

TESIS DE LICENCIATURA

**CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS AISLADOS
DE AMBIENTES CONTAMINADOS PARA SU APLICACIÓN EN
PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN**

Denaro, María Azul – LU 1100026

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Bernabeu, Pamela Romina, INTEC - UADE

Co-Tutor:

Lacava, Judith Elizabeth, INTEC - UADE

2023

UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

A mi tutora, Pamela y a mi co-tutora, Judith, gracias por sus enseñanzas y acompañamiento desde el primer día, por las tantas horas compartidas, por su paciencia y dedicación, por estar para celebrar cada logro y afrontar los desafíos que se presentaron en el desarrollo de este trabajo.

A los técnicos del laboratorio Guillermina, Carla, Lucas y Pablo, por su buena predisposición para enseñarme a utilizar los equipos.

A los investigadores del Instituto de Tecnología de la Universidad, Marta, Santiago y Verónica, por sus consejos.

A UADE, por permitirme realizar la tesis en sus instalaciones y darme la posibilidad de conocer personas increíbles a lo largo de la cursada y proyectos de investigación, en especial, Eze, Cata, Flor y Agus.

A mi familia, por acompañarme en cada etapa desde que inicié la carrera hasta el día de hoy, en especial, mis papás y mi hermano Martín, por estar con las palabras justas para cada momento.

A todos los profesores que conocí en la carrera, gracias por aconsejarme en tantas ocasiones y transmitir sus conocimientos con tanta pasión. A Luis Crivaro, Pablo Rosito, Leandro Tosar, Silvina Nuñez.

A mis amigas, Ro y Delfi, por ser parte del proceso, por motivarme y acompañarme en las buenas y en las malas.

A Miguel Langman, en representación de Arlanco SRL, quien nos brindó el plástico para utilizar en los ensayos.

A Mariela Fernández y Matías Gauna del CETMIC que nos dieron la posibilidad de usar el equipo de microscopía electrónica.

Gracias a cada uno de ustedes fue posible llegar a esta instancia.

Gracias a todos, de corazón.

Resumen

El avance de la industrialización y globalización ha ido deteriorando los entornos naturales al introducir componentes que comprometen el funcionamiento holístico del ambiente. Por un lado, están los plásticos que, si bien poseen una amplia variedad de aplicaciones en la vida diaria del ser humano, generan residuos cuya disposición final no es gestionada adecuadamente. Por otro lado, como consecuencia de determinadas actividades antrópicas, se liberan al ambiente elementos conocidos como metales pesados, cuya toxicidad afecta tanto a la salud humana como a la mayoría de formas de vida. A pesar de que los plásticos y los metales pesados suelen pertenecer a clases diferentes de contaminantes, los vertederos de residuos pueden ser el espacio en común entre estos. En este trabajo se propuso el estudio de la biorreducción de metales pesados y el análisis de la biodegradación de plásticos mediada por bacterias nativas con potencial capacidad biorremediadora. Para ello, se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos a partir de muestras ambientales con presencia de ambos contaminantes y luego fueron agrupados según su morfología y sus características metabólicas. En función de los resultados obtenidos, el criterio determinante para decidir con qué bacterias continuar los ensayos fue la evaluación de formación de *biofilm*. Esta capacidad es reportada como el paso inicial en el proceso de biodegradación de plásticos. Al seleccionar las mejores 5 bacterias que presentaron elevada formación de *biofilm*, se les evaluó la capacidad de biodegradar polipropileno en un periodo de 40 días. Al mismo tiempo, en un ensayo independiente se evaluó la capacidad de estas bacterias de crecer a distintas concentraciones de cromo y su capacidad biorreductora del metal pesado. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los sistemas compuestos por microorganismo-polipropileno y microorganismo-cromo, se seleccionaron a los mejores 3 microorganismos para evaluar su crecimiento en sistemas diseñados con los dos contaminantes. El polipropileno fue biodegradado en las condiciones establecidas. Los microorganismos fueron identificados por secuenciación parcial del gen rRNA 16S. Los resultados indicaron que 2 de éstos pertenecen al género *Stenotrophomonas* y el tercero a *Lysinibacillus*. Estos géneros han sido reportados como biodegradadores de polipropileno, no así sumando la presencia de otros contaminantes de origen antrópico. Los resultados expuestos en el trabajo pueden servir de puntapié inicial para nuevos estudios que permitan a futuro la aplicación de microorganismos nativos de ambientes contaminados en procesos de biorremediación.

Abstract

The advance of industrialisation and globalization has been deteriorating natural environments by introducing components that compromise the holistic functioning of the environment. On the one hand, there are plastics which, although they have a wide variety of applications in human daily life, generate waste whose final disposal is not adequately managed. On the other hand, as a consequence of certain anthropogenic activities, elements known as heavy metals are released into the environment, whose toxicity affects both human health and most forms of life. Although plastics and heavy metals often belong to different classes of pollutants, waste landfills may be the common ground between them. In this work it is proposed to study the bioreduction of heavy metals and to analyze the biodegradation of plastics mediated by native bacteria with potential bioremediation capacity. For this purpose, microorganisms were isolated from environmental samples with the presence of both pollutants and then grouped according to their morphology and metabolic characteristics. Based on the results obtained, the decisive criterion for deciding which bacteria to continue the tests with was the evaluation of biofilm formation. This capacity is reported to be the initial step in the process of biodegradation of plastics. By selecting the best 5 bacteria that showed high biofilm formation, they were evaluated for their ability to biodegrade polypropylene over a period of 40 days. At the same time, the ability of these bacteria to grow at different chromium concentrations and their ability to bioreduce the heavy metal was evaluated in a separate test. Taking into account the results obtained from the microorganism-polypropylene and microorganism-chromium systems, the best 3 microorganisms were selected to evaluate their growth in systems designed with the two pollutants. Polypropylene was biodegraded under the established conditions. The microorganisms were identified by partial sequencing of 16S rRNA gene. The results indicated that two of these belong to the genus *Stenotrophomonas* and the third to *Lysinibacillus*. These genera have been reported as polypropylene biodegraders, but not in presence of other contaminants of anthropogenic origin. The results presented in this work may serve as a starting point for new studies that will allow the future application of native microorganisms from contaminated environments in bioremediation processes.

Contenidos

1. Introducción	8
1.1. Interacciones entre microorganismos y contaminantes	8
1.2. Metales pesados	9
1.2.1. Definición y características	9
1.2.2. Especiación de metales pesados	9
1.2.3. Contaminación por metales pesados	10
1.2.4. Estudios relacionados a la presencia de metales pesados en el ambiente	11
1.2.5. Cromo en el ambiente	12
1.3. Interacciones entre microorganismos y metales pesados	12
1.4. Plásticos	13
1.4.1. Definición y propiedades	13
1.4.2. Contaminación por plásticos	14
1.4.3. Estudios relacionados a la presencia de plásticos en el ambiente	15
1.4.4. Producción de plástico a nivel global: polipropileno en el ambiente	16
1.5. Biodegradación de plásticos	18
1.5.1. Formación de <i>biofilm</i> en la superficie del plástico	18
1.5.2. Factores que influyen en la biodegradación de plásticos	19
1.6. Interacciones entre plásticos y metales pesados	20
2. Hipótesis de trabajo	22
3. Objetivos	23
3.1. Objetivo general	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. Metodología	24
4.1. Búsqueda de partículas plásticas en muestras ambientales	24
4.2. Aislamiento y caracterización metabólica de microorganismos	24
4.2.1. Enriquecimiento de muestras ambientales y aislamiento de microorganismos	24
4.2.2. Agrupación de aislamientos según su morfología y características metabólicas	25
4.3. Evaluación de la formación de <i>biofilm</i> de las bacterias seleccionadas	28

4.4. Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno como única fuente de carbono y energía	30
4.5. Cultivo de bacterias en presencia de cromo	33
4.5.1. Ensayo de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de Cr ⁶⁺	33
4.5.2. Evaluación de la detoxificación biológica de Cr ⁶⁺	33
4.6. Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno y Cr ⁶⁺	36
4.7. Identificación de las bacterias mediante secuenciación parcial del gen rRNA 16S	36
4.8. Análisis estadístico	37
5. Resultados y discusiones	38
5.1. Búsqueda de partículas plásticas en muestras ambientales	38
5.2. Aislamiento de microorganismos de muestras ambientales	38
5.3. Caracterización de los microorganismos aislados	39
5.4. Evaluación de la formación de <i>biofilm</i> de las bacterias seleccionadas	40
5.5. Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno	41
5.5.1. Crecimiento bacteriano en presencia de polipropileno	41
5.5.2. Análisis cuantitativo de los cambios en el polipropileno	42
5.5.3. Análisis cualitativo de los cambios en el polipropileno	44
5.6. Cultivo de bacterias en presencia de cromo	45
5.6.1. Ensayo de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de Cr ⁶⁺	45
5.6.2. Evaluación de la detoxificación biológica de Cr ⁶⁺	46
5.7. Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno y cromo	49
5.7.1. Recuento bacteriano en presencia de polipropileno y Cr ⁶⁺	50
5.7.2. Análisis cuantitativo de los cambios en el polipropileno en presencia de Cr ⁶⁺	50
5.7.3. Capacidad biorreductora de Cr ⁶⁺ en presencia de polipropileno	52
5.8. Identificación de las bacterias mediante secuenciación parcial del gen rRNA 16S	53
6. Conclusión	57
7. Bibliografía	59
8. Anexos	68
8.1. Anexo A	68

8.2. Anexo B	71
8.3. Anexo C	73

1. Introducción

El avance de la industrialización y globalización ha ido deteriorando los entornos naturales al introducir componentes que comprometen el funcionamiento holístico del ambiente (Masindi y Muedi, 2018). Entre estos componentes se encuentran los metales pesados, elementos químicos que se han ido acumulando gradualmente en la naturaleza debido principalmente a la descarga directa e indirecta en efluentes industriales (Kumari *et al.* 2016). Otro componente que abunda en el ambiente son los plásticos, debido a la ausencia de infraestructuras eficaces de gestión de residuos (Chamas *et al.* 2020).

Estos componentes persisten en el ambiente debido a la lenta velocidad de degradación de los plásticos en condiciones naturales (Zhang *et al.* 2020) y a que los metales pesados son especies químicas no degradables (Vullo, 2003). De esta manera, tienden a acumularse en plantas y animales, fenómeno conocido como bioacumulación (Gambarini *et al.* 2022; Masindi y Muedi, 2018). La bioacumulación conduce a la biomagnificación, generando daños al resto de los animales que se alimentan de ellos y perjudicando a los siguientes eslabones de la cadena alimentaria (Ajith *et al.* 2020; Shah y Kumar, 2022).

A pesar de los impactos negativos que generan hacia los ecosistemas, los metales pesados y los plásticos forman parte de nuestro presente y seguirán afectando nuestro futuro (Nuss y Eckelman, 2014). Esto es motivo de preocupación a nivel mundial, por lo que son necesarias soluciones innovadoras y sostenibles que contribuyan a la reducción de dicho impacto ambiental (Masindi y Muedi, 2018; Plastics Europe, 2020).

1.1. Interacciones entre microorganismos y contaminantes

Una alternativa sostenible capaz de contribuir a la disminución del impacto ambiental generado como consecuencia de actividades antrópicas es la biorremediación. La biorremediación es una tecnología innovadora y prometedora que puede ser utilizada para la eliminación y/o recuperación de sustancias contaminantes presentes en el ambiente (Lynch y Moffat, 2015). Su aplicación consiste en emplear distintos procesos biológicos que implican el uso de microorganismos y/o enzimas catalíticas (Anani y Adetunji, 2021; Dixit *et al.* 2015). En el presente

trabajo se propone el estudio de la biorreducción de metales pesados y el análisis de la biodegradación de plásticos mediada por especies nativas de ambientes contaminados con potencial capacidad biorremediadora.

1.2. Metales pesados

1.2.1. Definición y características

Los metales pesados son aquellos elementos cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua (Argentina.gob.ar, 2022). Estos elementos son extraídos de yacimientos mineros y utilizados para fabricar todo tipo de productos de uso cotidiano. Cuentan con una amplia variedad de aplicaciones, estando presentes en mayor o menor medida en pilas y aparatos electrónicos. Asimismo, existen dispositivos y actividades comunes que pueden ser fuentes de metales pesados como algunos termómetros, tensiómetros, pirotecnia, combustibles fósiles, entre otros (Argentina.gob.ar, 2022).

Los metales pesados más comunes son el plomo (Pb), níquel (Ni), cromo (Cr), cadmio (Cd), arsénico (As), mercurio (Hg), zinc (Zn) y cobre (Cu). Aunque estos pueden encontrarse en muy bajas concentraciones en la naturaleza e incluso ser fundamentales para procesos biológicos de los seres vivos (por ejemplo, el Cr, Zn y Ni, entre otros); existen otros que aún a bajas concentraciones son altamente tóxicos, incluidos el Cd, Pb y Hg, entre otros (Navarro-Aviñó *et al.* 2007). La exposición prolongada de los seres humanos a estos genera graves problemas de salud, al mismo tiempo que también compromete a la fauna y flora circundante (Masindi y Muedi, 2018).

1.2.2. Especiación de metales pesados

Estos compuestos pueden adoptar formas físicas y químicas particulares, concepto conocido como especiación. En medio acuoso, estos pueden adquirir forma particulada o disuelta (de Paiva Magalhães *et al.* 2015):

- **Forma particulada.** En este caso, los elementos no suelen estar biodisponibles. Pueden estar adsorbidos sobre sedimentos, acomplejados o incluso suspendidos en materia orgánica particulada.

- **Forma disuelta.** A diferencia de la forma particulada, esta promueve la biodisponibilidad de los elementos debido a su movilidad, manteniendo una relación directamente proporcional al grado de toxicidad que genera.

Los principales parámetros que influyen la especiación química de los metales pesados son el pH, el potencial óxido-reducción del sistema y la correspondiente concentración del metal en solución (de Paiva Magalhães *et al.* 2015):

- **pH.** Valores de pH alcalinos pueden promover la precipitación de los metales, disminuyendo su biodisponibilidad y toxicidad. Contrariamente, valores de pH ácidos determinan el grado de disociación de los metales, provocando un aumento de la solubilidad y toxicidad de los mismos.
- **Potencial de óxido-reducción del sistema.** En condiciones oxidantes y a valores de pH mayores a 5,5, algunas especies metálicas como el cromo reaccionan con el agua produciendo óxidos e hidróxidos de baja solubilidad. Por otro lado, en condiciones reductoras y a valores de pH menores a 7, la solubilidad de algunos metales aumenta al promover la generación de cationes solubles, generalmente de bajo número de oxidación.
- **Concentración del metal pesado en solución.** A mayor concentración del metal pesado, más tóxico es. A mayor toxicidad, menor posibilidad de crecimiento microbiano, lo que genera una disminución en la capacidad de especiación química del metal.

1.2.3. Contaminación por metales pesados

La presencia de metales pesados en el ambiente puede deberse a fenómenos naturales, así como también a actividades de origen antrópico, siendo más contaminantes estas últimas respecto de las primeras. Entre las fuentes naturales que liberan metales pesados al ambiente se encuentran las erupciones volcánicas, los incendios forestales e incluso la erosión del suelo o rocas (Masindi

y Muedi, 2018). Por otro lado, dentro de las actividades antropogénicas se encuentran distintas industrias, tales como la textil, la metalúrgica, la papelera, la de plásticos, la farmacéutica, la minera, la de curtiembre, la de pinturas y barnices, entre otras (Okerefor *et al.* 2020).

1.2.4. Estudios relacionados a la presencia de metales pesados en el ambiente

La contaminación por metales es muy frecuente en ambientes acuáticos de zonas urbano-industriales de todo el mundo. Basílico *et al.* (2022) destacan que la región metropolitana de Buenos Aires es una de las metrópolis más pobladas a nivel mundial que presenta esta problemática en sus ríos, arroyos y humedales como consecuencia del vertido de efluentes líquidos y de la escorrentía urbana. Esta región se asienta sobre cuencas hidrológicas, entre ellas las cuencas de los ríos Luján, Reconquista, Matanza-Riachuelo, del Bajo Delta del Río Paraná y del Río de la Plata. Existen estudios que evidenciaron contaminación por metales pesados en estos sitios, tales como:

- La Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo (ACUMAR, 2012) presentó un estudio en donde se identificaron 18.630 industrias pertenecientes a la cuenca, de las cuales 1.570 fueron declaradas como agentes contaminantes y al menos el 3% de estas vierten Cr en sus efluentes.
- Avigliano *et al.* (2019) analizaron la concentración de distintos metales pesados en agua, sedimentos y órganos de peces correspondientes a las áreas de mayor relevancia a nivel comercial distribuidas a lo largo de la Cuenca del Plata, siendo estas el Río Alto Paraná, Río Paraná Medio y el Estuario del Río de la Plata. Las concentraciones halladas de Cu y Cr en los sedimentos de todos los sitios superaron los límites establecidos como perjudiciales para la vida acuática.
- Menone y de Mello (2020) destacan que en algunos tramos del Bajo Delta del Río Paraná se han detectado altas concentraciones de metales pesados, entre ellos Cu, Cr, Ni, Pb, Cd y As, como consecuencia del vertido de aguas residuales domésticas parcialmente tratadas y de descargas de actividades industriales y agrícolas.

1.2.5. Cromo en el ambiente

Dentro de las principales propiedades del cromo se destacan su alto punto de fusión y su elevada resistencia a la corrosión, a la deformación y al desgaste/deterioro (Argentina.gob.ar, 2022). Al mismo tiempo que el cromo ingresa por descargas industriales ya sea para la fabricación de aleaciones, la elaboración de vehículos, así como también en curtiembre de cueros, existen otras fuentes de contaminación por este metal, como lo es a través de los lixiviados de vertedero (Gómez *et al.* 2016).

Los efectos del cromo dependen de su estado de oxidación. En la naturaleza, el cromo se encuentra principalmente en dos formas: su forma trivalente, Cr^{3+} , que es relativamente inocua, y la forma hexavalente, Cr^{6+} , considerada una especie tóxica y con alta solubilidad en agua (Ramírez-Díaz *et al.* 2009). El Cr^{6+} existe en forma de anión soluble en agua, el cual puede encontrarse como oxianión hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), dependiendo del pH del medio. Por otra parte, la mayoría de los derivados del Cr^{3+} existen en el ambiente formando complejos estables con ligandos orgánicos o inorgánicos y son menos móviles en comparación con las formas que puede adoptar el Cr^{6+} . Para la transformación del Cr^{6+} a su estado inocuo se han desarrollado diversos métodos físicos y químicos tales como reducción y precipitación química, adsorción, intercambio iónico, ósmosis inversa, electrodiálisis, entre otros (Rueda *et al.* 2017). Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos son costosos y algunos presentan desventajas como la remoción incompleta de metales, alto consumo de reactivos, alto requerimiento energético y la generación de residuos secundarios (Rueda *et al.* 2017).

