

Identificación y caracterización de hongos filamentosos aislados de un basurero local con potencial para degradar polietileno de baja densidad

Juan Pablo Saurith Díaz

Trabajo de Grado para Optar al Título de Biólogo

Director

William Hidalgo Bucheli

Doctor en Química

Codirectora

Clara Inés Sánchez Suárez

Doctora en Microbiología y Genética Molecular

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2023

**Dedicatoria**

A mis padres y hermanos, quienes no solamente hicieron posible mis estudios, sino que me brindaron su constante apoyo y sentimientos de orgullo hacia mi desarrollo personal y profesional.

### **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Industrial de Santander por brindarme el espacio y los recursos para desarrollar mis cualidades como futuro biólogo. Agradezco también a mi director de tesis, el Doctor en Química William Hidalgo Bucheli, por su guía y su atención constante durante todo el desarrollo de este proyecto, además, por recibirme con tanto entusiasmo al plantearle mis deseos en desarrollar este tema. A mi codirectora, Clara Inés Sánchez Suárez por todo el apoyo a lo largo de mi proyecto de grado. A Inés Celi por dedicar tanto de su tiempo en ayudarme a establecer la metodología de trabajo, y por su buena actitud al hacerlo. De igual forma agradezco a todos mis compañeros del grupo de investigación de bioquímica y productos naturales, el GIBIM, y el semillero Funga. A mi mejor amiga, Isabella, agradezco profundamente por ser mi aliada en cada paso de mi desarrollo personal desde que nos conocimos. También quiero extender mi sincero agradecimiento a mi compañera de vida y de laboratorio, Silvia Toloza. Su apoyo constante y dedicación han sido fundamentales en este viaje, marcando una diferencia en mi crecimiento personal y profesional. Además, quiero expresar mi gratitud a su familia, a quienes considero mi segunda familia. Gracias por cuidar de mi salud física y emocional, esto ha sido un regalo invaluable durante este fascinante trayecto. A todos ustedes, mi amor y reconocimiento eterno.

Por último, a mis profesores de carrera quienes me enseñaron todo lo que sé, y quienes me abrieron las puertas al campo de la investigación.

**Tabla de Contenido**

<b>Introducción .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Objetivos .....</b>	<b>14</b>
1.1 Objetivo General.....	14
1.2 Objetivos Específicos .....	14
<b>2. Marco teórico .....</b>	<b>15</b>
2.1 Clasificación del plástico .....	15
2.1.1 Plástico termoestable .....	15
2.1.2 Termoplásticos .....	15
2.3 Hongos filamentosos en la biodegradación del polietileno de baja densidad.....	17
2.4 Enzimas en la biodegradación del PEBD .....	18
<b>3. Metodología .....</b>	<b>20</b>
3.1 Colecta del material plástico y sitio de muestreo .....	20
3.2 Limpieza de material .....	21
3.3 Aislamiento de hongos a partir del material plástico colectado .....	21
3.4 Identificación taxonómica de los micromicetos aislados .....	22
3.5 Selección de hongos con potencial para degradar PEBD .....	23
3.6 Evaluación de la capacidad degradativa de los hongos con mayor actividad frente a diferentes tratamientos en medios con PEBD .....	23
3.6.1 Medios de cultivo con adición de glucosa 0.5 g/L .....	24
3.6.3 Esterilización de perlas de PEBD .....	25
3.7 Cuantificación de proteínas durante degradación de plástico.....	26
3.7.1 Preparación de inóculo fúngico .....	26

3.7.2 Cuantificación de proteínas por el método Bradford.....	27
<b>4. Resultados.....</b>	<b>27</b>
4.1 Resultados de colecta.....	27
4.2 Aislamiento de micromicetos presentes en las muestras colectadas .....	28
4.3 Identificación de los micromicetos aislados .....	28
4.4 Evaluación de actividad degradativa de PEBD por los hongos con mayor actividad .....	30
4.6 Cuantificación de proteínas de medios líquidos mediante el método de Bradford .....	33
<b>5. Discusión .....</b>	<b>35</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>40</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>43</b>

**Lista de Tablas**

<b>Tabla 1</b> <i>Criterios de clasificación de la capacidad degradativa</i> .....	23
<b>Tabla 2</b> <i>Tratamientos utilizados para evaluar la respuesta degradativa de los aislados con mayor potencial para degradar PEBD</i> .....	24
<b>Tabla 3</b> <i>Tratamientos para cuantificación de proteínas</i> .....	26
<b>Tabla 4</b> <i>Caracterización de los aislados según su actividad en la degradación de PEBD</i> .....	29
<b>Tabla 5</b> <i>Crecimiento de los hongos A04, A05 y A11 en la evaluación de la capacidad degradativa frente a diferentes tratamientos en medios con PEBD</i> .....	31

**Lista de figuras**

<b>Figura 1</b> <i>Sitio de muestreo del material plástico empleado en el estudio</i> .....	21
<b>Figura 2</b> <i>Esquema de un montaje de microcultivo</i> .....	22
<b>Figura 3</b> <i>Muestras del material plástico colectado</i> .....	28
<b>Figura 4</b> <i>Fotografía de tres tipos de resultados observados durante el proceso de selección</i> ....	30
<b>Figura 5</b> <i>Crecimiento de los aislados A04 y A05 bajo las condiciones del tratamiento 2, durante la evaluación de la respuesta degradativa de los aislados con mayor potencial para degradar PEBD</i> .....	32
<b>Figura 6</b> <i>Perlas de PEBD con signos de degradación en medios inoculados con el aislado A11</i> .....	33
<b>Figura 7</b> <i>Curva de calibración con soluciones de albúmina 0.1- 1 g/L</i> .....	34
<b>Figura 8</b> <i>Concentraciones de proteínas producidas por los aislados A04 y A05 en medios con PEBD</i> .....	35

**Lista de Anexos**

**Anexo A.** *Esquema de la metodología empleada*..... 52

## Resumen

**Título:** Identificación y caracterización de hongos filamentosos aislados de un basurero local con potencial para degradar polietileno de baja densidad \*

**Autor:** Juan Pablo Saurith Díaz \*\*

**Palabras Clave:** Plástico, medio ambiente, contaminación, micromicetos, biotecnología

**Descripción:** Las proyecciones para el año 2050 estiman que la cantidad de plástico en el planeta será de aproximadamente 26000 millones de toneladas, de los que el 79% se almacenará en vertederos y medios naturales. Actualmente, la distribución de este polímero alcanza a todos los biomas terrestres, y el problema se agrava al considerar que los métodos de manejo de estos residuos (vertederos, reciclaje e incineración) suponen una solución momentánea y no sostenible. En consecuencia, es evidente la necesidad de métodos que permitan degradar el material plástico y así aminorar los daños causados por su presencia en los ecosistemas. En este sentido, la biodegradación plantea ser una estrategia con alto potencial, dado que aprovecha la capacidad que tienen algunos microorganismos de utilizar los polímeros plásticos como fuente de carbono. Este estudio tuvo como objetivo aislar, identificar y caracterizar hongos con potencial en la degradación del polietileno de baja densidad (PEBD), uno de los polímeros sintéticos de mayor producción a nivel mundial. Para ello, se aislaron hongos a partir de materiales plásticos depositados en un basurero de Bucaramanga (Santander). Las muestras colectadas se sembraron en medios con PEBD y 0.5 g/L de glucosa. Posteriormente, se identificó el género de los hongos recuperados en el paso anterior, y se clasificó cada aislado según su potencial para biodegradar el PEBD. Como resultado, se obtuvieron 12 aislados fúngicos a partir de las 34 muestras plásticas colectadas. Estos se identificaron como ejemplares de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Trichoderma*; siendo este último el más común. Finalmente, se evidenció que tres (3) de los aislados, A04, A05 y A11 son degradadores del PEBD, por tanto, son especímenes con potencial para el estudio de la biodegradación de este polímero.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Biología. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. Doctorado. Codirectora: Clara Inés Sánchez Suárez. Doctorado.

### Abstract

**Title:** Identification and characterization of filamentous fungi isolated from a local landfill with potential to degrade low density polyethylene\*

**Author:** Juan Pablo Saurith Díaz\*\*

**Key Words:** Plastic, environment, pollution, micromycetes, biotechnology

**Description:** Projections for the year 2050 estimate that the amount of plastic on the planet will be approximately 26 billion tons, 79% of which will be stored in landfills and natural environments. Currently, the distribution of this polymer reaches all terrestrial biomes, and the problem is aggravated when considering that the methods of handling this waste (landfills, recycling and incineration) represent a momentary and unsustainable solution. Consequently, there is a clear need for methods to degrade plastic material and thus reduce the damage caused by its presence in ecosystems. In this sense, biodegradation is a strategy with high potential, since it takes advantage of the capacity of some microorganisms to use plastic polymers as a source of carbon. The objective of this study was to isolate, identify and characterize fungi with potential in the degradation of low-density polyethylene (LDPE), one of the most widely produced synthetic polymers worldwide. For this purpose, fungi were isolated from plastic materials deposited in a landfill in Bucaramanga (Santander). The collected samples were seeded on media with LDPE and 0.5 g/L glucose. Subsequently, the genus of the fungi recovered in the previous step was identified, and each isolate was classified according to its potential to biodegrade LDPE. As a result, 12 fungal isolates were obtained from the 34 plastic samples collected. These were identified as *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Trichoderma*, the latter being the most common. Finally, it was evidenced that three (3) of the isolates, A04, A05 and A11 are LDPE degraders, therefore, they are specimens with potential for the study of the biodegradation of this polymer.

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Sciences. School of Biology. Biology. Director: William Fernando Hidalgo Bucheli. PhD. Co-director: Clara Inés Sánchez Suárez. Ph.D.

## Introducción

El uso desmedido de plástico a nivel mundial trae consigo consecuencias perjudiciales que van desde riesgos de salud pública hasta problemas ecológicos de gran magnitud (Andrade et al., 2006, Pivokonsky et al., 2018). Algunos aditivos de uso frecuente en la producción de plástico, tal como los ftalatos y el bisfenol A, se encuentran asociados a patologías humanas como la disminución de la calidad del semen, mal desarrollo neurológico, disminución de los niveles de testosterona, diabetes tipo 2, cáncer de mama y de cuello uterino (Eales et al., 2022). En animales, estas moléculas están involucradas en el retraso del desarrollo gonadal e interrupciones metabólicas (Han et al., 2022).

