

Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), enero-febrero 2025,
Volumen 9, Número 1.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i1

IDENTIFICACIÓN METAGENÓMICA DE MICROORGANISMOS DEL LÍQUIDO RUMINAL Y HUMUS DE LOMBRIZ, BIODEGRADADORES DE PLÁSTICOS

**METAGENOMIC IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS
FROM RUMINAL FLUID AND WORM HUMUS, PLASTIC
BIODEGRADERS**

Mario Miguel Samamé Saavedra
Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo

Julio César Arellano Barragán
Universidad Nacional de Trujillo

Ana Lucía Tocto Tomapasca
Universidad Nacional de Trujillo

Luis Enrique Manrique Salvador
Universidad Nacional del Santa

Identificación metagenómica de microorganismos del líquido ruminal y humus de lombriz, biodegradadores de plásticos

Mario Miguel Samamé Saavedra¹

mario.samame87@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0005-5727-5675>

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo
Perú

Julio César Arellano Barragán

jcab442@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-1516-2531>

Universidad Nacional de Trujillo
Perú

Ana Lucía Tocto Tomapasca

ana.tocto.02@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0006-7488-5827>

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo
Perú

Luis Enrique Manrique Salvador

lemsmanrique@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-6463-094X>

Universidad Nacional del Santa
Perú

RESUMEN

La biodegradación es un método ampliamente empleada en la biorremediación de polímeros que permite controlar la alteración de ecosistemas perjudicados por las actividades antropogénicas. El objetivo fue determinar la capacidad de biodegradación del consorcio microbiano del líquido ruminal vacuno y humus de lombriz, sobre el polietileno de baja densidad y tereftalato a diferentes condiciones de temperatura y humedad, e identificar los microorganismos involucrados en este proceso. La metodología fue experimental en la cual se emplearon 120 láminas de PET y 120 de PEBD de 2,5 cm x 2,5 cm, sumergidas dentro de frascos estériles con líquido ruminal y humus, las láminas y sus repeticiones fueron extraídas de los frascos mensualmente durante 7 meses. La identificación de los microorganismos fue desarrollada mediante un análisis metagenómico, lo que permitió la identificación de microorganismos en el líquido ruminal como en el humus de lombriz, encontrando los géneros más comunes Bacillus, Methanosarcina y Advenella, además el valor de biodegradación más alto fue de 4,5 % para el tratamiento de humus de lombriz con polietileno de baja densidad a temperatura de incubación entre 25° a 27 °C.

Palabras clave: advenella, bacillus, methanosarcina, pcr, secuenciación

¹ Autor principal

Correspondencia: mario.samame87@gmail.com

Metagenomic identification of microorganisms from ruminal fluid and worm humus, plastic biodegraders

ABSTRACT

Biodegradation is a method widely used in the bioremediation of polymers that allows controlling the alteration of ecosystems damaged by anthropogenic activities. The objective was to determine the biodegradation capacity of the microbial consortium of bovine ruminal fluid and worm humus on low-density polyethylene and terephthalate at different temperature and humidity conditions, and to identify the microorganisms involved in this process. The methodology was experimental in which 120 sheets of PET and 120 of PEBD measuring 2.5 cm x 2.5 cm were used, submerged in sterile jars with ruminal fluid and humus. The sheets and their repetitions were removed from the jars monthly. for 7 months. The identification of the microorganisms was developed through a metagenomic analysis, which allowed the identification of microorganisms in the ruminal fluid and in the worm humus, finding the most common genera Bacillus, Methanosarcina and Advenella, in addition the highest biodegradation value was 4.5% for the treatment of worm castings with low-density polyethylene at an incubation temperature between 25° to 27°C.

Keywords: advenella, bacillus, sequencing, methanosarcina, per

Artículo recibido 19 diciembre 2024

Aceptado para publicación: 24 enero 2025



INTRODUCCIÓN

Los plásticos, protagonistas principales en todos los hogares por su uso cotidiano y desmedido, forma, propiedades y utilidad, se caracterizan principalmente por el tiempo que tardan en biodegradarse alcanzando en algunos casos hasta 600 años aproximadamente, entre ellos tenemos al polietileno de baja densidad (PEBD) y el tereftalato de polietileno (PET), estos derivados del petróleo son considerados grandes contaminantes, porque se dispersan por acción del viento perjudicando a las especies que habitan en los ecosistemas. (Awasthi et al., 2020; Geyer et al., 2017; Lee et al., 1991) señalaron en su estudio sobre la fabricación, empleo y comercialización de plásticos que los residuos de estos materiales se incrementó al 47% del total de restos generados a nivel mundial, la mitad de estos polímeros sintéticos procedentes principalmente de Asia y que constituyen un escenario preocupante debido a que la mayoría de estos residuos no son reciclados y se encuentran libres en el ambiente, por otro lado, la incineración de los polímeros libera gases tóxicos producto del tratamiento térmico que puede ocasionar problemas de salud pública como algunos tipos de cáncer.

Para fines de ese año es China, el mayor productor a nivel mundial de residuos plásticos seguidos por Japón y la Unión Europea, en ese contexto luego de su uso, según su destino final podrían ser reciclados, quemados, enterrados, soterrados en basurales, desechados en lugares poco usuales o simplemente eliminados al ambiente, se estima que el 79% representa el porcentaje de polímeros plásticos producidos hasta la fecha encontrados en basurales o en el ambiente, de los cuales solo el 12 % fueron incinerados y sólo el 9% han fueron reciclados (UNEP, 2018).

La estructura de algunos polímeros plásticos como la del polietileno de baja densidad cuando entran en contacto con materia orgánica descompuesta de los botaderos es transformada naturalmente por microorganismos mediante el proceso de biodegradación a través de enzimas presentes en bacterias y hongos principalmente (Shalini & Sasikumar, 2015; Uribe et al., 2010) de esta manera la biodegradación microbiana se presenta como una posible solución ambiental ante el uso desmedido de residuos plásticos, entre estos microorganismos se encuentran las *Pseudomonas* spp. que cuentan por acción de enzimas, a condiciones óptimas de temperatura y según la naturaleza del polímero, la capacidad para degradarlos, reduciéndolos bioquímicamente y modificando su estructura hasta alcanzar moléculas simples como metano, anhídrido carbónico y agua, lo que permite su asimilación como fuente de carbono y reducir



significativamente el tiempo de biodegradación (Ccallo Arela et al., 2020; Li et al., 2020).

