieron un pH óptimo de 4.6 para lacasa de *T. versicolor*.

También se observó un incremento en la actividad enzimática con respecto a la temperatura siendo la máxima actividad a 60 °C y un pH de 5.0, los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Daassi y colaboradores (2013), para lacasa de *Trametes sp.* con valores de temperatura y pH óptimo de 60 °C y 4.0 respectivamente.

Gráfico 1. Actividad de lacasa de *T. versicolor* a diferentes temperaturas y pH.



8.3 ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN

Se realizaron los ensayos de biodegradación por las pruebas de Sturm y pérdida de peso con las bacterias aisladas de una muestra de PS expandido recolectada del basurero del municipio de Chimalhuacán, Edo. de México, que previamente se habían reportado como potencialmente degradadoras de este polímero (González-Martínez, 2015) y que fueron identificadas y nombradas como *Enterobacter sp.* UAMI-C1, *Enterobacter sp.* UAMI-C2 y *Enterobacter sp.* UAMI-C4.

8.3.1 Prueba de Sturm

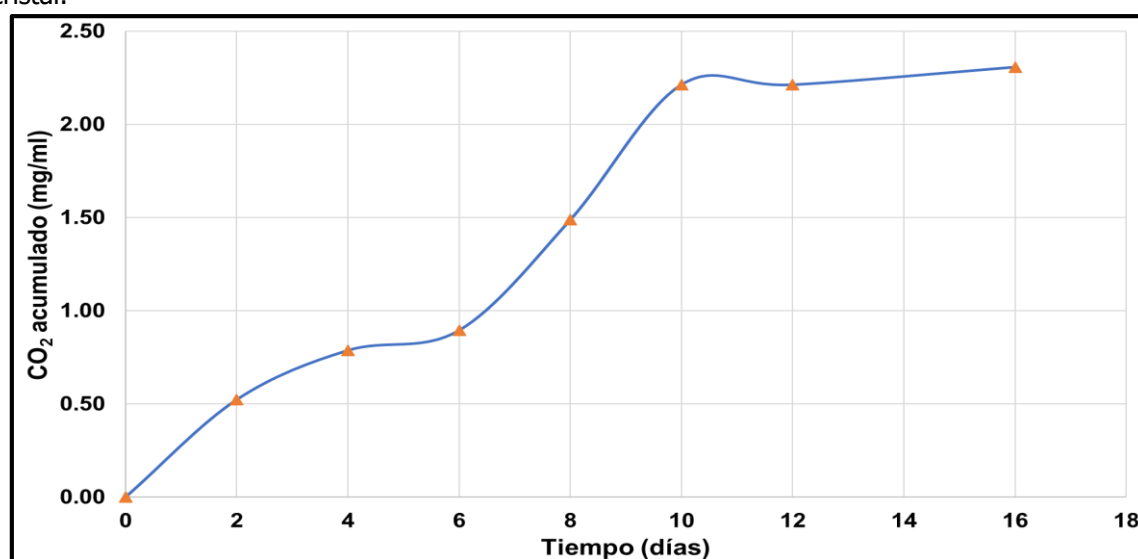
La prueba de Sturm está diseñada para estudiar la degradación de sustratos y es de las más utilizadas a nivel de laboratorio, ya que es un método que permite monitorear y cuantificar la producción de CO₂ que los microorganismos forman al oxidar el carbono del sustrato a biodegradar, en nuestro caso el poliestireno (PS), por lo que se implementó el sistema en el laboratorio para estudiar la biodegradación del PS.

Los resultados que se presentan en el gráfico 2, son los obtenidos en el ensayo de biodegradación de PS cristal con *Enterobacter sp.* UAMI-C1, donde se observó que durante los primeros 10 días del ensayo la producción de CO₂ aumenta, y a partir de este día ya no se observó un aumento de la producción de CO₂.

La concentración final de CO₂ fue de 2.31 mg/ml y se estimó una biodegradación del 0.062%. A pesar de que la biodegradación del PS fue baja, estos datos resultan interesantes dado que esta prueba no ha sido reportada previamente con este polímero sintético. Pramila y colaboradores (2012), reportaron la biodegradación del polietileno de baja densidad

(LDPE) con la bacteria *Acinetobacter baumannii*, empleando la prueba de Sturm y dando un pretratamiento con xileno al polímero para disolverlo y transformarlo en polvo antes de realizar el ensayo, obteniendo una producción de CO₂ de 1.06 mg/ml a los 2 días. Por otra parte, González-Martínez (2015), reportó la biodegradación de PS cristal con las bacterias aisladas mediante la prueba de Sturm. Realizando una pulverización del PS cristal previo al ensayo, obteniendo una biodegradación con la bacteria C1 (utilizada en esta investigación) del 0.83% a los 4 días. Ambos resultados son mayores a los obtenidos en este trabajo, sin embargo, es importante mencionar que en nuestro caso no se dio ningún pretratamiento al PS por lo que podemos decir que la biodegradación se puede mejorar si se da algún pretratamiento al PS con irradiación de luz UV.

Gráfico 2. Cinética de CO₂ producido por *Enterobacter sp.* UAMI-C1 en la biodegradación de PS cristal.



A pesar de que la bacteria *Enterobacter sp.* UAMI-C1 tiene la capacidad de biodegradar el PS cristal, debido a que la producción de CO₂ ya no aumentó después del día 10 del ensayo a comparación de los días anteriores, se decidió no realizar este ensayo para las demás bacterias.

8.3.2 Pérdida de peso

La prueba de pérdida de peso es un método para cuantificar de manera directa la biodegradación de los polímeros, mediante la determinación en la disminución del peso gravimétrico de la muestra, en nuestro caso PS. Siendo también una prueba sencilla de montar y la cual permite realizar de manera simultánea varios ensayos con diferentes muestras. Por lo que se realizó el montaje de la prueba con *Enterobacter sp.* UAMI-C1, *Enterobacter sp.* UAMI-C2 y *Enterobacter sp.* UAMI-C4 con los dos tipos de PS (cristal y expandido).

En el cuadro 18 se presentan los resultados obtenidos a los 30 días en las pruebas de pérdida de peso de PS cristal y expandido con las tres bacterias. Donde se observa que independientemente del tipo de PS las bacterias *Enterobacter sp.* UAMI-C1 y *Enterobacter sp.* UAMI-C4 no presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre ellas, mientras que ambas presentaron diferencias con *Enterobacter sp.* UAMI-C2, obteniendo la mayor pérdida de peso del 0.42% para el PS cristal y de 0.40% para el PS expandido con *Enterobacter sp.* UAMI-C4 a los 30 días de la prueba. Estos resultados son similares a los reportados por Mor y Sivan (2008), donde obtuvieron una pérdida de peso del PS cristal del 0.5% en 4 semanas del ensayo de biodegradación con la bacteria *Rhodococcus ruber* C208. Por otra parte, Gilan y colaboradores (2004), reportaron una disminución del 8% del peso de polietileno de baja densidad (LDPE) a los 30 días de la prueba con *R. ruber* C208 a 30 °C y 150 rpm, cabe destacar, que realizaron un pretratamiento irradiando con luz UV durante 60 horas al LDPE el cual acelera el proceso de degradación del polímero. Es importante mencionar que a las muestras de PS utilizados en esta investigación, no se le realizó ningún pretratamiento ya que al aplicar cualquiera de los reportados, no se podría garantizar que las bacterias fueron las que realizaron el proceso de biodegradación. Destacando que éste es de los primeros reportes en la biodegradación de PS expandido con bacterias.

Cuadro 18. Pérdida de peso de los dos tipos de PS por las tres bacterias a los 30 días.

Cepa	Pérdida peso (%)	
	PS cristal	PS expandido
Control	0	0
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C1	0.39 ± 0.017 ^{a, A}	0.39 ± 0.031 ^{a, A}
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C2	0.29 ± 0.014 ^{b, A}	0.18 ± 0.008 ^{b, B}
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C4	0.42 ± 0.012 ^{a, A}	0.40 ± 0.013 ^{a, A}

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05)

Letra minúscula comparación de columnas; letra mayúscula comparación de filas.

