

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad Ciencias de la Vida

**EVALUACIÓN DE BIODEGRADACIÓN DE PLÁSTICOS DE
UN SOLO USO A PARTIR DE UN CONSORCIO DE
MICROORGANISMO**

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

BIÓLOGA

Presentado por:

María Grazia Mejía Monroy

Rafaella Fernanda Dueñas Olvera

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la PhD. Nardy Diez por la confianza y paciencia depositadas en nosotras. Al Ing. Jeffrey Vargas, por el continuo apoyo y conocimiento impartido. Al CIBE por permitirnos utilizar las instalaciones para llevar a cabo el proyecto y a Agrantech por confiarnos su producto

A mis padres, por ser esa inspiración y soporte que me alienta a escalar las cumbres más altas, todos mis logros son siempre por, para y gracias a ustedes. A mi familia y amigos, por las palabras de ánimo y a Rafaella, por ser sinónimo de empatía, apoyo y comprensión en esta aventura conocida como universidad.

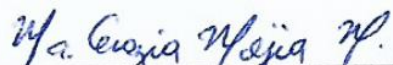
-Ma. Grazia

Agradezco principalmente a mi mamá quien comparte todos mis logros. A Sol que me ayuda a brillar. Mis amigos con quienes comparto hermosas experiencias, especialmente a la más bondadosa, Maga. A mis profesores que me impartieron conocimientos.

-Rafaella

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *María Grazia Mejía Monroy* y *Rafaella Fernanda Dueñas Olvera* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



María Grazia Mejía Monroy



Rafaella Fernanda Dueñas Olvera

EVALUADORES

Nombre del Profesor

Diego Gallardo Polit

Nombre del Profesor

Nardy Diez García PhD

RESUMEN

El uso desmedido de plástico en Guayaquil ha obligado a las autoridades a tomar medidas y crear una ley progresiva que regula al plástico de un solo uso desde su fabricación hasta su comercialización. Esta ley menciona que debe ser sustituido por material 100% biodegradable. Por esto proponemos una evaluación de la biodegradación de plástico de un solo uso a partir dosis específicas de un consorcio comercial de microorganismos mediante el cambio de biomasa. Se diseñó un experimento de dos factores en donde se estudió la interacción entre las concentraciones de 0.5 mg/100 ml y 1 mg/100 ml del consorcio comercial de microorganismos con tres materiales: plato normal, plato fotooxidado y plato a base de caña de azúcar. Los resultados demostraron que, con un periodo de incubación de un mes, la dosis de 0.5 mg/100 mL logró colonizar todos los materiales exitosamente generando un incremento del 2.24% en la biomasa del plato normal y 2.47% en el plato fotooxidado. Por otro lado, la dosis de 1mg/100 mL generó un 1.7% de incremento en la biomasa del plato fotooxidado y un decrecimiento del 1.2% en el plato normal. Se puede concluir que el tratamiento de fotooxidación fue el más afectado debido a que la porosidad del plástico lo hace mas susceptible para la colonización y formación del biofilm por parte de las bacterias. Finalmente, el proceso de biodegradación se da como resultado del aprovechamiento del plástico como única fuente de carbono por parte de los microorganismos.

Palabras Clave: consorcio microbiano, biodegradación, poliestireno, fotooxidación.

ABSTRACT

The excessive use of plastic in Guayaquil has forced the authorities to take measures and create a progressive law that regulates single-use plastic from its manufacture to its commercialization. This law mentions that it must be replaced by 100% biodegradable material. Therefore, we propose an evaluation of the biodegradation of single-use plastic from specific doses of a commercial consortium of microorganisms by analyzing change in the biomass. A two-factor experiment was designed to study the interaction between concentrations of 0.5 mg/100 mL and 1 mg/100 mL of the commercial consortium of microorganisms with three materials: normal plate, photooxidized plate and sugarcane-based plate. The results showed that, with an incubation period of one month, the dose of 0.5 mg/100 mL successfully colonized all the materials, generating an increase of 2.24% in the biomass of the normal plate and 2.47% in the photooxidized plate. On the other hand, the dose of 1mg/100 mL generated a 1.7% increase in the biomass of the photooxidized plate and a 1.2% decrease in the normal plate. It can be concluded that the photooxidation treatment was the most affected because the porosity of the plastic makes it more susceptible to bacteria colonization and biofilm formation. Finally, the biodegradation process is the result of the microorganisms taking advantage of the plastic as the only source of carbon.

Key words: microbial consortium, biodegradation, polystyrene, photooxidation.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
CAPÍTULO 1	1
1. Introducción.....	1
1.1 Descripción del problema	1
1.2 Justificación del problema	1
1.3 Objetivos	2
1.3.1 Objetivo General	2
1.3.2 Objetivos Específicos.....	2
1.4 Marco teórico	2
CAPÍTULO 2.....	7
2. METODOLOGÍA	7
2.1 Investigaciones preliminares	7
2.2 Diseño de Experimentos.....	8
2.3 Evaluación de la biodegradación	9
2.3.1 Biomasa.....	9
2.3.2 Microscopía	9
2.4 Análisis Estadístico	9
2.5 Prueba de Potencia	10
2.5.1 ANOVA en un diseño de dos factores.....	10

CAPÍTULO 3.....	12
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	12
3.1 Resultados	12
3.1.1 Biomasa.....	12
3.1.2 Microscopía	14
3.1.3 ANOVA	16
3.2 Discusión.....	16
3.3 Análisis de Costos	16
CAPÍTULO 4.....	20
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	20
4.1 Conclusiones.....	20
4.2 Recomendaciones	20
BIBLIOGRAFÍA.....	22

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
ANOVA	Análisis de una varianza
PET	Tereflato de Polietileno
HDPE	Polietileno de alta densidad
LDPE	Polietileno de baja densidad
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
EPS	Poliestireno expandido

SIMBOLOGÍA

g	Gramo
mg	Miligramo
mL	Mililitro
°C	Grados centigrados
rpm	Revoluciones por minuto
kg	Kilogramo
m	Metro

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Representación gráfica del diseño de experimentos.....	8
Figura 3.1 Peso (g) iniciales y después de incubación.....	14
Figura 3.2 Porcentaje de biomasa de los tratamientos 0.5 mg/mL y 1 mg/mL	14
Figura 3.3 Biodigestor (Soluciones Integrales de Combustión, 2021)	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Medidas iniciales de peso seco de plásticos	13
Tabla 3.2 Biomasa.....	13
Tabla 3.3 Resultados de microscopía después de la incubación.....	14
Tabla 3.4 ANOVA para un diseño de dos factores	16
Tabla 3.5 Análisis de costo para inversión	21

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema

El uso excesivo de plástico es una problemática a nivel mundial que perjudica a todos los ecosistemas, ocasionando pérdida de fauna y flora tanto marina como terrestre. Entre los plásticos más utilizados, el poliestireno de un solo uso ocasiona el mayor desequilibrio debido al poco tiempo de vida útil y el largo período de degradación.

Ecuador en pro de incentivar el cuidado del ambiente, ha desarrollado regulaciones específicas para el manejo y reutilización de los plásticos entre las que se encuentra la exige la reincorporación de los plásticos de un solo uso en los procesos productivos o la biodegradación total de los mismos con el objetivo de preservar zonas que se encuentran en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas. Por esto, se busca alternativas eco amigables que ayuden a contrarrestar esta contaminación.

Se ha comprobado que algunos microorganismos poseen la capacidad de degradar materia orgánica, actualmente se utilizan productos comerciales formados por consorcios de microorganismos para la biorremediación de suelos y agua. Evaluar la eficiencia de biodegradación de estos productos puede colaborar con el cumplimiento de las políticas ambientales.

