

Proteómica comparativa de cepas fúngicas nativas degradadoras de plástico como herramienta en  
la identificación de enzimas de interés biotecnológico

María Andrea Reyes Reyes

Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Microbiología

Directora

Clara Inés Sánchez Suárez

PhD. en Microbiología y Genética Molecular

Codirector

William Fernando Hidalgo Bucheli

PhD. en Ciencias Naturales

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2025

## **Dedicatoria**

*A mis papás, por su apoyo y amor incondicional.*

### **Agradecimientos**

A Dios, por guiarme y fortalecerme en cada paso de este camino.

A mis padres, Daniel Reyes y Claudia Reyes, y a mis hermanos, quienes han sido mi mayor motivación y apoyo incondicional. Gracias por su amor infinito y por ser la fuerza que me impulsa a seguir adelante cada día.

A mi directora, Clara Sánchez, por transmitirme su pasión por la micología desde el pregrado, por su apoyo constante y por convertirse en una segunda mamá durante este proceso.

Al Doctor Jorge Hernando Panqueva, director de la Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC), por confiar en mis capacidades y mi palabra. Gracias por darme la oportunidad y el tiempo para realizar mi maestría, por estar siempre pendiente de mi formación profesional, educativa y personal, así como de mi bienestar.

A mi codirector, William Hidalgo, por su disposición, guía y valiosos aportes durante el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Industrial de Santander (UIS), por permitirme formar parte de su comunidad educativa. Por su apoyo en esta investigación, financiada bajo el código 3942 del programa titulado “OMICPLAST: Integración de tecnologías ómicas en el estudio de la biotransformación de plásticos utilizando hongos nativos de alto potencial biotecnológico” y por el privilegio de ser beneficiaria del proyecto “Formación de Capital Humano de Alto Nivel para el Departamento de Santander en la Universidad Industrial de Santander”, con código BPIN 2020000100536.

A todo el personal de la CIC, especialmente a Ronald Rueda, por su apoyo y motivación.

A los profesores Enrique Mejía y Sergio Marchant por su orientación en la parte química y bioinformática respectivamente.

A Yuly Prada y María Paula Turizo por su generosidad y ayuda en el mundo de las proteínas.

A mi querida profesora Carolina Guzmán, por enseñarme la importancia de la microbiología ambiental y su potencial biotecnológico desde el pregrado.

A mis compañeros de la maestría, especialmente a Laura Vargas y William Chaparro, por tenerme paciencia y ayudarme en este proceso de aprendizaje.

A mis compañeras del programa OMICPLAST, Silvia Corrales y María Atehortua, por su disposición siempre a ayudarme cuando más lo necesité.

A mis estudiantes que ahora son colegas, especialmente a Harrison Villamizar, Kewin Hernández y Brayan Vergel.

A mi mejor amiga Pauli Cuadros, por estar siempre tan pendiente y motivarme cada día con los mensajes lindos de mi ahijadita Ana Paulita.

A Miguel Ángel, por aparecer en el momento preciso y brindarme apoyo constante durante toda la maestría. Gracias por ayudarme a superar cada reto con paciencia.

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	12
1. Problema de investigación y justificación .....	13
2. Objetivos .....	18
2.1 Objetivo general .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
3. Marco conceptual y estado del arte .....	19
4. Metodología .....	35
5. Resultados .....	44
6. Discusión .....	70
7. Conclusiones .....	82
8. Recomendaciones .....	84
Referencias Bibliográficas .....	86
Apéndices .....	108

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1 <i>Estadísticas de Nanoplot de las lecturas de las cepas de Fusarium con Nanopore</i> .....	46
Tabla 2 <i>Información estadística del ensamblaje del genoma de las cepas de Fusarium</i> .....	47
Tabla 3 <i>Información estadística del ensamblaje del genoma de FOCIC01 con Flye+Medaka</i> ..	49
Tabla 4 <i>Enzimas asociadas a biodegradación de plásticos</i> .....	53
Tabla 5 <i>Laccasas extracelulares EC1.10.3.2 en las cepas de Fusarium oxysporum evaluadas</i> .	54
Tabla 6 <i>Peroxidasa extracelular en las cepas de Fusarium oxysporum evaluadas</i> .....	56
Tabla 7 <i>Cutinasas extracelulares en las cepas de Fusarium evaluadas</i> .....	57
Tabla 8 <i>Modelamiento de enzimas de interés biotecnológico en la biodegradación de plásticos</i> .....	60
Tabla 9 <i>Proteínas identificadas mediante Mascot del montaje LDPE+FO</i> .....	69

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
Figura 1 <i>Microplásticos y macroplásticos como contaminantes en el medio ambiente</i> .....	16
Figura 2 <i>Tuberías de polietileno biodegradadas por hongos filamentosos en Colombia</i> .....	17
Figura 3 <i>Producción de plásticos (polímeros sintéticos) a nivel mundial</i> .....	20
Figura 4 <i>Microplásticos de tipo primario</i> .....	21
Figura 5 <i>Esquema del proceso de biodegradación de plásticos</i> .....	24
Figura 6 <i>Filogenia de los genomas del complejo <i>Fusarium oxysporum</i></i> .....	29
Figura 7 <i>Nutrición saprófita de <i>Fusarium oxysporum</i></i> .....	30
Figura 8 <i>Reactivación de cepas fúngicas del género <i>Fusarium</i></i> .....	45
Figura 9 <i>Crecimiento de las cepas fúngicas en medio líquido para extracción de ADN</i> .....	46
Figura 10 <i>Alineamiento de las lacasas EC1.10.3.2 de FOCIC01</i> .....	56
Figura 11 <i>Alineamiento de las cutinasas EC3.1.1.74 de FOCIC01</i> .....	59
Figura 12 <i>Microfotografías de las perlas de polietileno finalizado el tiempo de incubación</i> .....	62
Figura 13 <i>Microfotografías de perlas de polietileno colonizadas por FOCIC01 luego del lavado</i> .....	63
Figura 14 <i>Espectros FTIR de perlas de polietileno</i> .....	63
Figura 15 <i>Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF</i> .....	65
Figura 16 <i>Cuantificación de proteínas totales del sobrenadante</i> .....	67
Figura 17 <i>Separación de proteínas secretadas en los diferentes montajes</i> .....	67
Figura 18 <i>Propuesta de ruta metabólica en la biodegradación de polietileno por las cepas de <i>Fusarium</i></i> .....	81

### Lista de Apéndices

Los apéndices están en una carpeta comprimida adjunta.

Apéndice A *Registro fotográfico de cepas fúngicas aisladas por CIC de tuberías de polietileno biodegradadas*

Apéndice B *Metaanálisis del efecto de los microorganismos en la biodegradación de materiales plásticos*

Apéndice C *Ficha técnica LDPE lotrene fd0274*

Apéndice D *Certificación Cepas Fusarium CIC – CBUDES*

Apéndice E *Contrato Marco No. 167 -2017 ARG MINAMBIENTE-CIC*

Apéndice F *Otrosi No. 2 Contrato de ARG MINAMBIENTE-CIC*

Apéndice G *Acuerdo de Transferencia de Material (ATM) UIS-CIC*

Apéndice H *Protocolo extracción de ADN fúngico*

Apéndice I. *MpGAP Pipeline*

Apéndice J *Protocolo digestión de proteínas*

Apéndice K *NCBI Genomas Fusarium oxysporum*

Apéndice L *Árbol filogenético*

Apéndice M *FOCIC01\_Interproscan*

Apéndice N *FECIC02\_Interproscan*

Apéndice O *FOCIC01 - CAZymes péptido señal*

Apéndice P *FECIC02 - CAZymes péptido señal*

Apéndice Q *Espectros de masas de polímeros*

Apéndice R *Espectros de masas de péptidos*

## Glosario

**Bioinformática:** disciplina que combina biología, informática y estadística para analizar y comprender datos biológicos complejos, como secuencias genómicas y proteómicas.

**Enzimas extracelulares:** proteínas secretadas por microorganismos al medio circundante, capaces de catalizar reacciones fuera de la célula

**LDPE (Low-Density Polyethylene):** polietileno de baja densidad, polímero plástico ampliamente utilizado en la industria debido a su flexibilidad y durabilidad.

**Omicas:** conjunto de disciplinas científicas (genómica, proteómica, metabolómica) orientadas al estudio global de moléculas biológicas en organismos.

**Polímero:** macromolécula compuesta por unidades repetitivas (monómeros) unidas mediante enlaces covalentes.

**Proteómica:** ciencia que estudia el conjunto completo de proteínas expresadas en un organismo, tejido o célula bajo determinadas condiciones.

## Resumen

**Título:** Proteómica comparativa de cepas fúngicas nativas degradadoras de plástico como herramienta en la identificación de enzimas de interés biotecnológico \*

**Autor:** María Andrea Reyes Reyes \*\*

**Palabras Clave:** *Fusarium*, Proteínas, Polietileno, Biodegradación, Polímeros, Genómica.

**Descripción:** La contaminación por plásticos, especialmente el polietileno, representa un reto ambiental debido a su resistencia a la degradación y acumulación en ecosistemas terrestres y marinos. Los hongos ofrecen una alternativa para mitigar este problema, gracias a su capacidad de secretar enzimas extracelulares que degradan polímeros complejos. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar los perfiles proteómicos de dos cepas nativas del género *Fusarium* para identificar enzimas implicadas en la biodegradación de polietileno. Se realizó la secuenciación genómica de las cepas mediante plataformas Illumina y Nanopore, seguida de ensamblaje híbrido y anotación funcional para identificar genes relacionados con biodegradación de plásticos. Además, se llevaron a cabo cultivos en medios con polietileno de baja densidad (LDPE) como única fuente de carbono durante 30 días, evaluando cambios físicos y químicos en el polímero mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía infrarroja (FTIR). La expresión proteica se analizó con electroforesis en gel SDS-PAGE e identificación por MALDI-TOF. Los resultados confirmaron que *Fusarium oxysporum* FOCIC01 y FECIC02 poseen genes relacionados con enzimas extracelulares como lacasas, peroxidasas y cutinasas, asociadas a la degradación de polímeros. Los análisis de SEM y FTIR revelaron alteraciones estructurales en el LDPE y la descomposición parcial del polímero. FOCIC01 mostró un perfil proteico más activo en presencia de LDPE, destacando su capacidad degradativa frente a FECIC02. Este estudio aporta algunos de los mecanismos enzimáticos involucrados en la biodegradación de polietileno, con potencial para aplicaciones biotecnológicas en la gestión de residuos plásticos.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología. Directora: Clara Inés Sánchez Suárez. PhD. Codirector: William Fernando Hidalgo Bucheli. PhD.

### Abstract

**Title:** Comparative proteomics of native plastic-degrading fungal strains as a tool in the identification of enzymes of biotechnological interest\*

**Author:** María Andrea Reyes Reyes\*\*

**Key Words:** *Fusarium*, Proteins, Polyethylene, Biodegradation, Polymers, Genomics.

**Description:** Plastic pollution, especially polyethylene, represents an environmental challenge due to its resistance to degradation and accumulation in terrestrial and marine ecosystems. Fungi offer an alternative to mitigate this problem through their ability to secrete extracellular enzymes capable of degrading complex polymers. This study aimed to characterise the proteomic profiles of two native strains of the genus *Fusarium* to identify enzymes involved in polyethylene biodegradation. The genomic sequencing of the strains was performed using Illumina and Nanopore platforms, followed by hybrid assembly and functional annotation to identify genes associated with plastic biodegradation. In addition, cultures were grown in media with low-density polyethylene (LDPE) as the sole carbon source for 30 days, evaluating physical and chemical changes in the polymer through scanning electron microscopy (SEM) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). Protein expression was analysed using SDS-PAGE gel electrophoresis and identification through MALDI-TOF. The results confirmed that *Fusarium oxysporum* FOCIC01 and FECIC02 harbour genes encoding extracellular enzymes such as laccases, peroxidases, and cutinases, all associated with polymer degradation. SEM and FTIR analyses revealed structural alterations in LDPE and partial polymer decomposition. FOCIC01 exhibited a more active proteomic profile in the presence of LDPE, highlighting its superior degradative capacity compared to FECIC02. This study contributes to understanding the enzymatic mechanisms involved in polyethylene biodegradation, with potential applications in biotechnological strategies for plastic waste management.

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Health. School of Microbiology. Master in Microbiology. Director: Clara Inés Sánchez Suárez. Ph.D. Co-director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Ph.D.

## Introducción

En las últimas décadas, la acumulación de residuos plásticos y su impacto ambiental se han convertido en uno de los desafíos más urgentes a nivel global. Entre estos materiales, el polietileno (PE) destaca como uno de los polímeros más utilizados en la industria del plástico, representando una problemática significativa debido a su lenta degradación en condiciones naturales. En este contexto, la biodegradación de polímeros sintéticos mediante microorganismos ha surgido como una alternativa para mitigar esta crisis ambiental. Dentro de los microorganismos estudiados, los hongos filamentosos han demostrado ser efectivos en la degradación de plásticos, incluyendo polietileno (PE), polipropileno (PP) y poliestireno (PS). En particular, *Fusarium oxysporum*, un hongo filamentoso ampliamente distribuido en diversos ecosistemas, ha mostrado capacidad para descomponer compuestos recalcitrantes como el PE (Ekanayaka et al., 2022; Gong et al., 2023; Spina et al., 2021; Srikanth et al., 2022). No obstante, la diversidad intrínseca de las cepas fúngicas nativas puede influir significativamente en su eficiencia degradativa y en el repertorio de enzimas implicadas en estos procesos.

El objetivo central de esta tesis fue caracterizar a nivel proteómico dos cepas fúngicas nativas del género *Fusarium* en búsqueda de enzimas potencialmente implicadas en el proceso de biodegradación de polietileno. Este enfoque permitió no solo elucidar algunos de los mecanismos moleculares subyacentes en la degradación de este polímero, sino también identificar enzimas de interés biotecnológico como lacasas, peroxidasas y cutinasas, con potenciales aplicaciones en la biodegradación y valorización de plásticos. La selección de *Fusarium* nativo de Santander, Colombia, como organismo modelo en este estudio se basó en su adaptación a las condiciones

ambientales locales y su potencial para desempeñar un papel importante en la solución de problemáticas asociadas con la acumulación de desechos plásticos en la región.

El análisis integrado de los perfiles genómicos y proteómicos de estas cepas fúngicas permitió asociar algunas de las enzimas implicadas en el proceso de biodegradación con la comprensión de posibles mecanismos metabólicos extracelulares. Por otro lado, el uso de herramientas bioinformáticas, como el ensamblaje híbrido de genomas, el modelamiento estructural de proteínas y el análisis de alineamientos, permitió profundizar en la funcionalidad de las enzimas involucradas en la biodegradación. La combinación de enfoques proteómicos y genómicos resultó ser una estrategia efectiva para la caracterización de los mecanismos de biodegradación fúngica de polietileno.

En este sentido, esta investigación profundizó en la caracterización genómica y proteómica de dos cepas nativas de *Fusarium oxysporum* potencialmente degradadoras de LDPE. Los hallazgos obtenidos permitieron un mayor entendimiento de las interacciones moleculares involucradas en este proceso y ofrecieron información valiosa para futuras aplicaciones biotecnológicas orientadas a la mitigación de la contaminación por plásticos.

## **1. Problema de investigación y justificación**

Desde la década de 1950, cuando comenzó la producción de plásticos a gran escala, la fabricación mundial de estos materiales ha crecido de manera exponencial, alcanzando más de 368 millones de toneladas en 2019 y 2020 (Ekanayaka et al., 2022; *Plastics - the Facts 2021 • Plastics Europe*, n.d.; Temporiti et al., 2022). La mayoría de estos plásticos son materiales no biodegradables, caracterizados por su alta resistencia a agentes atmosféricos y corrosivos, y

derivados principalmente del petróleo y otros hidrocarburos. Entre los polímeros más utilizados, y por ende los principales residuos plásticos, se encuentran el polietileno de baja densidad (LDPE), el polietileno de alta densidad (HDPE), el tereftalato de polietileno (PET), el polipropileno (PP), el cloruro de polivinilo (PVC) y el poliestireno (PS) (Lear et al., 2021, 2022; Matjašič et al., 2021; Temporiti et al., 2022; Zeghal et al., 2021). En Colombia, el polietileno, en sus diferentes formas de densidad, ocupa el primer lugar en los plásticos procesados, con un consumo de 534 mil toneladas en 2021, seguido por el polipropileno con 310 mil toneladas y las resinas de PVC con 230 mil toneladas (Acoplásticos, 2022).

Tras su uso, estos plásticos se convierten en residuos sólidos que, dependiendo del tratamiento de cada país, se someten a tres procesos principales: reciclaje, incineración como fuente de energía o acumulación en vertederos (Balu et al., 2022; Lear et al., 2022; Ncube et al., 2021). En el caso de la acumulación, estos residuos requieren largos períodos de tiempo para su degradación natural, debido a las características inherentes del plástico, como su alto peso molecular, cristalinidad, hidrofobicidad y los aditivos empleados para mejorar la calidad del producto final, lo que favorece la resistencia a los agentes atmosféricos y corrosivos (Harshvardhan & Jha, 2013; Lear et al., 2021; Matjašič et al., 2021).

Según el informe nacional de disposición final de residuos sólidos 2020, elaborado por la Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios de Colombia, para el año 2020 se dispuso un estimado de 11.600.849 toneladas de residuos sólidos en Colombia. De estos, solo el 17% de los residuos, incluidos los plásticos, fueron reciclados. Para el caso del departamento de Santander, se evidencia un constante crecimiento poblacional del área metropolitana, generando a su vez un aumento en el consumo de bienes y servicios, cuya consecuencia se refleja en un incremento de los residuos sólidos, alcanzando un total de 349.854 toneladas anual dispuesto (SSP 2021). De

estos residuos, solo hay un aprovechamiento del 20% en los residuos plásticos, cuando este material puede ser aprovechable en más de un 90%. En Santander, el PE representó el 15% de los residuos sólidos generados en 2021 (Acoplásticos, 2022). En el caso de residuos plásticos para el municipio de Bucaramanga, en el periodo de 2020 a 2021 fue de 566 toneladas, menos del 1% del total de residuos sólidos producidos reportados en Santander (Alcaldía de Bucaramanga 2022). Cabe resaltar que estos valores son subestimados, debido a que solo se reportan los recolectados por las organizaciones registradas, despreciando los demás residuos en el reciclado informal y el material no reciclado que termina en el Carrasco o que carece de una correcta disposición (Yepes 2004).

Lo anterior, demuestra que la cadena de valor de los productos fabricados con plástico funciona bajo un modelo de economía lineal, fundamentada en la carencia de valor de estos en el municipio, dada la inexistencia de mecanismos y plantas de aprovechamiento que permitan la reincorporación de los residuos a las cadenas productivas. El departamento de Santander, no cuenta con métodos eficientes de eliminación de plásticos, generando una amenaza ecológica, debido a la acumulación tanto en ambientes acuáticos como terrestres. Esta acumulación se evidencia con macro y microplásticos, representando un problema ambiental y de salud pública, con alta capacidad de acumulación en diferentes ecosistemas (Figura 1). Esto afecta el desarrollo agrícola, pecuario y la salud de los seres humanos, causando diversas patologías y en algunos casos hasta la muerte de diferentes seres vivos (Hale et al., 2020; Li et al., 2021; Sharma et al., 2021; Uthra et al., 2023; C. Wu et al., 2022).

**Figura 1**

*Microplásticos y macroplásticos como contaminantes en el medio ambiente*



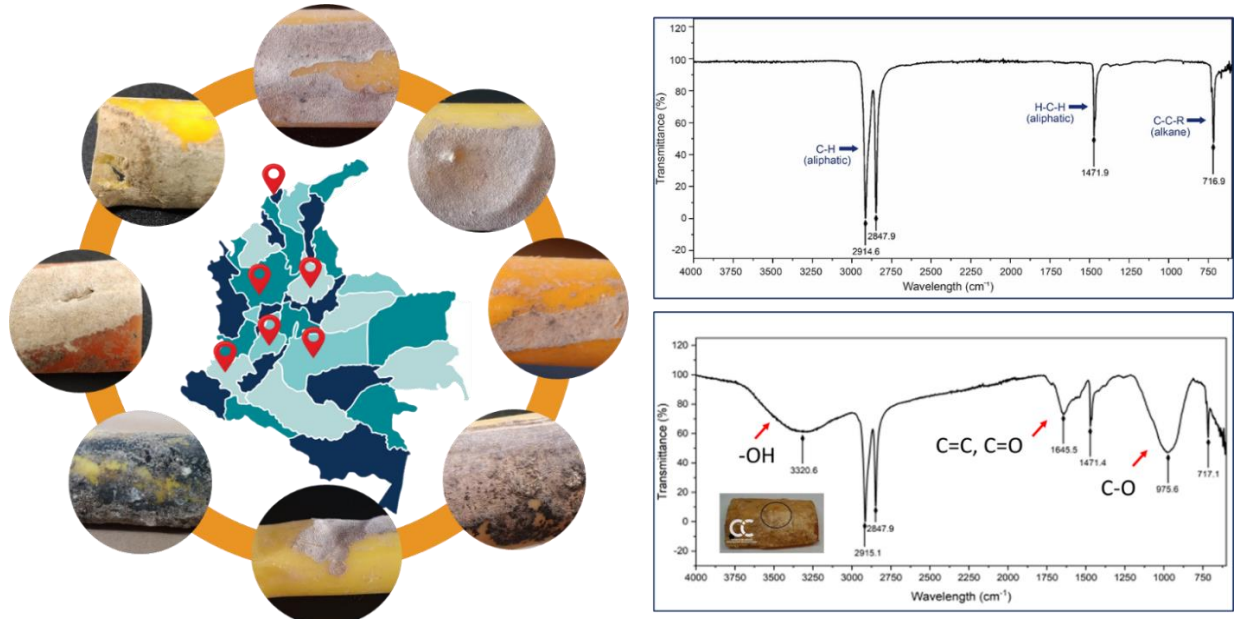
*Nota.* PE: Polietileno, PP: Polipropileno, PMMA: Polimetilmetacrilato, PA: Poliamida o Nylon. Foto: ZYS PLANET

La importancia en la búsqueda de alternativas verdes en la biodegradación de plásticos, favorece los tratamientos de biorremediación (Ali et al., 2021; Y. He et al., 2024; Lear et al., 2022; Ncube et al., 2021). A la fecha, se han reportado un gran número de estudios de hongos degradadores de polímeros, dentro de estos, se resalta los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* que cuentan con variedad de enzimas extracelulares que degradan los polímeros insolubles hasta unidades monoméricas solubles (Ekanayaka et al., 2022; Spina et al., 2021; Temporiti et al., 2022).

En Colombia, el laboratorio de Biocorrosión y Biotecnología de la Corporación para la Investigación de la Corrosión (en adelante, CIC) aisló microorganismos nativos con predominancia de hongos incluyendo especies de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Penicillium* y *Fusarium*, en tuberías de polietileno degradadas utilizadas en distribución de gas domiciliario en Colombia (Figura 2). En el **Apéndice A** se encuentra el registro fotográfico de algunas de las cepas aisladas.

**Figura 2**

*Tuberías de polietileno biodegradadas por hongos filamentosos en Colombia*



*Nota.* Tuberías de polietileno de alta y media densidad biodegradadas utilizadas en distribución de gas domiciliario en Colombia. En el mapa se señalan con el indicador rojo, algunos de los departamentos que reportaron casos de falla. De arriba hacia abajo, espectro infrarrojo de una tubería de polietileno sin afectación, se observan enlaces C-H y C-C- El espectro inferior, corresponde a una tubería biodegrada, se observa cambios en la estructura química del material con aparición de señales -OH, C=O y C-O asociados a procesos de oxidación. Fuente: Autor-CIC

Utilizando la biodiversidad colombiana, con dos de estas cepas fúngicas y con el fin de aprovechar su funcionalidad en la fabricación de herramientas biotecnológicas para aplicaciones ambientales, en la presente investigación se abordó como objetivo global la siguiente pregunta ¿Qué proteínas estarán asociadas con la biodegradación de polietileno en dos hongos de *Fusarium* nativos de Colombia?

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Caracterizar los perfiles proteómicos de dos cepas fúngicas nativas del género *Fusarium* en búsqueda de enzimas potencialmente implicadas en el proceso de biodegradación de polietileno.

### 2.2 Objetivos específicos

Analizar el genoma de dos cepas nativas de *Fusarium* sp. potencialmente degradadoras de materiales poliméricos.

Identificar las proteínas expresadas diferencialmente por las cepas nativas de *Fusarium* durante la degradación de polietileno.

Correlacionar los genomas y proteomas de dos cepas fúngicas del género *Fusarium* con especial énfasis en la identificación de genes y proteínas candidatas asociadas a la degradación de polietileno.