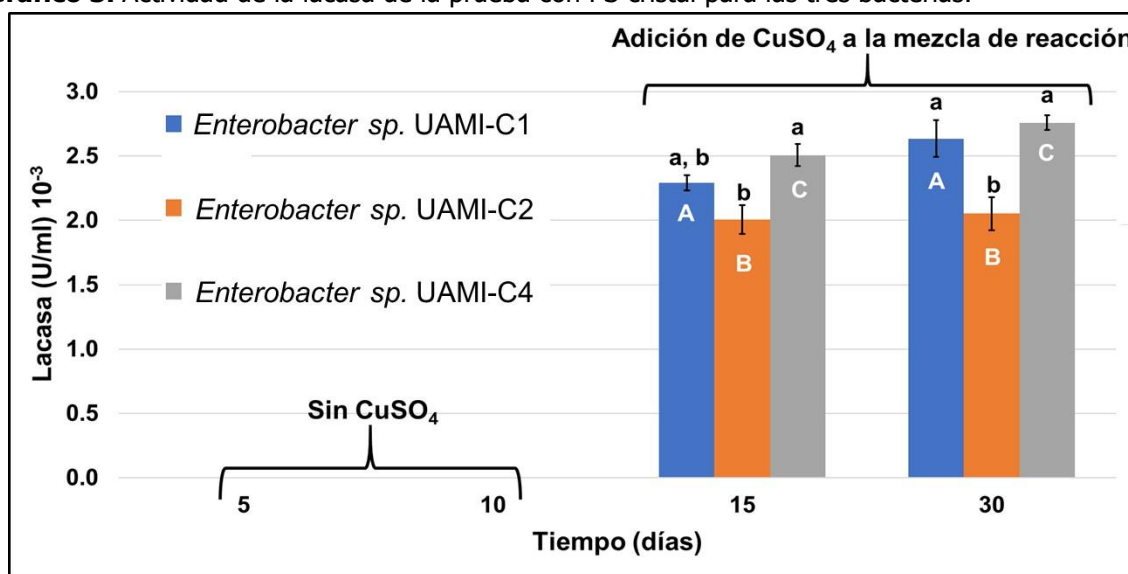
8.3.2.1 Determinación de la actividad de lacasa

La determinación de la actividad enzimática en los ensayos de biodegradación es muy importante, debido a que la oxidación de los polímeros sintéticos mediante las enzimas es un paso determinante en su biodegradación. Por lo anterior, se realizó la determinación de la actividad de la lacasa durante la prueba de pérdida de peso de los dos tipos de PS (cristal y expandido), ya que es una de las enzimas reportada que participa en la biodegradación del polietileno (Iiyoshi y col., 1998; Fujisawa y col, 2002; Santo y col., 2013), sin haber reportes previos con el PS.

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad de la lacasa para los dos tipos de PS y las tres bacterias se presentan en los gráficos 3 y 4, donde se observa

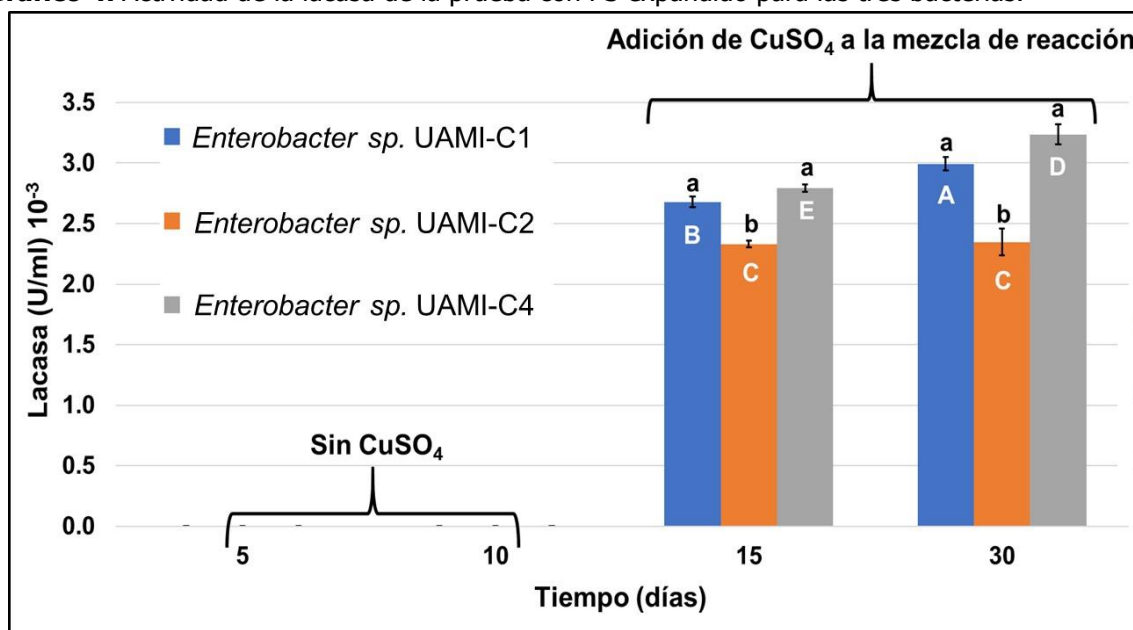
que en los días 5 y 10 no se obtuvo actividad de la lacasa. Santo y colaboradores (2013), reportaron que el cobre está asociado en la activación de la lacasa producida por *R. ruber* C208. Para la determinación de la actividad de lacasa de los días 15 y 30, se realizó con la adición de CuSO_4 en la mezcla de la reacción enzimática, y como se puede observar la mayor actividad de la lacasa se obtuvo con las bacterias *Enterobacter sp.* UAMI-C1 y *Enterobacter sp.* UAMI-C4 sin presentar diferencias significativas ($\alpha=0.05$) al día 30 para los dos tipos de PS. Estos resultados coinciden con los obtenidos de la mayor pérdida de peso con *Enterobacter sp.* UAMI-C1 y *Enterobacter sp.* UAMI-C4 (sec. 8.3.2) como se puede ver en los cuadros 19 y 20. Por lo cual, la biodegradación del PS por las bacterias está directamente asociada a la actividad de la lacasa. Cabe destacar que hasta el momento no hay reportes previos de la determinación de la actividad enzimática durante los ensayos de biodegradación del PS.

Gráfico 3. Actividad de la lacasa de la prueba con PS cristal para las tres bacterias.



Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05). Letra minúscula comparación de las bacterias los días 15 y 30 respectivamente; letra mayúscula comparación individual de las bacterias entre los días 15 y 30.

Gráfico 4. Actividad de la lacasa de la prueba con PS expandido para las tres bacterias.



Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05). Letra minúscula comparación de las bacterias los días 15 y 30 respectivamente; letra mayúscula comparación individual de las bacterias entre los días 15 y 30.

Cuadro 19. Pérdida de peso de la prueba con PS cristal y la actividad de la lacasa para cada bacteria a los 30 días.

Cepa	Pérdida de peso (%)	Lacasa X 10^{-3} (U/ml)
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C1	0.39 ± 0.017 ^a	2.635 ± 0.143 ^a
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C2	0.29 ± 0.014 ^b	2.052 ± 0.129 ^b
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C4	0.42 ± 0.012 ^a	2.760 ± 0.058 ^a

Las medias por columna que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

Cuadro 20. Pérdida de peso de la prueba con PS expandido y la actividad de la lacasa para cada bacteria a los 30 días.