1.2 Justificación del problema

El plástico se encuentra en varias industrias por lo tanto existen diferentes tipos, uno de los más habituales en la basura es el poliestireno que representa el 6.4% del plástico total producido, esto se debe a que no es material de reciclaje. Asimismo, se ha visto la necesidad de plantear que para el 2030 todos los plásticos destinados a empaquetamiento sean reciclados (European Commission, 2019). El quinto plástico más utilizado en el mundo es el poliestireno, al mismo tiempo que es uno de los más desechados por su bajo rendimiento en el reciclaje (Ho et al., 2018).

En Ecuador, el 21 de diciembre del 2020 la Asamblea Nacional aprobó la Ley Orgánica para la Racionalización, Reutilización y Reducción de plásticos de un solo uso, la cual busca regular la generación de residuos de plástico, la reducción progresiva de plásticos de un solo uso y, cuando sea posible, su reemplazo por envases y productos fabricados con material reciclado o biodegradable, para así contribuir con el cuidado de la salud y el ambiente (Asamblea Nacional, 2020). Esta normativa tiene un plazo de 48 meses para su cumplimiento, donde el proceso de incorporar material reciclado a sus productos debe de tener un porcentaje mínimo al mismo tiempo que no pierda su calidad.

Por otro lado, a nivel local, una ordenanza vigente en Guayaquil desde el 2018 estableció que plásticos de un solo uso sean regulados desde su fabricación hasta su comercio, en el cual mencionan el poliestireno expandido. Se obliga a que sea sustituido por material 100% biodegradable hasta 24 meses, una adición de 70% de material reciclado o sea material reutilizable (Registro Oficial N°330, 2018).

El objetivo de estas legislaciones es disminuir el consumo de plástico y fomentar una conciencia ambiental en las empresas. Por lo tanto, el uso del consorcio de microorganismos es una alternativa eco amigable viable para el manejo del poliestireno.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la biodegradación de plástico de un solo uso a partir de dosis específicas de un consorcio microbiano comercial para un manejo eco amigable de polímeros.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Estudiar la relación de la concentración del consorcio microbiano necesario para lograr la biodegradación del poliestireno expandido.
2. Medir el cambio de la biomasa del poliestireno expandido luego de la acción del consorcio microbiano.

1.4 Marco teórico

La contaminación por plástico es un problema ambiental a nivel mundial muy conocido y ampliamente estudiado. Es el resultado de diversas actividades industriales y domésticas

que son llevadas a cabo con una mala gestión que comienza desde el momento de su fabricación (Soares et al, 2021). A nivel mundial, se conoce que actualmente se producen 300 millones de toneladas de desechos plásticos al año, de los cuales la mitad son considerados plásticos de un solo uso (UN Environment, 2018).

Se define como plásticos de un solo uso aquellos productos que son utilizados una única vez, por un corto periodo de tiempo antes de ser desechados (EU, 2019). El impacto de estos residuos de plásticos en el medio ambiente y en nuestra salud es a nivel global provocando consecuencias en la conservación de la flora y fauna en la mayoría de los ecosistemas. Entre los plásticos de un solo uso se encuentran los Tereftalato de polietileno (PET), utilizados para la elaboración de botellas de plástico, contenedores o bandejas; Polietileno de alta densidad (HDPE) utilizado para las botellas de champú, leche, recipientes de helado o fundas térmicas; Polietileno de baja densidad (LDPE) empleado en las fundas de plástico, film de envasado de alimentos, bandejas y contenedores; Polipropileno (PP) sirve para la elaboración de las fundas para comida chatarra, platos para microondas, tapas de las botellas, mascarillas de un solo uso, etc.; Poliestireno (PS) se utiliza para elaborar platos, cubiertos y vasos desechables; finalmente el Poliestireno expandido (EPS) utilizado para empaquetados, elaborar vasos térmicos desechables o bandejas de comida (UN Environment, 2019).

En Ecuador, el 46.04% de los residuos clasificados correspondieron a plásticos (INEC, 2019). Por otro lado, en el 2018, se publicó que diariamente se arrojaron 12.739,01 toneladas de basura, de las cuales el 11.43% era plástico. Es decir que anualmente Ecuador desecha 531.461 toneladas de plástico y la mitad de estos desechos (260.000 toneladas aproximadamente) corresponden a plásticos de un solo uso (Moran, 2020).

Una alternativa para intentar disminuir la contaminación por plásticos es utilizando consorcios microbianos para la biodegradación. Un consorcio microbiano es un cultivo mixto de microorganismos beneficiosos que en conjunto producen metabolitos que actúan para mejorar la calidad del ecosistema. Consisten principalmente en bacterias fotosintetizadoras, bacterias lácticas, levaduras, actinomicetos y hongos fermentadores. Todos los microorganismos son compatibles entre sí y logran coexistir en un medio líquido (Towett, 2016). El suelo es el ecosistema en donde la aplicación de consorcios microbianos es más utilizada para mejorar su calidad y así obtener mejores resultados

en la producción de cultivos. Sin embargo, su aplicación puede variar en diferentes ámbitos como en el acuícola, para mejorar el sistema inmunológico y así promover el crecimiento de tilapia (Xu et al,2020), o en construcción, para mejorar la durabilidad y sostenibilidad del hormigón (Olukotum et al, 2021). Un campo en donde la aplicación es un tanto innovadora y se están llevando a cabo varios estudios es la biodegradación de plástico (Li et al., 2020; Matjašič et al., 2021; Moog et al., 2019).

El consumo masivo de plástico ha obligado a las industrias a buscar alternativas eco amigables para su manejo. Generalmente, gestionar desechos se enfoca en vertederos, incineración y reciclaje, sin embargo, estas soluciones tienen varios limitantes por las consecuencias climáticas (Ru et al., 2020). Mientras que la degradación de plástico es una estrategia más eco amigable y eficiente, ya que permite su fragmentación y disminución de peso molecular, este proceso se logra mediante biodegradación o procedimiento fisicoquímico.

La degradación de plástico poliestireno en el ambiente tarda mucho tiempo, inclusive cuando se encuentra en suelos ricos en hongos, bacterias e insectos, sin embargo, se conoce que en condiciones controladas las larvas degradan un 15% - 23% en 15 días (Kaplan et al., 1979; Tsochatzis et al., 2021). La biodegradación tiene recibimiento por ser una estrategia ecológica que utiliza componentes bióticos como insectos, algas o microorganismos para degradar polímeros mediante acción enzimática. Las cadenas de polímeros son convertidas en biogas y biomasa debido a que son una fuente de carbono (Ali et al., 2019).

Este proceso conlleva varios pasos desde la fragmentación del polímero hasta su mineralización. El mecanismo comienza con la colonización donde se forma un biofilm a base de microorganismos adheridos al plástico que sintetizan polisacáridos y proteínas, esto afecta su hidrofobicidad y flotabilidad (Lobelle & Cunliffe, 2011; Sarmah & Rout, 2018). Los polímeros pasan por una deteriorización que son cambios fisicoquímicos ocasionados por enzimas extracelulares, permitiendo la invasión de más microorganismos. Posteriormente, la biofragmentación transforma la masa en oligómeros, dímeros y monómeros para que durante la asimilación sean la fuente de carbono de los microorganismos y así abarcar mayor superficie del plástico. Finalmente, la mineralización ocurre cuando se liberan CO₂, H₂O y CH₄ (Ganesh Kumar et al., 2020).