Lo anterior, se agrava al considerar que su presencia abarca todos los biomas terrestres (Andrade et al., 2006) y las cifras de producción muestran un panorama negativo. De hecho, debido a su alta demanda y, por consiguiente, su alta producción, la cantidad de masa de este polímero presente en el planeta en el año 2020 superó el doble de la masa global de todos los animales terrestres y acuáticos juntos (Elhacham et al., 2020) y se espera que la cifra aumente hasta llegar a los 26000 millones de toneladas en el año 2050 (Geyer et al., 2017).

Se estima que los ríos vierten al mar 4 millones de toneladas de plástico al año provenientes de regiones continentales, lo que resulta en problemas de contaminación ambiental y de salud para las personas que habitan las regiones costeras (Schmidt et al., 2017). En Colombia, Garcés-Ordóñez et al. (2021) indicaron la presencia de microplástico en la totalidad de las zonas muestreadas del Caribe y el Pacífico, producto de la mala administración de los residuos sólidos. Adicionalmente, estos mismos autores señalan que, aproximadamente, el 65% de los residuos producidos en poblaciones costeras son descargados a cuerpos de aguas naturales (Garcés-Ordóñez et al., 2021).

En relación con lo anterior, los estudios realizados por Pinheiro et al. (2017) muestran que la contaminación plástica está presente en peces destinados a la industria alimenticia, sin ser esta la única fuente de consumo. De hecho, Pivokonsky et al. (2018), en República Checa, reportaron la cantidad de plástico presente en los ríos que abastecen el agua para el consumo equivalente a  $3605 \pm 497$  partículas/ litro de agua bruta.

En la actualidad, los principales métodos de eliminación del plástico son el vertido (79%), la incineración (12%) y el reciclaje (9%), los cuales traen consigo una serie de desventajas (Peng et al., 2018). El relleno sanitario no supone un método sostenible, debido a que ocupa un gran terreno y es a la vez una forma de contaminación (Ru et al., 2020). La incineración, por otra parte, reduce la demanda de vertederos y permite recuperar energía térmica, sin embargo, es una fuente de contaminación ambiental importante, dado que en dicho proceso se generan dioxinas, monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, entre otros gases con efectos adversos para el ecosistema (Ru et al., 2020, Sekar et al., 2022). Por último, en el reciclaje se ven comprometidas las propiedades de los materiales tras varios ciclos de reciclado, por tanto, los valores comerciales son cada vez más reducidos (Ru et al., 2020), y dichos productos pasan a ser tratados por algunos de los dos métodos mencionados anteriormente.

Por lo anterior, resulta evidente la necesidad de alternativas que permitan disminuir o eliminar de circulación el material plástico, a fin de evitar los riesgos que supone su prevalencia en un medio natural. Por tal razón, la biodegradación apunta a ser una solución ante la contaminación por este polímero, en la cual se emplea el plástico como fuente de carbono de algunos microorganismos, y de esta manera, se elimina el material utilizado (Ru et al., 2020). Autores como Zeghal (2021) destacan el potencial que presentan los hongos filamentosos en esta tarea, debido a características propias de este grupo, tal como la facultad de degradar compuestos

sintéticos complejos (Zeghal, 2021) y alta capacidad de propagación de sus hifas, lo que les otorga ventajas en término de degradación del plástico, en comparación con otros microorganismos, como las bacterias (Kotova et al., 2021).

El proceso de biodegradación plantea varias ventajas ya que, en primer lugar, el producto de la despolimerización puede ser utilizado para la biosíntesis de compuestos de alto valor a través de rutas metabólicas específicas, y así valorizar los desechos plásticos (Wierckx et al., 2015). Además, es una forma de eliminar definitivamente el material plástico del medio ambiente. Pese a lo anterior, el conocimiento actual acerca de las enzimas que contribuyen a la descomposición del plástico sigue siendo escasa, por tanto, resulta fundamental estudiar los microorganismos implicados en la producción de estas enzimas (Ru et al., 2020). En consideración a lo anterior, este estudio pretende ampliar el conocimiento acerca de hongos filamentosos con capacidad de degradar plástico. Para ello, se pretende aislar e identificar taxones presentes en un basurero local, que puedan utilizar como sustrato el polietileno de baja densidad, plástico de mayor abundancia a nivel mundial (Fundación Heinrich Böll, 2019). En concordancia, se buscó dar respuesta a las siguientes preguntas: ¿Existen hongos filamentosos capaces de degradar el polietileno de baja densidad en un basurero local? y, de ser así ¿Qué géneros presentan dicha capacidad?

## **1. Objetivos**

### **1.1 Objetivo General**

Evaluar el potencial de los hongos filamentosos, aislados de un basurero local, para biodegradar el polietileno de baja densidad.

### **1.2 Objetivos Específicos**

Aislar microorganismos fúngicos presentes en materiales contruidos a partir de polietileno de baja densidad provenientes de un basurero local.

Identificar los géneros de hongos filamentosos aislados de dichos materiales.

Evaluar la capacidad para biodegradar el polietileno de baja densidad por parte de cada uno de los géneros identificados.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Clasificación del plástico

Los plásticos se categorizan fundamentalmente en dos grupos: termoplásticos y plásticos termoestables (Amobonye et al., 2021). Cada categoría cuenta con características ajustadas a un uso particular, el cual está determinado según su estructura química (Shah et al., 2020).

#### 2.1.1 Plástico termoestable

Los plásticos termoestables una vez moldeados no pueden ser modificados. Es decir, al exponerlos a altas temperaturas no se funden, sino que, se carbonizan, por tanto, no pueden ser reciclados (Yepes, 2014). Estos son utilizados en la industria automotriz, marina y de construcción, como por ejemplo el poliuretano, resinas de silicona y vinilo (Amobonye et al., 2021).

#### 2.1.2 Termoplásticos

Los termoplásticos pueden ser fundidos en más de una ocasión sin que esto cambie su composición química, es decir, pueden ser moldeados múltiples veces (Andrade et al., 2012). En esta categoría están los polímeros artificiales mayormente asociados a la contaminación ambiental: el polietileno (PE) y el polipropileno (PP), que representan más del 50 % de la producción mundial de plástico, y el cloruro de polivinilo (PVC) (Fundación Heinrich Böll, 2019).

#### 2.1.3 Polietileno

Las propiedades del polietileno varían con respecto a la densidad del mismo, por lo cual, este factor es determinante en los usos que se le da a este polímero. Al respecto, se suele clasificar el polietileno en tres categorías con base en su densidad, siendo estas, polietileno de alta densidad ( $952 - 956 \text{ kg/m}^3$ ), polietileno de media densidad ( $931 - 946 \text{ kg/m}^3$ ) y polietileno de baja densidad ( $917 - 932 \text{ kg/m}^3$ ) (Edupack, 2021). En general, poseen una estructura formada por cadenas largas de etileno ( $(\text{CH}_2)_n$ ), que, en caso de ser completamente lineales (alta densidad), da como resultado

una gran dureza, resistencia al impacto y abrasión, como aquellos utilizados en la fabricación de prótesis médicas (Cardona et al., 2010). Por otra parte, al poseer un mayor número de ramificaciones, disminuye su densidad, y con ello aumenta su flexibilidad, por lo que suele emplearse en la fabricación de envolturas de alimentos, botellas y tuberías (Shah et al., 2020).

## **2.2 Degradación del plástico**

La degradación es un proceso irreversible por el cual el material involucrado sufre un cambio en su estructura, y, por ende, en las propiedades que posee, tal como la resistencia mecánica, peso molecular e integridad, lo que conduce a su fragmentación (Cowan et al., 2022). Estos cambios están asociados a variables, en su mayoría de tipo abiótico, aunque las enzimas también juegan un papel importante (Accinelli et al., 2022). Por otra parte, la biodegradación integra lo anteriormente descrito con el aprovechamiento de este material por parte de un ser vivo capaz de integrarlo a su compartimiento celular (Cowan et al., 2022).

El tiempo de vida útil de los plásticos está directamente relacionado a su composición química, y este a su vez, a la fuente de origen (Zhang et al., 2021). En general, estos polímeros provienen de productos petroquímicos, la mayoría presenta alto peso molecular y son comúnmente denominados no biodegradables, dado que, por estar conformados por cadenas de monómeros muy largas no pueden pasar por la membrana celular (Cowan et al., 2022).

La resistencia de los plásticos ante el ataque microbiano radica en que su presencia en la naturaleza es muy reciente (Mueller, 2006). Aún con esto, es sabido desde los estudios pioneros realizados por Tsuchii (1980), que los oligómeros de polietileno de más bajo peso molecular (MW= 600-800 Da), pueden ser degradados por microorganismos, mientras que los de alto peso molecular no.

Por otro lado, Accinelli et al. (2021) indican que los plásticos pueden ser afectados por factores abióticos, tales como, la luz, el calor, la humedad, el pH, entre otros, que pueden causar cambios en sus propiedades físicas y químicas, y, por ende, desempeñan un papel activo en la descomposición de este polímero. Cabe mencionar que, aunque estos factores requieren mucho tiempo para degradar completamente el polímero, pero la exposición a ellos posibilita la actividad biológica de microorganismos (Tokiwa et al., 2009).

### **2.3 Hongos filamentosos en la biodegradación del polietileno de baja densidad**

La biodegradación del PEBD es la asimilación del mismo por parte de microorganismos, lo cual inicia con la adherencia de estos a la superficie del material. Después, comienza el proceso de despolimerización, en el que el material plástico se descompone debido a secreción de enzimas, lo que da lugar a moléculas de menor tamaño que pueden atravesar la membrana celular. Una vez dentro, se da el proceso de mineralización, durante el cual se aprovechan las moléculas de cadena corta como fuente de carbono, lo cual da lugar a la aparición de productos como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y CH<sub>4</sub>, entre otros (Sen y Raut, 2015; Raaman et al., 2012).