Cepa	Pérdida de peso (%)	Lacasa X 10^{-3} (U/ml)
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C1	0.39 ± 0.031 ^a	2.994 ± 0.055 ^a
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C2	0.18 ± 0.008 ^b	2.348 ± 0.108 ^b
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C4	0.40 ± 0.013 ^a	3.236 ± 0.082 ^a

Las medias por columna que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

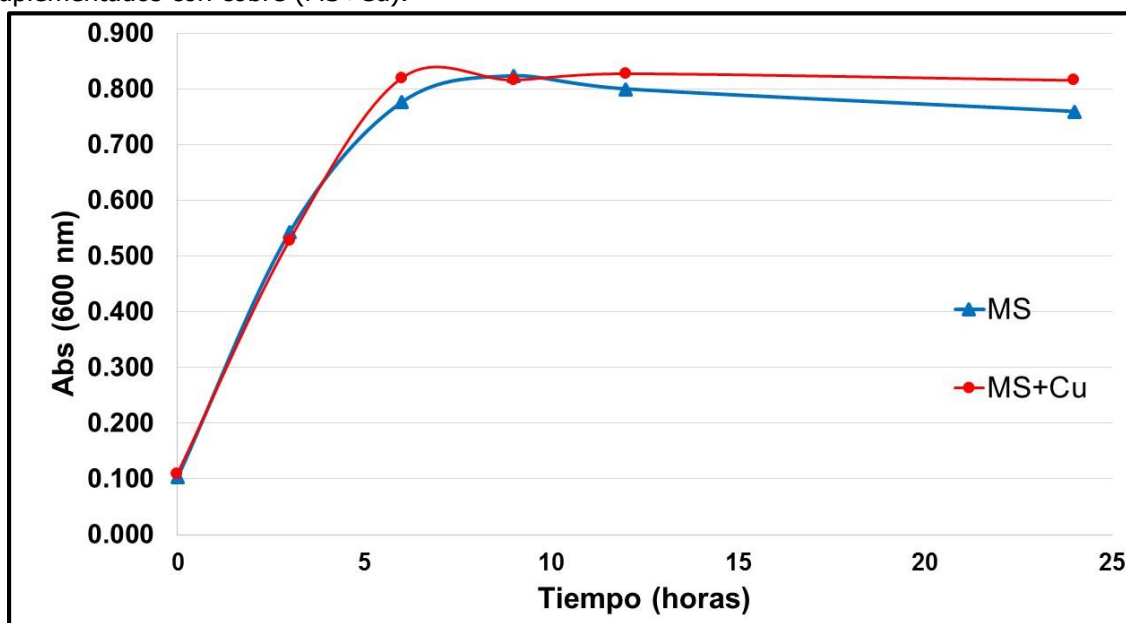
8.4 EFECTO DEL COBRE EN EL CRECIMIENTO MICROBIANO Y LA PRODUCCIÓN DE LACASA

De los resultados anteriores donde se observó que la lacasa participa en la biodegradación del PS y que el cobre influye en la activación de la lacasa. Se realizó el estudio del efecto del cobre en el crecimiento de las bacterias y en la producción de la lacasa, utilizando medio sintético suplementado con glucosa y sulfato de cobre (CuSO_4).

8.4.1 Efecto del cobre en el crecimiento bacteriano

Se realizaron dos ensayos de crecimiento de la bacteria *Enterobacter sp.* UAMI-C1 en medio sintético suplementado con glucosa y a uno de los ensayos se le adicionó $50 \mu\text{M}$ de CuSO_4 . Como se puede observar en el gráfico 5 el cobre no inhibió el crecimiento de la bacteria, siendo similar a lo reportado por Santo y colaboradores (2013) quienes reportaron que no hubo diferencia en el crecimiento de *R. ruber* C208 cuando se adicionó CuSO_4 en el medio. Por lo cual se decidió realizar las cinéticas de crecimiento de todas las bacterias y evaluar la producción de lacasa.

Gráfico 5. Cinética de crecimiento de *Enterobacter sp.* UAMI-C1 en medio sintético (MS) y MS suplementados con cobre (MS+Cu).



8.4.2 Cinéticas de crecimiento de las bacterias y su producción de lacasa

En los gráficos 6, 7 y 8 se presentan los resultados obtenidos de las cinéticas de crecimiento de las bacterias y su producción de la lacasa. Como se puede observar la producción de la lacasa está asociada al crecimiento.

Se obtuvo la mayor producción de lacasa con *Enterobacter sp.* UAMI-C4 con el 16.11×10^{-3} U/ml, seguida de *Enterobacter sp.* UAMI-C1 con un 13.48×10^{-3} U/ml y *Enterobacter sp.* UAMI-C2 con un 10.64×10^{-3} U/ml, cabe mencionar que la determinación de la actividad de lacasa se realizó en los extractos crudos (lacasa sin purificar). La asociación de la producción de lacasa con el crecimiento bacteria es similar a lo reportado por Santo y colaboradores (2013), donde adicionaron CuSO_4 al medio de cultivo de la bacteria *R. ruber* C208 por 6 días a 30°C y 150 rpm, reportando que la producción de la lacasa va aumentando durante el transcurso del ensayo.

Gráfico 6. Cinética de crecimiento de *Enterobacter sp.* UAMI-C1 y producción de lacasa.

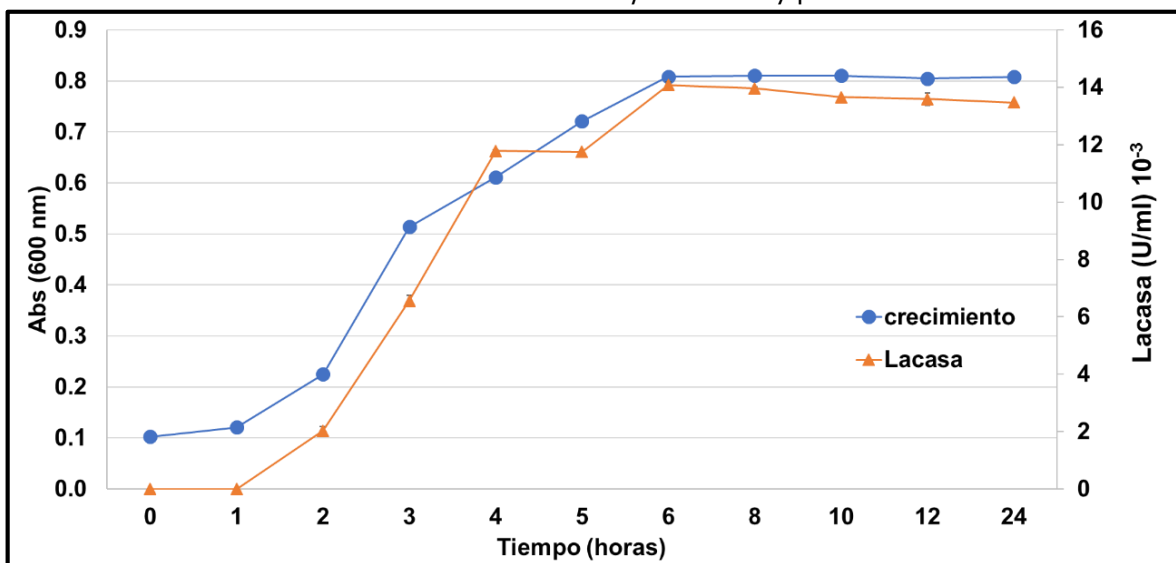


Gráfico 7. Cinética de crecimiento de *Enterobacter sp.* UAMI-C2 y producción de lacasa.