1.3. Interacciones entre microorganismos y metales pesados

Como parte del metabolismo secundario, algunos microorganismos tienen la capacidad natural de transformar o acumular una variedad de compuestos, incluidos los metales pesados (Kale *et al.* 2015). En el caso particular del cromo, si bien el Cr^{3+} en el ambiente es relativamente inocuo, en el interior de las células es altamente tóxico ya que puede unirse a proteínas y al ADN. Como fue mencionado previamente, el Cr^{6+} en el ambiente se encuentra en forma de iones cromato o dicromato, que tienen la capacidad de atravesar fácilmente la membrana plasmática. Para poder crecer en ambientes con presencia de cromo, muchas bacterias presentan enzimas denominadas

cromato reductasas, que convierten el Cr^{6+} que ingresa a las células en Cr^{3+} (Ramírez-Díaz *et al.* 2009). Este último es luego liberado al medio. Por lo tanto, estos microorganismos con capacidad biorreductora de cromo tienen un potencial uso en la biorremediación de la contaminación por cromo.

1.4. Plásticos

1.4.1. Definición y propiedades

Los plásticos son polímeros orgánicos sintéticos o semisintéticos derivados del petróleo (Andrady, 2011). La palabra *polímero* proviene de dos palabras griegas: *poli*, que significa *muchos*, y *meros*, que significa *partes o unidades* (Science History Institute, 2021). De esta manera, los polímeros son grandes moléculas formadas por unidades moleculares repetitivas conocidas como monómeros (Crawford y Martin, 2020). Machovsky-Capuska *et al.* (2019) categorizan a los plásticos según su tamaño en megaplásticos (>100 mm), macroplásticos (>20–100 mm), mesoplásticos (5–20 mm) y microplásticos (MPs) (<5 mm).

Las propiedades del plástico se pueden clasificar en dos categorías principales: físicas y químicas. Las propiedades físicas son medibles, observables y al mismo tiempo dependientes de la estructura del plástico. Algunas de las propiedades físicas más importantes de estos polímeros son (Crawford y Martin, 2020):

- **Apariencia.** Características visuales como el color, el brillo, la opacidad y el amarillamiento.
- **Temperatura de fusión.** Los plásticos funden a baja temperatura.
- **Densidad.** En general, los plásticos tienen una densidad más alta cuando cristalizan debido al empaquetamiento más cercano de las moléculas en comparación con los plásticos amorfos (estos adoptan una estructura molecular aleatoria al cristalizar). Por lo tanto, cuanto más amorfa sea su estructura molecular, menor será su densidad.
- **Impermeabilidad.** Impide el pasaje de líquidos.

- **Ductilidad.** Indica si un material puede deformarse plásticamente sin romperse.
- **Resistencia.** Fuerza máxima que se le puede ejercer a un material sin que se produzca fractura.
- **Tenacidad.** Es la capacidad de un material de absorber energía antes de la fractura. Un material tenaz tiene alta ductilidad y resistencia. Los plásticos con alta tenacidad no son biodegradables ni fáciles de reciclar.

Las propiedades químicas de los plásticos se ven afectadas debido a reacciones químicas o cambios en los enlaces químicos que conforman dichos polímeros (Bonten, 2019; Crawford y Martin, 2020):

- **Degradación.** Pérdida de la estructura molecular a través de reacciones químicas que dan lugar a la ruptura de los enlaces primarios en el polímero.
- **Solubilidad.** Pérdida de la estructura molecular del polímero al ser sometido a diferentes solventes.

Las mismas propiedades que hacen que los plásticos sean tan versátiles para los humanos también han creado una amenaza emergente para el ambiente (Gambarini *et al.* 2022; Thompson *et al.* 2009).

1.4.2. Contaminación por plásticos

Desde diciembre de 2019, el mundo se ha visto afectado por una pandemia originada por un nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) responsable de un síndrome respiratorio severo conocido como COVID-19 (World Health Organization, 2020). A raíz de esto, las tendencias en la producción de plásticos y la generación de residuos se vieron temporalmente interrumpidas, reanudándose en 2021 a medida que la actividad económica se recuperaba (OECD, 2022). Sin embargo, un reciente estudio de Silva *et al.* (2021) plantea que la cantidad de desechos plásticos presentes en el ambiente en los próximos años se verá agravada por el uso y consumo excesivo de

plásticos de un solo uso (incluidos los elementos de protección personal, como máscaras y guantes) como consecuencia de la pandemia. En relación con lo antes mencionado, Abu-Qdais *et al.* (2020) señala que el Hospital Universitario Rey Abdullah en Jordania produjo diez veces más desechos médicos que la tasa de generación durante el día operativo normal del hospital (aproximadamente 650 kg por día). Los efectos negativos a corto plazo son parte de los problemas ambientales actuales, agravando su impacto en los ecosistemas naturales y comprometiendo posibles medidas de remediación (Silva *et al.* 2021).

1.4.3. Estudios relacionados a la presencia de plásticos en el ambiente

La contaminación por plásticos es frecuente tanto en entornos terrestres como en acuáticos, incluidos lugares urbanos, rurales y remotos (Hartmann *et al.* 2019). Si bien se han realizado muchos estudios de identificación y caracterización de plásticos en ambientes marinos, Pazos *et al.* (2017) plantean que las investigaciones en ecosistemas de agua dulce son escasas.

Además de la contaminación por metales comentada anteriormente (Basílico *et al.* 2022), en la región metropolitana de Buenos Aires existe evidencia de la presencia de plásticos en las orillas pertenecientes a las cuencas que la conforman. Algunas de las investigaciones asociadas a esta problemática corresponden a los siguientes autores:

- Blettler *et al.* (2017) estimaron por primera vez la distribución espacial, tipos y características de MPs hallados en sedimentos costeros en el lago Setúbal, ubicado en la provincia de Santa Fe, uno de los lagos de llanura aluvial más grandes del Río Paraná. Los MPs blancos/transparentes fueron los predominantes. La fuente principal de los plásticos hallados fue de residuos domésticos por sobre los industriales, lo cual resalta la importancia de aplicar estrategias de sensibilización de los consumidores en la región.
- Mitchell *et al.* (2021) cuantificaron y caracterizaron los macro-, meso- y MPs hallados en playas ribereñas cercanas a la ciudad de Rosario. Esta es la ciudad más poblada de la costa del Bajo Delta del Río Paraná. Los resultados demostraron que las costas de la ciudad se encuentran significativamente más contaminadas que las costas de los humedales.

- Lacava *et al.* (2022) evaluaron la presencia de MPs en sedimento costero de playas distribuidas a lo largo de la costa del Río de la Plata, demostrando su incidencia en cada uno de los sitios muestreados, correspondientes a las zonas de Puerto Madero, Quilmes y Vicente López. En función de los resultados obtenidos fue posible asociar la morfología de MP hallado a su fuente. De esta manera, los MPs de forma esférica, conocidos como microperlas, se asociaron a efluentes domésticos e industriales descargados directamente al río y la presencia de MPs de aspecto similar a un hilo, conocidos como fibras, se asociaron a actividades deportivas, como la pesca.

1.4.4. Producción de plástico a nivel global: polipropileno en el ambiente

Gracias a sus propiedades, los plásticos poseen una amplia variedad de aplicaciones, siendo comúnmente empleados para envasado, transporte, construcción, agricultura, artículos para el hogar, productos electrónicos y textiles (Clunies-Ross, 2019). Además, son prácticos y económicos, por lo que se han integrado fácilmente en la vida diaria del ser humano (Ajith *et al.* 2020; Ghosh *et al.* 2013).

El informe publicado en febrero de 2022 sobre *Perspectivas mundiales de los plásticos* (OECD, 2022) reveló que la producción anual de plásticos pasó de 2 millones de toneladas (Mt) en 1950 a 460 Mt en 2019. De dicha cifra de producción alcanzada en 2019, el polipropileno (PP) fue el segundo tipo de plástico con mayor uso (Fig. 1).

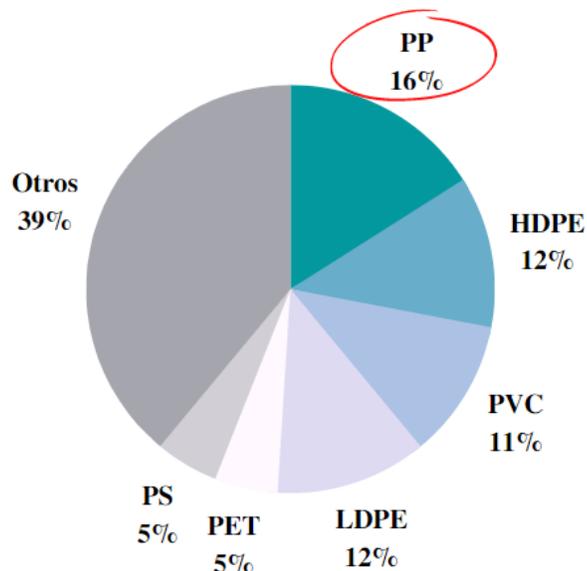


Figura 1. Categorización de las 460 Mt de polímeros producidas en 2019 en función de su uso. PET: Polietileno Tereftalato, HDPE: Polietileno de alta densidad, PVC: Policloruro de vinilo, LDPE: Polietileno de baja densidad, PP: Polipropileno, PS: Poliestireno. Fuente: adaptado de OECD (2022).

A pesar de su clasificación según el tipo de resina por la Sociedad de la Industria de Plásticos (SPI), polímeros de distinta categoría pueden ser empleados para una misma función (Clunie-Ross, 2019). Hacia el año 2060, se proyecta una duplicación en el uso de polímeros para envasado, tales como LDPE, HDPE, PET y PP, al mismo tiempo que se estima un incremento sustancial en el uso de polímeros en la producción de vehículos, en especial el PP (OECD, 2022).

Por otro lado, en las últimas décadas se registró una duplicación de la generación de residuos, pasando de 156 Mt en 2000 a 353 Mt en 2019 (OECD, 2022). La mitad de dichos residuos generados fue depositada en vertederos (Fig. 2). Al margen de los tratamientos convencionales, el 22% del total de residuos se gestionó inadecuadamente, terminando en vertederos incontrolados o siendo quemados al aire libre, lo que provocó fugas en el ambiente (OECD, 2022).

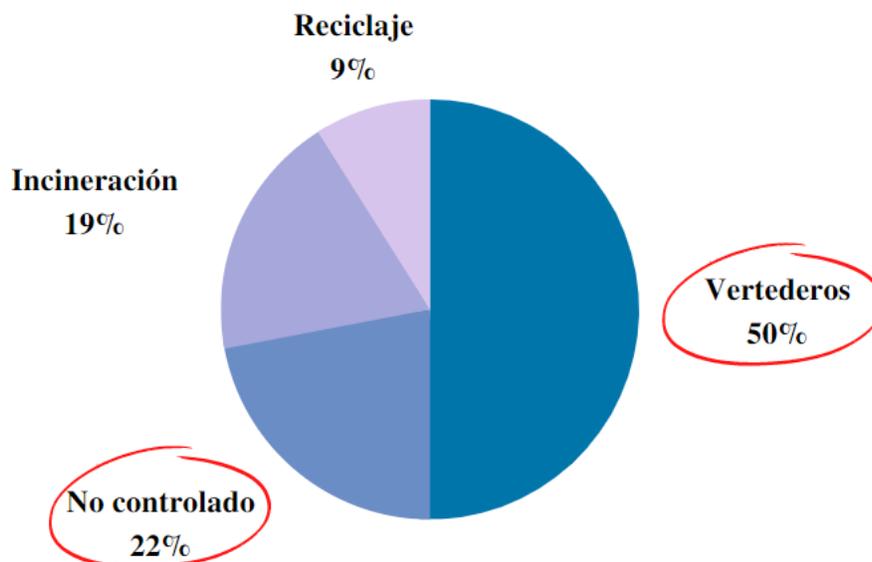


Figura 2. Tratamiento de las 353 Mt de desechos plásticos generadas en 2019. Fuente: adaptado de OECD (2022).

En la práctica, el vertido en relleno sanitario es el método más común de disposición final de residuos; sin embargo, el plástico puede permanecer durante muchos siglos en el ambiente sin algún tipo de transformación, alterando la fertilidad de la tierra y causando un efecto perjudicial para los habitantes locales (Hopewell *et al.* 2009; Wierckx *et al.* 2015).

A pesar de las recientes iniciativas políticas para gestionar la producción de plástico y generación de residuos, “*el ciclo de vida de los plásticos sólo es circular en un 9%*” (OECD, 2022).

1.5. Biodegradación de plásticos

1.5.1. Formación de biofilm en la superficie del plástico

Los sitios contaminados con plásticos albergan distintas comunidades microbianas, entre ellas, potenciales degradadoras del polímero. La etapa inicial en el proceso de biodegradación de plásticos es la producción de enzimas catalíticas activas por parte de los microorganismos, lo cual lleva a la generación de *biofilms* sobre la superficie del material sintético (Anjana *et al.* 2020). Esta secreción de endoenzimas, exoenzimas y exopolisacáridos (EPS) conduce al biodeterioro y a la biofragmentación al desestabilizar el esqueleto carbonado del polímero. De esta manera, promueve

su descomposición en oligómeros, dímeros y monómeros (Kirstein *et al.* 2019). Por lo tanto, la hidrólisis de la cadena carbonada resulta en la disminución del peso molecular del polímero y, al mismo tiempo, exhibe propiedades mecánicas débiles, siendo más accesible para una mayor asimilación microbiana como fuente de carbono y energía (Aamer *et al.* 2009).

A su vez, el sistema enzimático presente dará lugar a la conversión del polímero en intermediarios orgánicos como ácidos, alcoholes y cetonas (Arutchelvi *et al.* 2008). Por ende, los productos que se obtienen al final del proceso dependen directamente del metabolismo que los microorganismos poseen: si presentara metabolismo aeróbico, generará dióxido de carbono y agua (Starnecker y Menner, 1996) y si fuese anaeróbico, dará como resultado dióxido de carbono, agua y metano (Gu *et al.* 2000).

1.5.2. Factores que influyen en la biodegradación de plásticos

La biodegradabilidad del plástico no se define únicamente por la composición química a nivel molecular, sino que se ve influenciada por la participación de diversos factores que dan lugar al fenómeno de biodegradación. Estos factores que impulsan la degradación del polímero son complejos, principalmente debido a la naturaleza hidrofóbica del material, su alto peso molecular y su estructura tridimensional, que restringen la disponibilidad de interacción con los microorganismos (Hadad *et al.* 2005). Por este motivo, los factores que influyen en la biodegradación del plástico pueden asociarse en tres categorías principales:

- **Propiedades del polímero.** Las propiedades químicas y físicas del plástico influyen directamente en la biodegradabilidad de éste. Según Kale *et al.* (2015), la disminución del peso molecular favorece la biodegradación y, generalmente, ocurre lo mismo con la disminución de la temperatura de fusión. Por otro lado, el uso de aditivos, antioxidantes y estabilizadores en la fabricación de polímeros pueden ralentizar la velocidad de degradación e incluso ser tóxicos para los microorganismos (Arutchelvi *et al.* 2008). Factores dinámicos como la cristalinidad, orientación y movilidad molecular, tipo de grupos funcionales y sustituyentes añadidos repercuten en el grado de degradabilidad del polímero (Min *et al.* 2015).

- **Condiciones ambientales.** Los parámetros ambientales como la humedad, la temperatura, el pH, la salinidad, la presencia o ausencia de oxígeno, la luz solar, el agua, el estrés y las condiciones de cultivo afectan la degradación del polímero al provocar cambios en las propiedades físicas y químicas del mismo (Gu, 2003). Al mismo tiempo, estos parámetros influyen de manera crucial en la población microbiana y la actividad enzimática (Kale *et al.* 2015).
- **Componentes del entorno.** La capacidad de sorción de contaminantes en los plásticos se ve influenciada principalmente por la relación superficie/volumen del polímero, ya que, a medida que disminuye el tamaño de las partículas plásticas, aumenta la posibilidad de interacción (Liu, X. *et al.* 2018; Liu, Y. *et al.* 2018). A su vez, la continua exposición a las condiciones ambientales conduce a cambios morfológicos en la superficie de los mismos (Cai *et al.* 2018; Hüffer *et al.* 2018). De esta manera, los fragmentos plásticos con superficie rugosa, forma irregular y estructura porosa tendrán mayor área específica y altas afinidades de sorción por los contaminantes en comparación con partículas plásticas vírgenes (Guo y Wang, 2019).

La combinación de estos factores, junto con la polaridad de cada componente presente en el entorno, permitiría la acumulación de contaminantes de diferente origen, incluyendo contaminantes inorgánicos (Brennecke *et al.* 2016; Hodson *et al.* 2017; Holmes *et al.* 2014).

1.6. Interacciones entre plásticos y metales pesados

Si bien los metales pesados y los plásticos suelen pertenecer a clases diferentes de contaminantes, existen estudios que evidencian la interacción entre sí bajo el fenómeno de adsorción que ocurre en presencia de metales sobre la superficie del plástico (Brennecke *et al.* 2016; Li *et al.* 2018; Richard *et al.* 2019; Sun *et al.* 2019; Vedolin *et al.* 2018).

Según Brennecke *et al.* (2016), las condiciones del entorno parecen influir más que el tipo de plástico en las capacidades de sorción de contaminantes. Por este motivo es que, a pesar de que el plástico no posea carga inherente o porosidad significativa, los procesos abióticos a los que esté

expuesto generarán cambios sobre la superficie del polímero. El pH es uno de los factores externos que puede modificar los comportamientos de sorción como consecuencia del cambio en la electronegatividad de las partículas plásticas (Xu *et al.* 2018). Si bien en soluciones ácidas la superficie del polímero se encuentra protonada (Wang *et al.* 2016), en soluciones alcalinas, los MPs pueden estar cargados negativamente, lo que conduciría a la sorción de cationes por atracción electrostática (Guo y Wang, 2019). Este proceso de sorción puede involucrar tres etapas: primero, la difusión de metales en los *biofilms* alrededor de los MPs, segundo, la difusión de metales dentro del poro en los MPs y tercero, la adsorción en los sitios activos (Guo y Wang, 2019). De esta manera, el polímero será capaz de adoptar una carga que permita la adsorción de iones metálicos en su superficie. Puede suceder lo mismo al suspender plásticos vírgenes en aguas naturales, ya que pueden adquirir una superficie con carga neta negativa al pH del agua de río y mar, siendo posible la rápida adsorción de materia orgánica y, como consecuencia, la adsorción de metales (Holmes *et al.* 2014).

El hecho de que los plásticos y MPs puedan actuar como transportadores de metales pesados permite el diseño de estrategias de remoción de estos compuestos inorgánicos del ambiente (Rozman *et al.* 2020). Un ejemplo de estrategia consiste en aprovechar la capacidad de los microorganismos de generar *biofilms* sobre la superficie de los polímeros, así la comunidad microbiana que crece formando dicha matriz de EPS puede ser empleada como “*biosorbente*” de metales (Richard *et al.* 2019).

2. Hipótesis de trabajo

El presente trabajo se vincula con tres proyectos llevados a cabo en el Instituto de Tecnología (INTEC) de la Universidad Argentina de la Empresa:

- Actividad de Ciencia y Tecnología Doctoral D20T02 (2020-2025) titulada *“Estrategias para la fitorremediación de residuos de fármacos veterinarios empleados en sistemas ganaderos del Bajo Delta e Islas del Río Paraná Sur”*.
- Proyecto de Investigación y Desarrollo A19T06 (2019-2020) titulado *“Evaluación de la presencia de microplásticos en playas arenosas de Lima y Buenos Aires”*.
- Proyecto de Investigación y Desarrollo P21T08 (2021-2023) titulado *“Biorremediación de contaminantes emergentes: aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial uso biotecnológico”*.

