

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE CALKINI

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERASA EN MUESTRAS
BACTERIANAS OBTENIDAS DE AMBIENTES SALINOS PARA LA
BIODEGRADACIÓN DE POLIÉSTERES”**

TESIS PARA TITULACIÓN INTEGRAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**EGRESADO:
MOISÉS COBÁ NÚÑEZ**

**DIRECTOR Y CO-DIRECTOR:
DR. JOSÉ EFRAÍN RAMÍREZ BENÍTES
DR. IVÁN ALFREDO ESTRADA MOTA**

Calkiní, Campeche, México 2025



Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Subdirección de Planeación y Desarrollo

Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante

Calkiní, Campeche 25943
P/10/25/799
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

CONSTANCIA DE NO INCONVENIENCIA

MODALIDAD: TESIS

C. MOISES COBA NUÑEZ 7371
PASANTE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOQUÍMICA.
PRESENTE

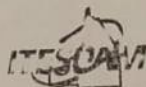
Con relación a lo establecido en el Reglamento de Estudios de Licenciatura, capítulo VII, fracción I, vigente en este Instituto, y una vez emitido el fallo favorable por el director DR. JOSÉ EFRAIN RAMÍREZ BENÍTEZ, y el co-director DR. IVAN ALFREDO ESTRADA MOTA, respectivamente, este Instituto consta de no tener inconveniencia para la realización del acto protocolario de titulación integral de su trabajo profesional titulado: "**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERASA EN MUESTRAS BACTERIANAS OBTENIDAS DE AMBIENTES SALINOS PARA LA BIODEGRADACIÓN DE POLIÉSTERES**".

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría, Fortaleza de Nuestra Cultura®

Dr. Jorge Alfonso Hau Puc.
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante.

C.c.p. Archivo



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE CALKINÍ

"DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR Y APOYO A
ESTUDIANTES"

CLAVE: 04MSU0013P
CALKINÍ, CAMPECHE, MÉXICO



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Ah Canul S/N por Carretera Federal, Calkiní, Campeche,
C.P. 24900 Tel. 996-8134870,
e-mail: se_calkiní@tecnm.mx | itescam.edu.mx



Dedicatoria

A todos mis amigos y compañeros que estuvieron en todo el trayecto de la carrera; Abimael, Alejandra, Sandra, Rafael, Margarita, Marcel y Rosa. Quienes siempre estuvieron conmigo en las buenas, en las malas y en las peores en todo el tiempo que duró la ingeniería.

A mis amigos de Campeche quienes siempre preguntaban, ayudaban y apoyaban en todo; Alan, Ricardo, Javier, Scarlett y Ariadna. Quienes estuvieron conmigo en todo momento y fueron mi impulso, al igual que mis amigos del tecnológico.

A mis hermanos Elmer, el Ing. Samuel y a mi madre la Lic. Irma, quienes siempre me apoyaron y me permitieron llevar a cabo todos mis sueños y proyectos, los amo con todo mi corazón.

A mis compañeros y amigos de la facultad de ciencias; Adriana, Faride, Fernanda, María Inés, Angy y María José. Quienes me ayudaron y apoyaron en el trayecto de mi residencia profesional y posterior tesis, se les aprecia con todo el corazón.

Agradecimientos

A mi asesor el Dr. Iván Estrada, quien me asesoró al respecto de la realización de este trabajo y quien desde el servicio social, me ha enseñado muchas cosas para las posteriores materias que estudié en el futuro, además de su apoyo a mis proyectos personales.

A mi asesor el Dr. Efraín Ramírez, quien fue pilar fundamental en este trabajo y que, con sus consejos, apoyo y asesoría, se logró llevar a cabo este proyecto, además del apoyo y ayuda en mis proyectos personales y que a su vez, fue un excelente maestro en todo ámbito posible. Hacen falta maestros con tanta pasión y espíritu como usted, Doc.

A la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de México, que me permitió realizar mi residencia profesional durante el 9no semestre y llevar a cabo mis actividades de obtención de resultados para este trabajo.

Índice de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Definición	3
2.2 Historia de los polímeros plásticos	3
2.3 Tipos de plásticos	4
2.4 Usos de los plásticos	5
2.5 Problemas ambientales	6
2.6 Problemas de salud	7
2.6.1 Efectos en la fauna	7
2.7 Microplásticos	8
2.8 Alternativas al uso de plásticos contaminantes	8
2.8.1 Plásticos biodegradables	9
2.8.2 Degradación por medio de bacterias	9
2.8.3 Degradación por medio de hongos	10
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. OBJETIVOS	12
4.1 Objetivos generales	12
4.2 Objetivos específicos	12
4.3 Hipótesis	12
4.4 Planteamiento del problema	12
5. Materiales y métodos	14
5.1 Estrategia experimental	14
5.2 Muestras analizadas	14
5.3 Implementación del protocolo	15
5.4 Análisis de morfología y caracterización	16
5.5 Identificación molecular	17
5.5.1 Extracción de ADN	17
5.5.2 Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN	18
5.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (qPCR)	19
5.5.4 Electroforesis en gel de agarosa de la qPCR	19
5.5.5 Extracción de las muestras amplificadas del gel	20

5.5.6 Secuenciación	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1 Inoculación y crecimiento de las placas	22
6.1.1 Manglar (M8B)	22
6.1.2 Blanquizar	23
6.2 Análisis de morfología y caracterización	26
6.2.1 Tamaño y forma	26
6.2.2 Tinción Gram	28
6.3 Identificación molecular	31
6.3.1 Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN.....	31
6.3.2 Electroforesis en gel de agarosa de la qPCR	32
6.3.3 Secuenciación	32
6.4 Comparativa.....	36
7. CONCLUSIONES.....	38
Recomendaciones.....	38
8. BIBLIOGRAFÍA	39
9. ANEXOS	44

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama experimental	14
Figura 2. Uso del software BioEdit para la visualización de secuencias FASTA	21
Figura 3. Medio de cultivo Manglar (M8B) sin glicerol.	22
Figura 4. Medio de cultivo Manglar (M8B) con glicerol.	23
Figura 5. Medio de cultivo Blanquizal sin glicerol presentando un crecimiento bacteriano muy notorio.	23
Figura 6. Medio de cultivo Blanquizal presentó un crecimiento numeroso en las colonias bacterianas, las cuales presentaron un tamaño mayor.	24
Figura 7. Los medios de cultivo de Blanquizal en donde se realizaron las 2 diluciones presentaron diferentes tamaños. A) En una dilución 1/10 mediante estría cruzada. B) En una dilución 1/100 usando la misma técnica de siembra.	24
Figura 8. Medio de cultivo B2-P08 presentó colonias de una pigmentación o color blanco/lechoso, algunas colonias de entre 0.5 mm a 1 mm presentaban una forma redondeada mientras que otras colonias de entre 1 mm a 1.5 mm eran amorfas.	26
Figura 9. Medio de cultivo B-P09 presentó colonias definidas de diferentes tamaños de entre 0.5 mm a 1 mm con formas redondeadas y una pigmentación amarilla.	26
Figura 10. A) Medio de cultivo B-P01. B) Medio de cultivo B-P04. C) Medio de cultivo B-P05. Estos tres medios presentaban características similares como una pigmentación amarilla, colonias de entre 0.5 mm a 1 mm con formas redondeadas y definidas.	27
Figura 11. A) Medio de cultivo B-P03. B) Medio de cultivo B4-P05. Ambos medios presentaban características tales como formas que oscilaban entre redondas y amorfas con un tamaño que variaba entre los 0.5 mm a los 5 mm con una pigmentación blanca/lechosa.	27
Figura 12. A) Muestra B-P01 bacilos gram positivos, presenta grupos que oscilan entre 2-4 bacilos y células individuales. B) Muestra B-P03 bacilos gram negativos, con escasos grupos de 2 bacilos con mayoría de células individuales. C) B-P04 bacilos gram negativos con una notoria agrupación de más de 20	

bacilos. D) B4-P05 bacilos gram negativos con células agrupadas y dispersas.	
.....	28
Figura 13. Muestra B-P05 cocos gram positivos agrupados en tétradas (grupos de cuatro células), donde los grupos bacterianos se encontraban muy juntos unos de otros.....	28
Figura 14. A) Muestra B3-P07 Bacilos gram negativos, individuales y con grupos de 2 células. B) Muestra B4-P01 cocos gram positivos agrupadas en tétradas. C) Muestra B2-P21 cocos gram negativos agrupadas en tétradas y en 2 células. D) Muestra B3-P01 Cocos gram positivos agrupados en tétradas.....	30
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mediante el uso del marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Las muestras analizadas muestran una considerable cantidad de ADN.	31
Figura 16. Observación de las muestras secuenciadas mediante el uso del software BioEdit.	32

Índice de tablas

Tabla 1. Usos de los diferentes polímeros plásticos (Chen et al., 2021)	5
Tabla 2. Clasificación y características de las muestras seleccionadas	29
Tabla 3. Clasificación y características de las muestras no seleccionadas.	30
Tabla 4. Resultados del análisis de las secuencias en la base de datos NCBI	33
Tabla 5. Características de los microorganismos identificados.....	34

Índice de Anexos

Anexo 1. Solicitud de secuenciación	44
Anexo 2. Secuencia Forward de <i>Cytobacillus Gottheilii</i>	45
Anexo 3. Secuencia Reverse de <i>Cytobacillus Gottheilii</i>	45
Anexo 4. Secuencia Forward de <i>Halomonas Venusta</i>	46
Anexo 5. Secuencia Reverse de <i>Halomonas Venusta</i>	46
Anexo 6. Secuencia Forward de <i>Mesobacillus Jeotgali</i>	47
Anexo 7. Secuencia Reverse de <i>Mesobacillus Jeotgali</i>	47
Anexo 8. Secuencia Forward de <i>Kocuria Palustris</i>	48
Anexo 9. Secuencia Reverse de <i>Kocuria Palustris</i>	48
Anexo 10. Constancia de participación en el XII Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste y III Simposio Aprovechamiento Integral de Pescados, Mariscos y Biomasa de Algas celebrado en el Parque Científico y Tecnológico de Yucatán. 31 de Octubre de 2024.....	49
Anexo 11. Constancia de participación en los Festejos del Día del Ingeniero 2025 en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UACAM. 20 de mayo de 2025.	49

Lista de abreviaturas

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

ARN. Ácido ribonucleico.

ARNr. ARN ribosomal.

CTAB. Bromuro de cetiltrimetilamonio

HDPE. Polietileno de alta densidad.

LDPE. Polietileno de baja densidad.

PCL. Policaprolactona.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.

PE. Polietileno.

PES. Poliestireno.

PET. Tereftalato de Polietileno.

PHA. Polihidroxialcanoatos.

PHB. Polihidroxibutiratos.

PLA. Ácido poliláctico.

PP. Polipropileno.

PS. Poliéster.

PU. Poliuretano.

PVC. Cloruro de Polivinilo o Policloruro de Vinilo.

qPCR. PCR en tiempo real.

TAE. Tris (Tris-HCl)-acético (Ácido acético)-EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético)

1. INTRODUCCIÓN

Los plásticos están en prácticamente cualquier aspecto de la vida cotidiana, desde protectores para celulares, tarjetas de crédito hasta en envoltorios y recipientes de alimentos. Estos son materiales sintéticos obtenidos mediante la polimerización de los átomos de carbono en largas cadenas moleculares de compuestos orgánicos (Segura, 2007). Estos están hechos de diferentes polímeros dependiendo del uso que se le vaya a dar, como las tuberías y las láminas de construcción hechas de PVC, polietileno de baja densidad para la creación de plásticos envoltorios transparentes y el polipropileno para la fabricación de alfombras y sogas (Frías et al., 2003). Los residuos de estos plásticos ocasionan problemas ambientales como la muerte de diversas especies animales debido a la asfixia, heridas y malformaciones, además de la contaminación atmosférica provocada por su producción y posterior incineración (Castro & Riera, 2021). Otro problema radica en su difícil reciclaje y posterior procesamiento debido a su estabilidad física, lo que hace que con el paso del tiempo se vean sometidos a erosiones tanto físicas como químicas, dando como resultado su fragmentación en partículas denominadas “microplásticos” (Bollaín Pastor & Vicente Agulló, 2019).

Sin embargo, se han propuesto diversas alternativas para afrontar esta problemática, como el uso de bacterias con el potencial de degradar diversos plásticos como lo es *Bacillus Subtilis* con el potencial de degradar polietileno, *Pseudomonas Aeuroginosa* con el potencial de degradar polipropileno y *Pseudomonas Putida* con la capacidad de degradar PET (Nallely, 2025). A su vez, también existen hongos con esta misma capacidad como lo son diversas especies de *Aspergillus* que pueden degradar tanto polietileno como polietileno de alta densidad y *Penicillium Oxalicum* con la capacidad de degradar tanto polietileno de baja densidad y de alta densidad (Milagrosa & Brenda, 2020).

Esta capacidad de degradación está mediada por la secreción de enzimas que llevan a cabo estos procesos. Estas enzimas pertenecen al grupo de las hidrolasas tales como las cutinasas, esterasas, lipasas y carboxilesterasas. Este proceso de hidrólisis se lleva a cabo debido a la ruptura de los enlaces esteres mediante el consumo de moléculas de agua (María et al., 2020).

Mediante la implementación de medios de cultivo enriquecidos con una suspensión de policaprolactona, se llevó a cabo el análisis de la actividad de hidrólisis donde las muestras bacterianas se sembraron usando dos técnicas tales como la siembra por extensión y la estría cruzada. Las muestras bacterianas provenientes de ambientes salinos fueron sembradas en medios de cultivo suplementados con glicerol y en otros medios de cultivo sin glicerol. Esto sirvió para elegir las muestras bacterianas con mejor crecimiento y que a su vez presentaban halo de hidrólisis, dando como resultado la degradación de PCL.