En ese sentido, frente a la urgente necesidad de disminuir los residuos plásticos como el tereftalato de polietileno y el polietileno de baja densidad por su uso habitual, surgieron algunas alternativas con consecuencias perjudiciales al ambiente, como la incineración de estos materiales que liberaron gran cantidad de gases y sustancias tóxicas a la atmósfera provocando como impacto negativo el efecto invernadero, produciendo el recalentamiento de la capa de ozono y crisis climática como la que está aconteciendo en todo el planeta (Segura et al., 2015).

Actualmente, se han desarrollados estudios experimentales orientados a evidenciar la degradación del polietileno de baja densidad por acción de *Staphylococcus* sp así como, explicar el proceso de aislamiento y biodegradación de la cepa bacteriana sobre el polímero plástico (Arotoma Oré et al., 2021), otros estudios han demostrado a través de aislamientos e identificación microbiológica la capacidad de microorganismos específicos para biodegradar polímeros plásticos en condiciones controladas de temperatura como alternativa de solución ambiental frente al uso desmedido, la generación excesiva de residuos y micro plásticos en el mar (Archana et al., 2017). Otras investigaciones relacionadas lograron determinar la capacidad de biodegradación de polímeros elaborados a base de almidón de tapioca, policaprolactona y ácido poliláctico con microorganismos anóxicos obtenidos del estómago de los rumiantes al entrar en contacto con trozos de rumen vacuno, líquido ruminal provenientes del camal municipal de la ciudad y restos de comida en descomposición (Camacho-Muñoz & Luis Hoyos-Concha, 2014), por otro lado, se logró identificar la presencia de los géneros bacterianos *Bacillus* spp y *Clostridium* spp en el humus de lombriz, los cuales presentaron una potencial capacidad para alcanzar la biodegradación del polímero expandido o tecnopor ubicadas en recipientes con humus de lombriz a distintas profundidades y tiempos (Chunga Campos & Cieza Martínez, 2017).

Sin embargo, a la fecha aún es limitado los estudios metagenómicos comparativos que hayan aplicado distintos tratamientos como el líquido ruminal vacuno y humus de lombriz de forma simultánea para biodegradar polímeros plásticos como el tereftalato de polietileno y el polietileno de baja densidad.

Ante lo expuesto, el objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de biodegradación del consorcio microbiano aislados del líquido ruminal vacuno y humus de lombriz, basándose en un análisis gravimétrico que permitió determinar la diferencia de masas de las láminas de tereftalato de polietileno y polietileno de



baja densidad sometidos con ambos tratamientos, así mismo analizar los consorcios microbianos a través de técnicas moleculares y determinar los microorganismos que intervinieron en el proceso de biodegradación

METODOLOGÍA

Incubación de láminas de PET y PEBD en sustrato de líquido ruminal y humus de lombriz

Se incubó los materiales plásticos de 2,5 cm por 2,5 cm de superficie, en frascos de vidrio previamente esterilizados, se adicionó 250 ml de líquido ruminal como tratamiento biodegradativo de los polímeros, obteniendo en total 4 frascos con líquido ruminal, tanto para las muestras de PET y PEBD a temperatura ambiente e incubación. De la misma forma se incorporó en 4 frascos esterilizados 400 g/frasco de humus de lombriz como sustrato, tanto las muestras de PET y PEBD fueron incubadas por 6 meses a temperatura ambiente (25 a 27°C), finalmente se sumergieron 30 láminas por cada frasco para determinar hasta el término del ensayo, la variación de sus pesos. Las láminas de los 8 frascos de vidrio, 4 del líquido ruminal y 4 humus de lombriz, fueron extraídos mensualmente con la finalidad de determinar y comprara sus pesos iniciales y finales (Acuña Molina, 2017).

Determinación de masas residuales de láminas de PET y PEBD

El análisis consistió en medir las masas residuales de las láminas de PEBD y PET por el método gravimétrico con una balanza analítica marca Sartorius serie ED224S (con sensibilidad 0.1 mg), mensualmente las láminas fueron retiradas de los frascos con los tratamientos ,se lavaron y se colocaron sobre una tela esterilizada y se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente, al día siguiente las láminas se llevaron al laboratorio de la Universidad Nacional de Cajamarca filial Celendín y fueron pesadas en la balanza analítica determinando la masa perdida de cada lámina, el resultado se expresó en unidades (gramos) y mediante *fórmula se estimó el porcentaje de biodegradación.

Este análisis determinó la diferenciación directa de las masas del PEBD y PET que fueron sometidos a condiciones de degradación biológica. El fundamento básico de la pérdida de masa es la biodegradación del PEBD y del PET, los cuales se eligieron por su composición para ser degradados como nutrientes y composición rica en carbonos. con una balanza analítica los polímeros antes y después de realizar un ensayo de cultivo (Acuña Molina, 2017) (Das & Kumar, 2015).

* **%Biodegradación**= [(masa inicial - masa final) / masa inicial]x100



masa inicial = masa inicial del plástico (g)

masa final = masa final (g) del plástico en función del tiempo (mensualmente) o después de: (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210) días.

Preparación de las muestras para extracción de ADN

La preparación de las muestras para la extracción del ADN se realizó según Conde et al., (2006) con la excepción de la muestra que fue obtenida del material biológico adherido a las láminas plásticas del cual se obtuvo 250 miligramos de cada muestra.