Por otra parte, se tiene conocimiento de que los hongos filamentosos presentan una alta capacidad de degradar el polietileno de baja densidad, llegando en algunos casos a tener mayor actividad que bacterias y levaduras (Uribe et al., 2010). Su potencial radica en la tolerancia a muchos tipos de contaminantes plásticos y a la habilidad que estos tienen de crecer en lugares de difícil acceso para otros microorganismos, esto a raíz de poder extender sus estructuras filamentosas para encontrar sus nutrientes con fuentes de carbono (Zhang et al., 2021). Se ha encontrado reiteradas veces que *Aspergillus flavus* presenta los valores más altos de degradación de plástico, incluso sobre aquellas pertenecientes al mismo género, tal como *A. niger*, y *A. fumigatus*, y especies de otros géneros, tales como *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhodoturulla*,

*Gliocladium* y *Phanerochaete* (Méndez et al., 2007; Uribe et al., 2010; Mostajo-Zavaleta et al., 2017; Alcos, 2020; Amobonye et al., 2021).

#### **2.4 Enzimas en la biodegradación del PEBD**

En hongos se tiene conocimiento de algunas enzimas extracelulares involucradas en la degradación de la materia plástica, tal como la cutinasa, catalasa, proteasa, ureasa, peroxidasa de manganeso e hidrilasa (Sen y Raut, 2015). Estas, debido a su gran tamaño, no suelen difundirse lejos del micelio, por lo cual, se puede observar su actividad mediante la aparición de grietas en la periferia del hongo (Yepes, 2014). Lo que, a su vez, permite el reconocimiento de materiales plásticos que posiblemente están siendo atacados por consorcios fúngicos (Méndez et al., 2007).

Aun con esto, no se sabe con certeza el proceso implicado activamente en la biodegradación del plástico (Ru et al., 2020). Sin embargo, se tiene conocimiento de que participan enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos y lignina (Kotova et al., 2021), tal como la peroxidasa de manganeso, presente en *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* (hongos degradadores de lignina), que media la degradación del polietileno de baja densidad estimulado por iones de magnesio (Kotova et al., 2021).

#### **2.5 Estado del arte**

Los estudios recientes en torno a la biodegradación del polietileno por ataque fúngico apuntan hacia la implementación de esta actividad biológica como alternativa de saneamiento ecológico ante la constante amenaza que supone el plástico en todo el ecosistema, y hacia la implementación de métodos que permitan aplicar dicha capacidad a nivel industrial (Kotova et al., 2021).

Chaudhary et al. (2021) evaluaron los efectos de la radiación UV, el calor, y el ácido sobre la biodegradabilidad del polietileno de baja densidad. Para ello, utilizaron el hongo *Thermomyces*

*lanuginosus*. Este estudio encontró una disminución del peso (10%) en las muestras pretratadas, además de la aparición de nuevos grupos funcionales en el material residual., observados a partir de espectroscopía infrarroja.

Por otra parte, en los estudios realizados por Taghavi et al. (2021) se extrajeron cepas fúngicas de diferentes fuentes (suelo, lodos activados, lodos de granja y excremento de lombrices), a fin de evaluar la degradación de varios tipos de plásticos, incluido el polietileno. Para ello, se evaluó el crecimiento y la degradación en sistemas mixtos, individuales y con cepas estimuladas. *Aspergillus flavus* fue aislada en todos los nichos evaluados, y una de sus cepas presentó la mayor capacidad degradadora en medios sin estimular (5.5 % en 100 días de incubación), superando a aquellas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Penicillium*. Aún con esto, la estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostró reducir el tiempo de degradación debido a una disminución del peso en un 2.5% en 30 días.

En el estudio realizado por Spina et al. (2021) se lograron aislar 95 cepas (distribuidas en 27 especies de hongos) de los plásticos acumulados en vertederos de basura. Tras 6 meses de incubación, se encontró que el 97% de los hongos seleccionados fueron capaces de crecer con polietileno en polvo como su única fuente de carbono. En esta investigación, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium falciforme*, *Fusarium solani* y *Purpureocillum lilacinum* presentaron una alta capacidad oxidativa (Spina et al., 2021), siendo *F. oxysporum* y *F. sonali*, los hongos con mayor potencial para ser empleados en procesos de biorremediación de zonas con polietileno.

El estudio realizado por Cowan et al. (2022), acerca de los desafíos que presenta la biorremediación fúngica, plantea que es poco probable que disminuya la dependencia humana del plástico, por tanto, lo importante radica en desarrollar tecnologías para la gestión de este. Los estudios demuestran que hay diversidad de hongos capaces de inducir cambios en la estructura de

plástico, incluso, la adsorción y mineralización de este; no obstante, es fundamental que para que este campo de investigación avance, se adopte una metodología estandarizada, y de igual manera, es necesario maximizar las técnicas empleadas para detectar el proceso de biodegradación de tal forma que permita diferenciar el deterioro superficial de la biofragmentación, siendo esto último lo realmente deseado para que ocurra una remediación sustancial del plástico. Adicionalmente, este estudio pone en manifiesto la necesidad de comprender los sistemas biológicos que subyacen al daño químico y físico observado en el plástico, dado que, aún son muy pocas las enzimas, ya sea de origen fúngico o bacteriano, de las cuales se tiene conocimiento que estén implicadas en la degradación de los polímeros sintéticos (Cowan et al., 2022)

### **3. Metodología**

#### **3.1 Colecta del material plástico y sitio de muestreo**

Se realizaron tres (3) muestreos en un basurero, no registrado legalmente, de la ciudad de Bucaramanga (Santander) durante el periodo de agosto a noviembre de 2022 (Ver Figura 1). En cada uno se colectaron bolsas plásticas con signos de deterioro y se guardaron en bolsas ziploc individuales para su posterior traslado hacia las instalaciones del laboratorio, conforme a la metodología empleada por Soncco et al. (2022). Adicionalmente, se incluyó en la muestra dos recipientes plásticos con signos de degradación, donados de una residencia local.

**Figura 1**

*Sitio de muestreo del material plástico empleado en el estudio*



*Nota.* Esta área se ubica en las coordenadas latitud 7.141872329775862, longitud 73.11824925304971, dentro del Campus central de la Universidad Industrial de Santander. Se caracteriza por ser húmeda y con abundante hojarasca. Fuente: El autor.

**3.2 Limpieza de material**

Se lavó cada muestra con la ayuda de un cepillo y jabón comercial, a fin de eliminar la materia orgánica adherida a estas. Posteriormente, el material se sumergió en una solución hipoclorito de sodio 1% v/v durante 5 minutos para disminuir la carga microbiana. Finalmente, se lavó cada muestra con agua tipo I estéril para eliminar el hipoclorito excedente.

**3.3 Aislamiento de hongos a partir del material plástico colectado**

Las muestras plásticas se fragmentaron en trozos de 2 x 3 cm y se sembraron junto a 16 perlas de PEBD marca Lotréne FD 0474 en medios Czapeck modificados (2 NaNO<sub>3</sub>, 1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 MgSO<sub>4</sub>, 0.5 KCl, 0.01 FeSO<sub>4</sub>, 15 agar, 0.05 glucosa, 0.01 cloranfenicol: g/L). Después de 15

días de incubación a 25°C en total oscuridad, se repicaron los hongos de las cajas en donde se observó crecimiento a hasta obtener colonias axénicas.

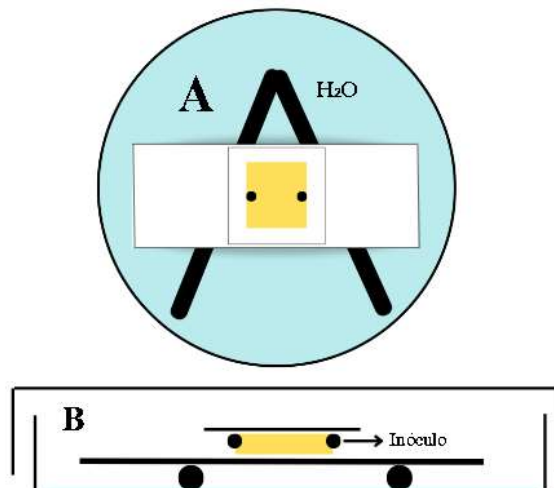
### 3.4 Identificación taxonómica de los micromicetos aislados

Se identificó el género de cada uno de los aislados obtenidos a partir de características morfológicas. Para ello, se realizaron réplicas por triplicado en medios PDA (medio de cultivo agar papa dextrosa) de la totalidad de los hongos. Estos se incubaron durante 7 días a 25° C, y posteriormente, se inocularon en microcultivos de acuerdo con la metodología de Díaz et al. (2020), como se describe en la Figura 2.

Para ello, dentro de una caja Petri, se dispuso un trozo de servilleta circular y un soporte en forma de V invertida. Sobre dicho soporte, se ubicó un portaobjetos con un trozo de medio agar PDA sobre sí. Posteriormente, se inoculó el medio de cultivo y se colocó un cubreobjetos. Finalmente, se humedeció la superficie de la caja Petri con agua destilada para evitar la desecación del medio de cultivo. Tras 7 días de incubación, las muestras se observaron al microscopio (40X), utilizando azul lactofenol.

#### Figura 2

*Esquema de un montaje de microcultivo*



*Nota.* A) Vista superior y, B) Vista frontal de un microcultivo. Imagen adaptada de:

[https://www.ufrgs.br/aulaspraticasdemip/?page\\_id=90](https://www.ufrgs.br/aulaspraticasdemip/?page_id=90)

### 3.5 Selección de hongos con potencial para degradar PEBD

La actividad degradativa de cada hongo se evaluó con base en el crecimiento observado durante la fase de asilamiento tal como se muestra en la Tabla 1. Se seleccionaron como potenciales degradadores de polietileno de baja densidad aquellos micromicetos que crecieron según los criterios de clasificación “muy buena”, “buena” y “regular” expuestos por Méndez et al. (2007).

