



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

Bacterioma de plastisfera y determinación de genes de resistencia antimicrobiana en vertedero de la región del BíoBío

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Microbiología

POR DANIELA ANDREA ROJAS OÑATE

PROFESOR GUÍA:

Mauricio Schoebitz Cid (guía)

Andrés Opazo Capurro (co-guía)

Agosto, 2024

Concepción, Chile

PROFESOR GUÍA:

Dr. Mauricio Schoebitz Cid
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

PROFESOR CO-GUÍA:

Dr. Andrés Opazo Capurro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

COMITÉ EVALUADOR:

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Homero Urrutia
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Raúl Zornoza
Departamento de Ingeniería Agronómica
Universidad Politécnica de Cartagena de
España

DIRECTOR PROGRAMA:

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de este proyecto tuve el apoyo de muchas personas y seres queridos, a los cuales me gustaría expresar mi agradecimiento.

A mi familia de Quillota, a mis padres por apoyarme siempre, a mis hermanos, que, aunque ahora estemos repartidos por todas partes, siempre puedo contar con ustedes.

A mi familia de Quirihue, por adoptarme, cuidarme y darme un segundo hogar durante todo este tiempo.

A mis compañeros y amigos de la universidad, a pesar de que llegué sin conocer a nadie, agradezco haber conocido a buenas personas, que me ayudaron, ya sea con mis estudios, mi proyecto, o para distraerme cuando lo necesitaba y cuando no lo necesitaba también, porque hay muchas más cosas que hacer que solo estudiar y trabajar.

A mis profesores, que me enseñaron, guiaron y animaron positivamente durante el transcurso de este magíster, estoy muy agradecida por su orientación, y haberme entregado herramientas y oportunidades para ser una mejor profesional.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iii
TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	2
Objetivo General.....	3
Objetivos Específicos.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 El problema de los residuos plásticos.....	4
2.2 La Plastisfera.....	5
2.3 Resistencia a antibióticos.....	6
2.4 Resistencia a antibióticos en la plastisfera.....	9
2.5 Diversidad.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Sitio de estudio.....	15
3.2 Muestreo.....	16
3.3 Procesamiento previo.....	17
3.4 Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier.....	18
3.5 Microscopía electrónica de barrido.....	19
3.6 Extracción de ADN y detección de <i>intl1</i>	19
3.7 Secuenciación de amplicones 16S rRNA y análisis estadístico.....	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Identificación de polímeros.....	23
4.2 Observación microscópica de comunidad microbiana.....	23
4.3 Detección del gen 16S rRNA e <i>intl1</i>	25

4.4 Abundancia y diversidad	26
4.5 Predicción funcional	33
5. DISCUSIÓN.....	36
6. CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipo de polímero y detección del gen *intl1* en cada sitio de muestreo y tipo de plástico.

..... 25

Tabla 2. Frecuencia de la presencia y ausencia del gen *intl1* por cada tipo de plástico.

..... 26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación del sitio de estudio en la región de Biobío, Chile, destacando la ubicación del vertedero en rectángulo rojo en la costa norte de la comuna de Talcahuano entre el océano Pacífico y el humedal Rocuant-Andalién 16

Figura 2: Fotografía de la pared expuesta del vertedero y mapa de sitios de muestreo, enumerados desde S1 a S6 cada 200 m de distancia..... 17

Figura 3: Esquema del procesamiento de muestras obtenidas, a partir de la bolsa de muestreo que contiene aproximadamente 1 kg de residuos, suelo y arena, la selección del residuo plástico, corte en trozos más pequeños y finalmente separación de acuerdo al proceso posterior, ya sea FTIR, SEM o Extracción de ADN.

..... 18

Figura 4: (a) Espectro de absorción infrarrojo entre 500 y 2000 cm ⁻¹ de las muestras identificadas para cuatro tipos de plástico. (b) Imágenes representativas de SEM indicando la presencia de microorganismos en la superficie de las partículas de plástico.	24
Figura 5: Abundancia relativa de filos (a) y géneros (b) identificados de acuerdo al sitio de muestreo.	28
Figura 6: Índices Shannon, Chao1, Observed OTUs y Simpson (a) para cada sitio y (b) agrupados de acuerdo a la presencia o ausencia del gen <i>intl1</i>	30
Figura 7: (a) Matriz de disimilitud utilizando la distancia de Bray-Curtis entre muestras (b) PCoA de las distintas muestras y de acuerdo a los distintos tipos de plásticos (distintos colores).....	32
Figura 8: Funciones metabólicas basadas en asignación taxonómica usando Faportax (a) Predicción de funciones asociadas a salud humana (b) Funciones ecológicas asociadas a metabolismo.	35

RESUMEN

Plastisfera se refiere a la comunidad microbiana de la superficie de las partículas de plástico. Aunque han sido bien estudiadas en ecosistemas acuáticos, los estudios terrestres han sido limitados. Este estudio se llevó a cabo en un vertedero de 40 años de antigüedad en Rocuant-Andalién, ubicado a 20 m del Océano Pacífico. Se muestrearon transectos de 1 km de longitud, totalizando seis sitios. El tipo de polímero de los residuos plásticos se identificó mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), mientras que microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para obtener imágenes de la superficie del plástico. Se secuenció la región V3-V4 del gen 16S rRNA bacteriano para analizar la comunidad microbiana utilizando un enfoque metagenómico. Además, se analizó el gen *intl1* mediante PCR convencional, revelando la presencia potencial de genes de resistencia a antibióticos de relevancia clínica humana en el 67 % de las seis parcelas. El tipo de plástico más abundante fue el polietileno de alta densidad (HDPE) (56 %). No se encontró relación entre el tipo de plástico y la presencia del gen *intl1*. La microscopía reveló la presencia de microorganismos en las muestras, incluidos bacilos, cocos y bacterias filamentosas, que formaban pequeños grupos en las superficies de plástico. La secuenciación de amplicones del 16S rRNA mostró un predominio de miembros pertenecientes a los filos Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria en la mayoría de las muestras. Los índices de diversidad alfa indicaron una elevada diversidad y riqueza entre las muestras, pero no hubo diferencias estadísticas significativas entre los sitios. El análisis de diversidad beta indicó diferencias significativas en las comunidades bacterianas entre los lugares de muestreo, pero no entre los tipos de

polímeros. Este estudio entrega información sobre las comunidades bacterianas asociadas a los residuos plásticos de los vertederos, incluida la alta diversidad, la documentación de diversos microorganismos y las diferencias en las comunidades bacterianas y los posibles problemas ecológicos y sanitarios relacionados con la resistencia a los antibióticos.

ABSTRACT

Plastispheres refer to microbial communities on the surface of plastic particles. Although they have been well studied in aquatic ecosystems, terrestrial studies are limited. This study was conducted at a 40-year-old landfill site in Rocuant-Andalién, close to 20 m from the Pacific Ocean. One 1 km-long transects were sampled, totaling six plots. The plastic debris polymer type was identified using Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) whereas scanning electron microscopy (SEM) was used to obtain images of the plastic. The V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA gene was sequenced to analyze the microbial community using a metagenomic approach. Additionally, the *int11* gene was screened by conventional PCR, revealing the potencial presence of antibiotic-resistance genes of human clinical relevance in 67 % of the six plots. The most abundant plastic type was high density polyethylene (HDPE) (56 %). No association was found between the type of plastic and the presence of the *int11* gene. Microscopy revealed the presence of microorganisms in the samples, including bacilli, cocci, and filamentous bacteria, forming small clusters on the plastic surfaces. 16S rRNA amplicon sequencing showed a predominance of members belonging to the *Actinobacteria*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria* phyla in most samples. Alpha diversity indices indicated high diversity and richness among the samples, but there were no significant statistical difference between the sites. Beta diversity analysis indicated significant differences in bacterial communities between sampling sites but not among polymer types. This study provides insights into the bacterial communities associated with landfill plastic waste, including high diversity, documenting diverse

microorganisms and differences in the bacterial communities and potential ecological and health concerns related to antibiotic resistance.

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace bastante tiempo que el problema de la gestión de los residuos ha sido una de las grandes preocupaciones por su efecto en el medioambiente y la salud, y uno de los mayores desafíos en la actualidad es la mitigación de los efectos negativos que genera la disposición de residuos plásticos. A nivel mundial, en los últimos años se han producido cerca de 400 millones de toneladas de residuos plásticos anualmente, que se desechan de distintas formas, ya sea en rellenos sanitarios, vertederos o basurales. Se ha demostrado que los vertederos pueden ser una fuente de microplásticos (MP) que se liberan al medio ambiente y si abordamos este problema desde una perspectiva microbiológica, se pueden estudiar las comunidades microbianas, las funciones ecológicas y los peligros asociados a estos residuos. Este nuevo ecosistema de origen antropogénico, conocido como plastisfera, describe la comunidad microbiana en la superficie de las partículas de plástico.

En general, la plastisfera se ha estudiado en su mayoría en ambientes acuáticos, sin embargo, encontramos algunos estudios recientes en ambientes terrestres. En vertederos, los estudios de Rohrbach et al. (2022) y Zhu et al. (2022), relacionaron el tipo de plástico y su influencia en la comunidad microbiana. Además, se han identificado microorganismos de la plastisfera en vertederos, observando una predominancia de Proteobacterias, Firmicutes,

Bacteroidetes y Actinobacterias. En el estudio de Zhu et al., 2022, se detectaron además patógenos potenciales y genes de resistencia a antimicrobianos en la plastisfera, con niveles de enriquecimiento que variaban según los tipos de plástico y los tipos de suelo.

Considerando la información revisada y presentada a continuación, el objetivo de este estudio es identificar los componentes bacterianos y detectar la presencia de genes de resistencia antimicrobiana de importancia clínica humana en la plastisfera de un relleno sanitario cerrado hace 40 años en el sector correspondiente al humedal Rocuant-Andalién, en la ciudad de Talcahuano, región del Biobío, Chile. Para ello, este estudio incluyó microscopía electrónica de barrido para la observación de microorganismos, FT-IR para la identificación del tipo de polímero, detección del gen *intl1* como marcador de resistencia a los antibióticos y secuenciación de amplicones de 16S rRNA para el análisis de la comunidad microbiana.

Hipótesis

La comunidad bacteriana de la plastisfera de un vertedero depende del tipo de plástico. Además, el tipo de polímero determina la presencia de genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica humana.

Objetivo General

Determinar la composición del bacterioma y genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica humana en la plastisfera de un vertedero de 39 años de antigüedad del sector correspondiente al humedal Rocuant-Andalién en la comuna de Talcahuano de la región del Biobío.

Objetivos Específicos

- (1) Determinar los tipos de plástico presentes en las muestras del vertedero.
- (2) Determinar la comunidad bacteriana de la plastisfera.
- (3) Determinar la presencia de ARGs de importancia clínica humana en las muestras obtenidas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El problema de los residuos plásticos

Desde 2021, se producen aproximadamente 400 millones de toneladas de residuos plásticos al año (United Nations Environment Programme, 2023), de los cuales el 9 % se puede reciclar y el 79 % se deposita en vertederos o en el medio ambiente (C. Li et al., 2021). A nivel mundial, los residuos sólidos urbanos están compuestos por un 10-30 % de plásticos, en Sudamérica, la composición es del 15 % (International Solid Waste Association, 2024). La producción de plástico puede dividirse en diferentes tipos, siendo la mayor producción actual la de polietileno (PE), polipropileno (PP) y cloruro de polivinilo (PVC) (Chow et al., 2023). Con el tiempo, el plástico se rompe debido a una combinación de factores ambientales (C. Li et al., 2021); las partículas de más de 5 mm se denominan macroplásticos, y las de entre 1 μm y 5 mm, microplásticos (MP) (Tursi et al., 2022).