Extracción de ADN metagenómico de muestras de líquido ruminal y humus de lombriz

La extracción del ADN metagenómico a partir de las muestras procedentes del líquido ruminal fueron obtenidas empleando el kit Zymo BIOMICS DNA Miniprep, mientras que la extracción del ADN a partir del humus de lombriz fue realizada empleando el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep (ZymoResearch) y el kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen) debido a la presencia elevada de inhibidores, estos procesos fueron desarrollados considerando las recomendaciones del fabricante del kit y las recomendaciones reportadas por (López & Mejía, 2012) y Wright et al., (2017).

Cuantificación y evaluación de la pureza e integridad del ADN

La cuantificación de ADN obtenido de las muestras de líquido ruminal extraída con el kit Zymo BIOMICS DNA Miniprep (ZymoResearch) y de la muestra de ADN de humus de lombriz extraída con el kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen), fue realizada mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000, se evaluó la relación A260/A280 para determinar la pureza.

Para verificar la integridad del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, para el cual se colocó las muestras de ADN en cámara de electroforesis a 80 voltios por 80 minutos. Cabe mencionar que una muestra de ADN es considerada íntegra cuando sobre el carril de la muestra se visualiza una banda conservada. El grado de separación o división de una muestra está definido por la pérdida de la conservación de la banda superior y el acoplamiento de un haz o a lo largo del carril de la muestra (López & Mejía, 2012).

Amplificación de las regiones de interés mediante electroforesis capilar (Agilent 5400)

La amplificación del gen ARNr 16SV3-V4 y ITS2 se realizó empleando la reacción en cadena de la polimerasa, las moléculas usadas como iniciadoras de ARNr 16SV3-V4 (341F: CCTAYGGGRBGCASCAG y 806R: GGACTACNNGGGTATCTAAT) y de ITS2 (2024F:



GCATCGATGAAGAACGCAGC y 2409R: TCCTCCGCTTATTGATATGC) se acondicionaron las 2 muestras de ADN genómico de los tratamientos añadiendo por separado el buffer para electroforesis. La mezcla total contenía 5 µL de primers de forward, 5 µL de primers de reverse, 5 µL de ADN genómico, 15 µL de solución para PCR, la mezcla final no debió exceder los 30 µL, para impedir el trasvase por la rendija de la cubeta de la muestra. El corrido electroforético se realizó a 150 voltios invariables, a estas condiciones la electroforesis se llevó a cabo en 1 hora aproximadamente, durante este tiempo se desnaturalizó a 94 °C durante 1 minuto, se ejecutaron 30 ciclos de temperatura, siguiendo el ciclo: desnaturalización a 94 °C por 50 segundos, el acoplamiento de los oligonucleótidos a 55 °C durante 30 segundos y la elongación de la cadena complementaria a 72 °C durante 60 segundos. El resultado de la PCR se verificó a través de electroforesis en agarosa al 1 % por fluorometría (Qubit) (Riversa Salazar et al., 2023), posteriormente se hizo un control de calidad mediante el método electroforesis capilar para (16S) o electroforesis en gel de agarosa (ITS) para confirmar la presencia del amplicón de tamaño deseado. El control de calidad para verificar la amplificación de la región 16S a secuenciar se realizó mediante electroforesis capilar automatizada, mientras que la verificación de la amplificación de la región ITS se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Dado que la muestra de ADN líquido ruminal no pasó el control de calidad (posiblemente por impurezas presentes en la muestra de ADN), se optó por realizar una purificación del ADN mediante perlas magnéticas antes de intentar amplificar nuevamente las regiones de interés, con resultados satisfactorios.

Preparación de librerías y secuenciamiento

Las librerías 16SV3-V4 e ITS2 fueron preparadas y secuenciadas por la empresa Novogen Co. Tras la primera PCR, se realizó un control de calidad mediante electroforesis capilar (16S) o electroforesis en gel de agarosa (ITS) para verificar la presencia del amplicón de tamaño esperado. Una vez verificado esto, se continuó con el protocolo estándar de preparación de librerías pareadas y secuenciamiento por NGS empleando el equipo Illumina.

Análisis Bioinformático

Se evaluó el número de lecturas por muestra y la calidad de los datos de secuenciamiento de rRNA 16S e ITS fue desarrollada mediante el software FastQC versión 0.12.1. Luego, las lecturas de cada muestra fueron importadas en la plataforma QIIME2 (versión 2023.5.0), se eliminaron los iniciadores de rRNA



16SV34 (341F: CCTAYGGGRBGCASCAG y 806R: GGACTACNNGGGTATCTAAT) y de ITS2 (2024F: GCATCGATGAAGAACGCAGC y 2409R: TCCTCCGCTTATTGATATGC) presentes en las lecturas de sus respectivas bibliotecas utilizando el complemento cutadapt.