La biodegradación de la basura plástica se ha estudiado desde 1960 para identificar organismos con esta capacidad. Los insectos son los más recurrentes en estos proyectos por estar en contacto con suelos y otros sustratos expuestos a plásticos, se infiere que esto se debe a la simbiosis microbiana en sus intestinos. Larvas de insecto son de interés porque mastican e ingieren polímeros sin repercusión, por lo que son llamados “plastivoros” (Sanchez-Hernandez, 2021). Los gusanos de harina (*Tenebrio molitor*) degradan poliestireno y polietileno a gran escala por su actividad metabólica (Brandon et al., 2018; Yang et al., 2020).

Por otro parte, hongos y bacterias tienen roles importantes en la biodegradación. El *T. molitor* con una alimentación basada en poliestireno presenta altos niveles de *Bifidobacterium*, *Acinetobacter* y *Streptococcus* exhibiendo la eficiencia de estas bacterias (Lou et al., 2021). Asimismo, *Pseudomonas* que son encontradas en muestras de suelo ambiental (Kim et al., 2021). De manera similar, se estudian cepas como *Bacillus paralicheniformis* G1 (MN720578) que puede degradar poliestireno durante 60 días bajo condiciones controladas, confirmando la capacidad degradadora de *Bacillus* junto a demás investigaciones (Ganesh Kumar et al., 2021). Por otro lado, los hongos basan su capacidad de biodegradación en el ingreso de su micelio en la superficie polimérica. De este modo, un consorcio de bacterias y hongos lograría niveles altos de biomasa.

Ciertos géneros de bacterias como la *Bifidobacterium sp.* son conocidos por llevar a cabo procesos metabólicos que resultan beneficiosos para la fermentación y degradación de materia. Esto se debe a que poseen una diversa cantidad de genes que permiten sintetizar enzimas que permiten llevar a cabo procesos de absorción y catabolismo de carbohidratos complejos y no digeribles, que van desde los oligosacáridos de la leche humana hasta las fibrillas de las plantas (Milani et al, 2014). Un ejemplo es *B. longum*, la única especie del género *Bifidobacterium* que tiene la capacidad de sintetizar enzimas que permiten fermentar el manitol y la trehalosa, sin embargo, carece de otras enzimas utilizadas para fermentación (Devika et al, 2019). Esta diferencia en las rutas metabólicas de *B. longum* es lo que la hace especial dentro del género y se utiliza específicamente para la degradación de materia ya que son compuestos empleados en la industria alimentaria y farmacéutica.

Otro grupo de microorganismos ampliamente estudiado dentro de las industrias antes mencionadas son las bacterias ácido-lácticas. Las *Lactobacillus* se utilizan mucho debido a que posee propiedades que permiten mantener en equilibrio la microbiota al mismo tiempo que previenen las bacterias no peligrosas (Yan & Polk, 2011). Otra aplicación es en la biodegradación de residuos orgánicos debido a que son ricos en polímeros de carbonos como almidón, celulosa y hemicelulosa, además contienen lípidos, proteínas, ácidos orgánicos y restos inorgánicos. Estos compuestos permiten el crecimiento de bacterias ácido-lácticas y las ayudan a sintetizar compuestos valiosos como nisinas y pediocinas, también conocidas como bacteriocinas. La incorporación de las bacterias ácido-lácticas para la degradación de materia no solo acelera el proceso de fermentación, sino también, es más sencillo, ecológico y es una alternativa económica al uso de tecnología química. A través de los metabolitos sintetizados por estos microorganismos se logra ajustar el pH para la fermentación y llevar a cabo su preservación (Novik et al, 2017).

Dentro del proceso de biodegradación, en la etapa de mineralización, se necesitan enzimas como esterasas, lipasas, cutinasas, peroxidasas y lacasas, por esto la caracterización de especies bacterianas es esencial para confirmar su relación con la biodegradación. Especies del género *Bacillus* participan en las vías metabólicas para la degradación de polímeros como el poliestireno, como lo hace *B. paralicheniformis* G1. El género se caracteriza por ser capaces de secretar enzimas como proteasas, lipasas, xilanasas y quitinasas (Dang et al., 2018).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Investigaciones preliminares

Una investigación preliminar titulada “Bioprospección de organismos para la degradación de plásticos de un solo uso” realizada en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIBE), estudiaron la respuesta de plásticos de un solo uso con aditivos frente a diferentes hongos y bacterias tomados de la Colección de microorganismos del CIBE. En el trabajo se utilizaron recortes de viandas y platos hechos de poliestireno expandido como muestras de plásticos. Los microorganismos seleccionados se incubaron junto a cuatro tratamientos físicos del sustrato: vianda, vianda envejecida, plato y plato envejecido.

Las muestras de plásticos fueron incubadas en un medio salino con agitación durante 30 días para esperar la colonización de los microorganismos al sustrato. Las muestras de plásticos fueron evaluadas por cambio en la biomasa, microscopía y espectrometría infrarroja por transformada de Fourier antes de incubarlas y después de la colonización de microorganismos.

Al finalizar la evaluación, se observó que un incremento en la exposición de los grupos amino y los enlaces simples en el polímero, favorecieron que los microorganismos degraden el plástico. Las muestras envejecidas presentaron una mayor colonización por parte de los microorganismos resultando en una mayor biopelícula que en las no envejecidas. Finalmente, se concluye que hubo una reducción mayor al 27% durante los 30 días de experimentación y mencionan que muestras de menor espesor se degradan con mayor facilidad (Diez et al., 2021).

A partir de estos estudios preliminares se espera emplear la misma metodología en la presente investigación con la alteración de que los microhongos no serán utilizados durante el periodo de incubación, sino un consorcio comercial de microorganismos que se suele utilizar para la biodregradación de materia orgánica.

2.2 Diseño de Experimentos

El diseño experimental de ensayo consistió en el análisis de tres niveles de tratamientos. El primero, se llevó a cabo con un plato plástico normal, el cual fue estandarizado en pequeños pedazos redondos. El segundo, fue con un plato plástico que pasó por un pretratamiento de fotooxidación, es decir, se expuso al plástico a 300 horas seguidas de luz ultravioleta para simular la exposición al sol en el ambiente. Finalmente, el tercer tratamiento que se llevó a cabo fue con un plato a base de caña de azúcar, el cual sirvió como tratamiento control ya que se comercializa como plato biodegradable de fibra (Figura 2.1).

Todos los experimentos se efectuaron en frascos con capacidad de 250 mL aproximadamente, 30 piezas de plástico con un diámetro de alrededor de 7 mm, 30 mL de medio salino y se utilizaron dos diferentes concentraciones del consorcio microbiano.

Adicionalmente, dentro de cada uno de los tratamientos se realizó un control con frascos que contuvieron medio salino, pero sin ninguna dosis de consorcio microbiano. Esto permitió descartar cualquier indicio de contaminación dentro de los frascos de experimentación.