A su vez, se realizaron prácticas de análisis de morfología y caracterización y prácticas de biología molecular para la identificación de los microorganismos. Tras los análisis de morfología y caracterización se detectaron diversos microorganismos del tipo *Bacillus* mientras que en contraste, los microorganismos del tipo *Coccus*. Los microorganismos del tipo *Bacillus* se caracterizaron por ser gram negativos en su mayoría junto con los microorganismos del tipo *Coccus* en contraste con los gram positivos que fueron pocos. En las prácticas de biología molecular se llevaron a cabo extracciones de ADN, qPCR y electroforesis en gel de agarosa para la identificación molecular. Se hizo la extracción de ADN para su posterior visualización en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% usando como marcador molecular el GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Posteriormente, se llevó a cabo la qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real) usando los primers PHAFD1 (forward) y PHARD2 (reverse) para la amplificación del gen 16S ARNr para la identificación de microorganismos bacterianos. Finalmente se llevó a cabo la preparación de las muestras para su secuenciación en la unidad de secuenciación de la UNAM donde se enviaron 5 muestras tratadas.

Según los resultados de secuenciación recibidos, se identificaron 4 microorganismos; *Cytobacillus Gottheilii*, *Halomonas Venusta*, *Mesobacillus Jeotgali* y *Kocuria Palustris*. Los microorganismos *C. Gottheilii* y *M. Jeotgali* no presentaron algún antecedente histórico de degradación de plásticos en contraste con *H. Venusta* y *K. Palustris*. Sin embargo, las bacterias *H. Venusta* y *M. Jeotgali* presentaron información con respecto a plásticos de origen bacteriano conocidos como polihidroxicanoatos (PHA) y Polihidroxibutiratos (PHB).

2. ANTECEDENTES

El uso de los plásticos ha sido uno de los inventos más revolucionarios en la historia moderna, siendo este uno de los productos más consumidos actualmente en cualquier ámbito de la vida cotidiana.

2.1 Definición

Según Quijano (2021), los plásticos son definidos como compuestos hechos a base de polímeros con una estructura de cadena larga, la cual cuenta con múltiples enlaces covalentes. Debido a su estructura molecular, estos polímeros pueden tener características tales como impermeabilidad, durabilidad, baja densidad y resistencia a diferentes factores ambientales.

2.2 Historia de los polímeros plásticos

De acuerdo con Montero (2008), el uso de los polímeros se remonta al siglo XVIII cuando se usaban recursos naturales tales como el caucho, los caparzones de tortuga y el ámbar. No fue sino hasta finales de 1850 que se dio paso al uso del primero polímero semi sintético; el nitrato de celulosa también llamado Xilonite. Descubierta por Alexander Parkes, este compuesto podía ser calentado para ser usado en moldes y conservar su forma una vez enfriado. Posteriormente, los hermanos Hyatt crearían el celuloide en 1870, una combinación entre el nitrato de celulosa y el alcanfor. No fue sino hasta 1920 que se descubrió el nylon, el primer polímero sintético completamente artificial.

Posteriormente, se comenzaría la producción de los polímeros hechos a base del petróleo, tales como el polipropileno, poliestireno, polietileno y el tereftalato de polietileno (PET), esto tras los eventos de la Segunda Guerra Mundial según García (2009).

2.3 Tipos de plásticos

Pereiras (2019) dice que los plásticos se pueden clasificar según su composición estructural:

- Termoplásticos: Están formados en cadenas ramificadas o lineales. Son solubles en disolventes orgánicos, se funden al entrar en contacto con el calor y mantienen su forma al enfriarse. Los termoplásticos suponen más del 50% de plásticos usados en el mundo. Estos son el nylon, el PVC, poliestireno, polipropileno, etc...
- Plásticos termoestables: Su estructura interna se constituye de cadenas entrecruzadas entre sí, lo que le confiere su característica resistencia. Son insolubles en disolventes orgánicos además de ser difíciles de reciclar. Una vez se enfrían y adquieren su forma final no pueden ser reprocesados o reutilizados. Estos son las resinas fenólicas y las resinas de poliéster.
- Elastómeros: También considerados como plásticos termoestables, están conformados por cadenas entrecruzadas en su estructura, pero de manera más desordenada, esto le da su principal característica que es la elasticidad. Estos son difíciles de reciclar ya que, al entrar en contacto con el calor se degrada. En estos tenemos el poliuretano, silicona y el caucho natural.

2.4 Usos de los plásticos

El uso de los plásticos es diverso, puede adquirir diversos fines para cumplir con la demanda requerida en diversos ámbitos de la vida cotidiana. Según López (2021), los polímeros plásticos pueden ser usados de la siguiente manera:

Tabla 1. Usos de los diferentes polímeros plásticos (Chen et al., 2021)

Abreviatura	Nombre	Uso
PES	Poliéster	Tapicería, ropa
PP	Polipropileno	Muebles de oficina
PET	Tereftalato de polietileno	Envases de alimentos
PU	Poliuretano	Suela de zapatos
PB	Cis-1,4-Polibutadieno	Llantas
PVC	Policloruro de vinilo	Tuberías
PA	Poliamida	Fabricación de piezas mecánicas
PS	Poliestireno	Juguetes, embalajes de electrodomésticos, botones

Algunos otros polímeros plásticos de uso comercial más comunes, de acuerdo con López Carrasquero (2004) son los siguientes:

- Polietileno (PE): Obtenido a partir del etileno. Este tiene 2 variedades; el polietileno de alta densidad (HDPE) y el polietileno de baja densidad (LDPE). El primero al ser de estructura lineal, se usa en tuberías, recipientes y aislantes para cables mientras que el segundo al tener una estructura muy ramificada, puede ser usado para la fabricación de bolsas de uso común.
- Polimetilmetacrilato (PMMA): Polímero vinílico de material amorfo cuya propiedad característica es ser transparente, lo que le permite ser usado como un sustituto del vidrio.

- Politetrafluoroetileno (teflón): Material de gran resistencia química y térmica. Excelente aislante térmico. Es usado como sellante, aislante eléctrico y valculería.

2.5 Problemas ambientales

La acumulación de plásticos es un problema que se ha ido agravando con el paso de los años, dado a que las prácticas usadas cada vez son más ineficientes para disminuir el impacto por la contaminación de plásticos, el daño ocasionado al medio ambiente crece con el pasar del tiempo.

Castañeda (2020) nos dice que en 1950 se producían alrededor de 2 millones de toneladas de plásticos mientras que en el año 2015 se produjeron 381 millones de toneladas, siendo un incremento de más del 200% en la producción. De todos estos plásticos, el 50% son desechables o de un solo uso, aumentando exponencialmente la cantidad global de estos residuos en todo el mundo.

Tras el consumo exponencial de los plásticos y su creciente demanda, el 58% de los plásticos producidos en el mundo se usa para el embalaje y material de construcción mientras que el otro 42% se usa para juguetes, agricultura, material electrónico, muebles, transporte, etc.

Ocampo (2019) nos dice que uno de los métodos más usados para reducir el impacto de la contaminación por plásticos es a través de las 3R's (reducir, reutilizar y reciclar). A través del reciclaje, se pretende reducir el consumo de los plásticos mediante la recolección, clasificación y función del mismo reciclaje. Sin embargo, esto último tiene ciertas limitaciones:

- No todos los plásticos pueden ser reciclados.
- Para ser reciclado debe encontrarse en estado puro.
- Al ser expuesto a la radiación solar (rayos UV), este perderá calidad.
- El desconocimiento de la composición exacta de ciertos productos plásticos.
- El desprendimiento de compuestos y/o sustancias tóxicas al ser reciclados.

En México, el 10% de los hogares no cuentan con un sistema de recolección de basura, mientras que un 80% incinera su basura, 2.6% bota sus desechos en mares y ríos mientras que el 1.4% tira sus desperdicios en barrancas.

Mundialmente, solo el 9% de los plásticos se recicla mientras que alrededor del 12% se incinera y el 79% se encuentra en vertederos, acumulándose en basureros o contaminando el medio ambiente.

2.6 Problemas de salud

Según Buteler (2019) el bisfenol A (BPA) es un aditivo tóxico que se desprende de los productos plásticos al ser calentados. Se registraron personas con presencia de bisfenol A en su orina. Este aditivo en altas dosis puede afectar el sistema endócrino.

Prieto-Ortíz (2023) informa que, tras la pandemia por el SARS-COV2 (COVID19), hubo un incremento desmedido en los productos plásticos como cubrebocas, caretas, botellas con gel desinfectante, etc. Se estima que los seres humanos consumen de 39000 a 52000 partículas de microplásticos por año presentes en alimentos y al mismo tiempo, se han encontrado microplásticos y nanoplásticos en heces humanas, esto confirma la presencia de estas partículas en agua potable y alimentos.

Sarria-Villa y colaboradores (2016) informan que aún no encuentran una relación entre los microplásticos y los efectos a la salud tras su ingesta, sin embargo, es de sumo interés seguir estudiando la presencia de los mismos en el cuerpo humano, por lo que se entiende que las afectaciones no están ligadas a la presencia de estas partículas en sí sino a la presencia de aditivos agregados en la fabricación de los plásticos.

2.6.1 Efectos en la fauna

Rojo-Nieto y Martínez (2017) informa que hay concentraciones de plásticos flotando en los hemisferios norte y sur de los océanos Atlántico, Pacífico e Índico. A estas concentraciones se les conoce como “islas de plástico” o “parches de

plástico". Esto es provocado por actividades como lo son la pesca, el turismo, actividades recreativas así como las prácticas de gestión de residuos. Estas acumulaciones de plásticos dan como resultado que la fauna marina ingiera estos residuos.

Andrades Ayerra (2019) reporta que estos residuos afectan a diversas especies como ballenas, tortugas, focas, pulpos o alcatraces. Residuos tales como aparejos para pesca los cuales provocan enmallamientos y animales atrapados, cuerdas. Pero también las bolsas de plástico y anillas de los packs de latas provocan el enredamiento de la fauna marina, produciendo malformaciones, amputaciones, asfixia, flotabilidad afectada o movilidad limitada que impiden su alimentación.

2.7 Microplásticos

Sarria-Villa (2016) define a los microplásticos como aquellas partículas plásticas no mayores a 5 milímetros. Estas partículas provienen de la degradación de plásticos voluminosos hechos de polietileno como las bolsas de plástico y las botellas, poliestireno como los contenedores de alimentos, nylon y el polipropileno como las telas o el cloruro de polivinilo como las tuberías plásticas.

De La Torre (2019) clasifica a los microplásticos según su origen. Se definen a los microplásticos primarios como aquellos que provienen de aquellos plásticos como los pellets, microperlas, pasta de dientes y medios de administración de fármacos. Mientras que los microplásticos secundarios son definidos como aquellos derivados de la degradación mecánica y degradación biológica. Esto último puede derivar en el origen de partículas más pequeñas denominadas "nanoplásticos".

2.8 Alternativas al uso de plásticos contaminantes

Ante la creciente problemática que presenta la acumulación de plásticos en el medio ambiente y su subsecuente fragmentación en microplásticos, se han

buscado diversas alternativas que dejen de representar un problema de acumulación o de manejo de residuos y que, a su vez; no representen un problema en su degradación a largo plazo.

2.8.1 Plásticos biodegradables

De acuerdo con Olivera (2012), los plásticos biodegradables, o también conocidos como bioplásticos, son aquellos que presentan una degradación aeróbica o anaeróbica por la acción de microorganismos como lo pueden ser bacterias, hongos o algas. Este proceso de degradación se lleva a cabo mediante la acción enzimática.

Según Fernández (2018), los plásticos biodegradables se catalogan en 2 tipos; aquellos que se obtienen de fuentes no renovables como la policaprolactona y el politereftalato de metileno y los que se obtienen de fuentes naturales como el ácido poliláctico (PLA) el cual se fabrica mediante el almidón de maíz.

Otra alternativa son aquellos plásticos de origen microbiano llamados polihidroxialcanoatos (PHA). Gonzales y colaboradores (2013) informan que los polihidroxialcanoatos son aquellos polímeros que ciertas bacterias, arqueas y microalgas acumulan intracelularmente para usarlos posteriormente como fuente de carbono. Estos polímeros tienen en su estructura molecular enlaces ésteres, lo que les permite ser degradados por enzimas polimerasas o enzimas esterasas.

2.8.2 Degradación por medio de bacterias

Ante la búsqueda de métodos en el manejo y eliminación de los residuos plásticos, se ha estudiado el potencial de degradación que tienen las bacterias sobre ciertos polímeros plásticos.

Pérez (2017) informa que la bacteria *Rhodococcus ruber* C208 y *Brevibacillus borstelensis* 707 pueden degradar polietileno de baja densidad (LDPE) mediante un pretratamiento de irradiación de rayos UV. A su vez, Rodríguez (2024) informa que *Ideonella sakaiensis* 201-F6s presenta actividad enzimática para llevar a

cabo la degradación del PET. Mientras que Díaz Moreno (2021) informa que los géneros bacterianos *Shewanella*, *Moritella*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas* y *Rhodococcus* pueden degradar plásticos tales como PCL, PLA y PHB.

2.8.3 Degradación por medio de hongos

No solo se han investigado bacterias con la capacidad de degradar plásticos, sino que también se han estudiado a los hongos para analizar su potencial biotecnológico.

Leal (2024) informa que los hongos *Clavariopsis Aquatica* y *Stropharia rugosoannulata* presentan actividad degradativa de polietileno (PE) a través de la secreción de enzimas α y β hidrolasas. A su vez, Iparraguirre (2015) informa que un consorcio fúngico conformado por *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Gliocadium videms* y *Phanerochaete chrysosporium* en condiciones aeróbicas presentan degradación de polietileno de baja densidad (LDPE).

3. JUSTIFICACIÓN

La Biotecnología constituye un conjunto de herramientas tecnológicas diseñadas para contribuir a la resolución de las diversas problemáticas que enfrenta la sociedad. La contaminación por plásticos no degradables, específicamente los microplásticos, ha tenido un impacto importante en la salud humana y de los ecosistemas. Debido a su gran estabilidad estructural, los microplásticos se acumulan en los ecosistemas y causan estragos en la cadena alimenticia. Los microorganismos son herramientas biológicas por excelencia para la degradación de muchos contaminantes tales como hidrocarburos, colorantes textiles, pesticidas entre otros. Los microorganismos de ambientes marinos han sido muy poco estudiados, principalmente desde el punto de vista de sus capacidades metabólicas únicas para poder sobrevivir y prosperar en medios salinos, y representan una alternativa poco explorada para fines biotecnológicos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

Evaluar la actividad enzimática de esterasa en aislados microbianos obtenidos de muestras de sedimento de manglar de la reserva de la Biosfera Los Petenes, Campeche.