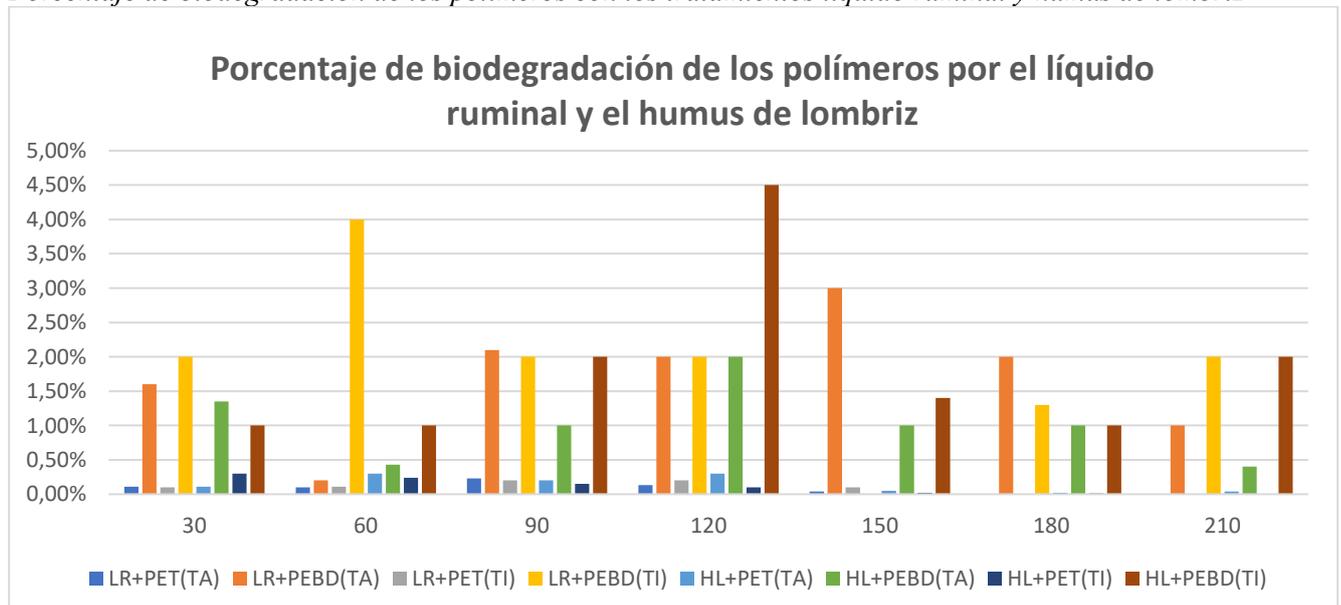
En este procedimiento, se mantuvieron las lecturas que tuvieron un tamaño mínimo de 100 nucleótidos, y ambos R1 y R2 presentes después del filtro, y se descartaron las lecturas que no fueron cortadas por no poseer ninguno de los iniciadores. Luego, utilizando el complemento DADA2, las lecturas fueron recortadas en los extremos donde tienen la calidad más baja, se eliminó el ruido de las lecturas en base a su secuencia, los R1 y R2 correspondientes, luego los fragmentos fueron ensamblados manteniendo una superposición de 20 nucleótidos, se eliminaron los fragmentos quimeras, para finalmente obtener las variantes de secuencias amplicón (ASV).

A continuación, utilizando las secuencias ASV se realizó la clasificación taxonómica al nivel de especie o cepa utilizando como referencia la base de datos de SILVA (versión 138_99_16S) y UNITE (versión 9.0). Con base en los resultados de clasificación obtenidos, los ASV clasificados como ADN de cloroplasto y mitocondria fueron eliminados, así como aquellos que no se clasificaron al menos hasta el nivel de filo. Finalmente, los valores de alfa y beta diversidad fueron calculados con el complemento diversity de QIIME2, considerando el número más bajo de ASV de las muestras como valor de referencia en la profundidad de muestreo.

RESULTADOS

Figura 1

Porcentaje de biodegradación de los polímeros con los tratamientos líquido ruminal y humus de lombriz



Cuantificación de ADN metagenómico

La muestra de ADN obtenido del líquido ruminal extraído empleando el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep (ZymoResearch) presentó una concentración en nanodrop de 66,4 ng/μL y de 64 obtenido en Qubit, en relación a la calidad del ADN estos presentaron valores en la proporción 260/280 de 1,93 y en 230/260 de 1,44; la muestra de ADN mostró valores adecuados para el proceso de secuenciamiento por NGS.

Por otro lado, la extracción de ADN a partir de humus de lombriz realizado empleando el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep (ZymoResearch) presentó una concentración en nanodrop de 25,7 ng/μL y 5,6 empleando Qubit, en relación a la calidad del ADN estos presentaron valores en la proporción 260/280 de 1,79 y en 230/260 de 0,1; la muestra de ADN no presentó valores adecuados para el proceso de secuenciamiento por NGS. Mientras que, empleando el kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen) presentó una concentración en nanodrop de 367,6 ng/μL y 243 empleando Qubit, en relación a la calidad del ADN estos presentaron valores en la proporción 260/280 de 1,9 y en 230/260 de 2,05; la muestra de ADN se mostró valores adecuados para el proceso de secuenciamiento por NGS, como se detalla en la tabla 1.

El análisis cuantitativo de ADN de las muestras por nanoespectrofotometría, mostró una diferencia significativa entre el uso de un kit y otro para la extracción de ADN de las muestras, esto debido a la presencia de concentraciones elevadas de inhibidores como ácido húmico en el humus de lombriz lo cual generó error en las lecturas.

Tabla 1

Concentración y pureza de las muestras de ADN extraídas.

MUESTRA	Nanodrop 2000/2000c			QubitHS Concentración (ng/μL)	DNA
	Concentración (ng/μL)	A260/280	260/230		
LR (kit Zymo)	66,4	1,93	1,44	64,0	
HL (kit Zymo)	25,7	1,74	0,1	5,36	
HL (kitQiagen)	367,6	1,90	2,05	243	

A:Absorbancia, HL:Humus de Lombriz LR: Líquido Ruminal

Integridad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de ADN obtenido a partir del líquido ruminal extraída con el kit Zymo BIOMICS DNA



Miniprep (ZymoResearch) y de las muestras de ADN de humus de lombriz extraída además con el kit DNeasy PowerSoil Pro(Qiagen), fueron procesadas en gel de agarosa al 2% y visualizadas en el transiluminador.

Se logró visualizar un ADN genómico integro en ambas muestras (Fig. 2 y 3)

Figura 2

Electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ADN extraídas con el Kit Zymo BIOMICS DNA Miniprep. M: Marcador de peso molecular de DNA 1Kb; 1: ADN de Líquido Ruminal; 2: ADN de Humus de lombriz.