### 3. Marco conceptual y estado del arte

#### 3.1 Plásticos

Los plásticos son materiales poliméricos utilizados en numerosas industrias, pueden ser de base biológica o sintética, siendo el material más utilizado en el mundo, por su estabilidad y durabilidad (Ahmed et al., 2018; Ekanayaka et al., 2022; Lear et al., 2021; Matjašič et al., 2021; Singh Jadaun et al., 2022; Zeghal et al., 2021). Se clasifican en diversas categorías según su comportamiento bajo diferentes condiciones. Según la disposición de las moléculas que forman el polímero, se pueden clasificar en tres grupos: elastómeros, termoestables, y termoplásticos (Peters, 2002). Según su tamaño se pueden clasificar en megaplásticos (mayores a 1 metro), macroplásticos (entre 2,5 cm y menos de 1 m), mesoplásticos entre (5 mm y menos de 2,5 cm), microplásticos (entre 1  $\mu\text{m}$  y menos de 5 mm) y nanoplásticos (menores a 1  $\mu\text{m}$ ) (Grande-Tovar et al., 2022; Hale et al., 2020).

##### 3.1.1 *Elastómeros*

En los elastómeros, las macromoléculas están ordenadas formando un espiral con pocos enlaces. Tienen propiedades elásticas, logrando deformarse bajo una fuerza y recuperan su forma y dimensión cuando la fuerza que actúa sobre ellos cede, son ampliamente utilizados en aplicaciones industriales y domésticas debido a su flexibilidad y resistencia (Peters, 2002). Algunos ejemplos de elastómeros incluyen el caucho natural (poliisopreno), el neopreno (policloropreno), el poliuretano (PU), el nitrilo y la silicona, entre otros.

##### 3.1.2 *Termoestables*

En los termoestables, las macromoléculas se entrecruzan formando estructuras tridimensionales de enlaces covalentes, otorgando rigidez, resistencia térmica y estabilidad

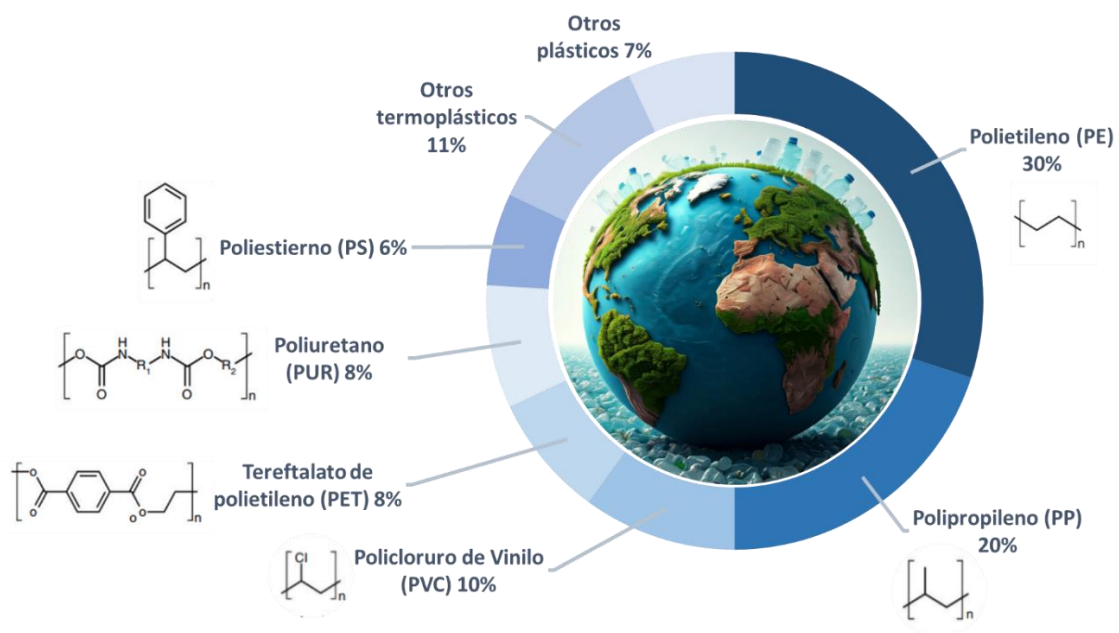
química (Peters, 2002). Debido a esto, solo se les puede dar forma una vez, cuando son sometidos a altas temperaturas se degradan completamente. Algunos ejemplos, son las resinas epoxi utilizadas en recubrimientos, adhesivos y materiales compuestos, resinas fenólicas utilizadas en aislantes eléctricos y asas de utensilios, entre otros.

### 3.1.3 Termoplásticos

En el caso de los termoplásticos, tienen la capacidad de fundirse repentinamente al ser calentados, lo que permite su moldeo en diferentes formas (Oladele et al., 2023; Peters, 2002). En esta categoría se encuentra el PP, PVC y el PE (Lear et al., 2021; Matjašič et al., 2021; Temporiti et al., 2022; Zeghal et al., 2021). El polietileno, es el polímero más simple y es el plástico más común representando aproximadamente un 30% del mercado (Cowan et al., 2022; C. Zhang et al., 2023; X. Zhang et al., 2023) ver **Figura 3**.

**Figura 3**

*Producción de plásticos (polímeros sintéticos) a nivel mundial*



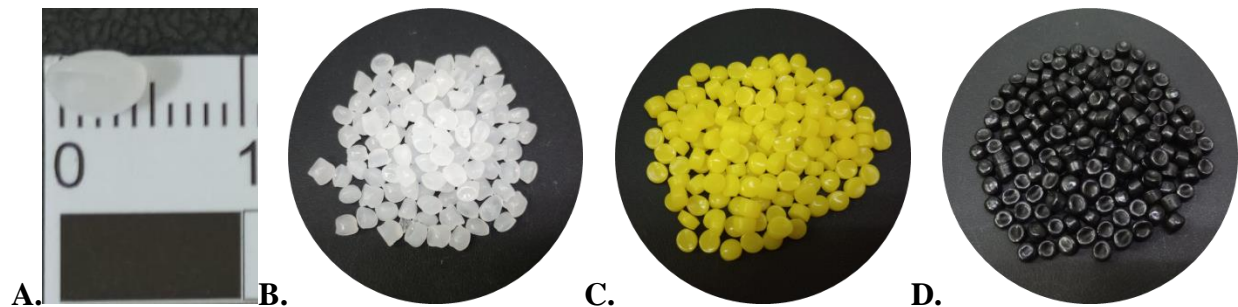
*Nota.* Valores asociados a la producción de plásticos en el año 2020. Imagen modificada del artículo de Cowan y colaboradores 2022 (Cowan et al., 2022).

### 3.1.4 Microplásticos

Los microplásticos son partículas de polímeros orgánicos sintéticos que tienen un tamaño menor a 5 mm. Tienen diferentes formas y morfologías, como fibras, láminas, películas, espumas, láminas, fragmentos, gránulos y esferas. Estos se pueden encontrar en cualquier ambiente, tierra, aire y sistemas acuáticos (Sharma et al., 2021). Pueden ser de origen primario o secundario. Los primarios como la materia prima para la fabricación de tuberías y bolsas de polietileno, perlas o pellets, ver Figura 4, o también los que se adicionan en la fabricación de cosméticos, y agentes farmacológicos. Por otra parte, los secundarios, son aquellos que se derivan de la fragmentación mecánica, química o biológica de los plásticos.

#### Figura 4

##### *Microplásticos de tipo primario*



*Nota.* Perlas de polietileno de diferentes pigmentos. A. Perla de polietileno sin pigmento de tamaño de 5 mm. B. Polietileno de baja densidad, natural sin pigmento, usado para fabricación de bolsas plásticas. C. Polietileno de media densidad con pigmento amarillo para fabricación de tuberías usadas en distribución de gas domiciliario. D. Polietileno de media densidad con pigmento negro para fabricación de tuberías usadas en distribución de agua potable. Fuente: Autor.

### **3.1.5 Polietileno**

El polietileno (en adelante, PE) es un hidrocarburo de alto peso molecular obtenido a partir de la polimerización de monómeros de etileno. Por sus propiedades termoplásticas, flexibilidad, resistencia y especialmente bajo precio, se utiliza principalmente en la fabricación de envases, tuberías y revestimiento de cables. La resistencia de este material es directamente proporcional a la longitud de sus cadenas monoméricas, determinando de esta manera la densidad del producto final (Gao et al., 2022a; Geyer et al., 2017; Ghatge et al., 2020; Kormin et al., 2017). El PE de baja densidad (LDPE, por sus siglas en inglés) es el producto más versátil con amplias aplicaciones.

## **3.2 Normatividad colombiana**

A nivel legal, en Colombia se aprobó la ley 2232 de 2022 la cual establece medidas a la reducción gradual de la producción y consumo de ciertos productos plásticos de un solo uso. Esta entró en vigencia el 1 de enero 2023 e incluye implementar un sistema de responsabilidad extendida del producto (REP), que consiste en la recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos generados por sus productos. Los plásticos de un solo uso que quedan prohibidos para su distribución y producción son las bolsas utilizadas para embalar periódicos, mezcladores y pitillos para bebidas, soportes plásticos para las bombas de inflar, hisopos con puntas de algodón. Una segunda etapa de esta ley se aplicará a partir del 7 de julio de 2030, incluyendo restricciones de producción y comercialización de otro grupo de plásticos de un solo uso como los envases y empaques para contener o llevar alimentos de consumo inmediato o entrega a domicilios, platos, bandejas, cuchillos, tenedores, cucharas, vasos y guantes de un solo uso para comer, confeti, manteles y serpentinas, empaques para la comercialización de frutas, verduras, tubérculos y hierbas aromáticas, adhesivos y etiquetas que llevan como distintivo los vegetales, entre otros (Ley 2232, 2022).

### 3.3 Degradación plástica

La degradación de los plásticos es un fenómeno relevante en el contexto ambiental e industrial, al durar más de 100 años para su descomposición. La degradación del PE puede ocurrir por degradación química, fotoquímica, térmica, o biológica (Bardají et al., 2020). Existen diferentes maneras de acelerar su degradación, con procesos químicos, físicos y biológicos. Se destaca la degradación térmica que sucede por exposición a altas temperaturas y provoca descomposición química y pérdida de propiedades. Degradación fotoquímica, donde la radiación UV (Ultravioleta) degrada los enlaces químicos de la estructura polimérica. Degradación mecánica, resultado del desgaste físico y fragmentación causada por el roce y la abrasión. Finalmente, la degradación biológica, en donde microorganismos descomponen los materiales plásticos (Royer et al., 2018).

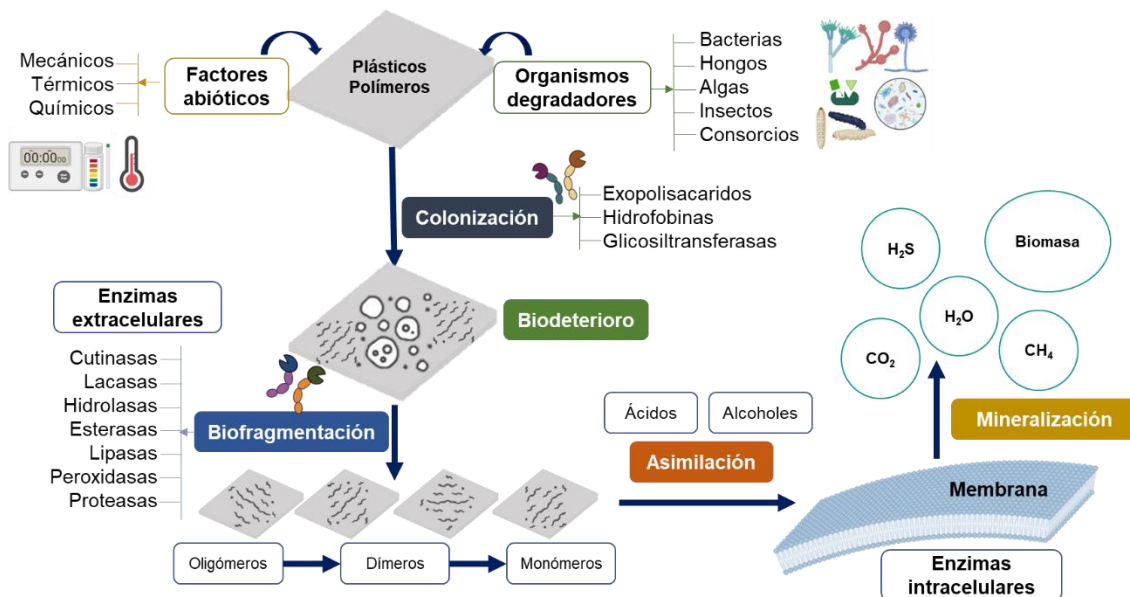
#### 3.3.1 Biodegradación

La biodegradación es un proceso bioquímico y fisicoquímico mediado por organismos vivos que transforman los polímeros en unidades más pequeñas (Figura 5). Cuenta con cuatro etapas principalmente, colonización, biofragmentación (biodeterioro), asimilación y mineralización (Bardají et al., 2020; Mendoza et al., 2025; Temporiti et al., 2022; Thomas Zumstein et al., 2018). Algunos factores abióticos que favorecen la degradación alterando las propiedades del material son la luz ultravioleta, temperaturas elevadas, oxígeno, afectaciones mecánicas, entre otros (Jacquin et al., 2019; Mendoza et al., 2025; Rogers et al., 2020). Diversos organismos, como bacterias, hongos, algas, insectos y consorcios microbianos, han demostrado capacidad para degradar materiales poliméricos. Los factores abióticos, como la luz ultravioleta, la temperatura y la humedad, pueden acelerar los procesos iniciales de colonización. En esta primera etapa, los microorganismos producen compuestos como exopolisacáridos, hidrofobinas y

glicosiltransferasas (Figura 5), que facilitan su adherencia a las superficies de los polímeros inertes. Posteriormente, se inicia el biodeterioro, etapa en la que se observan cambios visibles en la apariencia y estructura de los materiales plásticos. A medida que avanza el proceso, los organismos sintetizan enzimas extracelulares capaces de biofragmentar los polímeros en moléculas más pequeñas, como oligómeros, dímeros y monómeros. Estas moléculas intermedias son transformadas en compuestos como ácidos orgánicos y alcoholes, los cuales pueden ser asimilados por los microorganismos. Finalmente, mediante la acción de enzimas intracelulares, estos compuestos son mineralizados, generando productos finales como biomasa, agua y gases, entre los que se encuentran H<sub>2</sub>S, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Jacquin et al., 2019; Mendoza et al., 2025; Temporiti et al., 2022).

**Figura 5**

*Esquema del proceso de biodegradación de plásticos*



*Nota.* Diagrama esquemático del proceso de biodegradación de plásticos, mostrando las etapas de descomposición enzimática y la mineralización completa. Fuente: elaboración propia (Mendoza et al., 2025).

En el estudio de la biodegradación de materiales poliméricos como el polietileno, se utilizan diversas técnicas analíticas y espectroscópicas que permiten evaluar los cambios estructurales, químicos y físicos del material durante este proceso. Estas metodologías proporcionan evidencias tanto cualitativas como cuantitativas sobre la descomposición del polímero, lo que facilita su análisis y comprensión. Algunas de las técnicas, se encuentran la gravimetría por peso seco, medición de ángulos de contacto, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés), espectroscopia Raman, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), difracción de rayos X (DRX), colorimetría de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) (Mendoza et al., 2025).

La gravimetría por peso seco, permite medir la pérdida de masa del material después de un tiempo de exposición a microorganismos degradadores. La disminución del peso seco del polímero es un indicador directo de la degradación física y química del material, resultado de la acción enzimática y microbiana sobre las cadenas poliméricas (A. Ali et al., 2022; DSouza et al., 2021; Park & Kim, 2019; Soud, 2019; Tiwari et al., 2023).

La medición de ángulos de contacto evalúa los cambios en la hidrofobicidad de la superficie del polímero. Esta técnica sirve para evidenciar modificaciones superficiales en el polietileno degradado. Durante la biodegradación, en la mayoría de los casos se observa un incremento en la hidrofilia debido a la formación de grupos funcionales polares como carbonilos, hidroxilos y carboxilos, producto de la fragmentación oxidativa de la estructura polimérica (Liu et al., 2022; H. Lou et al., 2022; Pardi-Comensoli et al., 2022; Perera et al., 2023; Samanta et al., 2020).

La espectroscopia FTIR se utiliza para identificar cambios en los grupos funcionales del polímero. A través de las bandas de absorción en el espectro infrarrojo, se pueden detectar señales asociadas a la oxidación, como la aparición de grupos carbonilo (C=O) e hidroxilo (O-H), que son característicos del proceso de degradación del polietileno. La información obtenida mediante FTIR permite relacionar la acción microbiana con la ruptura de enlaces C-H y la formación de productos de oxidación (Adithama et al., 2023; Dwicania et al., 2019; Gupta & Devi, 2020; Islami et al., 2019).

La espectroscopia Raman detecta vibraciones moleculares y ofrece información detallada sobre la estructura química del polímero. En estudios de degradación de polietileno, esta técnica es útil para identificar la formación de regiones oxidadas, modificaciones en la cristalinidad y la presencia de insaturaciones que evidencian la descomposición molecular del material (Cognigni et al., 2023; Poma et al., 2022; Puglisi et al., 2019).

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) proporciona información sobre la estructura molecular y los cambios en la composición química del polímero. En el caso del polietileno, la RMN es capaz de detectar la aparición de nuevos grupos funcionales y fragmentos moleculares generados por la fragmentación oxidativa y la acción enzimática, lo que permite confirmar el avance del proceso de biodegradación (Peng et al., 2020; Sarmah & Rout, 2019; Sowmya et al., 2014).

La espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS) es una técnica de análisis superficial que determina la composición elemental y los estados de oxidación en la superficie del polímero. La incorporación de oxígeno durante la biodegradación es un signo claro de oxidación, y esta técnica facilita su cuantificación y localización precisa (Kanelli et al., 2015; H. Wu et al., 2023; H. Zhang et al., 2023).

La difracción de rayos X (DRX) proporciona información sobre la estructura cristalina del polímero. La degradación del polietileno puede reducir su cristalinidad, debido a la ruptura de las cadenas poliméricas, lo que genera regiones amorfas más susceptibles a la acción microbiana. Una disminución en la intensidad de las señales de difracción es un indicador relevante de este proceso (Adithama et al., 2023; Maroof et al., 2021; Tiwari et al., 2023; H. Zhang et al., 2023).

La calorimetría de barrido diferencial (DSC) se utiliza para analizar los cambios en las propiedades térmicas del polímero, como la temperatura de fusión y el grado de cristalinidad. La degradación del polietileno tiende a disminuir su cristalinidad, lo cual se evidencia en una reducción de las temperaturas de transición térmica y en la pérdida de organización molecular del material (Sarmah & Rout, 2019; Tiwari et al., 2023; H. Zhang et al., 2023).

La microscopía electrónica de barrido permite obtener imágenes detalladas de la superficie del polímero, revelando la colonización microbiana, la formación de biopelículas y la presencia de fisuras, cavidades y otros defectos superficiales generados durante la biodegradación (Adithama et al., 2023; Gao et al., 2022; Tiwari et al., 2023).

### **3.4 Hongos filamentosos**

Los hongos filamentosos son organismos eucariotas pertenecientes al reino Fungi, caracterizados por su crecimiento en forma de hifas, estructuras filamentosas que forman una red tridimensional conocida como micelio. Estas hifas están compuestas por células alargadas rodeadas de una pared celular rica en quitina, glucanos y otros polímeros estructurales. Su crecimiento apical y capacidad de ramificación les permiten colonizar diferentes sustratos, adaptándose a diversas condiciones ambientales. Algunos desempeñan roles cruciales en los ecosistemas como descomponedores primarios, degradando materia orgánica compleja como celulosa, lignina y compuestos aromáticos. Esto es posible gracias a la secreción de un amplio

repertorio de enzimas extracelulares, incluyendo celulasas, lacasas y peroxidasas, que facilitan la conversión de compuestos insolubles en formas asimilables. Además de su relevancia ecológica, los hongos filamentosos tienen aplicaciones biotecnológicas destacadas. Son utilizados en la producción de metabolitos secundarios, como antibióticos y micotoxinas, y en procesos industriales que incluyen la fermentación y la biorremediación. Géneros como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* son particularmente importantes debido a su capacidad de degradar materiales poliméricos ((Bardají et al., 2020; Ekanayaka et al., 2022; Ghatge et al., 2020; Zeghal et al., 2021)

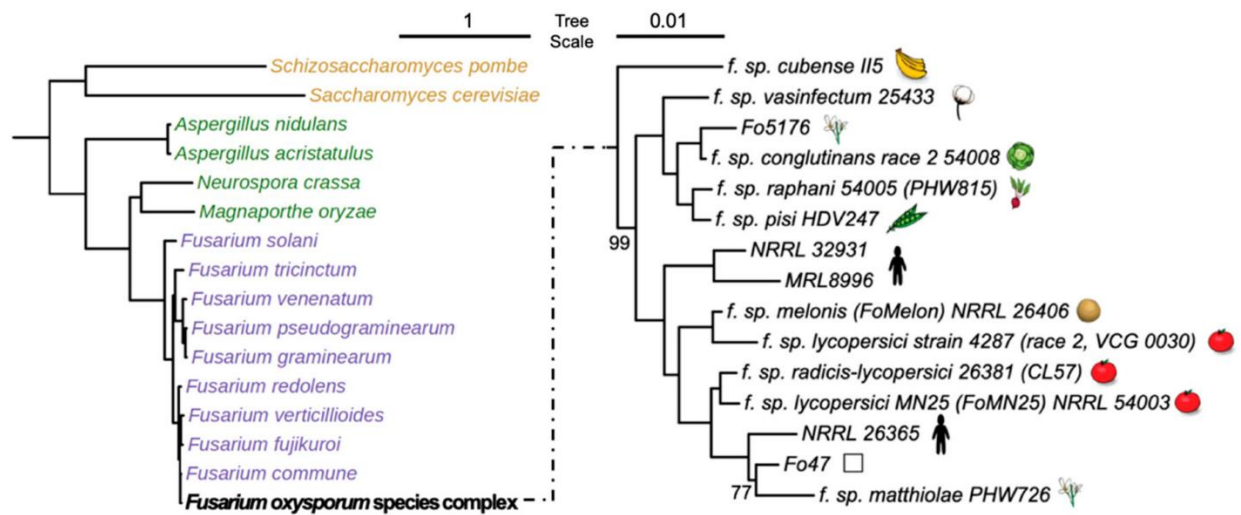
#### 3.4.1 *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende un grupo diverso de hongos filamentosos distribuidos en diferentes ecosistemas, reconocidos por su relevancia fitopatogénica y toxigénica. Este género pertenece al orden Hypocreales, dentro de la familia Nectriaceae, se encuentra clasificado en la clase Sordariomycetes, dentro del filo Ascomycota. Este grupo de hongos es de gran importancia agrícola, médica y biotecnológica. Incluye especies fitopatógenas responsables de enfermedades en cultivos de importancia económica, así como cepas con potencial en biorremediación y producción de metabolitos secundarios de interés industrial (J. He et al., 2024; Lizcano Salas et al., 2024; Mohd-Hafifi et al., 2024). El complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOOSC, por sus siglas en inglés) tiene una amplia distribución global, caracterizado por su alta variabilidad genética y la producción de estructuras especializadas, como clamidosporas y microconidios, que le confieren resistencia en ambientes adversos. FOOSC incluye patógenos vegetales, patógenos humanos y no patógenos. Las cepas patógenas son morfológicamente indistinguibles de las cepas no patógenas. *F. oxysporum* presenta una alta diversidad funcional y genética (Edel-Hermann & Lecomte, 2019). Las cepas fitopatógenas de *F. oxysporum* causan marchitez o pudrición de raíces

y coronas en cultivos extensivos económicamente importantes como plátano, banano, tomate, entre otros. Las cepas con el mismo rango de hospederos, generalmente una especie de planta, se agrupan en una forma especial (*forma specialis, f. sp.*), (ver Figura 6).