Por lo tanto, para el desarrollo del trabajo se obtuvieron muestras de sedimento de la región del Bajo Delta e Islas del Paraná Sur y de distintos sitios distribuidos a lo largo de la cuenca del Río de la Plata, respectivamente. En función de información expuesta en la introducción relacionada a la contaminación por plásticos y metales pesados, las hipótesis que se plantean son:

- Existen bacterias nativas del Bajo Delta e Islas del Paraná Sur y/o del Río de la Plata con capacidad de biodegradar polipropileno.
- Las bacterias son capaces de crecer en presencia de Cr^{6+} y/o reducirlo a Cr^{3+} .
- En cultivos bacterianos en presencia de los dos contaminantes ocurre la biodegradación de polipropileno y/o la biorreducción de Cr^{6+} .

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar la capacidad de degradación de polipropileno en presencia de cromo mediada por bacterias aisladas de muestras ambientales que evidenciaron la presencia de ambos contaminantes.

3.2. Objetivos específicos

1. Aislar bacterias de ambientes contaminados con plásticos y cromo y analizar su capacidad de formación de *biofilm*.
2. Analizar la degradación de polipropileno en sistemas batch con las mejores 5 bacterias formadoras de *biofilm*.
3. Evaluar el crecimiento de las bacterias seleccionadas en el objetivo específico 2 en presencia de cromo.
4. Evaluar en sistemas batch con ambos contaminantes los procesos de degradación de polipropileno y detoxificación de cromo mediados por las bacterias seleccionadas del objetivo específico 3.

4. Metodología

4.1. Búsqueda de partículas plásticas en muestras ambientales

Las muestras de sedimento costero recolectadas en el marco del proyecto A19T06 (ver 2. *Hipótesis de trabajo*) evidenciaron la presencia de partículas plásticas (Lacava *et al.* 2022). Los criterios de identificación de dichas partículas fueron tomados del estudio propuesto por Ng y Obbard (2006). Del mismo modo, se propuso confirmar la presencia de fragmentos plásticos en las muestras de sedimento recolectadas en el marco del proyecto D20T02 mediante técnicas de separación física por densidad (ver 2. *Hipótesis de trabajo*).

4.2. Aislamiento y caracterización metabólica de microorganismos

4.2.1. Enriquecimiento de muestras ambientales y aislamiento de microorganismos

De las muestras recolectadas pertenecientes a ambos proyectos, A19T06 y D20T02, se colocaron 2 g en un erlenmeyer con 100 mL de medio de cultivo LB (NaCl 5 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L) (Sambrook *et al.* 1989). La incubación de las muestras a 30°C a 200 rpm por 24 horas permitió el crecimiento de la microbiota propia de cada sitio de muestreo.

Una vez crecidos los cultivos, se colocó 1 mL de cada uno en tubos de ensayo con 9 mL de agua peptonada (NaCl 8,5 g/L, Peptona 1 g/L) y se realizaron diluciones seriadas. A partir de las diluciones 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} , se distribuyeron 100 μ L con espátula de Drigalsky sobre placas de Petri con medio LB agarizado (LB con el agregado de 15 g/L de agar). Las placas se incubaron a 30°C por 48 horas.

Tras la incubación, las colonias visualmente distintas fueron repicadas en medio de cultivo LB agarizado con el objeto de aislar las cepas. Las placas se colocaron en estufa a 30°C por 48 horas.

4.2.2. Agrupación de aislamientos según su morfología y características metabólicas

A partir de las colonias aisladas de las muestras ambientales, se determinó la composición de la pared celular bacteriana mediante la prueba de tinción de Gram. El procedimiento a seguir consistió en tres etapas: preparación de los extendidos, tinción y observación al microscopio (Moyes *et al.* 2009). Luego, al grupo de bacterias Gram negativas se le realizó una serie de pruebas bioquímicas que permitieron la clasificación de los aislamientos de acuerdo a sus características metabólicas (Fig. 3).

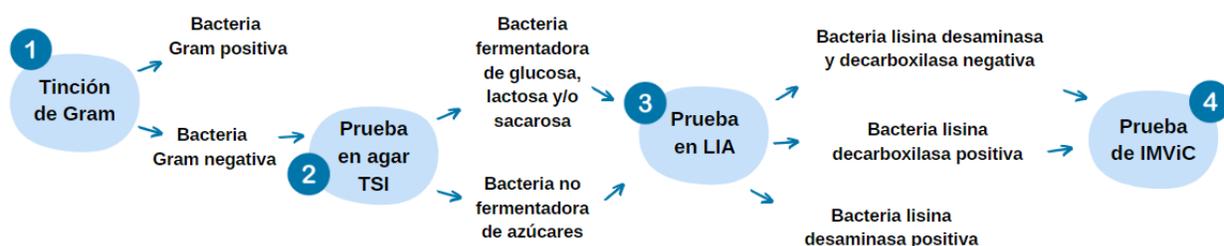


Figura 3. Orden de pruebas realizadas para la caracterización de los aislamientos obtenidos.

- **Prueba en agar TSI.** Pone en evidencia la fermentación de los hidratos de carbono, glucosa, lactosa y/o sacarosa y la producción de ácido sulfhídrico (H₂S). En la Tabla I se describen los resultados posibles para esta prueba.

TABLA I. Interpretación de los cambios de coloración en el medio de cultivo agar TSI post incubación.

Superficie / profundidad	Interpretación
Roja / amarilla	Bacteria fermenta glucosa
Amarilla / amarilla	Bacteria fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa
Roja / roja o anaranjada	Bacteria no fermenta azúcares

- **Prueba en LIA.** Pone en evidencia la presencia o ausencia de enzimas que conducen a la decarboxilación y/o desaminación de la lisina y la producción de H₂S. La Tabla II describe la interpretación de cada resultado posible.

TABLA II. Interpretación de los cambios de coloración en el medio de cultivo LIA post incubación.

Superficie / profundidad	Interpretación
Rojiza / amarilla o rojiza (*)	Presencia de enzima lisina desaminasa
Violeta / violeta	Presencia de enzima lisina decarboxilasa
Violeta o amarilla / amarilla	Ausencia de ambas enzimas

(*) Resultado característico del género *Proteus*, *Providencia* y algunas especies de *Morganella* spp.

Tanto en la prueba de Agar TSI como en la de LIA, la presencia de burbujas o ruptura del medio de cultivo indica que la bacteria genera gas y el ennegrecimiento del medio de cultivo indica la producción de sulfuro de hierro.

- **Prueba de IMViC.** Se compone de cuatro pruebas bioquímicas que permiten la diferenciación entre Enterobacterias: Prueba de indol, Prueba de rojo de metilo, Prueba de Voges-Proskauer y Prueba del citrato. De esta manera, IMViC pone en evidencia la presencia o ausencia de determinadas enzimas y las características metabólicas propias de cada bacteria analizada. En la Tabla III las pruebas se ubican en el orden de inoculación, acompañada de una breve descripción general de cada una.

TABLA III. Descripción general de las pruebas que componen la prueba de IMViC.

Nombre de la prueba	Pone en evidencia	Medio de cultivo	Reactivo para el revelado de resultados	Resultados posibles
Indol	Presencia de la enzima triptofanasa	Agua peptonada al 1% p/v	Dimetil- amino benzaldehido (Kovacs)	(+) Anillo rojo cereza
				(-) Anillo amarillo
Rojo de metilo	Fermentación ácido- mixta	MR-VP	Rojo de metilo (indicador de pH)	(+) Rojo
				(-) Amarillo
Voges-Proskauer	Fermentación butilen- glicólica	MR-VP	Alfa- naftol 5% + hidróxido de potasio 40%	(+) Rojo- rosado
				(-) Amarillo
Citrato	Presencia de la enzima citratasa	Citrato de Simmons	-	(+) Azul
				(-) Verde

En todas las pruebas se colocaron 3 mL de medio de cultivo en tubos de ensayo de vidrio. Una vez fraccionados, los tubos de ensayo se autoclavaron a 121°C por 15 minutos. Finalizado el ciclo de esterilización, los medios de cultivo agarizados se dejaron solidificar colocando el tubo con una inclinación que permitiera la formación de un pico de flauta profundo.

La inoculación de los medios de cultivo difirió según la prueba a evaluar. En el caso de las pruebas sobre Agar TSI y LIA, la colonia aislada crecida en LB agarizado se tomó con un ansa de aguja y se perforó el agar para luego extender el inóculo sobre la superficie del pico formado. Los tubos se colocaron a 37°C por 24 horas. Por otro lado, con un ansa de inoculación se tomó una colonia aislada crecida en LB agarizado y se realizó la prueba de IMViC. Los cuatro tubos por aislamiento se colocaron a 37°C durante 48 horas.

En el Anexo A se describe la composición de cada uno de los medios de cultivo utilizados junto con la explicación de los resultados posibles a obtener en la prueba de IMViC.

4.3. Evaluación de la formación de *biofilm* de las bacterias aisladas

Para determinar la capacidad de los aislamientos de formar *biofilm*, el ensayo se dividió en 3 etapas, tomando como base los estudios realizados por O'Toole (2011) y Weiss-Muszkat *et al.* (2010):

- **Crecimiento de las bacterias.** A partir de las colonias aisladas en LB agarizado, se realizaron repiques en 15 mL de medio de cultivo LB. La incubación de los inóculos se realizó en agitación a 200 rpm a 30°C por 24 horas.

Tras la incubación, se centrifugaron los cultivos a 4000 rpm por 10 minutos. Luego, el pellet obtenido se lavó y resuspendió en agua destilada estéril. La medición de la densidad óptica (DO) del resuspendido se evaluó a 560 nm. El valor registrado se utilizó para calcular el volumen correspondiente de inóculo para el inicio del ensayo con una DO cercana a 0,2 en un volumen final de 5 mL de medio de cultivo LB sin NaCl.

Se tomaron 200 µL de cada cultivo con DO estandarizada y se colocaron en placa de polipropileno estéril de 96 pocillos (n = 5). La placa se incubó a 30°C y sin agitación durante 48 horas.

El control positivo utilizado fue *Bacillus subtilis* debido a su conocida capacidad de formar *biofilm* (Ma *et al.* 2017) y el control negativo fue medio de cultivo LB sin NaCl, sin inocular.

- **Tinción del *biofilm* generado.** Tras la incubación, se procedió con la remoción del contenido de cada pocillo. Para retirar las células que no se encontraron adheridas al *biofilm*, se realizó un lavado suave con agua destilada, teniendo cuidado de no afectar con el mismo a las células adheridas a las paredes y/o al fondo del pocillo. Luego, se colocaron 250 µL de una solución de Cristal Violeta (CV) al 0,1% p/v y se dejó actuar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada y se dejó secar la placa durante 1 hora.

- **Cuantificación del *biofilm* generado.** Esta etapa consistió en colocar 250 μ L de etanol en cada pocillo y dejar que actúe por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se registró la DO de cada pocillo utilizando una longitud de onda de 595 nm.

Los criterios propuestos por Stepanović *et al.* (2007) permitieron estandarizar la evaluación de la capacidad de formación de *biofilm* de las bacterias seleccionadas. De esta manera, a partir del promedio de la absorbancia de los pocillos que corresponden al control negativo, sumado 3 veces el desvío estándar de dichos datos control, se estableció un valor de referencia: DOc.

Si bien Stepanović *et al.* (2007) propusieron 4 categorías, se decidió ajustar el rango de cada una e incluir una quinta denominada “*muy fuerte*”. Esto permitió distinguir a los valores de DO de las bacterias que presentaron en promedio una DO hasta 8 veces mayor que la DOc. En función de los valores obtenidos, fue posible clasificar a los aislamientos seleccionados en el ensayo anterior (4.2. *Aislamiento y caracterización metabólica de microorganismos*) en una de las categorías descritas en la Tabla IV.

TABLA IV. *Categorías de formación de biofilm, adaptado de Stepanović et al. (2007).*

Categorías de formación de <i>biofilm</i>	Rango de valores
No formador de <i>biofilm</i>	$X < DOc$
Pobre formador de <i>biofilm</i>	$DOc < X < 2*DOc$
Moderado formador de <i>biofilm</i>	$2*DOc < X < 4*DOc$
Fuerte formador de <i>biofilm</i>	$4*DOc < X < 8*DOc$
Muy fuerte formador de <i>biofilm</i>	$X > 8*DOc$

4.4. Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno como única fuente de carbono y energía

La adaptación gradual del crecimiento bacteriano en presencia de polipropileno (PP) como única fuente de carbono y energía (FCE) se realizó en 4 etapas:

- **Etapa 1: Generación de inóculos en medio de cultivo LB.** A partir de las colonias aisladas en medio de cultivo LB agarizado, se realizaron repiques en 15 mL de medio de cultivo LB líquido. La incubación de los inóculos se realizó en agitación a 200 rpm a 30°C por 24 horas.
- **Etapa 2: Cultivo de bacterias en medio de cultivo M9 adicionado con glucosa.** Tras la incubación, se centrifugaron los cultivos a 4000 rpm por 10 minutos. Luego, el pellet de bacterias obtenido se lavó y resuspendió en agua destilada estéril. Se colocaron 2 mL en 15 mL de medio de cultivo M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7,52 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH_4Cl 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M 0,3 mL/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1M 1 mL/L) con 4 g/L de glucosa. La incubación de los cultivos se realizó en agitación a 200 rpm a 30°C por 24 horas. Luego, se realizó el procedimiento previamente descrito, colocando 2 mL del resuspendido en 15 mL de medio de cultivo M9 con 2 g/L de glucosa. La incubación de los cultivos se realizó en agitación a 200 rpm a 30°C por 24 horas.
- **Etapa 3: Cultivo de bacterias en sistemas compuestos por M9 y 0,5 g de pellet de PP.** Tras la incubación, se centrifugaron los cultivos a 4000 rpm por 10 minutos. Luego, el pellet de bacterias obtenido se lavó y resuspendió en agua destilada estéril. La medida de DO del resuspendido se utilizó para calcular el volumen correspondiente de inóculo para el inicio del ensayo con una DO cercana a 0,1 en un volumen final de 50 mL de medio de cultivo M9 sin adicional de glucosa. Previo al armado de los sistemas, el pellet de PP se expuso a luz UV por 2 horas con el fin de esterilizar la superficie del mismo (Fig. 4). Esta etapa se tomó como tiempo inicial del ensayo de degradación de PP.



Figura 4. Acondicionamiento del pellet de PP previo al armado de los sistemas.

- **Etapa 4: Evaluación del crecimiento de las bacterias en presencia de PP como única FCE.** Luego de inocular los sistemas con medio M9 y PP, los mismos se colocaron en agitación a 160 rpm a temperatura ambiente y fueron monitoreados durante 40 días ($n = 6$). El control positivo usado en este ensayo fue *B. subtilis*, bacteria previamente reportada como degradadora de PP (Aravinthan *et al.* 2016; Arkatkar *et al.* 2010). El medio de cultivo M9 con 0,5 g de pellet de PP sin inocular fue utilizado como control negativo.

Los parámetros evaluados en los **cultivos** a tiempo inicial y cada 10 días fueron:

- DO medida a 560 nm
- Recuento bacteriano en placa

Los parámetros registrados en relación con el **pellet de PP** fueron:

- Medida de peso seco del PP a tiempo inicial y final del ensayo (40 días). El secado del pellet consistió en colocarlo en estufa a 60°C por 5 días y registrar su peso en balanza analítica.
- Análisis de la superficie del PP por microscopía electrónica de barrido (SEM) a tiempo final, llevada a cabo en el Centro de Tecnología de Recursos Minerales y Cerámica (CETMIC - CONICET - UNLP, La Plata, Buenos Aires). Las muestras de PP fueron recubiertas por pulverización catódica con una capa de plata bajo atmósfera cercana a $7,75 \times 10^{-2}$ torr en el equipo *Denton Vacuum*, para

posteriormente ser visualizadas mediante la utilización de un microscopio electrónico de barrido *JEOL* (Fig. 5).

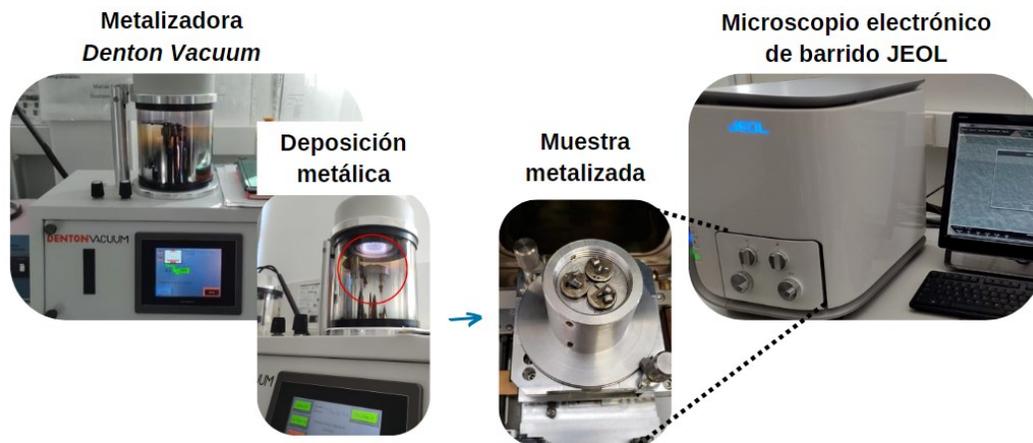


Figura 5. Metalizado de las muestras de PP para su posterior análisis por SEM.

Las medidas de peso seco obtenidas a tiempo inicial y final permitieron calcular el porcentaje de pérdida de peso del PP a partir de la Ecuación (1) (Auta *et al.* 2018).

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{\text{Peso inicial del polímero} - \text{Peso final del polímero}}{\text{Peso inicial del polímero}} \times 100 \quad (1)$$

Además, se determinaron dos parámetros: la constante de velocidad de reducción (*K*) del pellet de PP a partir del modelo cinético de primer orden de la Ecuación (2) y la potencial vida media del plástico ($t_{1/2}$) expresada en días en la Ecuación (3) (Auta *et al.* 2018).

$$K = -\frac{1}{\text{tiempo (días)}} \left(\ln \frac{\text{Peso final del polímero}}{\text{Peso inicial del polímero}} \right) \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{K} \quad (3)$$

4.5. Cultivo de bacterias en presencia de cromo

4.5.1. Ensayo de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de Cr^{6+}

El ensayo consistió en evaluar el crecimiento de las bacterias en medio de cultivo LB con 0 ppm (control), 1 ppm, 3 ppm y 5 ppm de Cr^{6+} ($n = 3$). Cada condición se preparó a partir de una solución madre de 1000 ppm de Cr^{6+} elaborada a base de sal de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).