4.2 Objetivos específicos

1. Implementar medios de cultivo semisólido adicionados con policaprolactona (poliéster), para la evaluación de actividad enzimática de esterasa en placa.
2. Obtener aislados microbianos con actividad de esterasa a partir de muestras de sedimento, mediante siembra por extensión y estría cruzada en placas de agar + policaprolactona.
3. Caracterizar morfológicamente las bacterias con actividad de esterasa, mediante tinción Gram y microscopía.
4. Identificar molecularmente los aislados positivos a actividad de esterasa, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación.

4.3 Hipótesis

Las muestras ambientales obtenidas en ambientes salinos de la península de Yucatán tienen elementos microbianos con actividad de esterasa.

4.4 Planteamiento del problema

La creciente preocupación por los microplásticos se vuelve cada vez más alarmante. A través de las últimas décadas se convirtió en un problema ambiental a un problema de salud. La fragmentación de los plásticos a microplásticos y que estos a su vez, se dispersen en los diversos ambientes existentes incluso encontrándose en los casquetes polares, demuestra que el problema ha escalado a niveles alarmantes.

Al mismo tiempo, el desmedido consumo de los productos plásticos provoca que su subsecuente fragmentación en microplásticos haga que la cantidad de los

mismos aumente, lo que ocasiona que la situación se vuelva cada vez más complicada de enfrentar con métodos convencionales como lo son las ya conocidas prácticas de *reducir, reutilizar y reciclar*. En 2019 en México, se generaban 1,951,785 kilogramos diarios de plásticos, o lo que es lo mismo; 1,951.7 toneladas diarias. Se estima que para 2050, la industria del plástico abarcaría el 20% del consumo mundial de petróleo.

La falta de normas y leyes que regulen el consumo de plásticos de un solo uso hace de la situación todavía más alarmante, es en muy pocas regiones de México y en algunas partes del mundo que cuentan con leyes y normas que regulen este consumo. Un ejemplo de esto es Dinamarca, quien en 1993 impuso un impuesto a las bolsas de plástico, reduciendo así su consumo y su subsecuente venta. Por otro lado, Chile, quien fuese el primer país latinoamericano en prohibir el uso de bolsas de plástico en tiendas y supermercados. En el caso de México, entidades como Aguascalientes, Baja California y Chihuahua, legislaron leyes para la prohibición de popotes, bolsas y recipientes de unicel que no sean reutilizables. Todas estas entidades federativas presentaron estas leyes en 2018.

5. Materiales y métodos

5.1 Estrategia experimental

Para la recolección de resultados y poder corroborar la hipótesis previamente planteada, se plantea el siguiente diseño experimental:

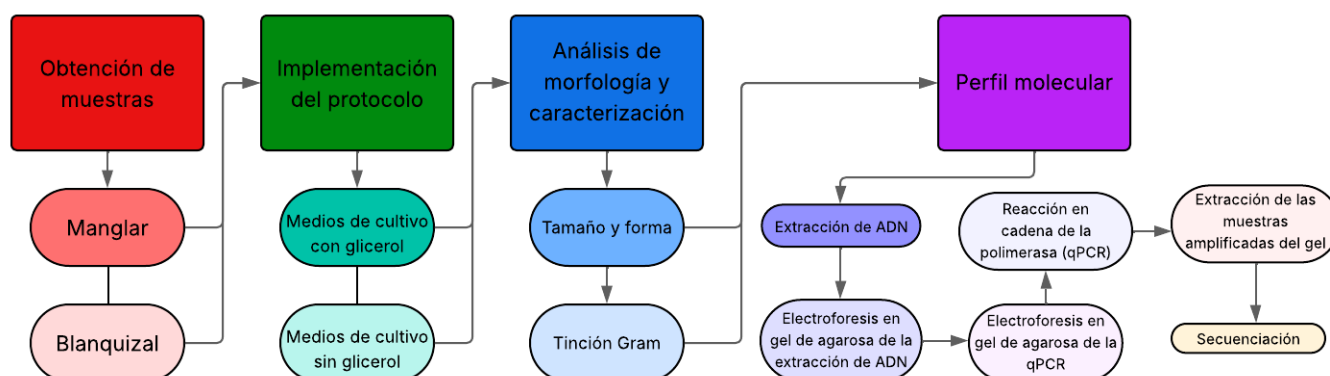


Figura 1. Diagrama experimental

Para llevar a cabo las actividades donde se pueda corroborar la hipótesis planteada y tener los resultados esperados, todo lo que se llevaría a cabo se dividió en 4 partes; la obtención de muestras, la implementación del protocolo, el análisis de morfología y caracterización y el perfil molecular. Todos estos puntos se describirán a continuación en los siguientes apartados.

Este diseño experimental se hizo de tal modo en el que se puedan estudiar y analizar los resultados obtenidos de manera eficiente al momento. Todo esto tomando en cuenta la naturaleza y el origen de las muestras obtenidas, las cuales provienen de ambientes salinos o de lugares cuya alcalinidad es muy alta.

5.2 Muestras analizadas

Para el estudio de los microorganismos en cuestión, se manejaron 2 muestras las cuales fueron “M8B” y “Blanquizal”, ambas fueron proporcionadas por la Universidad Autónoma de Campeche (UACAM) como parte del proyecto “Potencial Biotecnológico de Bacterias Halófilas aisladas de Sedimentos Costeros de la Península de Yucatán, México” con clave 007/UAC/2022.

5.3 Implementación del protocolo

Para este apartado, se llevó a cabo la implementación de un protocolo titulado “Agar plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by pseudomonas” de Molitor R., Bollinger A. et al.

El protocolo aborda la implementación de medios de cultivo suplementados con una suspensión de policaprolactona (poli(ϵ -caprolactona)) o abreviado PCL donde, tras la siembra de las muestras bacterianas y su posterior crecimiento, las colonias presentes en el medio de cultivo mostrarían una zona clara alrededor de las mismas llamadas “halo de hidrolisis”; el cual será el indicativo de la degradación del poliéster presente en el medio de cultivo.

La policaprolactona es un polímero perteneciente a la familia de los poliésteres alifáticos sintéticos biodegradables. Es fabricado mediante la polimerización por apertura de anillo del monómero ϵ -caprolactona. Su punto de fusión es de 60°C y es soluble en solventes orgánicos como la acetona y el cloroformo (Ortiz-Gómez, 2016).

Para llevar a cabo el protocolo, primero se formó la suspensión donde se deben pesar 0.30 gramos de policaprolactona y se disuelven en 30 mililitros de acetona en un tubo Eppendorf de 50 mililitros mediante un baño maría manteniendo una temperatura entre los 55°C-58°C en una placa de calentamiento donde se suministra la policaprolactona gradualmente y a su vez, se agitó en un agitador Vortex para que las partículas de PCL puedan disolverse de manera gradual y consistente en la acetona. Posteriormente en otro tubo Eppendorf de 50 mililitros, se tomó 1 mililitro de la suspensión de PCL-acetona por cada 9 mililitros de agua destilada estéril para 100 mililitros de medio de cultivo. Donde para 400 mililitros de medio de cultivo se vertieron 27.2 mililitros de agua destilada estéril y 12.8 mililitros de suspensión de PCL-acetona.

Para la preparación del medio de cultivo, se usaron 14.96 gramos de Marine Borth 2216 (37.4 gr/L según el fabricante), 6 gramos de agar bacteriológico (15 gr/L según el fabricante) en 400 mililitros de agua destilada. Para este trabajo, se realizaron dos medios de cultivo, uno donde se añadieron 4 mililitros de

glicerol y otro donde no se añadió el glicerol. Posteriormente, se esterilizó el medio de cultivo en autoclave a 120°C por 20 minutos.

5.4 Análisis de morfología y caracterización

Los análisis de morfología bacteriana sirven como estudios cualitativos en los cuales se observan detalles como el tamaño de las colonias, forma, crecimiento, color, pigmentación o si son gram positivas o negativas. Para este trabajo se seguirán las indicaciones dadas por Vargas-Flores y Kuno-Vargas (2014) de la Revista de Actualización clínica, en las cuales identifican a las bacterias en dos tipos:

- *Arqueobacterias*: Aquellas que carecen de peptidoglicano y cuya particularidad les permite vivir en ambientes ácidos o salinos.
- *Eubacterias*: Poseen peptidoglicano, razón por la cual conviven con otros organismos como el ser humano.

A su vez, para la diferenciación de bacterias gram positivas y gram negativas, se llevó a cabo la tinción correspondiente, donde se siguieron las indicaciones dadas por el fabricante del kit. Previo a estas indicaciones, se realizó un frotis en un portaobjetos tomando una colonia aislada de los medios de cultivo, esparcir esta muestra de tal modo que cubra la mayor área posible y a su vez, sellar con calor mediante el uso de un mechero de alcohol al 97%.

Posteriormente, se siguieron las indicaciones para llevar a cabo la tinción gram donde se usaron 4 reactivos; Violeta de genciana, Yodo gram, Safranina y Alcohol-acetona. Cada uno de estos reactivos se usará con una pipeta Pasteur, respectivamente. Para el primer reactivo se tomó una gota del colorante violeta de genciana y se aplicó al portaobjetos, se esperaron 60 segundos y se removió el exceso de colorante con agua destilada. Para el segundo reactivo, se tomó una gota del colorante yodo gram y se aplicó al portaobjetos, se esperaron 60 segundos y se removió el exceso de colorante con agua destilada. Para el tercer reactivo, se tomó una gota del colorante safranina y se aplicó al portaobjetos, se esperaron 60 segundos y se removió el exceso de colorante con agua destilada.

Por último, se tomó una gota de alcohol acetona y se aplicó al portaobjetos, se esperaron 45 segundos y se removió el exceso con agua destilada.

5.5 Identificación molecular

Este apartado se divide en 6 secciones donde se realizaron actividades de biología molecular donde se llevó a cabo la identificación molecular de las muestras que se trataron y así poder identificar completamente a las bacterias con las cuales se trabajaron.

Previo a las actividades de la identificación molecular, se prepararon medios de cultivo líquidos. Para esto, se usaron 3.74 gramos de Marine Broth 2216 y 1 mililitro de glicerol los cuales se deben mezclar en 100 mililitros de medio líquido usando un agitador magnético. Posteriormente se esterilizó el medio usando autoclave a 120°C por 20 minutos. Luego se usaron 5 tubos Eppendorf de 5 mililitros cada uno. Se suministraron 5 mililitros de medio líquido en cada tubo y se inoculó 1 colonia por cada tubo Eppendorf. Finalmente, se etiquetaron los medios líquidos con el nombre de las muestras de origen y se dejan en una cámara agitadora de incubación a 30°C por 3 días.

5.5.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se usó un kit de extracción llamado “Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit” de Zymo Research. Este kit de extracción puede ser usado tanto para muestras bacterianas como para muestras fúngicas. Este kit cuenta con 5 buffers, tubos y columnas diseñados para cada etapa de la extracción.

Adicionalmente, se le hicieron unos ajustes al protocolo del kit para garantizar que la extracción tenga un resultado satisfactorio. Estos ajustes se incorporaron en los primeros pasos del protocolo.

Previamente, se colocaron en congelación 5 morteros y pistilos durante unas 5 horas. Posterior a esto, se retiraba un mortero y su respectivo pistilo por cada muestra a tratar. Después se tomaron de los medios líquidos inoculados 2

mililitros de cada tubo Eppendorf y se colocaron estos dos mililitros de muestra sobre el mortero, adicionando 200 microlitros de reactivo CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio). Posteriormente, se procedió a usar el pistilo para moler mediante la acción mecánica durante 10 minutos. Luego, se recuperaron las muestras molidas y se incorporaron al ZR BashingBead™ Lysis Tube para luego pasar por un periodo de agitación de 10 minutos en el agitador Vortex. Luego se adicionaron 750 microlitros del BashingBead™ Buffer y se introdujeron las muestras a la maquina centrífuga calibrada a 12,000 revoluciones por 1 minuto. Se tomaron 400 microlitros de sobrenadante del ZR BashingBead™ Lysis Tube y se colocaron en el Zymo-Spin™ III-F Filter el cual se colocó sobre un tubo recolector que viene junto con el kit de extracción y se introdujeron a la máquina centrífuga a 12,000 revoluciones por 1 minuto. Tal y como indica el fabricante, se le añadieron 500 microlitros de reactivo β -mercaptoetanol al Genomic Lysis Buffer para una mayor eficiencia en el buffer mencionado. Al retirar el tubo recolector, se añadieron 1200 microlitros del Genomic Lysis Buffer. Luego se tomaron 800 microlitros del tubo recolector y se transfirieron al Zymo-Spin™ IICR Column junto con un nuevo tubo recolector y se centrifugó a 12,000 revoluciones por 1 minuto. Se descartó el fluido del tubo recolector y se procedió a repetir el paso anterior en un tubo recolector nuevo, pero manteniendo el mismo Zymo-Spin™ IICR Column. Se añadieron 200 microlitros del DNA Pre-Wash Buffer al Zymo-Spin™ IICR Column en un nuevo tubo recolector y se centrifugó a 12,000 revoluciones por un minuto. Posteriormente se agregaron 500 microlitros del g-DNA Wash Buffer al Zymo-Spin™ IICR Column y se centrifugó a 12,000 revoluciones por un minuto. Finalmente, se trasladó el Zymo-Spin™ IICR Column a un microtubo para centrífuga de 1.5 mililitros y se añadieron 100 microlitros de DNA Elution Buffer directamente a la columna para centrifugar a 12,000 revoluciones por 30 segundos.

5.5.2 Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN

Para la electroforesis se debe usar agarosa al 1.5%. Es decir; 1.5 gramos de agarosa para la elaboración del gel y una solución de reactivo TAE 10X diluido con agua destilada de tal modo que tuviese 10 mililitros de TAE por cada 90

mililitros de agua destilada, haciendo un total de 200 mililitros de solución (20 mililitros de TAE y 180 mililitros de agua destilada).