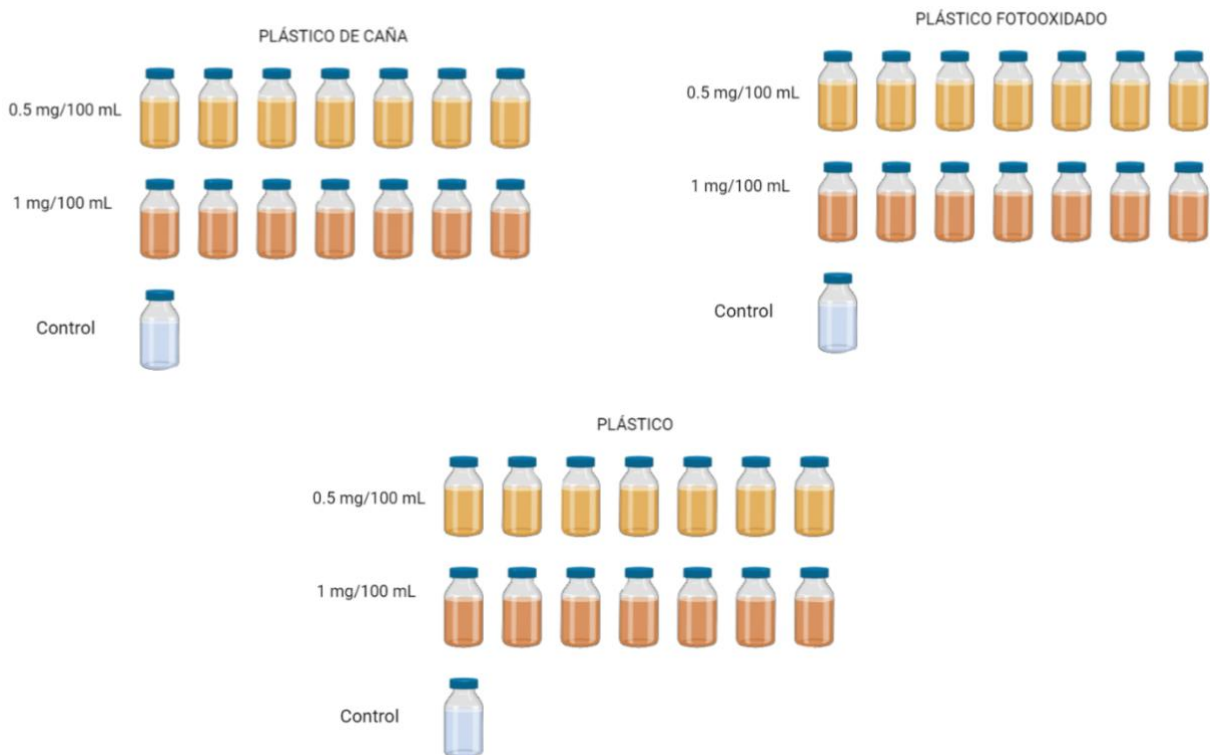


Figura 2.1 Representación gráfica del diseño de experimentos

2.3 Evaluación de la biodegradación

Posterior a los 30 días de incubación, se detuvo el experimento para observar los cambios en el sustrato causados por las bacterias. Es necesario determinar si se liberaron partículas de los plástico en el líquido, por lo que las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 12000 rpm y así observar si había algún precipitado. Después se preparó al material para la evaluación de biomasa y estereo microscopía, por lo tanto, todos los plásticos fueron secados durante 24 horas a 60°C y así corroborar que estén libres de humedad.

2.3.1 Biomasa

Biomasa se define como la masa de organismos vivos presentes en un instante de tiempo (Houghton, 2008). En el presente trabajo se midió la masa de los sustratos antes de comenzar el experimento y luego de los 30 días de incubación de los tres platos con las diferentes concentraciones del consorcio microbiano. El cambio de biomasa que se midió permitió estimar la cantidad de microorganismos que lograron fijarse en el sustrato y utilizarlo como única fuente de carbono para crecer. El método utilizado para medir la biomasa fue determinando el cambio de masa del plato con ayuda de una balanza analítica.

2.3.2 Estereo microscopía

La estéreo microscopía fue una herramienta que permitió observar de cerca el proceso de colonización de las bacterias en los sustratos, específicamente la formación de la biopelícula. A partir de este método se esperó determinar si existió alguna diferencia en la cantidad de fijación bacteriana entre los tres tratamientos de los plásticos. La identificación de biopelícula se llevó a cabo mediante características macroscópica, por lo que cada pieza de plástico fue teñida con azul de lactofenol y posteriormente observadas en estereoscopio.

2.4 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de biomasa y microscopía nos permiten conocer en general la capacidad del consorcio bacteriano de colonizar el plástico y utilizarlo como única fuente de carbono disponible. Los datos de biomasa son del tipo cuantitativos ya que fueron

medidos con ayuda de una balanza, mientras que los de microscopía son del tipo cualitativos debido a que se basa en un proceso de observación, el cual puede llegar a ser subjetivo.

Por ende, los datos a utilizarse para encontrar una tendencia que nos permita determinar la dosis del consorcio microbiano más efectiva para la degradación del plástico serán los de biomasa. Para el efecto, se llevarán a cabo dos herramientas estadísticas: la primera es una prueba de potencia que nos permita determinar la probabilidad de encontrar una diferencia significativa en la biodegradación del plástico con diversas concentraciones del consorcio microbiano. La segunda, es un análisis de varianza también conocido como ANOVA, para el diseño de experimento de dos factores.

2.5 Prueba de Potencia

La potencia de prueba es un análisis estadístico que permite conocer la confiabilidad de los resultados obtenidos. Es la probabilidad de rechazar correctamente la hipótesis nula, por lo que la potencia de prueba es una probabilidad condicional. La prueba de potencia para el diseño de experimento se calculó mediante un software estadístico, dando un resultado de 0.7/1. Lo cual indica que existe una alta confiabilidad en los resultados a obtener en el diseño de experimentos.

2.5.1 ANOVA en un diseño de dos factores.

ANOVA es un análisis de varianza que permite comparar más de dos variables al mismo tiempo para determinar si existe una relación entre ellas. El resultado de la fórmula ANOVA, el estadístico F, permite analizar múltiples grupos de datos para determinar la variabilidad entre muestras y dentro de ellas (Fisher, 1918).

La ANOVA unidireccional evalúa el impacto de un único factor sobre una única variable de respuesta. Se utiliza para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de tres o más grupos independientes (Fisher, 1918). Uno de los objetivos planteados es determinar la relación dosis/respuesta, por lo que se

analizó mediante ANOVA el impacto de la dosis con respecto al cambio de biomasa en los tratamientos.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Resultados

Luego del periodo de incubación se determinó que ninguno de los tres tratamientos mostró cambios con respecto a su coloración. También se observaron partículas pequeñas en las réplicas del plato fotooxidado, pero esto fue causado por el pretratamiento con luz UV. Por otro lado, durante el periodo de incubación, las réplicas del tratamiento de plato caña sufrieron contaminación micótica a diferencia de los otros tratamientos que contenían el consorcio comercial. Esto nos permitió descartar una posible contaminación por mala manipulación de los tratamientos y presumir que existe un mal tratamiento en la manufactura del plato caña.

Además, es importante tomar en consideración que los platos de poliestireno utilizados son fabricados con aditivos que favorecen el proceso de adhesión de las bacterias a estos materiales.

3.1.1 Biomasa

La biomasa fue calculada mediante la diferenciación de pesos, tomando como partida los pesos iniciales de los platos (Tabla 1) para restarla de los pesos promedios después de la incubación (Tabla 2). Aplicando una dosis de 0.5 mg/100mL, se observó un leve incremento del peso del plato, acotando a que existió un proceso de fijación de las bacterias. Por otro lado, para la dosis de 1 mg/100mL, se percibió una disminución de peso que probablemente fue causado por la degradación de los polímeros subsiguiente a la colonización de bacterias (Figura 1).

