

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Evaluación del potencial degradador de polietileno de baja
densidad de hongos cultivados en medio líquido**

Emilia Palomeque Álvarez

Biología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Bióloga

Quito, 27 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Evaluación del potencial degradador de polietileno de baja densidad de
hongos cultivados en medio líquido**

Emilia Palomeque Álvarez

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph. D

Quito, 27 de diciembre de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Emilia Palomeque Álvarez

Código: 00137585

Cédula de identidad: 1719602201

Lugar y fecha: Quito, diciembre de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El polietileno de baja densidad (PEBD) es el plástico de uso común que se encuentra con mayor frecuencia contaminando el medio ambiente por ser muy estable en el tiempo. Una solución a las problemáticas que generan los desechos hechos de este polímero es encontrar organismos que lo aprovechen como fuente de carbono y energía. Se ha demostrado anteriormente, que su tasa de biodegradación depende de la metodología utilizada, por lo que en esta investigación se realizó una revisión sistemática de literatura para determinar la mejor metodología para realizar ensayos de biodegradación de PEBD. También se evaluó el potencial degradador de cuatro hongos previamente aislados de bosques primarios. El ensayo se realizó cultivando los hongos en cuatro medios de cultivo líquidos, 3 con fuente de carbono y uno minimal, se utilizó hojas de polietileno de baja densidad sin pretratamiento y se realizó el ensayo con agitación. Después de 90 días se evaluó las muestras con un análisis de diferencia de masa y FTIR. Se observó que los hongos evaluados no tuvieron la habilidad de degradar este tipo de plástico al tiempo evaluado. Una posible explicación son los mecanismos adaptativos a las condiciones de laboratorio.

Palabras clave: Polietileno de baja densidad, *Xylaria*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, biodegradación.

ABSTRACT

Low-density polyethylene (LDPE) is the common use plastic that is most frequently found polluting the environment because it is very stable over time. A solution to the problems generated by waste made of this polymer is to find organisms that use it as a source of carbon and energy. It has been previously shown that its biodegradation rate depends on the methodology used, so in this research a systematic literature review was carried out to determine the best methodology to make biodegradation tests for LDPE. The degradative potential of four fungi previously isolated from primary forests was also evaluated. The test was carried out by cultivating the fungi in four liquid culture media, 3 with a carbon source and a minimal one, low-density polyethylene sheets without pretreatment were used and the test was made under shaking conditions. After 90 days the samples were evaluated with a mass difference analysis and FTIR. The results showed that the fungi did not have the ability to degrade this type of plastic at the time tested. One possible explanation is adaptive mechanisms to laboratory conditions.

Keywords: Low density polyethylene, Xylaria, Trichoderma, Aspergillus, biodegradation.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Polietileno de baja densidad.....	13
1.2 Biodegradación	14
1.3 Análisis de espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	15
1.4 Justificación y objetivos.....	17
2. MÉTODOS	17
2.1 Revisión sistemática de literatura	18
2.2 Ensayo de degradación en medio líquido	19
2.2.1 Preparación de medios de cultivo	20
2.2.2 Lavado y desinfección de los plásticos	20
2.3 Análisis de biodegradación del polietileno de baja densidad	21
2.3.1 Diferencia de masa.....	21
2.3.2 Análisis FTIR.....	21
3. RESULTADOS.....	21
3.1 Revisión sistemática de literatura	22
3.2 Cambio de masa.....	25
3.3 Análisis FTIR.....	27
4. DISCUSIÓN	28
5. CONCLUSIONES	30
6. RECOMENDACIONES.....	30
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXO A: Recetas medios de cultivo.....	35
ANEXO B: Información detallada de la metodología de los artículos de la revisión sistemática de literatura.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tasa de degradación superficial de cada tipo de plástico en rellenos sanitarios o compost.....	10
Tabla 2 Propiedades del PEBD.....	14
Tabla 3 Caracterización de los picos formados en distintos rangos de número de onda, en el análisis FTIR.....	17
Tabla 4 Análisis de la metodología utilizada para ensayos de biodegradación en los artículos seleccionados	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura esquemática del polietileno de baja densidad (Sastri, 2010).	14
Figura 2 Diagrama esquemático de los componentes del espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (Munaj, Subroto y Suwarno, 2018).	16
Figura 3 Prisma revisión sistemática de literatura	19
Figura 4 Esquema de la metodología del ensayo de biodegradación. Medios: minimal (M), rosa bengala (R), melaza (E) y PDB (P).	21
Figura 5 Análisis del tipo de medio, uso de fuente de carbono, pretratamiento del plástico y aireación del medio, en la metodología de los artículos seleccionados. Los números representan la cantidad de artículos.	23
Figura 6 Análisis de Variancia y prueba de Tukey HSD ($\alpha = 0.05$).	26
Figura 7 Crecimiento de <i>Xylaria</i> sobre PEBD en el medio de rosa bengala.	27
Figura 8 Espectros FTIR de los tratamientos realizados. Las líneas verticales rojas son las regiones entre: $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$, $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ y alrededor de 3300 cm^{-1}	27

INTRODUCCIÓN

Los plásticos son uno de los materiales que revolucionaron y transformaron la forma en la que se vive y consume en la actualidad. Estos son polímeros orgánicos, sintetizados a partir del petróleo y gas natural, que se caracterizan por tener un elevado peso molecular (Rhodes, 2018). Se utilizan en diversos campos, pero más de un tercio de la producción global total está destinada al empaquetamiento de productos. La mayoría de estos empaques no son reciclables por lo que se terminan convirtiendo en basura. Alrededor de 5 mil millones de toneladas de plástico producidas desde 1950 hasta el 2015, se encuentran depositadas en rellenos sanitarios y contaminando distintos ecosistemas como los ríos y océanos (Rhodes, 2018). El tiempo de degradación de cada plástico es diferente, depende de los aditivos que se le añaden y puede variar según el tamaño y las condiciones del lugar donde fue desechado. Las fundas y botellas plásticas son los elementos que con mayor frecuencia se encuentran contaminando el ambiente, se ha reportado que estos pueden tardar en degradarse entre 500 a 1000 y entre 70 a 450 años, respectivamente (Chamas et al., 2020) La Tabla 1 detalla las tasas de degradación estimadas de cada tipo de plástico. Las características fisicoquímicas del plástico que le hicieron ideal para sus distintas aplicaciones son las mismas que explican por qué es altamente persistente en el ambiente y resistente a la degradación (Singler, 2014). Este material que se consideró milagroso se convirtió en uno de los peores contaminantes, y su erradicación, uno de los mayores retos del siglo XXI (Chalmin, 2019).

Tabla 1 Tasa de degradación superficial de cada tipo de plástico en rellenos sanitarios o compost

Plástico	Tasa de degradación ($\mu\text{g año}^{-1}$)
Polietileno tereftalato (PET)	Cercano a 0
Polietileno de alta densidad (HDPE)	1

Cloruro de polivinilo (PVC)	Cercano a 0
Polietileno de baja densidad (LDPE)	10
Polipropileno (PP)	Menos a 1
Poliestireno (PS)	Cercano a 0
Otros	100

Recuperada de Chamas et al (2020).

El plástico tiene varios efectos adversos en los ecosistemas, desprende componentes químicos tóxicos utilizados en su producción y adsorbe contaminantes, como los metales pesados o pesticidas, que están presentes en concentraciones trazas en los cuerpos de agua. Cuando los animales los ingieren, se exponen a una mezcla de compuestos tóxicos que se bioacumulan en las redes tróficas (Seltenrich, 2015). Algunos de estos son disruptores endócrinos y afectan el desarrollo, reproducción y sistema inmune del organismo. La contaminación de plástico es tan grande que se ha convertido en un elemento ubicuo del ecosistema. Se conoce que mamíferos, tortugas, aves, peces y macroinvertebrados marinos han consumido estos polímeros (Rochman et al., 2014). Además de estos efectos, los plásticos también amenazan a la diversidad de los ecosistemas acuáticos, porque actúan como un vector que transporta especies nativas de una localidad a otra remota, lo que altera la composición de las comunidades bióticas (Rhodes, 2018).

A nivel mundial, se estima que anualmente se producen entre 350 y 400 millones de toneladas de plástico (Danso, Chow y Strelt, 2019). En Ecuador en el 2018, se desecharon 531 461 toneladas de plástico, lo que correspondió al 11% del total de residuos sólidos producidos en el país ese año. La mitad de esta cantidad se atribuyó a fundas y recipientes de poliestireno. En el 2019, 6 mil toneladas de fundas utilizadas una sola vez fueron enterradas en rellenos sanitarios y desechadas en quebradas. Por el mal manejo de los residuos que existe en el país, estos contaminantes han alcanzado otros ecosistemas (Morán, 2020). Esto explica por qué se

encontró microplásticos en el 75% de las muestras de agua de grifo de la capital (Donoso y Rios-Touma, 2020). Frente a esta problemática, el estado ha implementado regulaciones sin éxito. En el presente año, se aprobó la Ley Orgánica para la Racionalización, Reutilización y Reciclaje de Plásticos de un “Solo Uso”, que da un plazo de 36 meses para prohibir en el país la fabricación e importación de plásticos de un solo uso no reciclables o que no tengan un porcentaje de materiales reciclados (Morán, 2020; Alarcón, 2020). A pesar de que se establecen estas restricciones, la solución a los efectos adversos ambientales que genera este contaminante, es detener su producción y minimizar su uso. Sin embargo, la mayor preocupación actual son los plásticos que fueron utilizados, desechados y persisten en los ecosistemas. Una forma de enfrentar este conflicto es encontrar organismos, mediante la investigación científica, que aprovechen a estos polímeros como fuente de carbono y energía.