Existe evidencia de problemas que puede generar la presencia de plásticos en el ambiente, si consideramos un escenario de un ecosistema terrestre ubicado en humedales que reciben descargas de residuos, existen estudios que detectaron la presencia de microplásticos en aves que habitan estos lugares, tanto en el sistema digestivo, como en el plumaje (Reynolds & Ryan, 2018).

2.2 La Plastisfera

Se ha demostrado que los vertederos pueden ser una fuente de MP que se liberan al medio ambiente (He et al., 2019). Al abordar este problema desde una perspectiva microbiológica, podemos estudiar las comunidades microbianas, las funciones ecológicas y los peligros asociados a este ecosistema. De esta manera, diferenciamos este nuevo ecosistema, llamado plastisfera, término utilizado para describir la comunidad microbiana en la superficie de las partículas de plástico. Se ha estudiado su ecología microbiana y se ha detectado la presencia de saprófitos, simbioses, depredadores, fotótrofos y heterótrofos (Amaral-Zettler et al., 2020), lo que indica que la plastisfera es un ecosistema en el que cada microorganismo tiene su propia función ecológica. En los últimos años, ha aumentado el número de estudios sobre la plastisfera, centrados principalmente en ecosistemas acuáticos, suelos y plantas de tratamiento de aguas residuales.

Encontramos literatura muy reciente sobre plastisfera en vertederos, un estudio de Rohrbach et al. (2022) encontró que el tipo de MP influye en el microbioma y, por tanto, es un factor determinista y no estocástico en el ensamblaje de la comunidad microbiana. Esto, combinado con el estudio del suelo (Zhu et al., 2022), que encontró lo mismo, proporciona pruebas de que el tipo de plástico afecta a la comunidad microbiana. Además, las comunidades microbianas de la plastisfera mostraron diferencias significativas en comparación con las del suelo, y estas diferencias disminuyeron con el tiempo. Esto se mencionó en una revisión de (Shi et al.,

2023). En un estudio (Puglisi et al., 2019), la plastisfera envejecida, en residuos de PE, mostraron una estructura microbiana en donde predominaba el género *Bacillus*, y con menor diversidad alfa en comparación con las comunidades microbianas del suelo.

Un estudio realizado por Munir et al. (2022) aisló microorganismos de residuos plásticos encontrados en un vertedero en Indonesia. Los investigadores descubrieron que la mayoría de las bacterias aisladas (83 %) eran gramnegativas, en contraste con las grampositivas, que eran menos prevalentes. Otro estudio de comunidades bacterianas que colonizaban residuos de films de plástico de 20 años en vertederos de Corea (Chung et al., 2022) descubrió un enriquecimiento de Firmicutes, Planctomycetes y Actinobacteria a nivel de filo en el plástico en comparación con el suelo, y de *Bradyrhizobiaceae*, *Pseudarthrobacter*, *Myxococcales*, *Sphingomonas* y *Spartobacteria* a nivel de género. Además, un estudio reciente realizado en un vertedero ubicado en China (Lin et al., 2023), reveló que Proteobacterias, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria eran los filos bacterianos más abundantes en la superficie de los residuos plásticos e identificó los géneros *Sporosarcina*, *Haloplasma*, *Oceanobacillus*, *Pelagibacterium*, *Lysobacter* y *Desemzia*.

2.3 Resistencia a antibióticos

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos se produce cuando los cambios en las bacterias hacen que los medicamentos utilizados para tratar

infecciones sean menos eficaces y se ha convertido en una de las principales amenazas para la salud pública del siglo XXI. El informe sobre resistencia a los antimicrobianos, encargado por el Gobierno británico, afirma que la resistencia a antimicrobianos podría llegar a matar a 10 millones de personas al año de aquí a 2050 (Murray et al., 2022).

Las principales formas de resistencia a los antibióticos son: (1) Resistencia intrínseca: la resistencia es causada por propiedades estructurales de la bacteria. Se puede dar que el microorganismo no contiene la estructura diana del antibiótico, o que debido a sus características no encuentran la diana. (2) Resistencia adquirida: la bacteria no se ve afectada por antibióticos a los que antes era susceptible. Esta forma de resistencia puede venir del cromosoma principal o de estructuras extracromosomales (plásmidos, transposones, etc.). (3) Resistencia cruzada: resistencia a un antibiótico específico de un microorganismo, que funcionan con mecanismos idénticos o relacionados con otros, lo que suele ocurrir cuando los antibióticos tienen estructuras comunes. (4) *Multi-drug resistance*: si la cepa bacteriana no es susceptible a tres o más tipos de antimicrobianos, se denominan bacterias multirresistentes (MDR) (Hasan & Al-Harmoosh, 2020).

En microbiología ambiental se suele definir la resistencia como una menor susceptibilidad a un antibiótico en comparación con otras cepas de la misma especie y como la mayoría de las especies de bacterias ambientales son difíciles de cultivar, los microbiólogos ambientales, con más frecuencia que en

el área clínica, tienden a estudiar los genes de resistencia en lugar de las bacterias resistentes (Larsson & Flach, 2022).

La resistencia a antibióticos se puede generar en general por tres mecanismos (Alekshun & Levy, 2007): (1) Degradación o modificación enzimática de los compuestos antibióticos, (2) Modificación o protección del sitio de unión del antibiótico, y (3) Bombas de eflujo que eliminan activamente los compuestos antibióticos de la célula. Estos genes de resistencia a antibióticos (ARGs) pueden diseminarse en el medio ambiente y aumentar debido a la presión selectiva causada por las actividades humanas, ya sea por el uso indiscriminado de antibióticos en centros de salud o en la cría de animales. Los elementos genéticos móviles (MGEs) que contienen ARGs pueden transferirse entre bacterias. MGEs (*Mobile genetic elements* por sus siglas en inglés) es un término utilizado para referirse a los elementos que favorecen la movilidad intracelular del ADN (por ejemplo, del cromosoma a un plásmido o entre plásmidos), así como a los que permiten la movilidad intercelular del ADN (Partridge et al., 2018). La transferencia horizontal de genes de estos elementos aumenta significativamente los riesgos epidemiológicos asociados a la resistencia a los antibióticos, ya que los ARG pueden transferirse bidireccionalmente de bacterias no patógenas a patógenas (Cytryn, 2013)

Esta transferencia horizontal de genes se puede dar principalmente por tres mecanismos: (1) Conjugación: transferencia de plásmidos de una bacteria a otra, (2) Transducción: transferencia de genes mediada por virus (bacteriófagos) y (3) Transformación: captación de ADN a través de la pared

celular y la incorporación de ese ADN al genoma o a plásmidos existentes (Cytryn, 2013).

Las secuencias de inserción y los transposones son segmentos de ADN que pueden desplazarse ellos mismos (y sus genes de resistencia asociados) de forma casi aleatoria a nuevas ubicaciones en la misma molécula de ADN o en moléculas diferentes dentro de una misma célula. Otros elementos, como los integrones, utilizan la recombinación específica de sitio para mover genes de resistencia entre sitios definidos. Dado que estos tipos de MGE suelen estar presentes en múltiples copias en diferentes ubicaciones de un genoma, también pueden facilitar la recombinación homóloga (intercambio de secuencias entre segmentos idénticos o relacionados) (Partridge et al., 2018).

2.4 Resistencia a antibióticos en la plastisfera

Por otra parte, se han identificado elementos de interés medioambiental en las plastisferas, y una revisión (Junaid et al., 2022) destacó sus implicaciones ecotoxicológicas, principalmente en el enriquecimiento y la diseminación de patógenos, genes de resistencia a los antibióticos (ARGa), bacterias resistentes a los antibióticos (ARBs) y elementos genéticos móviles (MGEa) asociados a los MP en las aguas residuales. (Zhang et al., 2022) sugirieron que los MP pueden afectar el enriquecimiento selectivo de ARB y ARG en los ecosistemas acuáticos. La relación entre plásticos y ARGs ha sido objeto de varios estudios en los últimos años, no sólo en aguas residuales, sino también en diferentes tipos de ecosistemas. Por ejemplo, se ha descubierto que los

MP de PVC enriquecen una mayor variedad de bacterias potencialmente patógenas y transportan ARGs en lodos activados procedentes del tanque aeróbico de una planta de tratamiento de aguas residuales en Shenzhen, China (Q. Li et al., 2022). El estudio (Zhu et al., 2022) detectó una serie de patógenos potenciales y ARGs en la plastisfera, que estaban enriquecidos en comparación con el suelo, pero variaban en función de los tipos de microplásticos y de suelo. Se observó una mayor abundancia de ARGs en PE que en PS (poliestireno), PA (poliamida) y PVC, independientemente del tipo de suelo. Otro estudio demostró que los MP no sólo actúan como vectores para el transporte de ARG, sino que también podrían favorecer la propagación de ARG estimulando el potencial de transferencia horizontal de genes (HTG). Se estudiaron MP de PE, PP, PS y PE reciclado, y aunque todos estos tipos de MP adsorbían ARG, el PP mostró la mayor capacidad de adsorción. Además, la exposición bacteriana a estos materiales aumentó la transferencia horizontal de genes entre 1,5 y 2 veces. Estos experimentos se realizaron utilizando *Escherichia coli* BL21 como donante y MG1655 como aceptor del plásmido (Cheng et al., 2022). Una revisión de Shi et al. (2023) mencionó además que los ARGs en plásticos también varían dependiendo del tipo y tamaño de los MPs. Los MP grandes albergan una mayor abundancia de ARG que los MP pequeños (entre un 98 y un 154 % superior) (Lu et al., 2020). Esto se atribuye al hecho de que los MP más grandes contienen más antibióticos y metales pesados, generando así más presión selectiva. Además, el proceso de envejecimiento influye en la acumulación selectiva de ARG. La abundancia

de ARGs en plásticos envejecidos supera a la de los plásticos menos envejecidos en un 46 % (Lu et al., 2020).

En el estudio mencionado de Zhu et al. (2022) sobre la plastisfera en el suelo, se analizaron 285 ARGs y 10 MGEs mediante qPCR, revelando la presencia de 102 ARGs y 3 MGEs, así como diferencias entre los tipos de plastisferas. Un enfoque interesante es el de Zheng et al. (2020) donde propusieron el uso potencial del gen *intl1* clínico (integrasa de integrón de clase I) como indicador de la abundancia de genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica en una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. Los integrones de clase I contienen varias cascadas de genes de resistencia antimicrobiana que codifican *dfr* (dihidroflavonol-4-reductasa), β -lactamasa de amplio espectro, *qacE Δ 1* (amonio cuaternario), *sul1* (sulfonamida) y enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME), que se han encontrado en géneros como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Salmonella* (Akrami et al., 2019). Se ha estudiado la propagación de estos genes en entornos terrestres asociados a la agricultura (Ali et al., 2020), destacando el papel de las cascadas de integrones de clase I en la propagación de genes de resistencia y el riesgo de su transporte desde entornos terrestres a masas de agua.

2.5 Diversidad

Una característica importante de las comunidades microbianas es la diversidad, y para poder medirla se utilizan distintos métodos y cálculos.

Podemos diferenciar la diversidad alfa, que corresponde a la diversidad dentro de una población, y la diversidad beta, que hace la comparación entre distintas poblaciones.

Diversidad alfa

Las OTUs observadas cuentan el número de OTU distintas observadas en cada muestra, y el índice de Shannon es un estimador de la riqueza y la uniformidad de las especies, con más peso en la riqueza de especies. El índice de Simpson es un estimador de la riqueza y la homogeneidad de las especies, con mayor peso en la homogeneidad de las especies. El índice Chao1 es un estimador de la riqueza de especies basado en la abundancia (Kim et al., 2017). A continuación se entregan las ecuaciones utilizadas para calcular estos índices.