**Figura 6**

*Filogenia de los genomas del complejo Fusarium oxysporum*

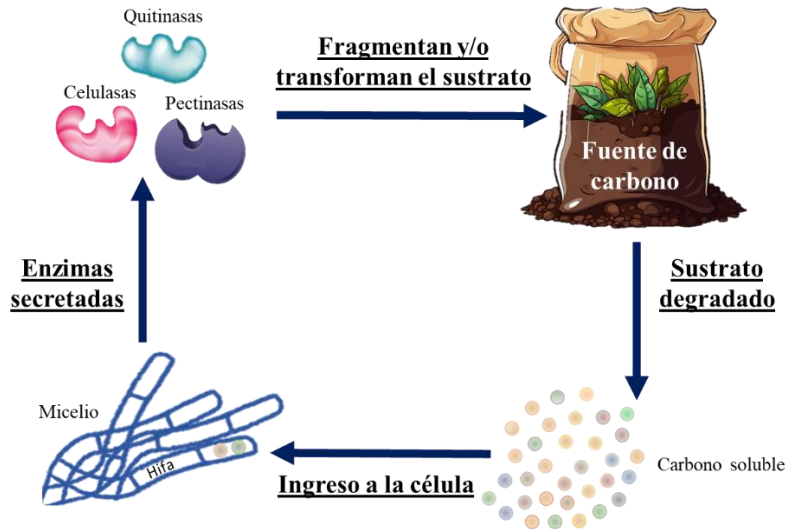


Nota. Figura tomada del artículo “Conservation and expansion of transcriptional factor repertoire in the Fusarium oxysporum species complex” (Yu et al., 2023)

Las cepas de *Fusarium oxysporum* tienen una nutrición saprofita, secretando una variedad de enzimas extracelulares, incluyendo celulasas, pectinasas y amilasas, que degradan polímeros vegetales como celulosa y pectina, liberando compuestos simples que pueden ser absorbidos y utilizados como fuente de carbono y energía (Figura 7). Esta capacidad le permite colonizar eficientemente restos vegetales y contribuir al ciclo del carbono en el suelo (Davis et al., 2023; Farah et al., 2016).

**Figura 7**

*Nutrición saprófita de Fusarium oxysporum*



*Nota.* Representación esquemática de la nutrición saprófita de *Fusarium oxysporum*, en la que se ilustran las enzimas extracelulares secretadas, como quitinasas, celulasas y pectinasas, responsables de la degradación del sustrato complejo en compuestos más simples. Estas enzimas fragmentan y/o transforman macromoléculas estructurales presentes en la materia orgánica en compuestos solubles de carbono, facilitando su absorción por las hifas del micelio. Este proceso permite a *F. oxysporum* utilizar los recursos del medio, asegurando su desarrollo y proliferación en distintos ambientes.

En el departamento de Santander en Colombia, se han aislado diferentes cepas de *Fusarium* a partir de tuberías de polietileno utilizadas en distribución de gas domiciliario que se encuentran enterradas, en el **Apéndice A**, se encuentra el registro fotográfico de algunas de estas cepas. La colonización y biodegradación de las tuberías por parte de las diferentes cepas fúngicas sugiere posibles procesos de adaptación biológica. En ausencia de raíces de cultivos cercanas que actúen como su principal fuente nutricional, estas cepas parecen desarrollar estrategias para aprovechar otras fuentes de carbono disponibles en su entorno.

El análisis de los datos genómicos disponibles en la base de datos del NCBI revela que, hasta noviembre de 2024, se encuentran registrados 1770 genomas pertenecientes al género *Fusarium*. Dentro de este grupo, *Fusarium oxysporum* representa un número significativo, con 750 ensamblajes genómicos depositados. Sin embargo, únicamente dos de estos ensamblajes están clasificados como genomas de referencia. Esta limitada representación de genomas de referencia resalta la necesidad de continuar con estudios de alta calidad que permitan no solo la caracterización detallada de nuevas cepas, sino también la estandarización y comparación de datos genómicos dentro del género.

### **3.5 Proteómica funcional**

En las diferentes etapas de la biodegradación de los materiales, los microorganismos producen enzimas asociadas a cada proceso. Las proteínas son las biomoléculas funcionales básicas para cualquier proceso biológico, conocer su actividad es necesario para identificar los mecanismos celulares durante los procesos de biodegradación. La proteómica incluye todas las tecnologías asociadas a la identificación, cuantificación o localización de proteínas presentes en un organismo, tejido o células en un momento dado. El objetivo de esta técnica es comprender sus funciones, estructuras y relaciones en un contexto biológico. En el caso específico de biorremediación de plásticos, permite identificar rutas metabólicas y proteínas/enzimas expresadas por cepas fúngicas durante el metabolismo de estos residuos sólidos (Lin et al., 2020; Sun et al., 2014).

Durante la evaluación proteómica, se emplean diversos métodos analíticos; entre ellos, se encuentra la anotación proteica a partir de la secuenciación del genoma completo de los microorganismos utilizando herramientas bioinformáticas como Augustus, Maker, entre otros. Asimismo, la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por

sus siglas en inglés), que permite la separación de proteínas según su tamaño y carga eléctrica facilitando su visualización. Otro método es la espectrometría de masas, mediante la relación masa/carga, siendo útil para analizar mezclas complejas de proteínas. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) es otro método para la separación y purificación de proteínas, aprovechando propiedades químicas, como la hidrofobicidad o la carga (Manikandan et al., 2018; Sun et al., 2014).

Con el fin de identificar información asociado a la proteómica aplicada en los materiales plásticos independiente del tipo de microorganismo fúngico, se realizó un análisis bibliométrico mediante las bases de datos de alto impacto Scopus y Web of Science. Aplicando la ecuación de búsqueda: (proteomic) OR (proteins) OR (enzymes) AND (*Fusarium*) OR (fungi) AND (polyethylene) OR (plastics) OR (polymers) AND (biodegradation) OR (biofragmentation), se encontraron 340 documentos, de estos luego de aplicar diferentes filtros como las temáticas incluyendo las áreas “ambiental”, “microbiológica”, “hongos”, “genética”, “materiales poliméricos”, “bioquímica” y excluyendo lo asociado a “salud”, “animales”, “humanos”, “plantas”, quedaron 98 documentos en idioma inglés.

El rango automático de tiempo que arrojó la base de datos fue desde el año 2002 hasta el 2022, demostrando que los temas seleccionados en conjunto son relativamente nuevos especialmente al utilizar la palabra “proteómica”. Este resultado es coherente con lo reportado con la literatura, siendo la palabra “proteómica” acuñada por Marc Wilkin en 1995 (Claudia Sandoval-usme et al., 2009). El país que presentó un mayor número de publicaciones fue India con 71 documentos, luego sigue Estados Unidos con 62, China con 52 y Japón con 34 (**Apéndice B**). Los demás países presentaron menos de 21 publicaciones. En el caso de Colombia, se encontraron tres

publicaciones, demostrando que el tema en nuestro país es poco estudiado o poco reportado en la literatura, indicando la importancia de realizar investigaciones en esta temática.

Debido a que la mayoría de publicaciones de interés se encuentran en los últimos años, se aplicó un filtro adicional, para analizar los documentos correspondientes a la ventana de tiempo del año 2020 a 2023, haciendo énfasis en estudios de hongos degradadores de polímeros insolubles hasta unidades monoméricas solubles (Ekanayaka et al., 2022; Lacerda et al., 2020; Moreno et al., 2022; Temporiti et al., 2022). En ese rango de tiempo, se encontraron los siguientes estudios de interés:

Spina y colaboradores en el 2021 reportaron un estudio asociado a la comunidad fúngica de los residuos plásticos provenientes de un vertedero, logrando aislar 95 hongos en su mayoría pertenecientes al filo Ascomycota. El 97% de las cepas, fueron capaces de crecer en la presencia de polvo de polietileno como única fuente de carbono. Las cepas que presentaron mayor tolerancia en altas concentraciones fueron las pertenecientes al género *Fusarium*. Mediante pruebas de respirometría, análisis de FTIR e imágenes SEM, encontraron afectación en el material con presencia de hoyos, surcos, hinchazón y protuberancias, y con alteraciones en los enlaces químicos, con degradación de los grupos metilo terminales (Spina et al., 2021).

Gong y colaboradores publicaron un primer informe demostrando la capacidad del hongo *Cladosporium* sp. en la degradación de gránulos de microplástico de polietileno de baja densidad (LDPE, por sus siglas en inglés). Los ensayos de biodegradación que los autores utilizaron fueron mediante pérdida de peso, cambio de pH, SEM y FTIR. La esterilización de los materiales poliméricos fue mediante exposición UV por 12 horas y etanol al 75% por tres horas (Gong et al., 2023).

Gao y colaboradores en el 2022 publicaron un artículo científico utilizando un hongo marino *Alternaria alternata* FB1, en un tiempo de exposición de 120 días. Confirmaron la biodegradación de polietileno con la identificación de 153 genes que codifican enzimas potenciales, algunas de estas corresponden a peroxidasas, lacasas, hidroxilasas, deshidrogenasas, oxidorreductasas, esterasas, lipasas y cutinasas (Gao et al., 2022).

Taxeidis y colaboradores 2023 realizaron ensayos de genómica y transcriptómica de diferentes cepas de *Fusarium* y *Aspergillus* durante la biodegradación de bolsas de polietileno y poliuretano. La metodología utilizada fue con medios de cultivo selectivos y la combinación de cromatografía líquida y espectrometría de masas, encontrando en el secretoma enzimas como cutinasas, proteasas, oxidasas, dismutasas, entre otras (Taxeidis et al., 2023).

A nivel proteómico de los hongos del género *Fusarium*, la mayoría de los artículos se centran a nivel fitopatológico, principalmente en la respuesta de las plantas al ataque patogénico de la cepa fúngica. Como lo reportado por Yang y colaboradores en el 2021, en los cambios que contribuye a la resistencia al tizón de la espiga por *Fusarium* en el trigo. El estudio empleó la espectrometría de masas basadas en etiquetado iTRAQ (etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta) (L. Yang et al., 2021).

Manikandan y colaboradores realizaron un análisis proteómico comparativo de diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en la búsqueda de proteínas expresadas diferencialmente asociadas a virulencia en las plantas de tomate, con el fin de desarrollar una estrategia de protección. El cultivo utilizado fue en medio líquido con 24 horas de incubación, las células fueron liofilizadas y sonicadas para el lisado celular y digerido con tripsina. Utilizaron el análisis 2D y demostraron la expresión diferencial de 17 proteínas diferentes. Mediante MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight) se analizaron las proteínas

asociadas a virulencia, sugiriendo que estaban involucradas en patogenicidad, expresión de síntomas y desarrollo de enfermedades, esporulación, crecimiento y mayor tasa de penetración en el tejido de la raíz (Manikandan et al., 2018).

Kalaiponmani y colaboradores publicaron un estudio asociado a la proteómica comparativa de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) con el fin de comprender el mecanismo molecular de patogenicidad para el manejo efectivo de la enfermedad de la marchitez o mal de Panamá en las plantas de banano y plátano. Los autores realizaron la comparación de tres protocolos de extracción de proteínas MgCl<sub>2</sub>/CHAPS, TCA-Acetona y TCA/Fenol-SDS, encontrando que este último presentó la mayor concentración. Seleccionaron al azar seis puntos para análisis de MALDI-TOF y búsqueda en Mascot. Como resultado en la anotación funcional, las proteínas identificadas pueden estar involucradas en el crecimiento invasivo, la transducción de señales y la persistencia de patógenos durante condiciones adversas (Kalaiponmani et al., 2017).

## 4. Metodología

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Plásticos

El material plástico evaluado fue polietileno de baja densidad (en adelante, LDPE) en perlas (Lotrene FD0274, Qapco Qatar Petrochemical Company), utilizado en la extrusión de películas delgadas. Contiene aditivos deslizantes (600 ppm de erucamida) y aditivos antibloqueo (900 ppm), así como antioxidantes. En el **Apéndice C** se encuentra la ficha técnica del material. Todas las perlas fueron lavadas con agua destilada estéril, desinfectadas con etanol al 70% y secadas al aire en una cabina de flujo laminar antes de su uso.

#### 4.1.2 Cepas fúngicas

Las cepas fúngicas de *Fusarium* (nativas de Santander, Colombia) usadas fueron dos, denominadas como FOCIC01 y FECIC02. Estas cepas fueron proporcionadas por la Corporación para la Investigación de la Corrosión (en adelante, CIC) (Piedecuesta, Colombia). Las cepas se encontraban en la colección biológica CBUDES de la Universidad de Santander (Bucaramanga, Colombia), con la identificación UDES:CBUDES:2599 para FOCIC01 y UDES:CBUDES:2600 para FECIC02 (ver **Apéndice D** Certificación de cepas fúngicas). El uso de las cepas se realizó mediante el otrosí No. 2 del contrato marco Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 167 de 2017 entre el Ministerio de Ambiente (MINAMBIENTE) y la CIC, ver **Apéndices E y F**. Asimismo, se realizó el acuerdo de transferencia de material (ATM) de aislados fúngicos del género *Fusarium* de la CIC, a la Universidad Industrial de Santander (en adelante, UIS), ver **Apéndice G**. Para la reactivación de los especímenes, se utilizaron medios de cultivo sólidos de agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (Merck, Alemania) con incubación a 25°C +/- 2°C y en oscuridad por siete días (Kalaiponmani et al., 2017).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Extracción de ADN

Se realizó un cultivo que contenía extracto de levadura (Merck, Alemania) a una concentración de 33 mM, sacarosa (Merck, Alemania) a 58 mM, fosfato de potasio monobásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck, Alemania) a 7,3 mM, sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) (Merck, Alemania) a 4,2 mM, y para evitar el crecimiento de bacterias se añadieron 0,5 g/L de cloranfenicol (Merck, Alemania). Se aforó con agua destilada, se ajustó el pH a 6,2 +/- 0,2 con ácido clorhídrico al 0,1 M antes de esterilizar y se sirvió 100 mL de medio en cada Erlenmeyer de 250 mL. De cada cepa fúngica crecida en PDA se extrajeron tres fragmentos de colonia (discos de 6 mm de 7 días de

incubación) proveniente de la zona más densa del crecimiento y se añadió como inóculo en los Erlenmeyer (Sathiyabama et al., 2024). Se dejó por 10 días en incubación a  $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad y sin agitación. Se realizó extracción de ADN utilizando el kit comercial DNesay PowerSoil (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante con modificaciones. Las modificaciones incluyeron la adición de perlas de vidrio de 3 mm en el paso inicial y uso de un homogeneizador (Beadbug 6 D1036, Benchmark Scientific, EE. UU.) para mayor detalle ver el **Apéndice H**. La calidad y concentración del ADN se evaluó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) y un fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies, California, EE. UU.) (Puentes-Cala et al., 2023).

#### ***4.2.2 Secuenciación de los genomas fúngicos***

El genoma completo de cada cepa se secuenció aplicando una metodología híbrida (secuencias largas y cortas). Para secuencias largas se utilizó el método de nanoporos con el equipo MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies Inc., Reino Unido), utilizando el kit de secuenciación de códigos de barras y celdas de flujo FLO-MIN106 (R9.4.1), realizada por personal de la CIC (Piedecuesta, Colombia). Para las secuencias cortas, el ADN se envió a Novogene Corporation Inc. (Stockton Blvd, California, EE. UU.) con la plataforma Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, EE. UU.) (Dvorianinova et al., 2021).

Las lecturas de ADN de secuencia larga se cortaron y filtraron utilizando los programas Porechop v. 0.2.4 y Filtlong v. 0.2.1 respectivamente, la calidad de las secuencias se comprobó utilizando la herramienta Nanoplot v. 1.43.0. El ensamblaje se realizó con la herramienta Flye v. 2.9.5, la calidad del ensamblaje se verificó con las herramientas Quast v. 5.3.0 y BUSCO v. 5.8.0. De forma adicional, para la cepa FOCIC01 se utilizó el pipeline MpGAP (**Apéndice I**), que incluye las siguientes herramientas de ensamblaje: Canu v. 2.2, Flye v. 2.9.2, Raven v. 1.6.1, Shasta v.

0.11.1, wtdbg2 v. 2.5, Haslr v. 0.8a1, Unicycler v. 0.5.0, Spades v. 3.15.3, Shovill v. 1.1.0, Megahit v. 1.2.9, como pulidores (polishers): Nanopolish v. 0.13.2, Medaka v. 1.11.1, gcpp v. 2.0.2 y Pilon v. 1.24, y verificadores de calidad Quast v. 5.2.0, BUSCO v. 5.6.1 y MultiQC v. 1.11 (de Almeida et al., 2023).

Las lecturas cortas de ADN se recortaron y se filtraron utilizando el programa Trimmomatic v. 0.38 (Bolger et al., 2014). La calidad de las lecturas se verificó con la herramienta FastQC v. 0.74. El ensamblaje del genoma se realizó utilizando el programa SPAdes v. 3.15.5 (Bankevich et al., 2012). La calidad del ensamblaje se verificó con Quast v. 5.2.0 y BUSCO V. 5.8.0. Se realizó la comparación de los ensamblajes para cada tecnología de secuenciación y se ensambló el genoma de forma híbrida. La anotación genómica se realizó mediante la herramienta Augustus v. 3.4.0 (Stanke et al., 2008). Las similitudes genómicas de las cepas de *Fusarium* obtenidos de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) se calcularon utilizando la herramienta de UniProt. Con esta información se realizó el alineamiento de las secuencias de 18S y se realizó la reconstrucción del árbol filogenético de máxima verosimilitud (Krasnov et al., 2020).

#### **4.2.3 Anotación proteica**

La anotación proteica se realizó a partir del genoma completo mediante la herramienta Augustus v. 3.4.0 (Stanke et al., 2008). La predicción de las proteínas secretadas, se llevó a cabo con la herramienta dbCAN3 (J. Zheng et al., 2023) HMMER: dbCAN (E-Value <  $1e^{-15}$ , coverage > 0.35), DIAMOND: CAZy (E-Value <  $1e^{-102}$ ) y HMMER: dbCAN-sub (E-Value <  $1e^{-15}$ , coverage > 0.35), se filtró la información por el péptido señal mediante SignalP (Almagro Armenteros et al., 2019) complementado con el análisis en las bases de datos tipo Blast de UniProt (Bateman et al., 2023). Para las enzimas candidatas, la predicción y localización de los dominios se realizó

mediante InterProScan v. 5.59-91.0 incluyendo las bases de datos como Colis: predicción de regiones de superenrollamiento en proteínas, FunFam: Predicción de anotaciones funcionales para secuencias novedosas y no caracterizadas. Gene3D: asignación estructural para genes y genomas completos utilizando la base de datos de estructura de dominio CATH, HAMAP: anotación automatizada de alta calidad de proteomas microbianos, MobiDBLite: Predicción de regiones intrínsecamente desordenadas en proteínas, PANTHER: análisis de proteínas a través de relaciones evolutivas, Pfam: familias de proteínas, cada una representada por múltiples alineamientos de secuencias y modelos ocultos de Markov, PIRSF: familias de proteínas basadas en modelos ocultos de Markov (HMM) y reglas de sitio patrón, PRINTS: patrones de secuencia conservados (fingerprint), ProSitePatterns, SFLD: base de datos de familias de proteínas basada en modelos ocultos de Markov (HMM), SMART: dominios y familias de proteínas basados en modelos de alineación de secuencias múltiples bien anotados, SUPERFAMILY: base de datos de anotaciones estructurales y funcionales para todas las proteínas y genomas y TIGRFAM: familias de proteínas basadas en modelos ocultos de Markov (HMM) (Mistry et al., 2021). Las proteínas asociadas a biodegradación de plásticos, se seleccionaron y se realizó un modelamiento de la estructura tridimensional con I-Tasser (W. Zheng et al., 2021; Zhou et al., 2022).

#### ***4.2.4 Diseño experimental de biodegradación***

Se realizó la metodología de Spina y colaboradores (2021) y Sowmya y colaboradores (2015) (Sowmya et al., 2015; Spina et al., 2021) con algunas modificaciones. Los montajes se realizaron en medio basal de sales (MBS) de composición, 5,14 mM de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 2,84 mM de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 12,49 mM de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), 0,09 mM de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), 0,007 mM de sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 0,007 mM de sulfato de zinc heptahidratado ( $\text{ZnSO}_4 -$

7H<sub>2</sub>O), 0,007 mM de sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub>), 4,02 mM de fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), con adición de cloranfenicol 0,5 g/L y aforado con agua destilada. Cada montaje se realizó en Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de MBS por triplicado. Para los montajes de tratamiento se añadieron las perlas de LDPE como única fuente de carbono y como inóculo 10<sup>6</sup> esporas/mL de las cepas fúngicas, evaluadas por separado FOCIC01 y FECIC02. Como controles se realizó un montaje con glucosa al 1% e inóculo (control de crecimiento), MBS con inóculo sin fuentes de carbono, MBS con perlas de LDPE sin inóculo y MBS sin fuente de carbono ni inóculo. El tiempo de exposición fue de treinta días, en oscuridad a 25°C y sin agitación.

#### ***4.2.5 Caracterización y análisis del polietileno degradado***

##### **4.2.5.1 Análisis con microscopio electrónico de barrido**

Para confirmar la biodegradación del material, se realizó observación de las perlas de LDPE mediante la detección de imágenes de alta resolución con haz de electrones, utilizando un microscopio electrónico de emisión de campo FESEM (Apreo 2S LoVac, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.). Antes de realizar el análisis, las muestras fueron bañadas en oro por pulverización catódica debido a que las muestras no son conductoras por naturaleza (DSouza et al., 2021). Se tomaron imágenes en condiciones atmosféricas de alto vacío (10<sup>3</sup> a 10<sup>7</sup> mbar), con voltaje de aceleración de 2 a 10 kV, con detector de electrones secundarios (Everhart Thomley detector, ETD o T2) y detector de electrones retrodispersados (Back scattered electron detector, T1), para observar la morfología de las superficies de las perlas en aumentos de 150x, 2500x y 8000x. Para el montaje con FOCIC01, se realizó la visualización de perlas con el hongo y otras perlas a las que se les quitó la biomasa con lavados, utilizando agua destilada estéril y sonicador, 4 ciclos de 20 minutos cada uno.

#### **4.2.5.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)**

Las perlas de LDPE (muestra control y con FOCIC01) fueron lavadas con agua destilada estéril y sonicador, 4 ciclos de 20 minutos cada uno, antes de su análisis por FTIR (is50 FT-IR Nicolet, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.). Las muestras fueron analizadas en un rango de números de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Las señales en los espectros corresponden a grupos funcionales que están presentes en la muestra (DSouza et al., 2021; Sowmya et al., 2015; Spina et al., 2021).

#### **4.2.5.3 Cuantificación de proteínas totales en el secretoma**

La cuantificación de proteínas totales en el secretoma, en lugar del micelio, se fundamenta en el objetivo de evaluar específicamente las proteínas extracelulares secretadas por las cepas durante su interacción con el polietileno. Estas proteínas extracelulares son las principales responsables de los procesos de biodegradación y actúan directamente sobre los polímeros. Por otro lado, las proteínas intracelulares presentes en el micelio están mayormente asociadas a funciones metabólicas internas y estructurales. Para retirar la biomasa del sobrenadante, cada montaje se filtró por separado utilizando una bomba al vacío pasando por filtros de celulosa estériles de diámetro de 45 mm y tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$ , luego de 0,45  $\mu\text{m}$  y finalmente por 0,22  $\mu\text{m}$ , adquiridos en Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). Los filtros con la biomasa y el sobrenadante se guardaron en tubos falcón y se conservaron en  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La detección colorimétrica y la cuantificación de proteínas totales se midió directamente en los sobrenadantes utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) (Cortés-Ríos et al., 2020). Las proteínas del sobrenadante se concentraron utilizando el equipo Concentrador plus -Concentrador centrífugo (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se volvió a realizar la medición de proteínas.

#### **4.2.5.4 Separación de proteínas extracelulares por electroforesis**

La separación de las proteínas extracelulares obtenidas del secretoma de las cepas fúngicas se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de una dimensión, siguiendo la metodología reportada por Gallagher (2006) y Laemmli (1970) (Gallagher, 2006; LAEMMLI, 1970). Debido a la baja concentración de proteínas en las muestras, no fue posible realizar una electroforesis en gel bidimensional (2D-PAGE), siendo necesario optar por el método de una dimensión para la separación proteica. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% para la separación y un gel de apilamiento al 5%, empleando un buffer Tris-Glicina-SDS. El gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 para visualizar las bandas proteicas. Las bandas diferenciales asociadas a los tratamientos con LDPE fueron cortadas cuidadosamente. Posteriormente, los fragmentos de gel se sometieron a digestión enzimática con tripsina (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) para generar péptidos. El protocolo de digestión de proteínas con sus soluciones se encuentra en el **Apéndice J**. Los péptidos trípticos fueron suspendidos en 5  $\mu$ L de solución TA30, compuesta por un 30% de acetonitrilo y un 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) para su posterior identificación y análisis mediante espectrometría de masas. El acetonitrilo actúa como un disolvente orgánico que facilita la solubilización de los péptidos, mientras que el TFA contribuye a acidificar la solución, favoreciendo la estabilización y protonación de los péptidos (Côrtes et al., 2020).