**Tabla 1**

*Criterios de clasificación de la capacidad degradativa*

<b>Actividad degradativa</b>	<b>Crecimiento</b>
Muy buena	Abundante en todo el plástico.
Buena	Moderado en todo el plástico.
Regular	En la parte inferior a media del plástico.
Pobre	En la parte inferior.
Sin actividad	Distante de las perlas.

*Nota.* Adaptado de Méndez et al. (2007).

### 3.6 Evaluación de la capacidad degradativa de los hongos con mayor actividad frente a diferentes tratamientos en medios con PEBD

A fin de someter a prueba la capacidad degradativa de PEBD de los hongos encontrados en este estudio, se emplearon los aislados con actividad degradativa “muy buena”, “buena” y “regular” en ensayos exploratorios en los que se evaluó su respuesta degradativa ante diferentes

condiciones, tales como: la presencia de glucosa (sección 3.6.1), el tratamiento de perlas de PEBD con acetona (sección 3.6.2) y el uso de autoclave (sección 3.6.3).

Los ensayos se llevaron a cabo según lo expuesto en la Tabla 2. Estos se realizaron por triplicado durante 15 días y en cada uno se utilizó como base un medio con: 2 g/L NaNO<sub>3</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.5 g/L KCl, 0.01 g/L FeSO<sub>4</sub>, 15 g/L agar, 0.01 g/L cloranfenicol.

**Tabla 2**

*Tratamientos utilizados para evaluar la respuesta degradativa de los aislados con mayor potencial para degradar PEBD*

Tratamiento	Medios con fuente de carbono adicional 0.5 g/L de glucosa	Eliminación de plastificantes de PEBD con acetona	Método de esterilización de las perlas PEBD
1	+	+	A
2	+	+	B
3	-	+	A
4	-	+	B
5	+	-	A
6	+	-	B
7	-	-	A
8	-	-	B

*Nota.* **Medios con fuente de carbono adicional 0.5 g/L de glucosa:** medios con glucosa 0.5 g/L (+), medios sin glucosa añadida (-). **Eliminación de plastificantes de PEBD con acetona:** medios con perlas de PEBD tratadas con acetona (+), medios con perlas de PEBD no tratadas con acetona (-). **Método de esterilización de las perlas de PEBD:** perlas esterilizadas con el empleo de autoclave (A), perlas esterilizadas con alcohol 70% y NaClO 1% (B).

### **3.6.1 Medios de cultivo con adición de glucosa 0.5 g/L**

Se realizaron tratamientos sin y con glucosa 0.5 g/L, al considerar lo planteado por Uribe et al. (2010), quienes en su estudio sobre la capacidad degradativa del PEBD por hongos, proponen

el empleo de una fuente de carbono adicional, y en bajas cantidades, que sirva como precursor inicial del crecimiento. De tal manera que, posteriormente, puedan consumir la fuente de carbono estudiada (Uribe et al., 2010).

### ***3.6.2 Tratamiento con acetona para retirar posibles plastificantes contenidos en las perlas***

Con el fin de determinar si el crecimiento fúngico se debía al consumo del polietileno o a los aditivos empleados por el fabricante, se sumergieron las perlas en una solución acetona 50% v/v la cual se mantuvo en agitación durante 10 min. Posteriormente, se llevaron las perlas a una cabina de extracción durante 24 h para evaporar la acetona. Después se sumergieron durante 5 min en hipoclorito 1% v/v y finalmente se ubicaron sobre los medios de cultivo correspondientes, tras dos lavados en agua destilada tipo I estéril. Tras dicho proceso, se añadieron 12 de estar en cada uno de los tratamientos correspondientes.

### ***3.6.3 Esterilización de perlas de PEBD***

Para esterilizar las perlas de PEBD mediante autoclave, se colocaron 12 perlas en un vaso de precipitado junto con 50 ml de agua tipo I. De esta forma, se evitó su compactación al momento de alcanzar la temperatura de fusión.

Para evitar algún daño en las perlas de PEBD a causa de las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso de esterilización en autoclave (121°C), se optó por utilizar una alternativa de esterilización. En este caso, se sumergieron las perlas en una solución de NaClO al 1% v/v durante 15 minutos, seguido de una inmersión en alcohol al 70% v/v durante otros 15 minutos. Después de este proceso, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se secaron con una servilleta esterilizada para eliminar el exceso de humedad. De esta forma, se aseguró la esterilización de las perlas de PEBD sin someterlas a altas temperaturas.

### 3.7 Cuantificación de proteínas durante degradación de plástico

En busca de evidencia que apoye los resultados de la capacidad degradativa de PEBD. Se cuantificaron las proteínas producidas por los hongos en medios con PEBD (con glucosa 0.5 g/L y sin glucosa), y en medios con glucosa como única fuente de carbono. Para ello, se procedió a determinar la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976).

#### 3.7.1 Preparación de inóculo fúngico

Se realizaron por triplicado siembras en rejilla en medio PDA de los hongos utilizados en la evaluación de la respuesta degradativa (Sección 3.6). Luego, tras una semana de incubación a 25°C, se añadieron 5 ml de agua tipo I a dos de las réplicas y, con ayuda de un asa, se removieron las esporas y propágulos hasta formar una solución. Dicha solución se transfirió a viales de 10 ml y se llevó a vortex durante 15 min. El restante se conservó para el conteo en cámara de Neubauer.

Por último, se transfirió 1 ml de la solución a cada uno de los medios líquidos compuestos de 2 g/L de NaNO<sub>3</sub>, 1 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 0.5 g/L de KCl y 0.01 g/L de FeSO<sub>4</sub>. Luego, se añadieron 2 gramos de perlas de PEBD al medio y se incubaron a 25°C con agitación a 150 rpm durante 15 días. Se utilizó como control un medio de cultivo sin perlas de PEBD y se realizaron dos tratamientos que se diferenciaron de acuerdo a la ausencia (Tratamiento A) o presencia de glucosa 0.5 g/L (Tratamiento B), tal como se describe en la Tabla 3.

**Tabla 3**

*Tratamientos para cuantificación de proteínas*

	Control	Tratamiento A	Tratamiento B
Glucosa 0.5 g/L	+	-	+
Polietileno (2g)	-	+	+

Inóculo (1 mL)	+	+	+
----------------	---	---	---

*Nota.* + = positivo (añadido), - = negativo (no añadido).

### **3.7.2 Cuantificación de proteínas por el método Bradford**

Se tomó una muestra de 2 mL de cada montaje (9 muestras en total) y se centrifugó a 8000 rpm durante 8 minutos. Luego, se extrajeron 20 µl del sobrenadante y se mezclaron con 1 mL de reactivo de Bradford en una celda de 1 cm. Se permitió la reacción durante 2 minutos y, posteriormente, se cuantificó la cantidad de proteínas. Para esto, se midieron los valores de absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro y se compararon con una curva patrón de albúmina con concentraciones que oscilaban entre 0.1 y 1 g/L (Banegas et al.,2022).

## **4. Resultados**

### **4.1 Resultados de colecta**

Se colectaron 32 muestras de bolsas plásticas de El aserradero, un basurero ubicado dentro del campus de la Universidad Industrial De Santander (Ver Figura 1). Adicionalmente, en la población muestral se incluyeron también, 2 recipientes de polipropileno con signos de degradación.

**Figura 3**

*Muestras del material plástico colectado*



*Nota.* En las imágenes se ven las muestras a partir de las cuales se aislaron los hongos con capacidad de degradar el PEBD. A, B) recipientes de comida; C, D) bolsas de plástico.

**4.2 Aislamiento de micromicetos presentes en las muestras colectadas**

Se evidenció crecimiento fúngico en 11 de las muestras colectadas (32%). La permanencia de micromicetos después del proceso de lavado, sugiere que estos estaban fuertemente adheridos al material colectado. Tras 15 días de incubación, se obtuvieron 12 aislados fúngicos, denominados A01, A02, A03, A04, A05, A06, A07, A08, A09, A10, A11, A12.

**4.3 Identificación de los micromicetos aislados**

La identificación taxonómica de los aislados mostró que, de la totalidad de géneros fúngicos encontrados, *Trichoderma* fue el más abundante, con 5 representantes (42%), seguido por *Aspergillus* (3 aislados, 25%), *Fusarium* (2 aislados, 16,6%), *Penicillium* (1 aislado, 8,3%). Por otra parte, solo se observaron hifas en el caso del aislado A05, lo cual imposibilitó su identificación mediante caracteres morfológicos.

**4.4 Selección de hongos con mayor actividad degradativa**

Tres de los hongos aislados (A04, A05 y A11) mostraron ser potenciales degradadores del PEBD con base en los criterios de calificación planteados en la sección (3.5). El aislado A05 mostró mayor capacidad degradativa, seguido por el aislado A04 y A11, respectivamente. Los

demás aislados no manifestaron crecimiento alguno sobre las perlas de plástico, por lo que se catalogaron “sin actividad”. La tabla 4, sintetiza los resultados obtenidos con cada uno de los aislados. Por otra parte, la Figura 4 ejemplifica tres tipos de resultados observados durante la siembra del material plástico colectado.

**Tabla 4**

*Caracterización de los aislados según su actividad en la degradación de PEBD*

<b>Aislado</b>	<b>Género</b>	<b>Actividad degradativa</b>	<b>Observaciones de crecimiento</b>
<b>A01</b>	<i>Aspergillus</i>	Sin actividad	Crecimiento reducido y distante de las perlas
<b>A02</b>	<i>Aspergillus</i>	Sin actividad	Crecimiento reducido y distante de las perlas
<b>A03</b>	<i>Trichoderma</i>	Sin actividad	Crecimiento reducido y distante de las perlas
<b>A04</b>	<i>Trichoderma</i>	Buena	Crecimiento moderado en todo el plástico.
<b>A05</b>	<i>Desconocido</i>	Muy buena	Crecimiento abundante en todo el plástico
<b>A06</b>	<i>Fusarium</i>	Sin actividad	Crecimiento reducido y distante de las perlas
<b>A07</b>	<i>Trichoderma</i>	Sin actividad	Crecimiento reducido y distante de las perlas
<b>A08</b>	<i>Penicillium</i>	Sin actividad	Crecimiento reducido y distante de las perlas
<b>A09</b>	<i>Aspergillus</i>	Sin actividad	Crecimiento reducido y distante de las perlas
<b>A10</b>	<i>Fusarium</i>	Sin actividad	Crecimiento reducido y distante de las perlas
<b>A11</b>	<i>Trichoderma</i>	Regular	Crecimiento inferior del plástico
<b>A12</b>	<i>Trichoderma</i>	Sin actividad	Crecimiento reducido y distante de las perlas

**Figura 4**

*Fotografía de tres tipos de resultados observados durante el proceso de selección*



*Nota.* A) aislado A05 seleccionado como potencial degradador del PEBD, se observa crecimiento abundante en todo el medio y sobre las perlas; B) aislado A07, hongo no seleccionado como potencial degradador de PEBD y catalogado “sin actividad” C) medio sin crecimiento. Escala corresponde a 5 cm.