Índice de diversidad de Shannon (H)

$$H = - \sum_{i=1}^s (p_i * \ln(p_i))$$

Donde s es el número de OTUs y p_i es la proporción de la comunidad representada por OTU_i.

Índice de Simpson's (D)

$$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$$

Donde s es el número total de especies en la comunidad y p_i es la proporción de la comunidad representada por OTU_{*i*}.

Chao1

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F_1(F_1 - 1)}{2(F_2 + 1)}$$

Donde F_1 y F_2 son la cuenta de los singletons y doubletons, respectivamente, y S_{obs} es el número de especies observadas (Kim et al., 2017).

Diversidad beta

La diversidad beta mide la diferencia entre dos muestras o comunidades. El análisis de la diversidad beta requiere como entrada una medida o índice de disimilitud (Xia & Sun, 2023). El índice de disimilitud Bray-Curtis, una medida de distancia o disimilitud entre muestras, fue desarrollado y bautizado con el nombre de J. Roger Bray y John T. Curtis. Es la beta diversidad más utilizada en los campos de la ecología y la investigación de microbiomas. La disimilitud de Bray-Curtis se desarrolló a partir de recuentos en cada muestra para cuantificar la diferencia composicional entre dos muestras. Para datos de abundancia de microbioma se mide disimilitud. Por ejemplo, si hay dos especies en dos muestras de comunidad, cuanto menor es la distancia, más parecidas son las dos comunidades. Cuando el coeficiente de distancia es

cero, las dos comunidades son idénticas. Este índice tiene la ventaja de que se pueden visualizar. La forma de calcular esta distancia es con la ecuación:

$$BC = \frac{\sum_{i=1}^i |X_{ij} - X_{ik}|}{\sum_{i=1}^i (X_{ij} + X_{ik})}$$

donde BC es el índice de disimilitud de Bray-Curtis; X_{ij} y X_{ik} son el número de individuos de la especie i en las muestras j y k , respectivamente; y n es el número total de especies en las muestras (Xia & Sun, 2023).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitio de estudio

El sitio de interés corresponde a un relleno sanitario de 40 años de antigüedad ubicado en el sector de playa del humedal Rocuant-Andalién, comuna de Talcahuano, región del Biobío, Chile (36° 44' 2.371 'S, 73° 3' 38.098' O). El sector presenta un clima oceánico templado, con una temperatura media anual de 13,1 °C y una precipitación anual de 984,3 mm (Dirección Meteorológica de Chile). El vertedero estuvo en funcionamiento entre 1974 y 1984. Actualmente, el vertedero está inactivo, cubierto de tierra y arena, y en su superficie se puede observar vegetación. Cabe destacar que se trata de un lugar de nidificación de aves migratorias, como *Haematopus palliatus* (Ortiz Soazo et al., 2022), *Leucophaeus pipixcan* (Western Hemisphere Shorebird Reserve Network, 2023) y *Limosa haemastica* (Western Hemisphere Shorebird Reserve Network., 2023). Debido a la erosión causada por factores ambientales y el paso del tiempo, el vertedero ha quedado expuesto en toda su longitud norte hacia la playa y el mar (Figura 1), con escombros en la pared expuesta (Figura 2) y diseminados por la playa.

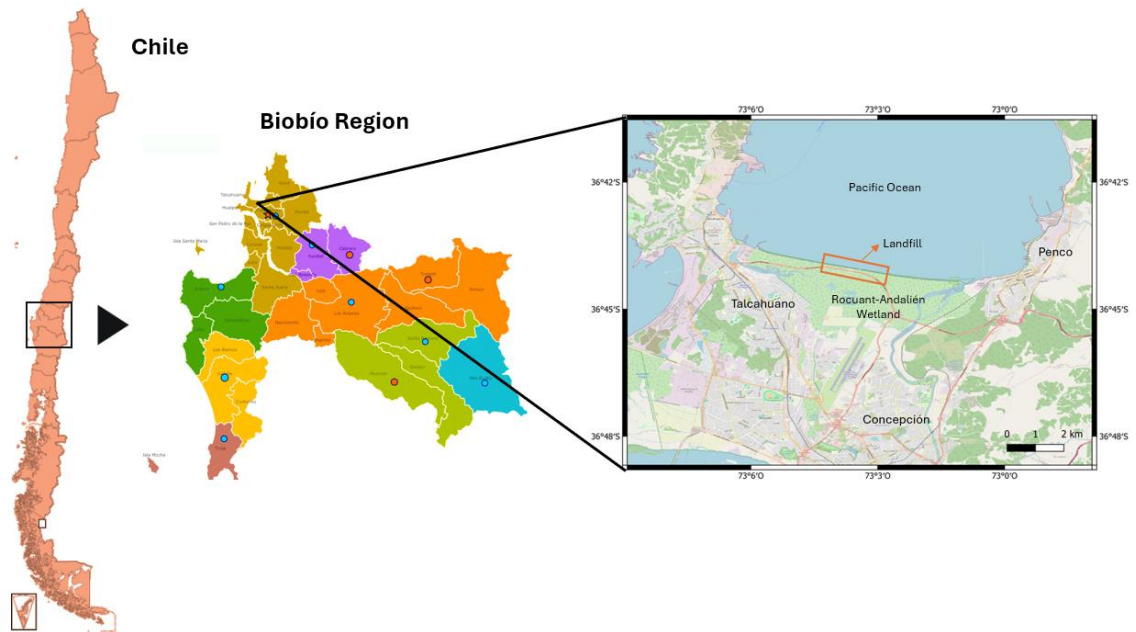


Figura 1: Ubicación del sitio de estudio en la región de Biobío, Chile, destacando la ubicación del vertedero en rectángulo rojo en la costa norte de la comuna de Talcahuano entre el océano Pacífico y el humedal Rocuant-Andalién.

3.2 Muestreo

El muestreo se realizó el 8 de mayo de 2023. Se empleó una estrategia de muestreo métrico incluyendo 1000 m de longitud del vertedero (Figura 2). El perfil expuesto se dividió en secciones equidistantes entre sí a intervalos de 200 m (S1 a S6). El muestreo se llevó a cabo por triplicado realizando una pequeña excavación horizontal en cada sección a una profundidad de 50 cm desde la superficie y recolectando material (1 kg), desechando el que estaba expuesto a las condiciones externas y almacenándolo en bolsas individuales. Las muestras se transportaron al laboratorio en contenedores cerrados y

aislados con compresas frías o hielo para mantener la temperatura baja. El almacenamiento en el laboratorio se mantuvo a 4 °C.

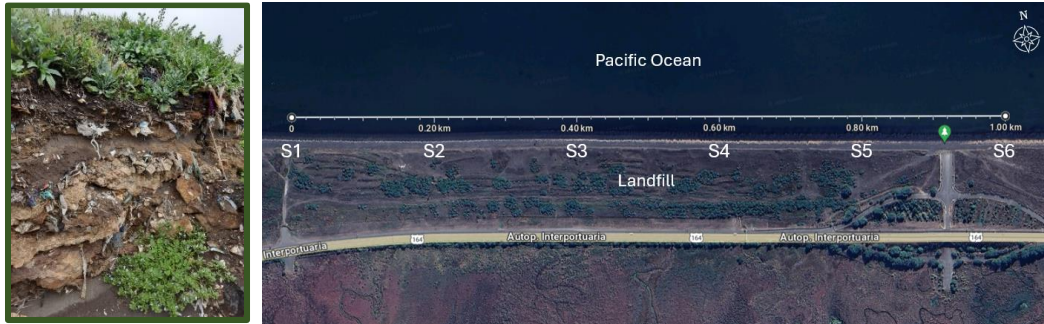


Figura 2: Fotografía de la pared expuesta del vertedero y mapa de sitios de muestreo, enumerados desde S1 a S6 cada 200 m de distancia.

3.3 Procesamiento previo

Las muestras se separaron seleccionando al azar un trozo de material plástico de cada bolsa de muestras, cortando el residuo en trozos más pequeños con un bisturí estéril, almacenando los trozos para FTIR y SEM (almacenados a 4 °C, siguiendo los protocolos indicados por el Centro de Microscopía Avanzada de la Universidad de Concepción), y a -18 para extracción de ADN (Figura 3).



Figura 3: Esquema del procesamiento de muestras obtenidas, a partir de la bolsa de muestreo que contiene aproximadamente 1 kg de residuos, suelo y arena, la selección del residuo plástico, corte en trozos más pequeños y finalmente separación de acuerdo al proceso posterior, ya sea FTIR, SEM o Extracción de ADN.

3.4 Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier

Para identificar el tipo de plástico se utilizó la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR). Este método se ha utilizado en varios estudios para la caracterización química de residuos plásticos (Mecozzi et al., 2016), así como para la detección de sustancias poliméricas extracelulares en la superficie. El espectro de absorción de luz infrarroja del material se obtuvo a diferentes longitudes de onda. El espectro entre 500 y 2000 cm^{-1} se comparó con una base de datos de peaks de absorción correspondientes a los grupos funcionales de diferentes polímeros para identificar el tipo de material. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro IRAffinity-1S (Shimadzu, Japón) con reflectancia total atenuada (ATR) para el análisis de partículas de plástico.

3.5 Microscopía electrónica de barrido

En una revisión de Wang et al., (2022) se sugiere que la microscopía electrónica de barrido (SEM), entre otras técnicas, se utiliza para estudiar la morfología de las plastisferas. Las ventajas de utilizar el SEM son su alta resolución, la obtención intuitiva de imágenes, el amplio rango de aumentos y la capacidad de realizar análisis cualitativos y cuantitativos. La muestra se trató con 1 ml de glutaraldehído al 2,5 % en un tubo Eppendorf de 1,5 ml a 4 °C durante 2 semanas, se secó en punto crítico y se recubrió de oro. El equipo utilizado fue un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6380 del Centro de Espectroscopía y Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción.

3.6 Extracción de ADN y detección de *intl1*

La extracción de ADN utilizando el DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen), uno de los kits más utilizados en estudios relacionados con MPs, y que no mostró diferencias significativas respecto a otros kits de uso común o a la extracción manual utilizando fenol-cloroformo (Onda & Sharief, 2021). La extracción se realizó en las 18 muestras seleccionadas siguiendo el protocolo del fabricante, con las siguientes modificaciones: pesando 0,2 g de muestra y utilizando 75 µl de solución de elución para el ADN. La concentración de ADN se midió espectrofotométricamente utilizando 1 µL del extracto en un

espectrofotómetro de microplacas Agilent BioTek Epoch (Agilent Technologies). Los extractos de ADN se almacenaron a -18 °C.

Para la PCR del gen 16s rRNA se utilizaron los primers P0 (285F) 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y P6 (1492R) 5'-CTACGCGTACCTTGTTACG-3' (Jara Henríquez, 2018) y la mezcla maestra DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Se utilizaron las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 2 min; y un paso final de elongación a 72 °C durante 5 min. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5 % utilizando un marcador MaestroGen de 1kb.

Para el análisis por PCR del gen *intI1* (integrón de clase 1, integrón-integrasa), se utilizaron los primers intA (F) 5'-GAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e intB (R) 5'-CTACGGCTACCTTGTTACG-3' (Ali et al., 2020). DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Se utilizaron las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 2 min; y un paso final de elongación a 72 °C durante 5 min. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5 % utilizando el marcador Azura PureView™ 100 bp DNA Ladder. Se utilizó ADN de la cepa UCO 286 como control positivo y ADN de la cepa UCO 288 como control negativo (stock bacteriano del

Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos, Universidad de Concepción).