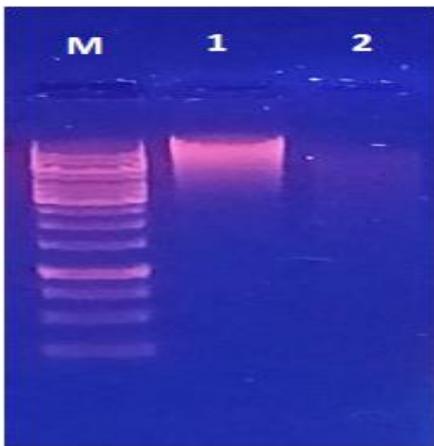
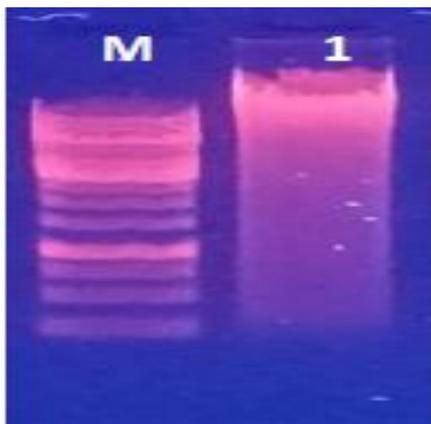


Figura 3

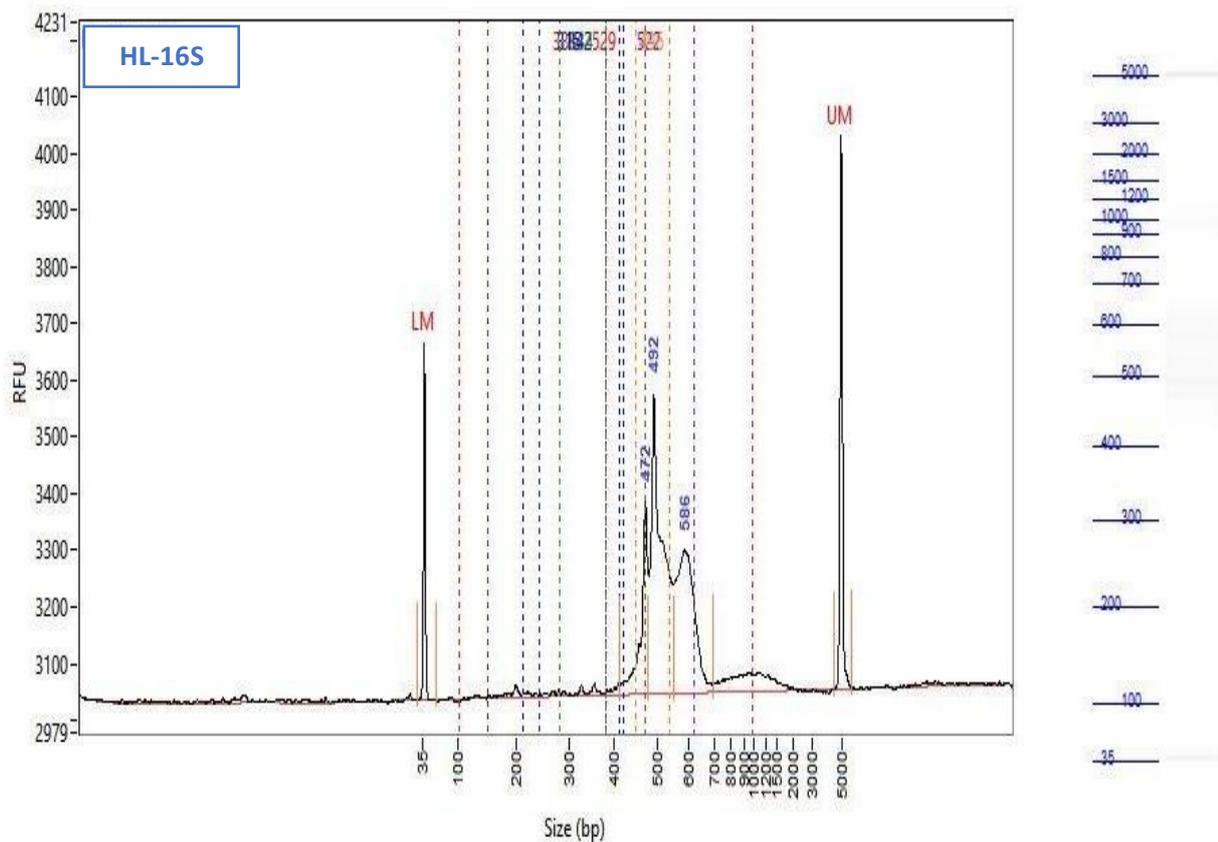
Electroforesis en gel de agarosa de la muestra de ADN extraída con el Kit DNeasy PowerSoil Pro. M: Marcador de peso molecular de DNA 1Kb; 1: ADN de Humus de lombriz.



Amplificación de las regiones de interés mediante electroforesis capilar (Agilent 5400) y electroforesis en gel de agarosa