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos de interés por la forma en que metabolizan sus nutrientes. Crecen en el sustrato del que se alimentan y excretan, mediante exocitosis, enzimas digestivas que degradan las moléculas complejas en compuestos simples que pueden ser absorbidos. Tienen la capacidad de oxidar distintos polímeros por la diversidad de enzimas inespecíficas que sintetizan intra y extracelularmente (Sánchez, 2020). Se ha reportado que algunos hongos filamentosos tienen la habilidad de aprovechar distintos contaminantes ambientales como fuente de carbono por lo que tienen un rol importante en su degradación y mineralización (Pathak y Navneet, 2017). Una de las enzimas relacionada a la degradación del plástico es la lacasa, perteneciente a la familia de las oxidasas de cobre, tiene la capacidad de oxidar compuestos orgánicos e inorgánicos. Estas remueven un electrón a la vez y utiliza el oxígeno como aceptor final (More et al., 2011) Otra familia de enzimas involucradas son las del citocromo P450, se conoce que tienen un rol importante en la desintoxicación de contaminantes y facilitan el crecimiento de los hongos en ambientes con condiciones cambiantes (Črešnar y Petrič, 2011). Al ser un sistema inespecífico, puede oxidar

diversas moléculas complejas, por eso la investigación se ha centrado en encontrar hongos que produzcan enzimas que puedan ser utilizadas en la degradación de polietileno de baja densidad (Sheik et al., 2015).

A continuación, se exponen las características del polietileno de baja densidad, se define qué es la biodegradación y el análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés).

1.1 Polietileno de baja densidad

El polietileno de baja densidad (PEBD) pertenece a la clasificación de los termoplásticos, estos se caracterizan porque pueden ser moldeados repetidas veces con calor después de ser formados. Fue descubierto por primera vez en 1898 y empezó a ser sintetizado desde 1933. Los plásticos se clasifican por su peso molecular, el tipo de polímero del que están hechos, por los grupos funcionales y elementos añadidos a su cadena elemental, y además por el método para sintetizarlos (Rhodes, 2018). Usualmente el PEBD se sintetiza mediante la polimerización del etileno a alta presión y presencia de radicales libres. Se considera que es de baja densidad por tener ramificaciones en la cadena principal (Figura 1). Es un material no reactivo a temperatura ambiente pero el contacto con agentes oxidantes causa su ablandamiento o hinchazón. Se puede utilizar continuamente hasta temperaturas de 80°C y por breves periodos de tiempo a 95°C. Es un sólido que tiene un grado de cristalinidad que varía entre el 50 y 60%. Es opaco (pero con alta claridad en films delgados), resistente a la tracción, desgarró y radiación, químicamente resistente e inerte, flexible incluso en bajas temperaturas, inoloro, sinsabor y no tóxico. Tiene una baja permeabilidad al vapor de agua y excelentes propiedades dieléctricas (Kumar y Raut, 2014; Sastri, 2010). Las propiedades específicas de este material se detallan en la Tabla 1, recuperada de Kumar y Raut (2014).

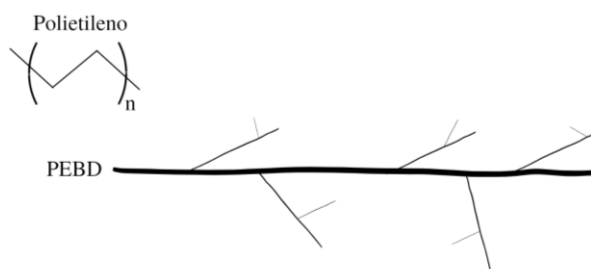


Figura 1 Estructura esquemática del polietileno de baja densidad (Sastri, 2010).

Tabla 2 Propiedades del PEBD

Propiedades	Unidad	Valor
Densidad	g cm^{-3}	0.91
Dureza	Shore D	44
Módulo de elasticidad	GPa	0.2
Módulo de flexión	GPa	0.4
Punto de fusión	$^{\circ}\text{C}$	115

Recuperado de Kumar y Raut (2014).

El elevado peso molecular, la superficie hidrófoba (por la presencia de grupos $-\text{CH}_2$) y la alta cristalinidad son lo que le convierten en un contaminante altamente persistente. Estas moléculas son tan estables que resulta difícil que se descomponga en elementos más simples, que no sean contaminantes, en un período de tiempo corto (Danso, Chow y Strelt, 2019).

1.2 Biodegradación

La biodegradación es el proceso por el cual un organismo descompone un contaminante en moléculas simples que pueda asimilar y que altera sus características fisicoquímicas. Existen cuatro etapas en este proceso: la bio-deterioración, bio-fragmentación, bio-asimilación y mineralización (Pathak y Navneet, 2017). En la bio-deterioración del polietileno inicia la oxidación de las cadenas que lo componen y se forman grupos carbonilo que después son aprovechados por los microorganismos. En esta etapa, no hay una disminución del peso

molecular, se caracteriza porque se forman puntos de acceso para que actúen las enzimas que secretan los microorganismos. Esta fase puede ser combinada con procesos fisicoquímicos como la radiación UV (Muhonja et al., 2018). Después, el polímero sufre una transformación que permite su fragmentación y formación de monómeros que son asimilados y utilizados como fuente de carbono para la producción de energía. Cuando los productos finales son el dióxido de carbono y el agua, se dice que hubo mineralización y que la degradación fue completa (Montazer et al., 2020).

Durante todo este proceso sucede la hidroxilación de los enlaces carbono-carbono para formar alcoholes primarios y secundarios, que después son oxidados en aldehídos o cetonas y finalmente en ácidos carboxílicos. La concentración de los grupos carbonilo que se formaron al inicio, disminuye, porque también son transformados en ácidos carboxílicos. Todas estas reacciones están mediadas por enzimas que difieren en cada organismo, sin embargo, la falta de investigación acerca de los mecanismos genéticos asociados a la degradación de polietileno y las rutas metabólicas que aprovechan esta fuente de carbono, es la principal razón por lo que se desconocen pasos intermedios de las reacciones y la función de todas las enzimas involucradas (Montazer et al., 2020).

1.3 Análisis de espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Las moléculas de un objeto, al interactuar con radiación electromagnética pueden absorber, reflejar, transmitir o dispersar la energía emitida. El tipo de interacción que sucede proporciona información sobre su estructura y su transición del nivel de energía (Munaj, Subroto y Suwarno, 2018). El análisis FTIR permite estudiar las interacciones entre la materia y los campos electromagnéticos en la región de luz infrarroja. Cuando un objeto se coloca en el camino de un rayo infrarrojo, algunas de sus moléculas se excitan a un estado vibratorio más

alto, por lo que una cantidad de energía es absorbida y la restante, transmitida (National University of Singapore, s.f.). La intensidad de la energía irradiada al objeto y la que es transmitida puede ser detectada, esto permite distinguir los grupos funcionales de los que se compone una muestra, ya que se cada uno absorbe energía a un distinto número de onda. El análisis FTIR se basa en este principio, genera gráficas de absorción o transmitancia contra el número de onda. Los componentes principales se muestran en la Figura 2 (Munaj, Subroto y Suwarno, 2018).

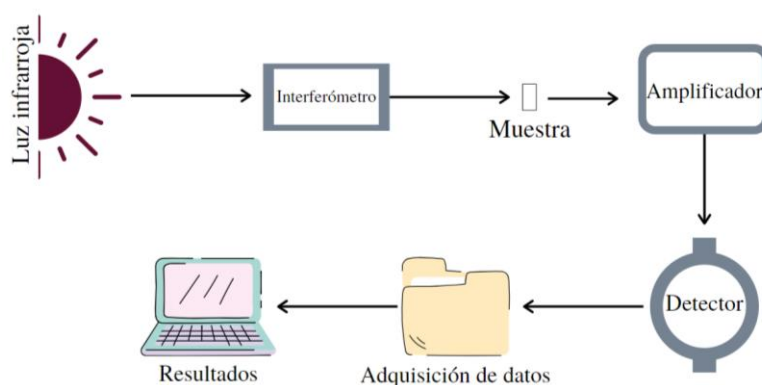


Figura 2 Diagrama esquemático de los componentes del espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (Munaj, Subroto y Suwarno, 2018).