3.7 Secuenciación de amplicones 16S rRNA y análisis estadístico

La secuenciación de los amplicones de la región v3-v4 del gen 16S rRNA se realizó utilizando Illumina HiSeq (Genoma Mayor, Santiago, Chile). Se utilizó Qiime2 para analizar las secuencias obtenidas (Bolyen et al., 2019). La abundancia relativa fue calculada y graficada para filos y géneros usando matplotlib (Hunter, 2007). Para cada muestra se calcularon las OTUs observadas y los índices de diversidad alfa Chao1, Shannon y Simpson. Las OTUs observadas cuentan el número de OTU distintas observadas en cada muestra, y el índice de Shannon es un estimador de la riqueza y la uniformidad de las especies, con más peso en la riqueza de especies. El índice de Simpson es un estimador de la riqueza y la homogeneidad de las especies, con mayor peso en la homogeneidad de las especies. El índice Chao1 es un estimador de la riqueza de especies basado en la abundancia (Kim et al., 2017). Se utilizó la prueba H de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas usando Scipy (Virtanen et al., 2020). La prueba de Kruskal-Wallis es útil como prueba no paramétrica general para comparar más de dos muestras independientes (Ostertagová et al., 2014). La prueba de Mann-Whitney U se utiliza para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos. y se utiliza con datos no paramétricos (MacFarland & Yates, 2016).

Para la diversidad beta, el índice de disimilitud de Bray-Curtis se calculó utilizando la biblioteca SciPy (Virtanen et al., 2020), PCoA se realizó utilizando Scikit-bio (<http://scikit-bio.org/>), y PERMANOVA se utilizó para probar diferencias estadísticamente significativas. FAPROTAX se utilizó para hacer predicciones funcionales basadas en identificaciones taxonómicas (Louca et al., 2016).

Para determinar la relación entre el tipo de plástico y la presencia del gen *intl1* se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para datos categóricos utilizando SciPy (Virtanen et al., 2020).

4. RESULTADOS

4.1 Identificación de polímeros

Se obtuvieron espectros de absorción infrarroja y se compararon con una base de datos de polímeros para identificar los tipos de polímeros de las 18 muestras. Diez de las muestras eran de HDPE (55,6 %), cuatro de PS (22,2 %), dos de PVC (11,1 %), una de LDPE (5,6 %) y una de PP (5,6 %).

4.2 Observación microscópica de comunidad microbiana

Las imágenes SEM (Figura 4) mostraron la presencia de bacterias, hongos (filamentosos y levaduras). Excepto en la muestra S5-2 (identificada como PS, situada a 1000 m del inicio de la pared expuesta), no se observaron microorganismos. En general, la población bacteriana estaba aislada o en pequeños grupos, con bacilos, cocos y morfología filamentosa sin formación evidente de biopelículas. Predominaba la morfología en forma de bacilo, que se observó en el 87 % de las imágenes y en el 94 % de las muestras. Se observaron bacterias en forma de bacilo en todas las muestras de HDPE.

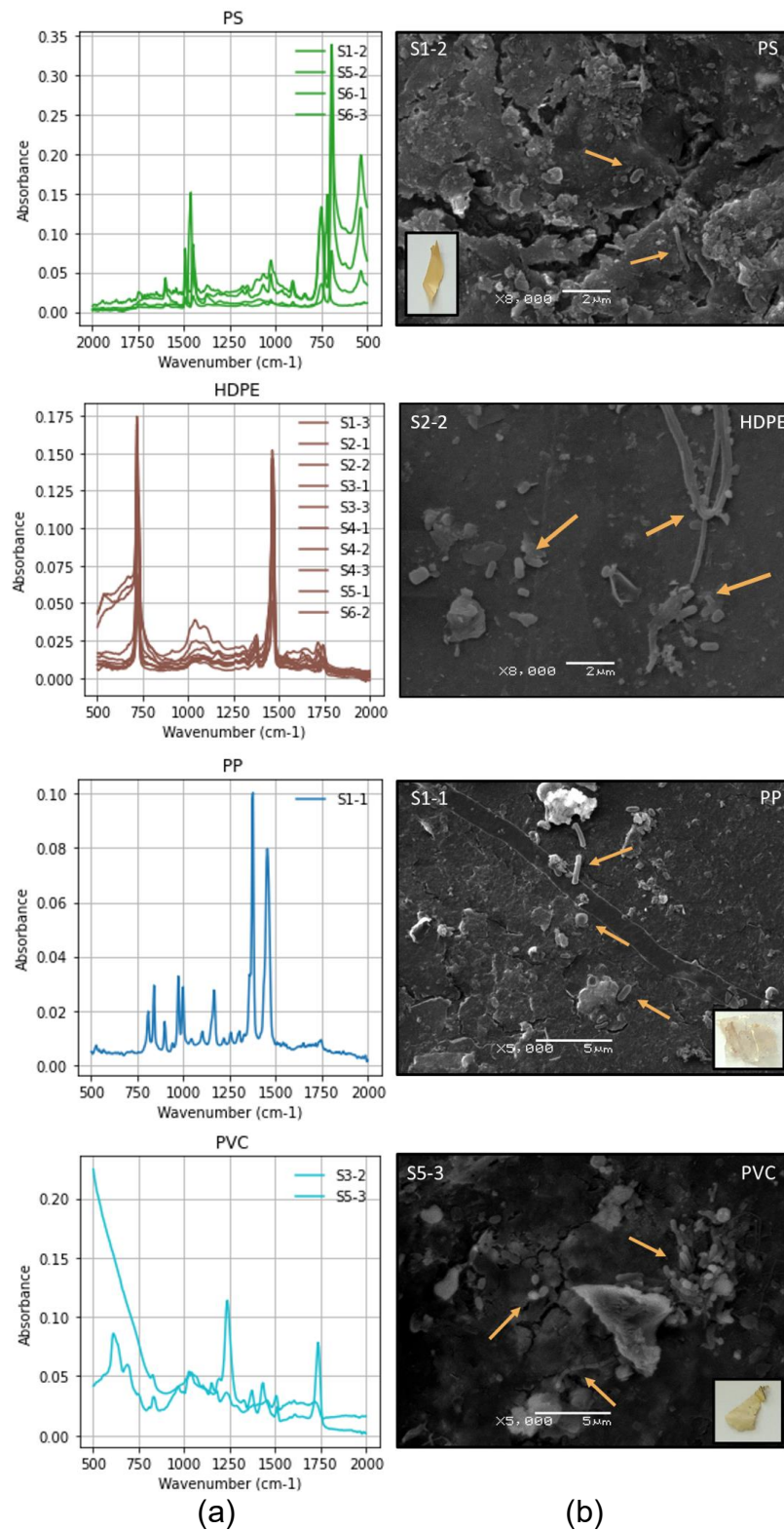


Figura 4: (a) Espectro de absorción infrarrojo entre 500 y 2000 cm⁻¹ de las muestras identificadas para cuatro tipos de plástico. (b) Imágenes

representativas de SEM indicando la presencia de microorganismos en la superficie de las partículas de plástico.

4.3 Detección del gen 16S rRNA e *intl1*

La visualización de los productos de la PCR para el gen 16S rRNA permitió verificar la presencia de ADN procariota y de *intl1*. El gen 16S rRNA se detectó en 15 de las 18 muestras (83 %) e *intl1* en 6 de las 18 muestras (33 %) y en 4 de los 6 sitios (67 %); la presencia de *intl1* en cada tipo de polímero y sitio de muestra se enumera en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipo de polímero y detección del gen *intl1* en cada sitio de muestreo y tipo de plástico.

Sitio de muestreo		Tipo de plástico	
Sitio	Presencia <i>intl1</i>	Polímero	Presencia <i>intl1</i>
S1	0.0 %	PP	0 %
S2	33.3 %	PS	33 %
S3	0.0 %	HDPE	50 %
S4	33.3 %	LDPE	0 %
S5	66.7 %	PVC	50 %
S6	66.7 %		

PS: poliestireno, PVC: policloruro de vinilo, HDPE1. Polietileno de alta densidad; LDPE: Polietileno de baja densidad; PP: Polipropileno

Se creó una tabla de frecuencia para determinar si existe una relación entre el tipo de plástico (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de la presencia y ausencia del gen *intl1* por cada tipo de plástico.

Tipo de Plástico	<i>intl1</i> : Sí	<i>intl1</i> : No	Total
PP	0	1	1
PS	1	3	4
HDPE	4	7	11
LDPE	0	1	1
PVC	1	1	2
Total	6	13	19

Se realizó la prueba de Chi-cuadrado para determinar dependencia de los datos, obteniendo un estadístico de prueba Chi-cuadrado igual a 1.575, y un valor p de 0.813. Dado que el valor p es mayor que el nivel de significancia de 0.05, no hay evidencia suficiente para confirmar una diferencia estadísticamente significativa en la presencia del gen *intl1* dependiente del tipo de plástico.

4.4 Abundancia y diversidad

La secuenciación de los amplicones del gen 16S rRNA nos permitió realizar un análisis metagenómico de la diversidad bacteriana de los residuos plásticos de los vertederos. Para estudiar la abundancia a nivel de filo y género, se representaron en abundancia relativa, mostrando los filos o géneros más abundantes, separándolos de los taxones no asignados y combinando el resto en la categoría "otros" (Figura 5).

El análisis de secuenciación reveló un predominio de Actinobacteria (17,8 % - 66,2 %), Firmicutes (3,9 - 58 %), y Proteobacteria (7-26,2 %) a nivel de filo en

la mayoría de las muestras, con *Nocardioides* (1,2 - 15,6 %), *Streptomyces* (0,6 - 4,6 %), *Gaiella* (0,4 - 5 %), *Actinomadura* (0,4 - 11,4 %), *Solirubrobacter* (0,7 - 4,2 %) y *Bacillus* (0,2 - 5,4 %) como géneros más representativos. Los taxones no asignados a nivel de género oscilaron entre el 56,8 % y el 74,3 % debido a las limitaciones de la base de datos utilizada. Casi todas las muestras mostraron un predominio de Actinobacterias con la excepción de las muestras S2-3, S4-1 y S5-2, identificadas como LDPE, HDPE y PS respectivamente, con un predominio de Firmicutes (Figura A1a). A nivel de género, la muestra S2-1, identificada como HDPE, tenía la mayor abundancia de *Nocardioides* (15,6 %) y la muestra 4-2, identificada también como HDPE, tenía la mayor abundancia de *Actinomadura* (11,4 %) (Figura A1b).

Se identificaron 404 microorganismos diferentes a nivel de especie (14,4 %). Los cinco microorganismos más abundantes fueron *Actinomycetospora chiangmaiensis* (0,0 - 7,97 %), *Gaiella occulta* (0,43 - 5,01 %), *Blastococcus jejuensis* (0,01 - 3,62 %), *Thermoflavimicrobium dichotomicum* (0,0 - 3,20 %) y *Bacillus thermoalkalophilus* (0,0 - 2,76 %). También se detectó la presencia (abundancia < 1 %) de algunos agentes patógenos u oportunistas conocidos, como *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Rhodococcus globerulus*, *Mycobacterium arupense*, *Rhodococcus equi*, *Corynebacterium aurimucosum*, *Acinetobacter radioresistens*, *Bordetella holmesii* y *Bordetella ansorpii*.