El porcentaje de biomasa refleja la cantidad de colonización presente en el sustrato con respecto al peso total. Posterior a los 30 días de incubación, los tratamientos con 0.5 mg/100mL de consorcio presentaron mayor porcentaje de biomasa que los de 1

mg/100mL (Figura 2). En el tratamiento de 0.5 mg/mL, el plato de caña obtuvo el mayor porcentaje de biomasa con un incremento del 8.32%. Sin embargo, el plato fotooxidado y el plato normal presentaron un menor incremento con 2.47% y 2.24%, respectivamente. Por otra parte, para la dosis de 1mg/100mL, el plato de caña y el plato normal presentaron una reducción en la biomasa de 4.6% y 1.24%, respectivamente. Por el contrario, el plato fotooxidado presentó un incremento de 1.72% de la biomasa, el cual fue menor al observado con la dosis de 0.5 mg/100 mL. Estos resultados mostraron que, con un periodo de incubación de 30 días y una dosis de 0.5 mg/100mL del consorcio comercial, las bacterias siguen colonizando el sustrato, pero al duplicar la dosis los microorganismos fueron capaces de degradar el plástico.

Tabla 3.1 Medidas iniciales de peso seco de plásticos

Pesos iniciales			
	Plato caña	Plato fotooxidado	Plato normal
1	0.1198	0.1138	0.1356

Tabla 3.2 Biomasa

Peso promedio después de la incubación			
	Plato caña	Plato fotooxidado	Plato normal
0.5 mg/ml	0.130675	0.116683	0.138717
1 mg/ml	0.11445	0.1158	0.133933
Biomasa			
0.5 mg/ml	0.010875	0.002883	0.003117
1 mg/ml	-0.00535	0.002	-0.00167
% Incremento			
0.5 mg/ml	8.322173	2.471076	2.246786
1 mg/ml	-4.67453	1.727116	-1.2444

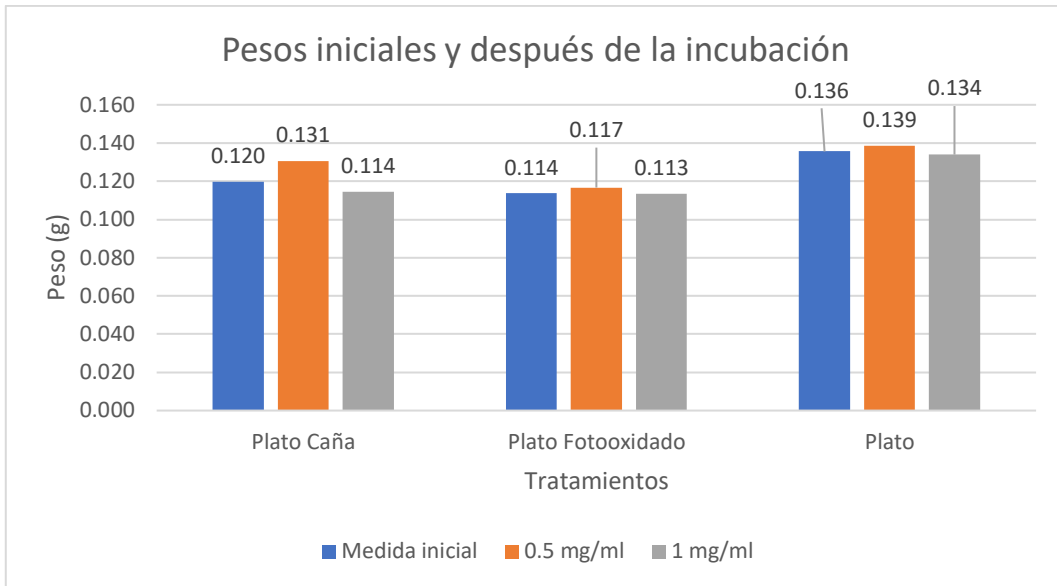


Figura 3.1 Peso (g) iniciales y después de incubación

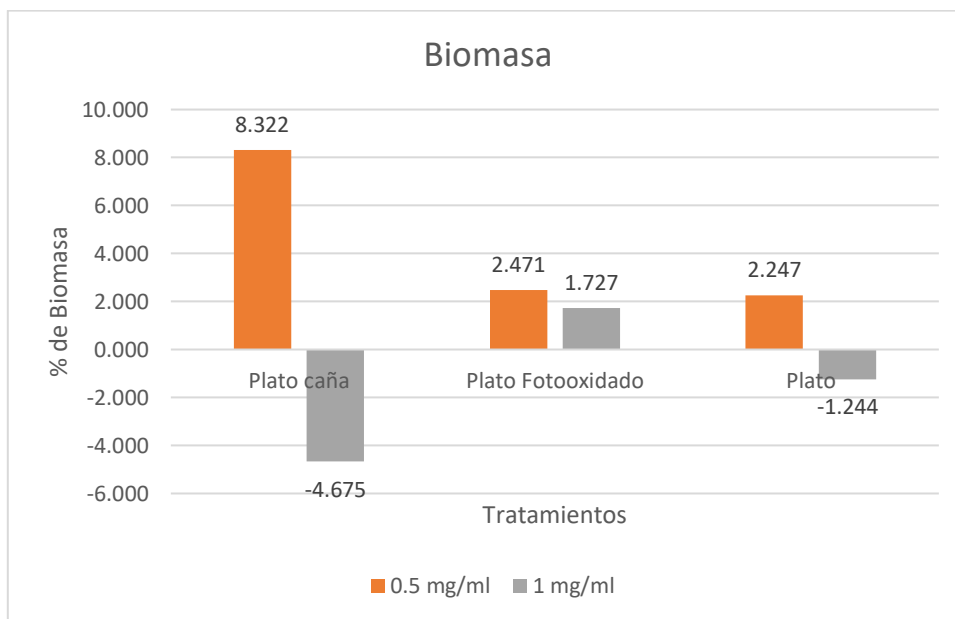


Figura 3.2 Porcentaje de biomasa de los tratamientos 0.5 mg/mL y 1 mg/mL







3.1.2 Estereo Microscopía

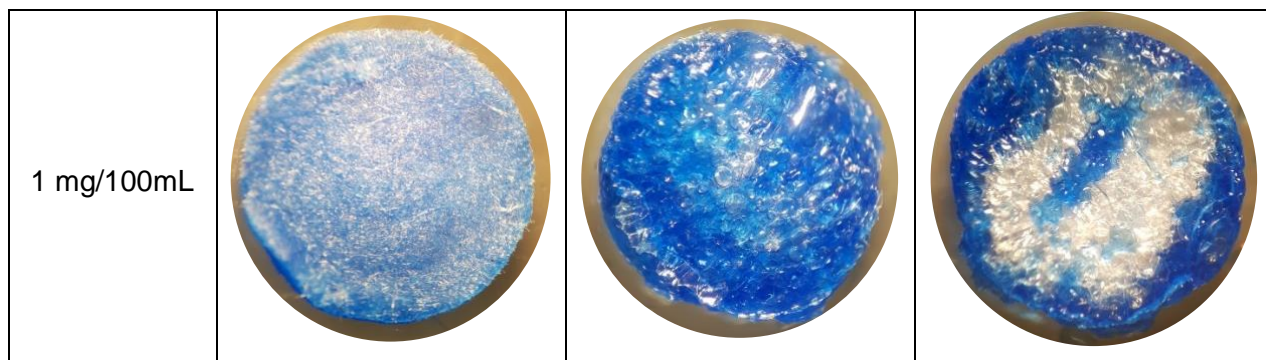
Los sustratos fueron observados en un estereoscopio después de ser teñidos para identificar áreas azules que indicaran la colonización de microorganismos. Se logró determinar que todos los tratamientos fueron exitosamente colonizados por las bacterias del consorcio comercial. La Tabla 3.3 muestra los resultado de la estereo microscopía, en donde se observa que el plato de caña se logró teñir en los tres experimentos. Se

infiere que esto se debe a que, al ser un plato biodegradable, es más susceptible al proceso de colonización por parte de las bacterias. Por otra parte, el plato fotooxidado tuvo una mayor porosidad debido a la exposición a rayos UV, esto ocasionó que sea el tratamiento que mayores cambios en la superficie presentó. Estos poros o grietas facilitaron el proceso de fijación de los microorganismos en la superficie ocasionando que el plástico se tiñera de azul intenso en su totalidad. Finalmente, el plato normal presentó zonas blancas indicando baja colonización y corroborando la efectividad del pretratamiento de los rayos UV para facilitar la adhesión de bacterias en el plástico.