**4.4 Evaluación de actividad degradativa de PEBD por los hongos con mayor actividad**

Los tres aislados seleccionados (A04, A05 y A11) crecieron en presencia de glucosa, mientras que en ausencia de esta fuente de carbono adicional no se observó crecimiento alguno (Ver tabla 5).

Asimismo, el tratamiento 2, que incluía glucosa 0.5 g/L, perlas de PEBD tratadas con acetona y sin autoclavar, también mostró resultados positivos (Ver figura 5), lo que demuestra el potencial de los microorganismos para degradar el polietileno sin aditivos y sin los efectos favorables que se suelen derivar de las altas temperaturas. Por otro lado, durante el ensayo se observó que los aislados A04 y A05 se mantuvieron en óptimas condiciones incluso después de tres semanas, mientras que el aislado A11 atenuó su crecimiento a partir del quinto día. No obstante, debido a que se evidenció degradación en las perlas de PEBD que estuvieron en contacto

con este microorganismo (Figura 6.A), estas se trasladaron a medios PDA. En estos medios se observó una marcada proliferación del hongo y la cobertura total de las perlas, además de un aumento en su degradación (Ver en la Figura 6.B). Posteriormente, se realizó un nuevo repique del microorganismo a un medio PDA con perlas de PEBD intactas y, al cabo de 5 días, se pudo observar la total cobertura de las mismas por parte del hongo (Ver Figura 6.C).

**Tabla 5**

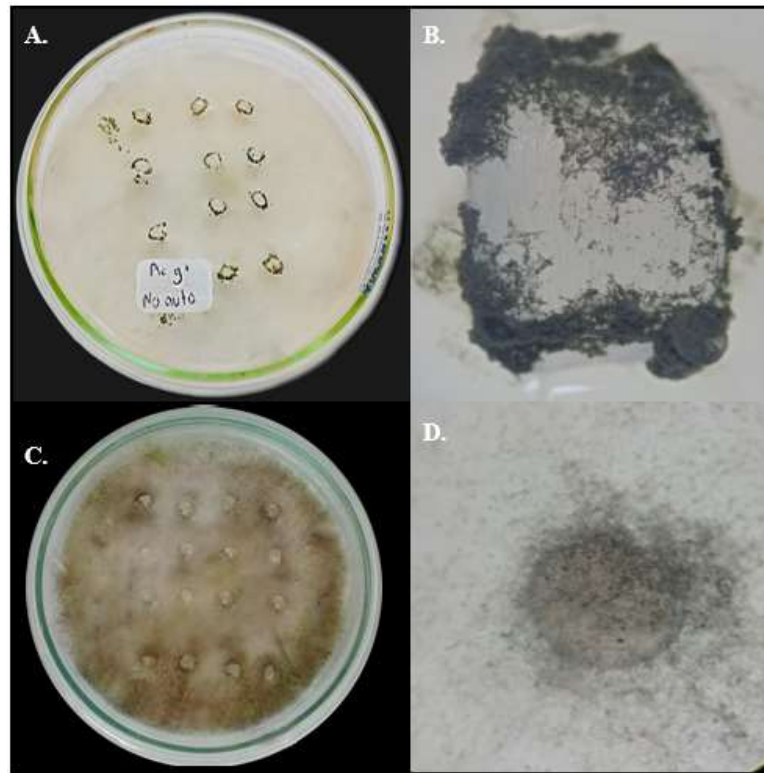
*Crecimiento de los hongos A04, A05 y A11 en la evaluación de la capacidad degradativa frente a diferentes tratamientos en medios con PEBD*

	<b>A04</b>	<b>A06</b>	<b>A11</b>
<b>Tratamiento 1</b>	++	++	+
<b>Tratamiento 2</b>	++	++	+
<b>Tratamiento 3</b>	-	-	-
<b>Tratamiento 4</b>	-	-	-
<b>Tratamiento 5</b>	++	++	+
<b>Tratamiento 6</b>	++	++	+
<b>Tratamiento 7</b>	-	-	-
<b>Tratamiento 8</b>	-	-	-

*Nota.* ++ = crecimiento normal, += crecimiento atenuado, -= sin crecimiento. La descripción de cada tratamiento se detalla en la sección 3.6 de la metodología.

**Figura 5**

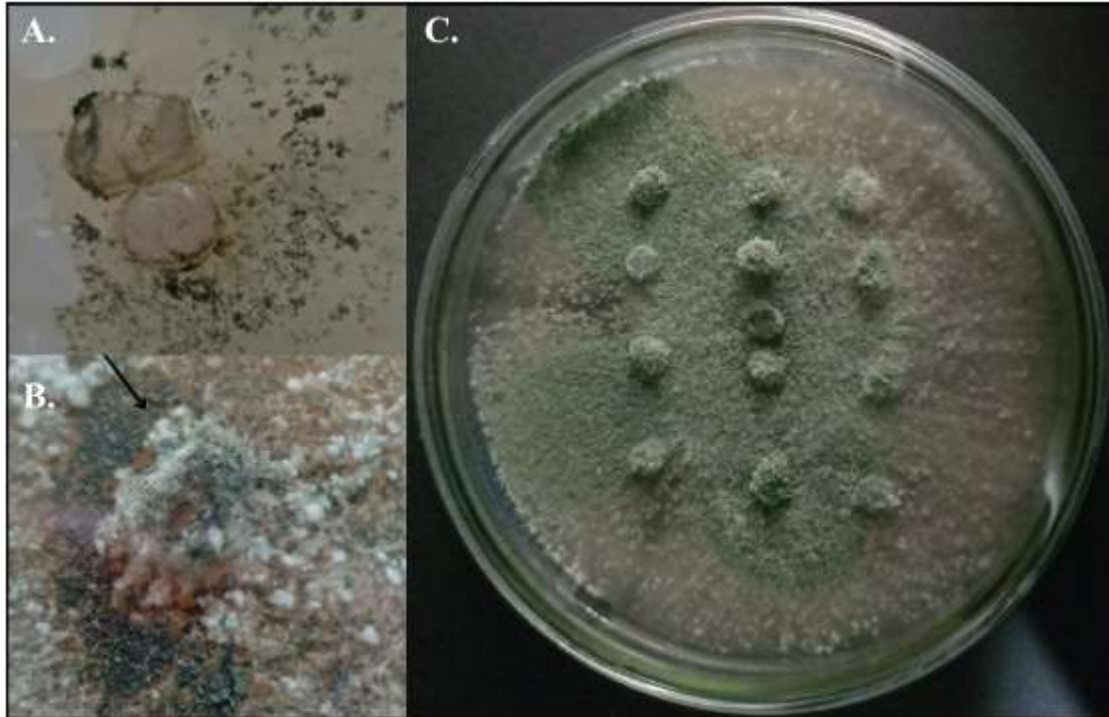
*Crecimiento de los aislados A04 y A05 bajo las condiciones del tratamiento 2, durante la evaluación de la respuesta degradativa de los aislados con mayor potencial para degradar PEBD*



*Nota.* A) Crecimiento del aislado identificado como A04. Se observan las perlas de polietileno colonizadas por el hongo, B) Fotografía tomada de una perla de PEBD invadida por el microorganismo A04. C) Crecimiento del aislado A05 y D) Visualización de perla de PEBD colonizada por el aislado A05.

**Figura 6**

*Perlas de PEBD con signos de degradación en medios inoculados con el aislado A11*



Nota. A) perlas de polietileno de baja densidad con signos de degradación, y alrededor de estas, el hongo con poco crecimiento; B) perla de polietileno, en medio PDA, completamente cubierta por el hongo; C) repique del hongo A11 en medio PDA con perlas nuevas tras 5 días de incubación

**4.6 Cuantificación de proteínas de medios líquidos mediante el método de Bradford**

Se empleó 1 mL de inóculo con concentraciones de  $1.0 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  en el caso del hongo A04. En cuanto al hongo A05, debido a que no se evidenciaron esporas, se realizaron soluciones con fragmentos del mismo hasta alcanzar una concentración de  $8 \times 10^5$  propágulos  $\text{mL}^{-1}$ . Adicionalmente, de la curva de calibración se obtuvo la ecuación  $y = 0,6042x + 0,1831$  con un  $R^2 = 0.9915$  (Figura 7).

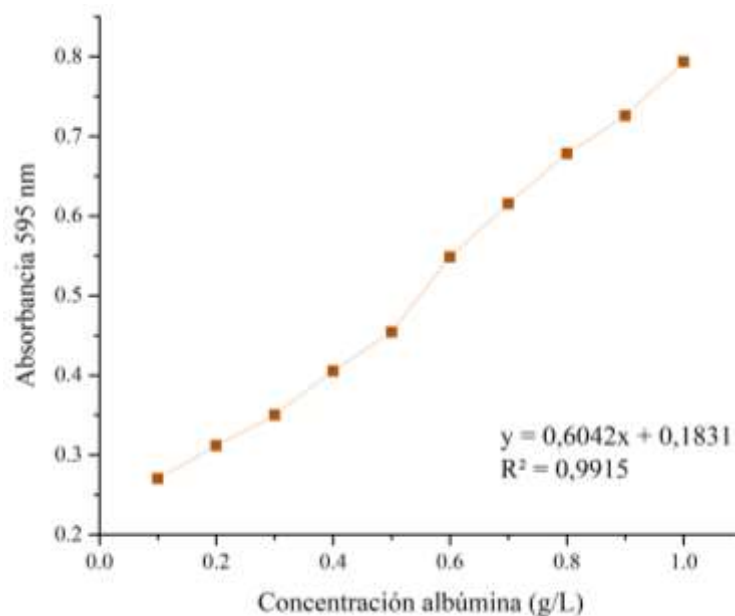
Las pruebas de cuantificación de proteínas mostraron que, en el caso del aislado A04, los medios en los que se añadió glucosa y perlas de PEBD produjeron una mayor cantidad de proteínas

( $0.697 \pm 0.034$  g/L). Seguido de este, se encontró el medio en el cual se empleó glucosa como única fuente de carbono ( $0.379 \pm 0.042$  g/L) y, por último, los medios con solo perlas de PEBD ( $0.228 \pm 0.062$  g/L) (Vea Figura 8A).