#### **4.2.5.5 Espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción láser asistida por matriz**

A partir del sobrenadante de los montajes se realizó medición de polímeros y a partir de la digestión de proteínas se realizó la medición de péptidos. Las mediciones se realizaron con un UltrafleXtreme (UTX) MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonik, Bremen, Alemania). Se utilizó el

modo Reflectron donde el voltaje de la fuente ionizante del ion 1, el voltaje de la fuente del ion 2, el voltaje del reflector 1 y el voltaje del reflector 2 fueron 25 kV, 23 kV, 26,5 kV y 13,45 kV, respectivamente (Kuki et al., 2022). El agente ionizante fue el ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich/Merck, Alemania) utilizado para mejorar la formación de iones y la eficiencia del proceso de ionización/desorción. La matriz utilizada fue el ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) (Sigma-Aldrich/Merck, Alemania) (Gobom et al., 2001), se preparó en una solución saturada de acetonitrilo 50%. Se empleó la técnica *two-layer* para la preparación de las muestras en el análisis mediante MALDI-TOF (Dai et al., 1999; N. Zhang et al., 2001). Esta metodología consistió en la aplicación secuencial de matriz y muestra sobre el target metálico, depositando inicialmente una capa de matriz, seguida de la adición de la muestra y, finalmente, una segunda capa de matriz. Para este procedimiento, se utilizó HCCA como matriz en una relación de volumen de 2:1 matriz:muestra, con el fin de garantizar una adecuada desorción e ionización de las proteínas, considerando su baja concentración en las muestras. Esta proporción permitió optimizar la distribución homogénea de la muestra en la matriz, evitando la saturación y favoreciendo la obtención de señales intensas y reproducibles en los espectros. Los espectros fueron evaluados por FlexAnalysis software 3.4 (Bruker) (Liepold et al., 2023). Los espectros de masas de los péptidos obtenidos se compararon con los de las proteínas disponibles en la base de datos SwissProt del Mascot Server 3.0. El criterio de búsqueda fue digestión con tripsina, taxonomía “fungi” y “other fungi”, modificaciones fijas de carbamidometilo (C) (Lin et al., 2020; Sun et al., 2014; M. Yang et al., 2021; M. Zhang et al., 2021).

#### **4.2.6 Análisis estadístico**

Los experimentos descritos anteriormente se realizaron por triplicado. Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico utilizando análisis de varianza de una vía (ANOVA) para

determinar si existían diferencias significativas entre los grupos comparados en los distintos experimentos realizados. Este método permitió evaluar la influencia de un único factor categórico en una variable dependiente continua, analizando la variabilidad dentro y entre los grupos. Previo al ANOVA, se evaluaron los supuestos estadísticos correspondientes, la normalidad de los datos se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, mientras que la homocedasticidad se evaluó utilizando la prueba de Levene. En caso de incumplimiento de los supuestos, se consideraron transformaciones de datos o pruebas estadísticas no paramétricas como Kruskal-Wallis. Para este propósito, se empleó la herramienta estadística Stata/IC 14,2, se estableció un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$  para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas.

## 5. Resultados

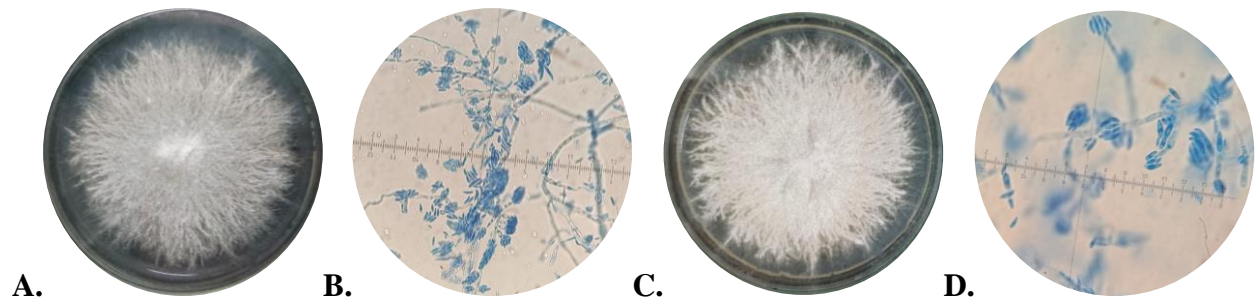
### 5.1 Reactivación fúngica y extracción de ADN

Las cepas utilizadas son hongos filamentosos del género *Fusarium* nativos del departamento de Santander, Colombia, aislados por la CIC en tuberías de polietileno usadas para la distribución de gas domiciliario en Colombia. La cepa FOCIC01 fue aislada de una tubería de MDPE (Polietileno de Media Densidad) que presentó biodegradación externa con 10 años de servicio. Por otra parte, la cepa FECIC02 fue aislada de una tubería de MDPE que presentó biodegradación externa con 30 años de funcionamiento. En la reactivación en PDA, se confirmó el género *Fusarium* de las dos cepas, por la forma filamentosa de color blanco de las colonias y las esporas fusiformes observadas en los montajes al microscopio entre lámina y laminilla con azul

de lactofenol (Figura 8). En morfología macro y microscópica no se ven diferencias significativas entre las dos cepas analizadas.

### Figura 8

#### *Reactivación de cepas fúngicas del género Fusarium*

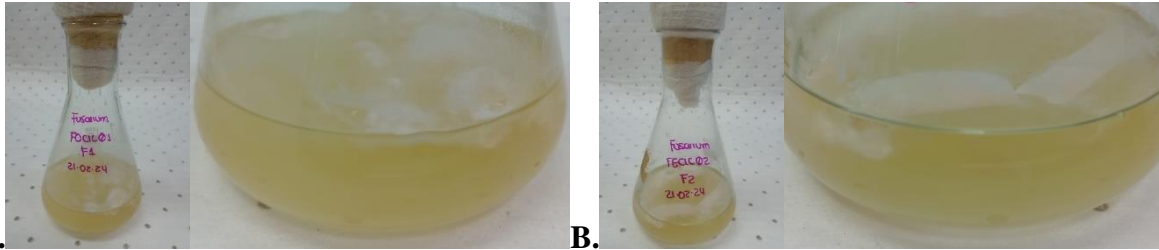


*Nota.* Crecimiento en medio PDA. Observación en microscopio óptico de luz visible con aumento de 40X, líquido de montaje azul de lactofenol. A. FOCIC01, colonia filamentososa de color blanco. B. FOCIC01, se observan hifas hialinas septadas con esporas fusiformes. C. FECIC02, colonia filamentososa de color blanco. D. FECIC02, se observan hifas hialinas septadas con esporas fusiformes.

Por otra parte, en el medio líquido de extracto de levadura y sacarosa, se evidenció formación de micelio de color blanco sobre la superficie, como se observa en la Figura 9. En la verificación de la calidad y concentración del ADN de cada cepa, se evidenció que la cepa FOCIC01 presentó una concentración de ADN de 129,7 ng/ $\mu$ L y para FECIC02 fue de 143,65 ng/ $\mu$ L, las dos presentaron ausencia de proteínas y sales (A260/280 y A260/A230 respectivamente).

**Figura 9**

*Crecimiento de las cepas fúngicas en medio líquido para extracción de ADN*



*Nota.* Crecimiento en medio líquido extracto de levadura sacarosa sin agitación. A. FOCIC01, turbidez del medio y formación de micelio color blanco sobre el medio. B. FECIC02, turbidez del medio y formación de micelio color blanco sobre el medio.

**5.2 Caracterización genómica**

**5.2.1 Secuenciación y ensamble**

En las secuencias largas obtenidas de Nanopore, luego de aplicar la herramienta Porechop, se obtuvo un total de 346.823 lecturas para FOCIC01 y 262.956 para FECIC02 (Tabla 1). FOCIC01 presentó un 25% más de lecturas y bases, generando una mayor cobertura (35,3x) en comparación de FECIC02 (25,6x).

**Tabla 1**

*Estadísticas de Nanoplot de las lecturas de las cepas de Fusarium con Nanopore*

Nanopore	FOCIC01	FECIC02
<b>Porechop</b>		
Número de lecturas	346.823	262.956
Número de bases (bp)	1.793.678.132	1.338.218.843
Longitud mediana de lectura (kb)	4.740	4.429
Longitud media de lectura (kb)	5.171	5.089

<b>Nanopore</b>	<b>FOCIC01</b>		<b>FECIC02</b>	
N50 (kb)	6.882		7.328	
>Q10	208.762 (60,2%)	1.079,5Mb	156.296 (59,4%)	797,3 Mb

*Nota.* Esta tabla comparativa presenta datos de calidad de secuencias de Nanopore para FOCIC01 y FECIC02. El N50 indica el tamaño de la lectura más pequeña (longitud) en el conjunto de lecturas acumuladas que constituye al menos el 50% del total de la longitud de las lecturas. El Q10 está asociado con la precisión de las bases de las lecturas. Indica que el 90% de las bases tienen una precisión de al menos el 90%.

La comparación de los datos del ensamble del genoma completo tanto por Nanopore como por Illumina para las cepas FOCIC01 y FECIC02 se presentan en la Tabla 2. Para las dos cepas se evidenció que el ensamble con Flye (Nanopore) genera un número menor de contigs en comparación con el ensamble en SPAdes (Illumina), lo que sugiere que Flye logra ensamblajes más continuos y largos. Lo anterior, se confirma con el valor de N50 siendo mayor con Nanopore, demostrando menor fragmentación. La composición GC fue similar entre los ensamblajes para ambas cepas, lo que sugiere que no hubo diferencia en la repartición de los nucleótidos durante el ensamblaje.

**Tabla 2**

*Información estadística del ensamblaje del genoma de las cepas de Fusarium*

<b>Cepas fúngicas</b>	<b>FOCIC01</b>		<b>FECIC02</b>	
<b>Ensamblador</b>	<b>Nanopore Flye</b>	<b>Illumina SPAdes</b>	<b>Nanopore Flye</b>	<b>Illumina SPAdes</b>
<b>Quast</b>				
Número de contigs	32	390	31	354
Longitud Total (bp)	45.733.580	44.944.831	46.373.917	45.329.841

Cepas fúngicas	FOCIC01		FECIC02	
	Nanopore Flye	Illumina SPAdes	Nanopore Flye	Illumina SPAdes
N50 (bp)	4.691.589	853.861	4.079.611	1.011.135
L50	5	19	5	17
GC (%)	47,57%	48,09%	47,75%	47,77%
<b>BUSCO - Fungi_odb10 (758)</b>				
Completos (%)	89% (675)	99,5% (754)	87,7% (665)	99,5% (754)
Singulares (%)	88,9% (674)	99,2% (752)	87,7% (665)	99,2% (752)
Duplicados (%)	0,1% (1)	0,3% (2)	0,0% (0)	0,3% (2)
Fragmentados (%)	2% (15)	0,0% (0)	2,4% (18)	0,0% (0)
Ausentes (%)	9% (68)	0,5% (4)	9,9% (75)	0,5% (4)
<b>BUSCO - Ascomycota_odb10 (1706)</b>				
Completos (%)	85,6% (1460)	98,9% (1688)	83,7% (1428)	98,9% (1688)
Singulares (%)	85,4% (1457)	98,6% (1682)	83,6% (1426)	98,6% (1682)
Duplicados (%)	0,2% (3)	0,4% (6)	0,1% (2)	0,4% (6)
Fragmentados (%)	2% (34)	0,2% (3)	5,7% (98)	0,2% (3)
Ausentes (%)	12,4% (212)	0,9% (15)	10,6% (180)	0,9% (15)

*Nota.* Esta tabla muestra las diferencias entre las dos cepas de *Fusarium* y los ensamblajes para secuencias largas (Nanopore) y cortas (Illumina). El predictor de genes en BUSCO fue Augustus. Los números que se encuentran entre paréntesis corresponden al número de genes. El L50 indica el número mínimo de contigs necesarios para cubrir al menos el 50% del tamaño total del genoma ensamblado.

De forma adicional, se utilizó el pipeline MpGAP para las secuencias largas del FOCIC01, con el fin de verificar cuál ensamblador y cuál herramienta de pulido podrían mejorar la calidad del genoma ensamblado, para futuros estudios que solo cuenten con secuencias de Nanopore. El paso a paso y la tabla comparativa entre los ensambladores con los resultados estadísticos básicos se encuentran en el **Apéndice I**. Los mejores ensambladores fueron Flye y Canu con Medaka como herramienta de pulido, en la Tabla 3 se detalla la información estadística de Flye con Medaka. Se resalta la importancia del pulido mejorando la integridad del genoma, representado en un aumento de la puntuación dada por BUSCO para los genes completos alcanzando un 99,3%, pasando de 15 genes fragmentados a 0 y de 68 genes ausentes a solo 5.

**Tabla 3**

*Información estadística del ensamblaje del genoma de FOCIC01 con Flye+Medaka*

Características	FOCIC01 (Flye+Medaka)
<b>Quast</b>	
Número de contigs	11
Longitud Total (bp)	45.552.433
N50 (bp)	4.714.756
L50	5
GC (%)	47,59%
<b>BUSCO - Fungi_odb10 (758)</b>	
Completos (%)	99,3% (753)
Singular (%)	98,9% (750)
Duplicado (%)	0,4% (3)

Características	FOCIC01 (Flye+Medaka)
Fragmentados (%)	0,0 % (0)
Ausentes (%)	0,7% (5)

*Nota.* El predictor de genes en BUSCO fue Augustus. Los números que se encuentran entre paréntesis corresponden al número de genes.

A partir de las secuencias genómicas ensambladas de las cepas FOCIC01 y FECIC02, se utilizó la herramienta NCBI BLAST+blastn con el algoritmo megablast, empleando la base de datos genómica de NCBI actualizada al 15 de agosto de 2024. Este análisis permitió realizar una búsqueda de alta precisión contra secuencias depositadas en la base de datos, optimizando la identificación taxonómica. Los resultados obtenidos indicaron que ambas cepas pertenecen al complejo *Fusarium oxysporum*. En particular, FOCIC01 presentó similitud genética con *Fusarium oxysporum* Fo47, mientras que FECIC02 mostró correspondencia con *Fusarium oxysporum* cepa Fo5176. Sin embargo, el tamaño del genoma de la cepa FOCIC01 no coincide con el tamaño de la secuencia de referencia registrada en el NCBI (GCF\_013085055.1). En el **Apéndice K** se presentan los datos asociados a los genomas que se encuentran registrados en el NCBI, para las dos cepas, donde se puede detallar la variación de los tamaños de los genomas y lo reciente de su publicación (entre 2020 y 2024). En el **Apéndice L** se encuentra el árbol filogenético realizado con la herramienta de UniProt, con la alineación de la secuencia de 18S de 30 diferentes especies fúngicas. Del género *Fusarium* se incluyeron las especies, *Fusarium oxysporum*, *F. oxysporum f.sp. cubense R1*, *F. oxysporum NRRL32931*, *F. oxysporum f.sp. rapae*, *F. oxysporum Fo5176*, *F. oxysporum f.sp. cubense R4*, *F. oxysporum f.sp. raphani*, *F. oxysporum f.sp. conglutinans*, *F. oxysporum f.sp. radialis cucumerinum*, *F. oxysporum f.sp. lycopersici*, *Fusarium gaditjirri*, *Fusarium acutatum*, *Fusarium agapanthi*, *Fusarium phyllophilum*, *Fusarium xylarioides*,

*Fusarium globosum*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium musae*, *Fusarium mundagurra*, *Fusarium pseudociccinatum*, *Fusarium redodens*, *Fusarium austroafricanum*, *Fusarium beoniforme*, *Fusarium poae*, y de otros géneros, *Beauveria bassiana*, *Cordyceps*, *Trichodema asperellum*, *Trichoderma aggressivum* y *Trichodemas harzianum*.

### 5.2.2 Anotación genética y proteica

La anotación del genoma se realizó utilizando el software Augustus, lo que permitió predecir las secuencias génicas y proteicas. A partir de las secuencias proteicas obtenidas, se emplearon las herramientas InterProScan y dbCAN2 para identificar dominios funcionales, familias de proteínas y enzimas relacionadas con la degradación de carbohidratos, incluyendo posibles enzimas implicadas en procesos de biodegradación. En el **Apéndice M** (FOCIC01) y **Apéndice N** (FECIC02) se encuentra el listado de proteínas, estos archivos están organizados por 12 columnas (de la A a L), cada columna representa lo siguiente: columna A: identificador de la proteína, representa el identificador único de la secuencia de proteína que fue analizada. Columna B: longitud de la proteína, indica el número de aminoácidos que conforman la proteína analizada. Columna C: base de datos de origen, como colis, FunFam, Gene3D, Hamap, MobiDBLite, PANTHER, Pfam, PIRSF, PRINTS, ProSitePatterns, SFLD, SUPERFAMILY o TIGRFAM. Columna D: ID del dominio o familia, código único asociado al dominio o familia anotada dentro de la base de datos específica. Columna E: descripción del dominio o familia. Columna F: inicio del dominio dentro de la proteína, posición del aminoácido en la proteína donde comienza el dominio anotado. Columna G: fin del dominio dentro de la proteína, posición del aminoácido en la proteína donde termina el dominio anotado. Columna H: E-value (valor esperado), representa la significancia estadística de la anotación; valores más pequeños indican mayor confianza. Columna I: ID del dominio en InterPro, código único asignado por InterPro para identificar el

dominio o familia anotada. Columna J: descripción del dominio en InterPro, descripción funcional del dominio según la anotación de InterPro. Columna K: términos GO (Gene Ontology), contiene términos de Gene Ontology asociados con la anotación, que describen las funciones biológicas, procesos celulares o componentes celulares relacionados con la proteína. Columna L: ruta metabólica asociada. Resaltados en amarillo se encuentran las cutinasas, enzimas asociadas a biodegradación de plásticos. De 13 proteínas con descripción de cutinasa, 6 presentan términos GO: GO:0005576, correspondiente a región extracelular y GO:0050525 de actividad cutinasa, ninguna presenta ruta metabólica asociada.

Para complementar la anotación funcional obtenida con InterProScan, se utilizó la herramienta dbCAN3, un recurso especializado en la identificación de enzimas asociadas a la degradación de carbohidratos (CAZymes, por sus siglas en inglés). La predicción de las proteínas extracelulares identificadas por el péptido señal (SignalP) con las tres herramientas (HMMER, DIAMOND y dbCAN\_sub) a partir del genoma completo mediante la herramienta dbCAN3 se encuentran registradas en el **Apéndice O** para FOCIC01 y **Apéndice P** para FECIC02.

Algunas de las familias de enzimas y dominios dentro del sistema de clasificación CAZY (Carbohydrate-Active enZymes), que agrupa proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, en este caso extracelular. Se evidenciaron enzimas auxiliares (AA, auxiliary activities), que participan en la modificación o degradación de carbohidratos, principalmente actuando sobre enlaces lignocelulósicos. Incluyen enzimas oxidorreductasas, como lacasas y peroxidasas, que facilitan la degradación de materiales complejos (Levasseur et al., 2013). Enzimas carbohidrato esterasas (CE), estas enzimas eliminan grupos acetilo u otros sustituyentes de los carbohidratos. Actúan rompiendo enlaces éster, facilitando el acceso de otras enzimas a las cadenas principales de polisacáridos (Cantarel et al., 2009). Las glucosido hidrolasas (GH), son

hidrolasas que rompen enlaces glicosídicos en carbohidratos complejos. Incluyen enzimas como celulasas, xilanasas y quitinasas, que degradan polisacáridos a azúcares más simples (Cantarel et al., 2009). Las glicosil transferasas (GT), estas enzimas participan en la síntesis de enlaces glicosídicos, transfiriendo azúcares activados a otras moléculas, lo que permite la formación de carbohidratos y otras estructuras glicosiladas (Cantarel et al., 2009). Las liasas de polisacáridos (PL), son enzimas que rompen enlaces glicosídicos de forma no hidrolítica, es decir, mediante reacciones que generan productos insaturados. Estas enzimas suelen actuar sobre polisacáridos como pectinas y alginatos (Cantarel et al., 2009).

A nivel cuantitativo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre el número de proteínas extracelulares en los grupos de enzimas AA, CE, GH, GT y PL entre las dos cepas FOCIC01 y FECIC02. Esto demuestra que a nivel de péptido señal las dos cepas presentan perfiles proteómicos similares en los grupos enzimáticos evaluados, con solo una ligera diferencia en el grupo PL (25 vs. 26), en donde FECIC02 presenta una proteína adicional que no es estadísticamente relevante. De estos grupos enzimáticos se filtró la búsqueda de las enzimas asociadas a biodegradación de materiales poliméricos, específicamente polietileno (Tabla 4). Las dos cepas presentaron en su genoma enzimas similares, como lacasas, peroxidasa, monooxigenasas, oxidoreductasas y cutinasas.

#### **Tabla 4**

##### *Enzimas asociadas a biodegradación de plásticos*

<b>Enzimas principales</b>	<b>Clasificación numérica</b>
Lacasas y otras multicobre oxidasas	EC 1.10.3.2
Peroxidasa	EC 1.11.1.-

Monooxigenasas (oxidación terminal)	EC 1.14.99.56
Monooxigenasa (oxidación sub-terminal)	EC 1.14.99.54
Alcohol oxidasa	EC 1.1.3.13
Cutinasas	EC 3.1.1.74

*Nota.* Los números EC son un sistema de clasificación numérica para las enzimas, basado en las reacciones químicas que catalizan. Las que inician con EC1 corresponden a oxidorreductasas y las EC3 a hidrolasas.

Las enzimas de interés fueron buscadas en la secuencia de aminoácidos de cada cepa y luego buscadas en base de datos. Debido a que en el Blastp del NCBI aparecieron algunas como proteínas sin caracterizar de *Fusarium oxysporum*, se complementó con la herramienta de UniProt. Se seleccionaron tres enzimas identificadas como EC1.10.3.2 (lacasas) encontradas tanto en la secuencia de FOCIC01 como en FECIC02, con una identidad del 100% con proteínas registradas en *Fusarium oxysporum*, (Tabla 5). De estas tres, una correspondió a Lacasa abr2, otra a Transporte de hierro oxidasa multicobre FET3 y la otra a una proteína no caracterizada. Los genes asociados fueron FOXYS1\_4104, FOXYS1\_7607 y FOXYS1\_14571 respectivamente.

**Tabla 5**

*Laccasas extracelulares EC1.10.3.2 en las cepas de Fusarium oxysporum evaluadas*

Ubicación ID	Longitud	UniProt (100%)	Nombre de la proteína	Gen <i>Fusarium oxysporum</i>
<b>FOCIC01</b>				
Scaffold_5.g2142	607 aa	A0A8H5AGR1	Lacasa abr2	FOXYS1_4104
<b>FECICI02</b>				
FEScaffold_1.g530				

---

<b>FOCIC01</b>				
Scaffold_28.g9382	623 aa	A0A420SYZ7	Proteína no caracterizada	FOXYS1_7607
<b>FECICI02</b>				
FEScaffold_26.g9936				

---

<b>FOCIC01</b>				
Scaffold_24.g8551	581 aa	A0A420QJ33	Transporte de hierro oxidasa	FOXYS1_14571
<b>FECICI02</b>				
FEScaffold_37.g11625				
multicobre FET3				

---

*Nota.* aa: Aminoácidos. Lacasa, actividad oxidorreductasa. Identidad del 100%.

Teniendo en cuenta que las secuencias de cada lacasa son exactamente iguales para las dos cepas, se seleccionó la cepa FOCIC01, para realizar el alineamiento de las tres lacasas EC1.10.3.2 con el fin de identificar similitudes o diferencias (Figura 10). Los resultados revelan la presencia de regiones conservadas que podrían estar asociadas con la funcionalidad catalítica típica de estas enzimas, así como regiones variables que sugieren adaptaciones específicas o posibles especializaciones funcionales. Además, se evidenció una diferencia en el número de aminoácidos entre las tres lacasas: 607, 623 y 581 residuos, respectivamente. Estas variaciones podrían influir en la estructura tridimensional, la estabilidad y la eficiencia catalítica de las enzimas.

En el análisis de las proteínas extracelulares de las cepas evaluadas, se identificó una peroxidasa extracelular (EC1.11.1.-) en ambas cepas de *Fusarium oxysporum* evaluadas. Las dos peroxidasas presentan una longitud de 510 aminoácidos y la misma secuencia de la proteína A0A420PMK0 de *F. oxysporum* registrada en UniProt (Tabla 6). El gen asociado fue FOXYS1\_9434.