Los inóculos se realizaron en medio de cultivo LB líquido, del mismo modo que en el ensayo 4.3. *Evaluación de la formación de biofilm de las bacterias aisladas*. El volumen necesario de cada inóculo fue añadido para estandarizar la DO a 0,1 en 15 mL finales de medio de cultivo LB. Los cultivos se colocaron en agitación a 200 rpm a 30°C durante 24 horas. El parámetro registrado fue la medida de DO a 560 nm a tiempo inicial y final.

4.5.2. Evaluación de la detoxificación biológica de Cr^{6+}

Para la determinación de la conversión de Cr^{6+} a Cr^{3+} se realizaron cultivos batch en erlenmeyers de los microorganismos a analizar. Los inóculos de estos 3 microorganismos fueron llevados a cabo como fue mencionado anteriormente (4.3. *Evaluación de la formación de biofilm de las bacterias aisladas*). Los sistemas fueron diseñados con 5 ppm de cromo en 80 mL de medio de cultivo LB líquido. Previo a la inoculación de los medios de cultivo, se realizaron las mediciones de cromo a tiempo inicial. De cada sistema se tomaron 10 mL para realizar la medición de Cr^{6+} en solución, sobre la base del procedimiento descrito por Sierra y García (2013). Por otro lado, se tomaron 20 mL para medir la concentración de cromo total presente en los sistemas mediante espectroscopia de llama (*Perkin Elmer AAnalyst 100*).

Los 50 mL de medio de cultivo LB con 5 ppm de cromo remanentes luego de tomar la muestra inicial, fueron inoculados de manera tal que iniciaran con una DO de 0,1. Los cultivos se colocaron a 200 rpm a 30°C por 48 horas. Tras la incubación, se centrifugaron los cultivos y se tomaron 10 mL y 20 mL de sobrenadante para realizar las mediciones de Cr^{6+} y cromo total respectivamente.

Medición de Cr^{6+} en solución. Se preparó una solución de difenilcarbazida (DPC) al 0,5% m/v según la relación 5 mg DPC/1 mL acetona y una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 50% v/v.

En tubos falcon de 15 mL se colocó la fracción de 10 mL de medio de cultivo LB con 5 ppm de cromo y se le añadieron:

1. 100 μL de la solución de H_2SO_4 y luego se agitó el tubo.
2. 200 μL de la solución de DPC, se homogenizó y dejó reposar de 5 a 10 minutos (desarrollo de color en presencia de Cr^{6+}).

Finalmente, la DO fue medida a una longitud de onda de 540 nm. Por otro lado, se prepararon soluciones patrón de Cr^{6+} con concentraciones 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm y 8 ppm (volumen final: 10 mL de medio de cultivo LB) para generar la curva de calibración (Fig. 6). Así, fue posible vincular la absorbancia medida a 540 nm con la concentración del metal en ppm.

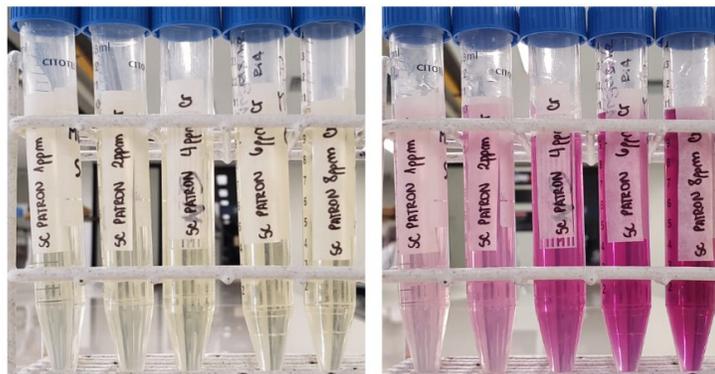


Figura 6. Soluciones patrón de Cr^{6+} . Izquierda: soluciones patrón antes del agregado de las soluciones de H_2SO_4 y DFC. Derecha: soluciones patrón luego del agregado de las soluciones.

La preparación de un blanco de reactivos fue necesaria para corregir la absorbancia de cada sistema. En este caso, a 10 mL de medio de cultivo LB (sin cromo) se le añadieron los reactivos

del mismo modo que al resto de las soluciones previamente medidas y se registró la absorbancia. La absorbancia (Abs) final de la muestra se calculó según la Ecuación (4).

$$\text{Abs final} = \text{Abs medida} - \text{Abs blanco} \quad (4)$$

En función de los datos obtenidos, se determinó el porcentaje de remoción del metal por parte de las bacterias, la velocidad de remoción de Cr^{6+} y la constante de velocidad K mediante las Ecuaciones (5), (6) y (7), respectivamente.

$$\text{Remoción de Cr VI (\%)} = \frac{\text{ppm Cr VI inicial} - \text{ppm Cr VI final}}{\text{ppm Cr VI inicial}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{Velocidad de remoción de Cr VI (ppm/h)} = \frac{\text{ppm Cr VI final} - \text{ppm Cr VI inicial}}{\text{tiempo (hs)}} \quad (6)$$

$$K = -\ln\left(\frac{\text{ppm Cr VI final}}{\text{ppm Cr VI inicial}}\right) \times \frac{1}{\text{tiempo (hs)}} \quad (7)$$

Medición de cromo total en solución. En este caso, la medición fue realizada por espectroscopía de llama a tiempo inicial. En matraces aforados de 25 mL se colocó la fracción de 20 mL de medio de cultivo LB con 5 ppm de cromo y se le añadieron 5 mL de HNO_3 0,5 M. Se elaboró una curva de calibración con soluciones patrón de Cr^{6+} que permitiera calcular la concentración del metal presente en las muestras. Dichas soluciones fueron preparadas con 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm y 8 ppm de Cr^{6+} y se llevó a un volumen final de 25 mL con la solución de HNO_3 0,5 M. El programa utilizado fue *AA WinLab Analyst*. A partir de la curva de calibración realizada fue posible determinar la concentración del metal en las muestras. El cálculo para registrar la concentración real de las muestras se indica en la Ecuación (8).

$$\text{Concentración real Cr VI} = \frac{25 \text{ mL} \times \text{concentración medida por el equipo}}{20 \text{ mL}} \quad (8)$$

4.6. Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno y cromo

Para el análisis de la interacción entre las bacterias seleccionadas, el PP y el Cr, se procedió de igual forma que en el ensayo descrito en el apartado 4.4 *Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno como única fuente de carbono y energía*. En este caso, a cada sistema compuesto por medio de cultivo M9 y 0,5 g de pellet de PP, se le añadieron 5 ppm de Cr⁶⁺ (n = 6). La DO inicial de los cultivos se estandarizó a 0,1 en 50 mL finales de medio de cultivo M9. El control negativo realizado consistió en sistemas con medio de cultivo M9, 0,5 g de pellet de PP y 5 ppm de Cr⁶⁺, sin inocular. Tanto a tiempo inicial como a tiempo final (40 días) se registró:

- Recuento bacteriano en placa.
- Concentración de Cr⁶⁺ por colorimetría (Sierra y García, 2013).
- Peso seco del pellet de PP.

Con los datos obtenidos se pudo analizar si los microorganismos en estudio tuvieron la capacidad de crecer en presencia de los dos contaminantes, si pudieron degradar PP en presencia de cromo, así como si pudieron o no reducir el Cr⁶⁺ bajo las condiciones ensayadas.

4.7. Identificación de los microorganismos mediante secuenciación parcial del gen rRNA 16S

Los 3 microorganismos analizados en los últimos ensayos se repicaron en placas de Petri con medio LB agarizado. Las placas fueron enviadas a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para realizar el servicio de identificación, que consta de la extracción de ADN de los microorganismos, la amplificación mediante PCR del gen del rRNA 16S con los *primers* universales 785F (5'- GGA TTA GAT ACC CTG GTA- 3') y 907R (5'- CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT- 3'), y la posterior secuenciación de los amplicones obtenidos. La obtención de las secuencias parciales del gen del rRNA 16S permitió identificar a los microorganismos mediante la comparación de secuencias homólogas utilizando la base de datos BLASTn del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 1988).

4.8. Análisis estadístico

Las medidas registradas a tiempo inicial y final correspondientes al peso seco del pellet de PP y a la concentración de Cr^{6+} , fueron analizadas mediante la prueba de Wilcoxon para muestras apareadas. Estas medidas fueron expresadas como porcentaje promedio de pérdida de peso \pm desviación estándar (DE) y como porcentaje de remoción de $\text{Cr}^{6+} \pm$ DE, respectivamente. Por otro lado, las diferencias en el Δ DO entre las distintas concentraciones de Cr^{6+} evaluadas en el ensayo 4.5. *Cultivo de microorganismos en presencia de cromo* fueron analizadas mediante ANOVA seguido de la Prueba de Comparación Múltiple de Tukey.

Cada serie de experimentos se realizó por triplicado o quintuplicado dependiendo del ensayo. Los experimentos se repitieron por separado para garantizar la reproducibilidad.

Los resultados obtenidos se consideraron estadísticamente significativos si $p\text{valor} < 0,05$.

Todos los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el software estadístico *Infostat* versión 2019, FCE, Universidad Nacional de Córdoba.

5. Resultados y discusiones

5.1. Búsqueda de partículas plásticas en muestras ambientales

Con el objeto de corroborar la contaminación por plásticos en las muestras pertenecientes a la Actividad de Ciencia y Tecnología Doctoral D20T02 (ver 2. *Hipótesis de trabajo*), se determinó cualitativamente la presencia de partículas plásticas. La visualización de los papeles de filtro fue realizada en lupa con un aumento de 6.5X (Fig. 7).

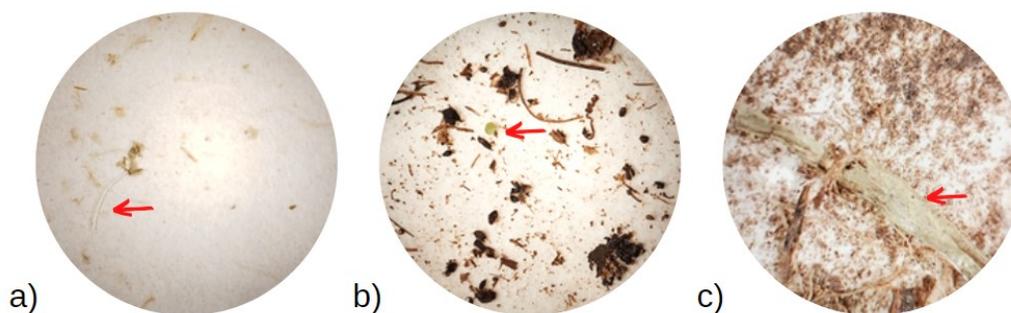


Figura 7. Identificación de partículas plásticas mediante visualización con lupa. (a) Fibra plástica color blanco, (b) Perla plástica color verde claro, (c) Lámina plástica.

5.2. Aislamiento de microorganismos de muestras ambientales

A partir del enriquecimiento de las muestras ambientales seleccionadas, se aislaron 73 microorganismos. La asignación de nombres a los aislamientos varió dependiendo de su muestra origen:

- **Muestras de sedimento del Bajo Delta e Islas del Paraná Sur.** Los aislamientos fueron nombrados en orden creciente de números. Algunos cuentan con una letra “a”, “b” o “c” en el caso de que se haya observado más de una morfología en el repique.
- **Muestras de sedimento del Río de la Plata.** Los aislamientos fueron nombrados con las iniciales de cada sitio de muestreo, siendo “PM” para Puerto Madero, “Q” para Quilmes y “VL” para Vicente López; acompañado de un número que distinguiera los aislamientos dentro de un mismo sitio.

5.3. Caracterización de los microorganismos aislados

Los resultados de la tinción de Gram determinaron que el 14 % eran bacterias Gram positivas y el 86% restante, Gram negativas. A estas últimas, se les realizaron pruebas bioquímicas en diferentes medios de cultivo para agrupar a los aislamientos en función de sus semejanzas a nivel metabólico. Los resultados posibles para cada prueba se fueron descritos en el apartado 4.2.2. *Agrupación de aislamientos según su morfología y características metabólicas* y se pueden observar en la Fig. 8.

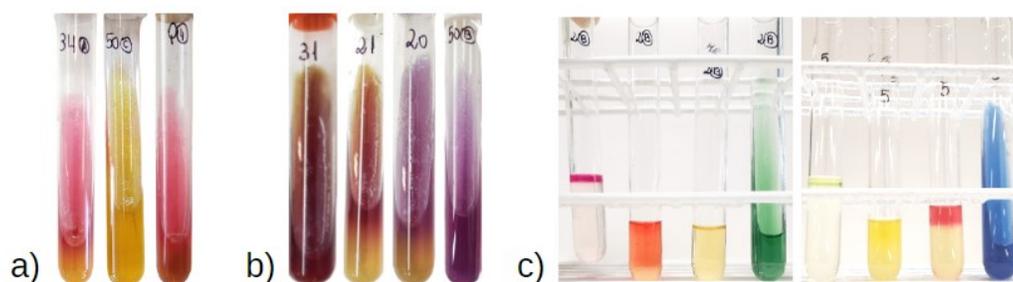


Figura 8. Resultados posibles de cada prueba bioquímica analizada. (a) Agar TSI, (b) LIA y (c) Prueba de IMViC: Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer, Citrato.

En el Anexo B se encuentran agrupados los aislamientos en función de los resultados obtenidos de las pruebas analizadas. El número de aislamientos se redujo de 73 a 51 al descartar a 11 microorganismos pertenecientes a una misma muestra que demostraron resultados iguales en las seis pruebas bioquímicas y a 11 bacterias que presentaron enzima lisina desaminasa positiva. Este último resultado es característico de cepas del género *Proteus*, *Providencia* y algunas de *Morganella* spp. Estudios reportan que estos géneros son capaces de provocar infecciones respiratorias, gastrointestinales o urinarias en el ser humano (Armbruster *et al.* 2018; Liu *et al.* 2016; Shah *et al.* 2019). Teniendo esto en cuenta, su uso en los ensayos posteriores fue discontinuado. Por lo tanto, del total de aislamientos obtenidos, 51 microorganismos fueron seleccionados para analizar su capacidad formadora de *biofilm*.

5.4. Evaluación de la formación de *biofilm* de los microorganismos seleccionados

En la Fig. 9 se puede observar el paso previo a la cuantificación del *biofilm* generado. En esta etapa se colocó etanol en cada uno de los pocillos que fueron inoculados con microorganismo. De esta manera, se consiguió eluir el *biofilm* teñido con cristal violeta que se encontraba adherido a la superficie de la placa para medir su absorbancia.

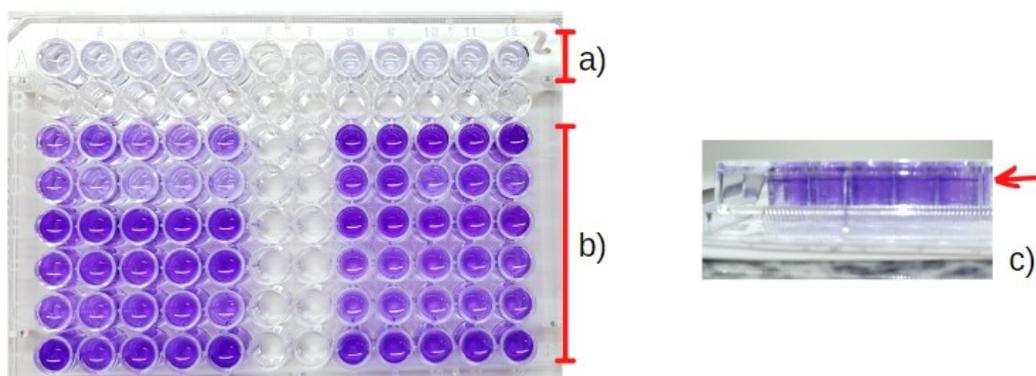


Figura 9. Cuantificación de *biofilm* mediante la técnica de tinción con Cristal Violeta. (a) Fila con medio de cultivo sin inocular (control negativo) (b) 11 aislamientos analizados por quintuplicado junto con *B. subtilis* (control positivo). (c) Visualización de la formación de *biofilm*.

Los mejores 5 aislamientos pertenecientes a la categoría formadora de *biofilm* “*muy fuerte*” fueron seleccionadas para continuar con los ensayos: 34B, PM7, VL5, Q2 y PM6. Los datos obtenidos para estos aislamientos se observan en la Tabla V.

TABLA V. Valores de DO medidos a 595 nm. Izquierda: Valores utilizados como criterio de categorización de la capacidad formadora de biofilm. Derecha: DO promedio y su desviación estándar (DE) correspondiente a los mejores 5 aislamientos con mayor capacidad formadora de biofilm.

Categoría	Referencias según DOc	Bacteria	DO promedio ± DE
No formador	$X < 0,242$	34B	$2,299 \pm 0,120$
Pobre	$0,242 < X < 0,484$	PM7	$2,257 \pm 0,089$
Moderado	$0,484 < X < 0,969$	Q2	$2,078 \pm 0,216$
Fuerte	$0,969 < X < 1,938$	VL5	$2,269 \pm 0,471$
Muy fuerte	$X > 1,938$	PM6	$2,249 \pm 0,122$

A estas 5 bacterias se les evaluó su crecimiento en presencia de polipropileno (PP) como única fuente de carbono y energía (FCE) y en un ensayo independiente, su crecimiento en presencia de cromo.

5.5. Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno

5.5.1. Crecimiento bacteriano en presencia de polipropileno

El registro del recuento bacteriano a tiempo inicial y cada diez días demostró el comportamiento de cada bacteria a lo largo del periodo estudiado utilizando PP como única FCE (Fig. 10).

A excepción de 34B, cuyo recuento disminuyó drásticamente en el tiempo, todas las bacterias analizadas mantuvieron un valor relativamente estable de recuento de viables durante los 40 días que duró el ensayo. Este valor a tiempo final presentó variaciones en promedio entre 1 y 2 órdenes de magnitud con respecto al valor inicial. Al ser el PP el único componente capaz de ser metabolizado por las bacterias, la asimilación como FCE es más compleja en comparación con los cultivos microbianos diseñados con una FCE accesible y fácilmente metabolizable, como por ejemplo, glucosa.

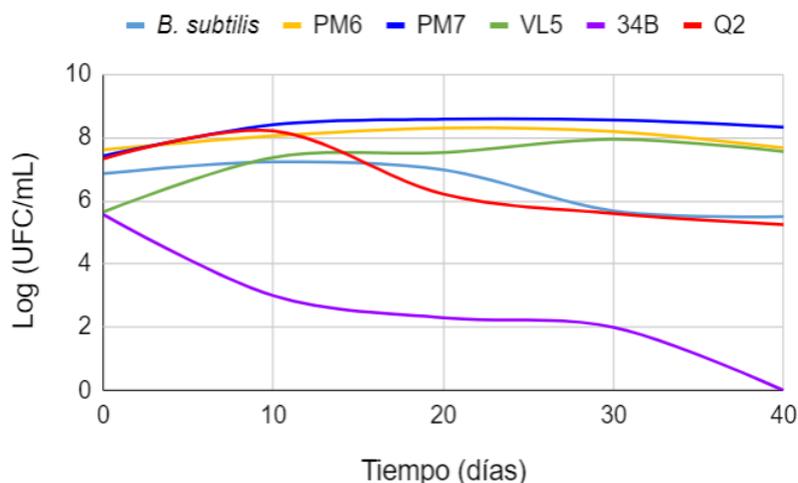


Figura 10. Recuento de las mejores 5 bacterias con capacidad formadora de biofilm “muy fuerte” y del control positivo *B. subtilis* creciendo en sistemas con PP como única FCE.