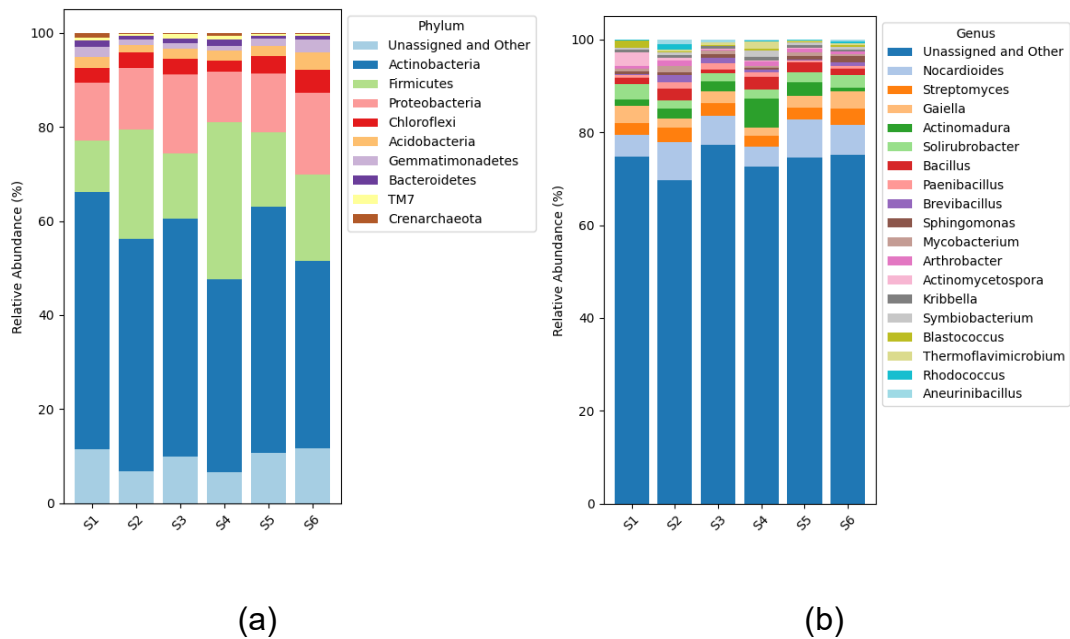


Figura 5: Abundancia relativa de filos (a) y géneros (b) identificados de acuerdo al sitio de muestreo.

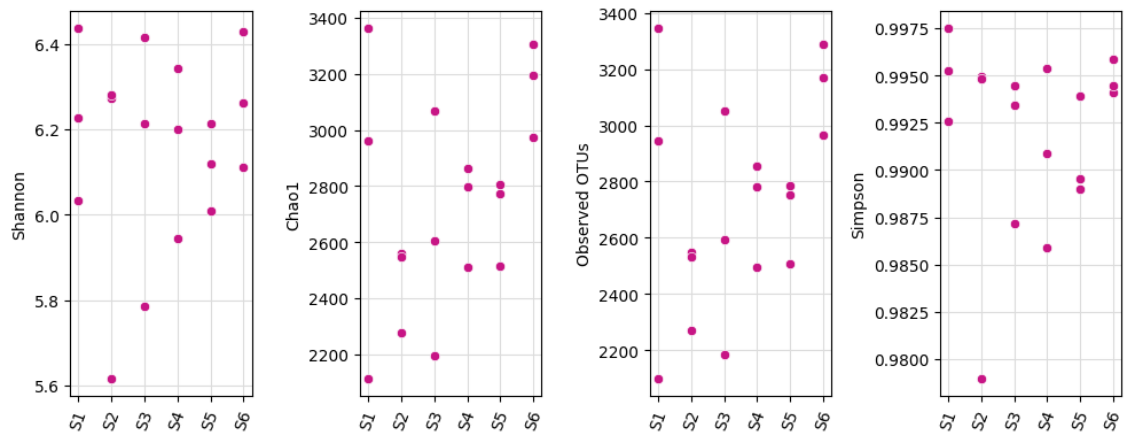
Para el análisis de la diversidad alfa, se calcularon los índices de Shannon, Simpson, Chao1 y OTU observadas (riqueza) (Figura 6).

El índice de Shannon, que oscila entre 5,51 y 6,44, es un valor elevado, lo que indica un gran número de especies diferentes y una distribución uniforme, sin una sola especie dominante en la comunidad. El índice de Simpson, que oscila entre 0,979 y 0,997, indica que la comunidad microbiana es muy homogénea y que ninguna especie domina la población. Las UOT observadas, que oscilan entre 2.100 y 3.345, indican el número de taxones diferentes presentes en las muestras. El índice Chao1, que oscila entre 2114 y 3362, similar al de las OTU observadas, indica una gran riqueza de especies en la comunidad microbiana, pero también tiene en cuenta las especies raras. Para todos los índices de diversidad, la muestra S1-1 fue la más diversa, identificada como PP. La

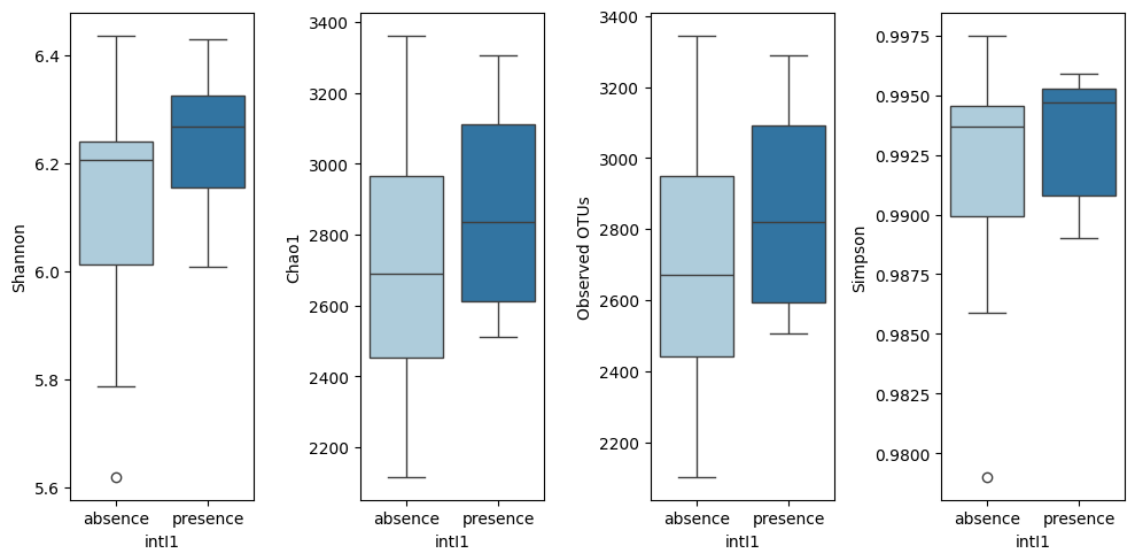
muestra S1-3 fue la menos diversa en el índice Chao1 y OTU observadas, y la S2-1 en los índices de Shannon y Simpson, ambas identificadas como HDPE.

Se realizó la prueba H de Kruskal-Wallis comparando los índices entre sitios, obteniéndose los siguientes valores p : Índice de Shannon ($p = 0,296665$), índice de Simpson ($p = 0,481842$), OTU observadas ($p = 0,275122$) y Chao1 ($p = 0,275122$). No hubo pruebas suficientes de diferencias significativas entre la diversidad de los distintos sitios (utilizando un intervalo de confianza del 95 %, $p < 0,05$).

También se analizaron los índices de diversidad alfa agrupando las muestras según la presencia o ausencia del gen *intl1* (Figura 6b), y se comprobaron las diferencias significativas mediante la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de dos muestras independientes, obteniéndose los respectivos valores p : Shannon (estadístico = 25,0, valor $p = 0,335$), Simpson': (estadístico = 26,0, valor $p = 0,385$), OTUs observadas (estadístico = 26,0, valor $p = 0,385$), y Chao1 (estadístico = 26,0, valor $p = 0,385$). También se observó que no había diferencias significativas en la diversidad entre las muestras con y sin *intl1*.



(a)



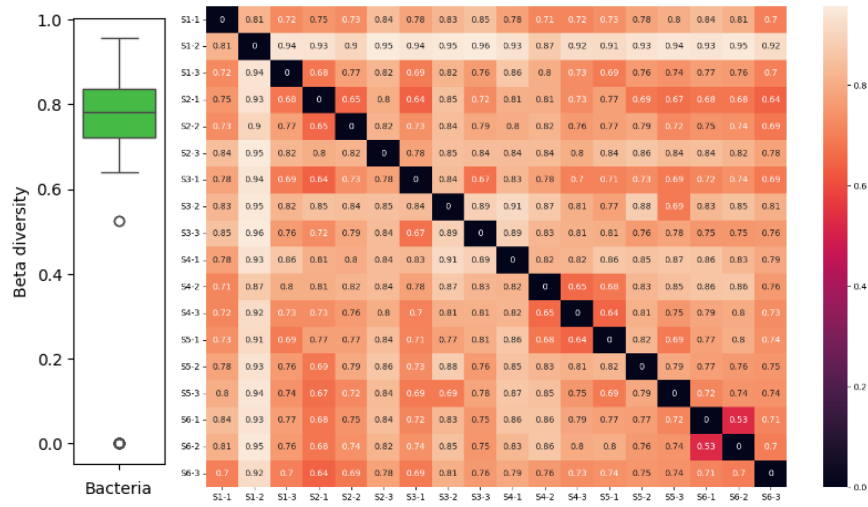
(b)

Figura 6: Índices Shannon, Chao1, Observed OTUs y Simpson (a) para cada sitio y (b) agrupados de acuerdo a la presencia o ausencia del gen *int1*.

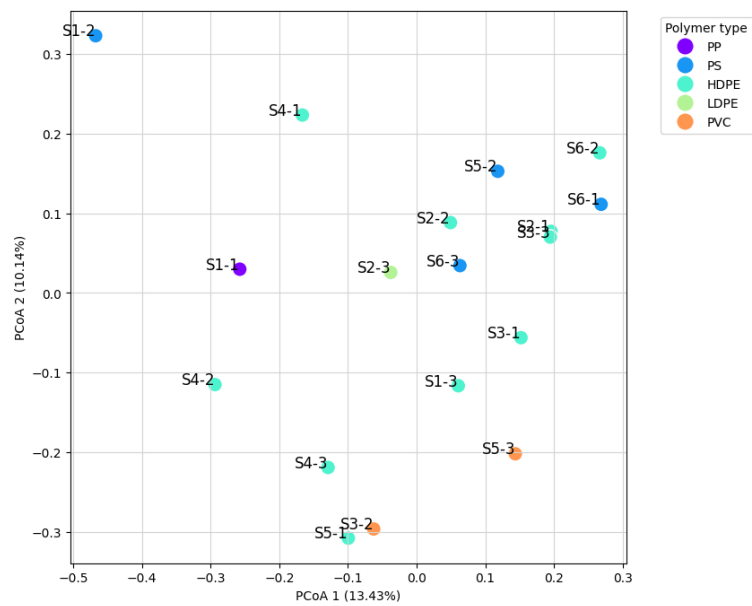
Para la diversidad beta, se calculó la distancia Bray-Curtis basándose en las UOT, lo que mostró que las muestras más similares eran S6-1 (PS) y S6-2 (HDPE); sin embargo, en general, los valores de la distancia calculada eran

altos, lo que indicaba que las abundancias de las OTUs de las muestras no eran similares, como puede verse en la Figura 7a.

El PCoA se realizó para visualizar la similitud o disimilitud de los datos, reduciéndolos a dos dimensiones: PCoA1 (que explica el 13,4% de la varianza) y PCoA2 (que explica el 10,1% de la varianza). Podemos observar un grupo formado por muestras compuestas de PS y HDPE (Figura 7b). Teniendo en cuenta que esta reducción dimensional explicaba sólo el 23,57 % de la varianza, se realizó un PERMANOVA para complementar el análisis, obteniendo un estadístico de 1,178 y un valor p de 0,09, lo que indica que no hay pruebas suficientes para concluir que existen diferencias significativas en la comunidad por tipo de polímero ($p < 0,05$). El mismo análisis se realizó agrupando las muestras por sitio, obteniéndose un estadístico de 1,250 y un valor p de 0,007, lo que indica que hay pruebas suficientes para concluir que existen diferencias significativas entre las comunidades de los distintos sitios.