Este patrón se repitió en el hongo A11, en el que se determinó que la producción n de proteínas en los medios con PEBD y glucosa fue de  $0.27 \pm 0.035$  g/L, seguido por los tratamientos con glucosa únicamente ( $0.234 \pm 0.006$  g/L), y en último lugar los medios con solo perlas de PEBD ( $0.145 \pm 0.076$  g/L) (Vea figura 8B). En ambos aislados, se encontró un aumento de la cantidad inicial de proteínas presentes en el sobrenadante.

### Figura 7

*Curva de calibración con soluciones de albúmina 0.1- 1 g/L*



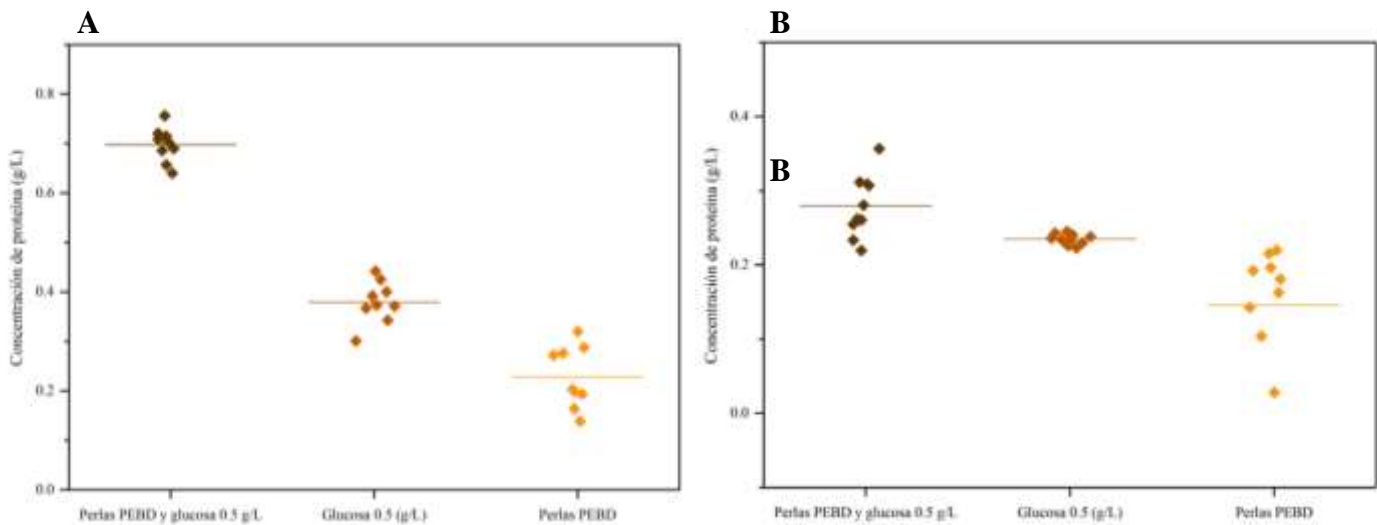
Es importante destacar que no se realizaron pruebas de cuantificación de proteínas en el hongo A11 debido a que este presentó poco crecimiento en medios con escasas fuentes de carbono de fácil asimilación. Lo cual queda evidenciado al comparar los resultados de crecimiento

obtenidos durante la fase de aislamiento con los obtenidos en las pruebas posteriores, realizadas en este mismo hongo, en medio PDA.

*Nota.* A) Concentración de proteínas encontradas para A04, B) Concentración de proteínas

### Figura 8

Concentraciones de proteínas producidas por los aislados A04 y A05 en medios con PEBD



encontradas para A05.

## 5. Discusión

### 5.1 Limpieza de material y aislamiento de micromicetos

Para que ocurra el ataque enzimático las hifas deben estar en contacto con el material a degradar, por lo tanto, la colonización del plástico puede considerarse como la primera evidencia de la capacidad que tiene un microorganismo de ejercer daño sobre la estructura del polímero. Esto es posible en micromicetos dado que la mayoría tiene la capacidad de producir hidrofobinas, unas proteínas hidrofóbicas que se han visto particularmente implicadas en los procesos de biodegradación de materiales plásticos, puesto que poseen propiedades como la formación de estructuras autoensambladas altamente insolubles, además de una fuerte adhesión (Wu et al., 2017).

Pese a lo anterior, la colonización fúngica del material con fines nutricionales no debe ser confundida con una simple capacidad de adherencia. Por ejemplo, en esta investigación se encontraron 12 aislados obtenidos de un sitio de muestreo con abundante materia orgánica (Figura 1). Sin embargo, solo 3 de ellos evidenciaron capacidad degradativa, lo que sugiere que los 9 restantes utilizan el material plástico como soporte físico durante su crecimiento mientras obtienen nutrientes a partir de otras fuentes (Sánchez, 2020). Este hallazgo fue similar al descrito por Mendez et al. (2013), quienes evaluaron la capacidad de degradar el PDB por parte de 20 cepas aisladas de un basurero y encontraron que solo 5 de ellas fueron capaces de utilizar dicho polímero como fuente de alimento. Esto a su vez coincide con lo encontrado en la investigación de Cedeño y Meriño (2020), en donde aislaron 15 micromicetos, de los cuales solo 2 presentaron potencial para degradar el PEBD.

Por otra parte, en ensayos metodológicos preliminares (no incluidos en este escrito), las muestras plásticas se limpiaron con agua destilada y cepillo, posteriormente se incorporaron en medios Czapeck Dox (los cuales contienen sacarosa 30 g/L) en los que se añadió rosa de bengala para inhibir el crecimiento excesivo y, de esta manera, posibilitar la selección de colonias. Contrario a lo esperado, se observó un crecimiento masivo del micelio y, a la vez, diferentes morfologías en una misma muestra, lo que dificultó la identificación y el aislamiento de microorganismos. Se concluyó que estos resultados fueron producto de un lavado insuficiente del material, con el que no se eliminó gran número de los microorganismos adheridos a este, y por el empleo de un medio muy óptimo de crecimiento. Por tal razón, el método de limpieza de las muestras con hipoclorito de sodio 1% v/v, así como la adición de perlas de PEBD para el aislamiento, empleados en este estudio, mostraron tener tres grandes ventajas: 1) disminuir notoriamente la carga microbiana excesiva, 2) debido a su baja disposición de azúcares, inhibir el

crecimiento de los hongos que permanecieron tras la limpieza, lo que hizo más sencilla la tarea de aislamiento, en los casos en que crecieron 2 hongos distintos, 3) permitir la distinción de hongos con potencial para degradar el PEBD de aquellos que solo lo habitan.

## 5.2 Identificación y selección de hongos con mayor actividad degradativa

Se obtuvieron 3 aislados A04, A05 y A11 que cumplieron con los requisitos de selección para hongos con potencial para biodegradar el PEBD, al presentar actividades degradativas “buena”, “muy buena” y “regular”, respectivamente (Ver Tabla 4).

El género *Trichoderma* presentó el mayor número de ejemplares con capacidad para biodegradar el PEBD (A04 y A11). Con anterioridad se han reportado ejemplares con esta capacidad pertenecientes a este mismo género tal como *T. harzianum* (Raghavendra et al., 2016) y *T. viride* (Munir et al., 2018); no obstante, el espécimen A05 obtuvo los mejores resultados de crecimiento, lo cual es evidencia de una mayor eficiencia en el uso del material plástico.

El hongo A04 evidenció una actividad degradativa “buena” hacia el polietileno de baja densidad cuando se adicionó glucosa 0.5 g/L. Tal como lo muestra la figura 4A, se observa que el hongo se desarrolló, casi que únicamente, sobre las perlas de PEBD y en el agar que limita con estas. Este hallazgo se soporta según lo encontrado por Uribe et al. (2010) quienes afirmaron que el empleo de una fuente de carbono adicional, y en bajas cantidades, sirve como precursor inicial del crecimiento e impulsa la degradación de PEBD.

Por otro lado, el hongo A11 mostró una actividad “regular”, sin embargo, las pruebas realizadas en medio PDA, mostraron un mayor daño en la estructura de las perlas de polietileno. Esto podría sugerir que el microorganismo necesita de una abundante fuente de carbono para el crecimiento, tal como lo reporta Dsouza et al. (2021) quienes encontraron que las cepas *Aspergillus*

*niger*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae* degradaron mejor el polietileno de baja densidad (26.15%, en 55 días de incubación) cuando se cultivaron en medio PDA.

En relación con lo anterior, los especímenes pertenecientes al género *Trichoderma*, hongos A04 y A11, pese a no ser los de mejor desempeño según los criterios de este estudio, tienen características que los convierten en buenos prospectos para el estudio de la biodegradación del PEBD, dado que, como reporta Shah et al. (2009), los cambios físicos a causa de daños estructurales en materiales plásticos tardan años en aparecer, mientras que en los hongos acá citados se hace evidente en apenas dos (2) semanas. Por otra parte, estos resultados pueden estar relacionados con las condiciones impuestas en el laboratorio, en donde se somete a los microorganismos a una reducida fuente de carbono, y, por tanto, se induce su asimilación del polímero evaluado, contrario a lo que se espera en un medio natural con múltiples fuentes de carbono.