Asimismo, se observó que los plásticos con dosis de 1 mg/100mL presentaron una tinción más tenue que aquellos de 0.5 mg/100mL, lo que puede estar relacionado con la cantidad de microorganismos presentes en el medio después de los 30 días. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que luego de un periodo de 30 días las bacterias del consorcio comercial hayan perdido viabilidad, por lo que se necesita hacer más estudios al respecto.

Tabla 3.3 Resultados de microscopía después de la incubación

Tratamiento Dosis	Plato caña	Plato fotooxidado	Plato normal
Control (0 mg/100mL)			
0.5 mg/100mL			



3.1.3 ANOVA

El análisis de varianza, también conocido como ANOVA, se presenta en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 ANOVA para un diseño de dos factores

Origen de las variaciones	Grados de libertad	F	Probabilidad	Valor crítico para F
CONCENTRACION	1	0.94872107	0.33976078	4.259677273
TIPO DE MATERIAL	1	64.2212968	3.061E-08	4.259677273
Interacción	1	0.35392069	0.55747002	4.259677273
Dentro del grupo	24			

Los resultados indican que los datos del cambio de biomasa en los platos no son estadísticamente significativos entre los tres tratamientos. Sin embargo, el ANOVA también indica que sí existe una interacción entre la concentración del consorcio de microorganismos utilizado y el tipo de material. Por lo tanto, estos resultados corroboran lo antes expuesto en el análisis de Biomasa y lo observado en Microscopía, la concentración del consorcio comercial sí favorece el porcentaje de biodegradación del plástico.

3.2 Discusión

Un proceso de biodegradación conlleva fases desde la colonización hasta la mineralización, donde la estructura del sustrato es sometida a cambios. El crecimiento de las bacterias en el plástico forma una biopelícula, la cual facilita la modificación del plástico haciéndolo menos hidrofóbico. Al debilitar el sustrato, se permite que las bacterias puedan consumir al plástico como fuente de carbono (Gu, 2007).

La biodegradación de poliestireno se ha demostrado que es posible llevarla a cabo con una serie de bacterias, entre ellas las *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Curvularia sp.*, *Rhodococcus ruber*, *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sedlakii*, *Alcaligenes sp.*, *Brevundimonas diminuta* y *Exiguobacterium sp.* (Mohan et al, 2020). Estos microorganismos fueron aislados de muestras de suelos utilizados como vertederos de plástico, biorreactores industriales y residuos de plásticos biodegradados.

Si comparamos las bacterias presentes en el consorcio comercial utilizado en este proyecto con las antes mencionadas podemos encontrar que el género *Bacillus sp.* ha sido previamente estudiado en la biodegradación del plástico (Mohan et al, 2020). Los resultados de aquella investigación mostraron que *Bacillus sp.* es capaz de reducir hasta en un 23.7% del peso original del plástico, mientras que en nuestra investigación se observó un decrecimiento de 1.72%. Hay que tomar en consideración que el periodo de incubación de nuestro experimento fue de 30 días mientras que en el del *Bacillus sp.* no fue especificado. Sin embargo, en otras investigaciones se reporta que el periodo de incubación que generalmente se utiliza puede variar de 30 a 120 días. Por ejemplo, en la investigación del uso de *Pseudomonas aeruginosa* para la degradación de poliestireno ácido poli-láctico se logró degradar 9.9% del peso original del plástico con un periodo de incubación de 28 días (Shimpi et al, 2012).

Por otro lado, diversas investigaciones han mostrado que la biodegradación del poliestireno es exitosa, pero no todos los microorganismos llevan a cabo el proceso a un alto ritmo de degradación. En una investigación llevada a cabo con *Rhodococcus ruber*, *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sedlakii*, *Alcaligenes sp.* y *Brevundimonas diminuta*, todos aislados de muestras de suelos, se observó que luego de un periodo de incubación de ocho semanas solo se presentó una degradación de 0.8% de la biomasa original del poliestireno (Mor and Sivan, 2008). Así mismo, otro estudio se llevó a cabo con *Curvularia sp.* para la biodegradación de poliestireno que pasó por un proceso de oxidación química y una co-incubación con microhongos. Los resultados mostraron que luego de un periodo de 9 semanas de incubación existió un incremento en la biomasa del plástico (Motta et al, 2009). Este escenario es similar al que observamos en nuestra investigación donde la concentración de 0.5 mg/100 mL no mostró niveles de biodegradación, pero sí un aumento de la biomasa que indica una fijación de las bacterias en el plástico.

Con respecto al tiempo de incubación, en un proyecto que estudió cepas de *Pseudomonas lini* como descomponedor de poliestireno, experimentaron con cuatro dosis (2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL) durante 30 días (Kim et al., 2021). Este estudio fue muy similar a la presente investigación ya que se utilizaron diferentes dosis para conocer qué concentración es la mejor para la degradación del plástico. El estudio con *P.lini* mostró un crecimiento exponencial hasta el cuarto día, ya que las bacterias colonizaron el sustrato hasta que se mantuvieron metabólicamente activas. Se infiere que, en nuestro experimento, al utilizar una menor dosis las bacterias necesitaron más tiempo para colonizar la mayoría de la superficie. Sin embargo, *P. lini* logró reducir 1.45% del film de poliestireno en los 30 días de incubación, lo cual nos permite presumir que el consorcio comercial podría presentar el mismo nivel de eficacia si utilizamos dosis más altas.

En una investigación donde utilizaron películas de poliestireno para determinar el potencial de una cepa de *Bacillus paralicheniformis* como biodegradador, se observó que a los 30 días de incubación ya se logró alcanzar un proceso de degradación y a su vez un crecimiento de la biopelícula. Por otra parte, a los 60 días, la cantidad de la degradación logró duplicarse (Ganesh Kumar et al., 2021). Esto sugiere que las bacterias llevan a cabo dos etapas para la degradación del plástico. La primera, es de aclimatización para lograr llevar a cabo el proceso de fijación en los sustratos y luego un proceso de aprovechamiento del plástico como fuente de carbono disponible que permita su crecimiento. Es por esto por lo que a los 60 días se logró observar que las bacterias eliminaron capas de la superficie plástica de los sustratos. Los resultados de nuestro proyecto sugieren algo similar, el tratamiento de 0.5 mg/100 mL mostró una colonización en toda la superficie del sustrato fotooxidado y parcialmente en el plato normal durante los 30 días de incubación, mientras que para la dosis de 1 mg/100 mL ya pudimos observar una degradación en el plástico normal.

Por otro lado, el análisis de estéreo microscopía nos ayudó a determinar la presencia de microorganismos en los tres tratamientos, indicando que ambas dosis del consorcio son efectivas para colonizar los sustratos y permitir una posterior degradación.

Nuestro experimento se llevó a cabo con poliestireno expandido el cual está hecho de varias unidades de plástico fusionados. Cuando las bacterias empiezan a colonizar la

superficie, ellas se apoyan de los poros entre cada isla de poliestireno. En un plástico pre tratado con rayos UV, como en el tratamiento de fotooxidación, estos poros se expanden (Taghavi, Zhuang, et al., 2021). Por esto, se observó que las dosis de 0.5 mg/100mL y 1mg/100mL del plástico envejecido tuvieron mayor fijación de microorganismos que los otros materiales. Es decir, un pretratamiento de envejecimiento del plástico aumenta la posibilidad de formación del biopelícula en plástico. En otro estudio de Taghavi se identificaron grietas en la superficie de los platos fotooxidados determinando que sería más fácil para la bacterias de consumirlo (Taghavi, Singhal, et al., 2021).