Por otro lado, los valores de DO de todos los cultivos no presentaron cambios en los distintos tiempos analizados. Esto pudo deberse a que estos microorganismos cuentan con una elevada capacidad de crecer formando *biofilm*. La superficie potencialmente colonizable por las bacterias analizadas es el pellet de PP colocado en los sistemas. De esta manera, dado que el registro de la DO del cultivo es a partir de la medida obtenida en solución, el hecho de estar potencialmente asociados al material polimérico podría justificar la falta de variación de DO observada.

5.5.2. Análisis cuantitativo de los cambios en el polipropileno

El registro del peso seco del PP a tiempo inicial y final permitió determinar los parámetros de degradación a partir de las Ecuaciones (1), (2) y (3) descritas en el apartado 4.4. *Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno como única fuente de carbono y energía*. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla VI.

TABLA VI. Parámetros de degradación de polipropileno de cada microorganismo en estudio y de los controles positivo (*B. subtilis*) y negativo (sin inocular).

<i>Degradación de PP</i>			
Sistema	Pérdida de peso (%)	K	Tiempo medio de degradación total (días)
<i>B. subtilis</i>	1,121 ± 0,870	2.83E-04	4082
PM6	2,015 ± 1,000	5.10E-04	1814
PM7	1,684 ± 0,816	4.25E-04	2272
Q2	0,538 ± 0,222	1.35E-04	7151
VL5	0,080 ± 0,040	1.99E-05	42510
Control sin inocular	0,013 ± 0,023	3.33E-06	69329

Los sistemas inoculados con PM6 presentaron una disminución significativa en el peso seco del pellet de PP a tiempo final respecto de la medida a tiempo inicial. Si bien PM7 no presentó diferencias significativas en las medidas registradas a cada tiempo, demostró un porcentaje de pérdida de peso relativamente cercano a PM6. Por el contrario, VL5 presentó un porcentaje de pérdida de peso del PP cercano al obtenido en los sistemas control sin inocular. Los sistemas inoculados con Q2 presentaron un porcentaje promedio de pérdida de peso de PP menor a PM6 y PM7 y mayor a VL5. Por otro lado, los sistemas inoculados con *B. subtilis* demostraron un valor cercano al obtenido en los sistemas inoculados con PM6 y PM7. Cabe destacar que los valores obtenidos para estas últimas 2 bacterias superaron los resultados obtenidos para dicho control positivo. Con excepción a los sistemas inoculados con VL5, los microorganismos analizados presentaron una disminución drástica de los días hipotéticamente requeridos para llevar a cabo la degradación total del PP en comparación con el sistema no inoculado. En todos los casos se evidenció una elevada variabilidad en las réplicas biológicas realizadas de cada sistema.

5.5.3 Análisis cualitativo de los cambios en el polipropileno

El análisis cualitativo del pellet de PP a tiempo final mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió distinguir cambios en la superficie del plástico al comparar sistemas inoculados con el control sin inocular (Fig. 11). La muestra correspondiente a 34B no se evaluó en este análisis, ya que no evidenció crecimiento en el periodo evaluado.

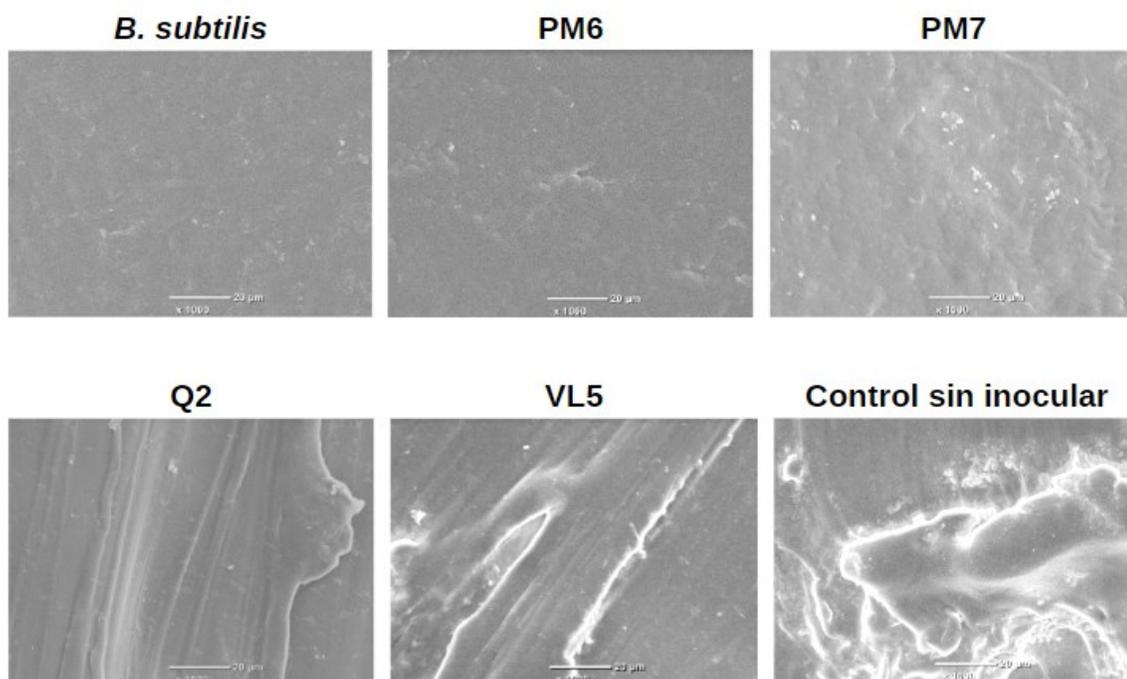


Figura 11. Visualización por microscopía electrónica de barrido de la superficie del PP a tiempo final correspondiente a cada sistema evaluado. Las barras representan 20 µm a un aumento de 1000X.

A partir de las imágenes obtenidas, fue posible distinguir que el PP del sistema control (sin inocular) presentó mayor rugosidad sobre la superficie en comparación con los sistemas inoculados. Además, se observó que el aumento en el porcentaje de pérdida de peso respecto del sistema control podría vincularse con una imagen de la superficie del polímero que haya presentado un aspecto más bien liso y con menores irregularidades (imagen de *B. subtilis*, PM6, PM7).

En estudios anteriores de biodegradación de PP (Aravinthan *et al.* 2016; Arkatkar *et al.* 2010), se observaron resultados similares en cuanto al aspecto obtenido en la superficie del polímero a tiempo final tras la incubación con microorganismos.

5.6. Cultivo de bacterias en presencia de cromo

5.6.1. Ensayo de resistencia bacteriana a distintas concentraciones de Cr^{6+}

Para estudiar el efecto de distintas concentraciones de Cr^{6+} sobre el crecimiento de las bacterias seleccionadas, se comparó la DO medida a tiempo inicial y final entre los sistemas con 0 (control), 1, 3 y 5 ppm de Cr^{6+} . Los resultados obtenidos se observan en la Fig. 12.

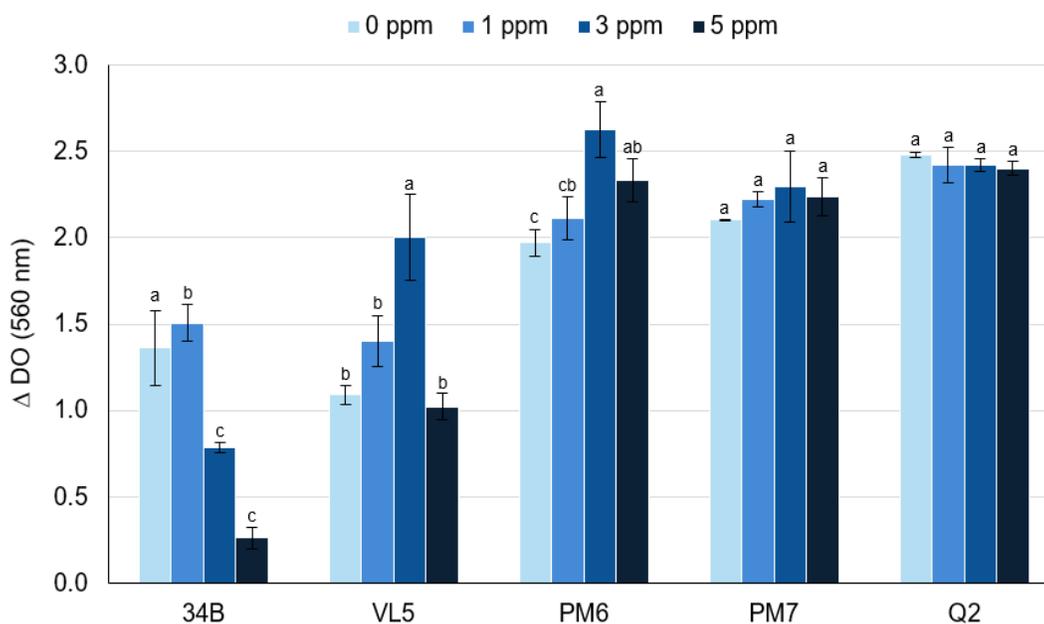


Figura 12. Cultivo de los mejores 5 microorganismos con capacidad formadora de biofilm “muy fuerte” en presencia de 0, 1, 3 y 5 ppm de Cr^{6+} . La comparación estadística de la variable medida (ΔDO promedio) fue realizada entre las condiciones evaluadas para un mismo microorganismo. Los valores de ΔDO promedio con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

El valor de Δ DO promedio obtenido para 34B disminuyó significativamente al utilizar 3 y 5 ppm respecto a los cultivos evaluados con 0 y 1 ppm. De esta manera, se puede interpretar que el incremento en la concentración de Cr^{6+} afectó negativamente el crecimiento de la bacteria. Contrariamente, PM6 presentó un incremento significativo de Δ DO promedio en la condición con 5 ppm frente a la condición con 0 ppm.

Con respecto a VL5, el valor de Δ DO promedio no difirió significativamente en las condiciones con 0, 1 y 5 ppm. Sin embargo, presentó un aumento significativo en los cultivos con 3 ppm del metal.

Por otro lado, los cultivos con 1, 3 y 5 ppm de Cr^{6+} correspondientes a los sistemas inoculados con PM7 y Q2 no presentaron cambios significativos frente a la condición con 0 ppm, indicando que su crecimiento no se vio afectado por la presencia de las concentraciones de metal ensayadas.

5.6.2. Evaluación de la detoxificación biológica de Cr^{6+}

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de cada bacteria en el ensayo 5.5. *Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno* y 5.6.1. *Ensayo de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de Cr^{6+}* , se decidió continuar los ensayos con PM6, PM7 y Q2. Estos microorganismos demostraron un porcentaje de pérdida de peso de PP mayor a 0,5 y elevada generación de biomasa en presencia de 5 ppm de Cr^{6+} . Las bacterias VL5 y 34B fueron descartadas para este ensayo por dos motivos. Por un lado, el porcentaje de pérdida de peso de PP para VL5 fue cercano al obtenido en el control sin inocular (ver Tabla VI) y 34B no logró crecer en el periodo estudiado bajo las condiciones establecidas (Fig. 10). Por otro lado, la exposición de ambas bacterias a 5 ppm de Cr^{6+} demostró que la presencia del metal pesado influyó negativamente en su crecimiento respecto de los cultivos con 0 ppm (Fig. 12).

Por lo tanto, a PM6, PM7 y Q2 se les evaluó su capacidad detoxificadora de Cr^{6+} según la técnica colorimétrica descrita por Sierra y García (2013).

Todos los sistemas comenzaron con una concentración de Cr^{6+} cercana a 5 ppm medida a tiempo inicial tanto por colorimetría como por espectroscopia de llama. Los valores finales de Cr^{6+} fueron medidos sólo por colorimetría. Según lo establecido por Rueda *et al.* (2017), puede

estimarse que la diferencia entre las concentraciones de Cr^{6+} a tiempo inicial y final corresponde a la reducción del mismo a Cr^{3+} , pudiendo calcular así su concentración. En la Fig. 13 se observan los resultados obtenidos.

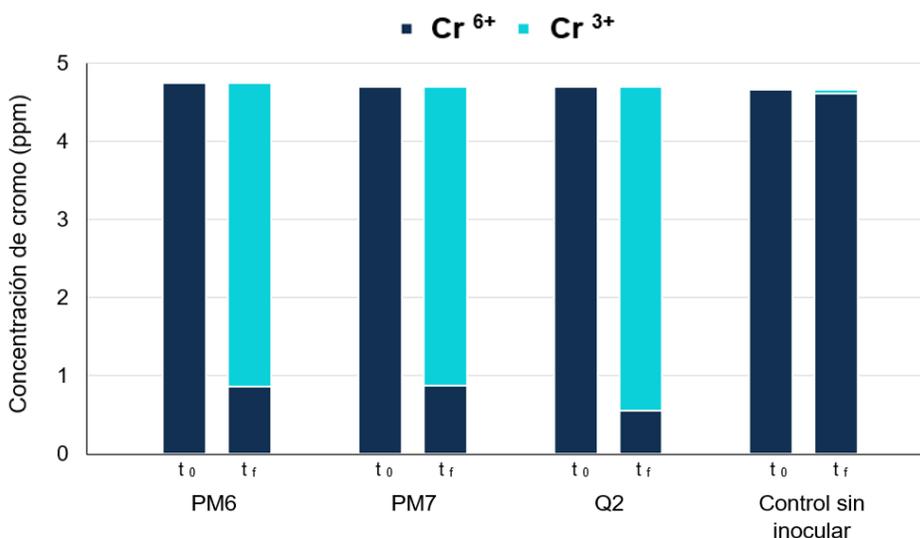


Figura 13. Concentraciones de Cr^{6+} y Cr^{3+} obtenidas a tiempo inicial (t_0) y final (t_f) correspondientes a los sistemas evaluados con PM6, PM7 y Q2 y al sistema control sin inocular. Todos los cultivos iniciaron con 5 ppm de Cr^{6+} .

En el control no inoculado no hubo variación significativa en la concentración de Cr^{6+} registrada en los tiempos ensayados, mientras que la inoculación con los 3 microorganismos llevó a una disminución significativa en la concentración de Cr^{6+} en solución.

En la investigación de Rueda *et al.* (2017) se propusieron dos tipos de respuesta del microorganismo creciendo en presencia de cromo:

- a) El microorganismo invierte gran cantidad de energía en el proceso de transporte activo para controlar la entrada masiva del catión altamente tóxico, frenándose considerablemente los procesos de división celular, al punto que la población viable permanece en estado de equilibrio.

- b) El microorganismo invierte energía para llevar a cabo procesos metabólicos que incrementen exponencialmente la población microbiana y que, a su vez, participen directamente en la reducción del Cr^{6+} , aumentando la velocidad de remoción del metal.

Teniendo esto en cuenta, una medida complementaria al resultado expuesto en la Fig. 13 hubiese sido evaluar el recuento de viables a tiempo inicial y final que permitiera interpretar el comportamiento de las bacterias analizadas. Sin embargo, puede considerarse a la DO como una medida indirecta del crecimiento microbiano. En función de los valores de Δ DO promedio obtenidos para PM6, PM7 y Q2 en los cultivos ensayados con 0 y 5 ppm de Cr^{6+} (Fig. 12) y los resultados correspondientes a la biorreducción del Cr^{6+} graficados en la Fig. 13, se puede interpretar que las tres bacterias han invertido energía para incrementar exponencialmente la población microbiana al mismo tiempo que participaron en la reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} . En otras palabras, la exposición al metal pesado no afectó negativamente el proceso de división celular para PM6, PM7 y Q2 ya que se puede observar que en las condiciones evaluadas con 5 ppm de Cr^{6+} no se encontró una disminución significativa de Δ DO promedio respecto de las condiciones con 0 ppm. La biomasa resultante permitió obtener una reducción significativa de Cr^{6+} a Cr^{3+} . Si bien el crecimiento exponencial de la biomasa fue observado en las tres bacterias evaluadas, PM6, a diferencia de PM7 y Q2, presentó un Δ DO promedio significativamente mayor en los cultivos con 5 ppm de Cr^{6+} respecto a los cultivos control (0 ppm). Este comportamiento podría relacionarse con la respuesta b) reportada por Rueda *et al.* (2017).

A partir de los resultados obtenidos, fue posible calcular para cada bacteria tres medidas relacionadas a la remoción de Cr^{6+} mediante las Ecuaciones (5), (6) y (7) (ver 4.5.2. *Evaluación de la detoxificación biológica de Cr^{6+}*). Los resultados obtenidos se observan en la Tabla VII.

TABLA VII. *Parámetros vinculados a la capacidad de reducción de Cr⁶⁺ a Cr³⁺ mediada por las bacterias analizadas.*

<i>Remoción de Cr⁶⁺</i>			
Sistema	Porcentaje	Velocidad (ppm/h)	K
PM6	81,930 ± 2,150	0,0809	0,0357
PM7	81,358 ± 1,539	0,0741	0,0351
Q2	88,295 ± 0,749	0,0952	0,0447

Las 3 bacterias seleccionadas para este ensayo presentaron un porcentaje de remoción de Cr⁶⁺ mayor a 80% tras 48 horas de incubación a 30°C y 200 rpm. La velocidad de remoción del metal pesado guarda relación con las medidas de concentración de Cr⁶⁺ obtenidas a tiempo inicial y final propias de cada bacteria. En función de los datos obtenidos, se puede interpretar que las 3 bacterias contaron con elevada capacidad detoxificadora de Cr⁶⁺ en sistemas con medio de cultivo LB líquido.

5.7. Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno y cromo

Los sistemas batch evaluados en este ensayo involucraron a los tres componentes de interés: bacteria, pellet de PP y Cr⁶⁺. Los valores registrados permitieron analizar el efecto de la presencia de PP y Cr⁶⁺ sobre el crecimiento bacteriano, su capacidad de utilizar al PP como única FCE y su capacidad de reducción del Cr⁶⁺ a Cr³⁺.

5.7.1. Recuento bacteriano en presencia de polipropileno y Cr^{6+}

Para estudiar el crecimiento de los microorganismos en presencia de PP y Cr^{6+} se realizó el recuento bacteriano en placa a tiempo inicial y final (Fig. 14).

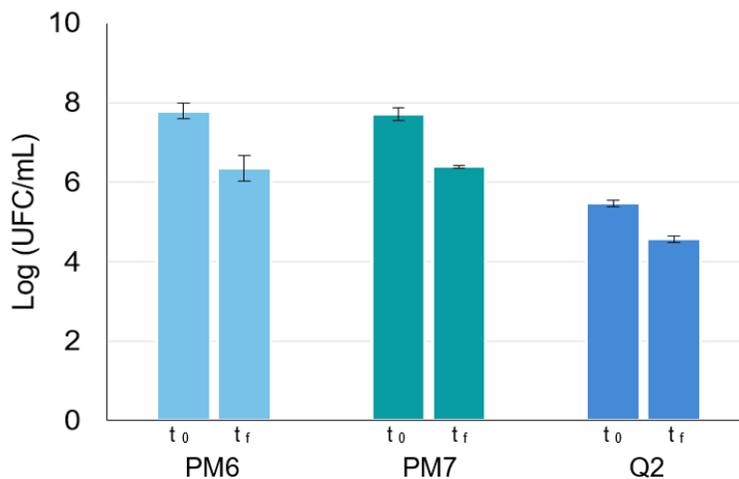


Figura 14. Recuento de viables a tiempo inicial (t_0) y final (t_f) en cultivos con PP y 5 ppm de Cr^{6+} de los tres microorganismos estudiados.