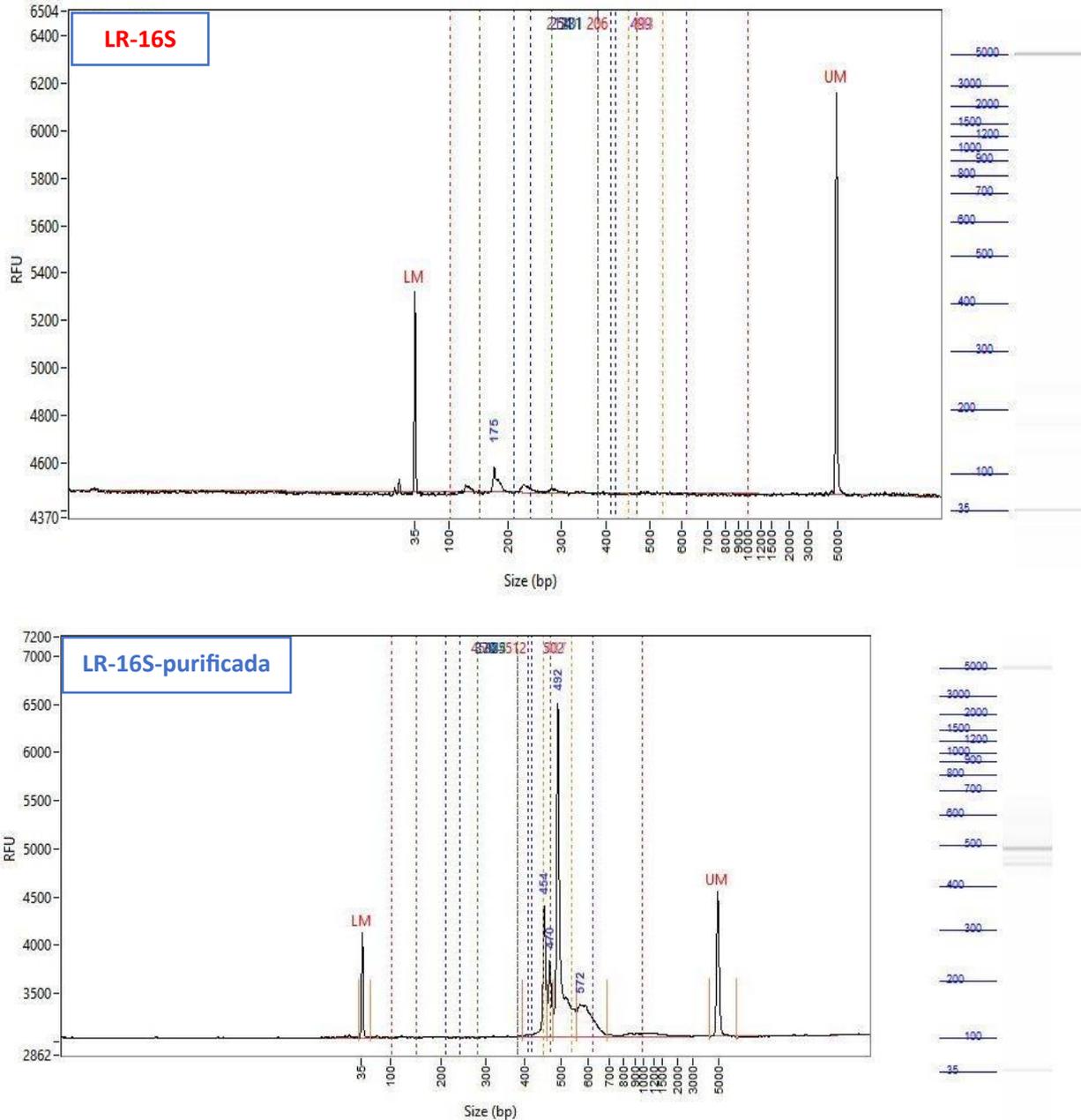
Dado que la muestra de ADN procedente del líquido ruminal no pasó este control de calidad (posiblemente por impurezas presentes en la muestra de ADN), se optó por realizar una purificación del ADN (mediante perlas magnéticas) antes de intentar amplificar nuevamente las regiones de interés, con resultados satisfactorios (figura 4 y 5).

Figura 4



El control de calidad para verificar la amplificación de la región 16S rRNA a secuenciar se realizó mediante electroforesis capilar automatizada, mientras que la verificación de la amplificación de la región ITS se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa

Figura 5



Electroforesis capilar de los productos amplificados de la región 16S rRNA a partir del líquido ruminal. Las muestras rotuladas en rojo son aquellas que no pasaron el control de calidad necesario para continuar con la preparación de librerías y posterior secuenciamiento. RFU: Real-time Fluorescence Signal intensity; LM: Low Marker, marcador de bajo peso molecular y UM: Up Marker, marcador de alto peso molecular. Marcador Ladder ubicado a la derecha de cada imagen.

A partir del análisis del secuenciamiento metagenómico por NGS del ADN procedentes y empleando la región 16S rRNA del líquido ruminal se logró la identificación de los géneros *Acinetobacter johnsonni*, *Methanocorpusculum* sp, *Pseudomonas flexibilis*, *Bacillus* sp, *Petrimonas* sp, *Methanobacterium* sp y

Advenella sp, mientras que, a partir de la muestra de humus de lombriz, se logró la identificación de *Methanosarcina* sp y *Bacillus* sp (tabla 2).

Tabla 2

Líquido Ruminal	
Género	Especie
<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonni</i>
<i>Methanocorpusculum</i>	<i>sp</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>flexibilis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>sp</i>
<i>Petrimonas</i>	<i>sp</i>
<i>Methanobacterium</i>	<i>sp</i>
<i>Advenella</i>	<i>sp</i>
Humus de Lombriz	
Género	Especie
<i>Methanosarcina</i>	<i>sp</i>
<i>Bacillus</i>	<i>sp</i>

Distribución de Géneros y especies más abundantes en líquido ruminal y humus de lombriz utilizando rRNA 16S rRNA.

A su vez, empleando la región del ITS se logró identificar a partir del líquido ruminal los géneros *Geotrichum candidum* y *Sacharomycetes* sp, mientras que, a partir de la muestra de humus de lombriz, se logró la identificación de *Psathyrellaceae* sp, *Rozellomycota* sp, *Thermomyces dupontii*, *Mycothermus thermophilus*, *Scedosporium auranticum* (tabla 3).



Tabla 3

Distribución de Géneros y especies más abundantes en líquido ruminal y humus de lombriz utilizando ITS.

Líquido Ruminal	
Género	Especie
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>
<i>Saccharomycetes</i>	<i>sp</i>
Humus de Lombriz	
Género	Especie
<i>Psathyrellaceae</i>	<i>sp.</i>
<i>Rozellomycota</i>	<i>sp.</i>
<i>Thermomyces</i>	<i>dupontii</i>
<i>Mycothermus</i>	<i>thermophilus</i>
<i>Scedosporium</i>	<i>aurantiacum</i>

DISCUSIONES

Los resultados de la presente investigación determinaron que los consorcios microbianos aislados del líquido ruminal vacuno y humus de lombriz poseen la capacidad de biodegradación del polietileno de baja densidad y tereftalato a distintas temperaturas y niveles de humedad según los resultados arrojados por el método gravimétrico con respecto a la pérdida de masa de los polímeros con la balanza analítica concordando con el estudio propuesto por Arotoma Oré et al., (2021) quienes señalaron que, la capacidad degradativa de los consorcios microbianos presentan una mayor actividad degradativa a determinadas temperaturas, es así que *Staphylococcus sp* es un microorganismo mesófilo que se desarrolla a una temperatura promedio de 37 °C por lo que para alcanzar niveles altos de degradación microbiana requiere alcanzar temperaturas cercanas a su temperatura de mayor actividad metabólica, sin embargo a temperaturas cercana a los 15 °C su actividad degradativa disminuye. Asimismo, Camacho-Muñoz & Luis Hoyos-Concha, (2014) afirmaron que los biorreactores con una concentración de gas metano de 59.35% y pH final correspondiente a 7,71 consigue reducir la masa en un 61,27% en condiciones de altas temperaturas, sin oxígeno y concentración de sólidos.