(a)



(b)

Figura 7: (a) Matriz de disimilitud utilizando la distancia de Bray-Curtis entre muestras (b) PCoA de las distintas muestras y de acuerdo a los distintos tipos de plásticos (distintos colores).

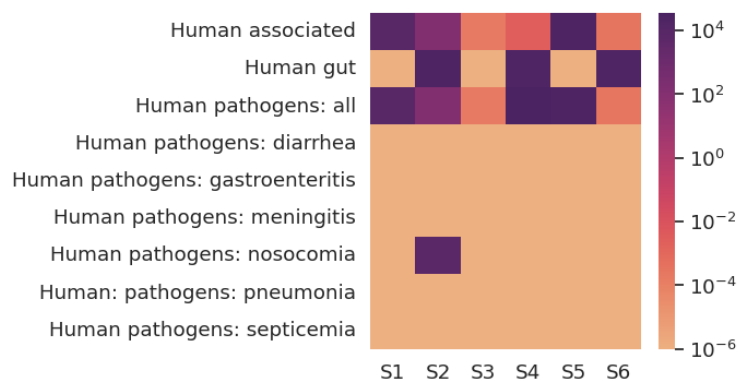
4.5 Predicción funcional

La predicción metabólica mediante el software Faprotax reveló diversas características funcionales. La Fig. 7 muestra la abundancia de funciones bacterianas relacionadas con la salud humana (Fig. 8a) y el metabolismo ecológico (Fig. 8b).

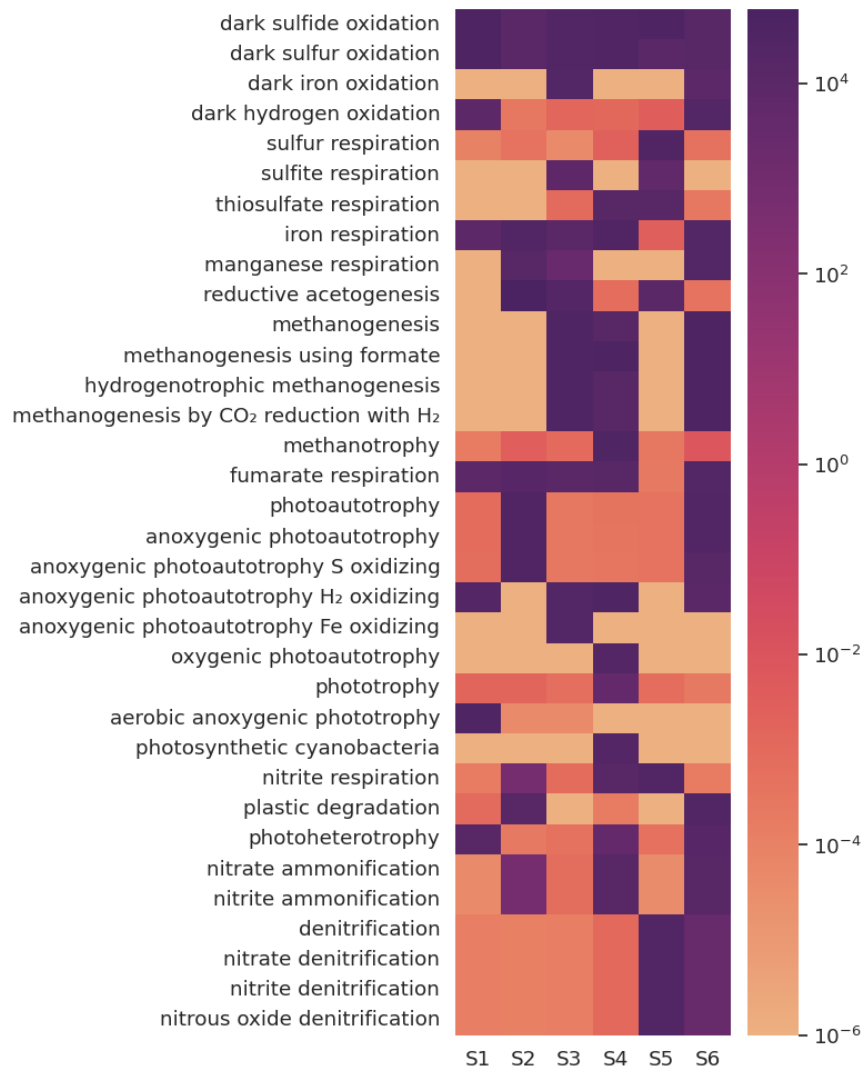
En cuanto a salud humana, destacamos la abundancia de bacterias asociadas a patógenos humanos en la mayoría de las muestras, incluidas S1-3 (HDPE), S4-2 (HDPE), S4-3 (HDPE) y S5-1 (HDPE), y bacterias relacionadas con infecciones nosocomiales en una muestra (S2-2, HDPE). Observamos una mayor abundancia de Actinobacterias (56 %) y Chloroflexi (4,4 %) que la media de todas las muestras (47,9 % y 3,5 %, respectivamente) a nivel de filo, y una mayor abundancia de *Nocardioides* (7.3 %), *Mycobacterium* (2,5 %), *Arthrobacter* (2,4 %) y *Rhodococcus* (3,4 %) que la media (6,3 %, 0,7 %, 0,7 % y 0,4 %, respectivamente) a nivel de género.

La predicción del metabolismo ecológico para la oxidación microbiana del azufre destacó en los seis sitios en las muestras S1-1 (PP), S1-3 (HDPE), S2-1 (HDPE), S3-3 (HDPE), S4-2 (HDPE), S5-1 (HDPE), S5-2 (PS) y S6-3 (PS). En cuanto al metabolismo relacionado con la metanogénesis, destacan las muestras de los sitios S3, S4 y S6. En algunas de estas muestras, observamos una abundancia superior a la media del filo Proteobacteria en S3-1 (17,9 %) y S6-1 (26,2 %) (media 13,8 %), y de Acidobacteria en S3-1 (3,0 %), S4-3 (3,1 %), S6-1 (5,4 %) y S6-2 (3,7 %) (media 2,4 %).

En varias muestras se observaron funciones ecológicas del metabolismo relacionado con la metanogénesis, el metabolismo del azufre y las vías de degradación del plástico. Concretamente, el metabolismo relacionado con la metanogénesis se observó en algunas muestras, el metabolismo del azufre estuvo presente en todos los sitios y las vías de degradación del plástico en cuatro sitios (S1, S2, S4, y S6). Sólo dos sitios (S2 y S6) mostraron metabolismo fotoautótrofo. Los procesos metabólicos de respiración de hierro y manganeso implican la utilización de estos metales como aceptores de electrones en la respiración anaeróbica. La amonificación de nitrato y nitrito se observó en los sitios S2, S4 y S6, mientras que la desnitrificación fue altamente prevalente en los sitios S5 y S6.



(a)



(b)

Figura 8: Funciones metabólicas basadas en asignación taxonómica usando Faportax (a) Predicción de funciones asociadas a salud humana (b) Funciones ecológicas asociadas a metabolismo.

5. DISCUSIÓN

Entre los diversos tipos de polímeros encontrados en las muestras mediante análisis FTIR, la gran mayoría se identificaron como HDPE. Aunque esto indica una prevalencia significativa de residuos plásticos en las muestras, la gran heterogeneidad de los residuos en los vertederos dificulta la extracción de conclusiones que puedan generalizarse y representar con exactitud la composición de los residuos de vertedero. En comparación, los datos sobre la identificación de MP en diferentes lixiviados de vertederos de China, Indonesia, Francia, Finlandia, Noruega e Islandia, donde se han identificado más de 28 tipos de polímeros, indican que el LDPE, el HDPE, el PS, el PP, el PVC y el PET son los polímeros plásticos más abundantes en los lixiviados de vertederos de todo el mundo (Kabir et al., 2023). Dado que encontramos cinco de los seis plásticos más comunes y que la fabricación de PET es la más reciente, nuestros datos concuerdan con esta información.

Las imágenes microscópicas proporcionan una visión de la superficie de las partículas de plástico y de los microorganismos que pueden encontrarse en ella. En un estudio realizado en un medio terrestre (Gkoutselis et al., 2021) se obtuvieron imágenes de SEM que mostraban la colonización de MP por hongos filamentosos, pero no por levaduras, lo que sugiere que algunos hongos están mejor adaptados a la vida en superficies de plástico. En residuos de PE obtenidos de un vertedero abandonado en Italia, el análisis SEM de

todos los plásticos mostró la adhesión de células procariontas en forma de bacilo morfológicamente diversas (Puglisi et al., 2019), lo que coincide con nuestros resultados de que se encontraron bacterias en forma de bacilo en la mayoría de las muestras. Además, mencionaron que *Bacillus* es el género predominante en sus muestras (10 - 50 %), capaz de degradar algunos colorantes presentes en el plástico.

El análisis de las secuencias del gen 16S rRNA, seguido de la aproximación metagenómica, reveló una presencia significativa de Actinobacterias, Firmicutes y Proteobacterias a nivel de filo, así como de *Nocardioides*, *Streptomyces*, *Gaiella*, *Actinomadura*, *Solirubrobacter* y *Bacillus* a nivel de género. Como se ha mencionado anteriormente, en el estudio de Puglisi et al. (2019) había un predominio del género *Bacillus*, y aunque nosotros encontramos un predominio de bacterias con forma de bacilo, este análisis mostró una abundancia solo de un 0,22 - 5,36 % del género *Bacillus*.

Dado que Actinobacteria es un filo prevalente de bacterias del suelo, no fue sorprendente encontrarlo en nuestras muestras. Esto incluye el género *Streptomyces*, que puede existir en estado latente en el suelo en forma de artrosporas y clamidosporas (Kurtböke, 2017). Soleimani et al., (2021) evaluaron la biodegradación del LDPE por aislados bacterianos de películas de LDPE en diferentes vertederos y descubrieron que *Streptomyces*, *Nocardia* y *Rhodococcus* eran capaces de biodegradar. Esto puede explicar la mayor abundancia de este género en nuestras muestras.

El estudio de Chung et al. (2022) mencionado anteriormente, de un vertedero abandonado de 20 años de antigüedad, halló un enriquecimiento de Firmicutes, Planctomycetes y Actinobacteria a nivel de filo en el plástico, y géneros de los grupos *Bradyrhizobiaceae*, *Pseudarthrobacter*, *Myxococcales*, *Sphingomonas* y *Spartobacteria*. Encontramos una gran abundancia de Actinobacteria y Firmicutes, pero el tercer filo predominante fue Proteobacteria y una baja abundancia de Planctomycetes (media del 0,1%).

La presencia de Firmicutes no es sorprendente, ya que muchos géneros pertenecientes a este filo pueden adaptarse a su entorno mediante estrategias de supervivencia como la capacidad de producir esporas que confieren resistencia a condiciones subóptimas y extremas como la desecación. Un estudio sugirió que múltiples factores ambientales extremos favorecen la prevalencia de Firmicutes productores de endosporas (Filippidou et al., 2016).

A diferencia de los experimentos de aislamiento comentados anteriormente (Munir et al., 2022), que revelaron el predominio de bacterias gramnegativas, nuestros resultados no coinciden. Si consideramos los filos más abundantes y los dividimos en bacterias grampositivas y gramnegativas, observamos un predominio del 71 % de bacterias grampositivas. En particular, sólo una pequeña fracción de las bacterias puede cultivarse (Lewis et al., 2021), y el enfoque molecular es más convincente para estudiar la comunidad microbiana y puede indicar la presencia de muchos más taxones bacterianos que no pueden cultivarse o tienen requisitos nutricionales especiales o desconocidos que no se tuvieron en cuenta en los experimentos de aislamiento.