Tras los 40 días de ensayo, se encontró que las bacterias analizadas tuvieron la capacidad de mantenerse viables en sistemas de cultivo con los dos factores de estrés (PP como única FCE y Cr^{6+}). En todos los casos, el valor del recuento bacteriano a tiempo final disminuyó, en promedio, entre 1 y 1,5 órdenes de magnitud con respecto al valor inicial.

5.7.2. Análisis cuantitativo de los cambios en el polipropileno en presencia de Cr^{6+}

En la Tabla VIII se indican los parámetros calculados para el pellet de PP a partir de las Ecuaciones (1), (2) y (3) descritas en el apartado 4.4. *Cultivo de bacterias en presencia de polipropileno como única fuente de carbono y energía*, teniendo en cuenta los pesos secos de PP registrados a tiempo inicial y final de cada sistema.

TABLA VIII. *Parámetros de degradación de polipropileno de cada microorganismo en estudio y del control sin inocular en presencia de 5 ppm de Cr⁶⁺.*

Degradación de PP en presencia de Cr⁶⁺			
Sistema	Pérdida de peso (%)	K	Tiempo medio de degradación total (días)
PM6	0,550 ± 0,186	1,38E-04	18378
PM7	0,523 ± 0,184	1,38E-04	17536
Q2	1,040 ± 0,100	2,62E-04	3526
Control sin inocular	0,085 ± 0,042	2,12E-05	62124

La diferencia de peso seco de PP a tiempo inicial y final fue significativa en los sistemas evaluados con cada microorganismo, no así en los sistemas control sin inocular. Esto indicaría que hubo biodegradación del PP en los sistemas inoculados.

Al comparar los resultados obtenidos en este ensayo correspondientes al recuento de viables y al porcentaje de pérdida de peso del pellet de PP, los sistemas inoculados con PM6 y PM7 fueron similares en ambos casos. Por otro lado, los sistemas inoculados con Q2 iniciaron con un menor recuento microbiano respecto de PM6 y PM7. A pesar de esto, puede suponerse que Q2 fue capaz de crecer formando *biofilm* sobre la superficie del polímero, lo que resultó en la obtención de un elevado porcentaje de pérdida de peso en contraste con el del resto de las bacterias analizadas.

El porcentaje promedio de pérdida de peso de PP obtenido en los sistemas inoculados con PM6 y PM7 fue menor con respecto al valor presentado en el ensayo 5.5. *Cultivo de microorganismos en presencia de polipropileno*. Por el contrario, los sistemas inoculados con Q2 presentaron un mayor valor de pérdida de peso de PP en presencia de ambos contaminantes.

5.7.3. Capacidad biorreductora de Cr^{6+} en presencia de polipropileno

La concentración de Cr^{6+} a tiempo inicial fue graficada en las barras de la izquierda y a la derecha se observa la concentración de ambas especies químicas obtenidas a tiempo final para cada sistema analizado (Fig. 15).

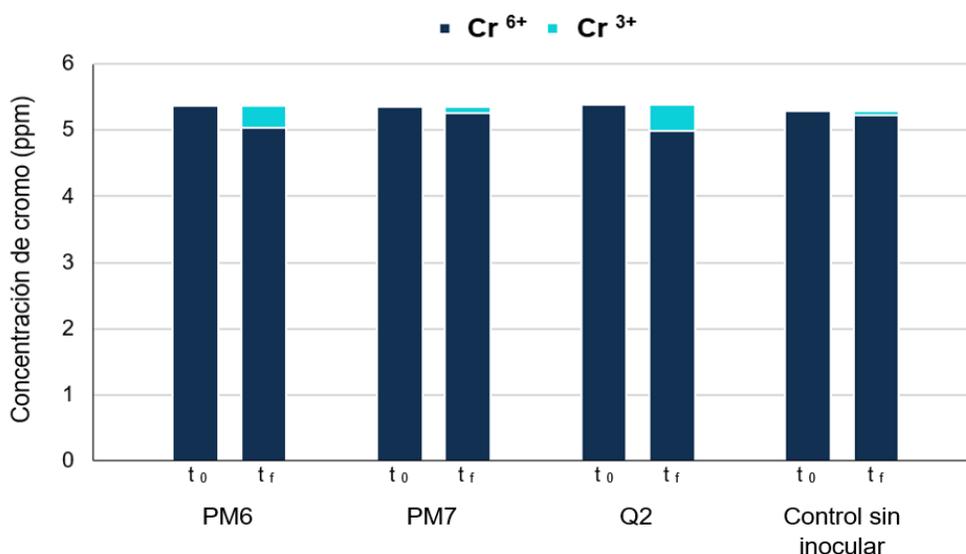


Figura 15. Cultivo de las bacterias seleccionadas en presencia de PP y 5 ppm de Cr^{6+} junto al sistema control sin inocular. t_0 : tiempo inicial y t_f : tiempo final.

La concentración de Cr^{6+} obtenida a tiempo final de los 4 sistemas evaluados no difirió significativamente respecto de la concentración inicial registrada. En función de los datos obtenidos en este ensayo, se observa que la capacidad de reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} se vio afectada bajo las condiciones establecidas respecto de los resultados que se observaron en la Fig. 13. Dicha capacidad pudo estar limitada por la demanda energética requerida para la adaptación metabólica de las bacterias al ser cultivadas en condiciones con más de un factor de estrés: medio de cultivo mínimo M9 con pellet de PP como única FCE y los 5 ppm de Cr^{6+} .

En el estudio de biodegradación de polipropileno propuesto por Jeon *et al.* (2021) se diseñaron sistemas con medio de cultivo mínimo M9 que incluía 1% de glucosa y 1% de extracto de levadura a tiempo inicial. Además, cada 48 horas se suministró una solución compuesta por

0,5% de glucosa y 0,5% de extracto de levadura para mantener la actividad microbiana. Estas condiciones de cultivo podrían ser una opción que contribuya a la disminución del estrés microbiano generado por la presencia de los dos contaminantes.

En futuros ensayos, se podría proponer la evaluación del comportamiento bacteriano frente a la biodegradación del plástico y a la biorreducción del metal pesado en las condiciones de menor estrés señaladas previamente. De esta manera, se podría efectuar una eventual comparación entre los resultados obtenidos en los ensayos con y sin el agregado basal de FCE ni nutrientes para continuar con el ajuste de las condiciones experimentales y lograr optimizar estos procesos de biorremediación.

5.8. Identificación de las bacterias mediante secuenciación parcial del gen rRNA 16S

La secuenciación parcial del gen rRNA 16S de las 3 bacterias fue llevada a cabo de manera exitosa. Los resultados obtenidos se encuentran en el Anexo C. A partir de las secuencias obtenidas con cada *primer*, se realizó el análisis de comparación de secuencias homólogas utilizando la base de datos BLASTn para obtener la asignación taxonómica más probable. Los resultados del alineamiento se observan en la Tabla IX.

Tanto PM6 como PM7 fueron identificadas como *Stenotrophomonas rhizophila* difiriendo a nivel de cepa al utilizar el *primer* 785F, con el que se obtuvieron secuencias de aproximadamente 1400 pb. Con el *primer* 907R se obtuvieron secuencias de una longitud aproximada de 900 pb. Al realizar el alineamiento en la base de datos con las secuencias generadas a partir del segundo *primer*, éstas fueron identificadas a nivel de género.

TABLA IX. Identificación de los 3 microorganismos analizados. La información corresponde al primer alineamiento encontrado a partir de la secuencia obtenida con cada primer.

Bacteria	Primer	Cobertura (%)	Identidad (%)	Nombre	Código de acceso
PM6	785F	52	99,71	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> cepa R3-90	MF111396.1
	907R	96	99,55	<i>Stenotrophomonas</i> sp. 364	CP047135.1
PM7	785F	47	99,29	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> cepa MK1	MF800946.1
	907R	58	99,77	<i>Stenotrophomonas</i> sp. 364	CP047135.1
Q2	785F	43	99,57	<i>Lysinibacillus</i> sp. cepa Brt-P	MF405114.1
	907R	60	99,66	<i>Lysinibacillus</i> sp. 2008723476	KT254139.1

Las características morfológicas y metabólicas del género *Stenotrophomonas* (Anton *et al.* 2005) coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo para PM6 y PM7. Sin embargo, la prueba bioquímica sobre agar Citrato de Simmons demostró resultados diferentes. La interpretación de los resultados obtenidos para estos aislamientos fue la siguiente:

1. Tinción de Gram: Bacilos Gram negativos.
2. Prueba en agar TSI: no fermentadores de azúcares.
3. Prueba en LIA: lisina decarboxilasa positiva.
4. Prueba de IMViC: indol negativo, rojo de metilo negativo, Voges-Proskauer negativo, citrato negativo para PM6 y positivo para PM7.

En el caso de Q2, las secuencias generadas con ambos *primers* presentaron una longitud aproximada de 1500 pb. Este microorganismo pudo ser identificado como miembro del género *Lysinibacillus*. Sin embargo, no se logró llevar a cabo la identificación a nivel de cepa de forma concluyente. La tinción de Gram característica de *Lysinibacillus* corresponde a bacilos Gram positivos (Sen *et al.* 2020). En la Fig. 16 se observa la tinción de Gram de las bacterias PM6, PM7 y Q2.

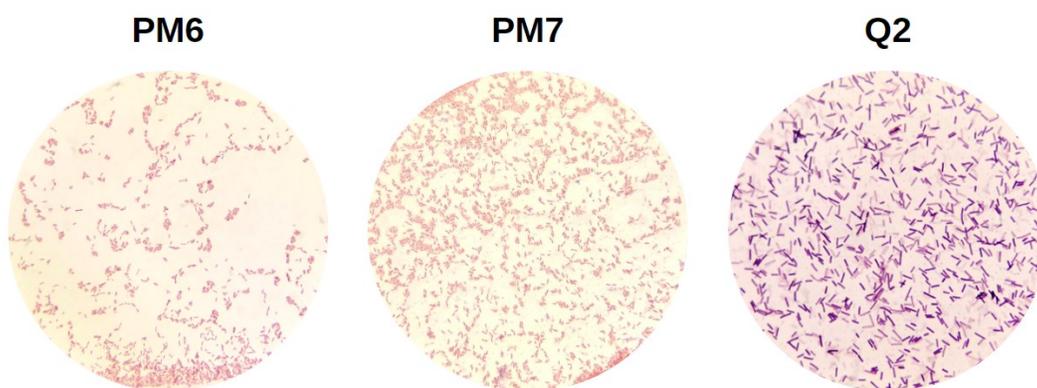


Figura 16. Visualización de la tinción de Gram para PM6, PM7 y Q2. Imágenes tomadas con aumento de 100X.

Si bien hay algunas especies del género *Stenotrophomonas* identificadas como patógenos en humanos (Looney *et al.* 2009), existen estudios de genómica comparativa que demostraron que estas especies difieren genéticamente de las especies benéficas del mismo género (Alavi *et al.* 2014). Incluso se han desarrollado métodos de biología molecular para diferenciar a las especies patógenas de las benéficas (Ribbeck-Busch *et al.* 2005). En particular, *S. rhizophila* ha sido reportada como una bacteria benéfica para el ambiente, que tiene características de promoción de crecimiento vegetal mediante biocontrol (Schmidt *et al.* 2012; Wolf *et al.* 2002). Con respecto al género *Lysinibacillus*, Ahsan y Shimizu (2021) han reportado que se trata de un microorganismo con propiedades interesantes para su aplicación en procesos de biorremediación de metales pesados, y que también presenta propiedades de promoción del crecimiento vegetal, actuando como biocontrolador.

En cuanto a la biodegradación de polipropileno, existen antecedentes de este proceso mediado por los géneros bacterianos identificados en este trabajo. En particular, dos investigadores de la República de Corea, Jeon y Kim (2016), aislaron una cepa degradadora de PP a partir de tierra recogida de un depósito abierto de residuos sólidos urbanos. Esta bacteria fue identificada como *Stenotrophomonas panacihumi* PA3-2. En este estudio emplearon polvo de PP libre de aditivos para evaluar la biodegradabilidad del polímero. También existen investigaciones que evidencian la biodegradación de otros tipos de plásticos mediada por *Stenotrophomonas* en distintas partes del mundo, incluidos Francia (Koutny *et al.* 2009), Brasil (Peixoto *et al.* 2017), Japón (Tachibana *et al.* 2010), India (Skariyachan *et al.* 2017) y Pakistán (Nadeem *et al.* 2021). Tanto en India como en Pakistán, las bacterias fueron aisladas de vertederos de residuos plásticos. Por otro lado, también ha sido reportada la biodegradación de PP mediada por *Lysinibacillus* sp. (Jeon *et al.* 2021). La metodología llevada a cabo junto con el medio de cultivo utilizado fueron similares a lo realizado en el presente trabajo. Los autores remarcan la necesidad de contar con más estudios sobre la degradación completa de PP durante un periodo prolongado para definir la relación entre la biodegradabilidad y la actividad microbiana. Adicionalmente, Andriani *et al.* (2022) evaluaron la biodegradación de *film* y perlas de PP mediada por *Lysinibacillus macroides* aislada de una zona costera en Indonesia. Los resultados obtenidos sugieren que los sistemas con perlas de PP podrían ser una buena fuente de carbono para el estudio a gran escala de bacterias degradadoras de plástico.

A futuro, sería necesario realizar un análisis bioinformático más profundo en cuanto a la reconstrucción del gen analizado para mejorar la identificación de las bacterias. Además, se podría considerar realizar una nueva secuenciación utilizando otros *primers* y mediante el uso de herramientas bioinformáticas intentar lograr la identificación a nivel de especie y cepa, sobre todo en el caso de *Lysinibacillus*.

6. Conclusión

En el presente trabajo se aislaron bacterias de muestras ambientales de sitios contaminados con el fin de evaluar dos mecanismos de biorremediación: biodegradación de polipropileno y biorreducción de cromo.

Las muestras presentaron una gran biodiversidad de microorganismos que pudieron ser caracterizados según su morfología y metabolismo. El análisis de formación de *biofilm* resultó ser un criterio de selección apropiado para continuar con los ensayos posteriores.

Los aislamientos pertenecientes a las muestras recolectadas del Bajo Delta e Islas del Paraná Sur no demostraron resultados prometedores en los ensayos de evaluación de pérdida de peso seco de polipropileno ni de crecimiento en presencia de cromo. Sin embargo, 3 bacterias aisladas de las muestras del Río de la Plata fueron capaces de degradar el polipropileno en sistemas de cultivo con el plástico como única fuente de carbono y energía y, además, tuvieron la capacidad no sólo de crecer en presencia de 1, 3 y 5 ppm de Cr^{6+} , sino que también pudieron biorreducir el Cr^{6+} a una forma menos tóxica para el ambiente, como es el Cr^{3+} . Por otro lado, en sistemas de cultivo en presencia de ambos contaminantes, los 3 microorganismos analizados pudieron degradar el polipropileno, pero no se observó reducción del Cr^{6+} . Por lo tanto, puede concluirse que existen microorganismos nativos del Río de la Plata con capacidad de biodegradar polipropileno en presencia de cromo.

Por otro lado, la identificación de estos microorganismos indicó que 2 pertenecen al género *Stenotrophomonas* y especie *rhizophila*, difiriendo a nivel de cepa y la tercera a *Lysinibacillus* sp. Estas bacterias no son patógenas para el ser humano y han sido previamente reportadas como biodegradadoras de polipropileno. Sin embargo, a la fecha no se han encontrado estudios sobre la biodegradación de este tipo de plástico en presencia de otros contaminantes de origen antrópico, como lo es el cromo.

A pesar de que es necesario optimizar las condiciones de cultivo y el diseño de los ensayos, los resultados obtenidos pueden servir de puntapié inicial para nuevos estudios que permitan a futuro la aplicación de los microorganismos identificados, nativos de ambientes contaminados, en procesos de biorremediación de ambientes que evidencien contaminación por polipropileno y cromo. De este modo, el diseño de estrategias biorremediadoras apunta a la promoción del uso de

alternativas amigables con el ambiente para el tratamiento de residuos generados como consecuencia de actividades antropogénicas.

7. Bibliografía

- AAMER, A. S.; FARIHA, H.; ABDUL, H.; TAVED, I. A. Isolation of *Fusarium* sp. AF4 from sewage sludge, with the ability to adhere the surface of polyethylene. *African Journal of Microbiology Research*, 2009, vol. 3, no 10, p. 658-663.
- ABU-QDAIS, H. A.; AL-GHAZO, M. A.; AL-GHAZO, E. M. Statistical analysis and characteristics of hospital medical waste under novel Coronavirus outbreak. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 2020, vol. 6, no Special Issue (Covid-19), p. 21-30.
- ACUMAR, Autoridad de la Cuenca Matanza-Riachuelo. Sistema de Indicadores Publicación Anual, 2012.
- AHSAN, N.; SHIMIZU, M. *Lysinibacillus* Species: their potential as effective bioremediation, biostimulant, and biocontrol agents. *Reviews in Agricultural Science*, 2021, vol. 9, p. 103-116.
- AJITH, N.; ARUMUGAM, S.; PARTHASARANTHY, S.; MANUPOORI, S.; JANAKIRAMAN, S. Global distribution of microplastics and its impact on marine environment—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, vol. 27, no 21, p. 25970-25986.
- ALAVI, P.; STARCHER, M. R.; THALLINGER, G. G.; ZACHOW, C.; MÜLLER, H., BERG, G. *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC genomics*, 2014, vol. 15, no. 1, p. 1-5.
- ANANI, O. A.; ADETUNJI, C. O. Bioremediation of polythene and plastics using beneficial microorganisms. En *Microbial rejuvenation of polluted environment*. Springer, Singapore, 2021. p. 281-302.
- ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 2011, vol. 62, no 8, p. 1596-1605.
- ANDRIANI, D.; APRIANA, A. Y.; SRIKANDACE, Y.; RATNANINGRUM, D.; ENDAH, E. S. Polypropylene film and beads biodegradation by *Lysinibacillus macroides* isolated from coastal area of Muara Angke in Jakarta-Indonesia. En *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, 2022. p. 012019.
- ANJANA, K., GANESH KUMAR, A.; HINDUJA, M.; SUJITHA, K.; DHARANI, G. Review on plastic wastes in marine environment—Biodegradation and biotechnological solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, vol. 150, p. 110733.
- ARAVINTHAN, A.; ARKATKAR, A.; JUWARKAR, A. A.; DOBLE, M. Synergistic growth of *Bacillus* and *Pseudomonas* and its degradation potential on pretreated polypropylene. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2016, vol. 46, no 2, p. 109-115.