5.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (qPCR)

Para este trabajo se llevará a cabo una PCR en tiempo real o qPCR. En comparación con una PCR convencional, esta nos permite monitorear en tiempo real la amplificación de cada muestra mediante la fluorescencia emitida por cada ciclo. Para esta qPCR se llevará a cabo la amplificación del gen 16S rRNA (ácido ribonucleico ribosómico). También llamado “Código de barra genético”, el gen 16S se encuentra prácticamente en todos los seres vivos procariontes (en el caso de eucariontes se trata del gen 18S), el cual se utiliza para la identificación de bacterias y arqueas y así poder realizar estudios taxonómicos de los mismos para la identificación de microorganismos bacterianos (Valenzuela-González, 2015).

Para llevar a cabo la qPCR se deben usar los primers PHAFD1 (forward) y PHARD2 (reverse), Master Mix Green qPCR, Agua pura libre de nucleasas y las respectivas muestras de ADN. Para cada muestra se deberán usar 12.5 microlitros de Master Mix Green qPCR, 0.15 microlitros tanto para el primer PHAFD1 (forward) y del primer PHARD2 (reverse), 0.5 microlitros de muestra de ADN y 12 microlitros de agua pura libre de nucleasas. Luego, los microtubos se colocarán en el rotor dentro de la máquina termocicladora

5.5.4 Electroforesis en gel de agarosa de la qPCR

Para la electroforesis se siguieron los mismos pasos que previamente se siguieron para llevar a cabo la electroforesis para la visualización del ADN extraído. Únicamente se cambiaron las muestras usadas que en este caso fueron aquellas amplificadas en la qPCR.

5.5.5 Extracción de las muestras amplificadas del gel

Este procedimiento se llevó a cabo con el objetivo de recuperar el material genético previamente amplificado por la qPCR y esto se llevó a cabo mediante un kit de extracción de ADN en gel de agarosa. Este proceso se usó el QIAquick Gel Extraction Kit siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante.

5.5.6 Secuenciación

Una vez se extraen y se purifican las muestras de ADN del gel de agarosa, se preparan 2 tubos por cada muestra, un tubo con 0.1 μ L del primer forward (PHAFD1) y otro tubo con 0.1 μ L el primer reverse (PHARD2) en un volumen de 16 microlitros, respectivamente. Cada tubo tiene 1 μ L de muestra de ADN, 0.1 μ L de oligonucleótidos y 15 μ L de H₂O ultrapuro.

Estas muestras se envían al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA. Para llevar a cabo esta parte, primero se hace una solicitud a la Unidad de Síntesis y secuenciación de DNA (Ver Anexo 1). Este departamento tiene un tiempo aproximado de respuesta de 7 días hábiles entre el envío y el procesamiento de las muestras hasta tener los resultados correspondientes.

La UNAM lleva a cabo la secuenciación de ADN mediante el método de Sanger, también llamado “método de terminación de la cadena”. Este método utiliza una enzima ADN polimerasa especializada para llevar a cabo la amplificación en una sola hebra usando el cebador o primer correspondiente. La ADN polimerasa irá incorporando dNTP's (desoxinucleótidos) y ddNTP's (didesoxinucleótidos) dejando como resultado cadenas de ADN amplificadas de diferentes tamaños, estas cadenas pasarán a través de un gel capilar leídos por un detector laser que diferenciarán a los nucleótidos de diferentes colores hasta tener la cadena secuenciada (Cardona, 2024).

La Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA manda sus resultados archivos formato FASTA, los cuales son leídos y analizados mediante el uso del Software BioEdit (Figura 2).

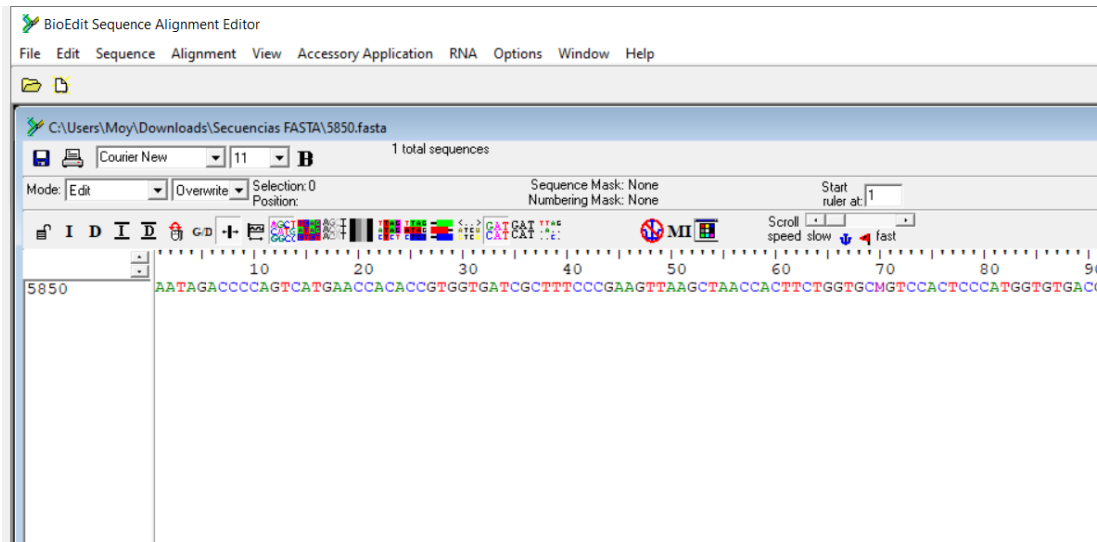


Figura 2. Uso del software BioEdit para la visualización de secuencias FASTA

A través de este software se puede visualizar la secuencia del ADN en una sola hebra, esto debido a que se envían dos archivos por muestra y es un archivo por hebra; dando así la visualización de 2 cadenas de una sola muestra (Forward y Reverse). Posteriormente, para la identificación de microorganismos mediante los archivos FASTA, se usa la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando su respectiva URL (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y mediante el uso de la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para la comparación de muestras secuenciadas en una base de datos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Inoculación y crecimiento de las placas

En un lapso de entre 4-7 días de crecimiento, los medios de cultivo presentaron los siguientes resultados:

6.1.1 Manglar (M8B)

Placas sin glicerol

Los medios de cultivo de Manglar (M8B) enriquecidos con la suspensión de PCL sin glicerol presentaron un crecimiento bacteriano muy reducido en las placas sin glicerol (Figura 3).

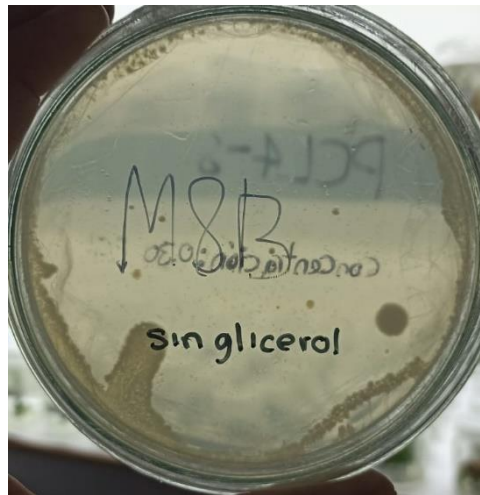


Figura 3. Medio de cultivo Manglar (M8B) sin glicerol.

Placas con glicerol

Los medios de cultivo de Manglar (M8B) enriquecidos con la suspensión de PCL y glicerol no se presentó diferencia entre aquellas placas sin glicerol (Figura 4) por lo que las muestras de Manglar se terminaron descartando.

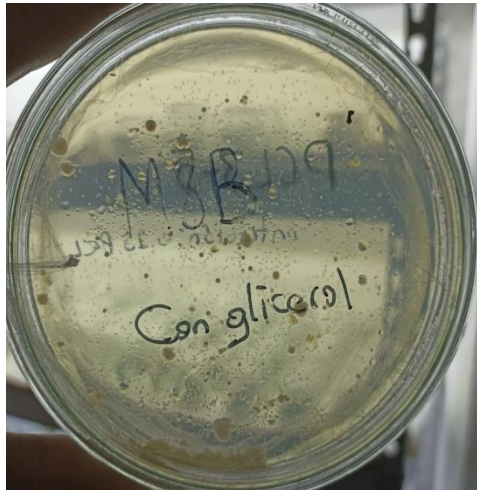


Figura 4. Medio de cultivo Manglar (M8B) con glicerol.

6.1.2 Blanquizar

Placas sin glicerol

Los medios de cultivo de Blanquizar enriquecidos con la suspensión de PCL sin glicerol, presentaron un crecimiento bacteriano bastante notorio, con un número significativo de colonias de un tamaño reducido (Figura 5).

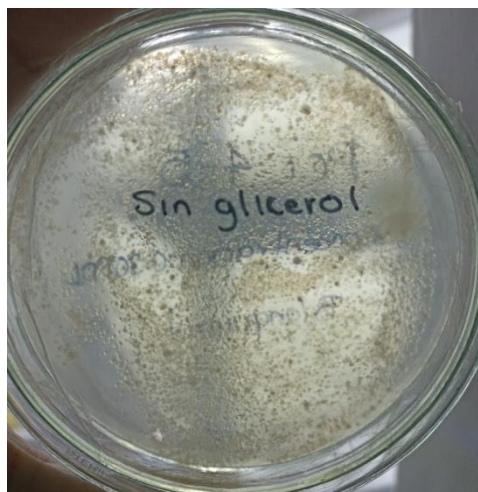


Figura 5. Medio de cultivo Blanquizar sin glicerol presentando un crecimiento bacteriano muy notorio.

Placas con glicerol

Los medios de cultivo de Blanquizal enriquecidos con la suspensión de PCL con glicerol, presentaron un crecimiento reducido en comparación con las placas sin glicerol. Sin embargo, el tamaño de las colonias era mayor (Figura 6).

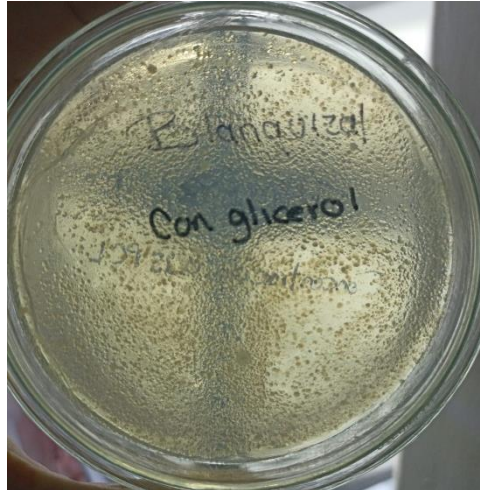


Figura 6. Medio de cultivo Blanquizal presentó un crecimiento numeroso en las colonias bacterianas, las cuales presentaron un tamaño mayor.

Al ser múltiples colonias, se realizaron dos diluciones de diferentes concentraciones donde la cantidad de bacterias crecidas en los medios de cultivo se pudo distinguir mejor, mostrando un halo alrededor de las colonias (Figura 7). Estos halos se podían distinguir mejor no solo por las diluciones realizadas, sino debido a la técnica usada para la siembra, la cual fue la estría cruzada, con la cual se pretende esparcir las muestras bacterianas presentes en el aza y así exponer colonias individuales y separadas.

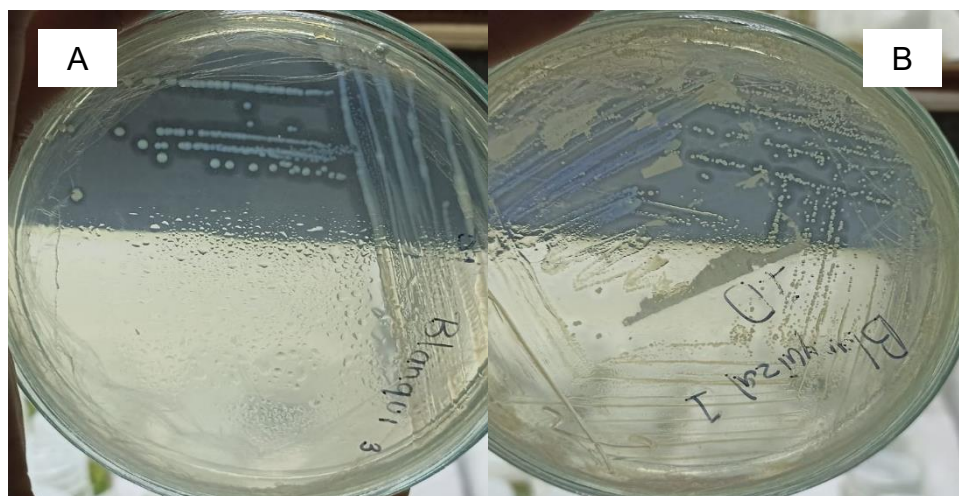


Figura 7. Los medios de cultivo de Blanquizal en donde se realizaron las 2 diluciones presentaron diferentes tamaños. A) En una dilución 1/10 mediante estría cruzada. B) En una dilución 1/100 usando la misma técnica de siembra.

Finalmente, se optó por usar las muestras provenientes de Blanquizal ya que fueron las que dieron un mejor resultado en cuanto a crecimiento de colonias y presentación de halo de hidrólisis.

Después de esta comprobación, las muestras sembradas siguieron una nomenclatura establecida según el origen de las muestras seleccionadas y el material usado para la verificación de la actividad esterasa, que fue la policaprolactona. La nomenclatura fue la siguiente:

- “B#-P#” fue la nomenclatura usada, donde:
 - La letra “B” significa Blanquizal, de las muestras seleccionadas.
 - La letra “P” significa Policaprolactona, del poliéster usado para la verificación de la actividad esterasa.
 - El número seguido de la letra “B” es la ronda que se cultivó en ese momento, por ejemplo “B2-P01” donde el “2” significa que es la 2da ronda de medios de cultivo.
 - El número seguido de la letra “P” es el número de placa que corresponde a dicha ronda, por ejemplo “B3-P08” donde el “8” significa el número de la placa cultivada en la ronda “3”.