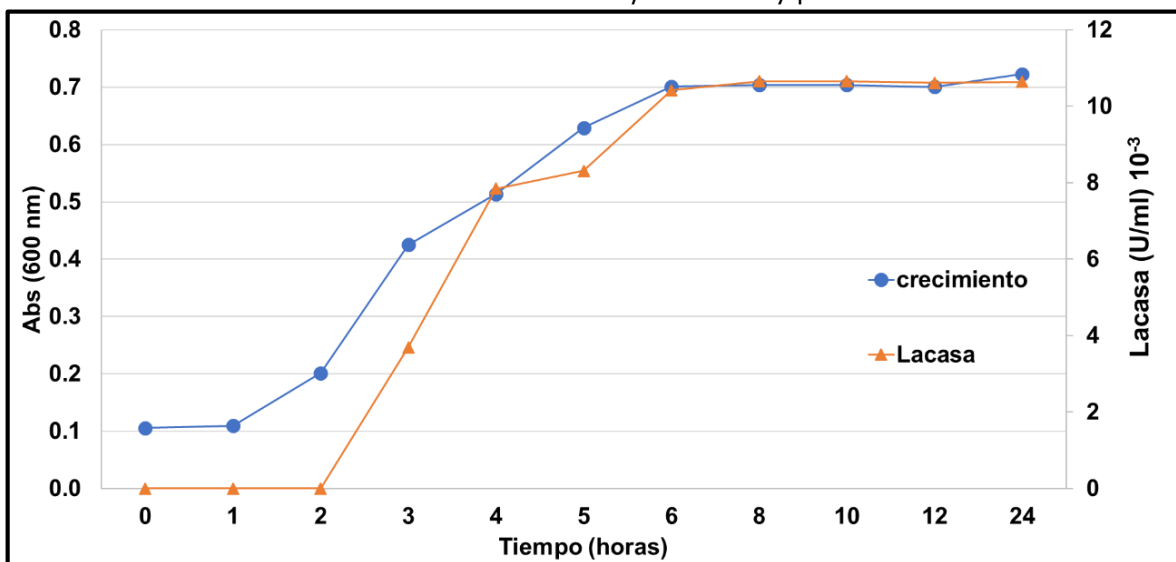
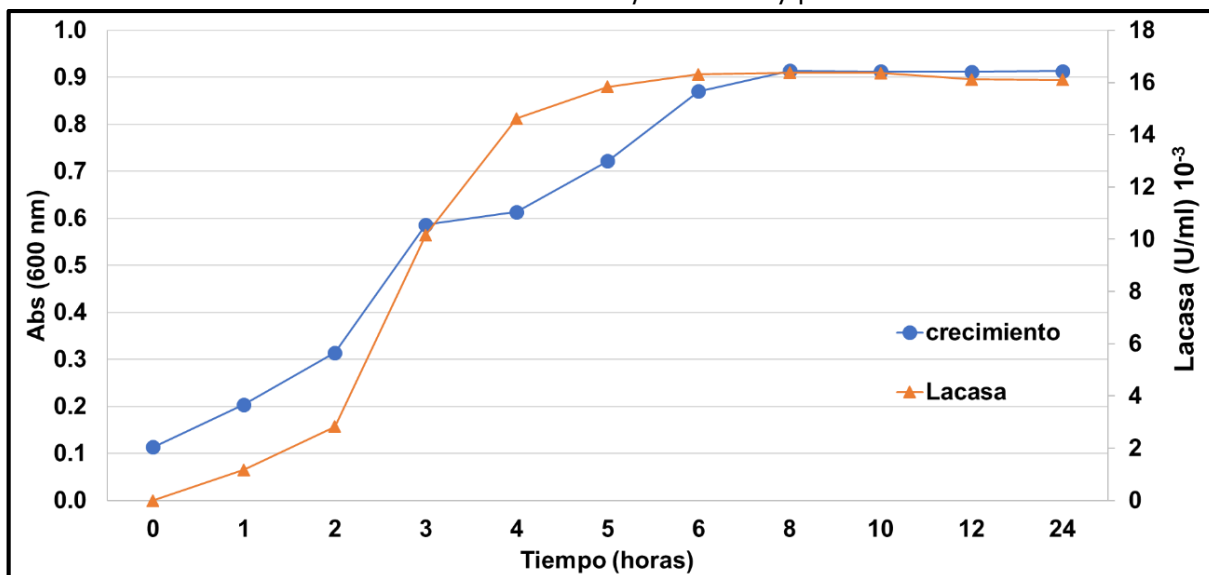


Gráfico 8. Cinética de crecimiento de *Enterobacter sp.* UAMI-C4 y producción de lacasa.

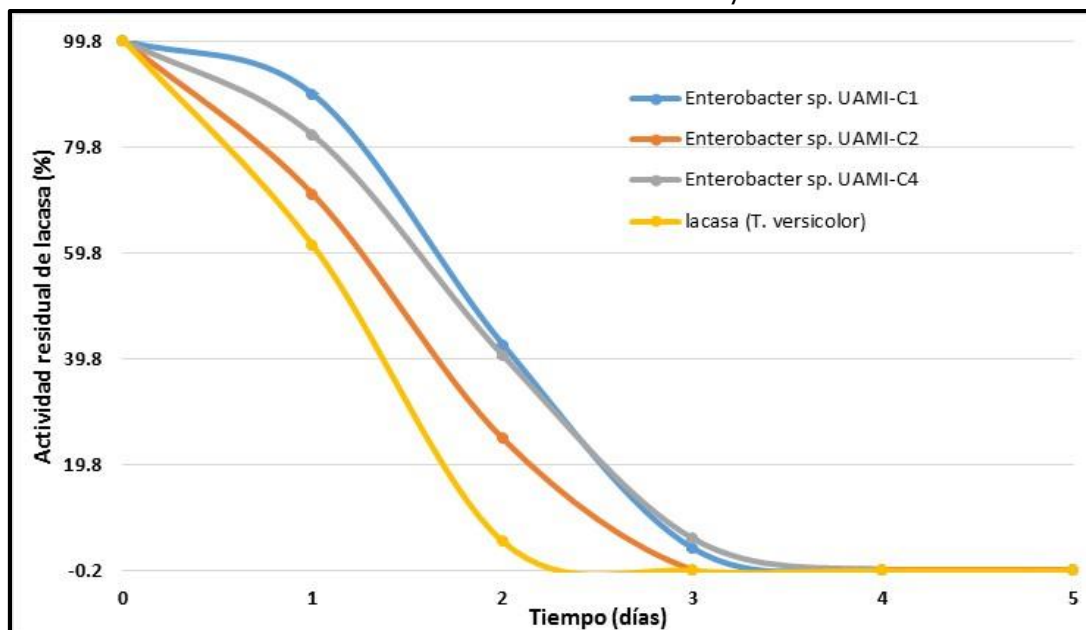


8.4.3 Estabilidad de la lacasa

Se evaluó la estabilidad de la lacasa (sin purificar) obtenida de las bacterias, en una solución de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0) y se comparó con lacasa de *T. versicolor* preparada en una solución de acetato de sodio 10 mM (pH 5.0) en presencia de PS expandido a 35 °C y 200 rpm.

En el gráfico 9 se presentan los resultados obtenidos al evaluar la estabilidad de la lacasa de las bacterias y lacasa de *T. versicolor*, donde se observa que después del día 2 del ensayo, las actividades de las lacasas disminuyeron por debajo del 50% de la actividad inicial. Las lacasas producidas por las bacterias *Enterobacter sp.* UAMI-C1 y *Enterobacter sp.* UAMI-C4 son las que tienen la mayor estabilidad presentando un comportamiento similar en comparación de las lacasas de *Enterobacter sp.* UAMI-C2 y *T. versicolor*. Al analizar el primer día de la prueba, se observó que la mayor disminución fue del 30% para la lacasa de *Enterobacter sp.* UAMI-C1, siendo una mayor estabilidad comparada con lo reportado por Santo y colaboradores (2013), donde obtuvieron una disminución de la actividad de la lacasa de *R. ruber* C208 del 12% a los 120 minutos a 50 °C y un pH de 7.0. Para la lacasa de *T. versicolor* de igual manera se obtuvo una mejor estabilidad en comparación con lo reportado por Daassi y colaboradores, (2013) donde obtuvieron una disminución de la actividad de la lacasa producida por *Trametes sp.* en un 20% a los 210 minutos a 37 °C y un pH de 4.0. Es importante destacar que este estudio se realizó con la presencia de una tira de PS expandido, debido a que la mayoría de los productos que se elaboran con este tipo de PS son utilizados por un tiempo muy corto y son desechados lo cual genera la acumulación de sus residuos.

Gráfico 9. Actividad residual de la lacasa cruda de las bacterias y lacasa de *T. versicolor*.



8.4.4 Efecto de la adición de cobre sobre la biodegradación de PS

Con los resultados obtenidos de la sección 8.4.1 donde el cobre no inhibió el crecimiento de las bacterias y que éste influyó en la producción de la lacasa. Se realizó el estudio del efecto del cobre en la prueba de pérdida de peso, para los dos tipos de PS con las tres bacterias.