- ARGENTINA.GOB.AR, 2022. <https://www.argentina.gob.ar/ambiente/control/productos-quimicos/metales-pesados>
- ARKATKAR, A.; JUWARKAR, A. A.; BHADURI, S.; UPPARA, P. V.; DOBLE, M. Growth of *Pseudomonas* and *Bacillus* biofilms on pretreated polypropylene surface. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2010, vol. 64, no 6, p. 530-536.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. *EcoSal Plus*, 2018, vol. 8, no 1.
- ARUTCHELVI, J.; SUDHAKAR, M.; ARKATKAR, A.; DOBLE, M.; BHADURI, S.; UPPARA, P. V. Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian Journal of Biotechnology*, 2008, vol. 7, p. 9-22.
- AUTA, H. S.; EMENIKE, C. U.; JAYANTHI, B.; FAUZIAH, S. H. Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. and *Rhodococcus* sp. isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, vol. 127, p. 15-21.
- AVIGLIANO, E.; MONFERRÁN, M. V.; SÁNCHEZ, S.; WUNDERLIN, D. A.; GASTAMINZA, J.; VOLPEDO, A. V. Distribution and bioaccumulation of 12 trace elements in water, sediment and tissues of the main fishery from different environments of the La Plata basin (South America): Risk assessment for human consumption. *Chemosphere*, 2019, vol. 236, p. 124394.
- BASÍLICO, G.; IONNO, V.; IGLESIAS, G.; OLIVELLI, M. S.; DE CABO, L. Sediment pollution in aquatic environments of the metropolitan region of Buenos Aires, Argentina. En *Hazardous and Trace Materials in Soil and Plants*. Academic Press, 2022. p. 97-110.
- BLETTLER, M. C. M.; ULLA, M. A.; RABUFFETTI, A. P.; GARELLO, N. Plastic pollution in freshwater ecosystems: macro-, meso-, and microplastic debris in a floodplain lake. *Environmental monitoring and assessment*, 2017, vol. 189, no 11, p. 1-13.
- BONTEN, C. *Plastics Technology: Introduction and Fundamentals*. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 2019.
- BRENNECKE, D.; DUARTE, B.; PAIVA, F.; CAÇADOR, I.; CANNING-CLODE, J. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2016, vol. 178, p. 189-195.
- CAI, L.; WANG, J.; PENG, J.; WU, Z.; TAN, X. Observation of the degradation of three types of plastic pellets exposed to UV irradiation in three different environments. *Science of the Total Environment*, 2018, vol. 628, p. 740-747.

- CHAMAS, A., MOON, H.; ZHENG, J.; QIU, Y.; TABASSUM, T.; JANG, J. H.; ABU-OMAR, M.; SCOTT, S. L.; SUH, S. Degradation rates of plastics in the environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, vol. 8, no 9, p. 3494-3511.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, 1988. <https://ncbi.nlm.nih.gov/>.
- CLUNIES-ROSS, P. Plastics in the Environment: Te Ao Hurihuri – The Changing World Evidence Summary. *Royal Society*, 2019, p. 1-48.
- CRAWFORD, R. J.; MARTIN, P. J. General properties of plastics. *Plastics Engineering*”, 3rd Edn., Elsevier Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 1998.
- DE PAIVA MAGALHÃES, D.; DA COSTA MARQUES, M. R.; BAPTISTA D. F.; BUSS, D.F. Metal bioavailability and toxicity in freshwaters. *Environmental Chemistry Letters*, 2015, vol. 13, no 1, p. 69-87.
- DIXIT, R.; WASIULLAH; M., D.; PANDIVAN, K.; SINGH, U. B.; SAHU, A.; SHUKLA, R.; SINGH, B. P.; RAI, J. P; SHARMA, P.K.; LADE, H.; PAUL, D. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, 2015, vol. 7, no 2, p. 2189-2212.
- GAMBARINI, V.; PANTTOS, O.; KINGSBURY, J. M.; WEAVER, L.; HANDLEY, K. M.; LEAR, G. PlasticDB: a database of microorganisms and proteins linked to plastic biodegradation. *Database*, 2022, vol. 2022.
- GHOSH, S. K.; PAL, S.; RAY, S. Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, vol. 20, no 7, p. 4339-4355.
- GÓMEZ, B. M.; RODRÍGUEZ SALEMI V.; GÓMEZ, C.; CABO, L. Remoción de cromo hexavalente empleando *Salvinia minima* bajo condiciones controladas de laboratorio. *3er Encuentro de Investigadores en Formación en Recursos Hídricos*, Ezeiza, Buenos Aires, Argentina, 2016.
- GU, J. D.; FORD, T. E.; MITTON, D. B.; MITCHELL, R. Microbial corrosion of metals. *The Uhlig Corrosion Handbook. 2nd Edition. New York: Wiley*, 2000, p. 915-927.
- GU, J. D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International biodeterioration & biodegradation*, 2003, vol. 52, no 2, p. 69-91.
- GUO, X.; WANG, J. The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, vol. 142, p. 1-14.

- HADAD, D.; GERESH, S.; SIVAN, A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of applied microbiology*, 2005, vol. 98, no 5, p. 1093-1100.
- HARTMANN, N. B.; HÜFFER, T.; THOMPSON, R. C.; HASSELLÖV, M.; VERSCHOOR, A.; DAUGAARD, A. E.; RIST, S.; KARLSSON, T. M.; BRENNHOLT, N.; COLE, M.; HERRLING, M. P.; HESS, M.; IVLEVA, N. P.; LUSHER, A. L.; WAGNER, M. Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. *Environmental Science & Technology*, 2019, vol. 53, no 3, p. 1039-1047.
- HODSON, M. E.; DUFFUS-HODSON, C. A.; CLARK, A.; PRENDERGAST-MILLER, M. T.; THORPE, K. L. Plastic bag derived-microplastics as a vector for metal exposure in terrestrial invertebrates. *Environmental Science & Technology*, 2017, vol. 51, no 8, p. 4714-4721.
- HOLMES, L. A.; TURNER, A.; THOMPSON, R. C. Interactions between trace metals and plastic production pellets under estuarine conditions. *Marine Chemistry*, 2014, vol. 167, p. 25-32.
- HOPEWELL, J.; DVORAK, R.; KOSIOR, E. Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, vol. 364, no 1526, p. 2115-2126.
- HÜFFER, T.; WENIGER, A. K.; HOFMANN, T. Sorption of organic compounds by aged polystyrene microplastic particles. *Environmental Pollution*, 2018, vol. 236, p. 218-225.
- JEON, H. J.; KIM, M. N. Isolation of mesophilic bacterium for biodegradation of polypropylene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, vol. 115, p. 244-249.
- JEON, J. M.; PARK, S. J.; CHOI, T. R.; PARK, J. H.; YANG, Y. H.; YOON, J. J. Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JJY0216 isolated from soil grove. *Polymer Degradation and Stability*, 2021, vol. 191, p. 109662.
- KALE, S. K.; DESHMUKH, A. G.; DUDHARE, M. S.; PATIL, V. B. Microbial degradation of plastic: a review. *Journal of Biochemical Technology*, 2015, vol. 6, no 2, p. 952-961.
- KIRSTEIN, I. V.; WICHELS, A.; GULLANS, E.; KROHNE, G.; GERDTS, G. The plastisphere—uncovering tightly attached plastic “specific” microorganisms. *PLoS One*, 2019, vol. 14, no 4, p. e0215859.
- KOUTNY, M.; AMATO, P.; MUCHOVA, M.; RUZICKA, J.; DELORT, A. M. Soil bacterial strains able to grow on the surface of oxidized polyethylene film containing prooxidant additives. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, vol. 63, no 3, p. 354-357.

- KUMARI, D.; QUIAN, X. Y.; PAN, X.; ACHAL, V.; LI, Q.; GADD, G. M. Microbially-induced carbonate precipitation for immobilization of toxic metals. *Advances in applied microbiology*, 2016, vol. 94, p. 79-108.
- LACAVA, J. E.; SCHMAEDKE, A.; DENARO, M. A.; BERNABEU, P. R.; GARGARELLO, R. M. Evaluación de la presencia de microplásticos en playas del Río de la Plata: Ciudad de Buenos Aires y alrededores. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales. Investigación, desarrollo y práctica*, p. 1163-1173.
- LI, J.; ZHANG, K.; ZHANG, H. Adsorption of antibiotics on microplastics. *Environmental Pollution*, 2018, vol. 237, p. 460-467.
- LIU, H.; JUNMIN, Z.; QIWEN, H.; XIANCAI, R. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, 2016, vol. 50, p. 10-17.
- LIU, X.; ZHENG, M.; WANG, L.; KE, R.; LOU, Y.; ZHANG, X.; DONG, X.; ZHANG, Y. Sorption behaviors of tris-(2, 3-dibromopropyl) isocyanurate and hexabromocyclododecanes on polypropylene microplastics. *Marine pollution bulletin*, 2018, vol. 135, p. 581-586.
- LIU, Y.; FAN, Q.; WANG, J. Zn-Fe-CNTs catalytic in situ generation of H₂O₂ for Fenton-like degradation of sulfamethoxazole. *Journal of hazardous materials*, 2018, vol. 342, p. 166-176.
- LOONEY, W. J.; NARITA, M.; MÜHLEMANN, K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *The Lancet infectious diseases*, 2009, vol. 9, no. 5, p. 312-323.
- LYNCH, J. M.; MOFFAT, A. J. Bioremediation—prospects for the future application of innovative applied biological research. *Annals of Applied Biology*, 2005, vol. 146, no 2, p. 217-221.
- MA, W.; PENG, D.; WALKER, S. L.; CAO, B.; GAO, C. H.; HUANG, Q.; CAI, P. *Bacillus subtilis* biofilm development in the presence of soil clay minerals and iron oxides. *npj Biofilms and Microbiomes*, 2017, vol. 3, no 1, p. 1-9.
- MACHOVSKY-CAPUSKA, G. E.; AMIOT, C.; DENUNCIO, P.; GRAINGER, R.; RAUBENHEIMER, D. A nutritional perspective on plastic ingestion in wildlife. *Science of the Total Environment*, 2019, vol. 656, p. 789-796.
- MASINDI, V.; MUEDI, K. L. Environmental contamination by heavy metals. *Heavy metals*, 2018, vol. 10, p. 115-132.
- MENONE, M. L.; DE MELLO, F. T. Water quality and impacts of development. En *The Paraná River Basin*. Routledge, 2020. p. 124-139.
- MIN', T. T.; SPIRIDONOVA, R. R.; AGZAMOV, R. Z.; KOCHNEV, A. M.; SIROTKIN, A. S. Improving the compatibility and assessing the biodegradation of polymer composites of low-density

polyethylene and polyamide-6. *International Polymer Science and Technology*, 2015, vol. 42, no 1, p. 51-56.

MITCHELL, C-; QUAGLINO, M C.; POSNER, V. M.; ARRANZ, S. E.; SCIARA, A. A. Quantification and composition analysis of plastic pollution in riverine beaches of the lower Paraná River, Argentina. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, vol. 28, no 13, p. 16140-16151.

MOYES, R. B.; REYNOLDS, J.; BREAKWELL, D. P. Differential staining of bacteria: gram stain. *Current Protocols in Microbiology*, 2009, vol. 15, no 1, p. A. 3C. 1-A. 3C. 8.

NADEEM, H.; ALIA, K. B.; MUNEER, F.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M.H.; AZEEM, F.; ZUBAIR, M. Isolation and identification of low-density polyethylene degrading novel bacterial strains. *Archives of Microbiology*, 2021, vol. 203, no 9, p. 5417-5423.

NAVARRO-AVIÑÓ, J. P.; ALONSO, I. A.; LÓPEZ-MOYA, J. R. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 2007, vol. 16, no 2.

NG, K. L.; OBBARD, J. P. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. *Marine pollution bulletin*, 2006, vol. 52, no 7, p. 761-767.

NUSS, P.; ECKELMAN, M. J. Life cycle assessment of metals: a scientific synthesis. *PloS one*, 2014, vol. 9, no 7, p. e101298.

O'TOOLE, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE*. 47, 2011.

OECD. Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options, 2022.

OKEREAFOR, U.; MAKHATHA, M.; MEKUTO, L.; UCHE-OKEREAFOR, N.; SEBOLA, T.; MAVUMENGWANA, V. Toxic metal implications on agricultural soils, plants, animals, aquatic life and human health. *International journal of environmental research and public health*, 2020, vol. 17, no 7, p. 2204.

PAZOS, R. S.; MAIZTEGUI, T.; COLAUTTI, D. C.; PARACAMPO, A. H.; GÓMEZ, N. Microplastics in gut contents of coastal freshwater fish from Río de la Plata estuary. *Marine pollution bulletin*, 2017, vol. 122, no 1-2, p. 85-90.

PEIXOTO, J.; SILVA, L. P.; KRÜGER, R. H. Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. *Journal of hazardous materials*, 2017, vol. 324, p. 634-644.

PLASTICSEUROPE, E. P. R. O. Plastics - The Facts 2020. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. *PlasticEurope*
<https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/1804-plastics-facts-2020>, 2020.

- RAMÍREZ-DÍAZ, M. I.; RIVEROS-ROSAS, H.; CAMPOS-GARCÍA, J.; CERVANTES, C. Reducción bacteriana de cromo hexavalente: mecanismos y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 2009, vol. 28, no 3, p. 73-79.
- RIBBECK-BUSCH, K.; RODER, A.; HASSE, D.; DE BOER, W.; MARTÍNEZ, J. L.; HAGEMANN, M.; BERG, G. A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant-associated *Stenotrophomonas rhizophila*. *Environmental Microbiology*, 2005, vol. 7, no 11, p. 1853-1858.
- RICHARD, H.; CARPENTER, E. J.; KOMADA, T.; PALMER, P. T.; ROCHMAN, C. M. Biofilm facilitates metal accumulation onto microplastics in estuarine waters. *Science of the total environment*, 2019, vol. 683, p. 600-608.
- ROZMAN, U.; KALČÍKOVÁ, G.; MAROLT, G.; SKALAR, T. y GOTVAJN, A. Ž. Potential of waste fungal biomass for lead and cadmium removal: characterization, biosorption kinetic and isotherm studies. *Environmental Technology & Innovation*, 2020, vol. 18, p. 100742.
- RUEDA, E. M. S.; LANDAZURI, P.; LOANGO, N. Remoción de cromo hexavalente de aguas residuales con microorganismos adaptados a medios ricos en cromo. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 2017, vol. 1, no 29, p. 49-57.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold spring harbor laboratory press*, 1989.
- SCHMIDT, C. S.; ALAVI, M.; CARDINALE, M.; MÜLLER, H.; BERG, G. *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. *Biology and fertility of soils*, 2012, vol. 48, no 8, p. 947-960.
- SCIENCE HISTORY INSTITUTE. Science Matters: the case of plastics. <https://www.sciencehistory.org/science-of-plastics>.
- SEN, S.; SAHA, T.; BHATTACHARYA, S.; NIDHI; MONDAL, N.; GHOSH, W.; CHAKRABORTY, R. Draft genome sequences of two boron-tolerant, arsenic-resistant, gram-positive bacterial strains, *Lysinibacillus* sp. OL1 and *Enterococcus* sp. OL5, isolated from boron-fortified cauliflower-growing field soils of northern West Bengal, India. *Microbiology Resource Announcements*, 2020, vol. 9, no 2, p. e01438-19.
- SHAH, M. M.; ODOYO, E.; ICHINOSE, Y. Epidemiology and pathogenesis of *Providencia alcalifaciens* infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2019, vol. 101, no 2, p. 290.
- SHAH, S.; KUMAR, A. Bioavailability, Bioconcentration, and Biomagnification of Pollutants. En *Environmental Toxicology and Ecosystem*. CRC Press, 2022. p. 179-214.

- SIERRA, C. A. S.; GARCÍA, H. G. Verificación analítica para las determinaciones de cromo hexavalente en aguas por espectrofotometría. *Ingenierías USBMed*, 2013, vol. 4, no 1, p. 22-26.
- SILVA, A. L. P.; PRATA, J. C.; WALKER, T. R.; DUARTE, A. C.; OUYANG, W.; BARCELÒ, D.; ROCHA-SANTOS, T. Increased plastic pollution due to COVID-19 pandemic: Challenges and recommendations. *Chemical Engineering Journal*, 2021, vol. 405, p. 126683.
- SKARIYACHAN, S.; SETLUR, A. S.; NAIK, S. Y.; NAIK, A. A.; USHARANI, M.; VASIST, K. S. Enhanced biodegradation of low and high-density polyethylene by novel bacterial consortia formulated from plastic-contaminated cow dung under thermophilic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, vol. 24, no 9, p. 8443-8457.
- STARNECKER, A.; MENNER, M. Assessment of biodegradability of plastics under simulated composting conditions in a laboratory test system. *International biodeterioration & biodegradation*, 1996, vol. 37, no 1-2, p. 85-92.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. D.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 2007, vol. 115, no 8, p. 891-899.
- SUN, J.; DAI, X.; WANG, Q.; VAN LOOSDRECHT, M. C.; NI, B. J. Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. *Water research*, 2019, vol. 152, p. 21-37.
- TACHIBANA, K.; HASHIMOTO, K.; YOSHIKAWA, M.; OKAWA, H. Isolation and characterization of microorganisms degrading nylon 4 in the composted soil. *Polymer degradation and stability*, 2010, vol. 95, no 6, p. 912-917.
- THOMPSON, R. C.; SWAN, S. H.; MOORE, C. J.; Vom Saal, F. S, et al. Our Plastic Age, *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*. 2009.
- THOMPSON, R. C.; SWAN, S.H.; MOORE, C.J.; VOM SAAL F. S. Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009, vol. 364, no 1526, p. 1973-1976.
- VEDOLIN, M. C.; TEOFILO, C. Y. S.; TURRA, A.; FIGUEIRA, R. C. L. Spatial variability in the concentrations of metals in beached microplastics. *Marine pollution bulletin*, 2018, vol. 129, no 2, p. 487-493.
- VULLO, D. L. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2003, vol. 2, no 3, p. 93-104.
- WANG, J.; TAN, Z.; PENG, J.; QIU, Q.; LI, M. The behaviors of microplastics in the marine environment. *Marine Environmental Research*, 2016, vol. 113, p. 7-17.

- WEISS-MUSZKAT, M.; SHAKH, D.; ZHOU, Y.; PINTO, R.; BELAUSOV, E.; CHAPMAN, M. R.; SELA, S. Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55: H7, an atypical enteropathogenic strain. *Applied and environmental microbiology*, 2010, vol. 76, no 5, p. 1545-1554.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19, 2020.
- WIERCKX, N.; PRIETO, M. A.; POMPOSIELLO, P.; DE LORENZO, V.; O'CONNOR, K.; BLANK, L. M. Plastic waste as a novel substrate for industrial biotechnology. *Microbial biotechnology*, 2015, vol. 8, no 6, p. 900.
- WOLF, A.; FRITZE, A.; HAGEMANN, M.; BERG, G. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2002, vol. 52, no 6, p. 1937-1944.
- XU, B.; LIU, F.; BOOKES, P. C.; XU, J. The sorption kinetics and isotherms of sulfamethoxazole with polyethylene microplastics. *Marine pollution bulletin*, 2018, vol. 131, p. 191-196.
- ZHANG, J.; GAO, D.; LI, Q.; ZHAO, Y.; LI, L.; LIN, H.; BU, Q.; ZHAO, Y. Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of the Total Environment*, 2020, vol. 704, p. 135931.