6.2 Análisis de morfología y caracterización

6.2.1 Tamaño y forma

Las colonias crecidas en los medios de cultivo presentaron diversas características en cuanto a tamaño y forma se refiere. Algunas presentaron una pigmentación que las diferenciaba del resto.

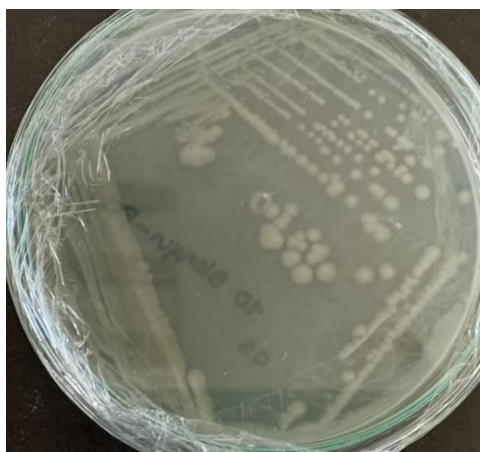


Figura 8. Medio de cultivo B2-P08 presentó colonias de una pigmentación o color blanco/lechoso, algunas colonias de entre 0.5 mm a 1 mm presentaban una forma redondeada mientras que otras colonias de entre 1 mm a 1.5 mm eran amorfas.



Figura 9. Medio de cultivo B-P09 presentó colonias definidas de diferentes tamaños de entre 0.5 mm a 1 mm con formas redondeadas y una pigmentación amarilla.

De manera general, las características de los medios de cultivo presentaban formas redondeadas o amorfas, con tamaños que oscilaban entre los 0.5 mm hasta los 1.5 mm y colores o pigmentos que variaban entre el amarillo y el blanco/lechoso (Figura 8 y 9).

Tomando estos parámetros en cuenta, se seleccionaron 5 medios de cultivo, algunos con similitudes con respecto a pigmentación y tamaño mientras que otros se diferenciaban por la forma de las colonias (Figura 10 y 11).

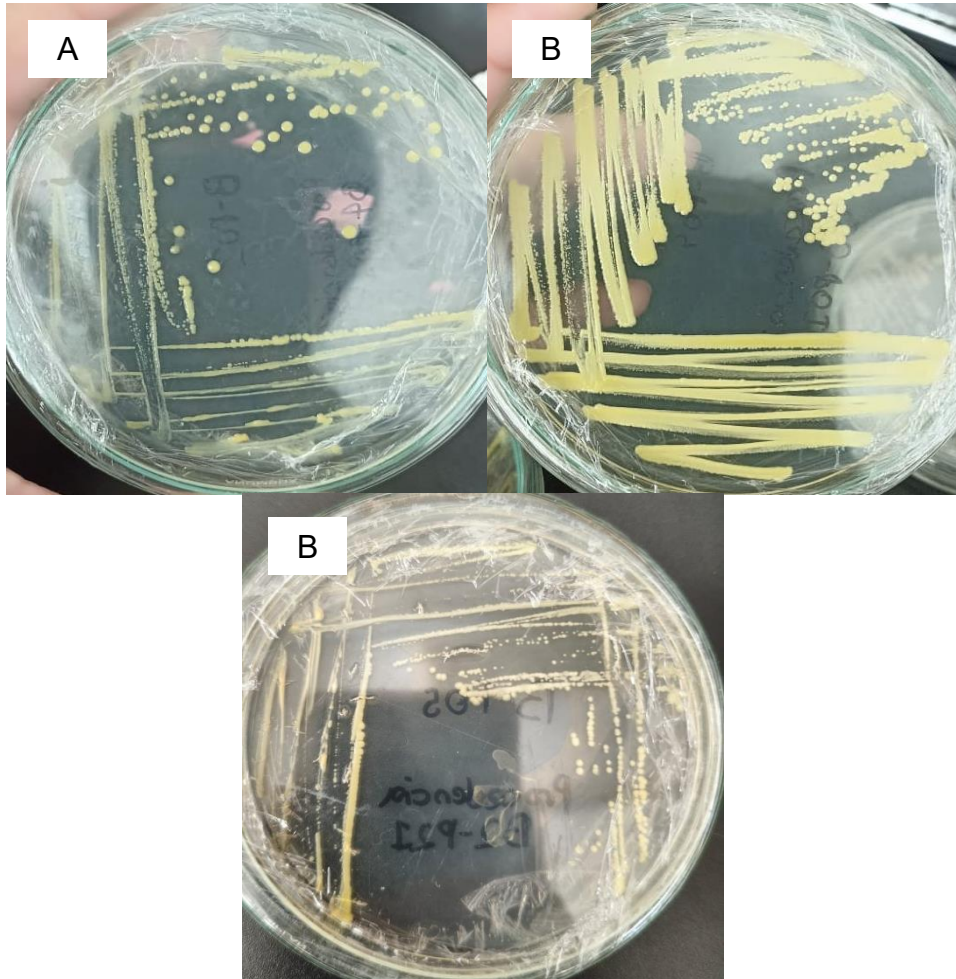


Figura 10. A) Medio de cultivo B-P01. B) Medio de cultivo B-P04. C) Medio de cultivo B-P05. Estos tres medios presentaban características similares como una pigmentación amarilla, colonias de entre 0.5 mm a 1 mm con formas redondeadas y definidas.

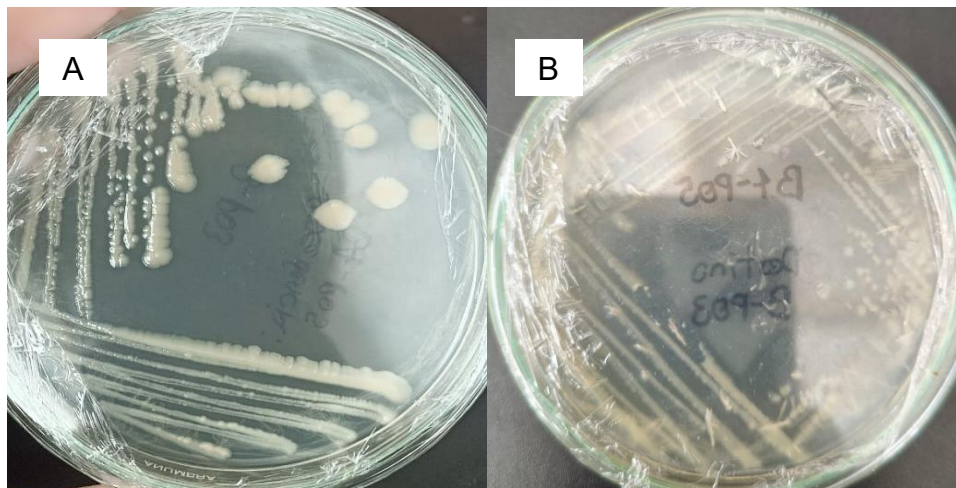


Figura 11. A) Medio de cultivo B-P03. B) Medio de cultivo B4-P05. Ambos medios presentaban características tales como formas que oscilaban entre redondas y amorfas con un tamaño que variaba entre los 0.5 mm a los 5 mm con una pigmentación blanca/lechosa.

6.2.2 Tinción Gram

Se llevaron a cabo las actividades de tinción Gram de acuerdo con las muestras seleccionadas previamente junto con otras muestras no seleccionadas. Esto con el fin de analizar la variabilidad entre las bacterias gram positivas y gram negativas, clasificadas según su forma como bacilos y cocos. También tomando en cuenta la agrupación de las mismas o si se encontraban individualmente.

Muestras seleccionadas

Las muestras seleccionadas se presentan en 2 tipos; bacilos y cocos, donde los bacilos presentaron mayoría numérica (Figura 12) en comparación de los cocos donde una muestra presenta esta característica (Figura 13).

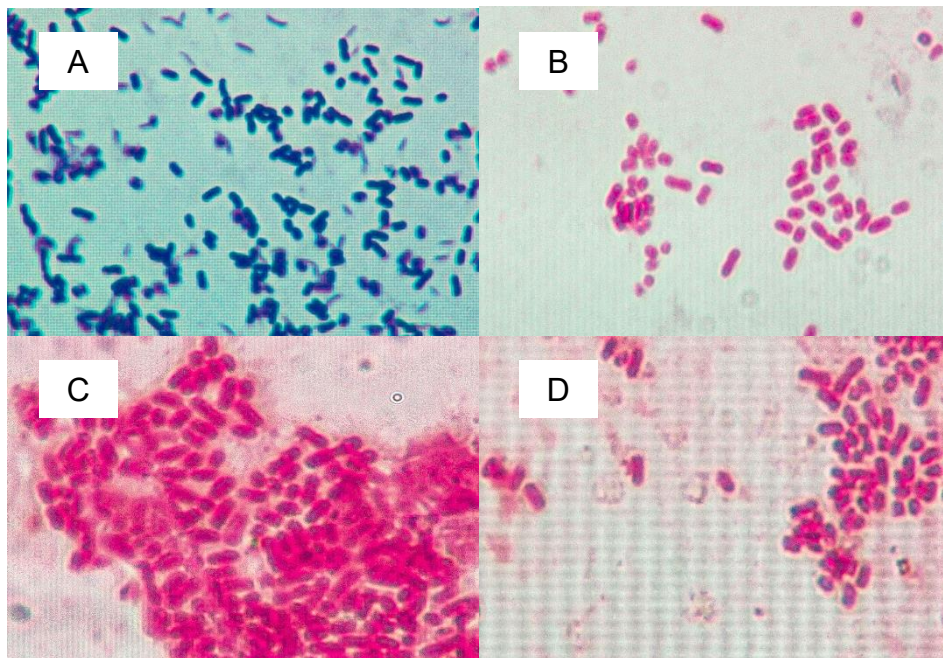


Figura 12. A) Muestra B-P01 bacilos gram positivos, presenta grupos que oscilan entre 2-4 bacilos y células individuales. B) Muestra B-P03 bacilos gram negativos, con escasos grupos de 2 bacilos con mayoría de células individuales. C) B-P04 bacilos gram negativos con una notoria agrupación de más de 20 bacilos. D) B4-P05 bacilos gram negativos con células agrupadas y dispersas.

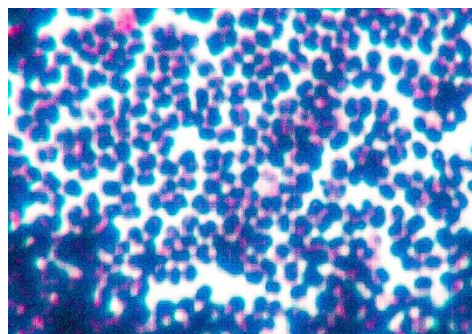


Figura 13. Muestra B-P05 cocos gram positivos agrupados en tétradas (grupos de cuatro células), donde los grupos bacterianos se encontraban muy juntos unos de otros.

Tabla 2. Clasificación y características de las muestras seleccionadas

Muestra	Forma	Gram +/-	Agrupación
B-P01	Bacilo	+	Individuales, tetradas
B-P03	Bacilo	-	Individuales
B-P04	Bacilo	-	Más de 10
B-P05	Coco	-	Individuales, triadas
B4-P05	Bacilo	+	Tetradas

Muestras no seleccionadas.

Estas muestras presentaron diversas características similares a las anteriormente mencionadas (Figura 14), por lo que los resultados que aquí se mencionan son para mostrar la diversidad de las muestras sembradas a lo largo de la realización de este trabajo.

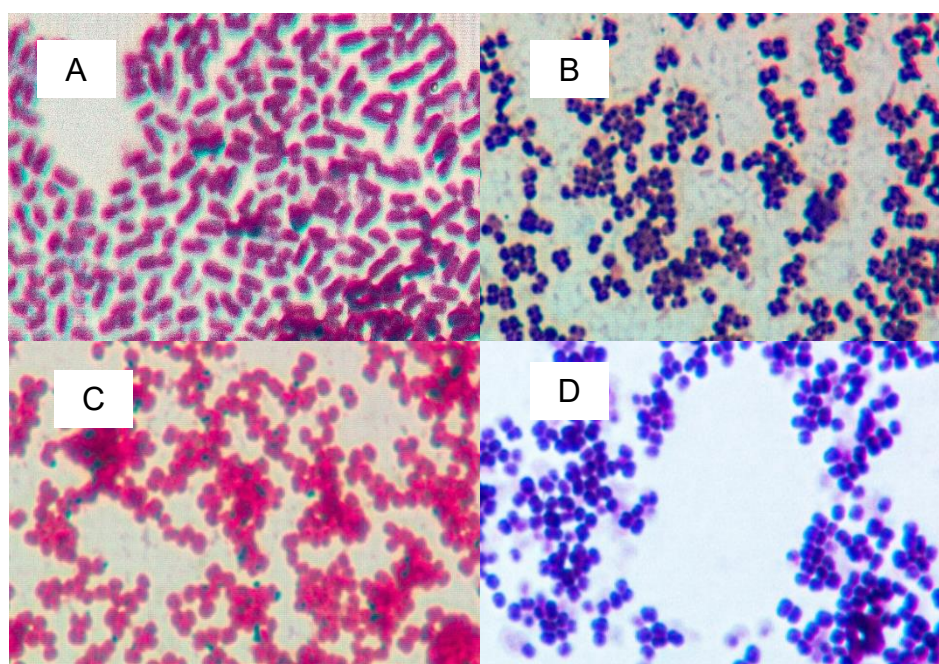


Figura 14. A) Muestra B3-P07 Bacilos gram negativos, individuales y con grupos de 2 células. B) Muestra B4-P01 cocos gram positivos agrupadas en tétradas. C) Muestra B2-P21 cocos gram negativos agrupadas en tétradas y en 2 células. D) Muestra B3-P01 Cocos gram positivos agrupados en tétradas.

Tabla 3. Clasificación y características de las muestras no seleccionadas.