El espectro infrarrojo analiza dos zonas, la de los grupos funcionales que va de 1200 a 3600 cm^{-1} y la de la huella digital que va de los 600 a 1200 cm^{-1} . La huella digital es una zona característica de cada material y es donde los picos de absorbancia son invariables al menos que haya sufrido una transformación por procesos, físicos, químicos o biológicos. Esta metodología permite distinguir la disminución de grupos funcionales o aparición de nuevos, por la actividad oxidativa de los organismos (Uribe et al., 2010). En la Tabla 2, recuperada de Montazer et al., (2020), se presentan los grupos funcionales que pueden ser identificados mediante el FTIR. En esta investigación, es de interés evaluar las regiones entre 1000 - 1200

cm^{-1} , $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ y cerca de 3300 cm^{-1} , ya que son los rangos de número de onda en donde se observaron picos de absorbancia en el estudio de Goyes (2019) y permite comprobar el potencial degradador de los hongos utilizados en esta investigación.

Tabla 3 Caracterización de los picos formados en distintos rangos de número de onda, en el análisis FTIR

Número de onda (cm^{-1})	Enlace	Grupo funcional
3000–2850	–C–H	Alcanos
2830–2695	H–C = O: C–H	Aldehídos
1710–1665	–C = O	Cetonas, aldehídos
1470–1450	–C–H	Alcanos
1320–1000	–C–O	Alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres, éteres
1000–650	=C–H	Alquenos

Recuperada de Montazer et al (2020)

1.4 Justificación y objetivos

Las fundas plásticas y distintos empaques hechos de polietileno de baja densidad tienen un tiempo de uso extremadamente corto, generalmente, después de un solo uso son desechados. Por eso es el tipo de plástico que con mayor frecuencia se encuentra contaminando el ambiente. Buscar potenciar la habilidad degradadora de hongos aislados de bosques primarios, resulta relevante para encontrar soluciones a las problemáticas ambientales que genera este polímero. Los alcances principales de esta investigación son: determinar, mediante una revisión sistemática de literatura, la mejor metodología para realizar ensayos de degradación y evaluar el potencial degradador de polietileno de baja densidad de cuatro hongos. aislados de bosques primarios, por Goyes (2019), en cuatro medios de cultivos.

MÉTODOS

Los cuatro hongos utilizados en esta investigación, pertenecientes a los géneros: *Xylaria*, *Aspergillus* y *Trichoderma*, fueron aislados por Paulette Goyes (2019). El objetivo de su investigación fue encontrar, en bosques primarios, organismos capaces de aprovechar el polietileno de baja densidad como fuente de carbono. Esta habilidad se comprobó al realizar ensayos de biodegradación en medio minimal por 60 días. Se reportó variación másica de los plásticos y mediante el análisis de FTIR, se comprobó la formación de grupos funcionales indicadores de degradación. También, mediante microscopía electrónica de barrido, se observó los cambios superficiales en el plástico por la acción enzimática de los hongos (Goyes, 2019).

2.1 Revisión sistemática de literatura

Para determinar la mejor metodología que potencia la habilidad de degradación de polietileno de baja densidad por acción de hongos, se realizó una revisión sistemática. Se utilizaron las bases de datos Scopus y ScienceDirect porque permiten extraer los resultados de los términos de búsqueda que incluyen el título y resumen de cada artículo. Se utilizaron los términos de búsqueda “fungi”, “biodegradation” y “low density polyethylene”. En la Figura 3 se presentan el número de resultados encontrados en cada base de datos y el protocolo de selección de artículos. Primero se eliminaron los artículos duplicados, después se descartaron aquellos cuyo título y resumen trataba sobre la biodegradación con bacterias, otros tipos de plástico, polietileno de baja densidad con aditivos añadidos, evaluación de la degradabilidad de biomateriales y biodegradación en compostaje. Después se leyó toda la investigación de los documentos seleccionados y se descartaron aquellos que no eran el tipo de estudio de interés o cuyo texto no se encontró completo. Se adicionaron 4 artículos encontrados por una búsqueda manual en Google Scholar. En los 23 artículos se analizó la metodología. Se realizó una tabla resumen en la que se determinó qué tipo de medio se utiliza para los ensayos de degradación, si tienen fuente de carbono, aireación y si es que se realiza un pretratamiento físico o químico

al plástico para iniciar el proceso de oxidación. Con los resultados obtenidos de esta investigación, se diseñó la metodología para la evaluación del potencial degradador de los hongos del estudio previo de Goyes (2019).

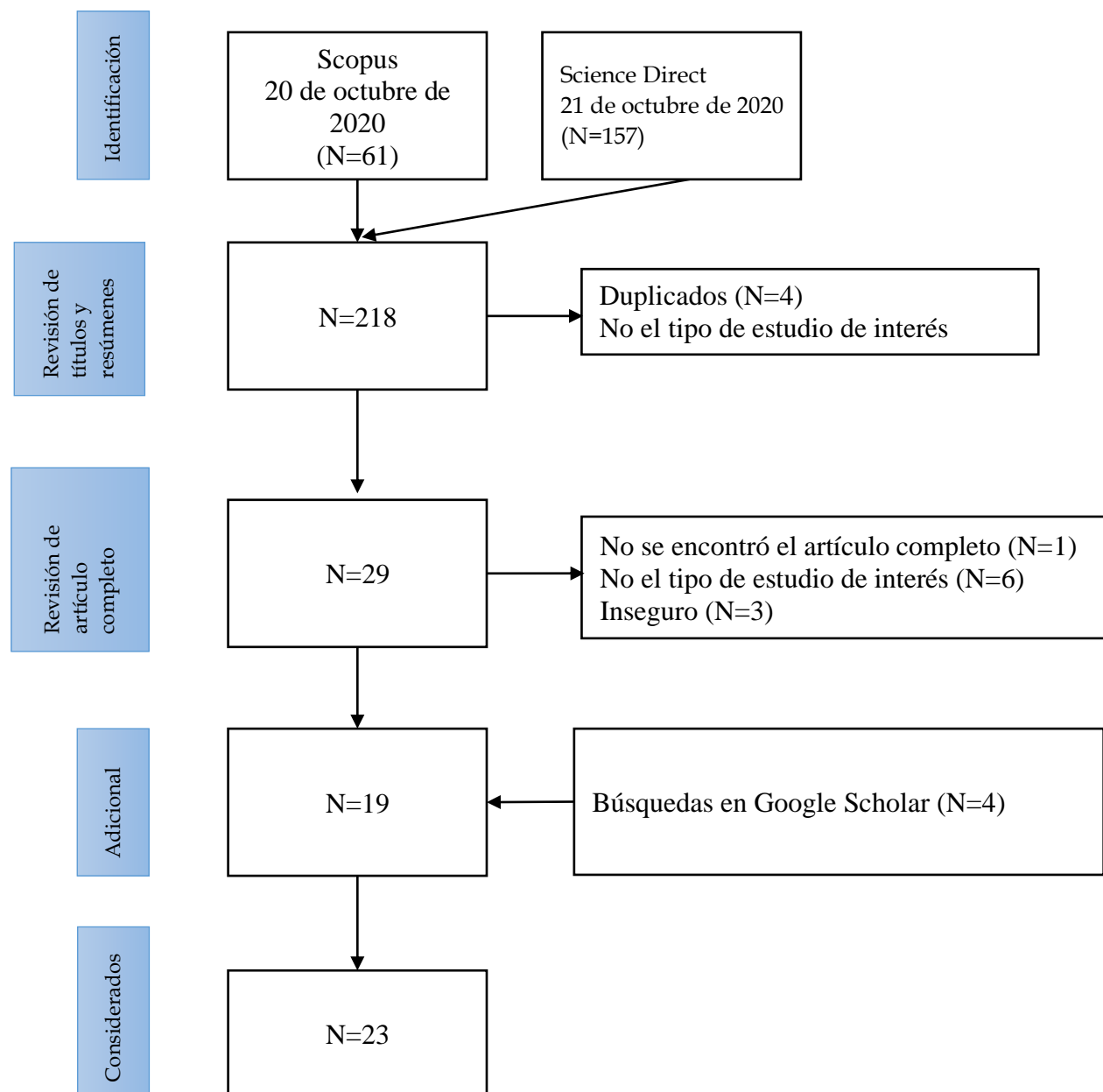


Figura 3 Prisma revisión sistemática de literatura

2.2 Ensayo de degradación en medio líquido

2.2.1 Preparación de medios de cultivo

Los ensayos de biodegradación se realizaron en cuatro medios de cultivo líquido: minimal, melaza, rosa bengala y caldo de dextrosa de papa (PDB, por sus siglas en inglés). Las recetas se detallan en ANEXO A. Se preparó 500 ml de cada uno y se repartió 25 ml en Erlenmeyers de 100 ml. Cada matraz se taponó con gasa, algodón, papel aluminio y se autoclavaron (121°C por 15 minutos). Se recortaron rectángulos de PEBD expandido mecánicamente (Proenfar, Colombia), se numeraron y pesaron en la balanza analítica AUW120D (Shimadzu Corporation) (Goyes, 2019). Las piezas se desinfectaron con luz ultravioleta por 30 minutos a cada lado. Se colocó en cada Erlenmeyer esterilizado un trozo de plástico desinfectado y un disco de 6mm de diámetro de las placas de cultivo con la ayuda de un tubo de acero estéril. Los hongos fueron previamente cultivados durante tres semanas en agar de dextrosa de papa (PDA). Cada tratamiento tuvo como control un matraz con el medio de cultivo y pieza de PEBD desinfectada. Se realizaron 12 ensayos de cada medio para tener 3 réplicas por hongo. Los 48 ensayos se mantuvieron en agitación a 100 rpm, a temperatura ambiente, por un tiempo de 90 días.