Por otro lado, se logró evidenciar la adaptación del metabolismo de los microorganismos del consorcio microbiano aislados del líquido ruminal y humus de lombriz a medios sintéticos como el tereftalato y polietileno de baja densidad, pues se logró determinar la pérdida de masa de las láminas por cada periodo mensual analizado, siendo mayor la degradación en el cuarto mes alcanzando un máximo de biodegradación promedio del 4,5 % en el polietileno de baja densidad (PEBD) empleando el tratamiento con humus de lombriz a una temperatura de incubación (25°C a 27°C). En un estudio similar realizado por Archana et al., (2017) y Martín Peraza, (2017) lograron determinar que la cepa bacteriana aislada del botadero del distrito de Ascensión presentó la capacidad de degradar el PEBD, en un 0,52 % a una temperatura de 20°C, resultados menores en comparación al presente trabajo.

En el estudio desarrollado por Ccallo Arela et al., (2020) y Li et al., (2020), determinaron que, la biodegradación microbiana representa un alternativa de solución ambiental ante el uso desmedido y generación excesiva de residuos plásticos ya que microorganismos como las *Pseudomonas* sp cuentan con capacidad para degradar polímeros plásticos según la naturaleza de los mismos, reduciéndolos bioquímicamente a moléculas simples, gracias a sus enzimas que poseen propiedades de degradación de materiales plásticos, los cuales en condiciones adecuadas como temperatura y humedad, logran asimilarlos como fuente de carbono a través de su mecanismo de acción adhesión a la superficie de los materiales, liberación de enzimas específicas que permiten su fraccionamiento y descomponiendo los polímeros a sustancias más simples como metano, anhídrido carbónico y agua.

En el presente estudio se logró determinar la disminución de la masa de los polímeros empleando como tratamiento el líquido ruminal y el humus de lombriz, así mismo, del proceso de secuenciamiento masivo por NGS dirigido a 16S rRNA se logró identificar la presencia de los microorganismos *Acinetobacter johnsonni*, *Methanocorpusculum* sp, *Pseudomonas flexibilis*, *Bacillus* sp en el líquido ruminal, además de *Methanosarcina* sp y *Bacillus* sp en humus de lombriz.

Por otro lado, empleando la región de ITS, se logró la identificación de los hongos más abundante según el sustrato son *Geotrichum candidum*, *Saccharomycetes* sp. presentes en el líquido ruminal, y en caso del humus de lombriz son *Psathyrellaceae* sp, *Rozellomycota* sp, *Thermomyces dupontii*, *Mycothermus thermophilus*, *Scedosporium aurantiacum*.

En este sentido, Chunga Campos & Cieza Martínez, (2017) indicaron que los géneros bacterianos más



abundantes identificados en el humus de lombriz dentro de recipientes y a distintas profundidades fueron *Bacillus* spp y *Clostridium* spp, en el presente estudio se logró la identificación de *Bacillus* spp.

Así mismo, se comprobó que la estructura química de los polímeros plásticos como el polietileno de baja densidad al entrar en contacto con materia orgánica descompuesta de los botaderos, es transformada naturalmente por microorganismos mediante el proceso de biodegradación a través de enzimas presentes en bacterias y hongos. Shalini & Sasikumar, (2015) y Uribe et al., (2010), constatan la teoría de la biodegradación que establece que, la descomposición de los compuestos orgánicos complejos a moléculas simples se da por medio de actividad enzimática realizada por microorganismos como mohos, levaduras, protozoos, bacterias, entre otros. Así mismo los reportes realizados por Bach et al., (2014), Fan et al., (2014), Carneado et al., (2015) y Rungchang et al., (2013) que los animales expuestos a pequeñas dosis de Bisfenol A presentes en algunos recipientes de plásticos evidencian deficiencias en el desarrollo del sistema nervioso y en el comportamiento en ratas recién nacidas.

CONCLUSIONES

Se logró determinar la capacidad de biodegradación del consorcio microbiano aislados del líquido ruminal vacuno y humus de lombriz a través de la determinación de la pérdida de masa del polietileno de baja densidad y tereftalato sometidos a distintas temperaturas, periodos de incubación y humedad, acorde con el método gravimétrico de la balanza analítica.

Se identificaron por métodos moleculares los géneros principales de microorganismos que conformaron el consorcio microbiano del líquido ruminal vacuno y humus de lombriz con potencial capacidad de biodegradación del polietileno de baja densidad y tereftalato. En el líquido ruminal vacuno, se logró identificar a los géneros bacterianos *Acinetobacter*, *Methanocorpusculum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Petrimonas*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* y *Advenella*, mientras que, los hongos presentes en el consorcio fue principalmente *Geotrichum*, *Saccharomycetes* y *Erythrobasidium*.

En el humus de lombriz, las bacterias presentes correspondieron a los géneros *Bacillus*, *Methanosarcina* y *Advenella*, mientras que, en caso de los hongos fueron los géneros *Scedosporium*, *Psathyrellaceae*, *Rozellomycota*, *Thermomyces*, *Ascomycota* y *Mycothermus* principalmente.

Se evidenció cada 30 días la adaptación del metabolismo de los microorganismos del consorcio microbiano aislados del líquido ruminal vacuno y humus de lombriz a medios sintéticos con tereftalato y polietileno de



baja densidad, siendo la biodegradación de PEBD de 4.5% para el tratamiento con humus de lombriz a temperatura de incubación, 4,0% de biodegradación de PEBD en líquido ruminal a temperatura incubación y 3,0% de biodegradación de PEBD en líquido ruminal a temperatura ambiente.