Muestra	Forma	Gram +/-	Agrupación
B3-P07	Bacilo	-	Indivuales, grupos de 2
B4-P01	Coco	+	Tétradas
B2-P21	Coco	-	Tétradas, grupos de 2
B3-P01	Coco	+	Tétradas

6.3 Identificación molecular

6.3.1 Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN

Para la electroforesis en gel de agarosa, se tomaron 10 microlitros de muestra de ADN a los cuales se les incorporó 3 microlitros de buffer de carga 6X TriTrack DNA Loading Dye, este se adhiere al ADN dándole una mayor densidad y permitiendo que pueda ser visualizado en un transluminador UV. Se usó como marcador molecular el GeneRuler 1 kb DNA Ladder, este nos permitirá analizar de manera cuantitativa el ADN cargado en el gel. El GeneRuler 1 kb DNA Ladder se cargó usando 2 μ L mezclados con 3 μ L de DNA Loading Dye.

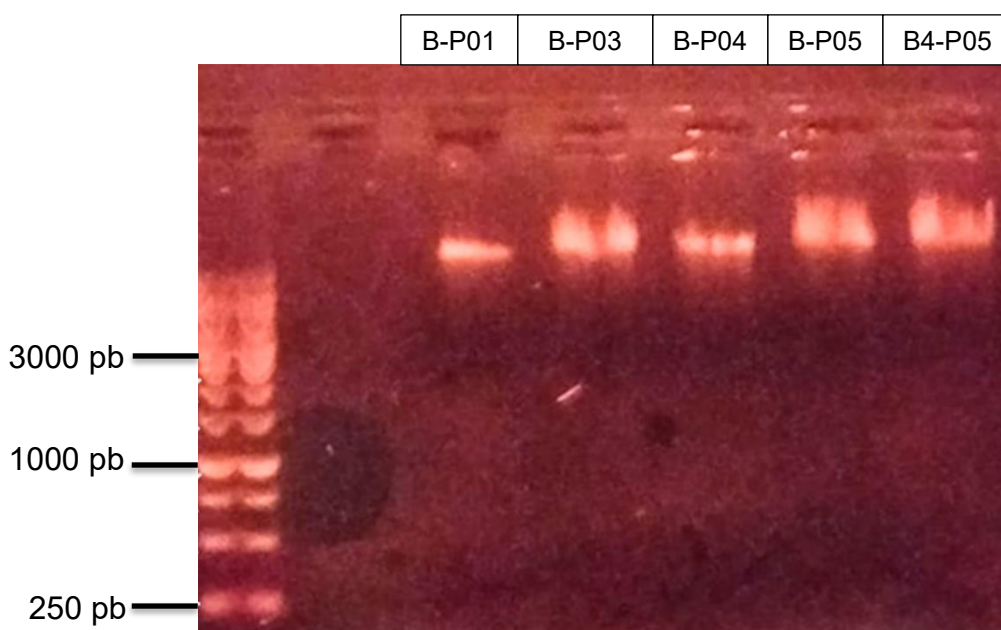


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, mediante el uso del marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Las muestras analizadas muestran una considerable cantidad de ADN.

La electroforesis mostró que las muestras seleccionadas contaban con una considerable cantidad de ADN (Figura 15) tomando en cuenta el marcador molecular, con lo anterior mencionado; la extracción de ADN previamente hecha tuvo muy buenos resultados, lo que permitió proceder con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (qPCR).

6.3.2 Electroforesis en gel de agarosa de la qPCR

DOCTOR ENVÍEME LA FOTO DE LA ELECTROFORESIS DE LA qPCR POR FAVOR

La electroforesis de las muestras amplificadas por qPCR mostraron bandas notorias y significativas del gen 16S ARNr en cuestión. Esto nos permite no solo observar la presencia de este gen sino que también nos permite dar el siguiente paso hacia la secuenciación de las muestras.

6.3.3 Secuenciación

En un lapso de 4 días, el Instituto de Biotecnología de la UNAM respondió con los resultados de secuenciación. Las secuencias obtenidas llegaron en archivos de formato FASTA, los cuales fueron leídos usando el software BioEdit (Figura 16). Las secuencias fueron clasificadas de la siguiente manera:

Para B-P01 se tuvieron los archivos 5841 y 5842. Para B-P03 se tuvieron los archivos 5843 y 5844. Para B-P04 se tuvieron los archivos 5845 y 5846. Para B-P05 se tuvieron los archivos 5847 y 5848. Para B4-P05 se tuvieron los archivos 5849 y 5850. Estos archivos se visualizaron en el software BioEdit.

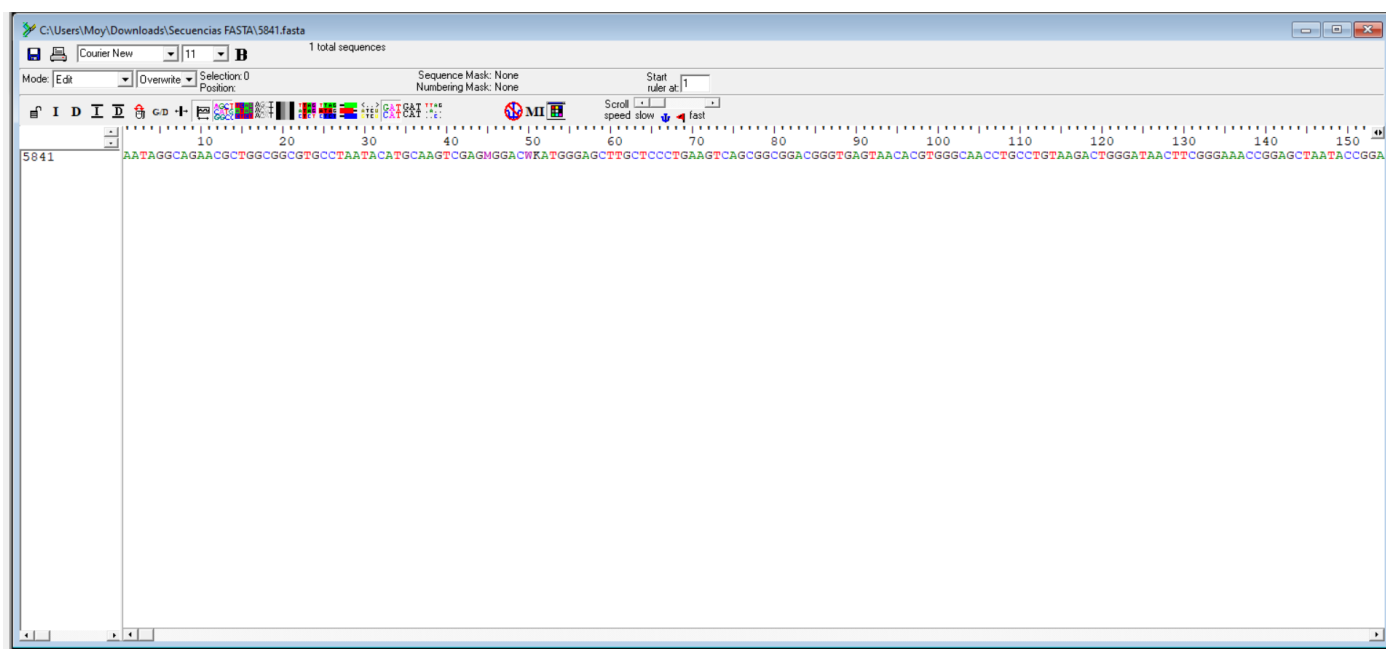


Figura 16. Observación de las muestras secuenciadas mediante el uso del software BioEdit.

Para la determinación del microorganismo mediante su secuencia de ADN se llevó a cabo una revisión en 2 bases de datos. Primero se usó el GenBank del Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI) usando los archivos FASTA obtenidos previamente y después se usó la página Bacdive, la cual nos da la información detallada de los microorganismos y sus características. Los resultados del análisis usando la herramienta BLAST del NCBI se muestran a

<i>Muestra</i>	<i>Secuencia Forward/Reverse</i>	<i>Nucleótidos en la cadena F/R</i>	<i>Resultado del análisis (NCBI)</i>	<i>Porcentaje de similitud F/R</i>	<i>Brechas F/R</i>
<i>B-P01</i>	5841/5842	1058/1182	<i>Cytobacillus Gottheilii</i>	93.95%/95.25%	1%/1%
<i>B-P03</i>	5843/5844	1180/91	<i>Halomonas Venusta</i>	97.40%	0%
<i>B-P04</i>	5845/5846	1200/1145	<i>Mesobacillus Jeotgali</i>	90.09%/91.69%	1%/2%
<i>B-P05</i>	5847/5848	1199/1209	<i>Kocuria Palustris</i>	87.43%/89.21%	2%/1%
<i>B4-P05</i>	5849/5850	1101/1150	<i>Halomonas Venusta</i>	95.46%/97.40%	1%/1%

continuación:

Tabla 4. Resultados del análisis de las secuencias en la base de datos NCBI

Los nucleótidos presentes en las cadenas rondaban entre los 1050 y 1200, mientras que su similitud comparada con la información obtenida dentro del GenBank del NCBI rondaba entre el 87% al 97%, lo que a su vez nos daba una fiabilidad en la información de las muestras secuenciadas.

De las 5 muestras secuenciadas 2 dieron el mismo resultado (B-P03 y B4-P05) como *Halomonas Venusta*, mientras que el resto de muestras fueron completamente diferentes unas de otras. En cuanto a las cadenas de la muestra B-P03, la secuencia reverse (5844) presentó muy pocos nucleótidos en comparación de su secuencia complementaria forward, esto pudo deberse a un

error en la secuenciación o un error humano por parte de la Unidad de Secuenciación de la UNAM.

La información al respecto de las características de los microorganismos

<i>Microorganismo</i>	<i>Forma</i>	<i>Gram +/-</i>	<i>Lugares que habita</i>	<i>Salinidad</i>	<i>Patogenia</i>
<i>Cytobacillus Gottheilii</i>	Bacilo	Variable	Aguas salobres, lagos hipersalinos, acumulaciones de sal, salinas naturales, solares.	0-20% NaCl.	Negativa. Sin casos registrados.
<i>Halomonas Venusta</i>	Bacilo	+	Aguas costeras, zonas de mezcla de agua dulce y salada, lagunas saladas, salinas naturales, suelos costeros, sedimentos de minas de sal o salares.	0.5%-22% NaCl.	Oportunista en pacientes inmunocomprometidos.
<i>Mesobacillus Jeotgali</i>	Bacilo	Variable	Alimentos fermentados, salados, sedimentos costeros, salinas naturales.	13%-20% NaCl.	Negativa, sin casos registrados.
<i>Kocuria Palustris</i>	Coco	-	Cosmopolita. Se ubica en la piel, mucosas, cavidades orales, canales auditivos externos, aguas salobres y suelos salinos.	8%-10% NaCl.	Oportunista en pacientes inmunocomprometidos.

identificados se describe a continuación:

Tabla 5. Características de los microorganismos identificados.

Cytobacillus Gottheilii

Cytobacillus Gottheilii pertenece al dominio bacteria, filo bacillota, orden bacillales, familia bacillaceae y del género cytobacillus. Las bacterias del género cytobacillus han sido caracterizadas e identificadas mediante estudios filogenéticos usando la secuencia del gen 16S ARNr. Son bacilos gram variables con formación de endosporas (Seiler, 2013).

C. Gottheilii no presenta antecedentes en cuanto a degradación de polímeros y/o poliésteres plásticos se refiere. Por lo que los resultados de este trabajo servirían como antecedente para este microorganismo en cuestión.

Los pares de bases presentes en la secuencia genética de *C. Gottheilii* ronda entre los 1000 a 1200 pares de bases. Siendo 1058 pares de bases en su cadena Forward (Anexo 2) y 1182 en su cadena Reverse (Anexo 3), respectivamente.

Halomonas Venusta

Halomonas Venusta pertenece al dominio bacteria, filo pseudomonadota, clase gammaproteobacteria, orden oceanospirillales, perteneciente a la familia halomonaceae y al género halomonas (Baumann et al., 1972). Fue pasando por diversas reclasificaciones por lo que tuvo diversos nombres, entre los que se encuentran *Vreelandella Venusta*, *Halomonas Hydrothermallis*, *Alcaligenes Venustus* y *Deleya Venusta* (Baumann et al., 1983).

Se ha reportado que *H. Venusta* puede producir PHA's como alternativas para el uso de polímeros (Stanley et al., 2020). A su vez, *H. Venusta* puede degradar tanto PE como LDPE donde el PE es más susceptible a este proceso de biodegradación (Zhang et al., 2025).

Los pares de bases presentes en la secuencia genética de *H. Venusta* ronda entre los 1100 a 1150 pares de bases. Siendo 1110 pares de bases en su cadena Forward (Anexo 4) y 1150 en su cadena Reverse (Anexo 5), respectivamente.

Mesobacillus Jeotgali

Mesobacillus Jeotgali pertenece al dominio bacteria, filo bacillota, clase bacilli, orden bacillales, de la familia bacillaceae y del género Mesobacillus. Es un bacilo gram variable con formación de endosporas (Yoon et al., 2001).

Se ha reportado que *M. Jeotgali* puede producir PHB como una alternativa para la producción de polímeros biodegradables (Shokr et al., 2023). Sin embargo, *M. Jeotgali* no presenta algún antecedente referente a la degradación de polímeros o poliésteres plásticos, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo servirían como antecedente para este microorganismo en cuestión.

Los pares de bases presentes en la secuencia genética de *M. Jeotgali* ronda entre los 1140 a 1200 pares de bases. Siendo 1200 pares de bases en su cadena Forward (Anexo 6) y 1145 en su cadena Reverse (Anexo 7), respectivamente.

Kocuria Palustris

Kocuria Palustris pertenece al dominio bacteria, filo actinomycetota, clase actinomycetia, orden micrococcales, perteneciente a la familia micrococcaceae y del género Kocuria. Las bacterias del género Kocuria han sido caracterizadas e identificadas a través de estudios filogenéticos usando la secuencia del gen 16S ARNr. Son cocos agrupados en diplococos o tetradas. Sin formación de endosporas (Al Bayatee, 2018).

Se han hecho trabajos para la degradación de residuos plásticos marinos donde *K. Palustris* puede degradar LDPE (Roager, 2019), demostrando una degradación del 1% de LDPE en un lapso de 30 días (Viel et al., 2023).

Los pares de bases presentes en la secuencia genética de *K. Palustris* ronda entre los 1190 a 1210 pares de bases. Siendo 1199 pares de bases en su cadena Forward (Anexo 8) y 1209 en su cadena Reverse (Anexo 9), respectivamente.