2.2.2 Lavado y desinfección de los plásticos

Transcurrido el tiempo del ensayo, se retiraron los plásticos de cada Erlenmeyer y el micelio añadido al PEBD. Se colocó a cada pieza en un recipiente de cristal diferente para realizar el proceso de desinfección e identificar a qué tratamiento perteneció. Primero, se añadió hipoclorito de sodio al 5%, luego se sumergieron las muestras en una solución de dodecil sulfato de sodio al 1% (SDS, por sus siglas en inglés), y finalmente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Cada proceso de desinfección se mantuvo en agitación por 15 minutos como se observa en la Figura 4.

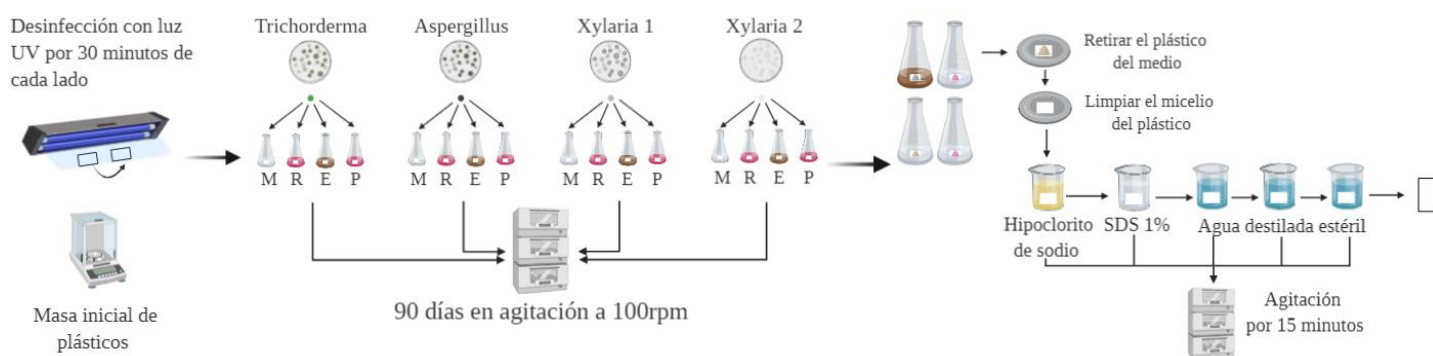


Figura 4 Esquema de la metodología del ensayo de biodegradación. Medios: minimal (M), rosa bengala (R), melaza (E) y PDB (P).

2.3 Análisis de biodegradación del polietileno de baja densidad

2.3.1 Diferencia de masa

Después del proceso de desinfección, se pesó cada plástico en la balanza analítica. Se calculó la diferencia de masa y se realizó un Análisis de Variancia (ANOVA) con prueba de Tukey HSD ($\alpha=0.05$) usando R y R studio (RStudio Team, 2020).

2.3.2 Análisis FTIR

Con la ayuda de un bisturí, se realizaron 3 cortes superficiales en distintos puntos de cada pieza de PEBD. Se realizó el análisis FTIR de estas muestras en el espectrómetro Cary 630 FTIR Spectrometer (Agilent Technologies) (Goyes, 2019). El espectro utilizado fue entre 650 y 4000 cm^{-1} . Se analizó la aparición de picos de absorbancia en las regiones de interés detalladas en la sección 1.4.

RESULTADOS

3.1 Revisión sistemática de literatura

La búsqueda de hongos capaces de degradar PEBD aumentó en las últimas dos décadas, sin embargo, en base a la revisión sistemática de literatura, la riqueza es de apenas 16 géneros. Los organismos han sido aislados de diferentes tipos de suelo y ecosistemas. Muchas de las investigaciones han aislado hongos de ambientes contaminados, como rellenos sanitarios (ANEXO B), porque se ha reportado que son los que tienen la mayor tasa de degradación (Gajendiran et al., 2016). Para demostrar que el cambio en las características fisicoquímicas del plástico se debe a la actividad enzimática de los hongos, se realizan ensayos de biodegradación. La mayoría de las investigaciones los realizan en un medio de cultivo líquido con y sin fuente de carbono (Figura 5). Los ensayos que utilizaron glucosa, sacarosa, dextrosa, extracto de malta o levadura tenían el objetivo de promover el crecimiento inicial del hongo. Se esperaba que en el transcurso del experimento esta fuente de carbono se agote y el organismo proceda a utilizar el polímero (Passos, Marconato y Franchetti, 2015). Con respecto a la agitación como se observa en la Tabla 3, muchas investigaciones no especificaban esta información. Todos los ensayos con agitación tuvieron una frecuencia mayor a 100 revoluciones por minuto. Esta condición es importante para mantener alta la densidad celular en el cultivo e incrementar la concentración de oxígeno en el líquido (Huang y Tang, 2007). Los artículos que dejaron estáticos los ensayos no mencionaron razones o beneficios de esta condición (Kunlere, Fagade y Nwadike, 2019; Ojha et al., 2017).

Como se mencionó en la sección 1.2, la bio-deterioración del PEBD puede empezar con pretratamientos físicos o químicos. En las investigaciones consideradas, no hay una tendencia a realizar o no un pretratamiento en los plásticos (Figura 5). En la Tabla 3, se observa que los pretratamientos que se realizan con frecuencia son la exposición a altas temperaturas y, por prolongados periodos de tiempo, a radiación ultravioleta y gamma. Los pretratamientos

cálculo del índice carbonilo, microscopía de fuerza atómica y cambio de pH (información detallada en ANEXO B.

Tabla 4 Análisis de la metodología utilizada para ensayos de biodegradación en los artículos seleccionados

Referencia	Organismo	Tipo de medio	Fuente de carbono	Agitación (rpm)	Pretratamiento
Malachová et al., 2020	<i>Trichoderma hamatum</i> , <i>Trichaptum abietinum</i> , <i>Byssochlamys nivea</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>	Líquido	Sí: Sacarosa	No especifica	Sí y no: Irradiación gamma y UV combinado con tratamiento térmico
Muhonja et al., 2018	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus nidulans</i>	Líquido	Sí: Extracto de levadura	150	No
Uribe et al., 2010	<i>Penicillium sp.</i>	Líquido	No	No especifica	No
Passos, Marconato y Franchetti, 2015	<i>Paecilomyces variotii</i>	Agar	Sí: Dextrosa	No aplica	No
Sheik et al., 2015	<i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Líquido	No especifica	No especifica	Sí: Irradiación gamma de 0 a 1000kGy
Kunlere, Fagade y Nwadike, 2019	<i>Aspergillus flavus</i>	Líquido	No	Estático	Sí: Tratamiento térmico: autoclavado
Ameen et al., 2015	<i>Aspergillus caespitosus</i> , <i>Phialophora alba</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Alternaria alternata</i> <i>Eupenicillium hirayamae</i>	Líquido	No	100	No
Manzur, A., Limón-González, M., y Favela-Torres, E. (2004)	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Gliocladium virens</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Líquido	No	No especifica	Sí: Irradiación UV por 29 días combinado con tratamiento térmico.
Paço et al., 2017	<i>Zalerion maritimum</i>	Líquido	Sí: Glucosa, extracto de malta, peptona	120	No
Awasthi et al., 2017	<i>Rhizopus oryzae</i> NS5	Líquido	Sí: Dextrosa de papa	120	Sí: Tratamiento térmico
Gómez-Méndez et al., 2018	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Agar	Sí: Glucosa	No aplica	Sí: Descarga de plasma luminiscente de oxígeno
Jayaprakash Palempalli, 2018	<i>Aspergillus oryzae</i>	Líquido	No	No especifica	Sí y no: Tratado con ácido

					palmítico al 1% disuelto en 2- propanol
<i>Ojha et al., 2017</i>	<i>Penicillium oxalicum,</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Líquido	Sí: Sucrosa	Estático	No
<i>Das, Kumar y Das, 2018</i>	<i>Aspergillus flavus,</i> <i>Aspergillus versicolor,</i> <i>Fusarium solani</i>	Líquido	No	No especifica	Sí: Tratado en una solución de xileno a 140°C
<i>Duddu y Guntuku, 2015</i>	<i>Actinomycete</i>	Líquido	Sí: Extracto de levadura	No especifica	Sí: Tratamiento térmico: autoclavado
<i>Abraham et al., 2017</i>	<i>Aspergillus nomius</i>	Líquido	No	120	No
<i>Gajendiran,</i> <i>Krishnamoorthy</i> y <i>Abraham, 2016</i>	<i>Aspergillus clavatus</i>	Líquido	Sí: Glucosa	120	No
<i>Das y Kumar, 2014</i>	<i>Aspergillus sp., Fusarium</i> <i>sp.</i>	Líquido	No	130	No
<i>Sáenz et al., 2019</i>	<i>Aspergillus niger,</i> <i>Aspergillus terreus</i>	Agar	Sí: Sucrosa	No aplica	No
<i>Munir et al., 2017</i>	<i>Trichoderma viride,</i> <i>Aspergillus nomius</i>	Agar	Sí: Glucosa	No aplica	No
<i>Hasan etl al. 2007</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Líquido	No	120	Sí: Irradiación UV combinado con tratamiento térmico y con ácido nítrico (99.0%)
<i>Hikmah, Setyaningsih y</i> <i>Pangastuti, 2018</i>	<i>Trichoderma spp.</i>	Agar	No	No aplica	No
<i>Volke-Sepúlveda et al.,</i> <i>2002</i>	<i>Penicillium pinophilum,</i> <i>Aspergillus niger</i>	Líquido	Sí: Glucosa	No especifica	Sí: Tratamiento térmico (80°C)

En base a estos resultados se diseñó la metodología utilizada. Se seleccionó el medio de rosa bengala por ser uno de los utilizados en las investigaciones analizadas. El medio de melaza se usó como medio de bajo costo y el de PDB porque tiene los mismos componentes del medio en el que se mantienen los cultivos en el banco del laboratorio. El ensayo duró 90 días y a diferencia de lo reportado, no se secaron las muestras en un horno ni a temperatura ambiente.