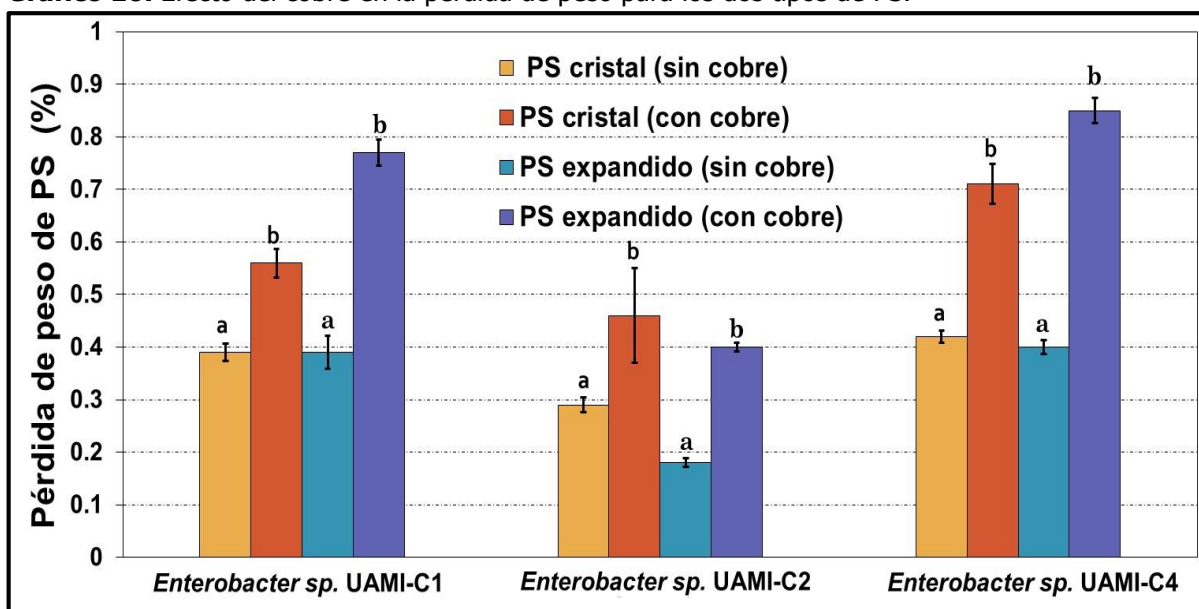
Los resultados obtenidos de la prueba de pérdida de peso a los 30 días para los dos tipos de PS al suplementarlas con sulfato de cobre (CuSO_4) se presentan en el cuadro 21. Donde se observa que la mayor disminución del peso para los dos tipos de PS se obtuvo con *Enterobacter sp.* UAMI-C4 y presentando diferencias significativas ($\alpha=0.05$) con las bacterias *Enterobacter sp.* UAMI-C1 y *Enterobacter sp.* UAMI-C2. En el gráfico 10 se presenta la comparación de los resultados de la pérdida de peso con la adición de cobre y sin adición de cobre (sección 8.4.2), observando que hubo mayor pérdida de peso con la presencia de cobre, obteniendo mejores resultados para los dos tipos de PS en comparación con lo reportado por Mor y Sivan (2008), con una pérdida de peso del 0.5% de PS cristal en 4 semanas con la bacteria *R. ruber* C208. Se debe resaltar que el mejor resultado se obtuvo con *Enterobacter sp.* UAMI-C4 con el PS expandido.

Cuadro 21. Pérdida de peso de los dos tipos de PS por las tres bacterias a los 30 días al suplementar el medio de cultivo con CuSO_4 .

Cepa	Pérdida peso (%)	
	PS cristal	PS expandido
Control	0	0
<i>Enterobacter sp. UAMI-C1</i>	$0.56 \pm 0.027^{b, B}$	$0.77 \pm 0.025^{b, A}$
<i>Enterobacter sp. UAMI-C2</i>	$0.46 \pm 0.090^{b, A}$	$0.40 \pm 0.008^{c, B}$
<i>Enterobacter sp. UAMI-C4</i>	$0.71 \pm 0.038^{a, B}$	$0.85 \pm 0.024^{a, A}$

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05)
 Letra minúscula comparación de columnas; letra mayúscula comparación de filas.

Gráfico 10. Efecto del cobre en la pérdida de peso para los dos tipos de PS.



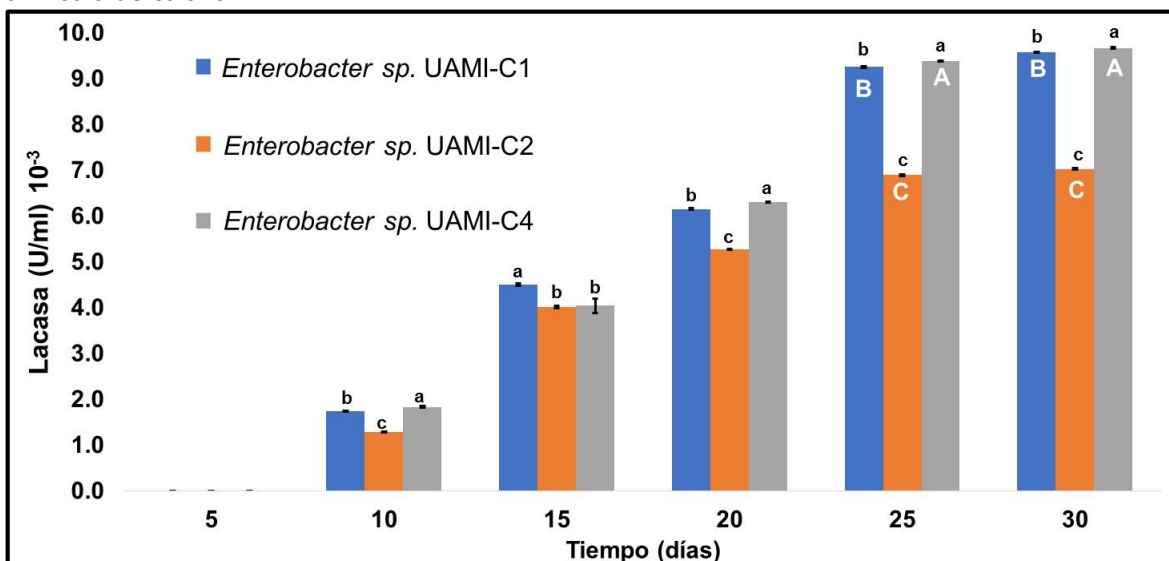
Las medias por cada enterobacteria que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05)

8.4.4.1 Determinación de la actividad de lacasa

Durante las pruebas de pérdida de peso para los dos tipos de PS con la adición de CuSO_4 (sec. 8.4.3) se tomaron muestras del medio cada 5 días y se cuantificó la producción de lacasa.