Rohrbach et al. (2022) incubaron partículas de plástico en suelo de vertedero durante 14 meses y descubrieron que los filos predominantes eran Proteobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes y Actinobacteria. Además, se comprobó que el tiempo afectaba positivamente a la diversidad de alfa (Shade et al., 2012). En el experimento de microcosmos realizado por Zhu et al., (2022), el índice de Shannon en las muestras de plástico osciló entre 7,6 y 8,4 y no fue significativamente diferente entre los distintos plásticos de diversos ambientes suelo. Este índice es superior al nuestro, pero debemos señalar que sus muestras se incubaron en distintos tipos de suelo y no en un vertedero.

De un vertedero, encontramos un estudio de Chukwuma et al. (2021) realizado en Malasia, un vertedero municipal de residuos sólidos, donde analizaron la comunidad microbiana de los sedimentos. Los índices de diversidad alfa obtenidos fueron Shannon (entre 3.52-4.59), Simpson (0.91-0.97), OTU observadas (512-1253) y Chao1 (538-1316). Estos índices fueron muy inferiores a nuestros resultados en términos de diversidad, uniformidad y riqueza.

Se ha sugerido que los índices de diversidad alfa más altos están implicados en la resistencia, resiliencia y redundancia funcional de las comunidades microbianas (Shade et al., 2012). Nuestro sitio de estudio se encuentra en un lugar con una amplitud térmica anual de 30 °C, ha sido afectado por inundaciones, tsunamis, entre otros factores ambientales extremos, que pueden afectar la composición de las comunidades microbianas.

La disimilitud en abundancia entre las muestras, indicada por el análisis de diversidad beta basado en la distancia Bray-Curtis, indicó una gran diferencia en la comunidad bacteriana entre las muestras y fue confirmada por pruebas estadísticas, lo que tiene sentido, ya que durante el proceso de muestreo fue posible observar una gran heterogeneidad en los residuos expuestos en el perfil del vertedero. El PCoA mostró un grupo formado por muestras de HDPE y PS, claramente separadas de las muestras de PP y PVC, pero también encontramos muestras dispersas de HDPE y PS fuera de este grupo. Esta agrupación no fue suficiente para obtener diferencias significativas en la composición microbiana a partir de nuestros datos. Como se ha mencionado anteriormente (Rohrbach et al., 2022; Zhu et al., 2022), se encontraron diferentes composiciones microbianas en distintos tipos de polímeros, pero estos estudios se realizaron en un entorno más controlado (incubación en vertedero y microcosmos, respectivamente). Se necesitan más estudios para confirmar esta diferencia en residuos plásticos reales.

El gen *intl1* se identificó en cuatro de los seis sitios, y se determinó estadísticamente que no existe evidencia suficiente para determinar una relación entre el tipo de plástico y la presencia del gen *intl1*. Como ya se ha mencionado, el gen *intl* se ha observado en miembros de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Salmonella* (Akrami et al., 2019), y en todos los miembros del filo Proteobacteria, que se observaron en gran medida en las muestras analizadas. De estos géneros mencionados, *Acinetobacter* se encontró en tres muestras (S2-2, S4-1, y S5-1), y *Acinetobacter*

radioresistens se encontró en S2-2. Esta especie se aísla normalmente de fuentes ambientales y forma parte del microbioma sano de la piel humana, pero se ha encontrado anteriormente en ambientes extremos debido a su resistencia a la radiación, y portadora de múltiples genes de resistencia a los antibióticos (Opazo-Capurro et al., 2019). El género *Pseudomonas* se encontró en 11 muestras, siendo *Pseudomonas stutzeri* la más abundante y presente en los seis sitios. *Pseudomonas stutzeri* es una bacteria ampliamente distribuida en el medio ambiente, un patógeno humano oportunista tolerante a los metales pesados, competente en la transformación y con una gran diversidad de MGE (de Sousa, 2020).

Cuetero-Martínez et al. (X. Li et al., 2021) hallaron que la abundancia de *intl1* correlacionaba positivamente con *sul1* y las betalactamasas OXA-10 y *cphA-02* en plantas de tratamiento de aguas residuales. En (Zheng et al., 2020), encontraron muchas correlaciones positivas entre el gen clínico *inti1* y los genes de resistencia a aminoglucósidos y betalactámicos, junto con *qacEdelta* que confiere resistencia a antisépticos, en una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. X. Li et al. (2021) descubrieron que *intl1* estaba positivamente relacionado con *mexF*, *sul1*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}* en procesos de biotratamiento de lixiviados de residuos alimentarios. En una revisión reciente (J. et al., 2024) sobre genes de resistencia a antibióticos como contaminantes emergentes en lixiviados de vertederos, se encontraron ARGs y sus MGEs asociados en varios países donde el gen *intl1* está asociado con resistencia a beta-lactámicos, tetraciclinas, macrólidos, sulfonamidas y fluoroquinolonas,

incluyendo los genes *sul1*, *sul2*, *blaNMD1*, *blaKPC*, *blaCTX*, *dfrA*, *aac6*, *tetO*, *qnrA* y *ermB*.

Aunque encontramos el gen *int11* clínico en el 67 % de los sitios, esto indica que estos plásticos portan predominantemente genes de resistencia de fuentes antropogénicas, dispersándolos en el medio ambiente cercano, incluidos humedales y océanos, y entrando en contacto con la fauna silvestre.

Los resultados de la predicción funcional relacionados con la salud humana destacaron la abundancia de bacterias asociadas a patógenos humanos en varias muestras y de bacterias relacionadas con infecciones nosocomiales en una muestra. Si complementamos esta información con la presencia positiva del indicador *int11* de ARGs en cuatro de los seis sitios, podemos tener una combinación de preocupación clínica.

6. CONCLUSIONES

Este estudio proporciona información importante sobre las comunidades microbianas asociadas a los residuos plásticos en vertederos terrestres. Examinamos muestras de plástico de un vertedero de 40 años de antigüedad. Se identificaron los tipos de plástico de las muestras (PS, PVC, HDPE, LDPE y PE) y se observaron las comunidades microbianas de la plastisfera en la mayoría de las muestras. Se documentó la presencia de diversos microorganismos en estas superficies y un predominio de Actinobacterias y Firmicutes, con los géneros *Nocardioides*, *Streptomyces* y *Gaiella* mayormente representados. Los resultados sugieren una ligera diferencia en la plastisfera entre los tipos de polímeros al observar la diversidad beta, pero su análisis estadístico indica que no existe suficiente evidencia para que esta diferencia sea significativa, por lo que se rechaza la hipótesis propuesta de que existe un efecto del tipo de plástico sobre la comunidad microbiana.

La detección del gen *int11* indica la probable presencia de genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica humana en el plástico del vertedero, lo que supone un riesgo ecológico de exposición a este tipo de residuos en la zona afectada, con especial preocupación por la propagación de genes de resistencia a los alrededores. El análisis de los resultados no entregan evidencia suficiente para concluir una efecto del tipo de polímero en la presencia de genes de resistencia, por lo que esta hipótesis también es rechazada. Este estudio amplía nuestra comprensión de la plastisfera en entornos terrestres, destacando la importancia de considerar las interacciones

microbianas con los residuos plásticos y sus implicaciones medioambientales, ecológicas, y en la salud humana y animal. Además, refuerza la necesidad de realizar investigaciones bajo un enfoque de "*One Health*".

BIBLIOGRAFÍA

- Akrami, F., Rajabnia, M., & VazifeSirzari, I. (2019). Resistance integrons. Mini review. *Caspian Journal of Internal Medicine*, *10*(4).
<https://doi.org/10.22088/cjim.10.4.370>
- Ali, N., Lin, Y., Qing, Z., Xiao, D., Ud Din, A., Ali, I., Lian, T., Chen, B., & Wen, R. (2020). The Role of Agriculture in the Dissemination of Class 1 Integrons, Antimicrobial Resistance, and Diversity of Their Gene Cassettes in Southern China. *Genes*, *11*(9), 1014.
<https://doi.org/10.3390/genes11091014>
- Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., & Mincer, T. J. (2020). Ecology of the plastisphere. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(3), 139–151.
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0308-0>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Cheng, Y., Lu, J., Fu, S., Wang, S., Senehi, N., & Yuan, Q. (2022). Enhanced propagation of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in municipal wastewater by microplastics. *Environmental Pollution*, *292*, 118284. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118284>
- Chow, J., Perez-Garcia, P., Dierkes, R., & Streit, W. R. (2023). Microbial enzymes will offer limited solutions to the global plastic pollution crisis. *Microbial Biotechnology*, *16*(2), 195–217. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14135>
- Chukwuma, O. B., Rafatullah, M., Tajarudin, H. A., & Ismail, N. (2021). Bacterial Diversity and Community Structure of a Municipal Solid Waste Landfill: A Source of Lignocellulolytic Potential. *Life*, *11*(6), 493.
<https://doi.org/10.3390/life11060493>
- Chung, J., Yeon, J., Seong, H. J., An, S.-H., Kim, D.-Y., Yoon, Y., Weon, H.-Y., Kim, J. J., & Ahn, J.-H. (2022). Distinct Bacterial and Fungal Communities Colonizing Waste Plastic Films Buried for More Than 20 Years in Four Landfill Sites in Korea. *Journal of Microbiology and*

- Biotechnology*, 32(12), 1561–1572.
<https://doi.org/10.4014/jmb.2206.06021>
- Cytryn, E. (2013). The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemistry*, 63, 18–23.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.03.017>
- de Sousa, L. P. (2020). Mobile Genetic Elements in *Pseudomonas stutzeri*. *Current Microbiology*, 77(2), 179–184. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01812-7>
- Filippidou, S., Wunderlin, T., Junier, T., Jeanneret, N., Dorador, C., Molina, V., Johnson, D. R., & Junier, P. (2016). A Combination of Extreme Environmental Conditions Favor the Prevalence of Endospore-Forming Firmicutes. *Frontiers in Microbiology*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01707>
- Gkoutselis, G., Rohrbach, S., Harjes, J., Obst, M., Brachmann, A., Horn, M. A., & Rambold, G. (2021). Microplastics accumulate fungal pathogens in terrestrial ecosystems. *Scientific Reports*, 11(1), 13214.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-92405-7>
- Hasan, T. H., & Al-Harmoosh, R. A. (2020). Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Sys Rev Pharm*, 11(6), 817–823.
- He, P., Chen, L., Shao, L., Zhang, H., & Lü, F. (2019). Municipal solid waste (MSW) landfill: A source of microplastics? -Evidence of microplastics in landfill leachate. *Water Research*, 159, 38–45.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.060>
- Hunter, J. D. (2007). Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering*, 9(03), 90–95.
<https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>
- International Solid Waste Association. (2024). *Global waste management outlook 2024: beyond an age of waste, turning rubbish into a resource*.
- J., J. D., V., V., P., R., S., R., & R., B. (2024). Antibiotic Resistance Genes – An Emerging Genetic Pollutant of LFL. *Water, Air, & Soil Pollution*, 235(6), 348. <https://doi.org/10.1007/s11270-024-07172-8>
- Jara Henríquez, D. A. (2018). *Diversidad de genes de resistencia a antibióticos en muestras de agua dulce de zonas con diferente grado de intervención humana en Península Fildes, Isla Rey Jorge, Antártica*. Universidad de Concepción.