3.2 Cambio de masa

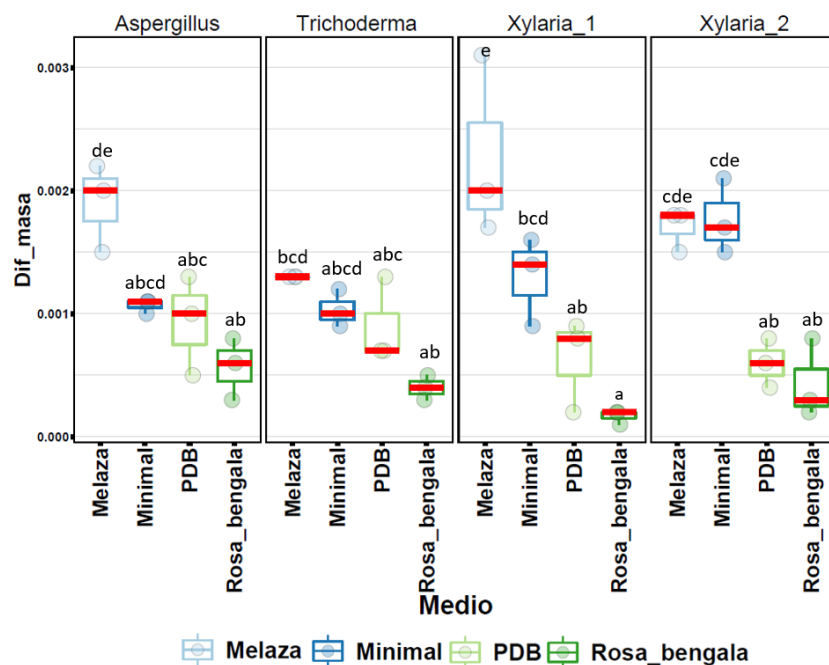


Figura 6 Análisis de Variancia y prueba de Tukey HSD ($\alpha=0.05$).

Después de 90 días, la masa final de todas las muestras de PEBD fue mayor a la inicial. En los ensayos de biodegradación se espera que el polímero disminuya su masa porque las cadenas de carbono son fragmentadas y asimiladas por los hongos (Kumar y Raut, 2015). Sin embargo, en esta investigación los resultados fueron contrarios a lo esperado. Una posible explicación es que al utilizar el plástico como sustrato para crecer (Figura 7), el micelio del hongo siguió pegado al polímero después del proceso de lavado y desinfección. Espinoza (2018), reportó resultados similares con la diferencia que sus muestras de PEBD sufrieron cambios de coloración. Este análisis no es un indicador confiable de la habilidad degradadora de los hongos, debe ser corroborado con otro porque existe la posibilidad que sea afectado si el procedimiento de limpieza y desinfección es deficiente (Shah et al., 2008). En la Figura 6 se observa que, en todos los hongos, el medio de cultivo en el que mayor aumento de masa significativo hubo, fue con el de melaza. En la revisión sistemática de literatura muchas investigaciones secan las muestras en un horno o a temperatura ambiente antes de pesarlo. En esta investigación se secaron con papel estéril y se pesaron el mismo día después del proceso

de desinfección. La ausencia de este procedimiento es otra posible explicación del aumento de masa.

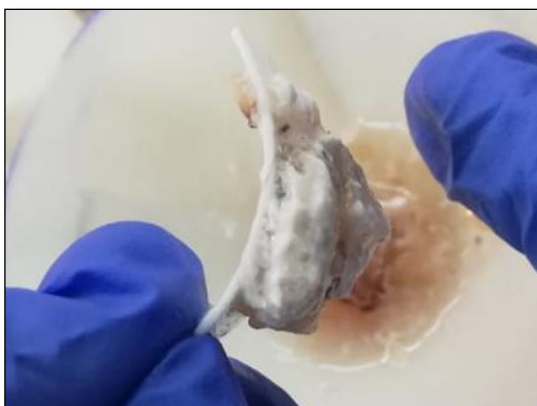


Figura 7 Crecimiento de *Xylaria* sobre PEBD en el medio de rosa bengala.

3.3 Análisis FTIR

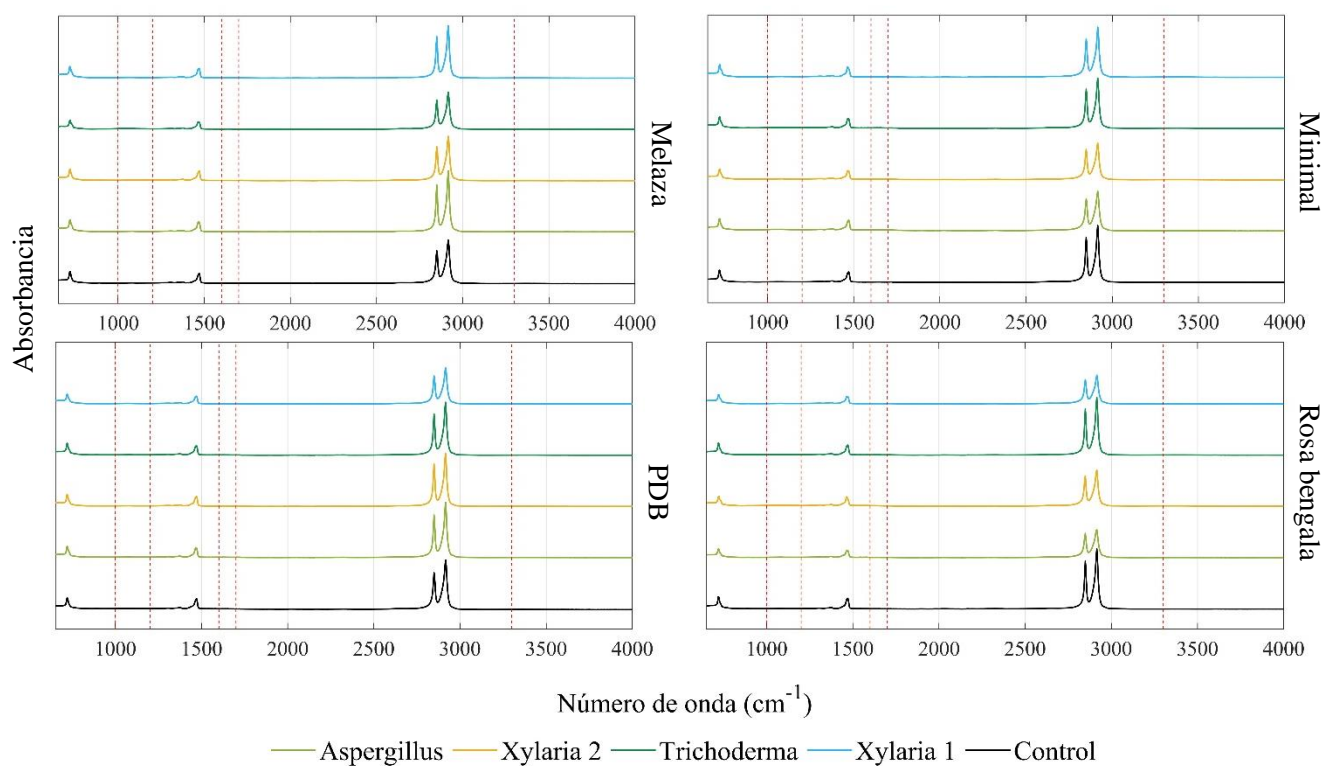


Figura 8 Espectros FTIR de los tratamientos realizados. Las líneas verticales rojas son las regiones entre: $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$, $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ y alrededor de 3300 cm^{-1} .