8. Anexos

8.1. Anexo A. Información complementaria de los medios de cultivo utilizados en la caracterización metabólica de los aislamientos

- **Prueba en agar TSI.** El Agar TSI (triple azúcar hierro) es un medio de cultivo que aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo del microorganismo (extracto de carne y pluripeptona), cuenta con NaCl para mantener el balance osmótico, rojo de fenol como indicador de pH (vira a amarillo en medio ácido y a rojo en medio alcalino) junto con los tres hidratos de carbono fermentables: glucosa, lactosa y sacarosa. A su vez, presenta en su composición tiosulfato de sodio que puede conducir a la producción de ácido sulfhídrico. El ácido generado puede reaccionar con los iones Fe^{+3} del sulfato de hierro y amonio -otra sal presente en el medio- y así producir sulfuro de hierro (compuesto de color negro). Es un medio de cultivo sólido que contiene agar como agente solidificante.
- **Prueba en LIA.** LIA es un medio de cultivo sólido compuesto por nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano (peptona y extracto de levadura), púrpura de bromocresol como indicador de pH (vira a amarillo cuando el medio presenta $pH \leq 5.8$ y a violeta si el pH es ≥ 6.8) y glucosa como carbohidrato fermentable. También cuenta con lisina, que es el sustrato que determina si la bacteria posee o no las enzimas correspondientes a catalizar la reacción sobre el aminoácido. Las sales de citrato de hierro y amonio y tiosulfato de sodio permiten determinar la producción de H_2S (mismo principio que en la prueba en agar TSI).
- **Prueba de IMViC.**

Prueba de indol. El agua de peptona al 1% es un medio de cultivo que se puede utilizar en esta prueba. Post incubación, se revelaron los resultados con el agregado de 5 gotas del Reactivo de Kovacks (alcohol amílico, p-dimetilamino-benzaldehido y HCl):

 - a) Indol (+): color rojo en la interfase entre el reactivo y el medio de cultivo: el microorganismo posee la enzima triptofanasa (el indol generado por el microorganismo reacciona con el reactivo formando un complejo de color rojo).

- b) Indol (-): color amarillo en la interfase entre el reactivo y el medio de cultivo: el microorganismo no posee la enzima para desdoblar el aminoácido (se visualiza el color amarillo propio del reactivo).

Prueba de rojo de metilo y Voges-Proskauer. Estas pruebas evidencian la capacidad del microorganismo en metabolizar la glucosa a través de una de dos vías (fermentación ácido-mixta o fermentación vía butilenglicólica) que llevan a la generación de productos finales ácidos o neutros. El medio de cultivo empleado es MR-VP. Es un medio de cultivo líquido que cuenta con peptona y glucosa que aportan factores orgánicos de crecimiento y fuente de carbono y energía respectivamente. Además, posee fosfato dibásico que actúa como solución buffer. A un tubo de ensayo se le agregan 5 gotas del indicador de pH rojo de metilo para revelar la presencia o ausencia de productos finales ácidos:

- a) RM (+): medio de cultivo de color rojo: el microorganismo metaboliza la glucosa generando productos finales ácidos (el indicador vira a rojo a pH ácido).
- b) RM (-): medio de cultivo sin cambio de coloración: el microorganismo metaboliza la glucosa (hay crecimiento) pero no produce una acidificación del medio.

Al otro tubo de ensayo se le agregan 12 gotas de alfa-naftol (actúa como intensificador de color) y 4 de KOH 40% (agente oxidante, acelera el proceso de reacción) para determinar la generación de productos finales neutros:

- a) VP (+): medio de cultivo de color rojo-rosado: el microorganismo metaboliza la glucosa generando productos finales neutros (entre ellos, la acetoína reacciona con el KOH 40% y se oxida a diacetilo en presencia de oxígeno atmosférico. El diacetilo reacciona con la peptona del medio produciendo coloración roja) que reaccionan con los reactivos luego de 10-15 minutos.
- b) VP (-): medio de cultivo sin cambio de coloración: el microorganismo metaboliza la glucosa pero no produce una neutralización del pH del medio.

Prueba en Citrato de Simmons. El Citrato de Simmons es un medio de cultivo sólido que cuenta con fosfato monoamónico como única fuente de nitrógeno, NaCl para mantener el balance osmótico, agar como agente solidificante y azul de bromotimol como indicador de pH (vira a color azul en pH alcalino). El cambio color del medio de cultivo post incubación fue registrado:

- a) C (+): medio de cultivo de color azul: el microorganismo metaboliza el citrato ya que posee la enzima citrato permeasa (produce alcalinización del medio, lo que conduce al viraje a azul del indicador de pH).
- b) C (-): medio de cultivo de color verde: ausencia de crecimiento (permanencia del color verde del medio de cultivo). Este microorganismo no posee la enzima citrato permeasa.

8.2. Anexo B. Tabla con resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas

Gram	Prueba en agar TSI	Prueba en LIA	Prueba de IMViC				Aislamiento
			I	MR	VP	C	
(-)	Bacteria fermentadora de glucosa, lactosa y/o sacarosa	(-) lisina decarboxilasa y (-) lisina desaminasa	(-)	(+)	(-)	(-)	20, 24, 50A, 50C , 53B
			(+)	(+)	(-)	(-)	2A, 2B
			(+)	(+)	(-)	(+)	28, 46A, 46B
			(-)	(+)	(-)	(+)	54A
			(-)	(-)	(+)	(+)	16, 41A, 48A, Q3
		(+) lisina decarboxilasa	(-)	(-)	(+)	(+)	5, 9A, 9B , 42A, 42B, 43A, 43B, 45A, 45B , 51A, 17B , 27, 17A, PM2, 49, 15B
			(-)	(+)	(-)	(+)	23, 44
			(+)	(-)	(+)	(+)	41B
			/	/	/	/	18A, 21, 31, 34A, 30
			(+)	(-)	(-)	(-)	Q1, 26, 53A, VL3, 18B, 50B, 51B, PM7
	Bacteria no fermentadora de azúcares	(+) lisina decarboxilasa	(-)	(-)	(-)	(-)	1, VL4, 25, 52B, Q4, PM6
			(-)	(-)	(-)	(-)	52A*, VL2* , VL6*, 32*
			/	/	/	/	PM3, PM4, PM5, PM8, 19A, 19B
(+)	3, 34B, 47, VL5, VL1, VL7, Q2, 22, 15A, PM1						

Donde:

- (*): Resultado positivo para la formación de H₂S en la prueba en agar TSI.
- Aislamientos señalados en rojo: descartado su uso para los ensayos posteriores
- Aislamientos señalados en azul: aislamientos pertenecientes a una misma muestra que demostraron resultados iguales en las seis pruebas bioquímicas.

Los aislamientos restantes fueron seleccionados para evaluar capacidad formadora de *biofilm*.

8.3. Anexo C. Secuencias parciales del gen rRNA 16S de las bacterias PM6, PM7 y Q2

- **PM6**

>H221213-R04_M03_PM6_785F.ab1 1335

```
TACCGTCGGATGCGACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCT
GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA
TTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACATGTCGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG
AACTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGC
AACCCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTACTACAATGGTAGGGACAGAGGGCTG
CAAACCCGCGAGGGCAAGCCAATCCCAGAAACCCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAA
GTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCCTTGTACACACCGCCCGTC
ACCCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATG
ACTGGGGTGAAGTCGTACAAAGGGTAGCCAACGAGTTGGTCTCGGATTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAA
TGTTATCTCTCACTTAATGGCAGGTTACACACGTGTACTACCCGTCCTCCACTCGTTCACAATTAATCAAGA
TGCAAGCACCTTCAATAATCAGAACTCGTTCACTTGTGTATTAAGCACGCCGCGCCGCTCTCCTAGGTCTACG
AGCAATAAAATAAAAAATAAAAAAGGCGGTTATTTTTTTCGTGTTGTATATAGTGAATAACGACTATCATTTTTT
TTCTTGGGTTGTGGGAGGTATAAATCTTTCGGGTTGTTTGTGTTGGGTTAAAACCATACGCAGGTTGTTGTTTT
TTTTTCTTGTAGATGTGGAGTGAATAAAAAAGGTTCTCAAACGACGTGTTGGTGTGTTACGGGTGTTTTCGGATT
GCAAAATATCCGCATCTGGGATGTATGAGAGTTAGAGTGTATTTTTTGTGTTGGTGTGTAAGCCCTTGTCTATAG
AGGTATGCCAATGATGCTGTGAGGGGGGACCGAGTCTATGATGAATAAGATCTAAATTTTGCATCTTTTGCACG
CGCTCGTGAGAGCGCCTTTGTTTTGCGTTTTGTTGGTAGTTAATTTATACGGGTCATCTTC
```

>H221213-R04_003_PM6_907R.ab1 919

```
GCCCTGGGACGGTCTTCCAGGCGGCGACTTAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCACCC
AACATCCAGTTCGCATCGTTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTT
TCGTGCCTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTTCTCCGATCTCTACG
CATTTCACTGCTACACCGGAATTCCACTACCCTCTACCACACTCTAGTCGCCAGTATCCACTGCAA
TTCCAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACAACAGACTTAAACAACCACCTACGCACGCTTTACGCCAGT
AATTCAGTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCTTATT
CTTTGGGTACCGTCAGAACAACCGGGTATTAGCCAGCTGCTTTTCTTTCCCAACAAAAGGGCTTTACA
ACCCGAAGGCCTTCTTACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCCC
ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCA
GCTACGGATCGTCGCCTTGGTGGGCTTTACCCCGCAACTAGCTAATCCGACATCGGCTCATCTATC
CGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCACCCGAAGGTCGTATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTA
CGTTATCCCCACGAAAAGGTAGATTCCGATGTATTCTCACCCTCCGCCACTCGCCACCCATAAGA
GCAAGCTCTTACTGTGCTGCCGTTTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTACCGCCAGCGTTCACTCTGAGCC
ATGATTCAAAACCTCTAAAACCTACCTTGTACGACT
```

- **PM7**

```
>H221213-R04_A05_PM7_785F.ab1 1476
GACGTCGATGCGACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATT
CGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATGTCGAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAA
CTCGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTAACAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCA
AACCCGCGAGGGCAAGCCAATCCCAGAAACCCATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGT
CGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTAC
ACCATGGGAGTTTGTTCACCAGAAGCAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTGCCACGGTGTGGCCGATGAC
TGGGGTGAAGCAAAAAGGGGAAACAAAACAAAGGGTTGGACCGGGGCCCGGAGGGCGGGCACCGGGGCTCCC
GGGGGGCTGACCGGGCCCGGGGGCCCGCCGGGGCCCCCCCCGGCGGGCGGGCCCGGGGGCCCC
ACAGGATCCACACGCAACCGGGCTCGACCCGAGGCAAGAGGCACCACGCAAGCAACGACGCGGGGCCAAGGCA
AACAAAAAAGCACACAACGCACGCCCCAGACGGGGCACCGAGGAAGCACGAAAGAAGACGACGGGCACCAACG
ATCAGGCGCGGGGGGGGAAGAACAACAAACCCGGGGAAGGACGGAACCGGGGGCCACAAGGAAAAAAAAAAGA
AAGAAGACGGAACCCCGGCACCCACCCAGAAAAAACAGAAAAAGGGCAAGAAACCCGACCCCGGGGGGAGAAAGG
GCCCGCGGGGGGGGGGGGGGAGCCCGGGGCGCGAACACGGCGAAAAACCCGCGCCCGCGGGCGGGGGGAGAAAGG
GGGGGGCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGGGAAAAAACACCAAAACAAAAAAGAGCACGGGGGGAAGGAGAG
GGGGGGGGGGCCAACCGCGAAAAACAGGGGGGACACACCACACCCAAACCCCGCCGCGCCCCGCGCGCCCC
CCCGCCACCAACCGAAAGGGAGAAGAGGACCACCGACAAACAAAAAACCAACAAAAAATAACACACGCCCC
CCCCCCCCCCCCCCCCACCCCAAGAGAAGAGGAGCGGGAGGGCGTG
```

```
>H221213-R04_C05_PM7_907R.ab1 1482
ACTTTGGGCGGTACTCCCAGGCGGGGACTTAAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCACCCAACATCC
AGTTTCGCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGTGCCTCAGTGT
CAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTCTCCCGATCTCTACGCATTTACTGCTACACCGGGA
ATTCCTACTACCTCTACCACACTCTAGTCGCCCAGTATCCACTGCAATTCCCAGGTTGAGCCCAGGGCTTTCACA
ACAGACTTAAACAACCACCTACGCACGCTTTACGCCCAGTAATTCGAGTAACGCTTGCACCTTTCGTATTACCG
CGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGCCTTATCTTTGGGTACCGTCAGAACAACCGGGTATTAGCCAGCTGCTT
TTCTTTCCCAACAAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGCCCTTCTTACCCACGCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGC
CCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCAT
CCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTGCCTTGGTGGGCTTTACCCCGCAACTAGCTAATCCGACATCGGCTCAT
CTATCCGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCGCTTTACCCGAAGGTCGTATGCGGTATTAGCGTAAGTTTCCCTACG
TTATCCCCCACGAAAAGGTAGATTCCGATGTATTCTCACCCGTCGCGCACCTCGCCACCCATAAGAGCAAGCTCT
TACTGTGCTGCCGTTGCACTTGCATGTGTTAGGCCTACCGCCAGCGTTCACTCTGAGCATGAAAAAAAAAATTTA
AAAGGCTACCATGGTTACGGATTACTGAGCCCGGATCAAACCTCCACGGATACCTTGCTACGACTTACTGACTGAC
TCCAACCTAAGGGATTCCCCTCACGAACTACTGACATCTGAGCCAAGATCAATGCGTTCCTTGTCTAAAACCTT
CGGGAACCTGCAGCAAAATCAAACGCCCTGTTTATTCAGAAATTAAGTGGTATCCTGAGTGAAGGCAGGGGTAG
GGGAATATGCGGGGTAGGTGAAACTCCTAACCCCTTACCGGGGACGCCGTGTGGCACAGGTCTAACATGGGAGGC
AACCCCGGGGACGTTATTTATTAAGATACTTGTTCATGGCATGATGTATACGCGGGTACAGGAACCTAATTATG
CGATGATGCGTTTAGATAACCGGGCGTGCCCGCCCCCAATGTGGTCCCTATGGATGTTGATCGACTGGGAATG
CGGGACATGATCGATGAATGATCATGGTGTGAAGGAGTGTGTTGAAACGAACGACATGAGATATGGAGTATTGT
AGTGAGGAGTTCTAGAGGTTGGCGTGTAGTAATTTGGTGGACAAGAGCGGATATTTCG
```

- Q2

```
>H221213-R04_E05_Q2_785F.ab1      1587
CCCCGACGAATGAGTGC TAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATGGTTTTCCCTTCGG
GGACAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATACAAACGGTTG
CCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAA
GCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCACGAGAGTTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGATAGATGA
TTGGGGTGAAGTCGTACAAAGGGTAGCCAAAGGAGTTTGCATCCTGCGCTACAGTGCAGGTGTACACGGTACCAT
ATACACTCCGTCTCTCCTGAGTTACTCCATACTCTGCGCGTTCACAGCGCTACACATGCACTTCTACGCTCCTCGT
CTGTCTTACACTTACAGGTGACCATATAGCTTCAACGGCTCCGCCGGGTGCTTCAGTAGCGACGCTGAGACCCG
ACTGAATGGCGCTGTCCCCCATAATCCCTGTACAGCTGGCCCAATACATATCACCACGACTACTCTTACGTGG
TTTTGCGGGCCTTCCACCTCCCGTAACCGTCTGGGTTCGGTTTGGGCCCGCTACTTGTCTCCATGGCTGTGT
ACTTTTCTATCCCGAAAACGTAAGTTTTGACCGGCATTGACCCACCCCTTCCCTCCTTGCCGCAATATCCTT
GATGTTCCCTCCCGAAGGAGTTGGGGACAGGGCACGGGCGCTGAGGGGAAATACACCTTAATGGCCTTTTGGGCT
ATTTGCCTCTAGGTTATATTTCTATGTTACAGACTGAGAGGAAACCGCGCGCCTTTTTATTAAATAAAAAATTCT
TTTTTTATGTATGGGAGTAGGGAAGAATATAGATTGTGACGCGTTTATCTTGGTTTTTTATTTTTATGATATAATA
CGGAGTGTATATTAGGCTCGCCTCTCCACATTTGGTTGCGCACAAGAAAATATCTCTATTAGACATGGAGCGGCGG
GCGGCGTCCGTAGCATCGCATCACACACACAACAACACAAAACAGATAACGTA AAAATGAACAGA ACTATTTGT
GAGGTGGTTATGGCAATGGTGATGGCCCGGACTGGGGTAGGTTATATGGTTCGATGGGCAGTACACAAAAAATAA
TGAATGTATGAT
```

```
>H221213-R04_G05_Q2_907R.ab1      1464
ACCGTCACGCTCTCCAGGCGGAGTGC TTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAG
CACTCATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCA
GTTACAGACCAGAAAGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCAAATCTCTACGCATTTACCCGCTACACTTGGAAAT
TCCACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCCCCAGTTTCCAATGACCCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATC
AGACTTAAAGGACCGCCTGCGCGCGCTTTACGCCCAATAATTCGGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCG
GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTAATAAGGTACCGTCAAGGTACAGCCAGTTACTACTGTACTTGT
CTTCCCTTACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACC
ATTGTGGAAGATTTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACC
TCTCAGGTGGCTACGCATCGCTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCT
TATAGCGACAGCCGAGACCGTCTTTCAGTATTTACCATGAAGTGAAATAGATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTT
CCCGGAGTTATCCCAAACATAAAGGTAGGTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCA
AGCTCCTTCTCTGTTTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCAGATTAAAAA ACT
TAAAAAAAATACCTTGTTCGACTTCCCTGAGCCAGGATCAAAATCTAAGGCTCCCTTGTACGACCTACTGAGTC
AGGATCAAAATGTAAGGGTATTTTGTATGGGCTTGTGAGCCGGGAACAAACTTTAATGATGGAATAGGTTACC
TTACGCAGCATGATCCAACGTGTTTAGTTACTTCTGTTAAAACCTTAGGGACCCCTCGCAATAAGCTTGGGCCGTGTC
TGGTAGAGATTTCCCGAGCCCCCCCCCGCCGAAAACCGGGAACGTGGGTGGTGCCGACACCCAAAAGCCCT
CGCGGGGGGTTGGACATGACGAATGTTTATATGGTGTTTAATAAAAAGAGTCAATGGGGGCGGGGTGCTCTATTTA
TAAATTATTTGGTCTGTGTTTTTGGCTCCCCACAAAACAAAAGGAATCGCCTTTGGCTCGCCGGCTCTAAGAAA
GATCACACAAAATAAATTTGGGCGTGGGTGTCTGTCTCACCTCCAGCCACCCCGATATATGATTAGGAAACCTCTT
TTTGGTGTTTTTGTTTTGGGAGACGGACGGGGGGGGTGC
```