Tabla 6

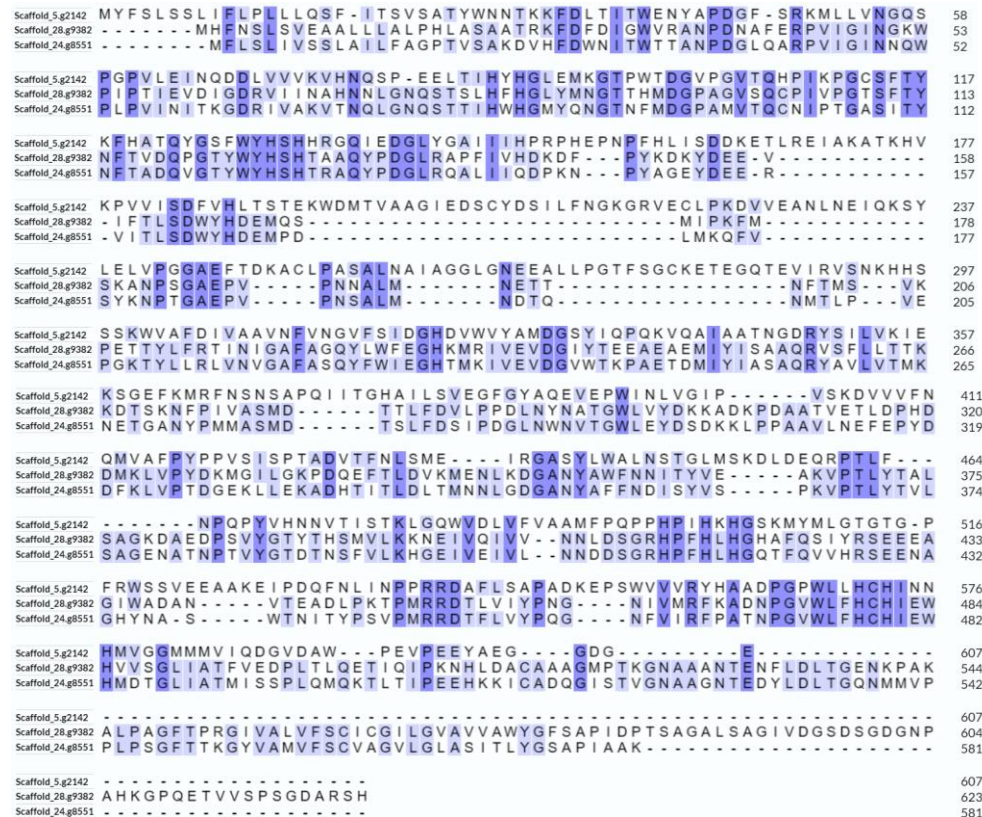
*Peroxidasa extracelular en las cepas de Fusarium oxysporum evaluadas*

Ubicación ID	Longitud / Masa	UniProt (100%)	Gen
			<i>Fusarium oxysporum</i>
<b>FOCIC01</b>			
Scaffold_2.g691	510 AA	A0A420PMK0	FOXYS1_9434
<b>FECICI02</b>	55,1 kDa		
FEScaffold_11.g5155			

Nota. Peroxidasa, EC1.11.1.-. Identidad del 100%.

Figura 10

*Alineamiento de las lacasas EC1.10.3.2 de FOCIC01*



*Nota.* Las regiones conservadas están resaltadas en tonos más oscuros, indicando alta similitud entre las secuencias, mientras que las regiones variables muestran diferencias en la composición de aminoácidos. Se observan diferencias en la longitud de las secuencias: 607 aa, 623 aa y 581 aa, lo que sugiere posibles variaciones en la estructura y función de las enzimas.

Asimismo, se identificaron varias cutinasas (EC3.1.1.74). En la Tabla 7 se presentan cuatro cutinasas encontradas en las dos cepas fúngicas. Las cutinasas presentan longitudes que varían entre 230 y 253 aminoácidos, con masas moleculares entre 23,3 kDa y 27,4 kDa. Al comparar las proteínas con la base de datos UniProt, se obtuvo una identidad del 100%, correspondiendo a las proteínas A0A8H5EPA3 (gen FOXYS1\_1321), A0A2H3TNX8 (gen FOXYS1\_10592), A0A420PA43 (gen FOXYS1\_9647) y A0A420S0V9 (gen FOXYS1\_6706). Cabe resaltar que la última proteína no se encuentra caracterizada. Estas enzimas pertenecen a la familia CE5 (esterasas de carbohidratos) y están relacionadas con procesos de degradación de polímeros y sustratos complejos, como la cutina y el polietileno.

**Tabla 7**

*Cutinasas extracelulares en las cepas de Fusarium evaluadas*

Ubicación ID	Longitud / Masa	UniProt (100%)	Gen <i>Fusarium oxysporum</i>
<b>FOCIC01</b>			
Scaffold_12.g5010	231 aa	A0A8H5EPA3	FOXYS1_1321
<b>FECICI02</b>			
FEScaffold_14.g6180	24,5 kDa		
<b>FOCIC01</b>			
Scaffold_31.g9976	230 aa 23,3 kDa	A0A2H3TNX8	FOXYS1_10592

Ubicación ID	Longitud / Masa	UniProt (100%)	Gen <i>Fusarium oxysporum</i>
<b>FECIC02</b>			
FEScaffold_24.g9376			
<b>FOCIC01</b>			
Scaffold_70.g13407	234 aa	A0A420PA43	FOXYS1_9647
<b>FECIC02</b>			
	24,3 kDa		
FEScaffold_65.g13825			

*Nota.* aa: aminoácidos. CE5: esterasas de carbohidratos. Cutinasa, EC3.1.1.74. *Fusarium oxysporum* (marchitez vascular). Identidad del 100%.

Con el fin de comparar si existían diferencias entre las tres enzimas cutinasas (EC3.1.1.74), se realizó un alineamiento de sus secuencias de aminoácidos. En la Figura 11, se observa que las tres enzimas presentan regiones altamente conservadas, lo que sugiere una estructura central similar y posiblemente una función catalítica compartida. Las diferencias observadas podrían estar asociadas a variaciones en la eficiencia de la actividad enzimática, estabilidad estructural o interacción con el sustrato. Estas observaciones refuerzan la hipótesis de que, aunque las tres enzimas pertenecen a la misma familia funcional, presentan características individuales que podrían influir en su desempeño frente a diferentes sustratos poliméricos.

**Figura 11**


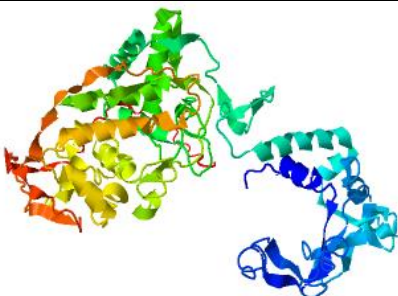
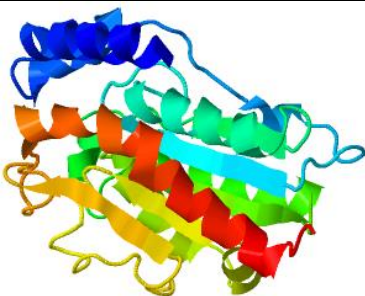
*Alineamiento de las cutinasas EC3.1.1.74 de FOCIC01*

Scaffold_12.g5010	MRAAFILSFLLASATALPTASTEKRAVAQAQDVNLLLETRDLLNRNDLENGDSSNCPTAIL	59
Scaffold_31.g9976	MKFSIISTLLAATASALPAGQDAAALEA-----RQLGGSITRNDLANGNSGSCPGVIF	53
Scaffold_70.g13407	MKFI AVL SFFAAASVALPTSNSPSELEVRAE-LEERQSGSITRDDLSNGASSACPPVIF	58
Scaffold_12.g5010	VYARGSTEPGNLGITVGPILVEA--MQLAIPDIWIQGVGGPYTADLAPNFLPEGTTDAS	116
Scaffold_31.g9976	IYARGSTESGNLGTL-GPRVASKLEAKYGKNGVWIQGVGGAYRATLGDNALPRGTSSAA	111
Scaffold_70.g13407	IYARGSTELGNLGTL-GPRVASVLESNYGSGVWVWIQGVGGAYRATLGDNALPRGTSSAA	116
Scaffold_12.g5010	IDEAKRLEFQMA YDKC P DTPVVTA GYSQGT VVVGYAL SELEGAVQNQVVGAA LFGYTKNE	175
Scaffold_31.g9976	IREMLGHFN DANQKCP DAVLIAGGYSQGAALAAASVTDVDAGIREK IAGVVLFGYTKNL	170
Scaffold_70.g13407	IREMIGLEFN LANSKCP SAKIVAGGYSQGAALAAASIEDLSTAVRNKVVGTVLFYTKNL	175
Scaffold_12.g5010	QLGGRI PDYPTDRTKIFCLPTDLVCDGTLFILPAHFLYGADA AVPGPEFLVGGI IQK--	231
Scaffold_31.g9976	QNRGKIPSY PEDRTKVF CNTGDLVCTGSLIVAAPHLAYQSAASGAAP EFLIQKADAAGA	229
Scaffold_70.g13407	QNLGRIPNY PRERTLVFCNIGDLVCTGSLIVAAPHLAYQSDASGPAPQFLIQRVAATS I	234
Scaffold_12.g5010	-	231
Scaffold_31.g9976	A	230
Scaffold_70.g13407	-	234

*Nota.* Las primeras secuencias de cada proteína (los primeros ~30 residuos) corresponden a la región del péptido señal.

En la búsqueda de enzimas de interés biotecnológico para la biodegradación de plásticos, específicamente polietileno, se seleccionó una enzima extracelular de cada familia para el modelamiento estructural mediante la herramienta I-TASSER, con el fin de predecir su estructura tridimensional (Tabla 8). Las enzimas seleccionadas incluyen una lacasa de 607 aminoácidos (EC1.10.3.2), una peroxidasa de 510 aminoácidos (EC1.11.1.-) y una cutinasa de 230 aminoácidos (EC3.1.1.74). Esto no quiere decir que sean las únicas enzimas asociadas a este proceso de biodegradación, es posible que existan otras enzimas como hidrolasas, lipasas y/o proteasas que se encuentren presentes en el genoma, así como algunas otras enzimas que no estén identificadas o sin caracterizar. El listado de enzimas extracelulares se encuentra en el Apéndice M (FOCIC01) y Apéndice N (FECIC02).

**Tabla 8**
*Modelamiento de enzimas de interés biotecnológico en la biodegradación de plásticos*

Lacasa	Peroxidasa	Cutinasa
		
C-score=-1.83	C-score=-1.19	C-score= 0.39
TM-score = 0.49±0.15	TM-score = 0.57±0.15	TM-score = 0.77±0.10
RMSD = 12.2±4.4Å	RMSD = 10.1±4.6Å	RMSD = 4.8±3.1Å

*Nota.* C-score (Coordinate-dependent score) suele estar en el rango de [-5 a 2], donde una puntuación C de valor más alto significa un modelo con una alta confianza y viceversa. TM score: (Template Modeling score) es una métrica que indica el grado de similitud entre la estructura predicha y la estructura de referencia o plantilla. RMSD (Root Mean Square Deviation) mide el promedio de la diferencia de posiciones entre los átomos correspondientes en la estructura predicha y la estructura experimental. Un RMSD bajo (<2 Å) indica que la estructura predicha es muy similar a la experimental.

El modelamiento tridimensional de las enzimas seleccionadas mediante I-TASSER arrojó valores específicos de C-score, TM-score y RMSD para cada una, los cuales permiten evaluar la calidad y confiabilidad de las predicciones estructurales (Tabla 8). La lacasa presentó un C-score de -1.83, un TM-score estimado de 0.49±0.15 y un RMSD de 12.2±4.4 Å. Estos valores sugieren una estructura predicha con moderada confianza, indicando cierta variabilidad en el modelo generado. Por otro lado, la peroxidasa mostró un C-score de -1.19, un TM-score de 0.57±0.15 y un RMSD de 10.1±4.6 Å, lo que representa un modelo con mayor estabilidad y precisión en

comparación con la lacasa. La cutinasa presentó los mejores valores entre las tres enzimas, con un C-score positivo de 0.39, un TM-score de  $0.77 \pm 0.10$  y un RMSD de  $4.8 \pm 3.1$  Å, lo que sugiere una estructura predicha de alta calidad y confiabilidad.

### **5.3 Evaluación de la biodegradación de polietileno**

La biodegradación de LDPE por las cepas nativas de *Fusarium oxysporum* se evaluó mediante su capacidad de colonizar y modificar físicamente y químicamente las perlas de LDPE en 30 días de incubación. Los resultados mostraron que la cepa FOCIC01 presentó una colonización mayor en las perlas de LDPE en comparación con FECIC02, lo que indica un mayor potencial degradativo en menor tiempo. En los controles, en los que se incluyeron medios sin inóculo y medios con LDPE sin inóculo, no se observó crecimiento fúngico, confirmando que la colonización fue exclusivamente atribuible a la actividad metabólica de las cepas evaluadas. Debido a la extensa colonización observada en FOCIC01, los análisis de cambios físicos y químicos en las perlas de LDPE se realizaron específicamente con esta cepa, utilizando como referencia el control correspondiente.

#### **5.3.1 Caracterización y análisis de las perlas de polietileno**

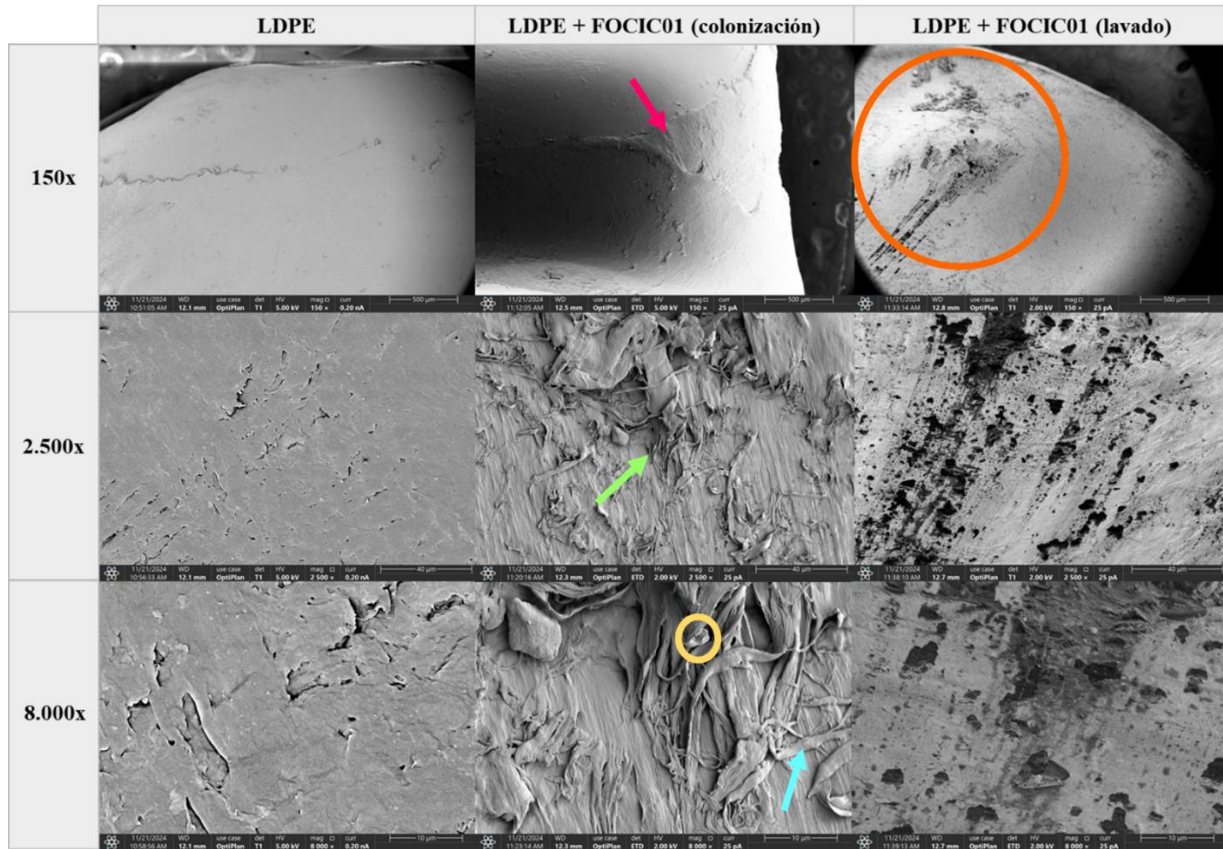
##### **5.3.1.1 Análisis con microscopio electrónico de barrido**

El cambio en la morfología de la superficie de las perlas de LDPE después de 30 días de incubación se observó mediante microscopía electrónica (Figura 12). Los aumentos seleccionados fueron 150x, 2500x y 8000x. Las perlas control sin inoculación presentaron una superficie homogénea, sin alteraciones. Las superficies de las perlas inoculadas con FOCIC01 presentaron colonización fúngica visible desde el aumento de 150x (Figura 12, flecha fucsia). En aumentos mayores se logró identificar estructuras como esporas (Figura 12, círculo amarillo), hifas (Figura

12, flecha celeste) y micelio (Figura 12, flecha verde). Se visualizó una perla lavada retirando la biopelícula, con evidencia de picaduras, oquedades y grietas (Figura 12, círculo naranja).

**Figura 12**

*Microfotografías de las perlas de polietileno finalizado el tiempo de incubación*

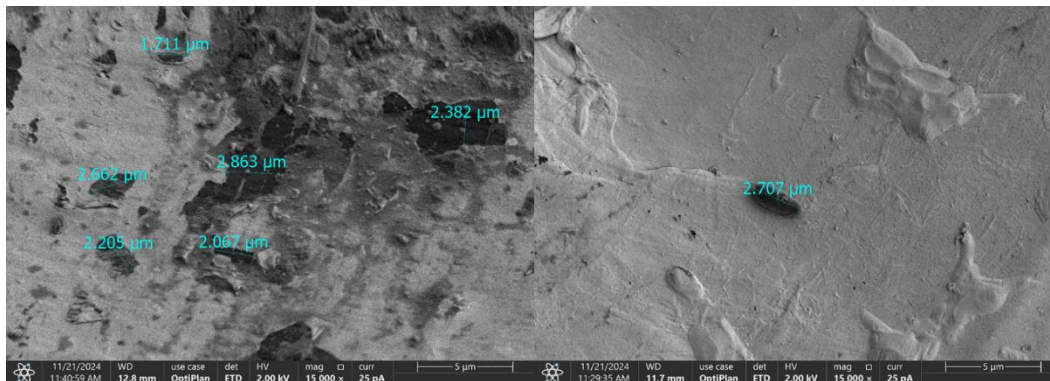


*Nota.* Observación en SEM. Las columnas corresponden a los montajes y las filas a los aumentos. LDPE: montaje correspondiente a las perlas de LDPE en el MBS sin inóculo fúngico, se observa la estructura natural del polímero. LDPE+FOCIC01: montaje con perlas de LDPE y esporas fúngicas de la cepa FOCIC01, se observó colonización (flecha fucsia), con esporas (círculo amarillo), hifas (flecha celeste) y micelio (flecha verde). Se visualizó una perla lavada retirando la biopelícula, con evidencia de picaduras, oquedades y grietas (círculo naranja).

Para la perla que se le retiró la biomasa, se evidenció grietas, desgaste, agujeros, picaduras y erosión. El diámetro de las picaduras fue variable entre 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$  (Figura 13). En otra zona de esa misma perla se observó una espora del hongo de longitud de 2,707  $\mu\text{m}$  (Figura 13).

**Figura 13**

*Microfotografías de perlas de polietileno colonizadas por FOCIC01 luego del lavado*



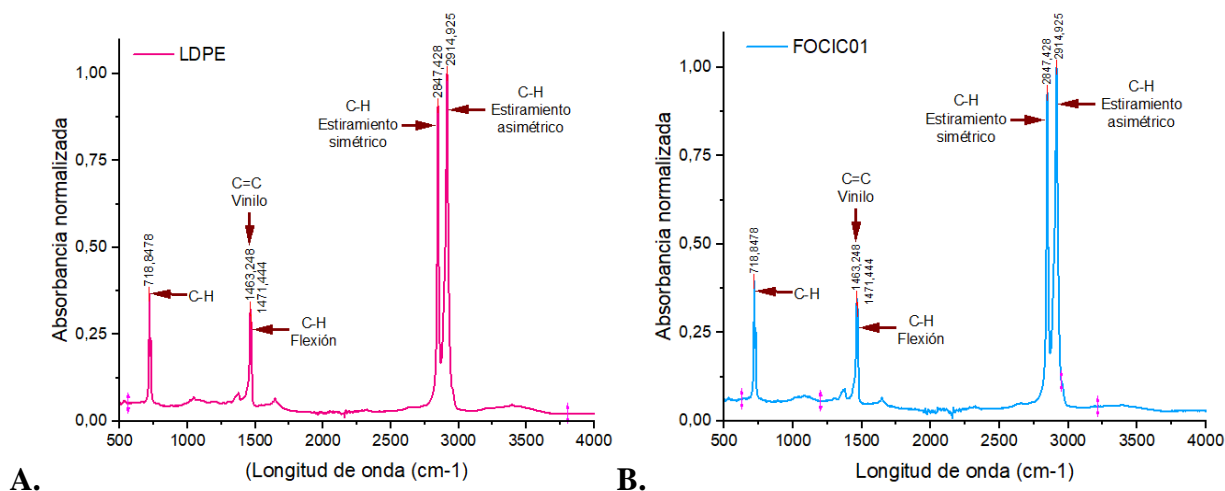
*Nota.* Imágenes que muestran las LDPE posterior al lavado. Se evidencian picaduras sobre la superficie con diámetro variable entre 1 µm a 3 µm. En otra zona de esa misma perla se observó una espora del hongo de longitud de 2,707 µm.

**5.3.1.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier**

Los cambios en la estructura química de la superficie de la perla de LDPE se determinaron mediante espectroscopía FTIR con un rango de frecuencia de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , los datos se procesaron utilizando OriginLab. En la Figura 14 se muestran los espectros FTIR de las perlas de LDPE control sin inoculación (Figura 14A) y las perlas inoculadas con esporas de *Fusarium oxysporum* FOCIC01 (Figura 14B). Las señales de absorción de los espectros indican el grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) del polietileno en las proximidades de 2.914  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento asimétrico -CH), 2.847  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento simétrico -CH), 1.463  $\text{cm}^{-1}$  (curvatura simétrica) y 718  $\text{cm}^{-1}$ . Además, se detectó el grupo vinilo ( $\text{C}=\text{C}$ ) del aditivo erucamida en la señal de 1.463  $\text{cm}^{-1}$ .

**Figura 14**

*Espectros FTIR de perlas de polietileno de baja densidad*



*Nota.* Los grupos funcionales de las señales de los espectros se encuentran señalados con flechas rojas. A. Espectro de la perla LDPE control sin inóculo. B. Espectro de la perla LDPE con inóculo de FOCIC01

El análisis espectroscópico por FTIR no mostró diferencias significativas entre el espectro del LDPE control y el expuesto a *Fusarium oxysporum* FOCIC01. Luego de la normalización de los datos de absorbancia, se observó un leve cambio en la intensidad de las señales correspondientes a los grupos metileno (-CH<sub>2</sub>), lo que sugiere modificaciones superficiales en la estructura del polímero. Sin embargo, no se detectaron señales nuevas que evidencien la formación de grupos funcionales adicionales. Es posible que la medición se haya realizado en regiones donde los cambios químicos no fueron lo suficientemente notorios, sin descartar la ocurrencia de transformaciones sutiles o procesos de oxidación en otras áreas del material.

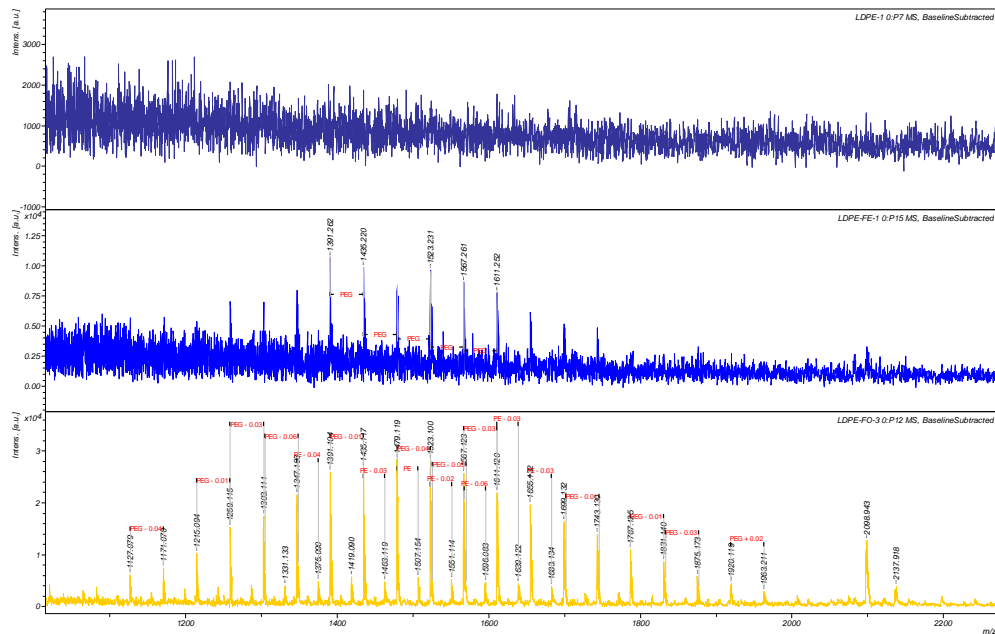
### 5.3.1.3 Espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción láser asistida por matriz

En la Figura 15 se muestran los espectros de masas obtenidos mediante MALDI-TOF de los polímeros evaluados en el sobrenadante de los montajes de biodegradación. Los espectros correspondientes al montaje control, que incluyen únicamente las perlas de LDPE y MBS sin esporas fúngicas, no presentan señales detectables en el rango analizado, lo que confirma la

ausencia de actividad o degradación espontánea en estas condiciones. En contraste, los montajes que incluyen las cepas de *Fusarium oxysporum* muestra un espectro de masas cuyas señales se encuentran equidistantes entre sí, claramente definidos con un patrón en forma de campana de Gauss en el rango de 1.100 a 2.000  $m/z$ . La forma de campana de Gauss es debido a la distribución isotópica natural de los fragmentos químicos presentes (principalmente carbono, oxígeno e hidrógeno). Esto es consistente con el patrón del espectro de masas de un polímero homogéneo. Cada unidad repetitiva tuvo una masa molecular de 44 Da. Esto genera un patrón característico en el espectro, con señales separadas regularmente por aproximadamente 44 unidades de  $m/z$  correspondiente posiblemente a polietilenglicol (PEG) (Kuki et al., 2022; X. Lou et al., 2022). En el caso de la cepa FOCIC01, adicionalmente al PEG, se observó la presencia de oligómeros o fragmentos de polietileno asociado a unidades repetitivas de etileno ( $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$ ) aunque con señales menos intensas, cada unidad repetitiva tuvo una masa molecular de 28 Da (Payne & Grayson, 2018), lo que podría indicar un mecanismo degradativo adicional o más eficiente en comparación con la cepa FECIC02. Estos resultados sugieren la degradación parcial del polietileno y la generación de polímeros intermedios durante la interacción del hongo con el polímero.