La absorbanza es una medida directamente proporcional a la concentración de un grupo funcional en una muestra, por eso, la ausencia de picos en las regiones esperadas demuestra que no se formó ningún producto por la actividad oxidativa de los organismos (Shah et al., 2008). El análisis FTIR permite cuantificar la biodegradación al comparar la absorbanza a cierta longitud de onda entre la muestra del tratamiento y el control (Martínez-Romo et al., 2015), sin embargo, como se aprecia en la Figura 8, no existe ninguna diferencia entre los controles y las muestras de cada ensayo. En los picos entre $689-768\text{ cm}^{-1}$ y $1345-1505\text{ cm}^{-1}$ no hay diferencias, solamente en la región entre 2760 y 2990 cm^{-1} , se observa que el tamaño de los picos varía. La última región está relacionada a los picos que caracterizan al material. Los espectros obtenidos son comparables a los que se reportan en la investigación de Martínez-Romo et al (2015).

DISCUSIÓN

Los dos análisis utilizados para la evaluar la biodegradación del PEBD demuestra que los hongos utilizados perdieron la habilidad de aprovechar este polímero como fuente alterna de carbono. Esto genera la inquietud de por qué sucede esto. No existe una explicación certera que responda esta incógnita, sin embargo, es importante analizar qué condiciones fueron distintas entre el primer ensayo de Goyes (2019) y la presente investigación, para entender los resultados obtenidos. Goyes utilizó los primeros aislados de bosque primarios, mientras que los que se utilizaron en este estudio fueron subcultivos que estuvieron almacenados en condiciones ideales por varios meses antes de utilizarlos en el ensayo de biodegradación. Esta diferencia se relaciona con lo que pasa con las características y respuestas fisiológicas de los organismos que son cultivados en laboratorio, y cómo se diferencian con los de la misma especie que se encuentran en la naturaleza.

Los organismos en el laboratorio se mantienen en cultivos puros y aislados en un ambiente controlado. Se provee la temperatura, cantidad de nutrientes y humedad necesaria para su reproducción y crecimiento exponencial. En cambio, en la naturaleza, los hongos están en un ambiente heterogéneo, en el que las variables abióticas no son constantes, además, los organismos en la naturaleza son parte de una comunidad, por lo que compiten con otras especies para aprovechar los recursos disponibles del ecosistema. Estas diferencias de las variables ambientales y las relaciones interespecíficas son presiones que determinan las características de un organismo y sus respuestas fisiológicas (Palková, 2004). Un artículo reportado que demuestra cómo las condiciones ideales del laboratorio cambian el comportamiento y fisiología de un organismo, analiza las diferencias en la formación de colonias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los primeros aislados de la naturaleza de levaduras silvestres tienen patrones esponjosos en sus colonias, porque están conectados en una matriz que funciona como andamio y protege a la colonia a los cambios de humedad. Cuando se realizan subcultivos las colonias pierden esta característica y la matriz extracelular desaparece. La pérdida de esta habilidad está acompañada de cambios en la expresión genética y se explica por los mecanismos evolutivos y la acumulación, a largo plazo, de mutaciones que seleccionan las cepas del laboratorio. El cambio de expresión genética transformó el estilo de vida de la levadura (Palková, 2004).

Una posible explicación de la pérdida de la habilidad degradadora son los rápidos mecanismos evolutivos, de las cuatro especies de hongos, a las condiciones ideales de laboratorio. Al tener todos los nutrientes disponibles los genes que transcribían las enzimas con el potencial de oxidar polímeros, como el polietileno de baja densidad, se silenciaron. Esta explicación no pudo ser comprobada porque no se realizó un análisis de los genes que se transcribieron durante el ensayo de degradación de los primeros aislados ni de los subcultivos.

Sin embargo, resalta la importancia de entender cómo las variables ambientales y las relaciones con otros organismos determinan las características de un organismo (Palková, 2004).

CONCLUSIONES

1. La metodología que se utiliza con mayor frecuencia para realizar ensayos de biodegradación se realiza en un medio de cultivo líquido con y sin fuente de carbono. No existe una tendencia hacia realizar o no pretratamiento al plástico. La mayoría de las investigaciones mantiene los ensayos en agitación para promover la aireación.

2. En las condiciones evaluadas, según los resultados de los análisis realizados para evaluar la capacidad de biodegradación de los hongos (diferencia de masa y FTIR), ninguno aprovechó el PEBD como fuente de carbono, ni causó cambios en sus propiedades fisicoquímicas. El uso de una fuente alterna de carbono solo influyó en la cantidad de biomasa producida.

RECOMENDACIONES

Para intentar recuperar la habilidad de degradar este material, se recomienda activar a los hongos en sustratos similares a los que se aislaron, suministrando polímeros naturales como la lignina o celulosa para que aproveche estos compuestos como fuente de carbono. Para próximas investigaciones, se recomienda incorporar en la metodología el secado de los plásticos antes de cuantificar la masa final. También es importante calcular la tasa de degradación en base a la pérdida de masa y aprovechar los resultados del análisis FTIR para calcular el índice carbonilo, porque son valores que permiten comparar los resultados con otros estudios. Es importante incrementar un método que corrobore los resultados, como el análisis con microscopio de barrido para observar los cambios superficiales del PEBD o comprobar que el organismo lo utilizó como sustrato. Por último, es importante resaltar la importancia de

estudiar la expresión genética de los organismos de interés para saber qué genes codifican las enzimas de interés y entender cómo la expresión genética cambia cuando un organismo pasa un prolongado periodo de tiempo en condiciones ideales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, J., Ghosh, E., Mukherjee, P., y Gajendiran, A. (2017). Microbial degradation of low density polyethylene. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 36(1), 147-154.

Alarcón, I. (2020). ¿Las fundas desechables son el plástico que más se usa en Ecuador? *El comercio*. Recuperado el 15 de noviembre de 2020, desde: <https://www.elcomercio.com/tendencias/fundas-desechables-plastico-ecuador-ambiente.html#:~:text=2020%2018%3A20-,%C2%BFLas%20fundas%20desechables%20son%20el%20pl%C3%A1stico,m%C3%A1s%20se%20usa%20en%20Ecuador%3F&text=Las%20fundas%20tipo%20camiseta%20para,seg%C3%BAAn%20el%20Ministerio%20del%20Ambiente.>

Ameen, F., Moslem, M., Hadi, S., y Al-Sabri, A. E. (2015). Biodegradation of Low Density Polyethylene (LDPE) by Mangrove fungi from the red sea coast. *Progress in Rubber Plastics and Recycling Technology*. 31(2), 125-143.

Awasthi, S., Srivastava, N., Singh, T., Tiwary, D., y Mishra, P. K. (2017). Biodegradation of thermally treated low density polyethylene by fungus *Rhizopus oryzae* NS 5. 3. *Biotech*. 7(1), 73.

Chalmin, P. (2019). The history of plastics: from the Capitol to the Tarpeian Rock. Field Actions Science Reports. *The journal of field actions*. (Special Issue 19), 6-11.. <http://journals.openedition.org/factsreports/5071>

Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M. Scott, S.L., y Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 8(9), 3494-3511.

Črešnar, B., y Petrič, Š. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1814(1), 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.020>

Danso, D., Chow, J., y Streit, W. R. (2019). Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(19), e01095-19. doi: 10.1128/AEM.01095-19

Das, M. P., y Kumar, S. (2014). Microbial deterioration of low density polyethylene by *Aspergillus* and *Fusarium* sp. *Int J Chem Tech Res*. 6(1), 299-305.

Das, M. P., Kumar, S., y Das, J. (2018). Fungal-mediated deterioration and biodegradation study of low-density polyethylene (LDPE) isolated from municipal dump yard in Chennai, India. *Energy, Ecology and Environment*. 3(4), 229-236.

Donoso, J. M., y Rios-Touma, B. (2020). Microplastics in tropical Andean rivers: A perspective from a highly populated Ecuadorian basin without wastewater treatment. *Heliyon*. 6(7), e04302. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04302>

Duddu, M. K., y Guntuku, G. S. (2015). Isolation and screening of actinomycetes for biodegradation of low density polyethylene from mangrove sediment. *Int J Pharma Res Rev*. 4(11), 14-22.

Espinoza, L. (2018). Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos (tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador. Recuperada el 20 de octubre de 2020, desde: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7410/1/139174.pdf>

Gajendiran, A., Krishnamoorthy, S., y Abraham, J. (2016). Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *3 Biotech*. 6(1), 52.

Gajendiran, A., Krishnamoorthy, S., y Abraham, J. (2016). Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *3 Biotech*. 6(1), 52. doi: 10.1007/s13205-016-0394-x

Gómez-Méndez, L. D., Moreno-Bayona, D. A., Poutou-Pinales, R. A., Salcedo-Reyes, J. C., Pedroza-Rodríguez, A. M., Vargas, A., y Bogoya, J. M. (2018). Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. *PloS one*. 13(9), e0203786.

Goyes, P. (2019). Low density polyethylene degradation mediated by fungi isolated from three primary forests of Ecuador.

Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., y Ahmed, S. (2007). Synergistic effect of photo and chemical treatment on the rate of biodegradation of low density polyethylene by *Fusarium* sp. AF4. *Journal of applied polymer science*. 105(3), 1466-1470.

Hikmah, M., Setyaningsih, R., y Pangastuti, A. (2018, March). The Potential of Lignolytic *Trichoderma* Isolates in LDPE (Low Density Polyethylene) Plastic Biodegradation. *In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 333, p. 012076.