### **5.3 Respuesta degradativa de los hongos con mayor actividad frente a diferentes tratamientos en medios con PEBD**

Los hongos A04, A05 y A11 mostraron tener la capacidad de biodegradar el polietileno de baja densidad bajo las condiciones del tratamiento 2 (perlas no esterilizadas en autoclave, tratadas con acetona y 0.5 g/L de glucosa).

Los diferentes métodos empleados para la esterilización de perlas de PEBD se realizaron de acuerdo con los estudios de Chaudhary et al. (2021), quienes encontraron un aumento de la capacidad degradativa del hongo *Thermomyces lanuginosus* al realizar pre-tratamientos térmicos en las perlas de PDB. Sin embargo, en este estudio no se observaron diferencias evidentes en el crecimiento de los microorganismos inoculados en los medios de cultivo que contenían perlas esterilizadas mediante autoclave, con respecto a los que poseían perlas esterilizadas por métodos

químicos. De tal forma que no fue posible relacionar el uso de autoclave con un incremento en la capacidad degradativa.

Por otra parte, considerando que el PEBD es de naturaleza apolar, pero sus aditivos son de carácter polar (Kazimi et al.,2011), se empleó una solución acetona al 50% v/v para descartar el uso de estos últimos como fuente de carbono por parte de los hongos. En relación, no se encontraron diferencias marcadas en el crecimiento de los hongos con y sin perlas tratadas, lo que implica que la supervivencia de estos no está determinada por el consumo de los aditivos, aumentando la probabilidad de que los aislados en cuestión tengan la capacidad para asimilar el PEBD.

Adicionalmente, no se evidenció crecimiento en los medios sin glucosa, lo que indica que para que se lleve a cabo la biodegradación es necesaria una fuente de carbono de fácil asimilación que impulse, inicialmente, el crecimiento del hongo. Esto concuerda con el estudio realizado por Dsouza et al. (2021), en el cual se evaluó la influencia de las concentraciones de azúcares, en los medios de cultivo, sobre la capacidad biodegradadora de PEBD por parte de especies del género *Aspergillus*. En esta investigación, se encontró que la pérdida de peso del polímero es menor en medios de cultivo donde el polietileno es la única fuente de carbono, al ser comparado con medios a los cuales se le suplementó con otras fuentes de carbono (D'Souza et al., 2021).

#### **5.4 Cuantificación de proteínas producidas por los aislados A04, A05 y A11**

Se registraron los valores de concentración de proteínas para apoyar los resultados obtenidos durante el proceso de selección. Para ello, los aislados que evidenciaron mejor capacidad degradativa, A04 y A05, se inocularon en medios líquidos cuyos componentes eran los mismos que los medios utilizados durante el aislamiento (pero sin agar, y con perlas esterilizadas mediante autoclave).

De estos, se evidenció una mayor producción de proteínas en los medios con PEBD y glucosa, en comparación con los medios en los que sólo se añadió una fuente de carbono, glucosa o perlas de PEBD únicamente. Con lo anterior, se evidencia que dichos microorganismos tienen la capacidad de aprovechar la fuente de carbono adicional para llevar a cabo su metabolismo. En relación, estos resultados coinciden con los de Gupta et al. (2020), quienes interpretaron el aumento de la concentración de proteínas, en los medios con PEBD y glucosa 0.5 g/L, como evidencia de una mayor actividad metabólica en estos, al ser comparados con medios con las mismas concentraciones de glucosa, pero sin PEBD.

Anteriormente, se han reportado resultados similares por autores como Gupta et al. (2020), quienes proponen que el aumento en la concentración de proteínas, entre los tratamientos descritos, es evidencia de una mayor actividad metabólica. Sin embargo, consideramos que los valores obtenidos pueden ser tomados como medidas indirectas de crecimiento, dado que durante la centrifugación se induce a la lisis celular (Canul y Flores, 2019), lo que causa la liberación de proteínas al medio. Con ello, se concluye que el aumento en la concentración de proteínas, en los con PEBD como única fuente de carbono, se debe a que los hongos evaluados tienen la capacidad de crecer bajo estas condiciones, lo que evidencia su facultad de asimilar dicho polímero. Por otra parte, se requieren estudios complementarios que evalúen el perfil proteico en cada uno de los tratamientos a fin de determinar las enzimas implicadas en estos resultados.

## 6. Conclusiones

Se aislaron 12 hongos provenientes de residuos plásticos obtenidos de un basurero local, de los cuales, se encontraron principalmente representantes del género *Trichoderma* (5 especímenes), seguido por *Aspergillus* (3 especímenes), *Fusarium* (2 especímenes), *Penicillium* (1 espécimen) y un hongo de un género desconocido. Por otra parte, el aislado con mayor capacidad

para biodegradar el polietileno de baja densidad, corresponde al espécimen A05, mientras que los aislados A04 y A11, mostraron actividad buena y pobre, respectivamente, en su capacidad para degradar el polietileno de baja densidad, según los criterios de clasificación empleados en este estudio.

### **7. Recomendaciones y perspectivas futuras**

El factor tiempo resulta determinante para identificar la capacidad para biodegradar el polietileno de baja densidad por parte de hongos. Por tal razón, se recomienda a futuros investigadores alargar los periodos de incubación empleados durante el periodo en que se realicen las pruebas de biodegradación. Adicionalmente, se recomienda pulverizar el plástico añadido a los medios y, de esta forma, aumentar la zona de contacto por parte del microorganismo con el polímero, además de poder llevar un mayor control de las cantidades añadidas a cada medio. Por otra parte, se sugiere analizar la capacidad degradativa de los aislados al formar consorcios, dado que estudios como los de Mostajo-Zavaleta et al. (2017) muestran mejores resultados al emplear varios microorganismos a la vez en la degradación del PEBD.

Por otra parte, los nuevos enfoques apuntan hacia las capacidades enzimáticas de cada microorganismo más que en el microorganismo en sí. Esto debido a que el reconocimiento y aislamiento de las proteínas implicadas en el deterioro del material plástico suponen mayores ventajas que los tratamientos con microorganismos, por las razones expuestas a continuación: 1) Los resultados obtenidos en presencia del hongo pueden replicarse en ausencia de éste al contar con las enzimas utilizadas para el proceso de degradación (Hongyuan et al.,2022). Esto a su vez, permite una comparación más acertada de los hallazgos obtenidos en diferentes organismos, ya que elimina de la ecuación las disparidades obtenidas por el empleo de distintos medios de cultivo, por tasa de crecimiento y de producción de enzima distintas, al igual que otros factores biológicos

asociados a cada especie. 2) Se evita el contacto con organismos que presenten un potencial riesgo para la salud. 3) Se puede controlar el grado de degradación hasta el nivel deseado, por tanto, se pueden generar compuestos de interés (Wierckx et al., 2015). 4) Permite el empleo de técnicas moleculares enfocadas en mejorar la eficiencia catalítica (Hongyuan et al.,2022). Por tanto, resulta de gran interés aislar y medir la actividad de las enzimas involucradas en el proceso de biodegradación de PEBD de los hongos obtenidos en este estudio.

### Bibliografía

- Accinelli, C., Abbas, H. K., Bruno, V., Khambhati, V. H., Little, N. S., Bellaloui, N., & Shier, W. T. (2022). Field studies on the deterioration of microplastic films from ultra-thin compostable bags in soil. *Journal of Environmental Management*, 305, 114407. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114407>.
- Andrade, G. I., Vázquez, R., Rodríguez, R., Medina, I. E., Lozano, J. A., & Rincón, J. (2012). Evidencia de la biodegradación de resinas fenólicas con hongos ligninolíticos por microscopía electrónica de barrido. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28(2), 159-166. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992012000200007&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000200007&lng=es).
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., & Pillai, S. (2020). Plastic biodegradation: frontline microbes and their enzymes. *Science of The Total Environment*, 143536. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143536>.
- Andrade-Ribeiro, A. L., Pacheco-Ferreira, A., da Cunha, C. L. N., & Mendes-Kling, A. S. (2006). Disruptores endocrinos: potencial problema para la salud pública y medio ambiente. *Revista Biomédica*, 17(2), 146-150. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2006/bio062i.pdf>.
- Alcos, V. C. G. (2020). Capacidad biodegradativa de hongos filamentosos frente al polietileno. *Revista de Investigaciones de la Escuela de Posgrado de la UNA PUNO*, 9(3), 1792-1804. <http://dx.doi.org/10.26788/riepg.2020.3.11>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*

*biochemistry*, 72(1-2), 248-254.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273>

Canul, Y. Y. B., & Flores, I. R. I. (2019). *Análisis proteómico de la pared celular del hongo Pseudocercospora fijiensis* (Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán).

[https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1579/1/PCB\\_D\\_Tesis\\_2019\\_Yamily\\_Burgos\\_Canul.pdf](https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1579/1/PCB_D_Tesis_2019_Yamily_Burgos_Canul.pdf)

Cardona, D., Lavernia, C. J., & Alcerro, J. C. (2010). Polietileno. *Acta Ortopédica Mexicana*, 24(2), 123-128. <https://www.medigraphic.com/pdfs/ortope/or-2010/or102m.pdf>

Edupack, C. E. S. (2021). Material Science and Engineering. [Software de bases de datos]. *CES Edupack*.