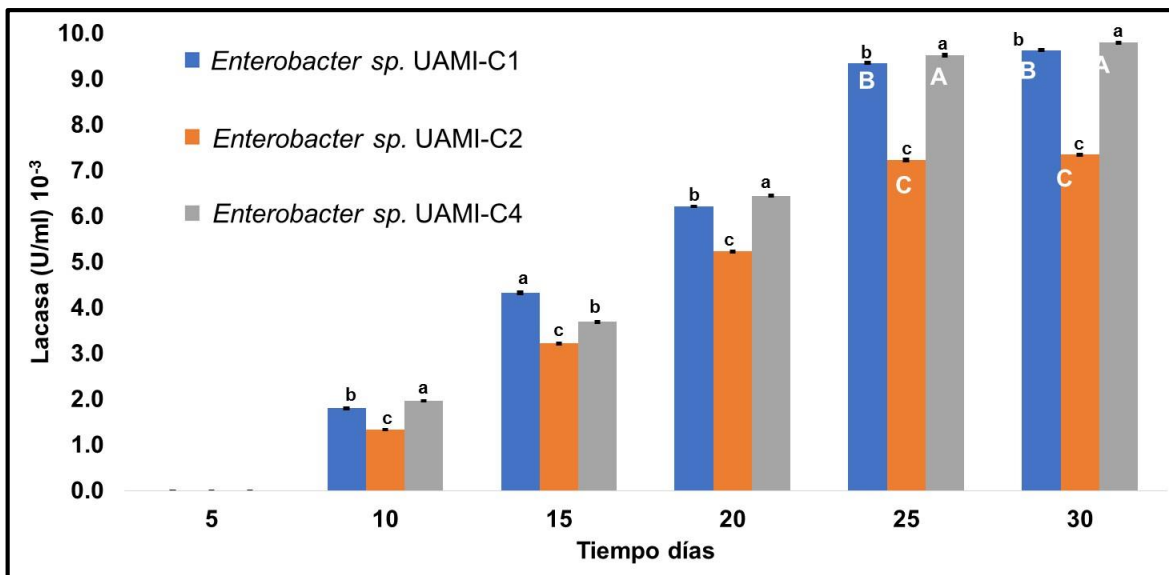
En los gráficos 11 y 12 se presentan los resultados y se observa un aumento en la producción de la lacasa hasta el día 25, a partir de este día se mantuvo constante. Estos resultados coinciden con aquellos obtenidos en la sección 8.4.1 donde se evaluó el efecto del cobre en la producción de la lacasa en un medio sintético. En las pruebas de pérdida de peso con cobre, se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) de la actividad de la lacasa entre las tres bacterias al día 30, a diferencia de los resultados obtenidos en la sección 8.3.2.1 donde no hubo diferencias significativas entre *Enterobacter sp.* UAMI-C1 y *Enterobacter sp.* UAMI-C4. Resultando en un aumento de la actividad de la lacasa en comparación con la obtenida en la sección 8.3.2.1, los cuales coinciden con lo reportado por Mouso y colaboradores (2003), donde observaron que al adicionar CuSO_4 al medio de crecimiento del hongo *Stereum hirsutum* la producción de lacasa aumentó. Con estos resultados podemos decir que la lacasa es fundamental en la biodegradación del PS, como se puede ver en los cuadros 22 y 23 la mayor pérdida de peso de *Enterobacter sp.* UAMI-C4 coincide con la mayor producción de la lacasa en los dos tipos de PS.

Gráfico 11. Actividad de la lacasa de las tres bacterias en el ensayo con PS cristal al adicionar CuSO_4 al medio de cultivo.



Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05). Letra minúscula comparación de las bacterias los días 15 y 30 respectivamente; letra mayúscula comparación de las bacterias entre los días 25 y 30.

Gráfico 12. Actividad de la lacasa de las tres bacterias en el ensayo con PS expandido al adicionar CuSO_4 al medio de cultivo.



Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (Tukey, 0.05). Letra minúscula comparación de las bacterias los días 15 y 30 respectivamente; letra mayúscula comparación de las bacterias entre los días 25 y 30.

Cuadro 22. Pérdida de peso de la prueba con la adición de CuSO_4 en el PS cristal y la actividad de la lacasa para cada bacteria a los 30 días.

Cepa	Pérdida de peso (%)	Lacasa X 10 ⁻³ (U/ml)
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C1	0.56 ± 0.027 ^b	9.580 ± 0.009 ^b
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C2	0.46 ± 0.090 ^b	7.033 ± 0.015 ^c
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C4	0.71 ± 0.038 ^a	9.673 ± 0.015 ^a

Las medias de las columnas que no comparten una letra* son significativamente diferentes (Tukey, 0.05)

Cuadro 23 Pérdida de peso de la prueba con la adición de CuSO_4 en el PS expandido y la actividad de la lacasa para cada bacteria a los 30 días.

Cepa	Pérdida de peso (%)	Lacasa X 10 ⁻³ (U/ml)
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C1	0.77 ± 0.025 ^b	9.640 ± 0.020 ^b
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C2	0.40 ± 0.008 ^c	7.349 ± 0.011 ^c
<i>Enterobacter sp.</i> UAMI-C4	0.85 ± 0.024 ^a	9.803 ± 0.015 ^a

Las medias de las columnas que no comparten una letra* son significativamente diferentes (Tukey, 0.05)

9 CONCLUSIONES

Se identificaron las bacterias empleadas en esta investigación mediante biología molecular y por el método MALDI-TOF/MS como *Enterobacter sp.* UAMI-C1, *Enterobacter sp.* UAMI-C2 y *Enterobacter sp.* UAMI-C4.

La mayor actividad obtenida con la lacasa de *Trametes versicolor* fue 363.5 U/ml lacasa a 60 °C y pH 5.0.

Se obtuvo 0.062% de biodegradación de PS cristal con *Enterobacter sp.* UAMI-C1 en la prueba de Sturm.

Las tres enterobacterias utilizadas en esta investigación mostraron la capacidad de biodegradar los dos tipos de PS. Encontrándose que no hubo diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en la biodegradación de PS entre *Enterobacter sp.* UAMI-C1 (0.39% para los dos tipos de PS) y *Enterobacter sp.* UAMI-C4 (0.42% para el PS cristal y de 0.40% para el PS expandido).

Cuando se adicionó cobre se obtuvo un incremento en la pérdida de peso para los dos tipos de PS con las tres enterobacterias. La mayor pérdida de peso fue 0.71% para el PS cristal y 0.85% para el PS expandido con *Enterobacter sp.* UAMI-C4.

Se comprobó que el cobre es un activador e inductor de la lacasa producida por las enterobacterias.

La producción de la lacasa está asociada al crecimiento de las enterobacterias estudiadas.

Por los resultados obtenidos, es posible una relación entre la producción de lacasa y la pérdida de peso de PS.



10 PERSPECTIVAS

Para continuar el estudio de la biodegradación del PS con las enterobacterias se podría realizar la evaluación de diferentes concentraciones de sulfato de cobre y aumentar el tiempo de los ensayos.

Estudiar la adición de compuestos que actúen como mediadores de lacasa en los ensayos de pérdida de peso, esto para potencializar la oxidación de sustratos no fenólicos.

Implementar nuevos métodos para evaluar la biodegradación con la observación por microscopía electrónica de barrido de la superficie del PS.

Estudiar la biodegradación en un biorreactor en columna empacada con el PS para evitar la acumulación de los productos inestables que se estén formando.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Andrady, A. 2007. "Biodegradability of Polymers." In *Physical Properties of Polymers Handbook*, edited by Mark J, 951–64. Springer.
- Atiq, N., S. Ahmed, M. Ishtiaq Ali, S. Andleeb, B. Ahmad, and G. Robson. 2010. "Isolation and Identification of Polystyrene Biodegrading Bacteria from Soil." *African Journal of Microbiology Research* 4 (14): 1537–41.
- Beltrán, M., and A. Marcilla. 2012. "Estructura Y Propiedades de Los Polímeros." In *Tecnología de Polímeros: Procesado Y Propiedades*, 17–60. Publicaciones de la Universidad de Alicante.
- Bhardwaj, H., R. Gupta, and A. Tiwari. 2013. "Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics." *Journal of Polymers and the Environment* 21 (2): 575–79. doi:10.1007/s10924-012-0456-z.
- Blánquez Moya, A. 2015. "Carcterización Y Función Biológica de La Lacasa Producida Por Steptomyces Ipomoea CECt 3341. Aprovechamiento de Su Potencial Oxidativo Para La Degradación de Contaminantes Ambientales." Universidad de Alcalá.
- Braga, P., A. Tata, V. Gonçalves dos Santos, J. Barreiro, N. Schwab, M. Veiga dos Santos, M. Eberlin, and C. Ferreira. 2013. "Bacterial Identification: From the Agar Plate to the Mass Spectrometer." *RSC Adv.* 3 (4): 994–1008. doi:10.1039/C2RA22063F.
- Daassi, D., H. Zouari-Mechichi, A. Prieto, M. Martínez, M. Nasri, and T. Mechichi. 2013. "Purification and Biochemical Characterization of a New Alkali-Stable Laccase from Trametes Sp. Isolated in Tunisia: Role of the Enzyme in Olive Mill Waste Water Treatment." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29 (11): 2145–55. doi:10.1007/s11274-013-1380-7.
- Dashtban, M., H. Schraft, T. Syed, and W. Qin. 2010. "Fungal Biodegradation and Enzymatic Modification of Lignin." *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1 (1): 36–50.
- Devasia, S., and N. Jayakumaran. 2017. "Demonstration of a Highly Thermotolerant Novel Laccase from Enterobacter Cloaceae, KSB 4." *International Journal of Sciences & Applied Research* 4 (1): 100–106.
- Eubeler, J., S. Zok, M. Bernhard, and T. Knepper. 2009. "Environmental Biodegradation of Synthetic Polymers I. Test Methodologies and Procedures." *Trends in Analytical Chemistry* 28 (9). Elsevier Ltd: 1057–72. doi:10.1016/j.trac.2009.06.007.
- Fernández Olmos, A., C. García de la Fuente, J. Saéz Nieto, and S. Valdezate Ramos. 2010. *Metodos de Identificacion Bacteriana En El Laboratorio de Microbiología. Procedimientos En Microbiología Clínica*. Vol. 37. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.012.
- Fred, W., and Jr. Billmeyer. 1975. "Otros Polímeros de Cadena Carbonada." In *Ciencia de Los Polímeros*, 409–10. Barcelona, España: Editorial Reverté.
- Fujisawa, M., H. Hirai, and T. Nishida. 2002. "Degradation of Polyethylene and Nylon-66 by the Laccase-Mediator System." *Journal of Polymers and the Environment* 9 (3): 103–8. doi:10.1023/A:1020472426516.