- Junaid, M., Liu, S., Liao, H., Liu, X., Wu, Y., & Wang, J. (2022). Wastewater plastisphere enhances antibiotic resistant elements, bacterial pathogens, and toxicological impacts in the environment. *Science of The Total Environment*, *841*, 156805.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156805>
- Kabir, M. S., Wang, H., Luster-Teasley, S., Zhang, L., & Zhao, R. (2023). Microplastics in landfill leachate: Sources, detection, occurrence, and removal. *Environmental Science and Ecotechnology*, *16*, 100256.
<https://doi.org/10.1016/j.es.2023.100256>
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(12), 2089–2093.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kurtböke, D. İ. (2017). Ecology and Habitat Distribution of Actinobacteria. In J. Wink, F. Mohammadipanah, & J. Hamedí (Eds.), *Biology and Biotechnology of Actinobacteria* (pp. 123–149). Springer International Publishing. http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-60339-1_6
- Larsson, D. G. J., & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(5), 257–269.
<https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Lewis, W. H., Tahon, G., Geesink, P., Sousa, D. Z., & Ettema, T. J. G. (2021). Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(4), 225–240. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00458-8>
- Li, C., Wang, L., Ji, S., Chang, M., Wang, L., Gan, Y., & Liu, J. (2021). The ecology of the plastisphere: Microbial composition, function, assembly, and network in the freshwater and seawater ecosystems. *Water Research*, *202*, 117428. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117428>
- Li, Q., Tian, L., Cai, X., Wang, Y., & Mao, Y. (2022). Plastisphere showing unique microbiome and resistome different from activated sludge. *Science of The Total Environment*, *851*, 158330.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158330>
- Li, X., Wang, P., Chu, S., Su, Y., Wu, D., & Xie, B. (2021). The variation of antibiotic resistance genes and their links with microbial communities during full-scale food waste leachate biotreatment processes. *Journal of*

Hazardous Materials, 416, 125744.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125744>

Lin, X., Wang, S., Ni, R., & Song, L. (2023). New insights on municipal solid waste (MSW) landfill plastisphere structure and function. *Science of The Total Environment*, 888, 163823.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163823>

Louca, S., Parfrey, L. W., & Doebeli, M. (2016). Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. *Science*, 353(6305), 1272–1277. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4507>

Lu, X.-M., Lu, P.-Z., & Liu, X.-P. (2020). Fate and abundance of antibiotic resistance genes on microplastics in facility vegetable soil. *Science of The Total Environment*, 709, 136276.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136276>

MacFarland, T. W., & Yates, J. M. (2016). Mann–Whitney U Test. In *Introduction to Nonparametric Statistics for the Biological Sciences Using R* (pp. 103–132). Springer International Publishing.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-30634-6_4

Mecozzi, M., Pietroletti, M., & Monakhova, Y. B. (2016). FTIR spectroscopy supported by statistical techniques for the structural characterization of plastic debris in the marine environment: Application to monitoring studies. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1–2), 155–161.

<https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2016.03.012>

Munir, E., Suryanto, D., Pasaribu, Y., Mubtasima, S., Hartanto, A., Lutfia, A., & Nasution, A. F. (2022). Occurrence of microbial community on plastic wastes in Terjun Landfill, North Sumatra. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1115(1), 012080.

<https://doi.org/10.1088/1755-1315/1115/1/012080>

Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Onda, D. F. L., & Sharief, K. M. (2021). Identification of Microorganisms Related to Microplastics. In T. Rocha-Santos, M. Costa, & C. Mouneyrac (Eds.), *Handbook of Microplastics in the Environment* (pp. 1–34).

Springer International Publishing. http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-10618-8_40-1

- Opazo-Capurro, A., Higgins, P. G., Wille, J., Seifert, H., Cigarroa, C., González-Muñoz, P., Quezada-Aguiluz, M., Domínguez-Yévenes, M., Bello-Toledo, H., Vergara, L., & González-Rocha, G. (2019). Genetic Features of Antarctic *Acinetobacter radioresistens* Strain A154 Harboring Multiple Antibiotic-Resistance Genes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00328>
- Ortiz Soazo, P., Jara Fernández, F., & Sanhueza Bravo, K. (2022). *Informe monitoreo de Avifauna en el Sitio Prioritario de Conservación Humedal Rocuant-Andalién, Vasco Da Gama, Paicaví-Tucapel bajo*.
- Ostertagová, E., Ostertag, O., & Kováč, J. (2014). Methodology and Application of the Kruskal-Wallis Test. *Applied Mechanics and Materials*, 611, 115–120. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.611.115>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Puglisi, E., Romaniello, F., Galletti, S., Boccaleri, E., Frache, A., & Cocconcelli, P. S. (2019). Selective bacterial colonization processes on polyethylene waste samples in an abandoned landfill site. *Scientific Reports*, 9(1), 14138. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50740-w>
- Reynolds, C., & Ryan, P. G. (2018). Micro-plastic ingestion by waterbirds from contaminated wetlands in South Africa. *Marine Pollution Bulletin*, 126, 330–333. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.021>
- Rohrbach, S., Gkoutselis, G., Hink, L., Weig, A. R., Obst, M., Diekmann, A., Ho, A., Rambold, G., & Horn, M. A. (2022). Microplastic polymer properties as deterministic factors driving terrestrial plastisphere microbiome assembly and succession in the field. *Environmental Microbiology*, 1462-2920.16234. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16234>
- Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H., Huber, D. H., Langenheder, S., Lennon, J. T., Martiny, J. B. H., Matulich, K. L., Schmidt, T. M., & Handelsman, J. (2012). Fundamentals of Microbial Community Resistance and Resilience. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417>

- Shi, X., Chen, Z., Wei, W., Chen, J., & Ni, B.-J. (2023). Toxicity of micro/nanoplastics in the environment: Roles of plastisphere and eco-corona. *Soil & Environmental Health*, 1(1), 100002. <https://doi.org/10.1016/j.seh.2023.100002>
- Soleimani, Z., Gharavi, S., Soudi, M., & Moosavi-Nejad, Z. (2021). A survey of intact low-density polyethylene film biodegradation by terrestrial Actinobacterial species. *International Microbiology*, 24(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s10123-020-00142-0>
- Tursi, A., Baratta, M., Easton, T., Chatzisyneon, E., Chidichimo, F., De Biase, M., & De Filpo, G. (2022). Microplastics in aquatic systems, a comprehensive review: origination, accumulation, impact, and removal technologies. *RSC Advances*, 12(44), 28318–28340. <https://doi.org/10.1039/D2RA04713F>
- United Nations Environment Programme. (2023). *Our planet is choking on plastic*.
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., Van Der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K. J., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., ... Vázquez-Baeza, Y. (2020). SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods*, 17(3), 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
- Wang, C., Wang, L., Ok, Y. S., Tsang, D. C. W., & Hou, D. (2022). Soil plastisphere: Exploration methods, influencing factors, and ecological insights. *Journal of Hazardous Materials*, 430, 128503. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128503>
- Western Hemisphere Shorebird Reserve Network. (2023). *Playa Isla de los Reyes Rocuant*.
- Western Hemisphere Shorebird Reserve Network. (2023). *Playa Isla de los Reyes Rocuant se Convierte en el Octavo sitio RHRAP de Chile*.
- Xia, Y., & Sun, J. (2023). Beta Diversity Metrics and Ordination. In *Bioinformatic and Statistical Analysis of Microbiome Data* (pp. 335–395). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-21391-5_10
- Zhang, S., Liu, X., Qiu, P., Chen, B., Xu, C., Dong, W., & Liu, T. (2022). Microplastics can selectively enrich intracellular and extracellular

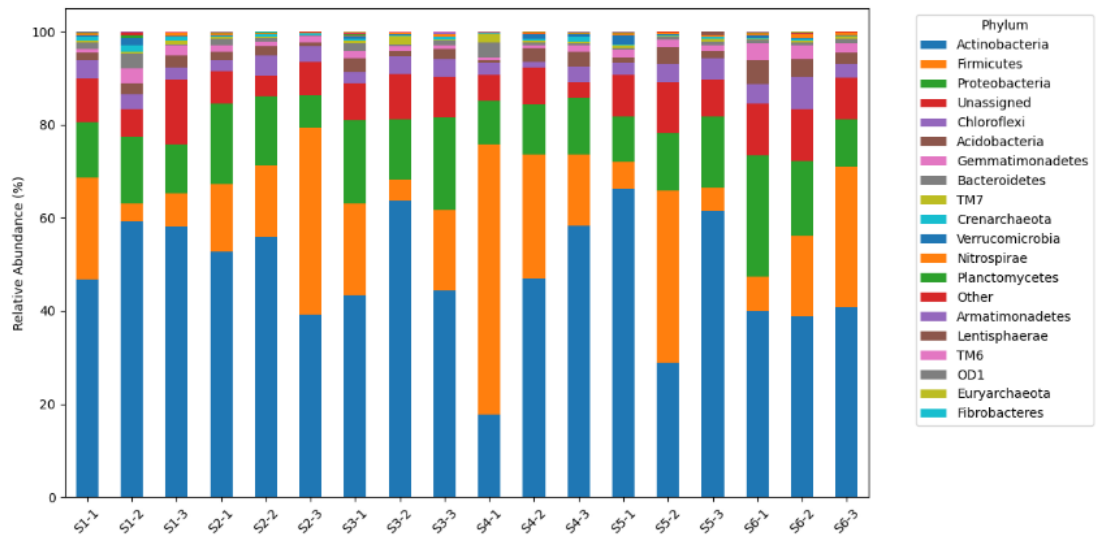
antibiotic resistant genes and shape different microbial communities in aquatic systems. *Science of The Total Environment*, 822, 153488. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153488>

Zheng, W., Huan, J., Tian, Z., Zhang, Y., & Wen, X. (2020). Clinical class 1 integron-integrase gene – A promising indicator to monitor the abundance and elimination of antibiotic resistance genes in an urban wastewater treatment plant. *Environment International*, 135, 105372. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105372>

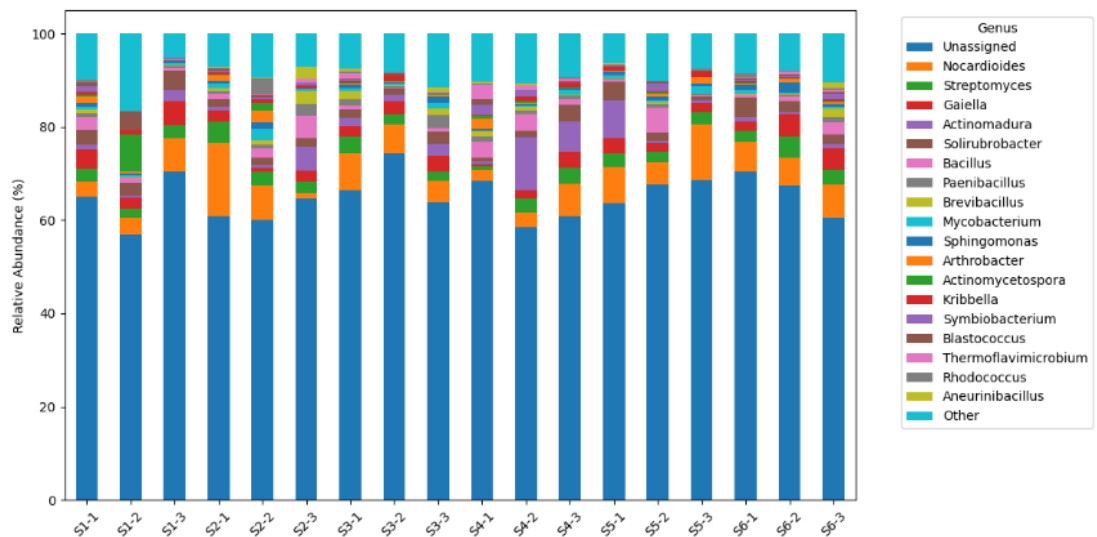
Zhu, D., Ma, J., Li, G., Rillig, M. C., & Zhu, Y.-G. (2022). Soil plastispheres as hotspots of antibiotic resistance genes and potential pathogens. *The ISME Journal*, 16(2), 521–532. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01103-9>

ANEXOS

Abundancia relativa de filos y género en todas las muestras.



(a)



(b)

Figura A1: Abundancia relativa de filos (a) y géneros (b) identificados de cada muestra.