Se logró evidenciar que, los microorganismos del consorcio microbiano aislados del líquido ruminal vacuno y humus de lombriz realizan actividad degradativa en medios sintéticos con polietileno de baja densidad y tereftalato de polietileno a diferentes valores de humedad y temperatura, mostrándose mayor pérdida de peso en el quinto y cuarto mes, el cual, varía de 3,0% hasta 4,5% siendo el humus de lombriz el mejor tratamiento para el polietileno de baja densidad en relación al tereftalato de polietileno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña Molina, N. R. (2017). *Revisión bibliográfica sobre los microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material [Thesis]*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Archana, B., Rajesh, M., & Samundeeswari, M. (2017). Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Garbage Soil. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 4(9), 2813–2828. <https://doi.org/10.12691/jaem-5-2-3>
- Arotoma Oré, F., Apaclla, A., Sánchez, V. G., Saldaña, J. E., & Enriquez Quispe, J. D. (2021). Biodegradación del polietileno de baja densidad con *Staphylococcus* sp. aislado del botadero de Ascención - Huancavelica. *Revista Científica Siglo XXI*, 1(1), 30–39. <https://doi.org/10.54943/resxxi.v1i1.8>
- Awasthi, A. K., Tan, Q., & Li, J. (2020). Biotechnological Potential for Microplastic Waste. *Trends in Biotechnology*, 38(11), 1196–1199. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.03.002>
- Bach, C., Dauchy, X., Severin, I., Munoz, J. F., Etienne, S., & Chagnon, M. C. (2014). Effect of sunlight exposure on the release of intentionally and/or non-intentionally added substances from polyethylene terephthalate (PET) bottles into water: Chemical analysis and in vitro toxicity. *Food Chemistry*, 162, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.020>
- Camacho-Muñoz, R., & Luis Hoyos-Concha, J. (2014). Biodegradación Anaerobia De Un Material Biodegradable Bajo Digestión Anaerobia Termófila. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 20–29.



- Carneado, S., Hernández-Nataren, E., López-Sánchez, J. F., & Sahuquillo, A. (2015). Migration of antimony from polyethylene terephthalate used in mineral water bottles. *Food Chemistry*, 166, 544–550. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.041>
- Ccallo Arela, M., Sacaca Marcos, F., Callata Churac, R. A., Vigo Rivera, J. E., & Calla Calla, J. (2020). Biodegradation of plastic polymers by pseudomonas. *Revista de Investigación: Ciencia, Tecnología y Desarrollo*, 6(2), 46–59. https://revistas.upeu.edu.pe/index.php/ri_ctd/index
- Chunga Campos, L. del R., & Cieza Martínez, C. A. (2017). *Biodegradación de Poliestireno utilizando microorganismos presentes en el humus de lombriz durante los meses, Octubre-Diciembre. [Thesis]*. Universidad de Lambayeque.
- Conde, M., Revollo, S., & Espada, A. (2006). Implementación de la técnica PCR en el diagnóstico de salmonela y shigella directamente de muestras fecales. *Biofarbo*, XIV(14), 67–75. <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa20061410.pdf>
- Das, M. P., & Kumar, S. (2015). An approach to low-density polyethylene biodegradation by *Bacillus amyloliquefaciens*. *3 Biotech*, 5(1), 81–86. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0205-1>
- Fan, Y. Y., Zheng, J.-L., Ren, J.-H., Luo, J., Cui, X.-Y., & Ma, L. Q. (2014). Effects of storage temperature and duration on release of antimony and bisphenol A from polyethylene terephthalate drinking water bottles of China. *Environmental Pollution*, 192, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.05.012>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3, e1700782.
- Lee, B., Pometto III, A. L., Fratzke, A., & Bailey, T. B. (1991). Biodegradation of Degradable Plastic Polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3), 678–685.
- Li, J., Kim, H. R., Lee, H. M., Yu, H. C., Jeon, E., Lee, S., & Kim, D. H. (2020). Rapid biodegradation of polyphenylene sulfide plastic beads by *Pseudomonas* sp. *Science of the Total Environment*, 720, 137616. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137616>
- [López, L. D. A., & Mejía, C. G. \(2012\). Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Revista MVZ Córdoba*, 17\(3\), 3169–3175.](#)



<https://doi.org/10.21897/rmvz.217>

- Martín Peraza, A. (2017). *Estudio preliminar de la biodegradación de plásticos por bacterias marinas. [Thesis]* [Universidad de La Laguna]. [https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5762/Estudio preliminar de la biodegradacion de plasticos por bacterias marinas.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5762/Estudio%20preliminar%20de%20la%20biodegradacion%20de%20plasticos%20por%20bacterias%20marinas.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Riversa Salazar, C. A., Tapia Limonchi, R., & Isasi Rosas, J. (2023). Actividad antibacteriana in vitro del veneno de Hadruides sp . “escorpión”, frente a *Acinetobacter baumannii* , *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*. *Revista de Investigación Científica REBIOL*, 4(1), 14–23.
- Rungchang, S., Numthuam, S., Qiu, X., Li, Y., & Satake, T. (2013). Diffusion coefficient of antimony leaching from polyethylene terephthalate bottles into beverages. *Journal of Food Engineering*, 115(3), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.025>
- Segura, D., Noguez, R., & Espín, G. (2015). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 361–372.
- Shalini, R., & Sasikumar, C. (2015). Biodegradation of Low Density Polythene Materials Using Microbial Consortium – An Overview. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4(4), 507–514.
- UNEP. (2018). *Single-use Plastic: A Roadmap for Sustainability*.
- Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 17(1), 133–136. <https://doi.org/10.15381/rpb.v17i1.62>
- Wright, M. H., Adelskov, J., & Greene, A. C. (2017). Bacterial DNA Extraction Using Individual Enzymes and Phenol/Chloroform Separation. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 18(2), 10.1128/jmbe.v18i2.1348.