6.4 Comparativa

De las 5 muestras en total, 4 fueron secuenciadas correctamente y dando resultados concluyentes, donde podemos destacar la presencia de bacterias del tipo bacilos en 3 de las 4 muestras mientras que solo una muestra fue del tipo cocos. Esto muestra la predominancia de las bacterias de un cierto tipo de forma con respecto a otras debido a su tamaño y agrupación lo que a su vez, muestra características diferentes entre el crecimiento de las colonias en un medio de cultivo.

Sin embargo, el hecho de que algunas bacterias como *C. Gottheilii* y *M. Jeotgali* no presenten algún antecedente referente a la degradación de polímeros plásticos pero que en este trabajo se pudo comprobar que tienen esta facultad, da una pauta importante donde queda el antecedente, ya que de manera experimental, pudimos comprobar que estas dos bacterias ya mencionadas

tienen potencial enzimático para llevar a cabo estos procesos estudiados y analizados.

Por otro lado, en cuanto a *H. Venusta* y *K. Palustris*, esta información queda como un antecedente para complementar los datos ya existentes en los diversos artículos y trabajos citados en este proyecto. Esto no solo reafirma la información relatada en los mismos sino que a su vez, se hace el aporte con los resultados recabados a lo largo de la realización de este trabajo.

En cuanto a las bacterias como *Mesobacillus Jeotgali* y *Halomonas Venusta* cuyo potencial de producción de PHA's y PHB's, da una alternativa no solo para la degradación de plásticos sino que también, da una opción a la producción poliésteres origen bacterianos y biodegradables.

7. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, se llegaron a las siguientes conclusiones:

Las bacterias de ambientes salinos cultivadas, analizadas y secuenciadas en este trabajo tienen el potencial de degradación de plásticos en un proceso de hidrólisis mediante la acción de la enzima esterasa.

Los trabajos de identificación molecular son de gran ayuda para el análisis del ADN extraído de las muestras seleccionadas pero a su vez, el método de secuenciación de Sanger tiene un ligero margen de error donde influye en mayor medida el error humano.

De las 5 muestras seleccionadas, 3 de ellas fueron bacterias completamente diferentes mientras que en dos muestras las bacterias identificadas fueron las mismas. Esto destaca la variabilidad de los medios cultivados y las características que presentan los mismos.

Se comprobó no solamente la actividad esterasa en las 4 bacterias identificadas, también se comprobó la actividad de producción de plásticos biodegradables conocidos como PHA y PHB en las bacterias *Halomonas Venusta* y *Mesobacillus Jeotgali*.

Recomendaciones

Se recomienda analizar la aplicación de cambios en el protocolo usado en este trabajo con el fin de usar diversos polímeros y poliésteres plásticos en medios de cultivo, usando del mismo modo, reactivos solventes que puedan agilizar la compatibilidad entre las suspensiones de diferentes plásticos y el medio de cultivo.

También se recomienda tener en cuenta diversos lugares para la secuenciación de material genético, esto con el fin de descartar cualquier error provocado en la extracción y así tener mejores resultados.

8. BIBLIOGRAFÍA

Al Bayatee, M. A., & Alsammak, E. G. (2018). Phenetic and phylogenetic analysis of *Kocuria palustris* and *Kocuria rhizophila* strains isolated from healthy and thalassemia persons. *Sci J Med Res*, 2, 135-46.

Andrades Ayerra, S., Guillén Monzón, N., & Sosa Misuraca, C. Efectos de la contaminación por plástico en Salud Animal.

Baumann, L., Baumann, P., Mandel, M., & Allen, R. D. (1972). Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *Journal of bacteriology*, 110(1), 402–429. <https://doi.org/10.1128/jb.110.1.402-429.1972>

Baumann, L., Bowditch, R. D., & Baumann, P. (1983). Description of *Deleya* gen. nov. Created to Accommodate the Marine Species *Alcaligenes aestus*, *A. pacificus*, *A. cupidus*, *A. venustus*, and *Pseudomonas marina*. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 33(4), 793-802. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-4-793>

Bollaín Pastor, B. P., & Vicente Agulló, V. A. (2019). Presencia de microplásticos en aguas y su potencial impacto en la salud pública. *Revista Española de Salud Pública*, 15(1). <https://www.scielosp.org/article/resp/2019.v93/e201908064/>

Buteler, M. (2019). ¿Qué es la contaminación por plástico y por qué nos afecta a todos?

Cardona Serrate, F. (2024). Introducción a la biología molecular. La PCR y la secuenciación de Sanger.

Castañeta, G., Gutiérrez, A. F., Nacaratte, F., & Manzano, C. A. (2020). Microplásticos: un contaminante que crece en todas las esferas ambientales, sus características y posibles riesgos para la salud pública por exposición. *Revista boliviana de química*, 37(3), 160-175.

Castro, H. Z., & Riera, M. A. (2021). Desafío de los polihidroxialcanoatos como solución al problema de los plásticos de un solo uso. *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*. <https://doi.org/10.13140/rg.2.2.30750.25923>

Chen, Y., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2021). Occurrence, effects, and biodegradation of plastic additives in sludge anaerobic digestion: A review. *Environmental Pollution*, 287, 117568. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117568>

De-la-Torre, Gabriel Enrique (2019). Microplásticos en el medio marino: una problemática que abordar. *Revista Ciencia y Tecnología*, 15 (4), 27-37.

Díaz Moreno, N. (2021). Degradación e Influencia de la Acumulación de Microplásticos en los Entornos Marinos.

Fernández, N. (2018). Plásticos biodegradables. Una vía para disminuir la contaminación ambiental. *Encuentro con la Química*, 4(3), 7-14.

Frías, A. C., Lema, I. I., & García, A. G. (2003). La situación de los envases de plástico en México. *Gaceta ecológica*, (69), 67-82.

García, S. (2009). Referencias históricas y evolución de los plásticos. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 10(1), 71-80.

GONZÁLEZ GARCÍA, Y., MEZA CONTRERAS, J. C., GONZÁLEZ REYNOSO, O., & CÓRDOVA LÓPEZ, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29(1), 77-115.

Iparraguirre Quispe, K. D. R., & Vivanco López, M. (2015). Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos biodegradadores de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad-Lca.

Leal, L. J. (2024). *Perspectivas actuales: biotransformación de polietilenteraftalato, polietileno y cloruro de polivinilo mediada por hongos y bacterias*. [Monografía]. Repositorio Institucional UNAD. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/63623>

López Carrasquero, F. (2004). Fundamentos de polímeros. *Escuela Venezolana para la enseñanza de la Química*. Mérida, 49-51.

Montero, L., & Barragán, F. M. (2008). El descubrimiento de los plásticos: de solución a problema ambiental. *Letras ConCiencia TecnoLógica*, (5), 80-96.

Ocampo, M., & Santa Catarina, C. (2019). Plásticos en los océanos. *INCyTU Of. Inf. Científica y Tecnología para el Congr. la Unión*, 34(6), 9-034.

Oliva Civera, G., & García Nieto, L. (2012). Plásticos biodegradables. *Universidad de Zaragoza, Escuela de Ingeniería y Arquitectura* <https://zaguan.unizar.es/record/6983>.

Ortiz, R. A. (2024, 1 marzo). Desafíos y alternativas en la gestión de residuos plásticos. *Gardner Business Media, Inc.* <https://www.pt-mexico.com/articulos/desafios-y-alternativas-en-la-gestion-de-residuos-plasticos#:~:text=En%20M%C3%A9xico%20el%20consumo%20total,sustentables%20para%20contrarrestar%20esta%20situaci%C3%B3n>.

Pereiras, P. V. M., & Da Coruña Escola Técnica Superior de Náutica E Máquinas, U. (2019). *Contaminación marina por plásticos* [Trabajo de fin de grado, Universidade da Coruña. Escola Técnica Superior de Náutica e Máquinas]. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/24187>

PEREZ, C. J. (2017). Biodegradación de poliestireno por microorganismo aislados de un basurero municipal.

Prieto-Ortiz, R. G. (2023). Contaminación ambiental por plásticos durante la pandemia y sus efectos en la salud humana. *Revista Colombiana de cirugía*, 38(1), 22-29.

Quijano Palomino, J. D. (2021). Policaprolactona y polimerización por apertura de anillo; propiedades, métodos de síntesis y aplicaciones.

Ramos, L., & Diequer, Y. Revisión sistemática y metaanálisis sobre la aplicación de bacterias para la biodegradación de plásticos.

Roager, L., & Sonnenschein, E. C. (2019). Bacterial candidates for colonization and degradation of marine plastic debris. *Environmental science & technology*, 53(20), 11636-11643.

Rodriguez Dominguez, I. (2024). Biodegradación de polímeros plásticos por microorganismos aislados de diferentes nichos ecológicos.

Rojo-Nieto, E., & Montoto Martínez, T. (2017). *Basuras marinas, plásticos y microplásticos: orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global*. Ecologistas en acción.

Sarria-Villa, R. A., & Gallo-Corredor, J. A. (2016). La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos. *Journal de Ciencia e Ingeniería*, 8(1).

Segura, D., Noguez, R., & Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14(3), 361-372.

Seiler, H., Wenning, M., Schmidt, V., & Scherer, S. (2013). *Bacillus gottheilii* sp. nov., isolated from a pharmaceutical manufacturing site. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 3), 867–872. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.036277-0>

Shokr, A., Abd-Elsalam, O., Hamedo, H., & Elshafey, N. (2023). Isolation and identification of Polyhydroxybutyrate (PHB)-producing microorganisms from various sources in North Sinai. *Catrina The International Journal Of Environmental Sciences*, 27(1), 23-31. <https://doi.org/10.21608/cat.2023.295260>

Stanley, A., Murthy, P.S.K. & Vijayendra, S.V.N. Characterization of Polyhydroxyalkanoate Produced by *Halomonas venusta* KT832796. *J Polym Environ* 28, 973–983 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01662-6>

Valenzuela-González, Fabiola, Casillas-Hernández, Ramón, Villalpando, Enrique, Vargas-Albores, Francisco, & Harris, Christine. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*, 41(4), 297-313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>

Viel, T., Manfra, L., Zupo, V., Libralato, G., Cocca, M., & Costantini, M. (2023). Biodegradation of Plastics Induced by Marine Organisms: Future Perspectives for Bioremediation Approaches. *Polymers*, 15(12), 2673. <https://doi.org/10.3390/polym15122673>

Yoon, J. H., Kang, S. S., Lee, K. C., Kho, Y. H., Choi, S. H., Kang, K. H., & Park, Y. H. (2001). *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(Pt 3), 1087–1092. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-1087>

Zhang, Y., Cao, Y., Chen, B., & Zhang, B. (2025). A critical review on temperature-mediated marine plastic biodegradation. *Eco-Environment & Health*, 100177. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2025.100177>

Nallely, M. M. (2025). *Bacterias del Golfo de México con potencial para degradar plásticos y su posible aprovechamiento en biorremediación*. <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000872604>

Milagrosa, S. H., & Brenda, S. M. (2020). *Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos*. Universidad de Almería. <http://hdl.handle.net/10835/9751>

María, R. P. A., Samuel, R. M., & Biología, G. E. (2020). *Biodegradación de tereftalato de polietileno: microorganismos, enzimas y perspectivas futuras*. Universidad de la Laguna. <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/20671>

9. ANEXOS

Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

SOLICITUD DE SECUENCIACIÓN DE ADN

Folio solicitud: **8826**

Fecha solicitud: **05/06/2025**

Solicitante **José Efraín Ramírez Benítez**
Solicitante email **jeramire@uacam.mx**
Jefe de grupo **NA**
Jefe de grupo email **ramirezybecerril@hotmail.com**
Dependencia **Universidad Autónoma de Campeche**
Telefono **9811687786**

Muestra	Tamaño	Nombre de la muestra	Nombre de Oligo y Tm	Kit usado para la purificación del DNA	Tipo de DNA	Usar oligo
#1	100	BP01F	FD1 66C	QIAquick gel extraction	PCR	
#2	100	BP01R	RP2 68C	QIAquick gel extraction	PCR	
#3	100	BP03F	FD1 66C	QIAquick gel extraction	PCR	
#4	100	BP03R	RP2 68C	QIAquick gel extraction	PCR	
#5	100	BP04F	FD1 66C	QIAquick gel extraction	PCR	
#6	100	BP04R	RP2 68C	QIAquick gel extraction	PCR	
#7	100	BP05F	FD1 66C	QIAquick gel extraction	PCR	
#8	100	BP05R	RP2 68C	QIAquick gel extraction	PCR	
#9	100	B4P05F	FD1 66C	QIAquick gel extraction	PCR	
#10	100	B4P05R	RP2 68C	QIAquick gel extraction	PCR	

Anexo 1. Solicitud de secuenciación

Secuencia Forward:

AATAGGCAGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGMGGACWK
ATGGGAGCTTGCTCCCTGAAGTCAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
CAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGA
TAATGCTTTTGGACTCATGTCCTWAAGCTGAAAGATGGTTTMSGCTATCACTT
ACAGATGRGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGRGGTAACGGCTCACCAA
GGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCARACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGATTTGGGATC
GTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTAYCGGAGTAAGTCCCGGTACCTT
GACGGTACCTAACCARAAAGCCACGKYTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGSCGTAAAGCGCGCGCAG
GCGGTCCCTTAARTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT
TGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAAGAGGAGAGTGGAATTCCACSTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCMGTGGCRAAGGCGACTCTC
TGGYCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCRAACAGGATTA
GATMCCCTGGTASCTRCMCGCCGTAAACRATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG
TTTCCGCCCTTTAKTGCTGCAGCAAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGGA
GTACGGCCGCRGGGCTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGYCCSCWCAGC
GTTGKAGMATGGTGSTTTAWTTCWKAAGYTACGCSAAGAACCTTACCAGGGC
TTGACWCCTCTGACCACTCCTARARRATAGRACGTTCCCWTTCCGGGGGAM
MWRARKTGACAGGGKGGGTGYATGG

Anexo 2. Secuencia Forward de *Cytobacillus Gottheilii*.