- Ghosh, S., S. Pal, and S. Ray. 2013. "Study of Microbes Having Potentiality for Biodegradation of Plastics." *Environmental Science and Pollution Research International* 20 (7): 4339–55. doi:10.1007/s11356-013-1706-x.
- Gilan, I., Y. Hadar, and A. Sivan. 2004. "Colonization, Biofilm Formation and Biodegradation of Polyethylene by a Strain of *Rhodococcus Ruber*." *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 97–104. doi:10.1007/s00253-004-1584-8.
- Gómez Dorado, C., M. Martínez Salgado, D. Nieto Mosquera, A. Pedrosa Rodríguez, R. Rodríguez Vázquez, and J. Rosas Acosta. 2005. "Estudio Del Efecto de Dos Inductores Y Un Protector Enzimático Sobre La Actividad de Las Enzimas Mn-Peroxidasa Y Lacasa Producida Por *Trametes Versicolor* Y Su Efecto En La Decoloración de Efluentes En La Industria Papelera." *Universitas Scientarium* 10 (2): 37–45.
- Góngora Pérez, J. 2014. "El Reciclaje En México." *Comercio Exterior* 64 (3): 4. http://revistas.bancomext.gob.mx/rce/magazines/757/2/reciclaje_mexico.pdf.
- González-Martínez, A. 2015. "Estudio de La Biodegradación in Vitro de Poliestireno Por Cepas Silvestres Aisladas de Un Tiradero." Tesis de Especialización, Universidad Autónoma Metropolitana.
- Grimont, P., and F. Grimont. 2015. "Enterobacter." In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–7. John Wiley & Sons, Inc.
- Hadad, D., S. Geresh, and A. Sivan. 2005. "Biodegradation of Polyethylene by the Thermophilic Bacterium *Brevibacillus Borstelensis*." *Journal of Applied Microbiology* 98 (5): 1093–1100. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x.
- Hu, X., C. Wang, L. Wang, R. Zhang, and H. Chen. 2014. "Influence of Temperature, pH and Metal Ions on Guaiacol Oxidation of Purified Laccase from *Leptographium Qinlingensis*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30 (4): 1285–90. doi:10.1007/s11274-013-1554-3.
- Iiyoshi, Y., Y. Tsutsumi, and T. Nishida. 1998. "Polyethylene Degradation by Lignin-Degrading Fungi and Manganese Peroxidase." *Journal of Wood Science* 44: 222–29. doi:10.1007/BF00521967.
- Jayasekara, R., I. Harding, I. Bowater, and G. Lonergan. 2005. "Biodegradability of a Selected Range of Polymers and Polymer Blends and Standard Methods for Assessment of Biodegradation." *Journal of Polymers and the Environment* 13 (3): 231–51. doi:10.1007/s10924-005-4758-2.
- Kern, C., J. Usbeck, R. Vogel, and J. Behr. 2013. "Optimization of Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-Of-Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial Contaminants in Beverages." *Journal of Microbiological Methods* 93 (3). Elsevier B.V.: 185–91. doi:10.1016/j.mimet.2013.03.012.
- Kunichika, N., S. Gyosuke, O. Toshihiko, and K. Shinichi. 1997. "Enzymatic Degradation of Polystyrene by Hydroquinone Peroxidase of *Azotobacter Beijerinckii* HM121." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84 (5): 480–82.



- Loera, O., C. Pérez, J. Barbosa, and F. Villaseñor. 2006. "Laccases." In *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, edited by R. Guevara-González and I. Torres-Pacheco, 323–40.
- Lucas, N., C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec, F. Silvestre, and J. Nava-Saucedo. 2008. "Polymer Biodegradation: Mechanisms and Estimation Techniques - A Review." *Chemosphere* 73 (4): 429–42. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.064.
- Madhavi, V., and S. Lele. 2009. "Laccase: Properties and Applications." *BioResources* 4 (4): 1694–1717. doi:10.15376/biores.4.4.1694-1717.
- Mayer, A., and R. Staples. 2002. "Laccase: New Functions for an Old Enzyme." *Phytochemistry* 60 (6): 551–65. doi:10.1016/S0031-9422(02)00171-1.
- Mohan, K., and T. Srivastava. 2010. "Microbial Deterioration and Degradation of Polymeric Materials." *Journal of Biochemical Technology* 2 (4): 210–15.
- Mongkolthananaruk, W., S. Tongbopit, and A. Bhoonobtong. 2012. "Independent Behavior of Bacterial Laccases to Inducers and Metal Ions during Production and Activity." *African Journal of Biotechnology* 11 (39): 9391–98. doi:10.5897/AJB11.3042.
- Mor, R., and A Sivan. 2008. "Biofilm Formation and Partial Biodegradation of Polystyrene by the Actinomycete *Rhodococcus Ruber*: Biodegradation of Polystyrene." *Biodegradation* 19 (6): 851–58. doi:10.1007/s10532-008-9188-0.
- Mouso, N., L. Papinutti, and F. Forchiassin. 2003. "Efecto Combinado Del Cobre Y pH Inicial Del Medio de Cultivo Sobre La Producción de Lacasa Y Manganeso Peroxidasa Por." *Revista Iberoamericana de Micología*, 176–78.
- Mukherjee, T., and M. Das. 2014. "Degradation of Malachite Green by *Enterobacter Asburiae* Strain XJUHX-4TM." *Clean-Soil Air Water* 42 (6): 849–56. doi:10.1002/clen.201200246.
- OECD. 1992. "Test No. 301B: CO₂ Evolution Test." *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* No. 301 (July): 1–62.
- Ojeda, M. 2011. "Tecnología de Los Plásticos." <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.mx/2011/06/poliestireno.html>.
- Ojeda, T., A. Freitas, E. Dalmolin, M. Pizzol, L. Vignol, J. Melnik, R. Jacques, F. Bento, and F. Camargo. 2009. "Abiotic and Biotic Degradation of Oxo-Biodegradable Foamed Polystyrene." *Polymer Degradation and Stability* 94 (12): 2128–33. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2009.09.012.
- Ortiz-Hernández, M. 2013. "El Impacto de Los Plásticos En El Ambiente." *La Jornada Ecológica*. <http://www.jornada.unam.mx/2013/05/27/eco-f.html>.
- Pramila, R., K. Padmavathy, K. Vijaya Ramesh, and K. Mahalakshmi. 2012. "Brevibacillus Parabrevis, *Acinetobacter Baumannii* and *Pseudomonas Citronellolis* - Potential Candidates for Biodegradation of Low Density Polyethylene (LDPE)." *Journal of Bacteriology Research* 4 (1): 9–14. doi:10.5897/JBR12.003.
- Preussler, C., E. Shimizu, L. Villalba, and P. Zapata. 2009. "Inducción Con Cobre de La Enzima Lacasa En El Hongo de Pudrición Blanca *Trametes Villosa* (Sw .: Fr.) Kreisel." *Revista de Ciencia Y Tecnología* 12 (12): 9–16.