3.3 Análisis de Costos

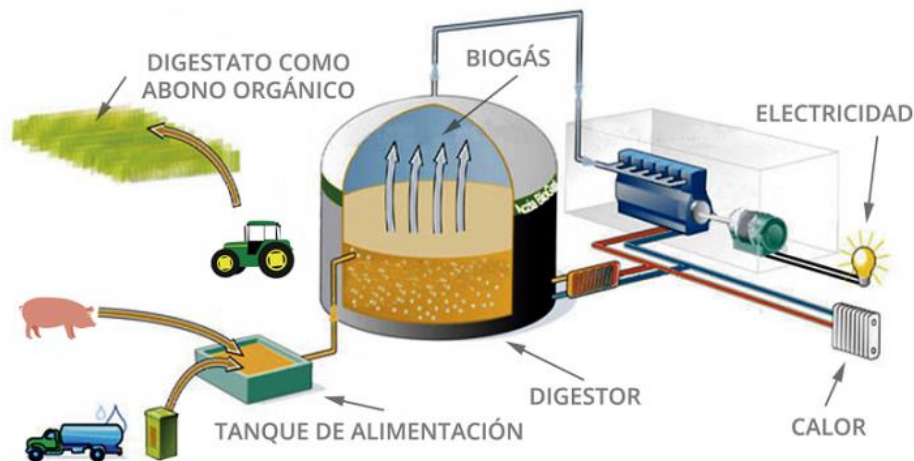


Figura 3.3 Biodigestor (Soluciones Integrales de Combustión, 2021)

Consideramos que la mejor manera de procesar este tipo de plástico con este tipo de microorganismos es utilizando un modelo de biodigestores (Imagen 3.3). Un biodigestor tiene una capacidad promedio de 10m³ que es lo mismo a 10 000 litros. Ahora, bajo la consigna de que la concentración del consorcio comercial a utilizar es de 1 mg/100 mL se calcula que se necesitaría 100 g del consorcio. Ahora, el valor de un kilo del consorcio comercial es de \$220 por lo que se estima que, aplicando una dosis de 100 g semanal, se necesitaría de 400 g al mes para un solo biogestor. Esto significaría que un kilo del consorcio comercial abastecería para un periodo de dos meses y medio, lo que conlleva a un valor de \$88 mensual.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El estudio de microorganismos para su aplicación en la biodegradación de plástico se ha reportado desde los años 1960 (Sanchez-Hernandez, 2021). Sin embargo, en la actualidad debido a la problemática mundial de la contaminación por plásticos se ha vuelto imperativo investigar a profundidad sobre estos microorganismos y las rutas enzimáticas que hacen posible la degradación del material para ser aprovechado. En esta presente investigación se demostró la habilidad del consorcio microbiano comercial para colonizar y empezar a degradar el plástico en un periodo de 30 días.

4.1 Conclusiones

- El consorcio comercial fue eficiente para la colonización de bacterias en los tres tipos de materiales a los 30 días, por lo que puede ser utilizado para degradar plástico poliestireno expandido normal o envejecido.
- Existe una interacción dosis/respuesta por parte del consorcio comercial para la biodegradación de los plásticos.
- El plástico normal presentó una mayor eficiencia de degradación, en comparación con el plato fotooxidado.

4.2 Recomendaciones

- El diseño de experimento debe de plantear un mayor tamaño de la prueba para obtener datos confiables con respecto al análisis estadístico.
- Es necesario corroborar el cambio estructural del sustrato mediante técnicas de análisis para biodegradación como la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) que determina cambios en grupos funcionales, al igual que la prueba de hidrofobicidad calculando el ángulo de contacto con el agua.
- Se recomienda aumentar la concentración de la dosis o el tiempo de incubación para lograr obtener una mejor tasa de biodegradación.

- Se propone llevar a cabo una investigación exhaustiva para identificar las enzimas que produce el consorcio microbiano para la biodegradación del plástico.
- Es recomendable realizar un estudio que permita determinar la curva de crecimiento y biodisponibilidad de las bacterias.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, M.-I., & Purcell, A. W. (2005). PEPTIDES. En P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)* (pp. 29–36). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00441-6>

Ali, S. S., Al-Tohamy, R., Koutra, E., El-Naggar, A. H., Kornaros, M., & Sun, J. (2021). Valorizing lignin-like dyes and textile dyeing wastewater by a newly constructed lipid-producing and lignin modifying oleaginous yeast consortium valued for biodiesel and bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 123575. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123575>

Ali, S. S., Al-Tohamy, R., Manni, A., Luz, F. C., Elsamahy, T., & Sun, J. (2019). Enhanced digestion of bio-pretreated sawdust using a novel bacterial consortium: Microbial community structure and methane-producing pathways. *Fuel*, 254, 115604. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.06.012>

Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., & Al-Sabri, A. E. (2015). Biodegradation of Low Density Polyethylene (Ldpe) by Mangrove Fungi from the Red Sea Coast. *Progress in Rubber, Plastics and Recycling Technology*, 31(2), 125–143. <https://doi.org/10.1177/147776061503100204>

Brandon, A. M., Gao, S.-H., Tian, R., Ning, D., Yang, S.-S., Zhou, J., Wu, W.-M., & Criddle, C. S. (2018). Biodegradation of Polyethylene and Plastic Mixtures in Mealworms (Larvae of *Tenebrio molitor*) and Effects on the Gut Microbiome. *Environmental Science & Technology*, 52(11), 6526–6533. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02301>

Cole-Parmer. (2021). UV Properties of Plastics: Transmission and Resistance from Cole-Parmer. from <https://www.coleparmer.com/tech-article/uv-properties-of-plastics>

Daéid, N. N. (2005). FORENSIC SCIENCES | Systematic Drug Identification. En P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science* (Second Edition) (pp. 471–480). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00197-7>

Dang, T. C. H., Nguyen, D. T., Thai, H., Nguyen, T. C., Tran, T. T. H., Le, V. H., Nguyen, V. H., Tran, X. B., Pham, T. P. T., Nguyen, T. G., & Nguyen, Q. T. (2018). *Plastic degradation by thermophilic Bacillus sp. BCBT21 isolated from composting agricultural residual in Vietnam*. 9(1), 015014. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aaabaf>

Devika, N. T., & Raman, K. (2019). Deciphering the metabolic capabilities of Bifidobacteria using genome-scale metabolic models. *Scientific Reports*, 9(1), 18222. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54696-9>

Diez, N., Triguero, J., & Bastidas, M. (2021). *Informe No. 21-141 PLASTICOS ECUATORIANOS S.A* (Núm. 21–141; p. 8). LEMAT.