### **Figura 15**

*Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF como resultado del proceso de biodegradación*



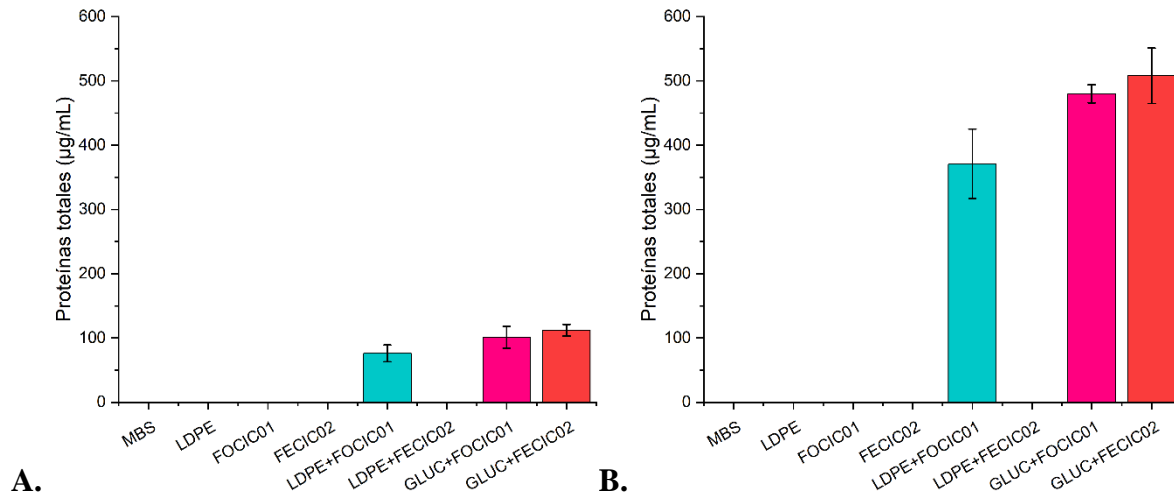
*Nota.* Espectros de masas obtenidos por MALDI-TOF. A) Montaje control LDPE. B) Espectro de masas de LDPE+FECIC02. C) Espectro de masas LDPE+FOCIC01. Los espectros de masas de las réplicas experimentales se encuentran en el Apéndice Q.

### 5.3.1.4 Cuantificación y separación de proteínas totales en el secretoma

La cuantificación de proteínas totales extracelulares mediante el kit BCA, representada en la Figura 16, permitió determinar la concentración de proteínas presentes en el sobrenadante de los ensayos de biodegradación. En la primera medición directa del sobrenadante (Figura 16A), se detectaron concentraciones aproximadas de 100  $\mu\text{g/mL}$  únicamente en las muestras correspondientes a los tratamientos LDPE+FOCIC01, Glucosa+FOCIC01 y Glucosa+FECIC02. Estos resultados indican una mayor actividad extracelular asociada a estos tratamientos en comparación con los demás. Posteriormente, tras concentrar las muestras mediante un concentrador de proteínas, se observó un aumento en las concentraciones, alcanzando valores entre 400  $\mu\text{g/mL}$  y 600  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 16B). Estos resultados presentaron un  $p < 0,05$  lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre al menos dos de las muestras comparadas.

**Figura 16**

*Cuantificación de proteínas totales del sobrenadante*



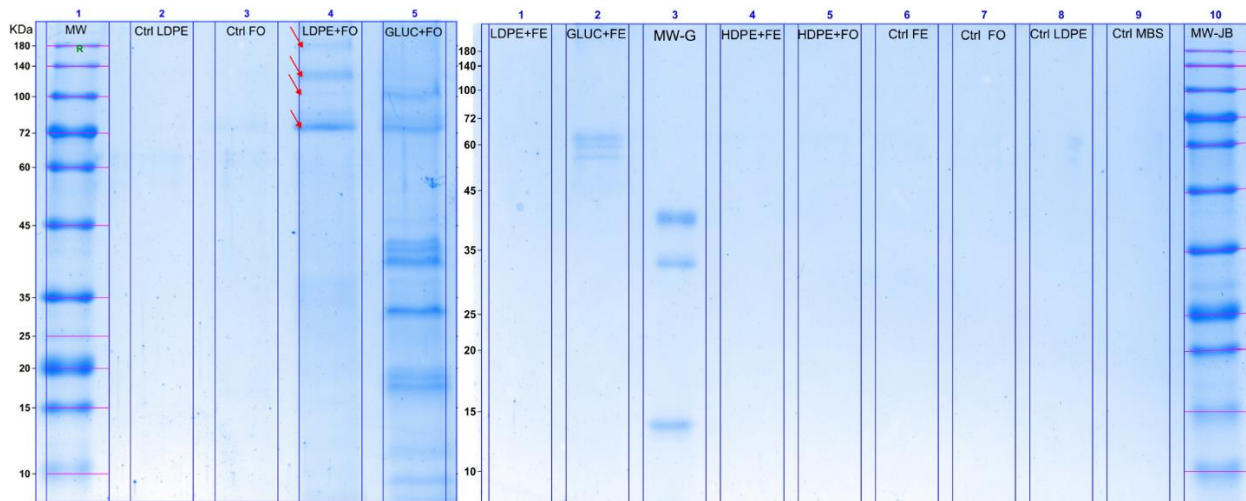
*Nota.* Proteínas totales extracelulares cuantificadas con el Kit BCA del sobrenadante de los ensayos de biodegradación.

A. Proteínas totales medidas directamente en el sobrenadante. B. Proteínas totales medidas luego de concentrar la muestra.

Aunque las muestras fueron concentradas mediante el equipo concentrador y también se evaluaron liofilizadas, las concentraciones de proteínas en el sobrenadante permanecieron bajas, sin superar los 600 µg/mL. Esta limitación impidió la ejecución de una electroforesis bidimensional (2D-PAGE), por lo que se optó por realizar una electroforesis en una sola dimensión (SDS-PAGE). En los geles, correspondientes a la Figura 17, se observaron cuatro bandas diferenciadas en el montaje LDPE+FOCIC01 (LDPE+FO). Señaladas con flechas de color rojo, de arriba hacia abajo, la primera banda presentó un peso aproximado de 180 kDa, la segunda banda de 120 kDa, la tercera de 100 kDa y la cuarta de 72 kDa. Estas bandas no estuvieron presentes en el montaje Glucosa+FOCIC01 (GLUC+FO).

**Figura 17**

*Separación de proteínas secretadas en los diferentes montajes*



*Nota.* Electroforesis de 1 dimensión en gel de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) con acrilamida al 12% y coloración de azul de comasie. kDa: kilo Dalton. MW: Marcador de peso molecular, por sus siglas en inglés. Ctrl: Control. LDPE: Polietileno de baja densidad. FO: FOCIC01. GLUC: Glucosa. FE: FECIC02. MBS: Medio Basal de Sales.

Por su parte, el montaje Glucosa+FECIC02 (GLUC+FE) presentó tres bandas diferenciadas, entre 60 y 70 kDa. Los demás montajes, incluidos los controles, no mostraron ninguna banda detectable. Estos resultados sugieren que la cepa FOCIC01 produce proteínas extracelulares potencialmente involucradas en la biodegradación del LDPE, mientras que la cepa FECIC02 mostró una respuesta menos específica bajo las condiciones evaluadas.

Con el riesgo de que las bandas observadas en el gel de SDS-PAGE contuvieran múltiples proteínas co-migrando en una misma banda, se procedió con su corte y posterior digestión enzimática utilizando tripsina para su identificación mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) y análisis bioinformático con la base de datos Mascot. Sin embargo, este enfoque presenta importantes limitaciones metodológicas. La ausencia de una separación bidimensional (2D-PAGE) restringe la resolución y dificulta discriminar proteínas con pesos moleculares y puntos isoelectricos similares. Además, la baja concentración de proteínas en las muestras representa un

sesgo significativo en la eficiencia de la digestión enzimática, lo que puede afectar directamente la obtención de péptidos representativos para cada proteína. A pesar de estas dificultades técnicas, en el **Apéndice R** se encuentran los espectros de los péptidos para la muestra LDPE+FOCIC01 y de Glucosa+FOCIC01, así como la tabla de resultados de Mascot.

Los resultados del análisis Mascot de las bandas diferenciales evidencian discrepancias entre los pesos moleculares aproximados observados en el SDS-PAGE y las masas monoisotópicas de las proteínas identificadas (Tabla 9). Estas diferencias entre los pesos moleculares experimentales y las masas moleculares reportadas en la base de datos, sugieren la posibilidad de errores en la identificación o la presencia de modificaciones postraduccionales, proteínas multiméricas o degradación proteica. Además, los puntajes (scores) inferiores al umbral de significancia estadística (70), cuestiona la fiabilidad de las asignaciones. El score representa una medida estadística que indica la confianza en la identificación de una proteína basada en el análisis de los espectros obtenidos por espectrometría de masas. Este valor está calculado a partir de la probabilidad de que la coincidencia entre los espectros experimentales y los teóricos de la base de datos haya ocurrido por azar.

**Tabla 9**

*Proteínas identificadas mediante Mascot del montaje LDPE+FO*

<b>Muestra</b>	<b>Score</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Masa monoisotópica</b>	<b>Descripción del gen y cepa</b>
Banda 1 (180 kDa)	45	52%	50,4 kDa	Uncharacterized protein ECU06_1680 <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (strain GB-M1)
Banda 2 (120 kDa)	41	59%	73,2 kDa	Uncharacterized protein ECU11_0030 <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (strain GB-M1)

Muestra	Score	Cobertura	Masa monoisotópica	Descripción del gen y cepa
Banda 3 (100 kDa)	41	40%	71,6 kDa	Uncharacterized protein YIL092W <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 204508 / S288c)
Banda 4 (72 kDa)	38	66%	32,9 kDa	Hypothetical protein pxr1 <i>Aspergillus terreus</i> (strain NIH 2624 /FGSC A1156)

*Nota.* kDa: kilo Dalton. Score: medida estadística, un puntaje superior a 70 es considerado estadísticamente significativo. Cobertura o coverage: porcentaje de la secuencia de la proteína identificada que está cubierta por los péptidos encontrados en el análisis.

Es relevante mencionar que varias de las proteínas identificadas mediante Mascot corresponden a proteínas no caracterizadas (*uncharacterized protein*), lo cual sugiere la presencia de posibles biomoléculas con funciones aún desconocidas, pero potencialmente implicadas en los mecanismos de biodegradación del LDPE.

## 6. Discusión

La identificación y caracterización de las cepas de *Fusarium* aisladas de tuberías de polietileno usadas en la distribución de gas domiciliario en Colombia constituye un paso fundamental para evaluar su potencial en la biodegradación de plásticos. La identificación del género *Fusarium* en las cepas FOCIC01 y FECIC02, coinciden con estudios previos que han destacado la relevancia de este género fúngico en biotecnología y biorremediación, dado su potencial para degradar materiales sintéticos como los plásticos (A. Ali et al., 2022; Alisch-Mark et al., 2006; Cognigni et al., 2023; Dimarogona et al., 2015; Kumar, 2014; Nimchua et al., 2007; Shah et al., 2009). En experimentos previos (datos no publicados) realizados por la Corporación

para la Investigación de la Corrosión (CIC) con otras cepas de *Fusarium* en estudios de biodegradación de materiales poliméricos, se observó una mayor colonización del material cuando los montajes se mantenían estáticos. Esta condición estática de crecimiento también la utilizó Sathiyabama y colaboradores durante la biodegradación de LDPE con la cepa *Cladosporium sphaerospermum* (Sathiyabama et al., 2024). Esta metodología fue adoptada en el presente estudio, desde el proceso de extracción de ADN, como lo realizado por Raman y colaboradores que utilizaron medios de cultivo líquido sin agitación para la extracción de ADN de cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) (Raman et al., 2021). El kit comercial DNeasy PowerSoil (Qiagen, Hilden, Alemania), diseñado originalmente para muestras de suelo, ha demostrado ser igualmente eficiente en la extracción de ADN de hongos filamentosos, como lo evidencia el trabajo de Petersen y colaboradores (2022). En su estudio, los autores destacan que métodos de extracción de ADN de alto peso molecular, como el utilizado en el kit DNeasy PowerSoil, sirven para obtener un ADN de calidad, lo que a su vez contribuye a la mejora en la calidad de los ensamblajes genómicos de hongos ascomicetos filamentosos mediante secuenciación con Oxford Nanopore e Illumina (Petersen et al., 2022). En el contexto de hongos filamentosos, especialmente de la división Ascomycota, se constituye en un reto realizar la extracción de ADN debido a su estructura celular compleja. La rigidez de la pared celular y la presencia de componentes como la quitina requieren de métodos específicos para garantizar una extracción de alta calidad. Por lo anterior, en este trabajo se realizaron modificaciones, incluyendo pasos mecánicos en las instrucciones del fabricante, lo que permitió mejorar la cantidad y calidad del ADN extraído para las dos cepas evaluadas. En el **Apéndice H** se encuentra el protocolo de extracción de ADN fúngico propuesto para futuros estudios.

El uso combinado de tecnologías de secuenciación como Illumina y Nanopore permite obtener ensamblajes genómicos completos y de alta calidad, especialmente en organismos complejos como las cepas fúngicas del complejo *Fusarium oxysporum* (Dvorianinova et al., 2021). Illumina, basada en secuenciación por síntesis, produce lecturas cortas (100 a 300 pb) con alta precisión, ideales para resolver regiones repetitivas y garantizar una alta exactitud en el ensamblaje (Krasnov et al., 2020). Por otro lado, Nanopore, que emplea la lectura de cambios en la conductividad eléctrica a través de un poro, genera lecturas ultralargas (mayores de 100 kb), permitiendo cubrir regiones estructuralmente complejas, como secuencias altamente repetitivas y ensamblar contigs de mayor continuidad (Marsay et al., 2022; Petersen et al., 2022).

La combinación de ambas plataformas en un enfoque híbrido permite aprovechar las ventajas de cada tecnología, las lecturas largas de Nanopore otorgan continuidad al ensamblaje, mientras que las lecturas cortas y precisas de Illumina corrigen errores y mejoran la resolución de regiones ambiguas. Estudios previos han demostrado que ensamblajes híbridos generan genomas más completos y menos fragmentados, superando limitaciones de ensamblajes individuales, favoreciendo la anotación genómica de hongos filamentosos (Dvorianinova et al., 2021; Krasnov et al., 2020; Leiva et al., 2022). La concordancia entre ambas técnicas de secuenciación en términos de calidad del ensamblaje refuerza la validez de los resultados obtenidos en este trabajo. En el presente estudio, se utilizó la herramienta BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) con las bases de datos Fungi\_odb10 y Ascomycota\_odb10 para evaluar la calidad del ensamblaje genómico de las cepas de *Fusarium*. La elección de Fungi\_odb10, que contiene 758 ortólogos universales específicos de hongos, permitió realizar una evaluación general del ensamblaje dentro del contexto taxonómico del reino Fungi. Por otro lado, el uso de Ascomycota\_odb10, que incluye 1706 ortólogos universales específicos de ascomicetos, permitió

refinar la evaluación considerando el nivel taxonómico más específico del filo al cual pertenecen las cepas analizadas. Estudios recientes han demostrado que el uso de bases de datos específicas para niveles taxonómicos más restringidos, como Ascomycota\_odb10, mejora significativamente la precisión en la anotación y evaluación del ensamblaje, especialmente en genomas de hongos filamentosos complejos (X. C. Wang et al., 2023).

El análisis genómico permitió clasificar las cepas FOCIC01 y FECIC02 dentro del complejo *Fusarium oxysporum*. Los resultados indican que FOCIC01 corresponde posiblemente a una cepa de *Fusarium oxysporum* Fo47, mientras que FECIC02 se identifica como *Fusarium oxysporum* cepa Fo5176. El complejo *Fusarium oxysporum* se caracteriza por su alta diversidad genética y funcional, lo que le permite colonizar una amplia gama de nichos ecológicos, incluyendo plantas, suelos y materiales sintéticos. Dentro de este complejo, las cepas Fo47 y Fo5176 comparten una base genética común con diferencias en su patogenicidad, metabolismo y adaptaciones específicas (Guo et al., 2021). Las dos cepas comparten características comunes propias del complejo, como la capacidad de sobrevivir en ambientes pobres en nutrientes y producir una variedad de enzimas hidrolíticas extracelulares. El análisis genómico de las cepas FOCIC01 (Fo47) y FECIC02 (Fo5176) del complejo *Fusarium oxysporum* reveló un conjunto diverso de genes que codifican enzimas hidrolíticas y oxidativas, las cuales desempeñan actividades tanto en la degradación de material vegetal como en la interacción con otros organismos en su nicho ecológico. En el caso de *Fusarium oxysporum* Fo47, ampliamente estudiado como biocontrolador, su arsenal enzimático incluye glucanasas, celulasas y quitinasas, que no solo facilitan la descomposición de componentes de la pared celular vegetal, sino que también contribuyen a su capacidad antagónica al degradar quitina en las paredes celulares de hongos patógenos competidores (Veloso & Díaz, 2021; B. Wang et al., 2020). Por otro lado,

FECIC02 (Fo5176), identificada como una cepa patógena de plantas, asociada a enfermedades como la marchitez vascular en cultivos de tomate. Esta cepa contiene elementos genéticos accesorios, como islas genómicas, que codifican factores de virulencia específicos y rutas metabólicas secundarias relacionadas con la infección de plantas hospedadas. Además, exhibe un perfil enzimático adaptado para invadir tejidos vegetales, con la presencia de cutinasas, pectinasas y lacasas. Estas enzimas permiten romper las barreras estructurales de la planta hospedada, facilitando la infección y colonización de tejidos vasculares (Fokkens et al., 2020; H. Wang et al., 2024). Las diferencias funcionales reportadas entre Fo47 y Fo5176 son notables, como lo reporta Guo y colaboradores en la interacción planta-hongo, específicamente con la planta *Arabidopsis* (Guo et al., 2021).

El análisis proteómico de las cepas *Fusarium oxysporum* FOCIC01 y FECIC02 permitió identificar diversas enzimas extracelulares reportadas en la biodegradación de polietileno, entre las que destacan lacasas, peroxidasas y cutinasas (Aza & Camarero, 2023; Lv et al., 2024; Sahu et al., 2023; Srikanth et al., 2022; Temporiti et al., 2022). Estas enzimas, conocidas por su capacidad para romper enlaces éster y estructuras complejas presentes en polímeros sintéticos, han sido previamente reportadas en otros estudios. Zampolli y colaboradores evaluaron la degradación oxidativa de polietileno a partir de dos lacasa-multicoper oxidasa de la bacteria *Rhodococcus opacus* R7 (Zampolli et al., 2023). Mohy Eldin y colaboradores estudiaron el posible mecanismo de lacasa y peroxidasa de *Aspergillus terreus*, *Penicillium sp.*, y *Bacillus sp.* en la depolimerización de bolsas de LDPE en 105 días de exposición (Mohy Eldin et al., 2022). Kanelli y colaboradores que evaluaron la modificación de la superficie del PET por una cutinasa de *Fusarium oxysporum* (Kanelli et al., 2015) y Dimarogona y colaboradores en el estudio estructural y funcional de cutinasa FoCut5a de *Fusarium oxysporum* en la biodegradación del PET (Dimarogona et al., 2015).

La correlación entre los datos genómicos y proteómicos reveló que, a pesar de la baja concentración proteica en los sobrenadantes de los cultivos con LDPE, se lograron identificar proteínas extracelulares, aunque varias de ellas permanecen sin caracterización funcional específica. Estudios similares han encontrado que la limitación en la concentración proteica durante ensayos con polímeros hidrofóbicos puede restringir la identificación y cuantificación precisa de proteínas con potencial biotecnológico (Ali et al., 2021).

La biodegradación de las perlas de LDPE se confirmó por SEM y MALDI-TOF. Las microfotografías obtenidas mediante SEM de las perlas de LDPE sometidas al proceso de biodegradación por el hongo FOCIC01 revelaron alteraciones en la superficie del material. La evidencia de colonización fúngica se refleja en la presencia de biopelículas, micelio, hifas y esporas adheridas, como se observa en la Figura 15, lo que demuestra la capacidad del hongo para establecerse sobre el polímero, probablemente favorecida por la secreción de compuestos extracelulares que facilitan la adhesión. A pesar de someter las perlas a un proceso de lavado reportado por varios estudios para retirar la biomasa, se observó que restos de estructuras fúngicas permanecen adheridos, lo cual impide una evaluación precisa de la pérdida de peso del material. Esta dificultad sugiere que la interacción entre el hongo y el polietileno incluye una fuerte adhesión superficial y posiblemente una penetración en los defectos estructurales generados durante la degradación. El análisis de las superficies tratadas evidencia la formación de grietas, picaduras y oquedades de bordes irregulares, características de un proceso de degradación activa. Los diámetros de las picaduras, que varían entre 2,067  $\mu\text{m}$  y 2,863  $\mu\text{m}$ , indican un daño localizado y la posible acción de enzimas extracelulares que fragmentan la matriz polimérica. Aunque estas alteraciones no presentan una profundidad considerable, podrían reflejar una fase inicial del proceso de biodegradación, resultado similar a lo reportado por Sathiyabama y colaboradores

(Sathiyabama et al., 2024). En la mayoría de los estudios asociados a biodegradación de plásticos, los cambios en la superficie plástica la evalúan mediante cambios visibles en las imágenes SEM, comparando una muestra sin inoculación y otra inoculada, para esta última describen la formación de grietas, poros y agujeros. Gong y colaboradores encontraron colonización y afectaciones por el hongo *Cladosporium* sp. en láminas de LDPE con 30 días de incubación (Gong et al., 2023). Khan y colaboradores demostraron la degradación del LDPE por *Penicillium citricola* con la identificación de grietas en la superficie del polímero mediante SEM, después de 90 días de biodegradación (Khan et al., 2023).

La perla de LDPE con y sin inóculo presentaron señales características a 2.914, 2.847, 1.463 y 718  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a las vibraciones de flexión y estiramiento del  $\text{CH}_2$  de LDPE y del aditivo erucamida. No se detectaron señales nuevas que evidencien la formación de grupos funcionales adicionales. Es posible que la medición se haya realizado en regiones donde los cambios químicos no fueron lo suficientemente notorios, sin descartar la ocurrencia de transformaciones sutiles o procesos de oxidación en otras áreas del material. Algunos grupos como ácidos carboxílicos, cetonas o aldehídos, que son comunes en los procesos de degradación oxidativa, han sido observados en otros montajes de biodegradación con las mismas condiciones (Gao et al., 2022; Santacruz-Juárez et al., 2021). La evaluación integral de la biodegradación del polietileno requiere la combinación de múltiples técnicas analíticas, ya que un único enfoque puede no ser suficiente para evidenciar todas las modificaciones estructurales y químicas que ocurren durante el proceso. Si bien el análisis por FTIR no mostró la aparición de nuevos grupos funcionales en la superficie del polímero, lo que sugiere la ausencia de cambios químicos detectables a este nivel, la microscopía electrónica de barrido reveló signos evidentes de deterioro estructural, como erosión, picaduras y oquedades, indicando una alteración física del material.