- San Andrés, M., R. Chércoles, J. De la Roja, and M. Gómez. 2010. "Factores Responsables de La Degradación Química de Los Polímeros . Efectos Provocados Por La Radiación Lumínica Sobre Algunos Materiales Utilizados En Conservación : Primeros Resultados." *Factores Responsables de La: Restauración. España*, 263–304.
- Santo, M., R. Weitsman, and A. Sivan. 2013. "The Role of the Copper-Binding Enzyme - Laccase - in the Biodegradation of Polyethylene by the Actinomycete *Rhodococcus Ruber*." *International Biodeterioration and Biodegradation* 84. Elsevier Ltd: 204–10. doi:10.1016/j.ibiod.2012.03.001.
- Shah, A., F. Hasan, A. Hameed, and S. Ahmed. 2008. "Biological Degradation of Plastics: A Comprehensive Review." *Biotechnology Advances* 26 (3): 246–65. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- Sheikhi, F., M. Roayaei Ardakani, N. Enayatizamir, and S. Rodriguez-Couto. 2012. "The Determination of Assay for Laccase of *Bacillus Subtilis* WPI with Two Classes of Chemical Compounds as Substrates." *Indian Journal of Microbiology* 52 (4): 701–7. doi:10.1007/s12088-012-0298-3.
- Sivan, A., M. Santo, and V. Pavlov. 2006. "Biofilm Development of the Polyethylene-Degrading Bacterium *Rhodococcus Ruber*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (2): 346–52. doi:10.1007/s00253-005-0259-4.
- Soergel, D., N. Dey, R. Knight, and S. Brenner. 2012. "Selection of Primers for Optimal Taxonomic Classification of Environmental 16S rRNA Gene Sequences : Supplementary Materials." *The ISME Journal*. http://brennerlab.org/people/brenner/pubs/soergel-2012-ismej-16S-suppmat_395K.pdf.
- Sogawa, K., M. Watanabe, K. Sato, S. Segawa, C. Ishii, A. Miyabe, S. Murata, T. Saito, and F. Nomura. 2011. "Use of the MALDI BioTyper System with MALDI-TOF Mass Spectrometry for Rapid Identification of Microorganisms." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (7): 1905–11. doi:10.1007/s00216-011-4877-7.



12 ANEXO

12.1 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

Después de haber agitado los tubos se le adicionó 60 μ l de la solución C1 (obtenida del kit de extracción) la cual contiene agentes para continuar con la lisis celular. El tubo con las perlas y la solución C1 se agito con la ayuda de un vortex a velocidad máxima (2500 rpm) durante 5 minutos. Se centrifugaron los tubos a 10,000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente y se transfirió 500 μ L de sobrenadante a un tubo colector de 2 ml (nuevo).

Se añadieron 250 μ l de la solución C2 a cada tubo y agitaron durante 5 segundos, seguido de una incubación a 4 °C durante 5 minutos. Nuevamente se centrifugaron a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10,000 x g y, evitando el sedimento, se transfirieron 500 μ l de sobrenadante a un tubo limpio de colector de 2 ml.

Se adicionaron 200 μ l de la solución C3 y se agitaron cuidadosamente para después incubar a 4 °C durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron los tubos a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10,000 x g y, evitando el sedimento, se transfirieron 600 μ l de sobrenadante a un tubo limpio de colector de 2 ml.

Se añadieron 1200 μ l de la solución C4 previamente homogenizada y se agitó en vortex durante 5 segundos. Se transfirieron aproximadamente 675 μ l del sobrenadante en un SpinFilter y se centrifugó a temperatura ambiente 1 minuto a 10000 x g, se desechó el líquido de fondo y se añadieron otros 675 μ l de sobrenadante al SpinFilter para después centrifugar a las mismas condiciones y desechar el líquido de fondo. Por último, se cargó el sobrenadante restante centrifugó de igual manera y se desechó el líquido de fondo.

Se adicionaron 500 μ l de la solución de C5 y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g desechando el líquido de fondo. Se centrifuga por última vez 1 minuto a 10000 x g para eliminar la mayor cantidad de líquido y concentrar el ADN.

Se colocaron cuidadosamente los SpinFilter en un tubo de colección de 2 ml y se añadieron 100 μ l de solución de C6 (en dos etapas de 50 μ l cada una esperando cerca de 2 minutos) por el centro de la membrana y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 x g. Se desecharon los SpinFilter y el ADN contenido en los tubos de colección se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.



12.2 SECUENCIAS DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Secuencia de la bacteria *Enterobacter sp.* UAMI-C1:

TGGTACAGGTACAGTAGAGCTTGATCCTGGCTCAGAAGTCGTGACAAGGTTACGCAGTGCTAGGT
TGATCATGGGTGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG
AAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCAT
CGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA
GCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAG
GCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGAGGTTAATAACCTTGTCAATTG
ACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGC
AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTA
GAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
CCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAA
CGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTTTGA
CATCCAGAAACTTTCCAGAAGATGGATTGGGGCCTTCGGGAACTCTGAAAACGGGTGCTGCATG
GCTGTCCGCCAGCTCCGTTGGGAAAATGTTGGGGTTAAATCCCCCAACGAAGGGCAACCCTTT
ATCCTTTTGTGCCAGCGGTCCGGGCCGGGAACTCAAAGGGATACTGGCCCTGGGATAAACT
GGGAGGAAAGGGGGGGGATGAACTTCAAATGCATTCGTGGGGCCTTTACGAAATAAGGGTTTAC
CCCCCTGGGCTTACAAGTGGGGCCGGTCCAAAAGAAAAAAGCAACCCTCCCCAGAAAAACAAGG
GGGACCCCTAAAAAGGAGGGGGGCTATTTTCG



Secuencia de la bacteria *Enterobacter sp.* UAMI-C2:

TGTAAAGTACAGTAGAGCTTGATCCTGGCTCAGAAGTCGTAACAAGGTTACGCAGTGCTAGGTTG
ATCATGGGTGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAA
ACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCG
GATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGC
TGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGC
CTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGAGGTTAATAACCTTGTGCGATTGAC
GTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAA
GCGTTAATCGGAATTAAGCGGCTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATC
CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
ATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACG
CGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACA
TCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAAACAGGTGCTGCATGGCTG
GCCGCCAGCTCGTGTTGGGAAAATGTTGGGGTTAAGTCCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTATCCT
TTTGTTGCCAGGGGTTCCGGCCGGGAAACTCAAAGGAAAACCTGCCCGGGGATAAACTGGGAGG
AAGGGGGGGGATTACCCCAAGTCCTCATGGCCCTTACAAAAAAGGGGTTACCCCGGGCTTCA
AATGGGGCTTTACAAGAAGAAAACGAGCTTCCCCGAAAGACAAGGGGAACCCCAAAAAAGGGG
GTCGGAAACCCGGGATTGTGGTCCGACATCTCCTCCCCCTGAAAAAGGAAAATTTCTTTTT



Secuencia de la bacteria *Enterobacter sp.* UAMI-C4:

TGTAAAGTACCGTAGAGCTTGATCCTGGCTCAGAAGTCGTAACAAGGTAACCAGGAGAGGTTGAT
CCTGGGTCAGAAATCGTAACAAGGGAAGCGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAA
CGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGG
ATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCT
GGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATGAGGTTAATAACCTTGTCGATTGAC
GTTACCCGCAAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAA
GCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATC
CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
ATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCC
TGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACG
CGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAGGACCTTACCTACTCTTGACAT
CCAGAGACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCCTGT
CGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTGGGTAAGTCCCGCACGAGCGCACCCCTTATCCTTTGTGCCAGC
GGTCAGGCCGGGACCTCAAGGGAGACTGCTAGGTGATTAACCTGGAGAGGTGGGGATGACGTC
GTCCATCATGCCTACGAGTAGGCTACCACGGCTACATGGGCTACCAAGGGAGGCGACCCTCGCGT
GGAGACACGCGGACCCTCCTATATAAATGTGC