EUMEPS. (2022). Construcción segura contra incendios con EPS. <https://www.construccion-eps.com/>

European Union. (2018). Restrictions on certain single-use plastics. https://ec.europa.eu/environment/topics/plastics/single-use-plastics/eu-restrictions-certain-single-use-plastics_en

European Commission. (2019). A European Green Deal Striving to Be the First Climate Neutral Continent [Text]. European Commission - European Commission. https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en

Ganesh Kumar, A., Anjana, K., Hinduja, M., Sujitha, K., & Dharani, G. (2020). Review on plastic wastes in marine environment – Biodegradation and biotechnological solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110733. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110733>

Ganesh Kumar, A., Hinduja, M., Sujitha, K., Nivedha Rajan, N., & Dharani, G. (2021). Biodegradation of polystyrene by deep-sea *Bacillus paralicheniformis* G1 and genome analysis. *Science of The Total Environment*, 774, 145002. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145002>

Gu, J.-D. (2007). Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(3), 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.08.010>

Ho, B. T., Roberts, T. K., & Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: The microbial approach. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 308–320. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1355293>

Houghton, R. A. (2008). Biomass. In S. E. Jørgensen & B. D. Fath (Eds.), *Encyclopedia of Ecology* (pp. 448–453). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00462-6>

INEC. (2019). Información ambiental en hogares ESPND 2019. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Hogares/Hogares%202019/MOD_AMB_HOGAR_ESPND_2019_11.pdf

Johansen, M. P., Cresswell, T., Davis, J., Howard, D. L., Howell, N. R., & Prentice, E. (2019). Biofilm-enhanced adsorption of strong and weak cations onto different microplastic sample types: Use of spectroscopy, microscopy and radiotracer methods. *Water Research*, 158, 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.029>

Kaplan, D., Hartenstein, R., & Sutter, J. (1979). Biodegradation of polystyrene, poly(methyl methacrylate), and phenol formaldehyde. *Applied and environmental microbiology*, 38, 551–553. <https://doi.org/10.1128/AEM.38.3.551-553.1979>

Kim, H.-W., Jo, J. H., Kim, Y.-B., Le, T.-K., Cho, C.-W., Yun, C.-H., Chi, W. S., & Yeom, S.-J. (2021). Biodegradation of polystyrene by bacteria from the soil in common environments. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 126239. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126239>

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>

Lobelle, D., & Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin*, 62(1), 197–200. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.10.013>

Lou, Y., Li, Y., Lu, B., Liu, Q., Yang, S.-S., Liu, B., Ren, N., Wu, W.-M., & Xing, D. (2021). Response of the yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) gut microbiome to diet shifts during polystyrene and polyethylene biodegradation. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 126222. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126222>

Matjašič, T., Simčič, T., Medvešček, N., Bajt, O., Dreo, T., & Mori, N. (2021). Critical evaluation of biodegradation studies on synthetic plastics through a systematic literature review. *Science of The Total Environment*, 752, 141959. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141959>

Milani, C., Lugli, G. A., Duranti, S., Turrone, F., Bottacini, F., Mangifesta, M., Sanchez, B., Viappiani, A., Mancabelli, L., Taminiau, B., Delcenserie, V., Barrangou, R., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2014). Genomic encyclopedia of type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(20), 6290–6302. <https://doi.org/10.1128/AEM.02308-14>

Moog, D., Schmitt, J., Senger, J., Zarzycki, J., Rexer, K.-H., Linne, U., Erb, T., & Maier, U. G. (2019). Using a marine microalga as a chassis for polyethylene terephthalate (PET) degradation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 171. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1220-z>

Moran, Susana. (2020). Nada frena los plásticos de un solo uso: más de 260.000 toneladas al año en Ecuador. Plan V <https://www.planv.com.ec/historias/sociedad/nada-frena-plasticos-un-solo-uso-mas-260000-toneladas-al-ano-ecuador>

Nathaniel, O., Sam, A. R. M., Lim, N. H. A. S., Adebisi, O., & Abdulkareem, M. (2020). Biogenic approach for concrete durability and sustainability using effective microorganisms: A review. *Construction and Building Materials*, 261, 119664. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.119664>

Novik, G., Meerovskaya, O., & Savich, V. (2017). Waste Degradation and Utilization by Lactic Acid Bacteria: Use of Lactic Acid Bacteria in Production of Food Additives, Bioenergy and Biogas. In *Food Additives*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69284>

Ru, J., Huo, Y., & Yang, Y. (2020). Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 442. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442>

Sanchez-Hernandez, J. C. (2021). A toxicological perspective of plastic biodegradation by insect larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 248, 109117. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109117>

Sarmah, P., & Rout, J. (2018). Algal colonization on polythene carry bags in a domestic solid waste dumping site of Silchar town in Assam. *Phykos*, 48, 67–77. Scopus.

Soares, J., Miguel, I., Venâncio, C., Lopes, I., & Oliveira, M. (2021). Public views on plastic pollution: Knowledge, perceived impacts, and pro-environmental behaviours. *Journal of Hazardous Materials*, 412, 125227. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125227>

Soluciones Integrales de Combustión. (2021, abril 9). Biogas, energía de futuro. Soluciones Integrales de Combustión. <https://solucionesdecombustion.com/biogas-energia-renovable-de-futuro/>

Song, B., & Hall, P. (2020). Densification of Biomass and Waste Plastic Blends as a Solid Fuel: Hazards, Advantages, and Perspectives. *Frontiers in Energy Research*, 8, 58. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.00058>

Steffen, W., Summerhayes, C., Wagreich, M., Williams, M., Wolfe, A. P., & Yonah, Y. (2016). The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene*, 13, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.ancene.2016.01.002>

Subramani, M., & Umamaheswari, S. (2016). FTIR analysis of bacterial mediated chemical changes in Polystyrene foam. *Meenashi Subramani and Umamaheswari Sepperumal*, 7, 55–61

Taghavi, N., Singhal, N., Zhuang, W.-Q., & Baroutian, S. (2021). Degradation of plastic waste using stimulated and naturally occurring microbial strains. *Chemosphere*, 263, 127975. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127975>

Taghavi, N., Zhuang, W.-Q., & Baroutian, S. (2021). Enhanced biodegradation of non-biodegradable plastics by UV radiation: Part 1. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(6), 106464. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106464>

Towett, Gideon.(2016). What are effective microorganisms? *Permaculture News*. Permaculture Research Institute. <https://www.permaculturenews.org/2016/01/19/what-are-effective-microorganisms/>

Tsochatzis, E. D., Berggreen, I. E., Nørgaard, J. V., Theodoridis, G., & Dalsgaard, T. K. (2021). Biodegradation of expanded polystyrene by mealworm larvae under different feeding strategies evaluated by metabolic profiling using GC-TOF-MS. *Chemosphere*, 281, 130840. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130840>

Xu, W., Mawolo, P. Y., Gao, J., Chu, L., Wang, Y., Nie, Z., Song, L., Shao, N., Gao, J., Xu, P., & Xu, G. (2021). Effects of supplemental effective microorganisms in feed on the growth, immunity, and appetite regulation in juvenile GIFT tilapia. *Aquaculture Reports*, 19, 100577. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100577>

United Nations Environment. (2019). Our planet is drowning in plastic pollution. This World Environment Day, it's time for a change. From <https://www.unep.org/interactive/beat-plastic-pollution/>

Yan, F., & Polk, D. B. (2011). Probiotics and immune health. *Current opinion in gastroenterology*, 27(6), 496–501. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834baa4d>

Yang, Y., Wang, J., & Xia, M. (2020). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating superworms *Zophobas atratus*. *Science of The Total Environment*, 708, 135233. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135233>

Yang, Y., Wang, J., & Xia, M. (2020). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating superworms *Zophobas atratus*. *Science of The Total Environment*, 708, 135233. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135233>

Zalasiewicz, J., Waters, C. N., Ivar do Sul, J. A., Corcoran, P. L., Barnosky, A. D., Cearreta, A., Edgeworth, M., Gałuszka, A., Jeandel, C., Leinfelder, R., McNeill, J. R., Zhao, S., Zettler, E. R., Amaral-Zettler, L. A., & Mincer, T. J. (2021). Microbial carrying capacity and carbon biomass of plastic marine debris. *The ISME Journal*, 15(1), 67–77. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00756-2>