Adicionalmente, el análisis por MALDI-TOF detectó un espectro característico de polietilenglicol con fragmentos de 44 Da, así como productos de menor peso molecular derivados del polietileno, confirmando la fragmentación del polímero. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que han demostrado que la biodegradación del polietileno puede no siempre generar cambios espectroscópicos evidentes en etapas iniciales, pero sí manifestarse mediante modificaciones morfológicas y la liberación de oligómeros detectables por espectrometría de masas (Molina-Millán et al., 2023; Restrepo-Flórez et al., 2014).

El uso del Kit Pierce™ BCA para la cuantificación de proteínas es más adecuado que el método de Bradford, debido a su precisión, sensibilidad y robustez en la medición. Una de las principales ventajas del Kit BCA en este contexto es su alta sensibilidad. El rango de cuantificación del Kit BCA, que va desde 20 µg/mL hasta 2.000 µg/mL, es ideal para medir concentraciones de proteínas en muestras con bajos niveles de proteínas, como es frecuente en estudios de biodegradación microbiana. Este kit también es menos susceptible a interferencias que otros métodos de cuantificación, como el de Bradford. En el caso de proteínas extracelulares de hongos, se pueden presentar compuestos interferentes como detergentes o sustratos de la biodegradación que podrían alterar las lecturas de absorbancia en el método de Bradford. El Kit BCA, al utilizar una reacción cúprica que no se ve tan afectada por estos compuestos, ofrece una mayor fiabilidad en las mediciones (Cortés-Ríos et al., 2020).

A pesar de las limitaciones derivadas de la baja concentración proteica en los sobrenadantes, que impidió la resolución en geles bidimensionales (2D-PAGE), la separación unidimensional permitió la identificación preliminar de proteínas. Los resultados obtenidos a través del análisis Mascot de las bandas diferenciales revelaron limitaciones en la identificación de proteínas debido a puntajes (scores) inferiores al umbral de significancia estadística (70), lo que

cuestiona la fiabilidad de las asignaciones. Aunque las coberturas de las proteínas identificadas oscilaron entre el 40 % y el 66 %, indicando que algunos fragmentos peptídicos coinciden con las secuencias propuestas, el bajo score sugiere una alta probabilidad de falsos positivos. Las proteínas identificadas revelan asociaciones con funciones específicas en organismos distintos a *Fusarium oxysporum*. Las limitaciones relacionadas con la baja concentración de proteínas extracelulares en el secretoma, junto con posibles pérdidas durante el proceso de extracción y preparación de muestras, el riesgo de que múltiples proteínas estuvieran presentes en una misma banda, pudo influir en la resolución de los resultados obtenidos mediante Mascot (Côrtes et al., 2020; Kalaiponmani et al., 2017). Además, no se descarta la posibilidad que en las bases de datos de Mascot no estén incluidas proteínas extracelulares específicas de hongos nativos de Colombia como lo son las dos cepas de *Fusarium oxysporum*. Esto, combinado con la naturaleza compleja del secretoma fúngico y las interacciones ambientales, puede sugerir que las proteínas no detectadas podrían corresponder a enzimas no registradas, no reportadas o aún no caracterizadas.

Tras analizar los resultados obtenidos mediante la identificación proteómica, se evidenció que las proteínas detectadas no presentaron similitud con las secuencias anotadas en el genoma de las cepas nativas *Fusarium oxysporum* FOCIC01. Este hallazgo destaca la necesidad de explorar rutas metabólicas potenciales implicadas en la biodegradación de polietileno, considerando tanto los mecanismos enzimáticos descritos como aquellos que podrían ser únicos para estas cepas. En la Figura 18 se presenta una propuesta de ruta metabólica que ilustra los posibles procesos implicados en la biodegradación de polietileno a nivel extracelular por *F. oxysporum* FOCIC01 y FECIC02. Esta ruta fue construida con base en los resultados de la anotación genómica y proteómica de este trabajo junto con modelos descritos en la literatura (Elsamahy et al., 2023; Gao et al., 2022; Santacruz-Juárez et al., 2021). En el esquema, el proceso comienza con la estructura

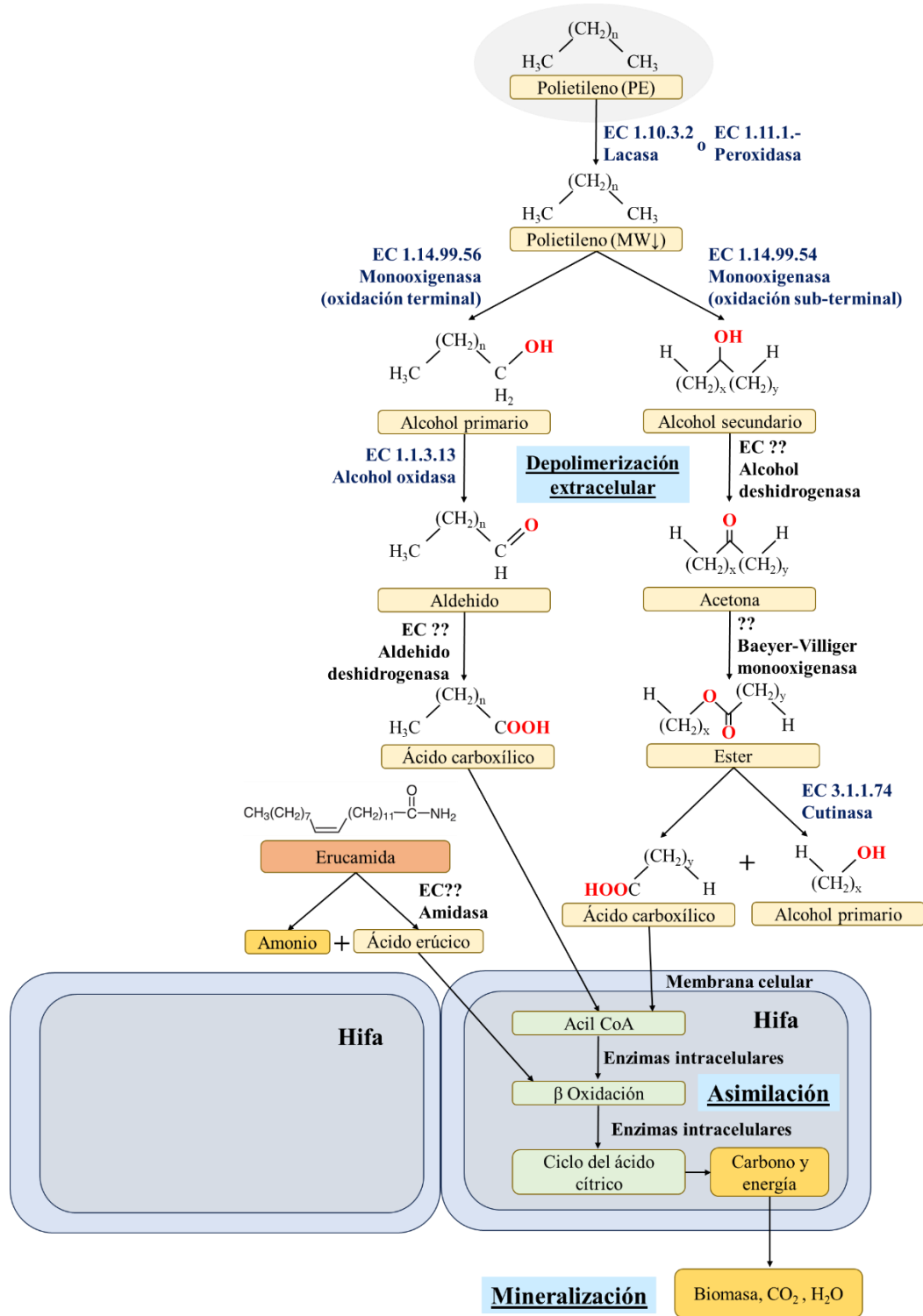
química del polietileno, una molécula hidrofóbica y de alto peso molecular, que es inicialmente atacada por enzimas oxidativas como lacasas (EC 1.10.3.2) y peroxidasas (EC 1.11.1.-). Estas enzimas facilitan la escisión parcial del polímero, generando fragmentos de polietileno de menor peso molecular. Una vez formado el polietileno de bajo peso molecular, la ruta propuesta sigue dos posibles vías de oxidación: oxidación terminal y oxidación subterminal. En la oxidación terminal, una monooxigenasa (EC 1.14.99.56) convierte el polietileno modificado en un alcohol primario. Este alcohol es posteriormente oxidado a un aldehído por acción de la enzima alcohol oxidasa (EC 1.1.3.13), y el aldehído es finalmente transformado en un ácido carboxílico por un aldehído deshidrogenasa (enzima no identificada directamente en el genoma, EC??). Este producto final puede ingresar a la célula como sustrato metabólico. En la oxidación subterminal, otra monooxigenasa (EC 1.14.88.54) convierte el polietileno en un alcohol secundario. A partir de este punto, dos pasos enzimáticos no identificados en el genoma transforman el alcohol secundario en acetona mediante un alcohol deshidrogenasa (EC??) y posteriormente en un éster mediante la acción de una Baeyer-Villiger monooxigenasa. Este éster es hidrolizado por una cutinasa (EC 3.1.1.74), generando un ácido carboxílico y un alcohol primario que pueden ser absorbidos por la célula. Dentro de la célula, los productos obtenidos se convierten en acil-CoA, el cual mediante enzimas intracelulares entra en la beta-oxidación y luego al ciclo del ácido cítrico. Estos procesos metabólicos producen energía, biomasa, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua, cerrando el ciclo metabólico de la biodegradación del polietileno. La erucamida, un aditivo comúnmente utilizado como antideslizante en plásticos de polietileno, puede ser biodegradada a nivel extracelular por *Fusarium oxysporum* mediante la acción de enzimas hidrolíticas, como esterasa y amidasa. Estas enzimas catalizan la ruptura de los enlaces amida y éster, generando ácido erúxico y amonio como productos iniciales. Posteriormente, el ácido erúxico puede ser sometido a  $\beta$ -oxidación, generando

metabolitos de cadena más corta que ingresan a rutas metabólicas centrales, como el ciclo de Krebs, facilitando su asimilación y aprovechamiento por la célula. Este proceso no solo contribuye a la degradación del polietileno al eliminar compuestos asociados a su estabilidad, sino que también representa una posible vía de transformación de aditivos plásticos en fuentes de carbono accesibles para los microorganismos involucrados.

A pesar de las limitaciones metodológicas, los resultados obtenidos resaltan la importancia de combinar técnicas proteómicas y genómicas para profundizar en el entendimiento de los mecanismos enzimáticos involucrados en la biodegradación de plásticos. Futuros estudios que optimicen la extracción y concentración de proteínas podrían mejorar la resolución en análisis proteómicos más detallados.

Figura 18

Propuesta de ruta metabólica en la biodegradación de polietileno por las cepas de *Fusarium*



*Nota.* Los grupos rojos en la figura indican nuevos grupos funcionales formados durante el proceso de degradación. Subrayado se encuentran los pasos de biodegradación como depolimerización extracelular, asimilación y mineralización. Fuente: elaboración propia.

## 7. Conclusiones

En este estudio se logró caracterizar el perfil genómico y proteómico de dos cepas nativas de *Fusarium oxysporum* (FOCIC01 y FECIC02), destacando su potencial para la biodegradación de LDPE. El análisis genómico reveló la presencia de genes asociados con la producción de enzimas extracelulares como lacasas, peroxidasas y cutinasas, todas ellas relacionadas con la descomposición de materiales poliméricos. Las diferencias en la expresión genética entre las cepas sugieren adaptaciones específicas en sus mecanismos de biodegradación, con FOCIC01 mostrando una mayor capacidad de colonización y actividad en LDPE como única fuente de carbono.

La caracterización proteómica confirmó la expresión diferencial de proteínas extracelulares en presencia de LDPE, evidenciando perfiles proteicos distintos entre los montajes experimentales. Los resultados arrojaron scores moderados y porcentajes de cobertura que respaldan la presencia de proteínas potencialmente implicadas en la degradación del polietileno, aunque algunas de ellas permanecen como proteínas no caracterizadas.

Asimismo, la integración de los datos genómicos y proteómicos permitió establecer una correlación entre los genes identificados y las proteínas expresadas, proporcionando evidencia para proponer posibles mecanismos enzimáticos involucrados en la biodegradación de LDPE por las cepas evaluadas. Este trabajo no solo contribuyó al conocimiento sobre la capacidad biodegradativa de *Fusarium oxysporum*, sino que también abre nuevas perspectivas para la

aplicación biotecnológica de estas enzimas en el tratamiento de residuos plásticos, particularmente en entornos contaminados con polietileno.

## 8. Limitaciones

El presente estudio enfrentó diversas limitaciones metodológicas y técnicas que afectaron la identificación y caracterización de las enzimas extracelulares involucradas en la biodegradación del polietileno por *Fusarium oxysporum*. Una de las principales restricciones fue la baja concentración proteica obtenida en los sobrenadantes de los cultivos, lo que pudo deberse a una limitada secreción de enzimas extracelulares bajo las condiciones de crecimiento establecidas o a una degradación proteolítica durante la incubación.

Además, la identificación de proteínas mediante MALDI-TOF y MASCOT presentó limitaciones debido a la ausencia de entradas específicas en las bases de datos utilizadas. Al tratarse de cepas nativas de *Fusarium oxysporum* aisladas de suelos, sus perfiles proteómicos no se encuentran completamente caracterizados en los repositorios convencionales, lo que restringe la asignación de funciones a las proteínas detectadas. En algunos casos, los péptidos identificados mostraron similitud con proteínas de organismos filogenéticamente distantes o con proteínas de función no caracterizada, lo que evidencia la necesidad de realizar análisis proteómicos más profundos, incluyendo de *novo sequencing* de los espectros de masas para mejorar la asignación de funciones.

La propuesta de ruta metabólica para la biodegradación del polietileno se basa en la predicción funcional de enzimas encontradas en el genoma de *F. oxysporum*, pero la confirmación experimental de su actividad catalítica requiere ensayos bioquímicos específicos. La ausencia de

algunas enzimas en los datos obtenidos sugiere que podrían tratarse de isoformas no descritas o de nuevos mecanismos de transformación aún no reportados. Por lo tanto, futuras investigaciones deberán incorporar técnicas como metaproteómica, análisis transcriptómico y ensayos de expresión heteróloga para validar la funcionalidad de las enzimas identificadas y su rol en la biodegradación del polietileno.

## 9. Recomendaciones

Para mejorar la identificación y caracterización de proteínas extracelulares secretadas por las cepas *Fusarium oxysporum* FOCIC01 y FECIC02, se recomienda optimizar los protocolos de extracción y concentración de proteínas. Esto incluye el uso de tiempos de incubación más prolongados durante los ensayos de biodegradación con uso de biorreactores para controlar variables como temperatura y pH, para permitir una mayor acumulación de proteínas en el sobrenadante. Asimismo, se podrían emplear técnicas alternativas a los geles de poliacrilamida, como cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) y proteómica basada en espectrometría de masas libre de gel (shotgun proteomics), que permiten una identificación más precisa y completa del repertorio de proteínas secretadas.

Las proteínas no caracterizadas identificadas mediante análisis bioinformáticos representan una línea de investigación. Se recomienda realizar su expresión heteróloga en sistemas como *Escherichia coli* o levaduras como *Komagataella phaffii* (anteriormente llamada *Pichia pastoris*), seguida de ensayos funcionales específicos para determinar su actividad catalítica y su posible participación en la biodegradación de polietileno. Además, sería relevante validar los niveles de expresión de estas proteínas mediante técnicas como PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y

western blot, lo que permitiría correlacionar los datos proteómicos con los resultados transcriptómicos y confirmar su participación activa en los procesos degradativos.

Por otro lado, el modelamiento estructural de las enzimas seleccionadas (lacasa, peroxidasa y cutinasa) puede complementarse con simulaciones de dinámica molecular para estudiar su estabilidad estructural, interacciones con el sustrato polimérico y posibles modificaciones que puedan mejorar su actividad enzimática. Estos estudios proporcionarían información para el diseño racional de enzimas con aplicaciones biotecnológicas más eficientes.

**Referencias Bibliográficas**

- A. Ali, S., Zakarya, S., & Khaled, S. (2022). Screening and optimisation of the biodegradation potential for low density polyethylene (LDPE) films by *Fusarium equiseti* and *Brevibacillus parabrevis*. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 19(1), 215–229. <https://doi.org/10.13005/bbra/2980>
- Adithama, R. M., Munifah, I., Yanto, D. H. Y., & Meryandini, A. (2023). Biodegradation of low-density polyethylene microplastic by new halotolerant bacteria isolated from saline mud in Bledug Kuwu, Indonesia. *Bioresource Technology Reports*, 22(February), 101466. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101466>
- Ahmed, T., Shahid, M., Azeem, F., Rasul, I., Shah, A. A., Noman, M., Hameed, A., Manzoor, N., Manzoor, I., & Muhammad, S. (2018). Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7287–7298. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-1234-9>
- Ali, S. S., Elsamahy, T., Al-Tohamy, R., Zhu, D., Mahmoud, Y. A. G., Koutra, E., Metwally, M. A., Kornaros, M., & Sun, J. (2021). Plastic wastes biodegradation: mechanisms, challenges and future prospects. In *Science of the Total Environment* (Vol. 780). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146590>
- Alisch-Mark, M., Herrmann, A., & Zimmermann, W. (2006). Increase of the hydrophilicity of polyethylene terephthalate fibres by hydrolases from *Thermomonospora fusca* and *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Biotechnology Letters*, 28(10), 681–685. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9041-7>

- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Aza, P., & Camarero, S. (2023). Fungal laccases: fundamentals, engineering and classification update. *Biomolecules* (Vol. 13, Issue 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biom13121716>
- Balu, R., Dutta, N. K., & Roy Choudhury, N. (2022). Plastic waste upcycling: a sustainable solution for waste management, product development, and circular economy. *Polymers* (Vol. 14, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14224788>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bardají, D. K. R., Moretto, J. A. S., Furlan, J. P. R., & Stehling, E. G. (2020). A mini-review: current advances in polyethylene biodegradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 36, Issue 2). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2808-5>
- Bateman, A., Martin, M.-J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E. H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T., Fan, J., Garmiri, P., da Costa Gonzales, L. J., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., Zhang, J. (2023). UniProt: the Universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523–D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37(Database), D233–D238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- Claudia Sandoval-usme, M., Umaña-pérez, A., Felipe Vallejo-pulido, A., Arévalo-ferro, C., & Sánchez-gómez, M. (2009). The proteomics in the postgenomic era. *Acta biol. Colomb* (Vol. 14). <http://www.hapmap.org>
- Cognigni, F., Temporiti, M. E. E., Nicola, L., Gueninchault, N., Tosi, S., & Rossi, M. (2023). Exploring the infiltrative and degradative ability of *Fusarium oxysporum* on polyethylene terephthalate (PET) using correlative microscopy and deep learning. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50199-w>
- Côrtés, L. M. de C., de Pita-Pereira, D., Farani, P. S. G., Pereira, B. A. S., Lopes, G. D., da Silva, F. S., Corrêa, P. R., Silva, R. M. M., Côrte-Real, S., Bello, F. J., Mendonça-Lima, L., Moreira, O. da C., Waghbi, M. C., & Alves, C. R. (2020). Insights into the proteomic profile and gene expression of *Lutzomyia longipalpis*-derived lulo cell line. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 115(9), 1–23. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200113>
- Cortés-Ríos, J., Zárate, A. M., Figueroa, J. D., Medina, J., Fuentes-Lemus, E., Rodríguez-Fernández, M., Aliaga, M., & López-Alarcón, C. (2020). Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Analytical Biochemistry*, 608. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113904>

- Cowan, A. R., Costanzo, C. M., Benham, R., Loveridge, E. J., & Moody, S. C. (2022). Fungal bioremediation of polyethylene: Challenges and perspectives. *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 132, Issue 1, pp. 78–89). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jam.15203>
- Dai, Y., Whittall, R. M., & Li, L. (1999). Two-layer sample preparation: A method for MALDI-MS analysis of complex peptide and protein mixtures. *Analytical Chemistry*, 71(5), 1087–1091. <https://doi.org/10.1021/ac980684h>
- Davis, R. L., Hayter, J. T., Marlino, M. L., Isakeit, T., & Chappell, T. M. (2023). Pathogenic and saprophytic growth rates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* interact to affect variation in inoculum density and interannual infection risk. *Phytopathology*, 113(8), 1447–1456. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-22-0407-R>
- de Almeida, F. M., de Campos, T. A., & Pappas, G. J. (2023). Scalable and versatile container-based pipelines for de novo genome assembly and bacterial annotation. *F1000Research* (Vol. 12, p. 1205). <https://doi.org/10.12688/f1000research.139488.1>
- Dimarogona, M., Nikolaiivits, E., Kanelli, M., Christakopoulos, P., Sandgren, M., & Topakas, E. (2015). Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(11), 2308–2317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.009>
- DSouza, G. C., Sheriff, R. S., Ullanat, V., Shrikrishna, A., Joshi, A. V., Hiremath, L., & Entoori, K. (2021). Fungal biodegradation of low-density polyethylene using consortium of *Aspergillus* species under controlled conditions. *Heliyon*, 7(5), e07008. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07008>

- Dvorianinova, E. M., Pushkova, E. N., Novakovskiy, R. O., Povkhova, L. V., Bolsheva, N. L., Kudryavtseva, L. P., Rozhmina, T. A., Melnikova, N. V., & Dmitriev, A. A. (2021). Nanopore and Illumina genome sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* strains of different virulence. *Frontiers in Genetics*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.662928>
- Dwicania, E., Rinanti, A., & Fachrul, M. F. (2019). Biodegradation of LLDPE plastic by mixed bacteria culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacterium* sp. *Journal of Physics: Conference Series*, *1402*(2). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1402/2/022105>
- Edel-Hermann, V., & Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum* formae speciales and races. *Phytopathology* (Vol. 109, Issue 4, pp. 512–530). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>
- Ekanayaka, A. H., Tibpromma, S., Dai, D., Xu, R., Suwannarach, N., Stephenson, S. L., Dao, C., & Karunarathna, S. C. (2022). A review of the fungi that degrade plastic. *Journal of Fungi* (Vol. 8, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof8080772>
- Elsamahy, T., Sun, J., Elsilk, S. E., & Ali, S. S. (2023). Biodegradation of low-density polyethylene plastic waste by a constructed tri-culture yeast consortium from wood-feeding termite: Degradation mechanism and pathway. *Journal of Hazardous Materials*, *448*(February), 130944. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130944>
- Farah, N., Karim, A., Mohd, M., Mohd, N., Nor, I. M., & Zakaria, L. (2016). Saprophytic and potentially pathogenic *Fusarium* species from peat soil in perak and pahang. *Tropical Life Sciences Research* (Vol. 27, Issue 1).
- Fokkens, L., Guo, L., Dora, S., Wang, B., Ye, K., Sánchez-Rodríguez, C., & Croll, D. (2020). A chromosome-scale genome assembly for the *Fusarium oxysporum* strain Fo5176 to establish

- a model arabidopsis-fungal pathosystem. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(10), 3549–3555. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401375>
- Gallagher, S. R. (2006). One-Dimensional <sc>SDS</sc> Gel Electrophoresis of Proteins. *Current Protocols in Immunology*, 75(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0804s75>
- Gao, R., Liu, R., & Sun, C. (2022). A marine fungus *Alternaria alternata* FB1 efficiently degrades polyethylene. *Journal of Hazardous Materials*, 431(March), 128617. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128617>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). *Production, use, and fate of all plastics ever made*. <https://www.science.org>
- Ghatge, S., Yang, Y., Ahn, J. H., & Hur, H. G. (2020). Biodegradation of polyethylene: a brief review. *Applied Biological Chemistry* (Vol. 63, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00511-3>
- Gobom, J., Schuerenberg, M., Mueller, M., Theiss, D., Lehrach, H., & Nordhoff, E. (2001).  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. *Analytical Chemistry*, 73(3), 434–438. <https://doi.org/10.1021/ac001241s>
- Gong, Z., Jin, L., Yu, X., Wang, B., Hu, S., Ruan, H., Sung, Y. J., Lee, H. G., & Jin, F. (2023). Biodegradation of low density polyethylene by the fungus *Cladosporium* sp. recovered from a landfill site. *Journal of Fungi*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/jof9060605>
- Grande-Tovar, C. D., Carrascal-Hernández, D. C., Trilleras, J., Mora, K., & Arana, V. A. (2022). Microplastics' and nanoplastics' interactions with microorganisms: a bibliometric study. *Sustainability (Switzerland)*, 14(22). <https://doi.org/10.3390/SU142214761/S1>