Huang, W. C., y Tang, I. C. (2007). Bacterial and Yeast Cultures—Process Characteristics, Products, and Applications. In *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*. (pp. 185-223). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50009-8>

Jayaprakash, V., y Palempalli, U. M. D. (2018). Effect of Palmitic Acid in the Acceleration of Polyethylene Biodegradation by *Aspergillus oryzae*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 12(4), 2259-2269.

Kumar, S., y Raut, S. (2014). Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 3. 462-473. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003>

Kunlere, I. O., Fagade, O. E., y Nwadike, B. I. (2019). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by certain indigenous bacteria and fungi. *International Journal of Environmental Studies*. 76(3), 428-440. <https://doi.org/10.1080/00207233.2019.1579586>

Malachová, K., Novotný, Č., Adamus, G., Lotti, N., Rybková, Z., Soccio, M., Pavlína Šlosarčíková, P., Vincent, V., y Fava, F. (2020). Ability of *Trichoderma hamatum* Isolated

from Plastics-Polluted Environments to Attack Petroleum-Based, Synthetic Polymer Films. *Processes*. 8(4), 467.

Manzur, A., Limón-González, M., y Favela-Torres, E. (2004). Biodegradation of physicochemically treated LDPE by a consortium of filamentous fungi. *Journal of Applied Polymer Science*. 92(1), 265-271.

Martínez-Romo, A., González-Mota, R., Soto-Bernal, J. J., y Rosales-Candelas, I. (2015). Investigating the Degradability of HDPE, LDPE, PE-BIO, and PE-OXO Films under UV-B Radiation. *Journal of Spectroscopy*. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/586514>

Montazer, Z., Habibi Najafi, M. B., y Levin, D. B. (2020). Challenges with Verifying Microbial Degradation of Polyethylene. *Polymers*. 12(1), 123. <https://doi.org/10.3390/polym12010123>

Morán, S. (2020). Nada frena los plásticos de un solo uso: más de 260.000 toneladas al año en Ecuador. *Plan V*. Recuperado el 15 de noviembre de 2020, desde: <https://www.planv.com.ec/historias/sociedad/nada-frena-plasticos-un-solo-uso-mas-260000-toneladas-al-ano-ecuador>

More, S., Runuka, P. S., Pruthvi, K., Swetha, M. S., y Veena, S. M. (2011). Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme research*. doi:10.4061/2011/248735

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: 10.1371/journal.pone.0198446

Muhonja, C. N., Makonde, H., Magoma, G., y Imbuga, M. (2018). Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. *PloS one*. 13(7), e0198446.

Munajad, A., Subroto, C., y Suwarno, S. (2018). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy analysis of transformer paper in mineral oil-paper composite insulation under accelerated thermal aging. *Energies*. 11(2), 364.

Munir, E., Harefa, R. S. M., Priyani, N., y 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*. 126, 1, pp. 1-7.

National University of Singapore. (s.f.). FOURIER TRANSFORM INFRA-RED (FTIR) SPECTROSCOPY. Recuperado el 15 de octubre de 2020, desde: <http://phyweb.physics.nus.edu.sg/~L3000/Level3manuals/FTIR.pdf>

Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Shrivastava, A., Khatua, P., Rai, V., y Bose, S. (2017). Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports*. 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep39515>

Paço, A., Duarte, K., da Costa, J. P., Santos, P. S., Pereira, R., Pereira, M. E., Freitas, A., Durante, A., y Rocha-Santos, T. A. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Science of the Total Environment*. 586, 10-15.

Palková, Z. (2004). Multicellular microorganisms: laboratory versus nature. *EMBO reports*. 5(5), 470-476.

Passos, T. M., Marconato, J. C., y Franchetti, S. M. M. (2015). Biodegradation of films of low density polyethylene (LDPE), poly (hydroxibutyrate-co-valerate)(PHBV), and

LDPE/PHBV (70/30) blend with *Paecilomyces variotii*. *Polímeros*. 25(1), 29-34. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1432>

Pathak, V.M., y Navneet. (2017). Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresources and Bioprocessing*. 4(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9>

Rhodes, C. J. (2018). Plastic pollution and potential solutions. *Science progress*. 101(3), 207-260. <https://doi.org/10.3184/003685018X15294876706211>

Rochman, C. M., Kurobe, T., Flores, I., y Teh, S. J. (2014). Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of the Total Environment*. 493, 656-661. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.051>

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Sáenz, M., Borodulina, T., Diaz, L., y Banchon, C. (2019). Minimal Conditions to Degrade Low Density Polyethylene by *Aspergillus terreus* and *niger*. *Journal of Ecological Engineering*. 20(6).

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

Sastri, V. R. (2010). Chapter 6-Commodity Thermoplastics: Polyvinyl Chloride, Polyolefins, and Polystyrene. *Plastics in medical devices*. 73-119. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3201-2.00006-9>.

Seltenrich, N. (2015). New link in the food chain? Marine plastic pollution and seafood safety. 123, 2. <https://doi.org/10.1289/ehp.123-A34>

Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., y Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology advances*. 26(3), 246-265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>

Sheik, S., Chandrashekar, K. R., Swaroop, K., y Somashekarappa, H. M. (2015). Biodegradation of gamma irradiated low density polyethylene and polypropylene by endophytic fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 105, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.08.006>

Sigler, M. (2014). The effects of plastic pollution on aquatic wildlife: current situations and future solutions. *Water, Air, & Soil Pollution*. 225(11), 2184. doi: 10.1007/s11270-014-2184-6

Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S., y Merino, F. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Revista peruana de biología*. 17(1), 133-136.

Volke-Sepúlveda, T., Saucedo-Castañeda, G., Gutiérrez-Rojas, M., Manzur, A., y Favela-Torres, E. (2002). Thermally treated low density polyethylene biodegradation by *Penicillium pinophilum* and *Aspergillus niger*. *Journal of applied polymer science*. 83(2), 305-314.

ANEXO A: RECETAS MEDIOS DE CULTIVO

Para un litro de medio

<i>Medio de Melaza:</i>	30 g de melaza (aforar hasta llegar a los 1000ml). pH: 6.0-6.5
<i>Medio PDB</i>	Medio comercial
<i>Medio Rosa bengala:</i>	5g de caldo de soya, 10g de dextrosa, 1g de KH_2PO_4 , 0.5g MgSO_4 y 0.05g de rosa bengala
<i>Medio minimal</i>	3.8g de fosfato de Na_2HPO_4 , 1.8g de KH_2PO_4 , 0.02g de MgSO_4 , 0.03g de FeSO_4 , 0.01g de CaSO_4 , 0.5g de NaCl , 0.3g de NH_4Cl y 1ml de solución traza
<i>Solución traza medio minimal (para 500ml)</i>	0.2g de MnSO_4 , 0.022g de ZnSO_4 , trazas de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ y trazas de CuSO_4

**ANEXO B: INFORMACIÓN DETALLADA DE LA METODOLOGÍA DE LOS
ARTÍCULOS DE LA REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LITERATURA**

<i>Cita</i>	<i>Fuente de organismos</i>	<i>Volumen</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo (días)</i>	<i>Inoculación</i>
<i>Malachová et al., 2020</i>	Relleno sanitario	No específica	28	60	El medio de cultivo líquido donde creció el hongo por 7 días, se usó 5% (V/V) como inóculo
<i>Muhonja et al., 2018</i>	Relleno sanitario	200	No específica	112	1% del cultivo de inóculo de la solución salina
<i>Uribe et al., 2010</i>	Relleno sanitario	100	20	60	10ml del cultivo de enriquecimiento
<i>Passos, Marconato y Franchetti, 2015</i>	De una colección de cultivos: Laboratorio de tratamiento de polímeros, Departamento de Bioquímica y Microbiología - UNESP/Rio Claro.	-	28	30	0.1ml de suspensión de esporas en solución salina al 0.85%. 10 ⁶ esporas/ml
<i>Sheik et al., 2015</i>	Hongos endófitos de hojas	50	No específica	90	No específica
<i>Kunlere, Fagade y Nwadike, 2019</i>	Relleno sanitario	50	Temperatura del cuarto	42	Se cultivó al hongo por 7 días en PDA y se disolvió el micelio en agua. 2.5ml de esta agua se inoculó en el medio.
<i>Ameen et al., 2015</i>	Manglar	100	30+2	30	Discos de 6mm de diámetro
<i>Manzur, A., Limón-González, M., y Favela-Torres, E. (2004)</i>	No menciona, ya tenía el aislado	25	29	270	1x 10 ⁶ esporas/ml de cada hongo
<i>Paço et al., 2017</i>	No menciona, ya tenía el aislado	50	25	28	0.5g del micelio filtrado
<i>Awasthi et al., 2017</i>	No menciona, ya tenía el aislado	100	37	30	Discos activos del cultivo del hongo
<i>Gómez-Méndez et al., 2018</i>	No menciona, ya tenía el aislado	-	28	150	1g de biomasa viable y mojada del hongo
<i>Jayaprakash y Palempalli, 2018</i>	No menciona, ya tenía el aislado	100	No específica	90	No especificar
<i>Ojha et al., 2017</i>	Relleno sanitario	100	28	90	No específica
<i>Das, Kumar y Das, 2018</i>	Relleno sanitario	300	25	60	Solo menciona que el volumen donde se introduce el plástico es una suspensión de cada hongo
<i>Duddu y Guntuku, 2015</i>	Manglar	60	35-45	28	Se inocula 1 ml del cultivo en medio de la etapa exponencial. El agar es de almidón y caseína. Se ajusta a que la concentración del