Chaudhary, A. K., Chaitanya, K., Dalmia, R., & Vijayakumar, R. P. (2021). Synergistic effect of UV, thermal, and chemical treatment on biological degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Thermomyces lanuginosus*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(8), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09296-4>

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*, 132(1), 78-89.  
<https://doi.org/10.1111/jam.15203>

Díaz, Y. M. R., Moreno, J. G., Santoyo, R. M. R., Hernández, R. G. R., & Rodríguez, L. E. V. (2020). Aislamiento e identificación morfológica y molecular de hongos asociados a plantas de zanahoria enfermas. *Investigación Científica*, 14(2), 14-19.  
<https://revistas.uaz.edu.mx/index.php/investigacioncientifica/article/download/958/876>

- 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), 07008. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07008>.
- Eales, J., Bethel, A., Galloway, T., Hopkinson, P., Morrissey, K., Short, R. E., & Garside, R. (2022). Human health impacts of exposure to phthalate plasticizers: An overview of reviews. *Environment International*, 158, 106903. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106903>
- Fundación Heinrich Böll (2019). Atlas del plástico. p 1-52. [https://co.boell.org/sites/default/files/202102/Plastic%20Atlas%202019%20c\\_ambio.pdf](https://co.boell.org/sites/default/files/202102/Plastic%20Atlas%202019%20c_ambio.pdf)
- Garcés-Ordóñez, O., Espinosa, L. F., Costa Muniz, M., Salles Pereira, L. B., & Meigikos dos Anjos, R. (2021). Abundance, distribution, and characteristics of microplastics in coastal surface waters of the Colombian Caribbean and Pacific. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(32), 43431-43442. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13723-x>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1700782>.
- Han, Y., Shi, W., Tang, Y., Zhou, W., Sun, H., Zhang, J., ... & Liu, G. (2022). Microplastics and bisphenol A hamper gonadal development of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by interfering with metabolism and disrupting hormone regulation. *Science of The Total Environment*, 810, 152354. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152354>
- Johnnie, D. A., Issac, R., & Prabha, M. L. (2021). Bio Efficacy Assay of Laccase isolated and Characterized from *Trichoderma viride* in Biodegradation of Low-Density Polyethylene

- (LDPE) and Textile Industrial Effluent Dyes. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(1), 410-421. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.1.38>
- Koneman W., Roberts G. 1985. Diagnóstico Microbiológico/ DMicrobiological diagnosis. Texto y Atlas Color. (6ta ed.). 2335. New York. Ed. Medica Panamericana
- Kotova, I. B., Taktarova, Y. V., Tsavkelova, E. A., Egorova, M. A., Bubnov, I. A., Malakhova, D. V., ... & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2021). Microbial Degradation of Plastics and Approaches to Make it More Efficient. *Microbiology*, 90(6), 671-701. <https://doi.org/10.1126/science.aba9475>
- Méndez, C. R., Vergaray, G., Béjar, V. R., & Cárdenas, K. J. (2007). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Peruana de Biología*, 13(3), 203-206. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332007000100008&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000100008&lng=es).
- Mohee, R., Unmar, G. D., Mudhoo, A., & Khadoo, P. (2008). Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. *Waste Management*, 28(9), 1624-1629. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.07.003>.
- Mostajo-Zavaleta, M. N., Ochoa-Cámara, M. L., & Ambur-Soncco, R. L. (2017). Efectividad de cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* en la degradación de polietileno de baja densidad aislados en los botaderos de los Distritos de Sicuani y Calca-Cusco. *Cantua*, 16, 54-63. <https://doi.org/10.51343/cantu.v16i0.633>
- Muhonja, C. N., Makonde, H., Magoma, G., & Imbuga, M. (2018). Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. *PloS one*, 13(7), e0198446. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446>

- Munir, E., Harefa, R. S. M., Priyani, N., & Suryanto, D. (2018, March). Plastic degrading fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* isolated from local landfill soil in Medan. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 126, No. 1, p. 012145). IOP Publishing. DOI 10.1088/1755-1315/126/1/012145
- Lora, M. A., Tocci, C. A., & Avellaneda, A. S. (2019). *Planta de polietileno de baja densidad*. [Tesis de pregrado, Universidad Tecnológica Nacional] <https://ria.utn.edu.ar/handle/20500.12272/4007>
- Elhacham, E., Ben-Uri, L., Grozovski, J., Bar-On, Y. M., & Milo, R. (2020). Global human-made mass exceeds all living biomass. *Nature*, 588(7838), 442-444. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3010-5>
- Mueller, R. J. (2006). Biological degradation of synthetic polyesters— Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry*, 41(10), 2124-2128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.018>
- Lau, W. W., Shiran, Y., Bailey, R. M., Cook, E., Stuchtey, M. R., Koskella, J., ... & Palardy, J. E. (2020). Evaluating scenarios toward zero plastic pollution. *Science*, 369(6510), 1455-1461. <https://doi.org/10.1126/science.aba9475>
- Lu, H., Diaz, D. J., Czarnecki, N. J., Zhu, C., Kim, W., Shroff, R., ... & Alper, H. S. (2022). Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature*, 604(7907), 662-667. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04599-z>
- Ochoa Carreño, D. C., & Montoya Restrepo, A. (2010). Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Revista Facultad de Ciencias Económicas: Investigación y Reflexión*, 18(2), 55-74. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-)

[68052010000200004#:~:text=Un%20Consortio%20Microbiano%20es%20una,las%20actividades%20de%20los%20dem%C3%A1s.](#)

Peng, R., Xia, M., Ru, J., Huo, Y., & Yang, Y. (2018). Microbial degradation of polyurethane plastics. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology*, 34(9), 1398-1409. DOI: [10.13345/j.cjb.170532](https://doi.org/10.13345/j.cjb.170532)

Pinheiro C, Oliveira U, Vieira M (2017) Occurrence and Impacts of Microplastics in Freshwater Fish. *Journal of Aquaculture & Marine Biology* 5(6): 00138. DOI: 10.15406/jamb.2017.05.00138.

Pivokonsky, M., Cermakova, L., Novotna, K., Peer, P., Cajthaml, T., & Janda, V. (2018). Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water. *Science of the total environment*, 643, 1644-1651. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.102> .

Ray, S., & Cooney, R. P. (2018). Thermal degradation of polymer and polymer composites. *Handbook of environmental degradation of materials* (pp. 185-206). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52472-8.00009-5>

UNEP (2014) Valuing Plastics: The Business Case for Measuring, Managing and Disclosing Plastic. *Use in the Consumer Goods Industry*. <https://wedocs.unep.org/handle/20.500.11822/9238;jsessionid=47C9B11FEA9B22DF5E13EE2D947E4BEE>

Ru, J., Huo, Y., & Yang, Y. (2020). Microbial degradation and valorization of plastic wastes. *Frontiers in microbiology*, 11, 442. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442>

Raaman, N., Rajitha, N., Jayshree, A., & Jegadeesh, R. (2012). Biodegradation of plastic by *Aspergillus spp.* isolated from polythene polluted sites around Chennai. *Journal of*

*Academia and Industrial Reseach*, 1(6), 313-316.

<http://jairjp.com/NOVEMBER%202012/08%20RAAMAN.pdf>

Sánchez, C. (2020). Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro-and microplastics biodegradation. *Biotechnology advances*, 40, 107501. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.107501

Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, C. 2004. Introduction to food and airborne Fungi. 7<sup>a</sup> ed. CBS, Utrecht, Holanda.

Sen, S. K., & Raut, S. (2015). Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 462-473. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003>

Sekar, M., Ponnusamy, V. K., Pugazhendhi, A., Nižetić, S., & Praveenkumar, T. R. (2022). Production and utilization of pyrolysis oil from solidplastic wastes: A review on pyrolysis process and influence of reactors design. *Journal of environmental management*, 302, 114046. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114046>

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. *Afr. J. Microbiol. Res*, 3(10), 658–663. <http://www.academicjournals.org/ajmr>

Shah A., Hasan F., Hameed A., Ahmed S. (2020). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 26, 246-255. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>

Schnurr, R. E., Alboiu, V., Chaudhary, M., Corbett, R. A., Quanz, M. E., Sankar, K., ... & Walker, T. R. (2018). Reducing marine pollution from single-use plastics (SUPs): A

review. *Marine Pollution Bulletin*, 137, 157- 171.  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.001>

Schmidt, C., Krauth, T., & Wagner, S. (2017). Export of plastic debris by rivers into the sea. *Environmental Science & Technology*, 51(21), 12246- 12253.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02368>

Soncco, R. L. A., & Zavaleta, M. N. M. (2022). Efectividad de hongos filamentosos en la degradación de polietileno de baja densidad proveniente del botadero de Sicuani Provincia de Canchis–Cusco. *Q'EUÑA*, 13(2), 21-28.  
<https://revistas.unsaac.edu.pe/index.php/RQ/article/view/1097>

Spina, F., Tummino, M. L., Poli, A., Prigione, V., Ilieva, V., Cocconcelli, P., & Varese, G. C. (2021). Low density polyethylene degradation by filamentous fungi. *Environmental Pollution*, 274, 116-548. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116548>

Taghavi, N., Singhal, N., Zhuang, W. Q., & Baroutian, S. (2021). Degradation of plastic waste using stimulated and naturally occurring microbial strains. *Chemosphere*, 263, 127-975.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127975>

Tokiwa, Y., Calabria, B., Ugwu, C., & Aiba, S. (2009). Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3722–3742. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms10093722>

Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2010). Biodegradation of low density polyethylene by the action of a microbial consortium isolated from a landfill, Lima, Peru. *Revista Peruana de Biología*, 17(1), 133-136. <https://doi.org/10.15381/rpb.v17i1.62>

Tsuchii, A. (1980). Microbial degradation of polyethylene oligomers. *Report Ferment. Res. Inst*, 55, 35-40.

- Wierckx, N., Prieto, M. A., Pomposiello, P., de Lorenzo, V., O'Connor, K., & Blank, L. M. (2015). Plastic waste as a novel substrate for industrial biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 8(6), 900. Doi: [10.1111/1751-7915.12312](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12312)
- Wu, Y., Li, J., Yang, H., & Shin, H. J. (2017). Fungal and mushroom hydrophobins: A review. *Journal of Mushroom*, 15(1), 1-7. Doi:7 <http://dx.doi.org/10.14480/JM.2017.15.1.1>
- Yepes Aguirre, L. M. (2014). *Degradación de polietileno de baja densidad utilizando hongos. revisión sistemática de la literatura* [Tesis de pregrado Pontificia Universidad Haveriana] <http://hdl.handle.net/10554/16184>
- Zhang, T., Liu, P., Wang, Q., Liang, Q., & Qi, Q. (2021). Degradation of petroleum-based plastics by microbes and microbial consortia. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology*, 37(10), 3520-3534. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.210399>
- Zhang, Xuyuan, et al. "Systematical Review of Interactions Between Microplastics and Microorganisms in the Soil Environment." *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126288>
- 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* <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.738877>

**Anexo B**

*Esquema de la metodología empleada*