Secuencia Reverse:

TTTAGCACCCCATCATCTGTCCACCTTAGKCGGCTGGCTCCAAAAGGATACC
CCACCSACTTCSGGTGYTACAACTCTCSTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA|
AGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATT
CCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGTGGTTTT
ATGGGAATGGMTAAACCTCGCGGTCTTGACGCCCTTTGTACCATCCATTGTA
GCACGTGTGATGCCCAGGTGATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCA
CCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTARAGTGCCCAACTGAATGCT
GGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCA
CGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGG
GGAACGTCTATYCTAGGAGTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTT
TTCGCGTTGCTTGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGCKKCCCG
TCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGSCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTA
ATGCGTTTGTGACGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTTAGCACTCAT
CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTT
CGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTT
CTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGMGAATCCACTCTCCTCTT
CTGCACTCAAGTCCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGYGGG
CTTTYACATCAGACTTAAAGGACCGCCCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATT
CCGGACAACGCTTGGCCACCTACGTATTACCGCGGGCTGCTGGSCACGTA
GTWAGCCGKGGCTTCTGTTTAGGTACCSGYCAAGGTACCGCAGTTMCT
CCSGRTACTTGGTCTTCCCTACACAGAGTTTTTACGAATCCGAAARCCTTCA
TCAMCTTCMCGCGSGCGATGGCTCGGAYMGGACTTTCGTYCAATTGSCGG
AAGATTCCCWACCTGRSYGTGCTCTTTCTCCSA

Anexo 3. Secuencia Reverse de *Cytobacillus Gottheilii*.

Secuencia Forward:

AGMGTTTGACGCTGGCGGCAGGCCCTACACATGCAGTCGAGCGGAAACAGGG
GTAGCTTGCTACCCSCTGACRAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAAT
CTGCCCCGATAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATACCGCATACG
TCCTACGGGAGAAAGGGGGCTCCGGCTCCCGCTATTGGATGAGCCTATGTC
GGATTARMTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCRACGATCCGTAGCTG
GTCTGASAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCGAACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGC
CATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGG
AARAACGCCCTAKTGGTTAATACCCATTAGGAAAGACATCACTCKCAGAAGAAG
CACCGGCTAACTCCGTGYCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATYACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTTGATAAGCCGGTT
GTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGSCMCGGCATCCGGAACGTCAAGCTAG
AGTGACAGGAGAGGAAAGGTAGAAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATCGGGAGGAATACCCAGTGGCGAAGGCGGCCCTTCTGGACTGACACTGAC
ACTGAGGTGCRAAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGTCGACCAGCCGTTGGGTGCCTAGCGCACTTTGTGGC
GAAGTTAWCGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGMAGGTTAAAA
CTCAAATGAATTTGACGGGGGGCCCGCMCMAGCGGTGGAGCATGTGGTTWA
ATTCGATGMAACSCGAGGACCCTTACCTACTCTTGACATYCYTKCCGAACCTG
TGAGAAGATCACYTTYGCTGCCCTTCGGGAACGMARAGACCAGGTGCTGCW
TGGCYTGYCSKYCAGCYTTCGKGYTGMAAAATGATTGGGGTTAGKCCCCG
AAACSGAGSCCAAACC

Anexo 4. Secuencia Forward de *Halomonas Venusta*.

Secuencia Reverse:

AATAGACCCAGTCATGAACCACACCGTGGTGATCGCTTTCCCGAAGTTAAG
CTAACCACTTCTGGTGCMGTCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA
AGGCCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGATTACTAGCGATT
CGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGAAGTACGACCGGCTTTT
CGGGATTAGCTGACTCTYGCAGCTCGCAACCCCTTTGTACCGGCCATTGTAG
CACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTGCTCCCCAC
CTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGCCATTACGCGCT
GGCAAATAAGGACAAGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACATTTCA
CAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGYCTCTGCGTTCCCGAAGGC
ACCAAGTGATCTCTCACAAGTYCGCAGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTC
GCGTTGCATCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTCGGGGCCCCGTCA
ATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCAGGCGGTGACTTATCG
CGTTAACTTCGCCACAAAGTGCGCTAGGCACCCAACGGCTGGTCGACATCGT
TTACGGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCACGCTTTCGC
ACCTCAGTGTCAGTGTCAGTCCAGAAGGCCGCWTTCCGCACTGGTATTCCTC
CCGATCTCTACGCATTTACCGCTACACGGGAATTCTACCTTCTCTCCTGC
ACTCTAGCTTGACAGTTCCGGATGCCGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTC
ACAACCGGCTTATCAAGCCACCTACSCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCGATT
AACGCTTGCAACCTCCGTATTACCGCGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTG
CTTCTTCTGCGAGTGATGTCTTCTAATGGGTATACCCACWAGGCGTCTTCTC
GCTGAAGTGCTTTACACCGAGGTCTTCTCACACACGCGGCATGCTGGATCA
GCTTTCGTCAATGTCATTATCCCACTGCKGCCTCCGTAAGGGAGTCGAC

Anexo 5. Secuencia Reverse de *Halomonas Venusta*.

Secuencia Forward:

TCTGACMGAACGCTGGCGGCGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGKAAWTCATT
AGCTTGCTTTTGYRGACSATCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGYAACCT
GCCTGTAASACTGGGATAACTYCGGGAAACGGAGCTAATACCGGATAATCC
TTTCCCTCACATGAGGGAAAGCTGAAAGACGGTTTCGGYTGTCTTACAGAT
GGGCACGCGGSGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGYAAC
GATGCRKASYCRACCTGAGAGGGKATCGGMCACACTGGGACTGAGACMCG
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGSARWAGGAATCTTCCSCAATGGACGAA
AGKCTGACGAGCAACGCCGSGTGAAACGATGAAGGCTTTCKGGYCGTAAAGT
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGYACCGGAGTAAGTGCCTGGTACCTTGACRGT
ACCTAACCARAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCRGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGMAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGKARAGCGRCGCAGGCGGT
TCCTTAAGYCTGATGTGAAAGCCCCGSCCTAACCGRGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGAACCTTGAGKGCRGAAGAGGAGAGCGGAATTCCACGKGTAGCGGW
GAAATGCGTAKAGATGTGGAGGAACACCAKTGSYGAAGGYGGCTCTCTGGTC
TGTAAGTACGCTGAGGMGCGAAAAGCGTGKGGAGCSAMCAGGATTACATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGYGYTAGAGGGTTCCG
CCCTTTASYGCTGCAGCAAACKCWTTAAGCACTCCKCCTGGGAGWACRGC
CGCAGGGCTGAACTCAAGGAATTGACSGGGGGCCGMWYAGCKGTGKAGC
ATGTGGCTTWAATYMRAGYAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCT
CTGMACWACCCTASAARATAGRCGGTCCCCCTTCGGGGTCAMCAGAGTGG
ACAGGGKGGCGCATGGTTGKCGATCAAGCTTCGTGTACRCTGMASATGAYTS
GCKMTAAASTCCCYSGCWACCGAGCCWCRAATAGCTTGRATYATARGTGCCA
GACMTTCRCGGKAGRGSACTCTCTAAGGGGAGGACMKGGCGGARGAGAMC
RARTCACSCRGA

Anexo 6. Secuencia Forward de *Mesobacillus Jeotgali*.

Secuencia Reverse:

ACCTCAAGTCATCTGTCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCCAAAGGTACCCACC
SACTTCKGGTGTACAACTCTCGTGGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
CGGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGC
TTCATGCAGGCGAGTTGCAGMCTGCAATCCGAAGTGAATGGATTTATGGG
ATRGGCTCGACCTCGCGGKTTTGCGGCCCTTTGTTCCATCCATTGTAGCAG
TGTGTAGCCCAGGTACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTC
CTCCGGTTTGTACCCGCGAGTCACCTTAGAGTGCCCMACCTGAATGCTGGCAA
CTAAGATCAAGGGKKGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAMCATCTCWCGACA
CRAGCTGACKACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCSAAGGGGAAC
GCCCTATCTYTATTTTTTCCCCCGACCCCGAGACCTGGTAAGGTTCTTCAA
AAAAGAATMRAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
TTCCTTTGAGTTTYAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAWTG
CGTTTGCTGCASCACTAAAGGGCGGAAACCCTTAACACTTAGCACTCATCGT
TTACGGCGKGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTSGCTCCCCACGCTTTCG
CGCCTCAGCGTCAGWTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTTCY
TCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAAATTCYGTCTCCTCTTC
TGCACTCAAGTTCCCRGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTGAGMCGGGGGCTTT
CACATCAGACTWAARGTGMMGCCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCG
GACAACGCTTGYSACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG
TGGCTTTTGTAGGTACCGTCAAGTACGAGTAACCTCGTACTGATCTTCC
TACAAMAGAACTTACGACCGARAGCTTCWCGATTACGGAGKTGCTCAGTCA
GATTCGCAATTGCGCAGATCCGWACTGCTGCTCGTAAGRARTCTGACGCGT

Anexo 7. Secuencia Reverse de *Mesobacillus Jeotgali*.

Secuencia Forward:

CAAYGGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTGAACGARAAGCCCT
CTTGCTGKCGTGKAKGAGTGCCGAACRSGTGAYAATACGTGARTAACCTGCC
CTTGWCTCTGGGATAAGCCCGGGAACTGSRTCTAATACTGGATGCTACMTG
TCACRCATGGKGGKGTGTGAAAGGGTTTACTGRTCTTGATGGGCTCACK
ACCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGSTACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGGCCTGAKAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCASACTC
CTACGGRAGGCAGMAKWGGGAATATTGCACAATGGYGAAAGCCTGATGC
MCGGACTCCGCRKGAGGGATGACGGCCTTCRGGTTGTAAACCTCTTTCAGAG
GGAAGAAGCCACAAGKGACGGWACCTGCASAASAAGCGCCGGMATACTACS
KGCCARCAGCCGCGKTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTGTGCTGTGAAAGCCCGGGGC
TTAACCCCGGTGTGCCGTGGGWACGGRYAGACTACAGTGCACTAKGGGAG
ACTGRAATTCTGKWGWATYSSCGGAATGCSCAGATATCRGGAGGAACWCC
GATGGMRAASGCAGGTCTCTGGGCTGTTACTGACGYTGAGGAGMGAATGATG
GSGAGCGAACAGGATTARATACCTGKAARTCCATGGCGAAAACGYTGGCA
CTAGGTGTGGGGGACATTCCRCGKTTTCCGCGCCGTAKSTAACGMATTT
AAGTGCCCCMCTGGRSGAGTAYGGYCRSTAGGCTAAAACCTCAAAGGAATY
GACGGRKGCCCGCACARGCCGSSGSAGCRTGCGGATTTAWKTTGATGCA
TCCMTAAAAACCTTTACCAAGGYTTTGACATATWYCCGGATCGTKTCARAWA
TGTTCTATCCCCCTTGGGCTCGGAWWACCGMTGAWGCATGGCTTGCAT
SMACTTCKWGTCTKAGATKSTAGAATTAAGTCYCCCTMAASYCACCGCAACT
CATCCATCCCATGTTTGGCCWAWMTYGGYACTGGTTGTGYRASYTCCATGGR
AASAACTWGTCTGGWRGTCTCCAYMGCTKCGYAAGAGAGKACAGAGTKG
TTGTCKASTA

Anexo 8. Secuencia Forward de *Kocuria Palustris*.

Secuencia Reverse:

GACGGCTCCCCATCGCCAGCCACCTTCGACGGCTCTCTCCCTAARGTTGGG
TCACCGGCTTCGGGTGTTCCGGCTTTCGTGACTTGACGGGCGGGGGGTACA
AGGCCCGGGAACGWATTACCGCASMGTGTTGATCTGCGATTACTAGCGA
CTCCGACTTCATGAGTTCGAGTTGCAGACCTCAATCCRAACTGAGACCGTTT
TTTGAGATTAKSTCCACCTCACGGTATCRMAACCCCTTGACCGMCAATTGTA
RCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGGYATGATGATTGACGKCATCCCCA
CCTTCTCCGAGKTGACCCCGGSAGTCTCCCATGAGTCCCCACCATCACGTG
CTGMAACATGGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGSGGGACTTAACCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCCCAAAGG
GGAAGAACCATCTCTGGAACGATCCGGKATATGTCAAGCCTTGGWAAGGTT
TTCGCGTTGCATCGAATTAATCCRYGTGCTCCGSCGCTTGTGCGGSCCCCCG
WMAATTCTTTGAGTTTTASYCTTGCGGSCGYACTCCCCAGGGGGGGCACTT
AATGCGTTAKYTACGGCGCGGAAAACGWGAATGYCCCCACACCTAGTGYC
CAACGTTTACGGSATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGYTCSCTCCCCATGC
TTTCGCTCCTCAGMGTSAGWAACAGCCAGAGACCTGCCTTCSYCATMGGYG
TTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACMAGGAATTCAGTCTCCCC
CTACTGCWCTCTAGWCTGTCYGTACTGCTGYACMCCCGGGGRTAMGSCS
CGGGYTTTACAGCATAYGCGACAACCGCTACGAGTTTCTTACCCCAAT
WATTYGRACAAGTTGCSYCTACKWATTAACCGCGGCTGCTGGRAMGTAG
TTAGCCGSTGTCTTCTGCTGSAGGTRCCGTTACTTGTGGSTTWCTTCCCTGC
WTGAARGAGTTTWCAACYCRAAGGTCKTMATYCCCTMMGGSGSTGYGCT
WGCATCAGGTTTSGCYCSATKRRGSAATWTTTCCCTATTCTGCCATCTGCTM
RGMAGTCTTGGSTCGKATGTMGAGATCGCGAGGKGRGGGAYSTGGTAYCA
YCCCCCTMATCGT

Anexo 9. Secuencia Reverse de *Kocuria Palustris*.



Anexo 10. Constancia de participación en el XII Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste y III Simposio Aprovechamiento Integral de Pescados, Mariscos y Biomasa de Algas celebrado en el Parque Científico y Tecnológico de Yucatán. 31 de Octubre de 2024.



Anexo 11. Constancia de participación en los Festejos del Día del Ingeniero 2025 en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UACAM. 20 de mayo de 2025.