					inóculo sea de 1.5 a 1.6 por 10 a la 6 UFC
<i>Abraham et al., 2017</i>	De lodos de depuradora mezclado con suelo de jardín: lodo de planta de tratamiento de aguas residuales	100	30+-2	90	Inóculo al 5% del aislado en el medio Sabouraud
<i>Gajendiran, Krishnamoorthy y Abraham, 2016</i>	Relleno sanitario	100	No especifica	90	1 ml del cultivo aislado
<i>Das y Kumar, 2014</i>	Relleno sanitario	300	33.3	60	No especifica
<i>Sáenz et al., 2019</i>	Manglar	-	37	77	Se inocula en la caja de agar
<i>Munir et al., 2017</i>	Relleno sanitario	-	26+-	45	2 discos de agar de 5mm de diámetro a cada lado del plástico
<i>Hasan etl al. 2007</i>	Del suelo, no especifica de dónde	100	37	90	10 ml del inóculo del suelo en caldo nutritivo
<i>Hikmah, Setyaningsih y Pangastuti, 2018</i>	De una colección de cultivos: Laboratorio del FMIPA UNS	-	Temperatura del cuarto	35	Dos discos de hongos cultivados de 5 días de edad.
<i>Volke-Sepúlveda et al., 2002</i>	No menciona, ya tenía el aislado	25	30	31 meses	1x 10 ⁶ esporas/ ml

<i>Cita</i>	<i>Presentación</i>	<i>Después del ensayo</i>
<i>Malachová et al., 2020</i>	Films de 20-30mg	Lavados con una solución al 2% de SDS por dos horas, después lavados con agua destilada y etanol al 70%
<i>Muhonja et al., 2018</i>	Sheet 3x3cm	Lavados con una solución al 2% de SDS, después secados antes de masar
<i>Uribe et al., 2010</i>	Discos, no especifica tamaño o peso	No especifica cómo limpia las muestras para análisis posteriores
<i>Passos, Marconato y Franchetti, 2015</i>	Film	Limpia con agua destilada y secar
<i>Sheik et al., 2015</i>	Film	Limpia con agua destilada y secar
<i>Kunlere, Fagade y Nwadike, 2019</i>	0.4 de polvo de LDPE	Se lavó varias veces con agua destilada y después se secaron para los análisis posteriores
<i>Ameen et al., 2015</i>	Film 1x1cm	Se secaron a 90°C antes de ser masados
<i>Manzur, A., Limón-González, M., y Favela-Torres, E. (2004)</i>	0.5 g de polietileno esteril	Se separó al hongo del plástico con agitación por 10 minutos. Después el plástico se retiró, se lavó con agua destilada. Se secó antes de masar.

<i>Paço et al., 2017</i>	0.130 gramos de microplástico	No especifica cómo limpia las muestras para análisis posteriores
<i>Awasthi et al., 2017</i>	Film 10x4.5cm	Se limpió con etanol al 70% lo más posible para retirar el micelio añadido al polímero, se secó a 45°C durante la noche para los análisis posteriores
<i>Gómez-Méndez et al., 2018</i>	Sheets de 3cm ²	Se sumergieron en agua y se agitó para desprender el hongos del plástico.
<i>Jayaprakash y Palempalli, 2018</i>	Discos de 2cm de diametro	Se limpio el polietileno con una solución de SDS al 2% por 4 horas y después se esterilizó con etanol al 70% y finalmente, se lavó con agua destilada antes de masarlos.
<i>Ojha et al., 2017</i>	6x6cm	No especifica cómo limpia las muestras para análisis posteriores
<i>Das, Kumar y Das, 2018</i>	Strips 1.5x1.5cm	Se lavaron con agua destilada y se secaron.
<i>Duddu y Guntuku, 2015</i>	1x1cm	Se limpio por 4 horas a 50°C con una solución de SDS al 2%, después se limpió con agua destilada tibia. Se secaron a 60°C por la noche
<i>Abraham et al., 2017</i>	Solo dice que pequeños pedazos	Se lavó con una solución de SDS al 2%, luego se secaron durante la noche a 60°C
<i>Gajendiran, Krishnamoorthy y Abraham, 2016</i>	Strips 2x2cm	Los films de polietileno se lavaron con una solución de SDS al 2% y agua destilada. Se secó por la noche a 60°C.
<i>Das y Kumar, 2014</i>	Films 1.5x1.5cm	Lavados con una solución al 2% de SDS, después secados antes de masar
<i>Sáenz et al., 2019</i>	Films 2cm ²	Las muestras se lavaron con etanol y se cortaron en cuadrados de 0.5cm cuadrados. Se fijaron con una solución de tetroxido de osmio por 24 horas. Luego se deshidrataron congelandolas con una solución de butanol al 100%.
<i>Munir et al., 2017</i>	Film 1x4cm	Se lavaron con etanol al 70% y agua destilada. Se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas.
<i>Hasan etl al. 2007</i>	Trozos, no empecifica peso o tamaño	No especifica cómo limpia los plásticos para los análisis posteriores
<i>Hikmah, Setyaningsih y Pangastuti, 2018</i>	Sheet 1x3cm thickness 0.03mm	Se lavaron las muestras con alcohol y agua destilada varias veces. Luego se secaron a 50°C por 6 horas.
<i>Volke-Sepúlveda et al., 2002</i>	No especifica	Se lavaron las muestras con agua destilada. Luego se secaron a 25°C por 24 horas.

<i>Cita</i>	<i>Diferencia de masa</i>	<i>FTIR</i>	<i>SEM</i>	<i>Otro</i>
<i>Malachová et al., 2020</i>	Sí	Sí	Sí	TGA y GPC (Gel Permeation Chromatography)
<i>Muhonja et al., 2018</i>	Sí	Sí	No	Cromatografía de gases
<i>Uribe et al., 2010</i>	Sí	Sí	No	-
<i>Passos, Marconato y Franchetti, 2015</i>	Sí	Sí	Sí	-
<i>Sheik et al., 2015</i>	Sí	Sí	Sí	Producción de lacasa

<i>Kunlere, Fagade y Nwadike, 2019</i>	Sí	Sí	No	-
<i>Ameen et al., 2015</i>	Sí	No	Sí	Ensayo enzimático y de la evolución de la producción de dióxido de carbono
<i>Manzur, A., Limón-González, M., y Favela-Torres, E. (2004)</i>	No	Sí	Sí	Calorimetría diferencial de barrido, dispersión de rayos X de gran angular (WAXS), cromatografía de gases, índice de carbonilo
<i>Paço et al., 2017</i>	Sí	Sí	Sí	FTIR-ATR
<i>Awasthi et al., 2017</i>	Sí	Sí	Sí	Resistencia a la tracción, cambio de pH en proceso de biodegradación, estudio de morfología superficial de LDPE
<i>Gómez-Méndez et al., 2018</i>	Sí	Sí	Sí	Índices de carbonilo (Ico) y vinilo (Iv), Propiedades viscoelásticas, Análisis de actividades de enzimas ligninolíticas
<i>Jayaprakash y Palempalli, 2018</i>	Sí	Sí	Sí	Determinación del grado de absorción de agua por LDPE y HDPE
<i>Ojha et al., 2017</i>	Sí	Sí	Sí	Se pesó el micelio: peso seco, se determinó el pH del medio, determinación del índice de carbonilo mediante análisis FTIR, análisis AFM, FE-SEM
<i>Das, Kumar y Das, 2018</i>	Sí	Sí	Sí	Estudio de microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM), prueba de evolución de CO ₂ , evaluación del cambio de pH
<i>Duddu y Guntuku, 2015</i>	Sí	No	No	Se evaluó el cambio de pH, el efecto de la temperatura en la degradación, el incremento de células viables,
<i>Abraham et al., 2017</i>	Sí	Sí	No	Cromatografía de gases y espectroscopía de masas, microscopía de fuerza atómica (AFM), prueba de Sturm: producción de dióxido de carbono, cinética de crecimiento
<i>Gajendiran, Krishnamoorthy y Abraham, 2016</i>	Sí	Sí	Sí	Producción de CO ₂ , AFM
<i>Das y Kumar, 2014</i>	Sí	Sí	Sí	Cambio de pH y producción de CO ₂
<i>Sáenz et al., 2019</i>	Sí	No	Sí	-
<i>Munir et al., 2017</i>	Sí	No	No	-
<i>Hasan et al., 2007</i>	Sí	Sí	No	-
<i>Hikmah, Setyaningsih y Pangastuti, 2018</i>	Sí	No	Sí	-
<i>Volke-Sepúlveda et al., 2002</i>	Sí	Sí	Sí	Cromatografía de gases, Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-ray Diffraction (XRD), producción de CO ₂