- Guo, L., Yu, H., Wang, B., Vescio, K., DeIulio, G. A., Yang, H., Berg, A., Zhang, L., Edel-Hermann, V., Steinberg, C., Corby Kistler, H., & Ma, L. J. (2021). Metatranscriptomic comparison of endophytic and pathogenic *Fusarium-arabidopsis* interactions reveals plant transcriptional plasticity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(9). <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-21-0063-R>
- Gupta, K. K., & Devi, D. (2020). Characteristics investigation on biofilm formation and biodegradation activities of *Pseudomonas aeruginosa* strain ISJ14 colonizing low density polyethylene (LDPE) surface. *Heliyon*, 6(7), e04398. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04398>
- Hale, R. C., Seeley, M. E., La Guardia, M. J., Mai, L., & Zeng, E. Y. (2020). A Global perspective on microplastics. *Journal of Geophysical Research: Oceans* (Vol. 125, Issue 1). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1029/2018JC014719>
- Harshvardhan, K., & Jha, B. (2013). Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1–2), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.025>
- He, J., Li, D. W., Cui, W. L., Zhu, L. H., & Huang, L. (2024). Morphological and phylogenetic analyses reveal three new species of *Fusarium* (Hypocreales, Nectriaceae) associated with leaf blight on *Cunninghamia lanceolata* in China. *MycKeys*, 101, 45–80. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.101.113128>
- He, Y., Deng, X., Jiang, L., Hao, L., Shi, Y., Lyu, M., Zhang, L., & Wang, S. (2024). Current advances, challenges and strategies for enhancing the biodegradation of plastic waste. *Science of the Total Environment*, 906(October 2023), 167850. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167850>

- Islami, A. N., Tazkiaturrizki, T., & Rinanti, A. (2019). The effect of pH-temperature on plastic allowance for Low-Density Polyethylene (LDPE) by *Thiobacillus* sp. and *Clostridium* sp. *Journal of Physics: Conference Series*, 1402(3). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1402/3/033003>
- Jacquín, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., Pujo-Pay, M., Barbe, V., Meistertzheim, A. L., & Ghiglione, J. F. (2019). Microbial ecotoxicology of marine plastic debris: a review on colonization and biodegradation by the “plastisphere.” *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00865>
- Kalaiponmani, K., Thangavelu, R., & Varun, G. (2017). Optimization of protein isolation and preliminary comparative proteomics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (p-Foc) and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* (np-Fo). *Journal of Plant Pathology*, 99(2), 361–369. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i2.3883>
- Kanelli, M., Vasilakos, S., Nikolaivits, E., Ladas, S., Christakopoulos, P., & Topakas, E. (2015). Surface modification of poly(ethylene terephthalate) (PET) fibers by a cutinase from *Fusarium oxysporum*. *Process Biochemistry*, 50(11), 1885–1892. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.08.013>
- Khan, S., Ali, S. A., & Ali, A. S. (2023). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mesophilic fungus ‘*Penicillium citrinum*’ isolated from soils of plastic waste dump yard, Bhopal, India.’ *Environmental Technology (United Kingdom)*, 44(15), 2300–2314. <https://doi.org/10.1080/09593330.2022.2027025>
- Kormin, S., Kormin, F., Beg, M. D. H., & Piah, M. B. M. (2017). Physical and mechanical properties of LDPE incorporated with different starch sources. *IOP Conference Series*:

*Materials Science and Engineering*, 226(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/226/1/012157>

Krasnov, G. S., Pushkova, E. N., Novakovskiy, R. O., Kudryavtseva, L. P., Rozhmina, T. A., Dvorianinova, E. M., Povkhova, L. V., Kudryavtseva, A. V., Dmitriev, A. A., & Melnikova, N. V. (2020). High-quality genome assembly of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00959>

Kuki, Á., Hashimov, M., Nagy, T., Tóth, C., Zsuga, M., & Kéki, S. (2022). Quantification of polyethylene glycol 400 excreted in the urine by MALDI-TOF mass spectrometry. *Pharmaceutics*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071341>

Kumar, S. (2014). Microbial deterioration of low density polyethylene by *Aspergillus* and *Fusarium* sp. *Article in International Journal of ChemTech Research*. <http://www.sphinxesai.com/framesphinxsaichemtech.htm>

Lacerda, A. L. d. F., Proietti, M. C., Secchi, E. R., & Taylor, J. D. (2020). Diverse groups of fungi are associated with plastics in the surface waters of the Western South Atlantic and the Antarctic Peninsula. *Molecular Ecology*, 29(10), 1903–1918. <https://doi.org/10.1111/mec.15444>

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lear, G., Kingsbury, J. M., Franchini, S., Gambarini, V., Maday, S. D. M., Wallbank, J. A., Weaver, L., & Pantos, O. (2021). Plastics and the microbiome: impacts and solutions. *Environmental Microbiomes* (Vol. 16, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40793-020-00371-w>

- Lear, G., Maday, S. D. M., Gambarini, V., Northcott, G., Abbel, R., Kingsbury, J. M., Weaver, L., Wallbank, J. A., & Pantos, O. (2022). Microbial abilities to degrade global environmental plastic polymer waste are overstated. *Environmental Research Letters*, *17*(4). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/AC59A7>
- Leiva, A. M., Rouard, M., Lopez-Alvarez, D., Cenci, A., Breton, C., Acuña, R., Rojas, J. C., Dita, M., & Cuellar, W. J. (2022). Draft genome sequence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 from Peru, Obtained by Nanopore and Illumina Hybrid Assembly. *Microbiology Resource Announcements*, *11*(9). <https://doi.org/10.1128/mra.00347-22>
- Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*, *6*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>
- Li, Y., Tao, L., Wang, Q., Wang, F., Li, G., & Song, M. (2021). *Potential health impact of microplastics: a review of environmental distribution, human exposure, and toxic effects*. <https://doi.org/10.1021/envhealth.3c00052>
- Liepold, T., Klafki, H. W., Kumar, S., Walter, J., Wirths, O., Wiltfang, J., & Jahn, O. (2023). Matrix development for the detection of phosphorylated amyloid- $\beta$  peptides by MALDI-TOF-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *34*(3), 505–512. <https://doi.org/10.1021/jasms.2c00270>
- Lin, S. Q., Yang, Z. J., Huang, B. F., Bi, C. Y., Huang, X. F., Chen, G. T., Nijiati, N., & Chen, X. Y. (2020). Comparative proteomic analysis of the sweetpotato provides insights into response mechanisms to *Fusarium oxysporum* f. sp. *batatas*. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78557-y>

- Liu, X., Zhang, Y., Sun, Q., Liu, Z., Zhao, Y., Fan, A., & Su, H. (2022). Rapid colonization and biodegradation of untreated commercial polyethylene wrap by a new strain of *Bacillus velezensis* C5. *Journal of Environmental Management*, 301(September 2021), 113848. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113848>
- Lizcano Salas, A. F., Duitama, J., Restrepo, S., & Celis Ramírez, A. M. (2024). Phylogenomic approaches reveal a robust time-scale phylogeny of the Terminal *Fusarium* Clade. *IMA Fungus*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s43008-024-00147-8>
- Lou, H., Fu, R., Long, T., Fan, B., Guo, C., Li, L., Zhang, J., & Zhang, G. (2022). Biodegradation of polyethylene by *Meyerozyma guilliermondii* and *Serratia marcescens* isolated from the gut of waxworms (larvae of *Plodia interpunctella*). *Science of the Total Environment*, 853(September), 158604. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158604>
- Lou, X., Van Dongen, J. L. J., Peeters, J. W., & Janssen, H. M. (2022). Disentangle a complex MALDI TOF mass spectrum of polyethylene glycols into three separate spectra via selective formation of protonated ions and sodium or potassium adducts. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 33(12), 2333–2337. <https://doi.org/10.1021/jasms.2c00250>
- Lv, S., Li, Y., Zhao, S., & Shao, Z. (2024). Biodegradation of typical plastics: from microbial diversity to metabolic mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 593. <https://doi.org/10.3390/ijms25010593>
- Manikandan, R., Harish, S., Karthikeyan, G., & Raguchander, T. (2018). Comparative proteomic analysis of different isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* to exploit the differentially expressed proteins responsible for virulence on tomato plants. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00420>

- Maroof, L., Khan, I., Yoo, H. S., Kim, S., Park, H. T., Ahmad, B., & Azam, S. (2021). Identification and characterization of low density polyethylene degrading bacteria isolated from soils of waste disposal sites. *Environmental Engineering Research*, 26(3), 0–2. <https://doi.org/10.4491/eer.2020.167>
- Marsay, K. S., Koucherov, Y., Davidov, K., Iankelevich-Kounio, E., Itzahri, S., Salmon-Divon, M., & Oren, M. (2022). High-resolution screening for marine prokaryotes and eukaryotes with selective preference for polyethylene and polyethylene terephthalate Surfaces. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.845144>
- Matjašič, T., Simčič, T., Medvešček, N., Bajt, O., Dreo, T., & Mori, N. (2021). Critical evaluation of biodegradation studies on synthetic plastics through a systematic literature review. *Science of the Total Environment* (Vol. 752). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141959>
- Mendoza, J. E., Tineo, D., Chuquibala-Checan, B., Atalaya-Marin, N., Taboada-Mitma, V. H., Tafur-Culqui, J., Tarrillo, E., Gómez-Fernández, D., Goñas, M., & Reyes-Reyes, M. A. (2025). Global perspectives on the biodegradation of LDPE in agricultural systems. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1510817>
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
- Mohd-Hafifi, A. B., Mohamed Nor, N. M. I., Zakaria, L., & Mohd, M. H. (2024). Molecular phylogeny and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* from various hosts in Malaysia. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-78195-8>

- Mohy Eldin, A., Al-Sharnouby, S. F. S., ElGabry, K. I. M., & Ramadan, A. I. (2022). *Aspergillus terreus*, *Penicillium* sp. and *Bacillus* sp. isolated from mangrove soil having laccase and peroxidase role in depolymerization of polyethylene bags. *Process Biochemistry*, 118(April), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.04.030>
- Molina-Millán, L., Körber, A., Flinders, B., Cillero-Pastor, B., Cuypers, E., & Heeren, R. M. A. (2023). MALDI-2 Mass spectrometry for synthetic polymer analysis. *Macromolecules*, 56(19), 7729–7736. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.3c01401>
- Moreno, L. G. N., Es Químico, A. R. C., Hipólito, C. N., & Collado, L. F. (2022). Degradación química de pet y su metabolismo por consorcios fúngicos. *South Florida Journal of Development*, 3(1), 1492–1506. <https://doi.org/10.46932/sfjdv3n1-114>
- Ncube, L. K., Ude, A. U., Ogunmuyiwa, E. N., Zulkifli, R., & Beas, I. N. (2021). An overview of plastic waste generation and management in food packaging industries. *Recycling 2021*, Vol. 6, Page 12, 6(1), 12. <https://doi.org/10.3390/RECYCLING6010012>
- Nimchua, T., Punnapayak, H., & Zimmermann, W. (2007). Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Biotechnology Journal*, 2(3), 361–364. <https://doi.org/10.1002/biot.200600095>
- Oladele, I. O., Okoro, C. J., Taiwo, A. S., Onuh, L. N., Agbeboh, N. I., Balogun, O. P., Olubambi, P. A., & Lephuthing, S. S. (2023). Modern trends in recycling waste thermoplastics and their prospective applications: a review. *Journal of Composites Science* (Vol. 7, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcs7050198>
- Pardi-Comensoli, L., Tonolla, M., Colpo, A., Palczewska, Z., Revikrishnan, S., Heeb, M., Brunner, I., & Barbezat, M. (2022). Microbial depolymerization of epoxy resins: a novel approach to

- a complex challenge. *Applied Sciences (Switzerland)*, *12*(1).  
<https://doi.org/10.3390/app12010466>
- Park, S. Y., & Kim, C. G. (2019). Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site. *Chemosphere*, *222*, 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.159>
- Payne, M. E., & Grayson, S. M. (2018). Characterization of synthetic polymers via matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Journal of Visualized Experiments*, *2018*(136). <https://doi.org/10.3791/57174>
- Peng, B. Y., Li, Y., Fan, R., Chen, Z., Chen, J., Brandon, A. M., Criddle, C. S., Zhang, Y., & Wu, W. M. (2020). Biodegradation of low-density polyethylene and polystyrene in superworms, larvae of *Zophobas atratus* (Coleoptera: *Tenebrionidae*): Broad and limited extent depolymerization. *Environmental Pollution*, *266*, 115206. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115206>
- Perera, P., Herath, H., Paranagama, P. A., Wijesinghe, P., & Attanayake, R. N. (2023). Wood decay fungi show enhanced biodeterioration of low-density polyethylene in the absence of wood in culture media. *PLoS ONE*, *18*(7 July), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288133>
- Peters, E. N. (2002). Plastics: thermoplastics, thermosets, and elastomers. *Handbook of Materials Selection* (pp. 335–355). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470172551.ch11>
- Petersen, C., Sørensen, T., Westphal, K. R., Fechete, L. I., Sondergaard, T. E., Sørensen, J. L., & Nielsen, K. L. (2022). High molecular weight DNA extraction methods lead to high quality filamentous ascomycete fungal genome assemblies using Oxford Nanopore sequencing. *Microbial Genomics*, *8*(4). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000816>

- Plastics - the Facts 2021 • Plastics Europe*. (n.d.). Retrieved June 2, 2023, from <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>
- Poma, O., Ricce, B., Beraún, J., Perez Carpio, J. E., Fernandez, H., & Soria, J. (2022). Biodegradation of Low-Density Polyethylene—LDPE by the Lepidopteran *Galleria mellonella* reusing beekeeping waste. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.915331>
- Puentes-Cala, E., Atehortúa-Bueno, M., Tapia-Perdomo, V., Navarro-Escalante, L., Hernández-Torres, J., & Castillo-Villamizar, G. (2023). First insights into the gut microbiome of *Diatraea saccharalis*: from a sugarcane pest to a reservoir of new bacteria with biotechnological potential. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1027527>
- 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), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50740-w>
- Raman, T., Raj, E. E., Muthukathan, G., Loganathan, M., Periyasamy, P., Natesh, M., Manivasakan, P., Kotteeswaran, S., Rajendran, S., & Subbaraya, U. (2021). Comparative whole-genome sequence analyses of *Fusarium* wilt pathogen (Foc r1, str4 and tr4) infecting cavendish (aaa) Bananas in India, with a special emphasis on pathogenicity mechanisms. *Journal of Fungi*, *7*(9). <https://doi.org/10.3390/jof7090717>
- Restrepo-Flórez, J. M., Bassi, A., & Thompson, M. R. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* (Vol. 88, pp. 83–90). <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>

- Rogers, K. L., Carreres-Calabuig, J. A., Gorokhova, E., & Posth, N. R. (2020). Micro-by-micro interactions: How microorganisms influence the fate of marine microplastics. *Limnology And Oceanography Letters* (Vol. 5, Issue 1, pp. 18–36). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/lol2.10136>
- Royer, S. J., Ferrón, S., Wilson, S. T., & Karl, D. M. (2018). Production of methane and ethylene from plastic in the environment. *PLoS ONE*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200574>
- Sahu, S., Kaur, A., Khatri, M., Singh, G., & Arya, S. K. (2023). A review on cutinases enzyme in degradation of microplastics. *Journal of Environmental Management* (Vol. 347). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119193>
- Samanta, S., Datta, D., & Halder, G. (2020). Biodegradation efficacy of soil inherent novel sp. *Bacillus tropicus* (MK318648) onto low density polyethylene matrix. *Journal of Polymer Research*, 27(10), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02296-x>
- Santacruz-Juárez, E., Buendía-Corona, R. E., Ramírez, R. E., & Sánchez, C. (2021). Fungal enzymes for the degradation of polyethylene: Molecular docking simulation and biodegradation pathway proposal. *Journal of Hazardous Materials*, 411. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125118>
- Sarmah, P., & Rout, J. (2019). Cyanobacterial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Nostoc carneum* isolated from submerged polyethylene surface in domestic sewage water. *Energy, Ecology and Environment*, 4(5), 240–252. <https://doi.org/10.1007/s40974-019-00133-6>
- Sathiyabama, M., Boomija, R. V, Sathiyamoorthy, T., Mathivanan, N., & Balaji, R. (2024). Mycodegradation of low-density polyethylene by *Cladosporium sphaerospermum*, isolated

from platisphere. *Scientific Reports*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59032-4>

Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Akhter, J. I. (2009). Isolation of *Fusarium* sp. AF4 from sewage sludge, with the ability to adhere the surface of polyethylene. *African Journal of Microbiology Research*, 3(10), 658–663. <http://www.academicjournals.org/ajmr>

Sharma, S., Basu, S., Shetti, N. P., Nadagouda, M. N., & Aminabhavi, T. M. (2021). Microplastics in the environment: occurrence, perils, and eradication EPA Public Access. *Chem Eng J*, 408, 127317. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127317>

Singh Jadaun, J., Bansal, S., Sonthalia, A., Rai, A. K., & Singh, S. P. (2022). Biodegradation of plastics for sustainable environment. *Bioresource Technology*, 347. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2022.126697>

Soud, S. A. (2019). Biodegradation of polyethylene LDPE plastic waste using locally isolated *Streptomyces* sp. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(4), 1333–1339.

Sowmya, H. V., Ramalingappa, B., Nayanashree, G., Thippeswamy, B., & Krishnappa, M. (2015). Polyethylene degradation by fungal consortium. *Int. J. Environ. Res*, 9(3), 823–830.

Sowmya, H. V., Ramalingappa, B., Krishnappa, M., & Thippeswamy, B. (2014). Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR, and NMR analyses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(10), 6577–6586. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3875-6>

Spina, F., Tummino, M. L., Poli, A., Prigione, V., Ilieva, V., Cocconcelli, P., Puglisi, E., Bracco, P., Zanetti, M., & Varese, G. C. (2021). Low density polyethylene degradation by filamentous fungi. *Environmental Pollution*, 274. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116548>

- Srikanth, M., Sandeep, T. S. R. S., Sucharitha, K., & Godi, S. (2022). Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S40643-022-00532-4/FIGURES/1>
- Stanke, M., Diekhans, M., Baertsch, R., & Haussler, D. (2008). Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding. *Bioinformatics*, 24(5), 637–644. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn013>
- Sun, Y., Yi, X., Peng, M., Zeng, H., Wang, D., Li, B., Tong, Z., Chang, L., Jin, X., & Wang, X. (2014). Proteomics of *Fusarium oxysporum* race 1 and race 4 reveals enzymes involved in carbohydrate metabolism and ion transport that might play important roles in banana Fusarium wilt. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113818>
- Taxeidis, G., Nikolaiivits, E., Siaperas, R., Gkountela, C., Vouyiouka, S., Pantelic, B., Nikodinovic-Runic, J., & Topakas, E. (2023). Triggering and identifying the polyurethane and polyethylene-degrading machinery of filamentous fungi secretomes. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121460>
- Temporiti, M. E. E., Nicola, L., Nielsen, E., & Tosi, S. (2022). Fungal enzymes involved in plastics biodegradation. *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061180>
- Thomas Zumstein, M., Schintlmeister, A., Nelson, T. F., Baumgartner, R., Woebken, D., Wagner, M., Kohler, H.-P. E., Mcneill, K., & Sander, M. (2018). *Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO<sub>2</sub> and microbial biomass*. <https://www.science.org>
- Tiwari, N., Santhiya, D., & Sharma, J. G. (2023). Degradation of polyethylene microplastics through microbial action by a soil isolate of *Brevibacillus brevis*. *Polymer Degradation and Stability*, 215(February), 110436. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2023.110436>

- Uthra, K. T., Chitra, V., Damodharan, N., Devadoss, A., Kuehnel, M., Exposito, A. J., Nagarajan, S., Pitchaimuthu, S., & Pazhani, G. P. (2023). Microplastic emerging pollutants - impact on microbiological diversity, diarrhea, antibiotic resistance, and bioremediation. *Environmental Science: Advances* (Vol. 2, Issue 11, pp. 1469–1487). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d3va00084b>
- Veloso, J., & Díaz, J. (2021). The non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 induces distinct responses in two closely related solanaceae plants against the pathogen *Verticillium dahliae*. *Journal of Fungi*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/jof7050344>
- Wang, B., Yu, H., Jia, Y., Dong, Q., Steinberg, C., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Corby Kistler, H., Ye, K., Ma, L. J., & Guo, L. (2020). Chromosome-scale genome assembly of *Fusarium oxysporum* strain Fo47, a fungal endophyte and biocontrol agent. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(9), 1108–1111. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-20-0116-A>
- Wang, H., Yao, G., Chen, W., Ayhan, D. H., Wang, X., Sun, J., Yi, S., Meng, T., Chen, S., Geng, X., Meng, D., Zhang, L., & Guo, L. (2024). A gap-free genome assembly of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, a vascular wilt pathogen. *Scientific Data*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03763-6>
- Wang, X. C., Zhang, Z. K., & Zhuang, W. Y. (2023). Species diversity of *Penicillium* in Southwest China with Discovery of forty-three new species. *Journal of Fungi*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/jof9121150>
- Wu, C., Xiong, X., Hamidian, H., Zhang, Y., & Xu, X. (2022). A review on source, occurrence, and impacts of microplastics in freshwater aquaculture systems in China. <https://doi.org/10.1016/j.watbs.2022.100040>

- Wu, H., Liu, Q., Sun, W., Lu, Y., Qi, Y., & Zhang, H. (2023). Biodegradability of polyethylene mulch film by *Bacillus paramycooides*. *Chemosphere*, *311*(P2), 136978. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136978>
- Yang, L., Gao, J., Liu, Y., Zhuang, G., Peng, X., Wu, W. M., & Zhuang, X. (2021). Biodegradation of expanded polystyrene and low-density polyethylene foams in larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae): Broad versus limited extent depolymerization and microbe-dependence versus independence. *Chemosphere*, *262*, 127818. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127818>
- Yang, M., Wang, X., Dong, J., Zhao, W., Alam, T., Thomashow, L. S., Weller, D. M., Gao, X., Rustgi, S., & Wen, S. (2021). Proteomics reveals the changes that contribute to *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Phytopathology*, *111*(2), 386–397. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0171-R>
- Yu, H., Yang, H., Haridas, S., Hayes, R. D., Lynch, H., Andersen, S., Newman, M., Li, G., Martínez-Soto, D., Milo-Cochavi, S., Hazal Ayhan, D., Zhang, Y., Grigoriev, I. V., & Ma, L. J. (2023). Conservation and expansion of transcriptional factor repertoire in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Journal of Fungi*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/jof9030359>
- Zampolli, J., Mangiagalli, M., Vezzini, D., Lasagni, M., Ami, D., Natalello, A., Arrigoni, F., Bertini, L., Lotti, M., & Di Gennaro, P. (2023). Oxidative degradation of polyethylene by two novel laccase-like multicopper oxidases from *Rhodococcus opacus* R7. *Environmental Technology and Innovation*, *32*, 103273. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103273>
- Zeghal, E., Vaksmaa, A., Vielfaure, H., Boekhout, T., & Niemann, H. (2021). The potential role of marine fungi in plastic degradation – a review. *Frontiers in Marine Science*, *8*, 1783. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2021.738877/BIBTEX>

- Zhang, C., Mu, Y., Li, T., Jin, F. J., Jin, C. Z., Oh, H. M., Lee, H. G., & Jin, L. (2023). Assembly strategies for polyethylene-degrading microbial consortia based on the combination of omics tools and the “Plastisphere.” *Frontiers in Microbiology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1181967>
- Zhang, H., Liu, Q., Wu, H., Sun, W., Yang, F., Ma, Y., & Qi, Y. (2023). Biodegradation of polyethylene film by the *Bacillus* sp. PELW2042 from the guts of *Tenebrio molitor* (Mealworm Larvae). *Process Biochemistry*, 130(April), 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.04.006>
- Zhang, M., Xu, J., Ren, R., Liu, G., Yao, X., Lou, L., Xu, J., & Yang, X. (2021). Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum*-induced mechanism in grafted watermelon seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.632758>
- Zhang, N., Doucette, A., & Li, L. (2001). Two-layer sample preparation method for MALDI mass spectrometric analysis of protein and peptide samples containing sodium dodecyl sulfate. *Analytical Chemistry*, 73(13), 2968–2975. <https://doi.org/10.1021/ac001418i>
- Zhang, X., Feng, X., Lin, Y., Gou, H., Zhang, Y., & Yang, L. (2023). Degradation of polyethylene by *Klebsiella pneumoniae* Mk-1 isolated from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 258(February), 114965. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114965>
- Zheng, J., Ge, Q., Yan, Y., Zhang, X., Huang, L., & Yin, Y. (2023). DbCAN3: Automated carbohydrate-Active enzyme and substrate annotation. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W115–W121. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad328>
- Zheng, W., Zhang, C., Li, Y., Pearce, R., Bell, E. W., & Zhang, Y. (2021). Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Reports Methods*, 1(3). <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100014>

Zhou, X., Zheng, W., Li, Y., Pearce, R., Zhang, C., Bell, E. W., Zhang, G., & Zhang, Y. (2022). I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, *17*(10), 2326–2353. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00728-0>

### **Apéndices**

Los apéndices están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS.