



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTADO DEL ARTE DEL AISLAMIENTO E
IDENTIFICACIÓN DE MOHOS CON POTENCIAL
PARA DEGRADAR PLÁSTICOS

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA JOSÉ GARCÍA POZOS

DIRECTOR DE TESIS

BIOL. ELOY HERRERA VÁZQUEZ

ASESORES

DR. DANIEL SIHUANCA MENDOZA

DR. ROSA EMILIA PÉREZ PÉREZ

DICIEMBRE, 2022



Oficio No. BIOSAC/C-1125/2022
Asunto: Modalidad de Titulación

Mtro. Ricardo Valderrama Valdez
Director de Administración Escolar, BUAP
PRESENTE

Por este conducto le envío un cordial saludo, así mismo me permito informarle que la **C. MARIA JOSE GARCIA POZOS** con número de matrícula **201330480** de la Licenciatura en Biología, presentará su Examen Profesional con el título de tesis **"Estado del arte del aislamiento e identificación de mohos con potencial para degradar plástico"** bajo la Dirección del Biol. Eloy Herrera Vázquez. La asignación del Jurado quedará integrado por:

PRESIDENTE: DRA. ROSA EMILIA PEREZ PEREZ
SECRETARIO: BIOL. ELOY HERRERA VAZQUEZ
VOCAL: DR. DANIEL SIHUANCA MENDOZA


El examen profesional se llevará a cabo en línea **el día 07 de diciembre de 2022 a las 11:00 horas.**

Sin otro particular por el momento, me despido de usted reiterándole la seguridad de mi consideración distinguida.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Zaragoza, a 02 de diciembre de 2022


Dr. Salvador Galicia Isasmendi
Director
Oficio No. BIOSAC/C-1125/2022
Asunto: Modalidad de Titulación

Facultad de
Ciencias Biológicas

Edif. 1 BIO 1, Ciudad Universitaria, Puebla,
Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7097, 7085, 7084 y 7086

Dedicatoria

El esfuerzo de este trabajo está dedicado en primer lugar, a aquel que le da sentido a mi vida, quien pensó en mí antes de ser engendrada, quien me da fuerzas, me acompaña y guía, Mi Señor Jesús, porque en Él confío, y aunque las cosas parecen ponerse pesadas y decepcionantes sé que Él estará ahí para impulsarme. Teniendo fe en Él, sé que mi vida será útil para la humanidad, pues a él le dedico mi inteligencia, fuerza y servicio.

Esperando estén orgullosos de mí, también quiero dedicar este trabajo a mi mamá María Dolores Pozos Cortes y a mi papá José Jaime García Reynoso, por su paciencia, apoyo y consideración, por su ejemplo de esfuerzo y pasión. A mis hermanos Paz, Chucho y Rafa, a mis cuñados y sobrinos a mi familia presente (Abuelita Carmen), y aquellos que se durmieron en la esperanza (Abuelita Chelo, Abuelito Armando, a mi hermano Chema) y amigos.

A tantísimas personas que he conocido y he tenido el gusto de trabajar, a aquellas que me inspiran y emocionan con su trayectoria, a quienes han creído en mí. En este sentido, dedico especialmente esta tesis al amigo enviado por Dios, ese ser humano tan fuera de lo común que creyó en mí, y mostró su continuo interés en este trabajo y cuya calidad de persona, me hizo ver un mundo diferente y lleno de esperanza, a él, a quien tanto quiero Joan Roberto Reyes Austria.

A todos ellos les dedico mi esfuerzo.

Agradecimientos

Desde luego que agradezco a Dios, por darme el don de la vida, y esa curiosidad por tratar de comprender los misterios de su creación.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP, a todo el cuerpo académico y a administrativo.

Mi director el profesor Eloy Herrera Vázquez, por ser parte de este trabajo, brindarme su apoyo y permitirme trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Efraín Rubio Rosas y a la Dirección de Innovación y Transferencia de conocimiento de la BUAP por su amable atención y ayuda.

Índice

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Índice de figuras	iii
Índice de cuadros	iv
Resumen	v
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III. Marco teórico	5
3.1 Hongos.....	5
3.2 Clasificación de hongos.....	6
3.3 Enzimas fúngicas.....	7
3.4 Mohos.....	9
3.4.1 <i>Aspergillus</i> sp.....	10
3.4.2 <i>Fusarium</i> sp.....	11
3.4.3 <i>Mucor</i> sp.....	12
3.4.4 <i>Cladosporium</i> sp.....	13
3.4.5 <i>Alternaria</i> sp.....	14
3.4.6 <i>Rizophus</i> sp.....	15
3.4.7 <i>Trichoderma</i> sp.....	16
3.4.8 <i>Penicillium</i> sp.....	17
3.5 Métodos de identificación de hongos filamentosos.....	19
3.5.1 Técnica de cinta adhesiva.....	19
3.5.2 Cultivo en lámina.....	19
3.5.3 Técnica MALDI-TOF.....	20
3.5.4 Amplificación por PCR y secuenciación.....	20
3.5.5 Medios Cromogénicos.....	21
3.6 Características de los plásticos.....	21
3.7 Poliestireno.....	22
3.7.1 Poliestireno expandido.....	24
3.7.2 Poliestireno cristal.....	26

3.8 Degradación de plásticos.....	26
3.8.1 Degradación química.....	27
3.8.2 Degradación térmica.....	27
3.8.3 Degradación mecánica.....	27
3.8.4 Fotodegradación.....	27
3.8.5 Biodegradación.....	28
3.8.6 Biopelículas.....	28
IV. Objetivos.....	29
V. Justificación.....	30
VI. Metodología.....	32
6.1 Estado del arte.....	32
6.1.1 Biodegradación por hongos.....	33
6.1.2 Biodegradación de plásticos.....	34
6.1.3 Etapas de la biodegradación.....	35
6.1.4 Producción de poliestireno en México.....	38
6.1.5 Biodegradación de poliestireno.....	39
6.1.6 Metodologías para el aislamiento de cepas.....	41
6.1.7 Metodologías para la evaluación de la degradación de plásticos.....	42
6.2 Fase experimental.....	49
6.2.1 Aislamiento de cepas.....	49
6.2.2 Preparación de plásticos.....	51
6.2.3 Medio de cultivo.....	52
6.2.4 Evaluación de la degradación de plásticos.....	53
6.2.5 Análisis por SEM.....	54
6.2.6 Identificación de cepas.....	54
VII. Resultados.....	56
7.1. Cepas aisladas.....	56
7.2. Evaluación de la degradación.....	56
7.2.1 Porcentajes de degradación.....	56
7.2.2 Tiempo de exposición.....	58
7.2.3 Efectos visibles de la degradación.....	61

7.2.4 Crecimiento de cepas.....	64
7.3 Identificación de cepas con mayor potencial de degradación de plástico..	65
7.3.1 Caracterización macroscópica.....	67
7.3.2 Caracterización microscópica.....	67
7.4 Resultados obtenidos en diferentes investigaciones.....	70
VIII. Discusión.....	71
IX. Conclusión.....	74
XI. Literatura.....	76

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Aspergillus</i> sp.....	10
Figura 2. <i>Fusarium</i> sp.....	11
Figura 3. <i>Mucor</i> sp.....	12
Figura 4. <i>Cladosporium</i> sp.....	13
Figura 5. <i>Alternaria</i> sp.....	14
Figura 6. <i>Rhizopus</i> sp.....	15
Figura 7. <i>Tricoderma</i>	16
Figura 8. <i>Penicillium</i> sp en placa.....	18
Figura 9. Estructura química del poliestireno expandido (PSE).....	25
Figura 10. Modificación estructural del estireno por polimerización de radicales libres.....	25
Figura 11. Monómeros de estireno unidos por procesos de polimerización.....	25
Figura 12. Poliestireno, tipo expandido y poliestireno tipo cristal.....	26
Figura 13. Toma de muestra de suelo para aislamiento de hongos.....	51
Figura 14. Muestras de poliestireno perforadas.....	52
Figura 15. Tubos inoculados con hongo y poliestireno.....	54
Figura 16. Equipos de observación y preparación de muestras para análisis SEM.....	55
Figura 17. Microcultivo de las cepas con mayor porcentaje de degradación.....	55
Figura 18. Cepas de mohos aisladas en laboratorio puestas a prueba para la degradación de PS.....	57
Figura 19. Porcentaje de degradación a los 15 días.....	59
Figura 20. Porcentaje de degradación a los 30 días.....	59
Figura 21. Porcentaje de degradación a los 45 días.....	59
Figura 22. Frecuencia de cepas degradadoras de PSE.....	60
Figura 23. Frecuencia de cepas degradadoras de PSC.....	60
Figura 24. PSE con crecimiento de hongos en la superficie.....	61
Figura 25. Poliestireno expandido sin exposición al hongo visto a 100X por SEM.....	62

Figura 26. PSE visto a 200X por SEM.....	62
Figura 27. PSE visto a 500X por SEM.....	62
Figura 28. PSE visto a 1000X por SEM.....	63
Figura 29. PSC visto a 100X por SEM	63
Figura 30. PSC visto a 200X por SEM	63
Figura 31. PSC visto a 500X por SEM.....	64
Figura 32. Crecimiento de micelio en medio liquido modificado.....	64
Figura 33. Cepa 1 con capacidad para degradar PSE.....	66
Figura 34. Cepa 9 con capacidad para degradar PSC.....	66
Figura 35. Cepa 1 vista al microscopio 10X.....	68
Figura 36. Cepa 1 vista al microscopio 40X.....	68
Figura 37. Cepa 9 vista al microscopio 4 X	69
Figura 38. Cepa 9 vista al microscopio 10X	69

Índice de cuadros

Cuadro 1. Enzimas fúngicas de interés industrial.....	8
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Aspergillus</i>	10
Cuadro 3. Clasificación taxonómica de <i>Fusarium</i>	12
Cuadro 4. Clasificación taxonómica de <i>Mucor</i>	13
Cuadro 5. Clasificación taxonómica de <i>Cladosporium</i>	14
Cuadro 6. Clasificación taxonómica de <i>Alternaria</i>	15
Cuadro 7. Clasificación taxonómica de <i>Rhizopus</i>	16
Cuadro 8. Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma</i>	17
Cuadro 9. Clasificación taxonómica de <i>Penicillium</i>	19
Cuadro 10. Abreviación de los nombres de plásticos.....	22
Cuadro 11. Propiedades físicas y químicas del poliestireno.....	24
Cuadro 12. Hongos evaluados por diferentes investigadores en la degradación de plásticos.....	33
Cuadro 13. Pruebas para evaluar la degradación de plásticos.....	37
Cuadro 14. Resumen de metodologías empleadas en investigaciones.....	45
Cuadro 15. Obtención de muestras para el aislamiento de hongos.....	49
Cuadro 16. Composición de medio Czapek en caldo.....	53
Cuadro 17. Crecimiento de las cepas en el medio con PS como única fuente de carbono.....	65

Resumen

Los mohos son un grupo de hongos filamentosos microscópicos que se encuentran presentes en prácticamente cualquier lugar, su amplia distribución se logra a través de la propagación de esporas en el aire. Son importantes clínicamente al ser causantes de enfermedades respiratorias y dérmicas, sin embargo, también destacan en la industria por la producción de enzimas hidrolíticas altamente demandadas por distintos procesos. En la actualidad vuelven llamar la atención al demostrar en algunas especies la capacidad de degradar plásticos en cortos periodos de tiempo. En éste trabajo se realizó el estado del arte de los avances en el tema de degradación de plásticos por hongos, además se aislaron e identificaron hongos de distintos sustratos, para evaluar su capacidad de degradar materiales plásticos de alta demanda comercial como lo es el poliestireno, el cual es la quinta resina sintética más comercializada a nivel mundial y cuyos métodos de reciclaje son poco eficientes. Estas muestras de plástico, fueron incubadas junto con distintas cepas en un medio líquido sin fuente de carbono durante tres periodos de tiempo (15, 30 y 45 días), al final de las pruebas se midió el peso seco, se identificaron los géneros *Penicillium* que degradó poliestireno expandido con 21 % a los 15 días. Mientras para poliestireno tipo cristal se identificó al género *Aspergillus*, quien degradó un 36.45 % a los 30 días. Los hongos microscópicos evaluados, son capaces de obtener carbono de una fuente inorgánica en un medio de cultivo líquido, se observó que todas las cepas aisladas generaron, en distinta medida degradación en el poliestireno, sin embargo, esto sucede a baja escala.

Palabras clave: Hongos microscópicos, poliestireno, cepas, tiempo.

I. Introducción

Entre los problemas ambientales que actualmente se viven, está el inadecuado manejo de desechos plásticos que se producen, la imagen de basura plástica en calles, lotes baldíos, cuerpos de agua y otros ecosistemas se ha vuelto común, esto ha despertado el interés de diversos investigadores por encontrar soluciones que no afecten la supervivencia de los organismos. En 2015 se produjeron 6 500 millones de toneladas de plásticos, de estas, el 9% se recicló, el 16 % fue incinerado y el 75 % se acumuló en vertederos (Geyer *et al.*, 2017). Sharma y Sharma (2004) mencionan que los principales métodos de eliminación de plásticos son la incineración, el reciclaje y el depósito en vertederos (citado por Deepika y Madhuri, 2015) tienen consecuencias negativas en el ambiente, ya que no suele tomarse en cuenta los aditivos del plástico que le dan resistencia y flexibilidad como di (2-etilhexil) ftalato (DEHF) (Sánchez *et al.*, 2015), bisfenol, bifenilos policlorados, el diclorodifenil, dicloroetano, nonifenoles, dioxinas y furanos, por lo que su incorrecta eliminación resulta perjudicial para los organismos (Gnanavel *et al.*, 2015). Es por eso que la biodegradación es la alternativa más viable en este sentido, ya que desempeña un papel clave en la reducción del peso molecular del polímero (Gu, 2003). Diferentes estudios basados en diversas metodologías han demostrado la capacidad de ciertos microorganismos para degradar plásticos, los resultados muestran que los microorganismos pueden hacerlo de manera individual y en consorcios (Uribe *et al.*, 2010), este último concepto debe ser comprendido como el conjunto de microorganismos como bacterias, hongos, actinomicetos, algas y levaduras que por relaciones simbióticas crean un ambiente que les permite obtener su alimento del medio donde se encuentran. En cuanto a los hongos, los géneros más estudiados en la biodegradación son *Aspergillus* (Kittur *et al.*, 2013; Karimi *et al.*, 2020) y *Penicillium* (Yang-Hoon *et al.*, 2002; Ji-Young A *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2015), estos géneros son abundantes en el ambiente y de ellos podemos obtener diversos beneficios como la producción de enzimas. Si bien, los hongos microscópicos tienen la popularidad de provocar enfermedades, es necesario reconocer que también son importantes degradadores de materia orgánica como la celulosa, hemicelulosa y lignina, razón

por la cual los investigadores fijaron la atención en estos organismos ya que en los últimos años también han demostrado la capacidad para degradar materiales plásticos en periodos de tiempo relativamente cortos y diferentes tipos de plásticos de alta demanda como el polietileno de alta y baja densidad (PE). Por su parte, el poliestireno (PS) es la quinta resina más utilizada en el mundo (Plastic Technology, 2017), su conformación estructural hace que este material sea altamente demandado en la industria de la construcción, el embalaje y la comida, sin embargo, su desecho se ha convertido en un problema ambiental debido a la liberación de sustancias tóxicas, así como el gran volumen que ocupa, el porcentaje de recuperación del poliestireno expandido es apenas del 12% (López y Pérez, 2019), a pesar de esta problemática, el PS no ha sido un material estudiado en la biodegradación. La degradación de un plástico se evalúa a partir de cambios físicos (color, brillo, textura, resistencia) o/y químicos (cambios en las cadenas moleculares) (Bustamante, 1994). La biodegradación de plástico es posible dada la naturaleza química a base de carbono, el cual es obtenido por los microorganismos a partir de la secreción de enzimas que, bajo ciertas condiciones son capaces de degradar los polímeros en oligómeros y luego en monómeros, incluso hasta en dióxido de carbono (Lucas *et al.*, 2008). “Estos productos solubles en agua escindidos enzimáticamente son absorbidos por las células microbianas como fuente de carbono donde se metabolizan” (Vasile, 1993 citado por Mukherjee y Chatterjee, 2014). La cutinasa por ejemplo, es una enzima que encontramos en hongos de suelo, los cuales mostraron capacidad para degradar plásticos (Yang-Hoon *et al.*, 2002). Dicha enzima fue objeto de estudio de las Investigadoras Amelia Farrés y Carolina Peña (2017) del laboratorio Ciencias Químicas de la UNAM, quienes aislaron los genes del hongo *Aspergillus nidulans* y desarrollaron enzimas recombinantes (producidas artificialmente) que degradan PET en 15 días al escindir los enlaces ésteres, y cuyo efecto se repite en otros tipos de plástico (Terrazas y Rojas, 2019). Diversas investigaciones de este tipo han generado mayor conocimiento sobre los procesos de biodegradación y los agentes causantes de la misma. Sin embargo, el mundo microscópico es muy diverso y variante a cada centímetro, por lo cual es necesario investigar estos fenómenos a diferentes escalas.

II. Antecedentes

Desde el momento en que los residuos plásticos comenzaron a acumularse en ambientes naturales y por consecuencia a afectar negativamente la vida de diversos organismos, surgió el interés por eliminarlos, los métodos populares que se utilizan no son amigables con el ambiente, por lo que diversos grupos de investigadores en el mundo han dirigido sus esfuerzos a la biodegradación como la opción más pertinente. También ha resultado de gran interés analizar los mecanismos que permiten a los microorganismos adaptarse y sobrevivir a ambientes altamente perturbados por basura plástica, ya que estos organismos a primera vista juegan un papel importante en el deterioro y degradación de dichos materiales.

Los trabajos realizados, han servido de escalón en la búsqueda de alternativas amigables para la degradación de materiales plásticos como el trabajo de Clutario y Cuevas (2001), que analizaron mediante microscopía electrónica de barrido el efecto causado en tiras de polietileno al ser sometido por 50 días como cofuente de carbono (0.5% de glucosa) en un medio inoculado con *Xylaria hyphae*, pues una vez que el hongo agotó la glucosa, este comenzó a degradar el plástico. El experimento demostró que determinada temperatura optimiza el crecimiento de este organismo, ya que, al experimentar a 37° y 25° C, el hongo creció mejor a 25° C así como a un pH de 6.6. También evaluaron indirectamente la producción de enzimas mediante el diámetro del crecimiento y biomasa del micelio en las placas. Las micrografías permitieron observar que los hongos hacen excavaciones en los bordes del plástico para después penetrarlos.

Yang-Hoon *et al.*, (2002), pusieron a prueba la capacidad de la enzima cutinasa aislada de *Fusarium oxysporum* y la enzima esterasa aislada de *Candida cylindracea*, para degradar n-butyl benzil ftalato (BBP) que es un aditivo de los plásticos. La cutinasa degradó el 60% del BBP en 7.5 horas a diferencia de la esterasa que después de tres días más del 90% del BBP permaneció sin degradación.

Por otra parte, Méndez *et al.* (2007) aislaron micromicetos a partir de muestras de plástico (polietileno de baja densidad y polietileno de alta densidad) obtenidas de un relleno sanitario en Lima, Perú. Después de aislar los microorganismos, utilizaron medio de cultivo Czapek sin carbohidratos adicionado con pellets de polietileno como única fuente de carbono y analizaron la temperatura (20° y 30°C) y pH (4.5, 6.5, 8.0). Mediante micro cultivo en lámina identificaron y caracterizaron 20 cepas de micromicetos, de los cuales observaron con capacidad degradadora de polietileno especies de *Penicilium sp*, *Aspergillus sp*, *Cladosporium sp*, y *Helminthosporium sp*, *Fusarium sp*, siendo *Aspergillus flavus*, quien evidenció mayor capacidad degradadora en un rango de temperatura de 25° a 30°C, a un pH de 6.5 y 8.

En 2011 Russell y colaboradores, probaron la degradación de un compuesto del poliestireno poliuretano, el Impranil DLN, este tipo de material ya ha sido probado con bacterias y hongos como como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Phoma*, *Penicillium*, *Plectosphaerella*, *Geomyces*, *Nectria* y *Neonectria*. Según los tipos de enzimas que producen los hongos (esterasas, lipasas y proteasas y ureasas), los investigadores sugieren que la degradación de estos materiales sucede por la ruptura de los enlaces éster. Este trabajo se realizó con el aislamiento de endófitos (microorganismos que viven en el interior de las plantas sin causar enfermedades) en la selva ecuatoriana. Identificaron diferentes organismos, incluidos *Pestalotiopsis microspora* quien demostró la capacidad de degradar y utilizar eficientemente poliéster poliuretano (PUR) como única fuente de carbono en un cultivo anaeróbico.

III. Marco teórico

3.1 Hongos

Los hongos son un grupo de organismos polifiléticos eucariontes, unicelulares o multicelulares, incluso ambas formas en diferentes estados de desarrollo, pueden almacenar glucógeno, son opistocontos, se caracterizan por tener una pared celular compuesta principalmente del polisacárido quitina, razón por la que los hongos son filogenéticamente más cercanos a los animales que a las plantas (Cepero *et al.*, 2012). Sus células son tubulares cilíndricas llamadas hifas, al conjunto de éstas se le denomina micelio, dentro del núcleo se encuentran uno o dos nucléolos pequeños y varios cromosomas (Deacon, 2006 citado por Cepero *et al.*, 2012). Las hifas también se dividen en septadas y cenocíticas, es decir, que pueden o no presentar divisiones. A pesar de que suelen ser comparados con las plantas, los hongos no son capaces de realizar fotosíntesis, de modo que son heterótrofos, así como quimiorganótrofos, es decir, la materia orgánica es su principal fuente de carbono. Se alimentan por absorción a partir de la secreción de enzimas que degradan la materia y la convierten en moléculas simples, posteriormente las células toman los nutrientes por medio de tres mecanismos; transporte pasivo, transporte activo y difusión facilitada, el cual va a depender de la naturaleza de la molécula, ya sean aminoácidos, carbohidratos, lípidos o aniones como el fosfato (Cepero *et al.*, 2012; Kavanagh, 2018). La mayoría son aerobios, pero existen especies anaerobios facultativos. Presentan reproducción sexual (teleomorfos) por la generación de esporas a partir de plasmogamia y cariogamia, así como reproducción asexual (anamorfos) por mitosis celular y fragmentación de hifas (Cepero *et al.*, 2012).

En cuanto a sus relaciones ecológicas, la mayoría de los hongos son saprótrofos, es decir se alimentan de materia orgánica en descomposición por lo que tienen un papel importante en la formación de suelo y en el ciclo del carbono y del nitrógeno, por consecuencia, en el reciclaje de nutrientes. Por simbiosis se encuentran los líquenes y las micorrizas, también los hay de vida parásita los cuales son causantes de enfermedades (Kavanagh, 2018).

Debido a la rapidez con la que se diseminan sus esporas, se pueden encontrar hongos fácilmente en una variedad de ambientes debido a la capacidad de crecer en un amplio rango de temperatura. De acuerdo a su tolerancia a la temperatura, los hongos se pueden dividir en tres grupos; hongos termófilos (20-60°C), hongos psicrófilos (0-17°C) y hongos mesófilos (20° a 30°C) la mayoría de estos organismos se encuentran en este grupo (Cepero *et al.*, 2012).

En el caso del pH, el rango es también amplio (2 a 8.5), cabe resaltar que presentan buen crecimiento a pH ácido, aunque el pH óptimo es de 5.6 en la mayoría de los hongos (Camacho *et al.*, 2009). A pesar de que necesitan materiales húmedos para vivir, los hongos pueden sobrevivir en ambientes deshidratados, al adquirir el agua del ambiente (Cepero *et al.*, 2012).

3.2 Clasificación de los hongos

Fue H. Whittaker quien en 1969 clasificó a los hongos en el Reino Fungi, pero con el paso del tiempo y el descubrimiento de nuevos organismos, la tarea por clasificarlos se volvió compleja. Dada la diversidad existente de hongos, los grupos taxonómicos se han tenido que actualizar constantemente, así como los métodos de caracterización empleados.

En 1979 Alexopoulos propuso tres líneas evolutivas independientes, reino Fungi, reino Stramenopila y Protistas (Cepero *et al.*, 2012). Posteriormente, James *et al.* (2006, citado por Cepero, *et al.*, 2012) a partir de un análisis genético propone tres phylum: Ascomycota y Basidiomycota que se unen en un grupo llamado Dikaria y Glomeromycota como un filo nuevo, y eliminando así a los grupos Chytridiomycota y Zygomycota. Por su parte, Ulloa y Hanlin (2012) proponen en el reino Fungi, los siguientes phylum: *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Microsporidia*.

Muller *et al.* (2004, citado por Aguirre *et al.*, 2014) y Cepero *et al.* (2012) reconocen cuatro filos principales: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota. El análisis filogenéticos conserva la clasificación tradicional con nuevos detalles, entre ellos es que los filos Ascomycota y Basidiomycota son filos hermanos pertenecientes al subreino Dikarya. En la clasificación de Hibbett *et al.*

(2011) se consideran siete filos Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota. Ascomycota, Basidiomycota (Moore *et al.*, 2011). Es importante resaltar que en la propuesta de Hibbertt el filo Zycomycota desaparece, sin embargo, Kavanagh (2018) retoma este grupo considerando los cuatro filos que tanto Muller *et al.*, (2004) como Cepero *et al.*, (2012) propusieron.

Tradicionalmente los hongos se clasifican a partir de la caracterización morfológica, tipo de reproducción y estructuras reproductivas, sin embargo, estos parámetros no son determinantes en algunos ejemplares. Entre los obstáculos a los que se enfrenta la clasificación por observación se encuentra la homoplastia en los caracteres morfológicos que dificultan aún más la identificación, por lo que las técnicas moleculares han tomado un papel importante en la clasificación de estos organismos.

3.3 Enzimas Fúngicas

Las enzimas son proteínas con actividad catalizadora, es decir, que pueden acelerar o aumentar la velocidad de las reacciones químicas. En los hongos, existen una amplia variedad de enzimas que favorecen la obtención de nutrientes ya que les permite degradar variedad de sustratos. Estas enzimas no solo son funcionales para los hongos, ya que la biotecnología ha logrado obtenerlas y producirlas sintéticamente para ser aprovechadas por la industria (Cuadro 1).

Las enzimas extracelulares tienen usualmente la función de digerir compuestos insolubles o moléculas poliméricas de gran tamaño y por lo tanto de difícil internalización y digestión dentro de la célula (Solera *et al.*, 2010). Entre las enzimas fúngicas de importancia industrial se encuentran: lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas capaces de degradar lignocelulosa, su aplicación en la industria es variada, por una parte se utiliza como blanqueador de papel y pasta al degradar la celulosa. Y también se han aplicado en el tratamiento de residuos orgánicos de fábricas, así como en el tratamiento de las aguas residuales de estas mismas (González *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Enzimas fúngicas de interés industrial según sus propiedades hidrolizantes de diversos compuestos

ENZIMA	FUNCIÓN
Amilasas	<p>Pertenecen al grupo de enzimas amilolíticas, que hidrolizan extracelularmente moléculas de almidón en dextrinas hasta glucosa.</p> <p>Se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos vegetales y animales, sin embargo, hay mayor concentración en bacterias, levaduras y hongos filamentosos</p> <p>Se utilizan en la panificación, la adición de amilasas aumenta el valor “panificador” de las harinas, generando un adecuado desprendimiento de CO₂. (Vargas <i>et al.</i>, 2016) Esta enzima se ha observado en especies del género <i>Penicillium Aspergillus, Geotrichum</i>.</p>
Pectinasas	<p>Hidrolizan los enlaces glucosídicos de la pectina hasta generar monómeros. La pectina se encuentra principalmente en la pared celular de los frutos cítricos. Los hongos filamentosos producen el 90% de esta enzima a nivel industrial (Núñez <i>et al.</i>, 2020).</p> <p>Rompen enlaces peptídicos de las proteínas.</p>
Proteasas	<p>Participan en la fabricación de detergentes, productos farmacéuticos y en la industria alimenticia como coagulante de la leche para la elaboración de quesos (Solera, 2010).</p> <p>Hidrolizan enlaces ésteres carboxílicos de acilglicerol de cadena larga.</p>
Lipasas	<p>Son el tercer grupo de enzimas más utilizado en la industria debido a sus múltiples aplicaciones.</p> <p>Son usadas como aditivos alimentarios en la modificación del sabor, síntesis de ésteres con actividad antioxidante, hidrólisis de grasas para la fabricación de detergentes,</p>

tratamiento de aguas residuales para la degradación y remoción de sustratos grasos, eliminación de lípidos y aceites en la industria cosmética y farmacéutica (Burkert *et al.*, 2004). Se obtiene principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rizophus*, *Thermomyces* y *Yarrowia*.

Capaces de hidrolizar enlaces éster de la cutina, así como ésteres solubles y triacilglicerolos.

Cutinasas

pueden catalizar reacciones de síntesis como esterificación y transesterificación de diferentes sustratos, lo que la coloca como una enzima de alta aplicación por la industria de alimentos, la industria de detergentes y oleoquímica, en la síntesis de triglicéridos estructurales, polímeros y surfactantes, en la síntesis de productos para el cuidado personal, degradación de insecticidas, sustancias tóxicas y polímeros sintéticos, y en la producción de biodiesel (Castro *et al.*, 2010).

3.4 Mohos

Se conoce como mohos al grupo de hongos filamentosos de aspecto algodonoso, aterciopelado o polvotiento que crecen prácticamente en cualquier superficie ya sea orgánica o inorgánica que presente humedad, se caracterizan por no formar cuerpos fructíferos complejos, algunas especies poseen rizoides, los cuales les ayudan a anclarse a la superficie donde crecen (Camacho *et al.*, 2009).

Este grupo de organismos forman parte de una clasificación artificial llamada hongos anamórficos, esta clasificación no tiene un enfoque filogenético, se utiliza como una forma práctica para la identificación de hongos (Cepero *et al.*, 2012). Además, se caracterizan por tener reproducción asexual y producir conidios. A pesar de no presentar relación filogenética, esta clasificación es útil para tener un primer acercamiento a estos organismos y poder identificarlos.

3.4.1 *Aspergillus*

Morfología: Este hongo inicialmente crece blanco y posteriormente se torna a colores verde azulado o amarillento, así como colores marrón o negro dependiendo la especie. La textura y apariencia del micelio es algodonosa en un principio y después granulosa, polvorienta dado la producción de esporas. Presenta surcos radiales distinguibles fácilmente (Figura 1a).

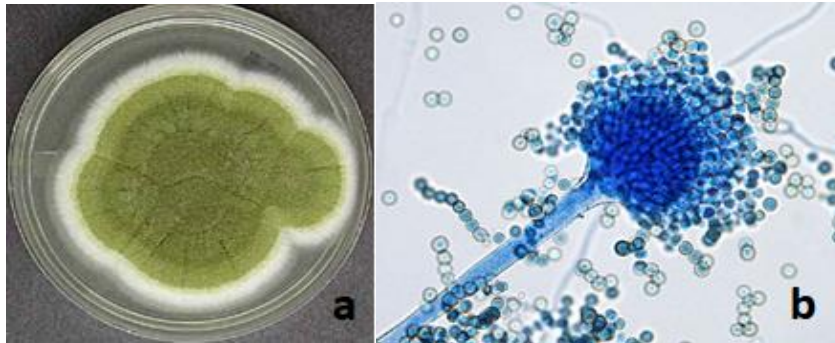


Figura 1. *Aspergillus* sp. a) En placa, b) Conidióforo visto al microscopio.

Estructuras de reproducción: Este género presenta tanto reproducción sexual por ascosporas, como reproducción asexual por conidios (Figura 1b). Es un hongo filamentoso hialino, de vida saprofita, crece en cualquier sustrato, especialmente en el suelo y materia en descomposición, es un hongo de contaminación común, además de que es tolerante a un amplio rango de temperaturas que van desde los 12 y hasta los 57°C (Abarca, 2000).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Aspergillus* sp

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycituna
Clase	Euascomycetes
Subclase	Eurotiomycetidae
Orden	Eurotiales
Familia	Aspergillaceae
Genero	<i>Aspergillus</i>

Fuente: <https://www.mycobank.org/>

Este hongo perteneciente al filo Ascomycota (Cuadro 2) es responsable de generar una enfermedad conocida como aspergilosis, que en sus versiones menos agresivas pueden provocar alergia hasta entramados de hifas en las cavidades de los pulmones provocando una afección pulmonar crónica.

3.4.2 *Fusarium*

Morfología: Se caracteriza por tener micelio de aspecto aterciopelado y esponjoso, de crecimiento rápido, color blanco al principio que después se torna a tonos ligeramente rosas, en el reverso de la placa Petri (Figura 2a) el tono del agar se vuelve purpura, crece a temperaturas cálidas (25° y 37°C).

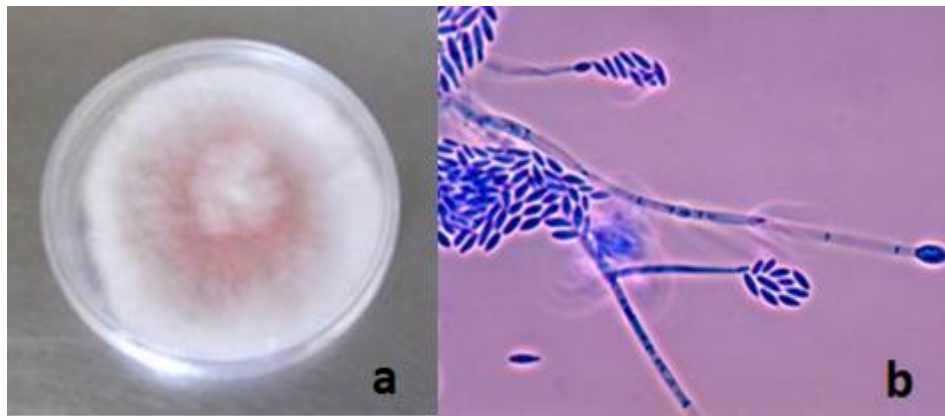


Figura 2. *Fusarium* sp a) en placa, b) Conidióforos vistos al microscopio

Estructuras de reproducción: Conidióforos de esporodoquios cortos, ramificados. Las clamidosporas son ovales o globosas, intercalares o terminales con paredes lisas o rugosas, formadas individualmente en cadenas o en racimos (Figura 2b). *Fusarium* es un hongo cosmopolita, es considerado oportunista, la mayoría de ellos son parásitos de plantas (hortalizas), causantes de enfermar dichas plantas atacando principalmente la raíz y provocando en un principio marchitez en tallo y hojas, hasta la muerte de la planta, son de interés económico debido a las pérdidas que generan en cultivos como el maíz, también existen especies que causan enfermedades en humanos, especialmente inmunodeprimidos (Duarte *et al.*, 2016) la clasificación para este hongo se puede observar en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *Fusarium* sp

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Hypocreomycetidae
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Genero	<i>Fusarium</i>

Fuente: <https://www.mycobank.org/>

3.4.3 Mucor

Morfología: Micelio ancho y escasamente septado o cenocítico, talo haploide, pared compuesta por quitina, quitosán y ácido poligalacturónico, y por el dimorfismo de algunas especies (Cepero *et al.*, 2012) La textura del micelio es ligeramente algodonosa de color blanco con tendencia a marrón (Figura 3a). Presentan rápido crecimiento en medio PDA

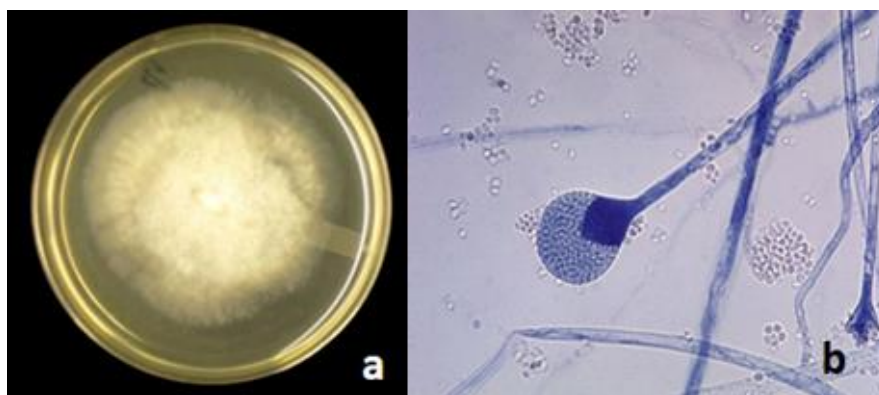


Figura 3. *Mucor* sp. a) En placa, b) Estructura reproductiva vistas al microscopio.

Estructuras de reproducción: Eporangióforos, redondos de color gris a negro (Figura 3b). Crece en un rango temperatura bastante amplio que va de 16° a 30°C, pero su temperatura óptima se encuentra alrededor de los 22°C (Cuadro 4). Son organismos importantes clínicamente ya que es causante de enfermedades respiratorias provocando desde alergias hasta la muerte en pacientes inmunocomprometidos (Álvarez, 2013).

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de *Mucor* sp

Reino	Fungi
Phylum	Mucoromycota
Clase	Mucoromycetes
Orden	Mucorales
Familia	Mucoraceae
Genero	<i>Mucor</i>

Fuente: <https://www.mycobank.org/>

3.4.4 Cladosporium

Morfología: Micelio septado, de color hialino a marrón (dematiáceo). Forma colonias aterciopeladas, pulverulentas o vellosas, con pliegues radiales (Figura 4) de color blanco o crema que tienden a oscurecerse en tonos verde oliva y, a veces, gris verdoso o marrones.

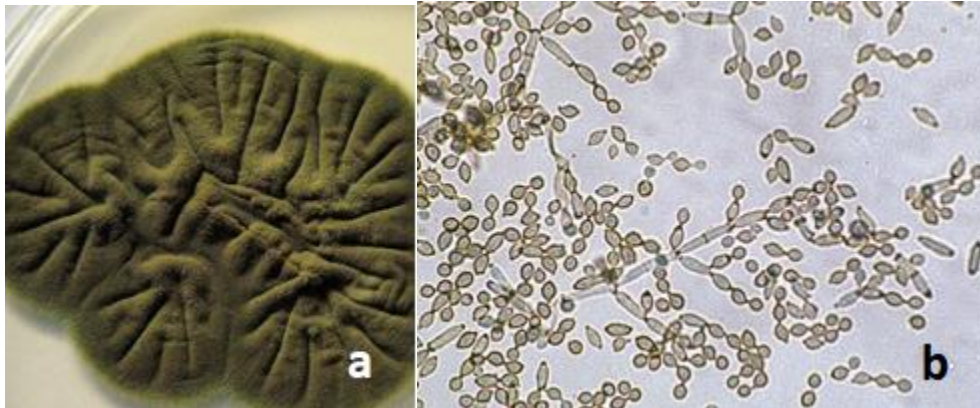


Figura 4. *Cladosporium* sp. a) En placa, b) Esporas dispersas.

Estructuras reproductivas: conidios unicelulares elipsoides o cilíndricos, se encuentran en los ápices de las hifas y ramificados. Pertenece a filo Ascomycota (Cuadro 5), es un hongo abundante en todo el mundo, especialmente en ambientes tropicales, crece a temperaturas que van de los -6°C en algunas especies hasta más de los 35°C , aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 18°C a 28°C . Pertenece al grupo artificial de los hifomicetos, habita principalmente en el suelo y en las plantas. Es patógeno de frutos como el

Maracuyá, lo que también lo hace importante económicamente al generar pérdidas, que su forma de vida es saprófita y parásita (Cepero *et al.*, 2012).

Cuadro 5. Clasificación taxonómica de *Cladosporium* sp.

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Dothideomycetes
Orden	Cladosporiales
Familia	Cladosporiaceae
Genero	<i>Cladosporium</i>

Fuente: <https://www.mycobank.org/>

3.4.5 *Alternaria*

Morfología: apenas crece el micelio presenta un color blanco grisáceo, posteriormente se torna a verde oscuro, formando anillos con tonos gris oscuro, con textura de pulverulenta a vellosa (Figura 5a).

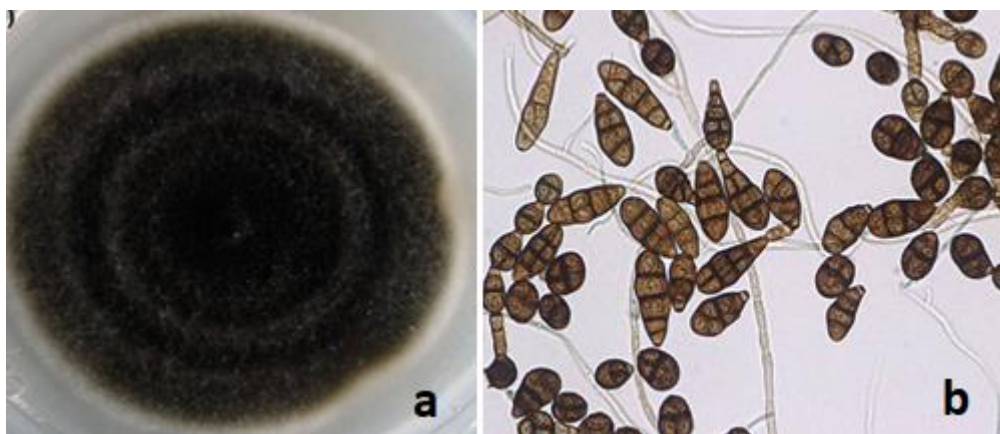


Figura 5. *Alternaria* sp. a) En placa, b) Conidióforos vistos al microscopio.

Estructuras reproductivas: Conidios grandes, septados y oscuros, ramificados en forma de tabique cerca del ápice. *Alternaria* es un grupo cosmopolita de importancia comercial debido a que es causante de enfermedades en plantas, también es saprófita de materia orgánica. (Rivas y Mühlhauser, 2014). Su clasificación taxonómica se puede observar en el cuadro 6.

Cuadro 6. Clasificación taxonómica de *Alternaria* sp

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Clase	Dothideomycetes
Subclase	Pleosporomycetidae
Orden	Pleosporales
Familia	Pleosporaceae
Genero	<i>Alternaria</i>

Fuente: <https://www.mycobank.org/>

3.4.6 *Rhizopus*

Morfología: Micelio ancho cenocítico y se caracterizan por tener rizoides bien desarrollados en la base de los esporangióforos en los extremos de los estolones (nodos). Presentan un crecimiento rápido al inicio el micelio es color blanco para después tornarse en gris (Figura 6a), sus hifas no presentan septos, los esporangios son globosos a subglobosos, columelados y nacen de esporangióforos apofisados. Después de la dispersión de las esporas, las columelas colapsan y toman la forma de paraguas (Figura 6b).

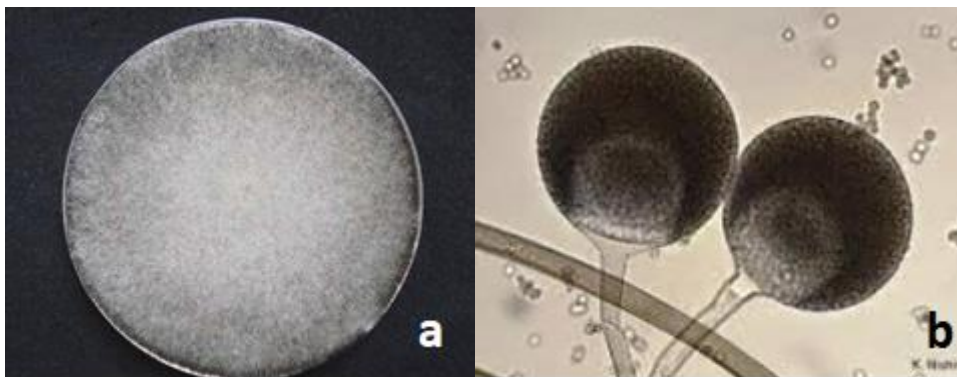


Figura 6. *Rhizopus* sp. **a)** En placa, **b)** Conidióforos vistos al microscopio.

Estructuras reproductivas: Producen esporas sexuales y asexuales (esporangiosporas). Este hongo crece como saprófito y parásito de tejidos vegetales, además es también un causante de enfermedades. Tiene un

crecimiento óptimo a temperaturas que van de los 25°C a los 30°C y un rango de tolerancia al pH de 2.2 a 9.6 (Cepero *et al.*, 2012).

Cuadro 7. Clasificación taxonómica de *Rhizopus* sp

Reino	Fungi
Phylum	Mucoromycota
Subphylum	Mucoromycotina
Clase	Mucoromycetes
Orden	Mucorales
Familia	Mucoraceae
Genero	<i>Rhizopus</i>

Fuente: <https://www.mycobank.org/>

3.4.7 *Trichoderma*

Morfología: Presentan rápido crecimiento, al principio el micelio es algodonoso y esponjoso de color blanco después aparecen puntos verdes que crecen como anillos de color amarillo con tendencia a verde y luego verde oscuro por la presencia de esporas (Figura 7a). El micelio visto microscópicamente es delgado, hialino y septado. Los conidióforos son ramificados, irregularmente verticilados y tienen grupos de fiálides divergentes (Cepero *et al.*, 2012) (Figura 7b).

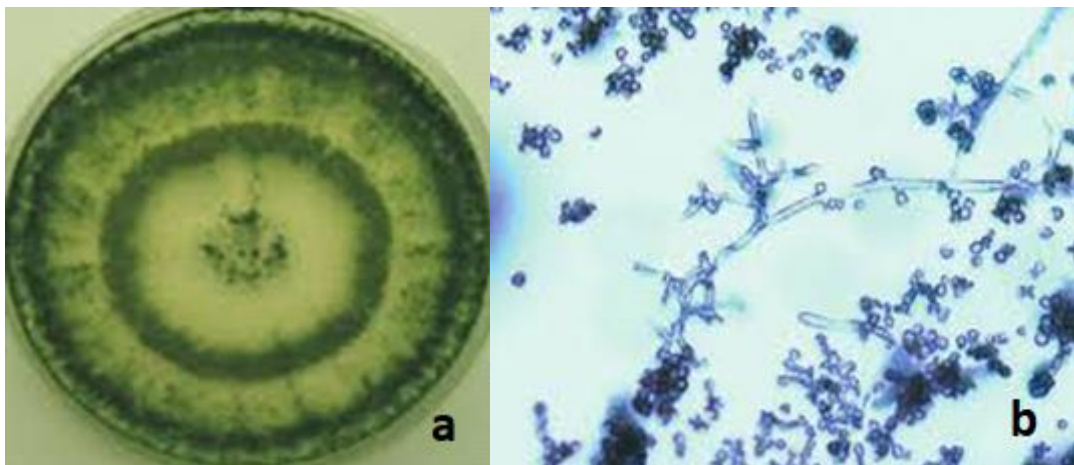


Figura 7. *Trichoderma* sp. a) En placa, b) Estructuras reproductivas vistas al microscopio.

Son hongos ubicuos y se encuentran en raíces, suelo y ambiente foliar. Presentan buen crecimiento en un rango de temperatura de 25 a 30°C. Son saprofitos y

parásitos de otros hongos, por lo que son aprovechados como biocontrol de plagas por otros hongos en las plantas.

A demás este género es aprovechado por la agricultura por promover el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la producción de auxinas y giberelinas, así como ácidos orgánicos. Como control biológico de otros hongos, entre sus principales acciones se encuentra la competencia por nutrientes y espacio, la antibiosis, también inducen respuestas de defensa por parte de las plantas (Hernández *et al*, 2019). Su clasificación taxonómica se puede observar en el cuadro 8.

Cuadro 8. Clasificación taxonómica de *Trichoderma* sp

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Hypocreomycetidae
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Genero	<i>Trichoderma</i>

Fuente: <https://www.mycobank.org/>

3.4.8 *Penicillium*

Morfología: verde azulado con tendencia a verde olivo, en la parte interna del hongo el color se torna gris. Micelio de apariencia algodonosa, después se torna polvoriento (Figura 8a). Tienen células especializadas llamadas fiálides, a partir de las cuales se producen cadenas de conidios. Los conidióforos son hialinos, de paredes lisas o rugosas. Las fiálides suelen tener forma de matraz y constan de una parte basal cilíndrica y un cuello distinto, o lanceoladas (Hernández, 2014) (Figura 8b).

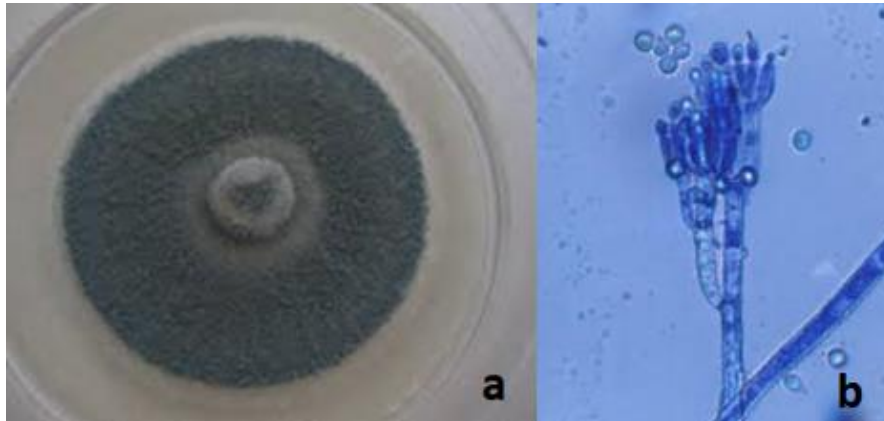


Figura 8. *Penicillium* sp. a) En placa, b) Conidióforos vistos al microscopio

Al igual que otros hongos, este género cumple un papel muy importante como descomponedor de materia orgánica. Es popular en la industria de los alimentos, ya que por un lado es uno de los principales contaminantes de ambientes interiores, lo que hace enmohecer los alimentos ya que producen micotoxinas y por lo tanto generan pérdidas económicas. Sin embargo, este género es un fermentador de bebidas y quesos, como lo es el queso Roquefort (*P. roqueforti*) y camembert (*P. camemberti*), (Cepero *et al.*, 2012).

Cuadro 9. Clasificación taxonómica de *Penicillium* sp

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycituna
Clase	Euascomycetes
Subclase	Eurotiomycetidae
Orden	Eurotiales
Familia	Aspergillaceae
Genero	<i>Penicillium</i>

Fuente: <https://www.mycobank.org/>

3.5 Métodos de identificación de hongos filamentosos

Los métodos de identificación tradicionales están basados en la caracterización morfológica a través de la observación en microscopio y de las tinciones de micelio, sin embargo, los avances en técnicas moleculares permiten tener mayor certeza de los resultados, ya que proveen información filogenética del organismo. Es importante reconocer que ambas técnicas pueden ser una complementaria de la otra y no sustituyente. Vélez (2021) reconoce que estas dos técnicas son importantes al momento de querer identificar un organismo, pero no se debe olvidar tener en cuenta la ecología del organismo, ya que esta es una fuente de información importante sobre los hongos.

Para una correcta identificación de los hongos es importante observar estructuras de reproducción y se utilizan algunas técnicas o métodos de observación, tales como la técnica de cinta adhesiva, cultivo en lámina, que se mencionan a continuación.

3.5.1 Técnica de cinta adhesiva

La metodología para esta técnica es muy fácil además de que se requieren pocos materiales. Se coloca una gota de azul lactofenol en un portaobjetos. Con cinta adhesiva se toma una muestra pequeña de micelio, tocando directamente la cinta sobre el tejido para posteriormente colocarla sobre la gota de azul lactofenol. Se adhiere suavemente procurando eliminar burbujas de aire y se coloca un cubreobjetos, posteriormente se observa al microscopio. Esta técnica permite observar características morfológicas del micelio y estructuras reproductivas (Andino y Castillo, 2010)

3.5.2 Cultivo en lámina

Esta metodología permite realizar observaciones de las características morfológicas del micelio, así como de estructuras reproductivas. Lo que lo hace un método rápido para la identificación de hongos. Esta técnica fue propuesta por Johnson en 1946 y modificada por Riddell en 1950, consiste en colocar un cuadro de medio de cultivo en agar sobre un portaobjetos estéril, y colocar sobre las esquinas del cuadro de agar muestras de hongo, se deja crecer en una cámara

húmeda entre 3 y 7 días según la especie y posteriormente se observa al microscopio (Gómez *et al.*, 2018). Actualmente las técnicas moleculares van ocupando mayor espacio en estos temas, a continuación se presentan algunas técnicas utilizadas en distintas investigaciones.

3.5.3 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight

Por sus siglas en inglés se conoce como técnica **MALDI-TOF** (*desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo*). Consiste en un análisis de la composición de proteínas ribosomales a través de la creación de un espectro de masas que es específico para cada género y especie (Maldonado *et al.*, 2018). Esta técnica es novedosa y altamente aceptada en los laboratorios por la rapidez con la que ofrece resultados de los análisis clínicos, sin embargo, cuenta con una limitante que es la base de datos con la que se comparan los datos obtenidos. Se ha observado que hay “diferencias significativas en los perfiles proteicos obtenidos en función de la antigüedad de los cultivos, e incluso entre diferentes subcultivos de la misma cepa” (Siller *et al.*, 2016). Para lo cual surge la solución de realizar bases de datos más complejas que abarquen datos en función al tiempo de antigüedad de las cepas a analizar. Como conclusión, esta técnica ofrece buenos resultados en un tiempo corto, sin embargo, hoy en día no puede sustituir a otras técnicas hasta contar con una base de datos grande, mientras tanto es complementaria de las técnicas ya existentes.

3.5.4 Amplificación por PCR y secuenciación

Utiliza para la detección y amplificación de ARN. Permite estudiar la expresión de determinados genes (su traducción a proteínas). Para lo cual se requiere de la obtención y purificación de ARN mensajero. Después se transcribe a ADN mediante una transcriptasa inversa, por cada molécula de ARNm (genes 18S, 5,8S y 28S), se sintetiza una molécula de cADN monocatenaria que posteriormente se ha de convertir en bicatenaria utilizando una ADN polimerasa, obtenidas los fragmentos de interés se procede a la comparación de secuencias (Cortés *et al.*, 2020). Este tipo de técnicas requieren de marcadores moleculares,

los cuales se definen como segmentos de ADN de regiones no codificantes, que permiten identificar alelos en determinados sitios en los cromosomas, estas características son específicas de cada individuo, grupo de individuos o poblaciones, por lo cual son útiles para la clasificación taxonómica de los organismos (Rocha, 2003).

3.5.5 Medios cromogénicos

Es un método de identificación rápido, está basado en la actividad enzimática específica de cada organismo, cuando éstas hidrolizan el sustrato generan en el medio un cambio de color, lo que les permite identificarlos. Suelen ser medios selectivos que pueden contrarrestar el crecimiento de otros microorganismos. “Los principales sustratos de los medios cromogénicos son derivados indólicos que pueden ser hidrolizados por galactosidasas o glucosidasas, produciéndose derivados poco tóxicos y que no inhiben el crecimiento bacteriano” (Siller *et al.*, 2016). Esta técnica permite hacer una identificación presuntiva y requiere del apoyo de otras pruebas, por lo que no puede considerarse como absoluta para la identificación de un organismo.

3.6 Características de los plásticos

Los plásticos son hidrocarburos de largas cadenas de átomos de carbono con dos átomos de hidrógeno unidos, estos pueden estar constituidos de compuestos orgánicos (celulosa, caucho, lignina, entre otros), sintéticos (derivados del petróleo, el gas natural o el carbón) y semi sintéticos. Entre sus principales características está el ser flexible, ligero, moldeables y re moldeables, impermeables, no son buenos conductores eléctricos, durante su vida útil presentan resistencia a distintas sustancias químicas, a factores ambientales, incluso a factores biológicos (Bustamante, 1994).

Existen diferentes tipos de plásticos que responden a diversas funciones, los materiales y procesos dependen de la tarea a la cual será destinado el plástico. Sin embargo, todo plástico pasa por algunos procesos en común, como la polimerización (Bustamante, 1994; Díaz, 2012).

Existe una amplia gama de plásticos que responden a la demanda del mercado, la diferencia entre estos materiales se encuentra en el proceso de fabricación, los aditivos añadidos dan estabilidad molecular, resistencia, flexibilidad, así como otros aspectos relacionados a su funcionalidad. Cada plástico tiene un nombre específico que es abreviado para su manejo práctico, en el cuadro 10 se muestra las abreviaciones de los plásticos más usados y que han sido objeto de investigación en distintos trabajos relacionados a la biodegradación.

Cuadro 10. Abreviación de los nombres de plásticos.

Nombre del plástico	Abreviación
Polietileno	PE
Polietileno de alta densidad	PEAD
Polietileno de baja densidad	PEBD
Poliestireno	PS
Poliestireno Cristal	PSC
Poliestireno Expandido	PSE
Ácido poliláctico	PLA
Poliéster poliuretano	PUR
Politereftalato de etileno	PET

3.7 Poliestireno (PS)

Eduard Simon aisló de la corteza de un árbol en 1839, obteniendo un líquido incoloro, posteriormente Farbenindustrie en 1930 obtuvo sintéticamente el poliestireno a partir de la polimerización en masa de estireno y en 1950 la firma alemana BASF desarrolló e inició la producción del poliestireno expandible, bajo la denominación Styropor, este material se reconoce con las letras PS (Pérez *et al.*, 2016). Es un termoplástico cuyas propiedades físicas y químicas lo han posicionado como uno de los materiales más utilizados hoy en día. Este material también es conocido en México y en otros países como Unicel, Telgopor, Isopor, Icopor, Espuma-Flex, Forexpan, Porexpan o Corcho Blanco. Entre sus principales cualidades encontramos que no es tóxico, es ligero, durable, presenta baja conductividad térmica y alta absorción acústica, tiene buena resistencia mecánica y resistencia a la humedad, por lo que es altamente demandado por la industria de los alimentos, la construcción y el embalaje principalmente. A pesar de poseer

dichas propiedades, su tiempo de vida útil es muy breve, siendo materiales de un solo uso, además de que representa varios problemas ambientales (López y Pérez, 2019), entre ellos se encuentran:

1. Su degradación es lenta.
2. Su fuente de generación es el petróleo, es decir, su materia prima no es renovable.
3. Algunos de los insumos químicos utilizados para producirlos son nocivos para el ambiente según Téllez, 2012 (citado por López y Pérez, 2019).
4. Contiene un tipo de sustancias tóxicas llamadas dioxinas, que provocan en los seres humanos problemas de reproducción, desarrollo y alteraciones en el sistema inmunitario, también pueden causar cáncer.
5. No se recomienda ser usado en recipientes que deban ser calentados, ya que al hacer esto, el material desprende sustancias tóxicas para el consumidor.

El PS es un polímero vinílico, es decir presenta doble enlace entre sus moléculas, está formado por una cadena lineal larga de hidrocarburos con un grupo fenilo unido cada dos átomos de carbón (Pérez *et al.*, 2016). Tiene enlaces de tipo covalente, además de uniones intramoleculares e intermoleculares (Figura 9).

Su proceso de producción comienza con la polimerización vinílica por radicales libres a partir de monómeros de estireno. Su fabricación requiere de un iniciador como los peróxidos, que operan rompiéndose para generar un radical libre (Figura 10).

Este se une a una molécula de monómero, formando así otro radical libre más grande que a su vez se une a otra molécula de manera repetida (Figura 11).

De acuerdo a lo que mencionan sus fabricantes, biológicamente el PS no es un material nutritivo para ningún organismo, por lo que es considerado como un material imputrescible (Fuentes, 2013; Diteval Icopor, 2019). Dentro de los productos de poliestireno se pueden identificar tres grupos principales, el poliestireno cristal o de uso general (GPPS), el poliestireno alto impacto (HIPS) y el poliestireno expandible (EPS).

Poliestireno de alto impacto (HIPS) dentro de su proceso de fabricación se le agrega un elastómero 'butadieno', lo que le proporciona mayor capacidad de resistencia, lo hace no quebradizo y más fuerte. Este polímero se caracteriza por ser de un color blanco opaco, sin embargo, se puede pintar y pegar fácilmente (Fuentes, 2013)

Cuadro 11. Propiedades físicas y químicas del poliestireno

PS	
Densidad	1.04-1.09 g/cm ³
Transparencia	88-92% (GPPS)
Índice de refracción	1,59-1,60
Resistencia a la Radiación	Buena
Resistencia a los Ultravioletas	Mala
Resistencia Dieléctrica (kV mm-1)	20
Absorción de Agua - en 24 horas (%)	<0,4
Resistencia a la Tracción (MPa)	30-100
Resistencia al Impacto Izod (J m-1)	19-24

Fuente: Pérez *et al.*, 2016

3.7.1 Poliestireno Expandido (PSE)

El PSE se genera a partir de monómeros de estireno y un hidrocarburo gaseoso, el pentano. Son perlas expandibles rellenas de aire, por lo que el material sólido que lo conforma va de entre el 2 al 5%, mientras que del 95 al 98% restante es gas (Schmidt *et al.*, 2011 citado por Jiménez, 2019). Su fabricación comienza con la polimerización de monómeros de estireno posteriormente se expanden hasta 20-50 veces su volumen inicial gracias al contacto con el pentano y el vapor de agua a 90° C (Asociación Nacional de Poliestireno Expandido [ANAPE], s.f.).

Este material es altamente utilizado para el embalaje de productos delicados por sus propiedades amortiguadoras, de igual manera para la industria de la construcción por sus propiedades como aislante térmico, por presentar buena resistencia y ser liviano (Zamudio, 2018). Frente a la luz UV este material se vuelve frágil y se torna amarillento.

Fórmula química: C₈H₈

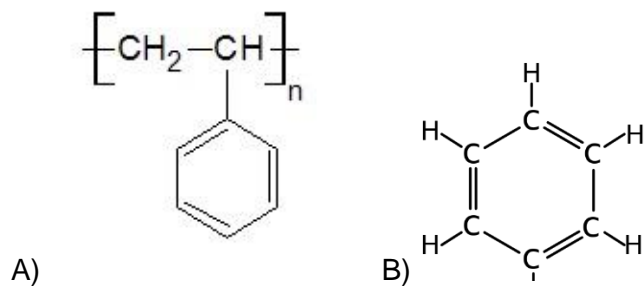


Figura 9. Estructura química del poli estireno B) Anillo Benceno



Figura 10. Modificación estructural del estireno por polimerización de radicales libres.

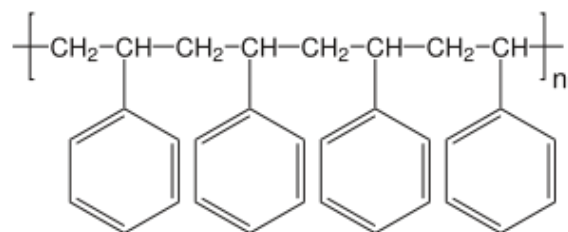


Figura 11. Monómeros de estireno unidos por procesos de polimerización.

El PSE es altamente demandado, entre sus particulares cualidades resalta la amortiguación de impactos, su fácil manipulación debido a su ligereza es un buen aislante térmico y sonoro, bajo costo y fácil acceso. En 1950 la empresa BASF utilizó este material para construir su propia planta, 45 años después realizaron pruebas para demostrar que el material mantenía sus mismas condiciones, ya que a pesar de su ligereza tiene una capacidad de carga en un intervalo de los 10 kg/m³ hasta los 35 kg/m³ (Figura 12a).

3.7.2 Poliestireno Cristal

Poliestireno de uso general (GPPS). Otro nombre que recibe este tipo de plástico se conoce como Poliestireno atáctico, se caracteriza por ser amorfo debido a que el grupo fenilo que presenta el estireno genera enlaces desordenados lo que genera un material con alta transparencia (Figura 12b). A demás este material se polimeriza en presencia de polibutadieno (caucho sintético) disuelto para mejorar su resistencia (Fuentes, 2013).

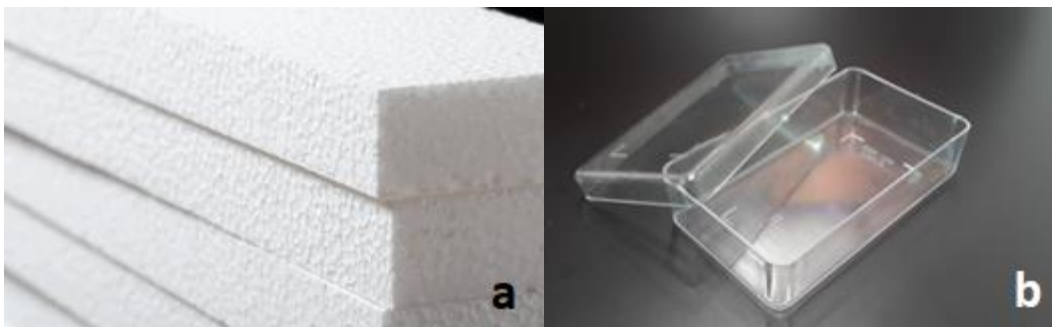


Figura 12. Poliestireno (PS) a) tipo expandido, b) tipo cristal

3.8 Degradación de plásticos

La degradación es un proceso en el que se daña la estructura molecular, lo que produce alteraciones físicas y químicas en las propiedades del material. En los plásticos, la degradación ocurre por diversos factores que pueden ser térmicos, mecánicos, biológicos, por causa de la luz y/o de la humedad (Bustamante, 1994).

Si bien los plásticos son cadenas largas de polímeros, la degradación ocurre principalmente por la ruptura de los enlaces (covalentes), lo que reduce el tamaño de las cadenas poliméricas a nivel de oligómeros y monómeros. Dependiendo del grado de degradación es como serán visibles los cambios en la superficie de los polímeros, estos pueden variar entre grietas, fisuras, desgaste superficial, pérdida de peso, opacidad, elasticidad, transparencia, fragmentación entre otros (Díaz, 2012)

3.8.1 Degradación Química

Es un tipo de degradación abiótica, en el que los diferentes elementos químicos del ambiente generan una reacción negativa en la estructura del polímero. El oxígeno y la hidrólisis son algunos de los principales agentes degradadores de estos materiales (Condori, 2020).

3.8.2 Degradación Térmica

De acuerdo a la función con la cual han sido diseñados los plásticos es el grado de resistencia a la temperatura, sin embargo, existen materiales que son altamente sensibles, que incluso a temperatura ambiente puede presentar degradación (por ejemplo, el policaprolactona-PLC) (Bustamante, 1994).

Los plásticos tienen la capacidad de ser remodelables una y otra vez, siempre y cuando sea a altas temperaturas.

3.8.3 Degradación mecánica

Este tipo de degradación es prácticamente inevitable, ocurre por la aplicación de fuerzas al manipular los materiales. La presión, fricción y tensión generan daños y deformaciones en el material que normalmente no se puede ver pero que ocasionan daños estructurales a nivel molecular (Gutiérrez, 2013)

3.8.4 Foto degradación

Ocurre en materiales que son sensibles a la luz, ya que la energía emitida puede ocasionar inestabilidad en las moléculas y en los enlaces. En algunos casos ocurre por fallas en la estructura de los plásticos, mientras que en otros es

provocada por la adición de moléculas fotosensibles como agentes pro-oxidantes, cuyo efecto va a depender del tiempo e intensidad de exposición a la luz (Lucas *et al.*, 2008)

3.8.5 Biodegradación

La biodegradación se define como el proceso de descomposición de materiales o sustancias por microorganismos, que al convertir estos materiales a moléculas más pequeñas contribuyen al ciclo del carbono y a la generación de biomasa (Lucas *et al.*, 2008; Gutiérrez, 2013; Arena y Chiappa, 2017).

Hongos, bacterias y actinomicetos son los principales microorganismos que participan en este tipo de degradación, mediante diferentes mecanismos como la producción y liberación de enzimas sobre el material orgánico e incluso inorgánico, como es el caso del plástico, el cual tiene una base de carbón que es aprovechada por los microorganismos. Sin embargo, la participación de factores no bióticos tales como daños mecánicos, térmicos, químicos o ambientales en el plástico juegan un papel importante en la biodegradación, pero desde luego no el principal, ya que solo hablamos de biodegradación cuando el mayor daño es ocasionado por la actividad biológica (Lucas *et al.*, 2008).

3.8.6. Biopelículas

En el proceso de biodegradación se forma sobre la superficie una biopelícula, el cual es un complejo ecosistema formado por diferentes microorganismos que han desarrollado la capacidad de adaptarse y establecer una especie de comunicación química entre las diferentes especies de organismos que ahí se encuentran (Betancourth *et al.*, 2004, citado por Gutiérrez, 2013) La formación de biopelículas permite a los organismos tener mayor probabilidad de sobrevivir a las condiciones del ambiente, se adhieren a la superficie excretando sustancias como enzimas con las cuales degradan la superficie y obtienen alimento. Este fenómeno no solo se observa en superficies orgánicas sino que también en inorgánicas como el plástico. De acuerdo a lo observado por Cappitelli y Sorlini (2008) “no solamente cambia sus características superficiales, provoca deterioración, sino que también incide en la degradación”.

IV. Objetivo General

Revisar el estado del arte de la degradación de plásticos por causa de microorganismos, así como evaluar la capacidad de diferentes mohos aislados en laboratorio de degradar dos tipos de Poliestireno (poliestireno cristal y poliestireno expandido) a partir de la pérdida de peso en diferentes periodos de tiempo.

Objetivos particulares

1. Realizar una revisión bibliográfica de los diferentes hongos degradadores de plásticos.
2. Obtener muestras provenientes de diferentes medios para aislar cepas de hongos que serán sometidos a prueba en la degradación de plásticos.
3. Evaluar la capacidad degradadora de los hongos aislados, en dos tipos de poliestireno a partir de diferencias de pesos secos, antes y después de ser inoculados.
4. Determinar el tiempo óptimo de degradación del polietireno con los diferentes hongos aislados.
5. Describir las características microscópicas y macroscópicas de las cepas que hayan generado mayor porcentaje de degradación.
6. Comparar los porcentajes de degradación en poliestireno expandido (PSE) y poliestireno cristal (PSC).

V. Justificación

En el Laboratorio Integral de Biología Vegetal y Micología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP, se investigan las relaciones existentes entre humanos y hongos tanto en la alimentación, la medicina y el ambiente. Si bien la división Basidiomycota ha ocupado un papel principal dentro de estas investigaciones, no se puede negar la constante presencia de hongos filamentosos microscópicos en el laboratorio, estos microorganismos juegan un papel importante en el ecosistema, como ser uno de los principales grupos degradadores de materia y así contribuyen en el ciclo del carbono y del nitrógeno.

El conocimiento que se tiene sobre los hongos microscópicos es insuficiente debido a que su principal enfoque es de tipo clínico, por lo que son solo unas cuantas especies las estudiadas, sin embargo, los hongos microscópicos son un grupo ampliamente diverso como lo reporta Aguirre *et al.*, (2014), el “Resultado de estas evaluaciones indican que existen por lo menos 700 000 especies de hongos en el mundo, de los cuales más del 80% son hongos microscópicos”. Sin embargo, el conocimiento sobre este grupo es limitado, según lo menciona Hawksworth en 2001 Aguirre *et al.*, (2014) mencionan que el conocimiento de este grupo equivale al 4%. En México se ha producido poca información al respecto, pues hablar de hongos es hablar de macromicetos, ya que tienen un papel importante en la historia y cultura del país, por lo que ha quedado a la sombra la investigación sobre micromicetos.

Por otra parte, la popularización de los plásticos en la sociedad ha sido tan alta que hoy en día estamos rodeados de estos polímeros, además, el mal manejo de estos residuos no solo afecta a las personas, sino que también impacta a los microorganismos del ambiente. El poliestireno es el quinto plástico más consumido a nivel mundial debido a sus múltiples beneficios y bajo costo, sin embargo, el tiempo que tarda en degradarse oscila entre 500 y 800 años (Cardozo, 2020) lo que lo coloca como un material contaminante. A pesar de ya existir plantas recicladoras de este material, los costos de operación son elevados debido al

transporte del gran volumen que ocupan. Según lo mencionan López y Pérez (2019) “el reciclado mecánico, a menudo resulta más costoso que el plástico virgen”. Los residuos plásticos, entre ellos PSE, generan 2.000 millones de toneladas de dióxido de carbono, equivalente al año en emisiones de gases efecto invernadero a la atmósfera, e ellos, solo el 12 % de este material es recuperado (López y Pérez, 2019).

La biodegradación, es la alternativa más amigable con el ambiente para degradar estos materiales, en este sentido, los mohos juegan un papel importante ya que son de los principales grupos de microorganismos que se han estudiado como degradadores de diversos materiales plásticos y sustancias sintéticas, mostrando un efecto significativo en la degradación de estos.

La biodegradación de plásticos por hongos es un tema que ya se ha abordado en distintos países, sin embargo, en México, las investigaciones sobre el tema son escasas y no se ha profundizado de forma directa. De ahí la importancia de producir información que nos haga reflexionar sobre este tema, conocer más sobre las especies que intervienen en estos procesos y presentar propuestas que nos lleven a la acción.

Hacer una revisión de las investigaciones producidas hasta el momento permitirá tomar decisiones sobre cómo abordar esta temática en futuras investigaciones, mejorando así las metodologías empleadas que permitan obtener resultados más relevantes y significativos que conlleven a soluciones eficaces en la biodegradación de los plásticos.

VI. Metodología

Este trabajo se realizó en dos partes, la primera consistió en la revisión del estado del arte de la degradación de plásticos por efecto de hongos microscópicos, desde sus técnicas de aislamiento y sus metodologías para evaluar la degradación del material, así también, se revisaron los resultados obtenidos de acuerdo a las variables que contemplaron los investigadores.

La segunda parte fue de tipo experimental, a partir de las investigaciones consultadas se aislaron hongos microscópicos con diferentes medios para evaluar el nivel de degradación de dos tipos de poliestireno PS comerciales, poliestireno tipo cristal PSC y poliestireno tipo expandido PSE ten diferentes periodos de tiempo.

6.1 Estado del arte

Se realizó una búsqueda avanzada a través de revistas internacionales de alto impacto como BioOne, Nature, Journal, PNAS, PubMed y por buscadores como EBSCO, Mendeley y Google Scholar, teniendo como palabras clave “moho” “degradation” “biodegradation”, se limitó la búsqueda al año de publicación que fuera posterior a 2010 preferentemente, la búsqueda se enfocó a la biodegradación de plásticos, particularmente de poliestireno por hongos, ya sea solos o en su defecto con otros organismos, no se limitó el idioma o país de procedencia. Se obtuvieron 39 artículos científicos, 9 tesis de licenciatura, 4 revisiones y 4 páginas de internet que abordaron específicamente la biodegradación de plásticos por hongos. Esta búsqueda tuvo como propósito conocer el estado actual de las investigaciones sobre la biodegradación de diferentes plásticos por hongos.

Se investigó el papel que han tenido los mohos en la degradación de materiales plásticos, la problemática de la contaminación por poliestireno y las soluciones que se han propuesto ante esta situación, por lo que se prestó especial atención a las metodologías empleadas y a los resultados obtenidos en los diferentes estudios.

Como ya se ha mencionado anteriormente, existen diferentes métodos por los cuales se puede reducir las cantidades de plástico, algunas son más viables que otras en términos económicos, sin embargo, la biodegradación es la que mejores resultados ofrece desde la perspectiva ambiental.

6.1.1 Biodegradación por hongos

Por su amplia variedad enzimática (Cuadro 1), los hongos han sido ocupados para degradar diversos sustratos que van desde residuos orgánicos como el bagazo de la caña, distintos tipos de paja, madera, entre otros (Cepero *et al.*, 2012), hasta residuos inorgánicos como los hidrocarburos (Petit *et al.*, 2013).

Cuadro 12. Hongos evaluados en diferentes investigadores en la degradación de plásticos

Hongos evaluados en la degradación de plásticos		
Hongo	Plástico	Investigador
<i>Xylaria hyphae</i>	PEBD	Clutario y Cuevas en 2001
<i>Candida cylindracea</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	n-butil bencil ftalato (BBP)	Yang-Hoon <i>et al.</i> , 2002
<i>Aspergillus flavus</i> ,	PEBD y PEAD	Méndez <i>et al.</i> , 2007
Consortio microbiano <i>Pseudomonas</i> <i>sp. Penicillium</i> sp. <i>Rhodotorula</i> , <i>Hyalodendron</i> sp. y una levadura	PEBD	Uribe <i>et al.</i> , 2011
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	PUR	Russell <i>et al.</i> , 2011
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	PEAD	Velrajan y Niren, 2012
<i>Aspergillus niger</i>	PE de 40 micras	Kittur <i>et al.</i> 2013

<i>Aspergillus fluvus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Cladosporium</i> sp. <i>Gliocladium virens</i> <i>Penicillium</i> sp	PEBD	Gutiérrez, 2013
<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Arthrobacter</i> sp	Di(2-etilhexilftalato) DEHF	Sánchez <i>et al.</i> 2015
<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i>	PEBD	Deepika y Madhuri, 2015
<i>Zalerion maritimum</i>	PE	Paco <i>et al.</i> , 2017
<i>Penicillium oxalicum</i> y <i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	PEAD	Ojha <i>et al.</i> , 2017
<i>Rhizopus arrhizus</i> y <i>Penicillium</i> sp	PE	Mahalakshmi y Niren, 2018
<i>Aspergillus flavus</i>	PE	Zhang <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus sydowii</i>	PE de 20 micras	Sangale <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus flavus</i>	PE, PS PP	Santacoloma <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus flavus</i>	PLA	Avargani <i>et al.</i> , 2020

6.1.2 Biodegradación de plásticos

La degradación de materiales plásticos se ha estudiado en una amplia variedad de organismo, desde insectos (*Tenebrio molitor*), gusanos (*Galleria mellonella*) hongos y bacterias, siendo estos últimos quienes los que mejores resultados han presentado y de quienes se ha realizado mayor investigación.

La biodegradación se conforma por diferentes etapas, por lo que es importante reconocer la diferencia entre cada una de ellas, ya que se han cometido errores al manejar el término biodegradación en materiales que no han atravesado todas las etapas. La sola presencia de organismos sobre una superficie no es un indicador directo de biodegradación, por ejemplo, encontrar algas sobre una superficie de piedra u otro material inorgánico, no genera efectos significativos.

Para hablar de biodegradación, el material tuvo que haber atravesado por biodeterioración, biofragmentación y asimilación por parte de los microorganismos (Lucas *et al.*, 2008), a este proceso, algunos investigadores han agregado la mineralización como la parte última de la biodegradación (Soriano, 2020). Cada etapa es evaluado bajo ciertas pruebas específicas, que muchas veces dependen de la naturaleza del material que se estudia (Cuadro 13).

6.1.3 Etapas de la biodegradación

1. Biodeterioración: En esta etapa ocurre deterioración a nivel superficial que modifican las propiedades físicas, químicas y mecánicas del material, ocurre por la acción combinada de factores abióticos y diferentes microorganismos (algas, bacterias, hongos, protozoarios) que por sus interacciones forman biopelículas formando así un consorcio microbiano (Gutiérrez, 2013).
2. Biofragmentación: Es un fenómeno necesario que antecede a la asimilación. Las enzimas tienen un papel importante ya que son estas las que rompen los enlaces de los polímeros generando moléculas de menor peso (Lucas *et al.*, 2008). Despolimerización: Esta etapa se caracteriza por la liberación de sustancias como enzimas y radicales libres capaces de escindir moléculas reduciendo progresivamente su peso molecular (Lucas *et al.*, 2008). El deterioro de un material se puede observar por cambios en el color, rugosidad, cambios en la elasticidad, flexibilidad, aparición de grietas y agujeros.
3. Asimilación: los productos de menor peso molecular pueden ser reconocidas por moléculas transportadoras para atravesar la membrana

plasmática y ser integradas al metabolismo para producir energía y biomasa.

4. Mineralización: En esta etapa se refiere a la producción de metabolitos simples y complejos como CO_2 , N_2 , CH_2 , H_2O y sales que son liberadas al medio.

Otra manera de comprender el proceso de biodegradación es propuesto por Reyes y Arena (2017), quienes mencionan que este proceso ocurre en 4 pasos generales:

1. Se comienza con el contacto del organismo hacia el material a partir de la segregación de enzimas, para posteriormente introducir las partículas del material a la célula a través del transporte activo.
2. Después ocurre el proceso oxidativo realizado por enzimas intracelulares (Oxigenasas y peroxidasas).
3. La degradación sucede por la activación de rutas periféricas de los hidrocarburos, es decir, en donde los materiales se convierten en compuestos intermedios.
4. Finalmente, la biosíntesis de la biomasa celular a partir de metabolitos precursores.

En la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por hongos, generan untrans-dihidrodiol, en este caso a partir de esta reacción, se forma un cis-dihidrodiol y así se pierde el anillo aromático.

Los estudios realizados en diferentes microorganismos muestran que la degradación puede ocurrir por un solo organismo o por la asociación de varios organismos. A esta asociación se le conoce como consorcios microbianos.

El cual lo define como una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, en la que unos se benefician de las actividades de los demás. En un consorcio se pueden encontrar

microorganismos con diferentes habilidades metabólicas Valdez y Poggi, 2006 (citados por Gutiérrez, 2013)

Al fenómeno en que los microorganismos habitan una superficie plástica se le ha denominado platisfera, el cual es considerado un nuevo ecosistema (Arribas, 2021). Este nuevo ecosistema se dio a conocer en la basura flotante recolectada en el giro subtropical del Atlántico Norte y se ha expandido el estudio en los variados sustratos plásticos que se acumulan en ambientes terrestres y acuáticos. Los plásticos no solo actúan como portadores de microorganismos, sino que también son vectores de estos, por lo que también se han catalogado como una nueva fuente de enfermedades (Gkoutselis *et al.*, 2021).

Cuadro 13. Pruebas para evaluar la degradación de plásticos

Etapas de la biodegradación	Lo que se busca observar	Prueba
Biodeterioración	Grietas Cambios de color Fisuras Desgaste	Microscopía fónica Microscopía electrónica Microscopía de fuerza atómica. Diferencia de peso
	Resistencia a la tensión	Pruebas de tensión Pruebas mecánicas de elongación.
	Resistencia a la Flexibilidad	Análisis térmico mecánico dinámico Pruebas calorimétricas.
Biofragmentación	Reducción del peso molecular Identificación de oligómeros y monómeros en el medio	Cromatografía de exclusión por tamaño Cromatografía líquida Prueba de la zona clara Espectrofotometría
Asimilación	Producción de CO ₂ en el medio	Espectrometría infrarroja transformada de Fourier Métodos respirométricos estandarizados

Lucas *et al.*, 2008; Cletus *et al.*, 2012; Yepes 2014.

6.1.4 Producción de Poliestireno en México

De acuerdo con una publicación realizada por la Asociación Nacional de Industrias del Plástico (ANIPAC) y la Asociación Nacional de la Industria Química (ANIQ),

Estiman que el consumo nacional del unicel en México es de 125 mil toneladas anuales, de las cuales el 25% se destinan a la fabricación de productos desechables para la industria alimenticia; el 75% restante se divide en el sector de la construcción y embalaje (Pérez *et al.*, 2016; Fundación UNAM s.f.).

Estos datos son similares a los publicados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía, quienes mencionan que “en México se producen y consumen aproximadamente 13,000 millones de toneladas de poliestireno expandido al año en sus diferentes modalidades, ya sea construcción, contenedores o embalajes. Apenas el 0.5% de este material es reciclado, es decir, 350 mil toneladas aproximadamente” (Guerra *et al.*, 2016).

De acuerdo a lo que menciona la gaceta del senado en la propuesta de iniciativa para la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos:

En México, la producción de poliestireno se encuentra regulada en la Norma Oficial Mexicana NOM-161.SEMARNAT-2011 se establecen criterios para clasificar los Residuos de Manejo Especial y determinar cuáles están sujetos a Plan de Manejo, incluye un listado de los mismos, el procedimiento para la inclusión o exclusión a dicho listado, así como los elementos y procedimientos para la formulación de los planes de manejo, pero no contamos con disposiciones que contemplen acciones de un efectivo reciclado o que prohíban o limiten su producción.

Héctor Ortiz y Jorge Hinojosa estudiantes egresados de la Facultad de Ingeniería de la UNAM (Hurtado, 2014), desarrollaron una máquina capaz de reciclar el poliestireno expandido, transformándolo en materia prima, crearon la empresa STARTUP RENNUEVA. Se estima que al reciclar poliestireno expandido se reduce en un 90% la presencia de este en el medio ambiente, el nombre de la máquina recicladora es “REPS-01” (Reciclaje de EPS prototipo 01) y trabaja con calor bajo un proceso conocido como termodensificado. A pesar de todo esto,

sólo el 11% se recicla debido al alto costo de la tecnología de importación, por lo que se considera más barato producir nuevo material.

En cuanto al manejo de sus desechos “no se separa en la fuente para su reciclado, el porcentaje de recuperación del poliestireno expandido es apenas del 12 %, además de que aportan 2.000 millones de toneladas de dióxido de carbono“(López y Pérez, 2019). Existen 4 tratamientos por los cuales se procesan los desechos de PSE:

- Proceso primario: Consiste en la trituración del material, este proceso permite reducir su volumen y mezclarlo con otros polímeros para la fabricación de nuevos productos.
- Proceso Secundario: El material es sometido a calor para formar un producto aglutinado para después formar bloques, este proceso permite la compactación del material pero requiere de una alta inversión de energía.
- Proceso terciario: Está basado en el uso de solventes que vuelven soluble el material
- Proceso cuaternario: Consiste en utilizar los desechos de PSE como fuente de energía al ser incinerados ya que este material tiene un elevado poder calorífico (40 MJ/Kg).

6.1.5 Biodegradación de Poliestireno

Otra alternativa para el procesamiento de residuos de este material es la biodegradación. Existen diversos estudios en los que las larvas del coleóptero *Tenebrio molitor* es capaz de consumir y degradar poliestireno. En 2015 Yang *et al.*, como lo menciona Rodríguez *et al.*, 2021 presentaron las primeras evidencias de la degradación de poliestireno por estos animales, no observaron diferencias en la biomasa de las larvas, entre una dieta normal y otra a base de poliestireno. Estos organismos demostraron ser capaces de degradar poliestireno en menos de 24 h, “los autores detectaron que el 47.7% del carbono del EPS ingerido fue mineralizado y convertido en CO₂, mientras que el 49.2 % fue excretado como humus y alrededor del 1 % se incorporó como biomasa”. Así también procedieron

a investigar la microbiota de los intestinos de las larvas, encontrando a la bacteria *Exiguobacterium* sp. la cual fue capaz de formar una biopelícula en la superficie de poliestireno, formando grietas después de una incubación de 28 días. Más adelante, Daviran (2017), alimentó por 8 días, larvas de *T. molitor* obteniendo al final del experimento un consumo de EPS de 0,1460g, además midió la producción de excretas, las cuales consideró abono y la variación de la biomasa de las larvas. Por otra parte, Cardozo (2019) realizó su investigación con este mismo organismo, seleccionaron larvas de 14 a 20 mm en 4 tratamientos para cada uno de ellos dispuso de 500 mg de poliestireno expandido, durante 6 meses. Como parámetro para cuantificar la biodegradación se tomó el peso del excremento de las larvas. Jiménez (2019), alimentó 40 larvas de *Galleria mellonella* con poliestireno expandido durante 168 horas, observó que estos organismos son capaces de consumir este material y de acuerdo al peso de sus excretas, el cual fue su parámetro para medir la degradación, estos organismos degradaron el 84,77 %. Concluyó que las larvas de *G. mellonella* son capaces de degradar poliestireno expandido a baja escala.

Con las aportaciones que brindó Zhang *et al.*, (2019), se pudo observar que los microorganismos presentes en el sistema digestivo del gusano de cera (*G. mellonella*) eran los responsables de degradar estos plásticos, aunque si bien Zhang *et al.* (2019) realizaron la prueba con polietileno, los trabajos de Jiménez (2019) quien probó a este mismo gusano para degradar poliestireno expandido, deja ver que los organismos presentes en la microbiota de estos son organismos capaces de degradar poliestireno al igual que el polietileno. Por otra parte, Cardozo (2020) probó la degradación de poliestireno expandido por acción de larvas de *Tenebrio molitor*, quien de acuerdo a sus resultados concluye que *T. molitor* es capaz de degradar poliestireno a baja escala. Así también se ha estudiado en la bacteria que *Pseudomonas* sp por Condori (2020), quien recolectó muestras bacterias de un depósito sanitario, aislaron los organismos y se inocularon con poliestireno durante 60 días, la degradación la midieron por porcentaje de peso perdido.

La biodegradación de poliestireno con hongos filamentosos poco se ha estudiado, pues solo se encuentran pocos trabajos al respecto. Lo que deja una oportunidad para conocer los diferentes prismas de este fenómeno y de las posibles soluciones que podrían aportar estos organismos.

6.1.6 Metodologías para el aislamiento de cepas

Las investigaciones enfocadas en la degradación de plásticos por microorganismos, parten de la obtención tanto del material plástico como de los organismos. De acuerdo a la literatura revisada, el método comúnmente utilizado por los investigadores es acudir a los tiraderos de basura, ya que estos ambientes están altamente contaminados por plásticos y los microorganismos se adaptaron a dichas condiciones para sobrevivir, así se observó en los trabajos de Méndez *et al.*, 2007; Uribe *et al.*, 2010; Kittur *et al.*, 2013; Deepika y Madhuri 2015; Ojha *et al.*, 2017; Serkhel *et al.*, 2019, estos investigadores acudieron al relleno sanitario de su comunidad para obtener muestras de plástico con signos de deterioro. De estas mismas muestras de plástico aislaron los organismos, pues era de suponer que la capacidad para hacer del plástico su fuente de carbono sería mayor. En otras investigaciones, se aislaron cepas de hongos del suelo o de la rizosfera de algunas plantas ya que el suelo es un ecosistema rico y diverso en el que se pueden encontrar amplia variedad de organismos. Por el contrario, otras investigaciones obtuvieron sus organismos de reservorios en donde ya se encontraban identificadas y preservadas las cepas.

Una vez obtenidas las muestras, los investigadores transportan los materiales al laboratorio, el método más utilizado para el aislamiento de hongos es por dilución seriada hasta obtener monocultivos, así como adicionarle al medio de cultivo un antibiótico como cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias, de lo contrario se realizan resiembras en medios de cultivo sólidos, los más comunes son; papa dextrosa agar, medio sabouraud, medio czapek y medio de sales minerales. Se procura vigilar el pH y la temperatura para observar el crecimiento de los hongos.

6.1.7 Metodologías para la evaluación de la degradación de plásticos

De acuerdo a los materiales plásticos empleados por los investigadores ha sido diseñado el método de evaluación de la degradación, siendo películas, perlas, polvo y pellets de plástico las utilizadas para su análisis. A continuación se enlistan las metodologías más actuales sobre esta área de investigación.

En 2010 Uribe *et al.*, aislaron microorganismos de materiales plásticos con signos de deterioro, provenientes de un relleno sanitario. Realizaron una preselección de organismos en medio de sales minerales adicionado con extracto de levadura y perlas de polietileno durante 45 días. Los organismos seleccionados fueron incubados con perlas de polietileno de baja densidad como única fuente de carbono durante 60 días en un medio de cultivo de sales minerales y sin extracto de levadura. Analizaron el pH a partir de dos cultivos, uno de 7 y otro de 5.5 a una temperatura ambiente de 20°C.

Velrajan y Niren, (2012) obtuvieron muestras de suelo de un depósito de basura, realizaron suspensiones e inocularon medio de cultivo de sales minerales.

Medio de sales minerales + hongo + tiras de polietileno sin tratar + glucosa.

Después realizaron subcultivos en los que eliminaron la glucosa y solo dejaron el PE como la única fuente de carbono, el hongo obtenido fue aislado en cajas Petri con PDA + cloranfenicol. Recortaron tiras de polietileno de alta densidad y polietileno de baja densidad. Emplearon tres pretratamientos para el plástico el primero consistió en someter al plástico a 100°C por 30 días para procurar la oxidación, en el segundo pretratamiento luz ultravioleta por 30 días y en el tercero usaron ácido nítrico. Después de aislar los hongos en PDA se utilizó para inocular el siguiente medio en movimiento por 6 meses.

Medio sales minerales + Hongo + tiras de Polietileno pretratadas.

Las muestras fueron medidas cada 2 meses. La identificación la realizaron por caracterización morfológica de las colonias y observación de los conidios.

Aspergillus niger fue probado para evaluar polietileno por Kittur *et al.* (2013). Primero colectaron muestras de plástico de un depósito de basura, realizaron pretratamientos a las muestras de plástico exponiéndolas a luz ultravioleta, ácido nítrico, tratamiento térmico y combinaciones. El experimento lo hicieron por fases para lo cual utilizaron 3 tipos de medio de cultivo a los que les modificaron la fuente de carbono, estos medios fueron utilizados gradualmente a medida que avanzaba el experimento. Analizaron la degradación por la pérdida de peso y por análisis de espectroscopia infrarroja transformada de Fourier.

En México en el 2013, una estudiante de la Facultad Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM colectó de un relleno sanitario bolsas de PEBD, al llevarlas a laboratorio lavó y retiró los compuestos ajenos a la biopelícula de plástico, después por raspadura aisló los organismos para inocular medio de cultivo a un pH de 5 para hongos y a pH de 7 para bacterias. Hizo una preselección en medio de sales minerales, con 0.20% extracto de levadura y 4 g de perlas de PEBD por 45 días. Posteriormente inoculó con 5 ml de la solución anterior medio sin extracto de levadura y PEBD como única fuente de carbono por 60 días.

Sánchez *et al.*, (2015), obtuvieron sus organismos de muestras de suelo. Realizaron un medio de sales minerales, a este le añadieron 1 g de suelo y 1 ml de di(2-etilhexilftalato) (DEHF) fue incubado en matraces Erlenmeyer a 25°C y 200 rpm por 29 días.

Por su parte Deepika y Madhuri (2015), tomaron de muestras de suelo obtenidas de un depósito de basura, después por dilución seriada aislaron hongos, bacterias y actinomicetos y mantenidas en medio de cultivo agar Czapek para hongos y agar glicerol asparagina. Utilizaron polvo de polietileno de alta densidad y gránulos de polietileno de baja densidad. La prueba de la degradación se realizó en medio de sales minerales agregando gránulos de polietileno se inocularon con los diferentes organismos en un periodo de 4 a 8 semanas a un temperatura de 30 a 35°C.

El equipo de investigación encabezado por Nupur Ojha (2017), identificaron a *Penicillium oxalicum* y *Penicillium chrysogenum*. Dos especies de moho que

fueron colectadas del área más antigua del suelo de un depósito de basura. Realizaron tres tratamientos, uno con sacarosa como fuente de carbono, otro sin fuente carbono y un último con polietileno de alta densidad y polietileno de baja densidad como única fuente de carbono, incubaron durante 90 días los aislados de hongo. Analizaron diferentes variantes para evaluar la degradación del plástico, como el peso perdido del plástico, peso seco del micelio, análisis por Espectrometría transformada de Fourier, Microscopia Electrónica de Barrido y Microscopía de Fuerza Atómica.

Sangale *et al.*, (2019), tomaron muestras de suelo de la rizosfera de *Avicennia marina* de doce localidades diferentes de la costa oeste de la India y por el método de dilución seriada sembraron en medio Sabouraud las cepas para su preservación. Incubaron por 60 días y en continuo movimiento muestras de polietileno a pH de 7 y pH de 3.3.

Zhang *et al.*, (2019) estudios anteriores muestran que en la microbiota de algunos organismos como *Tenebrio molitor* son capaces de degradar plástico. En este estudio analizaron el contenido intestinal de larvas *Galleria mellonella*, para lo cual, seleccionaron organismos con similitudes morfológicas y las alimentaron durante 28 días.

Cuadro 14. Resumen de metodologías empleadas en investigaciones

Hongos evaluados en la degradación de plásticos						
Hongo	Plástico	Pre-tratamiento Del plástico	Pre-selección del hongo	Tiempo de exposición	Método de evaluación de la degradación	Autores
Consorcio microbiano <i>Pseudomonas</i> <i>sp. Penicillium</i> sp. <i>Rhodotorula</i> , <i>Hyalodendron</i> sp. y una levadura	PEBD	No	Si	60 días	FTIR % peso perdido	Uribe <i>et al.</i> , 2010
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	PUR	N/A	No	14 días	IR	Russell <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	PEBD	Si	Si	55 días	% peso perdido SEM FTIR	Cletus D., <i>et al.</i> , 2021
<i>Rhizopus arrhizus</i> y <i>Penicillium</i> sp	PE	Si	Si	6 meses	Cuantificación de biomasa % peso perdido	Mahalakshmi V. y Niren A., 2012

Cuadro 14. Continuación

Hongo	Plástico	Pre-tratamiento Del plástico	Pre-selección del hongo	Tiempo de exposición	Método de evaluación de la degradación	Autores
<i>Aspergillus niger</i>	PE de 40 micras	Si	No	30 días	FTIR	Kittur <i>et al.</i> 2013
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> <i>Aspergillus niger</i>	PEBD	Si	Si	126 días	FTIR Difracción de rayos X (DRX) SEM	Esmaeili <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Cladosporium sp.</i> <i>Gliocladium virens</i> <i>Penicillium sp</i>	PEBD	Plástico con signos de deterioro	Si	60 días	SEM	Gutiérrez, 2013
<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Arthrobacter sp</i>	Di(2-etilhexilftalato) DEHF	No	No	29 días	Por observación de crecimiento en el medio	Sánchez <i>et al.</i> 2015
<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i>	PEBD	No	Si	6 meses	% de peso perdido. Observación de cambios físicos en el plástico. Prueba de la zona clara.	Deepika y Madhuri, 2015

Cuadro 14. Continuación

Hongo	Plástico	Pre-tratamiento Del plástico	Pre-selección del hongo	Tiempo de exposición	Método de evaluación de la degradación	Autores
<i>Zalerion maritimum</i>	PE	No	Si	28 días	FTIR SEM Resonancia magnética nuclear (RMN)	Paco <i>et al.</i> , 2017
<i>Penicillium oxalicum</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>	PEAD	No	No	90 días	SEM AFM FTIR	Ojha <i>et al.</i> , 2017
No especifica	PET	No	No	20 días	% peso perdido Cuantificación de biomasa	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2018
<i>Aspergillus flavus</i>	PEAD	Si	No	14 días	% Peso perdido FTIR	Idowu <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus flavus</i>	PE	No	No	28 días	% Peso perdido FTIR	Zhang <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus sydowii</i>	PE de 20 micras	Si	Si	60 días	% Peso perdido % Resistencia a la tracción. SEM FTIR	Sangale <i>et al.</i> , 2019

Cuadro 14. Continuación

Hongo	Plástico	Pre-tratamiento del plástico	Pre-selección del hongo	Tiempo de exposición	Método de evaluación de la degradación	Autores
<i>Aspergillus</i> sp <i>Vibrio</i> sp	PET	No	No	6 semanas	% peso perdido FIRT SEM DRX	Sarkhel <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus flavus</i>	PE, PS PP	No	No	100 días	% peso perdido Crecimiento del hongo sobre diferentes medios de cultivo	Santacoloma <i>et al.</i> , 2019
<i>Aspergillus flavus</i>	PLA	No	No	7 meses	Análisis termogravimétrico (TGA) Calorimetría diferencial de barrido (CSC) Porcentaje de reducción de espesor cromatografía de exclusión molecular	Avargani, <i>et al.</i> , 2020

6.2 Fase experimental

Se realizó un ejercicio experimental de la degradación de poliestireno por diferentes mohos aislados, este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio integral de biología vegetal y micología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

6.2.1 Aislamiento de hongos

Para la obtención de cepas de hongos se procedió a tomar muestras de distintos medios (suelo, superficies, medios de cultivo contaminados), basados en una metodología específica para cada cepa, según lo reportado en investigaciones anteriores.

Cuadro 15. Obtención de muestras para el aislamiento de hongos

Número de muestra	Origen	Método de aislamiento
1, 3, 6, 7, 12	Suelo	El muestreo se realizó en un lote baldío (ya que los terrenos baldíos se caracterizan por ser tiraderos de desechos, como rastrojo y basura plástica) del sur de la ciudad de Puebla a través de muestreos al azar estratificado en el mes abril de 2019. Se empleó un tubo de metal con diámetro de una pulgada, éste se enterró en el suelo a 15 cm de profundidad, al extraerlo inmediatamente se raspó la parte inferior con una varilla de metal para depositar aproximadamente 10 gr de muestra de tierra dentro de bolsas plásticas de primer uso, este procedimiento se realizó de la misma manera para obtener 20 muestras de suelo (Figura 14). Todas las muestras

		de suelo se sometieron al método de dilución seriada, bajo condiciones de asepsia, de cada muestra de suelo se tomó 1 g. y se diluyó hasta 10^{-3} . Posteriormente se vertió 100 μ l en cajas Petri con medio PDA y con una u de vidrio estéril se expandió la muestra por el medio (Méndez <i>et al.</i> , 2007; Uribe <i>et al.</i> , 2010; Esmaili <i>et al.</i> , 2013, Gutiérrez, 2013; Sanchez <i>et al.</i> , 2015; Deepika y Madhuri, 2015).
2	Hortaliza enferma con signos de marchitez	Se aisló de las hojas de una hortaliza enferma, enjuagando la hoja en alcohol después se sembró en medio PDA y se realizaron resiembras para evitar contaminaciones (Russell <i>et al.</i> , 2011; Duarte <i>et al.</i> , 2016).
4, 9, 11	Contaminaciones en otros medios de cultivo.	Se presentan como contaminaciones en otros medios de cultivo de cepas del laboratorio. Se tomó una muestra de los mohos y se realizaron resiembras para obtener únicamente cultivos puros.
8 y 10	Se aislaron hongos de la superficie de una botella de Polietileno.	Se frotó la superficie de la botella con un hisopo estéril humedecido con agua destilada estéril, la muestra se introdujo en un tubo de ensayo con agua destilada estéril a partir de este tubo se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} y se sembraron 100 μ l de muestra en medio PDA (Ojha <i>et al.</i> , 2017)



Figura 13. Toma de muestras de suelo para el aislamiento de hongos.

Una vez obtenidas las muestras de hongos se realizaron resiembras continuas en medio PDA para observar el crecimiento y desarrollo de los hongos (Guevara, 2010).

6.2.2 Preparación de los plásticos

Por su popularidad y uso en la sociedad se seleccionó poliestireno de tipo cristal y poliestireno tipo expandido para ser sometidos a prueba. A partir de una charola de poliestireno expandido de primer uso, se cortaron pequeños trozos de 0.5 cm de ancho por 0.8 cm de largo. De la misma manera se procedió con un vaso de poliestireno cristal de primer uso. Para ambos materiales se registró el peso seco inicial de cada trozo de plástico empleando una balanza analítica digital (OHAUS, Explorer pro). Para poder identificar cada muestra durante el periodo de prueba, se marcaron con perforaciones según el tiempo de incubación al que fueron sometidas (Figura 14).

Antes de ser introducidas en el medio de cultivo, las muestras de poliestireno se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 6.35 % durante 60 minutos, después se enjuagaron con agua destilada estéril y se retiró el exceso de agua con gasa estéril sin frotar, posteriormente se introdujeron dentro de un tubo de ensayo con medio de cultivo (Méndez 2007; Gutiérrez, 2013, Ojha *et al.*, 2017).

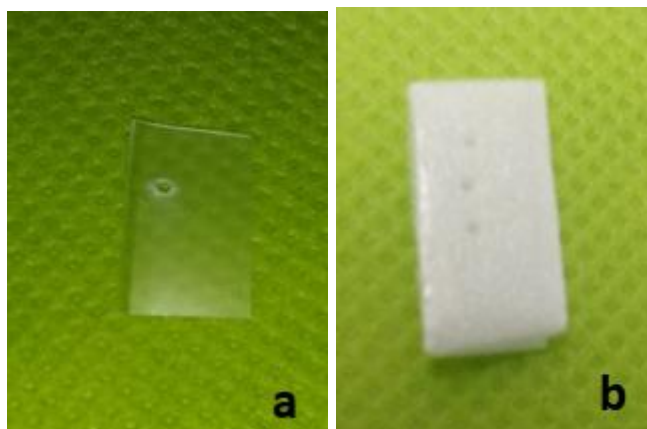


Figura 14. Muestras de poliestireno perforadas, a) PS tipo cristal b) PS tipo expandido marcadas con uno, dos o tres orificios de acuerdo al periodo de incubación al que fueron sometidas.

6.2.3 Medio de cultivo

Para la obtención y el mantenimiento de las muestras de hongos se utilizó medio PDA. Mientras que para la fase de experimentación, se preparó un medio de cultivo Czapek en caldo sin fuente de carbono, siendo este medio de cultivo uno de los más utilizados por distintos investigadores (Ojha *et al.*, 2017) la composición de este medio se puede observar en el cuadro 16. El pH final fue de 2.35 para lo cual se utilizó el medidor de pH marca HANNA-Combo. El caldo se vertió en tubos de ensayo y se esterilizaron a 120 ° C, por 15 minutos en autoclave.

Una vez frío el medio se depositó tres muestras de poliestireno expandido correspondientes a tres periodos de tiempo a evaluar por tubo de ensayo y se inoculó cada tubo con una muestra de hongo (Figura 15). El mismo procedimiento se realizó para las muestras de poliestireno tipo cristal. Por cada hongo se realizó una repetición y se hizo un control el cual consistió en sembrar cada hongo en un tubo de ensayo con el medio de cultivo preparado sin fuente de carbono y sin plástico, este control nos permitió evaluar si hay crecimiento y desarrollo del hongo en un medio sin fuente de carbono.

Los objetos de estudio permanecieron a temperatura ambiente (20° a 25 °C) en condiciones estáticas. Transcurridos 15 días se hizo la primera medición del peso

seco del plástico, para lo cual se retiró un trozo de poliestireno de cada tubo, en condiciones de asepsia, lo mismo se realizó en los tubos control. Antes de pesar, se lavaron las muestras de plástico para retirar lo más posible, sustancias orgánicas que pudiera quedar adheridas al plástico. Se sumergieron en solución detergente y se agitaron por 5 minutos, después se pasó cada muestra en hipoclorito de sodio al 6.4 %, permaneciendo 10 minutos, posteriormente se enjuagaron en agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas.

6.2.4 Evaluación de la degradación de plásticos

Se obtuvo la diferencia de peso de los materiales plásticos antes y después de ser incubados con hongos para analizar la pérdida de peso. Así como un análisis por observación de los efectos generados en los materiales por los hongos, además de un análisis cualitativo del crecimiento de los hongos en un medio de cultivo con poliestireno como única fuente de carbono.

Cuadro 16. Composición de medio Czapek descartando la fuente de carbono (sacarosa)

Composición requerida para un litro de liquido	
Nitrato Sódico	2.00 g
Cloruro de Potasio	0.50 g
Sulfato de Magnesio	0.50 g
Sulfato ferroso	0.01 g
Fosfato dipotásico	1.00 g

Fuente: <https://www.medioscultivo.com/czapek-dox-agar/>



Figura 15. *Tubos inoculados con el moho y poliestireno*

6.2.5 Análisis por SEM

Las muestras se procesaron en un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6610LV (Figura 16b) con versión de bajo vacío en las instalaciones de la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento de la BUAP. Este material fue difícil de observar en este instrumento, por lo que tuvieron que ser recubiertas con una delgada lámina de oro, para lo cual se empleó un equipo de recubrimiento modelo DENTON VACUUM (Figura 16a) para permitir el flujo de electrones y así poder observar mejor la superficie de los plásticos. Las muestras se observaron antes y después de ser incubadas con los hongos para comparar el efecto de degradación.

6.2.6 Identificación de hongos

Se realizó caracterización por observación de las cepas en placa y microcultivo de únicamente aquellas cepas que presentaron los mayores porcentajes de degradación para ambos tipos de plástico, posteriormente se observaron al microscopio para identificar las estructuras reproductivas con el apoyo de literatura (Arias y Piñeros, 2008; Guevara, 2010).

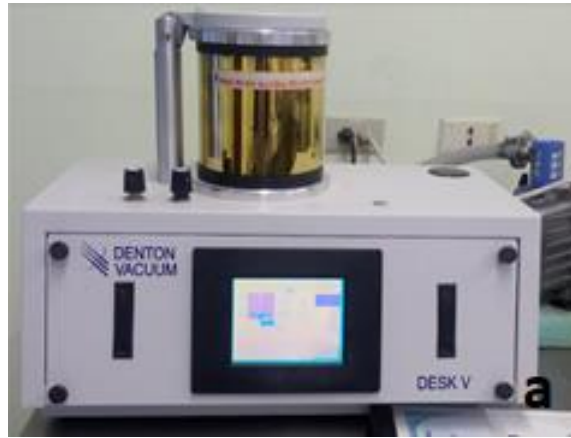


Figura 16. Equipos de observación y preparación de muestras para análisis SEM a) Equipo de recubrimiento de muestras no conductoras, b) Microscopio electrónico de barrido.

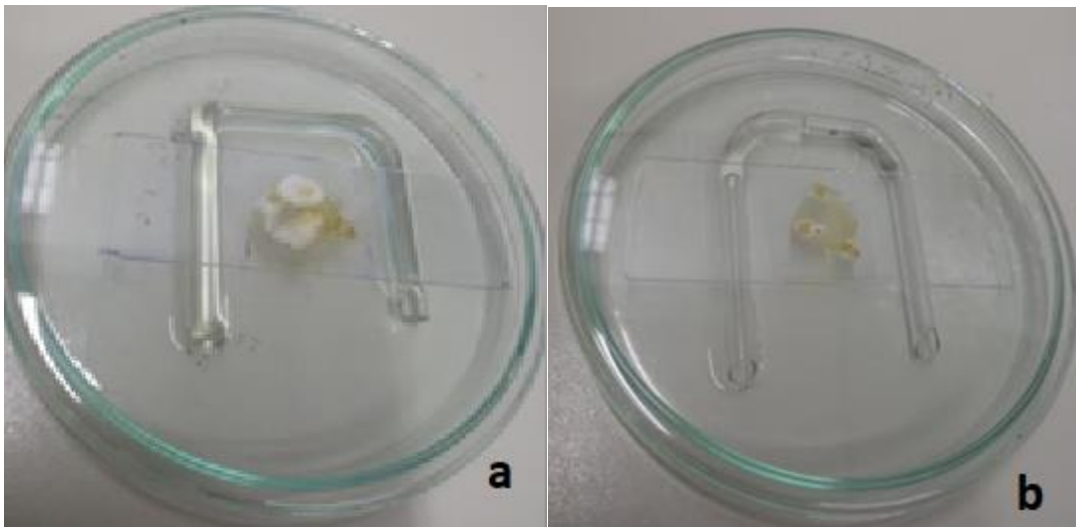


Figura 17. Micro cultivo de las cepas con mayor porcentaje de degradación. a) Cepa 1, b) cepa 9

VII. Resultados

La evaluación de la degradación de los plásticos a causa de los hongos, se analizó a partir del porcentaje de degradación, el tiempo de exposición, el crecimiento micelial en el medio y los cambios físicos observables en las muestras de poliestireno.

7.1 Cepas aisladas

De los muestreos realizados se obtuvieron 12 cepas, de las cuales cinco de ellas provenían de muestras de suelo, dos de la superficie de una botella de plástico, una de la rizósfera de hortalizas y tres de cepas contaminadas del laboratorio (Figura 18).

7.2 Porcentaje de degradación

Para este análisis se seleccionaron las cepas que provocaron reducción de peso, ya que se pudo observar que en la mayoría de los plásticos el peso aumentó y otras cuantas el peso se mantuvo sin cambios.

El porcentaje de degradación se obtuvo por la siguiente formula:

$$((P_i - P_f / P_i)100$$

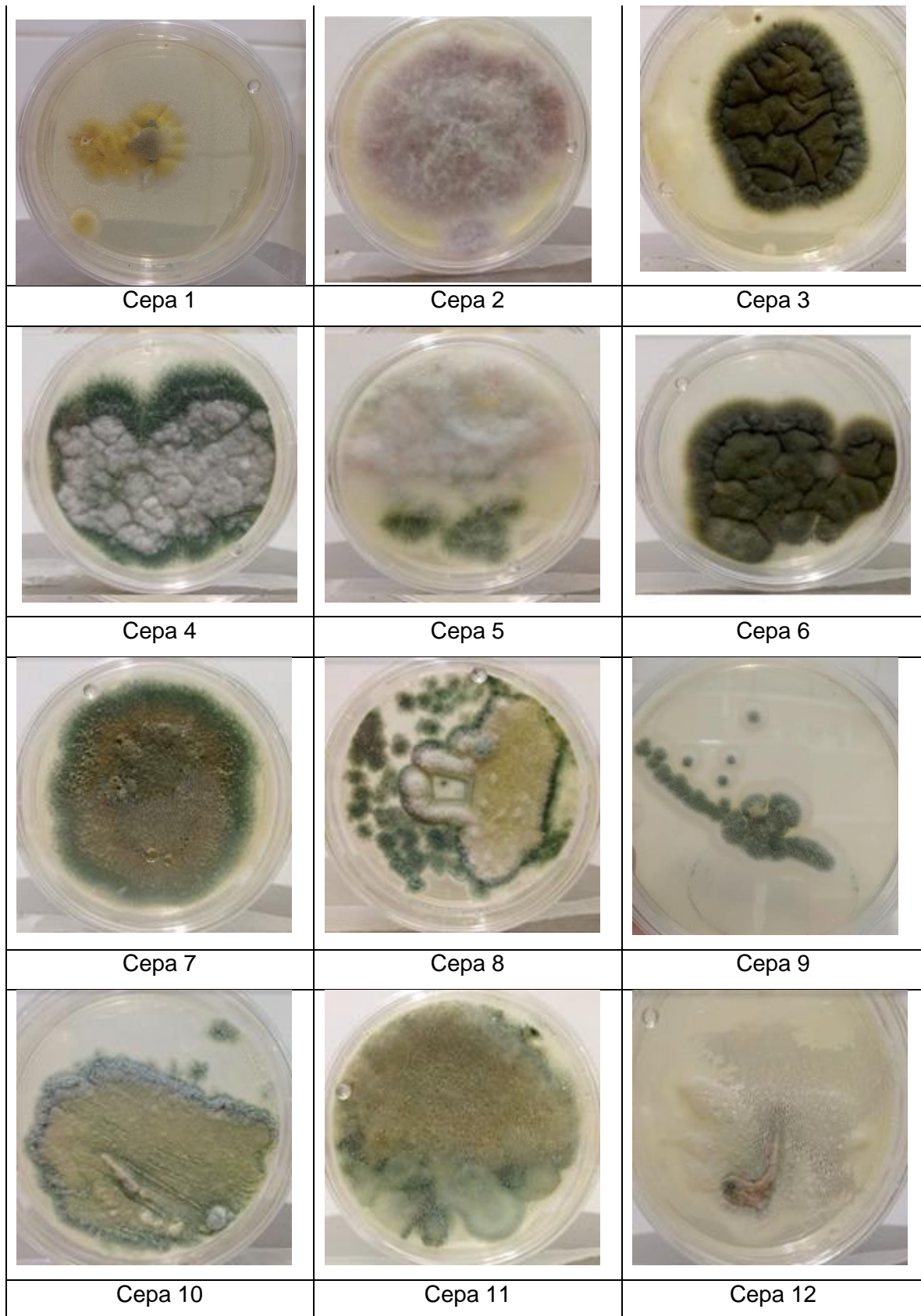
Donde:

P_i es el peso inicial de los plásticos

P_f es el peso final de los plásticos

Las cepas que reportaron degradación fueron para PSE la cepa 1, 3, 6, 7, 11 12. En cuanto a PSC las cepas fueron 3, 5, 6, 9, 10, 11 y 12. Los porcentajes de degradación fueron desde 0.5% hasta la máxima de 36%. Para PSE, la cepa que generó mayor porcentaje de degradación fue la cepa 1 a los 15 días de exposición con un 21%, seguida de la cepa 11 con 20.3% a los 45 días. Mientras que para PSC el porcentaje más alto fue de 36.24% a los 30 días por la cepa 9, misma que reportó el segundo valor más alto a los 15 días con 32.7% pero no así a los 45 días.

Figura 18. Cepas de mohos aisladas en laboratorio puestas a prueba para la degradación de PS



7.2.2. Tiempo de degradación

Las muestras de poliestireno se incubaron junto con las cepas durante 15, 30 y 45 días, se analizó si existe alguna relación entre el tiempo de incubación y el porcentaje de degradación.

A los 15 días de incubación

En PSE solo las cepas 1 y 12 presentaron cierta degradación, siendo la cepa 1 con 21% y la cepa 12 con apenas el 1.8%. Por su parte en el PSC fueron 5 cepas las que presentaron degradación, en donde la cepa 3 tuvo un 2.9 %, la cepa 6 14.14%, y la cepa 9 con 32.7 % siendo este el valor más alto para ambos tipos de plástico (Figura 19).

A los 30 días de incubación

En PSE cuatro cepas presentaron cierto porcentaje de degradación, la cepa 1 descendió a un 16%, la cepa 6 con 16.6%, la cepa 7 con 6.7% y la cepa 12 con 6.8%. Mientras que en PSC 5 cepas presentaron degradación, la cepa 2 con 0.8%, la cepa 6 con 10.93%, la cepa 9 con 36.43% siendo este el valor más alto, y las cepas 10, 11 y 12 menores al 1% (Figura 20).

A los 45 días de incubación

En el último periodo de prueba surgieron más cepas que degradan parcialmente el plástico en PSE, se presentó la cepa 1 con 11%, la cepa 3 con 6.9%, cepa 6 con 6.8%, la cepa 7 con 6.8%, la cepa 11 presentó el porcentaje más alto con 20.3% y la cepa 12 con 14.3%. En las muestras de PSC a los 45 días fueron únicamente 3 cepas, la cepa 5 con apenas 0.84%, la cepa 6 con 9.17% y finalmente la cepa 9 con 11.52% (Figura 21).

Debido a los diferentes resultados obtenidos para cada tipo de plástico, se procedió a comparar la cantidad de cepas que redujeron peso en los plásticos en función del tiempo (Figura 22).

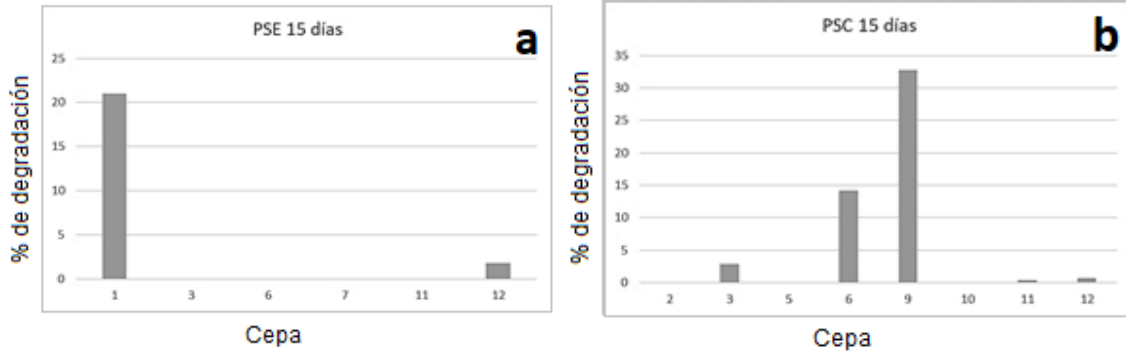


Figura 19. Porcentaje de degradación a los 15 días. a) PSE, b) PSC

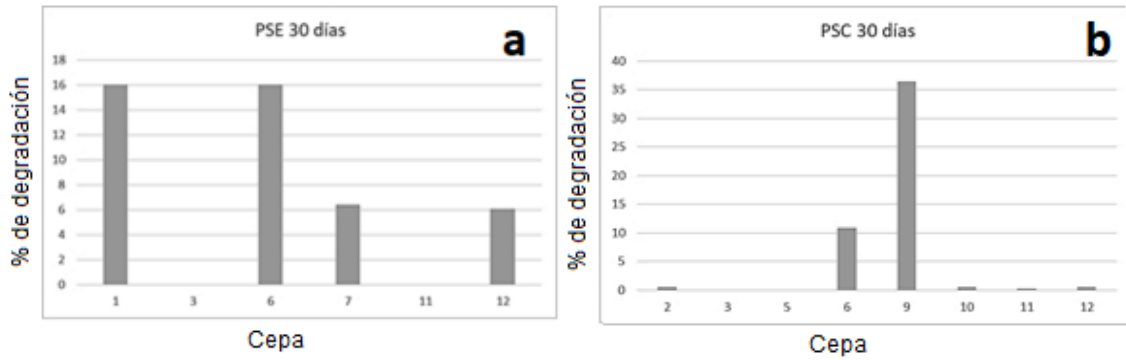


Figura 20. Porcentaje de degradación a los 30 días. a) PSE, b) PSC

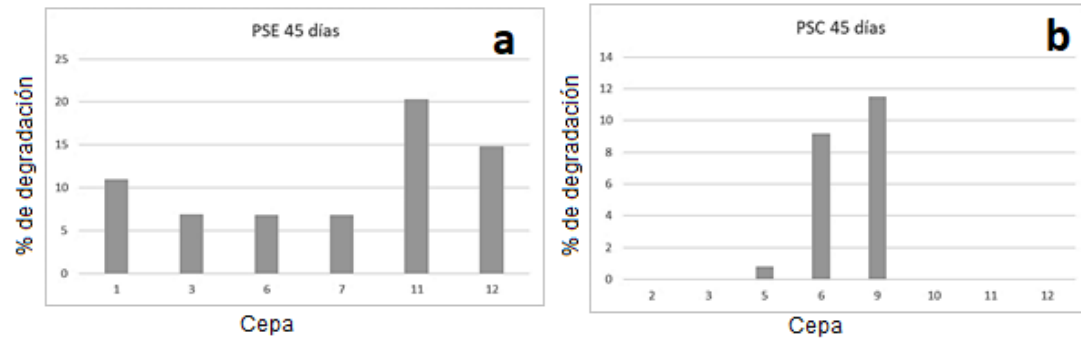


Figura 21. Porcentaje de degradación a los 45 días. a) PSE, b) PSC



Figura 22 Frecuencia de cepas que degradaron PSE durante los tres periodos de tiempo.

En los resultados obtenidos con los plásticos de PSE, se pudo observar que con el paso de los días, aumentaba el número de cepas que presentaron degradación del PSE. Contrario a lo que sucedió con las muestras de PSC, ya que al inicio de la prueba habían más cepas que degradan plástico que al final, pues el número de cepas redujo de 5 a 3 (Figura 23).

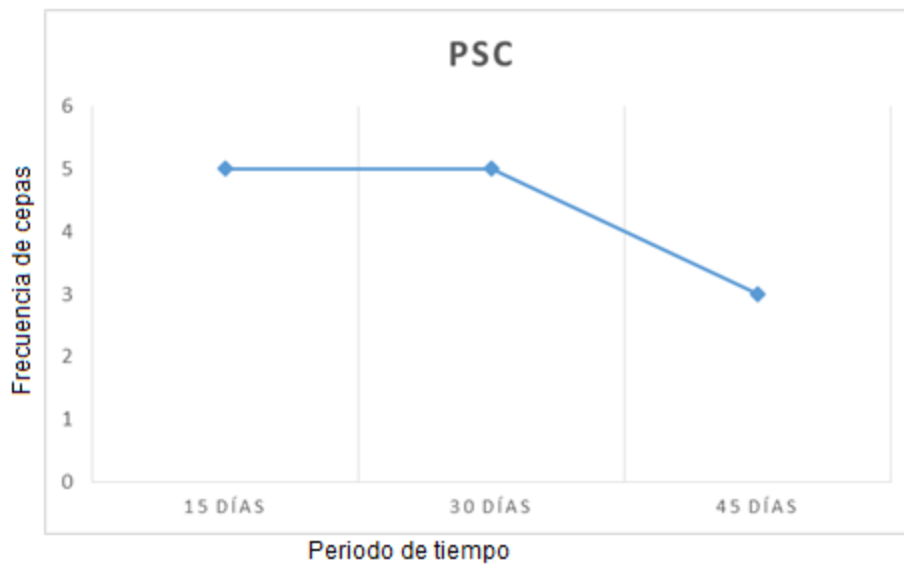


Figura 23. Frecuencia de cepas que degradaron PSC durante los tres periodos de tiempo.

7.2.3. Efectos visibles de la degradación

Se observó crecimiento de hongos en la superficie de algunas muestras de poliestireno expandido (Figura 24). De todas las muestras de plástico expuestas a los hongos, se seleccionaron aquellas que mayor porcentaje de degradación presentaron y se observaron los efectos a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) los efectos que generó el hongo sobre la superficie del material (Figuras 25 a la 31).



Figura 24. Poliestireno expandido con crecimiento de hongo en la superficie. El crecimiento de los hongos se localizó en las orillas del material, donde la superficie es más porosa.

A continuación se presentan micrografías de poliestireno expandido y poliestireno cristal que mayor porcentaje de degradación reportaron. En las imágenes se ofrecen diferentes acercamientos de la superficie de los materiales, se hizo una comparación de muestras de poliestireno sin exposición a los hongos y las muestras que fueron sometidas a experimentación, en ellas se puede apreciar ligeros cambios, como la aparición de relieves y pérdida de uniformidad en la superficie.

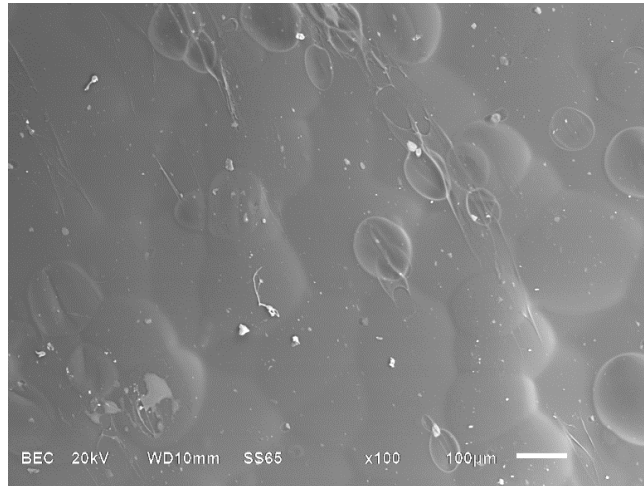


Figura 25. Poliestireno expandido sin exposición al hongo, visto a 100X por SEM.

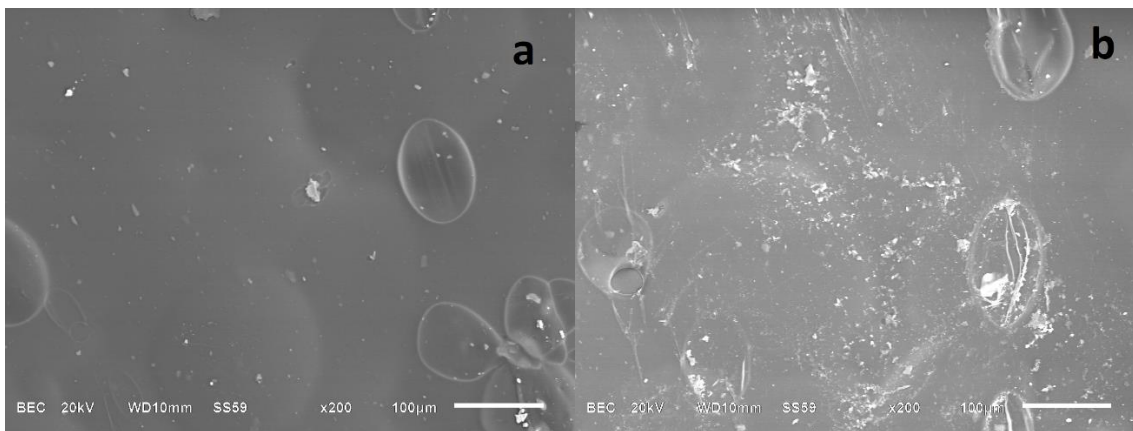


Figura 26. PSE visto a 200X por SEM. a) PSE sin incubación, b) PSE incubada a los 15 días, muestra relieves y rasgos de erosión y desgaste de la superficie.

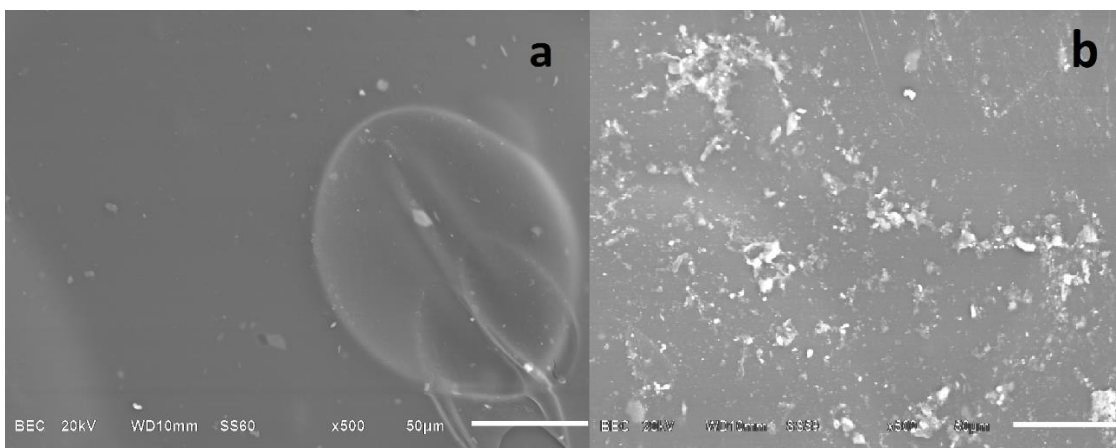


Figura 27. PSE visto a 500 X por SEM. a) PSE sin incubación, b) PSE incubada a los 15 días, muestra relieves y rasgos de erosión y desgaste de la superficie.

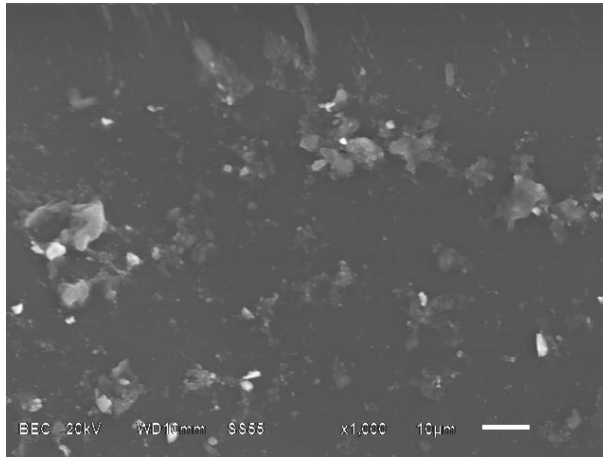


Figura 28. PSE visto a 1000X por SEM

Por su parte el poliestireno cristal presentó efectos menos visibles a este tipo de análisis ya que se observaron ligeros cambios en la superficie del material.

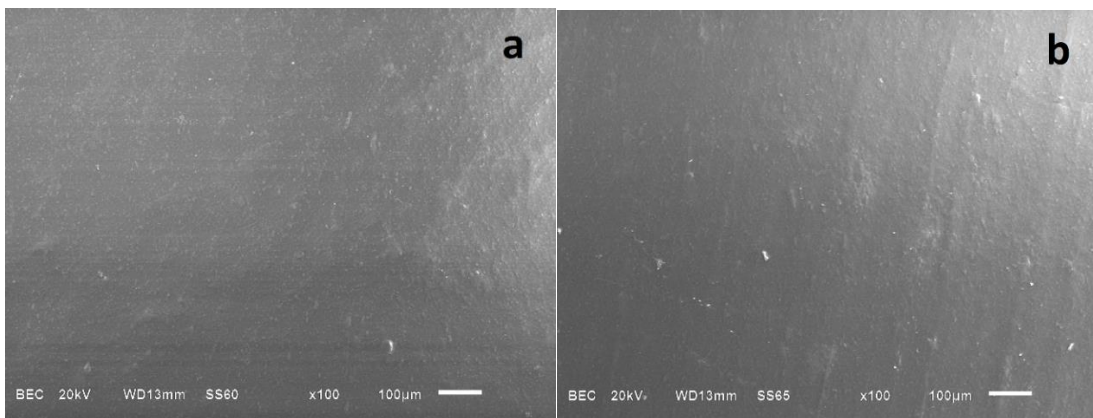


Figura 29. PSC visto a 100X por SEM. a) PSC sin incubación, b) PSC a los 30 días de ser incubada con la cepa 9.

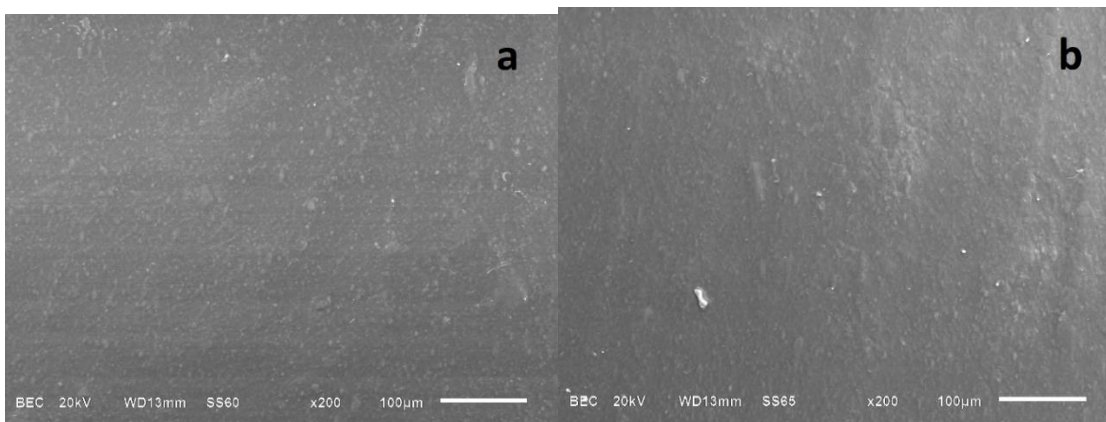


Figura 30. PSC visto a 200X por SEM a) PSC sin incubación, b) PSC a los 30 días de ser incubada con la cepa 9

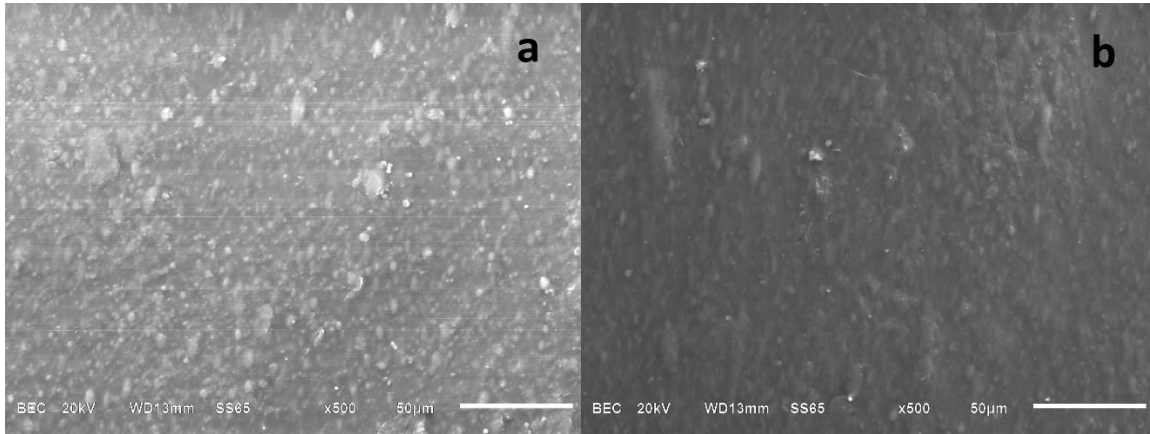


Figura 31. PSC visto a 500X por SEM, a) PSC sin incubación, b) PSC a los 30 días de ser incubada con la cepa 9

7.2.4. Crecimiento de las cepas en medio con poliestireno como única fuente de carbono

Todas las cepas aisladas presentaron crecimiento del micelio en el medio a pesar de no reportar reducción de peso en las muestras de plástico al final de la incubación (Figura 32). Este crecimiento se dio en diferente medida, por lo que se realizaron categorías para describir su desarrollo.



Figura 32. Crecimiento de micelio en el medio líquido Czapek con PS como fuente de carbono.

Cuadro 17. Crecimiento de las cepas en el medio con PS como única fuente de carbono, en donde se señalan las categorías con los siguientes símbolos: **no creció -**, **creció +**, **creció mucho ++**.

PSE		PSC	
Cepa 1	++	Cepa 1	+
Cepa 2	++	Cepa 2	+
Cepa 3	+	Cepa 3	++
Cepa 4	+	Cepa 4	+
Cepa 5	++	Cepa 5	+
Cepa 6	++	Cepa 6	+
Cepa 7	++	Cepa 7	+
Cepa 8	+	Cepa 8	+
Cepa 9	++	Cepa 9	++
Cepa 10	+	Cepa 10	+
Cepa 11	++	Cepa 11	+
Cepa 12	++	Cepa 12	+

7.3. Identificación de hongos con potencial para degradar plásticos

A partir del porcentaje de degradación, se determinó al hongo que presentó mayor capacidad para degradar plástico. En el caso de poliestireno expandido (PSE) la cepa 1 (Figura 33) a los 15 días presentó un porcentaje de degradación del 21 %, siendo éste el valor más alto para este tipo de plástico. Por su parte, para PSC la cepa 9 (Figura 34) a los 30 días de incubación fue quien presentó mayor porcentaje de degradación con 36.42%

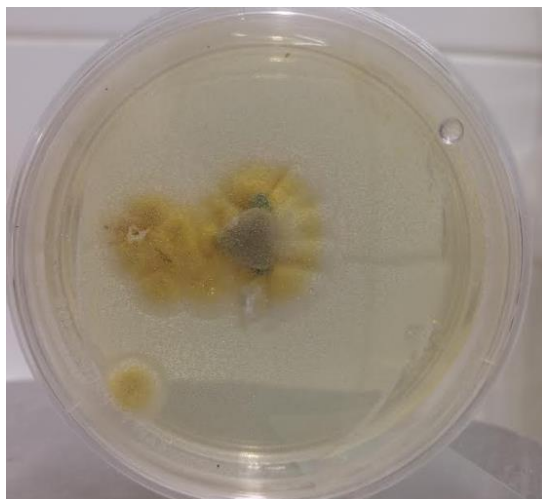


Figura 33. Cepa 1, con capacidad para degradar PSE.



Figura 34. Cepa 9, con capacidad para degradar de PSC

A partir de la realización de micro cultivo se pudo observar al microscopio las estructuras reproductivas de las cepas 1 y 9. Para caracterizar dichas estructuras, se consultó bibliografía relacionada a la identificación de hongos filamentosos (Arias y Piñeros 2008; Camacho *et al.*, 2009; Guevara 2010; Andino y Castillo, 2010)

7.3.1 Caracterización macroscópica

Cepa 1: Se aisló de muestras de suelo, posteriormente fue sembrada en medio papa dextrosa agar. Se observó rápido crecimiento, la coloración del micelio en un inicio era color blanco y rápidamente surgieron tonos amarillos y verde tenue, de textura aterciopelada y aplanada, tiene crecimiento radial y se observan ligeramente anillos en color verde, presenta pliegues y tiene bordes definidos, al reverso de la placa la cepa tiene una apariencia cremosa.

Cepa 9: La muestra de la cepa 9 fue aislada de medios de cultivo contaminados presentes en el laboratorio, fue sembrada en medio papa dextrosa agar. Las características morfológicas nos permiten observar crecimiento rápido y disperso, textura ligeramente algodonosa y relieves poco elevados, de color verde olivo oscuro.

7.3.2 Caracterización microscópica

A través de la técnica de microcultivo se observaron las estructuras reproductivas de cada cepa. En la cepa 1 (Figura 35 y 36) se observaron hifas hialinas y con septos, se observaron conidióforos en forma de pinceles, las hifas se ramifican y de los cuales surgen varios conidióforos (Guevara 2010; Andino y Castillo, 2010). Por su parte, en la cepa 9 (Figura 37 y 38) se observaron estructuras semejantes a un pincel que se ramificaba, debido a que a ser varias ramificaciones a estas estructuras se les denomina poliverticiliada. Las paredes tanto de las hifas como de las fialides son lisa. La forma de las fialides es cilíndrica, en la punta se observaron cadenas de conidios esféricos. Todas las estructuras observadas son hialinas (Arias y Piñeros 2008).

De acuerdo a las características observables de ambas cepas, se asignó el género *Aspergillus* sp a la cepa 1, mientras que el género *Penicillium* sp para la cepa 9. (Camacho *et al.*, 2009; Guevara 2010)



Figura 35. Cepa 1 vista al microscopio electrónico 10X

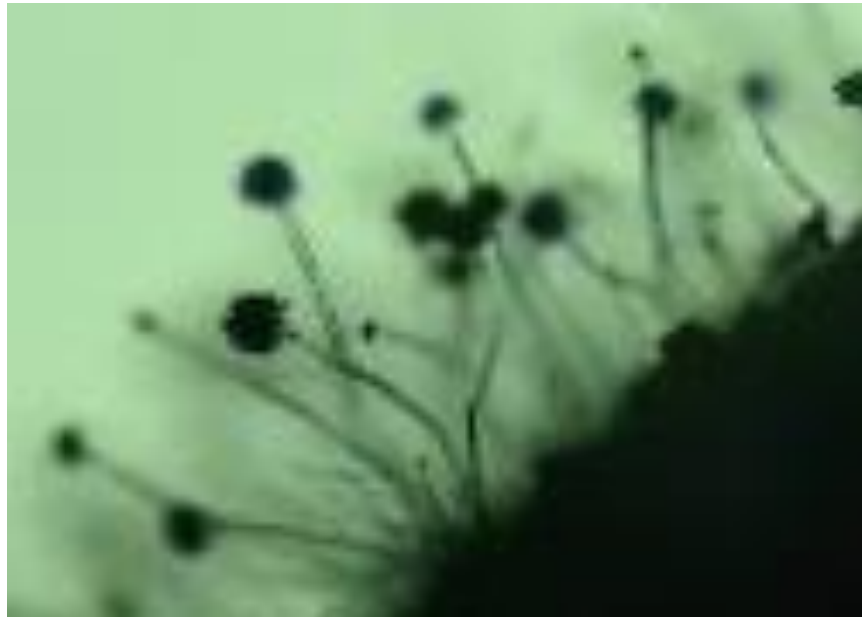


Figura 36. Cepa 1 vista al microscopio electrónico 40X



Figura 37. Ceba 9 vista al microscopio 4X



Figura 38. Ceba 9 vista al microscopio 10X

7.7 Resultados obtenidos en diversos estudios

Uribe *et al* 2010. Observaron el desarrollo y crecimiento de micelio sobre la superficie de las perlas de PEBD. Con el análisis FTIR se evidenció una reducción del 83,89% de la fuente de carbono correspondiente al grupo funcional C-O para pH 7,0 y de la misma forma para C=C con un índice de reducción de 19,77% a pH 5,5. Las perlas de plástico presentaron una reducción de 5,4% del peso total de polietileno bajo la acción del consorcio conformado solo por bacterias a un pH de 7, mientras que para el medio con pH de 5.5 el porcentaje de peso perdido fue de 4,8%.

Ojha *et al.*, 2017. Al final del experimento la cepa NS4 (*Penicillium oxalicum*) provocó reducción del peso en polietileno de baja densidad de 36.60% y en polietileno de alta densidad de 55.34%. Mientras que la cepa NS10 (*Penicillium chrysogenum*) redujo hasta un 34.35% el peso del polietileno de baja densidad, en cuanto al polietileno de alta densidad fue de 58.59% en condiciones estáticas. Las pruebas de microscopia permitieron observar fisuras y grietas en la superficie del plástico en los diferentes periodos de prueba.

Sangale *et al.*, 2019, obtuvieron 109 aislados de los muestreos realizados, de los cuales, identificaron a *Aspergillus terreus* y *Aspergillus sydowii* como los mayores degradadores de polietileno. En el medio de cultivo a un pH de 3.5 la cepa BAYF6 tuvo una reducción de peso del 23.31%, en el medio de cultivo a pH de 7 la cepa ERNF1 presentó 37.94%. Por otra parte el porcentaje de resistencia a la tensión también se vio afectado con una reducción de 94.44% por la cepa PNPf15 a un pH de 3.5, mientras que a un pH de 7 el porcentaje fue de 76.04% por la cepa VASF1. Cletus *et al*, 2021, después de haber transcurrido 55 días de incubación de *Aspergillus niger* con polietileno de baja densidad como única fuente de carbono, obtuvieron un porcentaje de peso perdido del 26.15% siendo este el valor más alto adquirido. En su análisis por SEM se pudieron apreciar en la superficie del material rasgos de erosión, plegamiento y picaduras. Mientras que por análisis FTIR se evidenció una clara disminución de los picos lo que indica signos de degradación del material.

VIII. Discusión

La obtención y aislamiento de estos organismos no representa mayor dificultad debido a sus cualidades biológicas que les permite adaptarse a diversos ambientes y a la dispersión de esporas que en condiciones favorables germinan y desarrollan hifas. El suelo es uno de los ecosistemas preferidos por los investigadores para la obtención de hongos degradadores de plástico (Méndez *et al.*, 2007; Arias y Piñeros, 2008; Sánchez *et al.* 2015; Velrajan M., Niren A., 2012; Pescador 2013, Kittur *et al.*, 2013; Deepika *et al.*, 2015; Ojha *et al.*, 2017). En el suelo abundan microorganismos encargados de degradar materia orgánica, y dadas las condiciones ambientales actuales por causa de la contaminación, se evalúa esta relación ecológica entre basura plástica y microorganismos. Algunos investigadores optaron por obtener sus organismos de ambientes perturbados por plástico, esto con la idea de que éstos organismos tendrían más desarrollada dicha capacidad (Velrajan M., Niren A., 2012; Pescador 2013, Kittur *et al.*, 2013; Deepika y Madhuri, 2015; Ojha *et al.*, 2017), sin embargo, otros trabajos utilizaron hongos y bacterias provenientes del cepario un laboratorio (Paco *et al.*, 2017; Sarkhel *et al.*, 2019) incluso de la rizosfera de algunas plantas (Sangale M., *et al.*, 2019) o del contenido intestinal de invertebrados (Zhang *et al.*, 2019). Sin importar la proveniencia de los organismos, éstos han demostrado que poseen rápida adaptación al ambiente donde se encuentren. En este trabajo, las cepas obtenidas se aislaron de superficies inertes, de suelo, y de las contaminaciones de otros medios, en todos los casos, las cepas presentaron crecimiento en el medio de cultivo con plástico como única fuente de carbono.

Por otra parte, al igual que en los trabajos analizados se utilizó el porcentaje de peso perdido de los plásticos, antes y después de la incubación, como indicador de la degradación de los materiales. El valor más alto para PSC fue de 21% a los 15 días y 36.4 % a los 30 días para PSC. Estos valores son similares a los obtenidos por Cletus *et al.*, en 2021 con un 26.15 % de degradación a los 55 días en polietileno de baja densidad por un consorcio de hongos pertenecientes al género *Aspergillus*. De igual manera, Sarkhel *et al.*, en 2019 utilizaron cepas de

Aspergillus sp, las cuales lograron degradar 22% de PET en 42 días. Por su parte, Esmaeili *et al.*, en 2013 obtuvieron a los 126 días una degradación de 29.5% en polietileno de baja densidad. Así también, Deepika *et al.*, en 2015 al evaluar la degradación de polietileno de baja densidad obtuvieron después de 6 meses una degradación del 26.17%. Sin embargo, el grupo de investigadores encabezados por Ojha *et al.*, en 2017 han sido quienes en esta revisión obtuvieron los porcentajes más altos, con un 58.59% a los 90 días en la degradación de polietileno de alta densidad por *Penicillium chrysogenum* y un 55.34% a los 90 días en polietileno de alta densidad por *Penicillium oxalicum*. No se alcanza apreciar una relación entre el tiempo de incubación y el porcentaje de degradación en estas investigaciones realizadas, sin embargo, cabe destacar que las metodologías empleadas por los investigadores presentan ligeras variaciones que influyen en los resultados, es decir, variables como el medio de cultivo, el pH, temperatura, si el medio de cultivo estaba en movimiento o no, o si el plástico tuvo un pre tratamiento. A pesar de lo observado, en este trabajo se esperaba que a mayor tiempo de incubación, mayor fuera el porcentaje de degradación, pero los resultados fueron contrarios, es decir, los plásticos presentaron en la mayoría de los casos aumento de peso. Estos resultados coinciden con lo reportado por Cletus *et al.*, en 2021 y Sangale *et al.*, 2019 quienes a final de sus pruebas también reportaron aumento de peso.

Al principio y al final de cada periodo de incubación se pesaron las muestras de plástico para evaluar la degradación, sin embargo se observó que en la mayoría de los plásticos el peso aumentó y en algunos el peso se mantuvo igual a pesar de que la cepa presentó crecimiento. De acuerdo a lo que explicó Gutiérrez en 2013, los microorganismos se adhieren a la superficie del material para formar biopelículas con lo cual generan un ecosistema que les permite sobrevivir y obtener su alimento, por lo que su eliminación requiere más que solo agua. Debido a que en este trabajo se buscó observar el efecto de los hongos sobre el poliestireno, se evitó en lo posible realizar cualquier tipo de fricción que alterara la actividad de los hongos sobre el material. Por lo que a partir de la información propuesta por Gutiérrez en 2013, el aumento de peso que presentaron las

muestras plásticas se debe a la presencia de materia orgánica adherida al material. Si bien, estos efectos no fueron del todo observado por el análisis SEM, cabe destacar que la estructura porosa del poliestireno permitió a estos organismos se localizaran en las orillas del poliestireno más que en la superficie. El análisis por microscopia electrónica de barrido (SEM) es uno de los métodos más utilizados para la evaluación de la degradación de plásticos por microorganismos (Gutierrez, 2013; Esmaili *et al.*, 2013, Paco *et al.*, 2017; Ojha *et al.*, 2017; Sangale *et al.*, 2019), sin embargo, en este trabajo solo fue posible observar dichas alteraciones en poliestireno expandido, ya que en poliestireno cristal los efectos no fueron perceptibles.

En cuanto a la caracterización y clasificación de los hongos, se realizó de acuerdo a los métodos por observación de estructuras reproductivas, sin embargo, es de reconocer que estos métodos no son del todo confiables ya que constantemente sufren cambios y que es necesario emplear métodos moleculares para obtener mayor certidumbre de los resultados, si bien se menciona que la clasificación por observación que no pierde vigencia, es necesario que el observador tenga experiencia y conocimiento del campo. Sin embargo, los métodos por observación permiten identificar a los organismos a nivel de género, en este trabajo, se encontraron estructuras pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* los cuales han sido uno de los grupos de organismos más estudiados para la degradación de plásticos. Se encuentra el género *Aspergillus*, un grupo reconocido clínicamente como perjudicial para la salud tanto de humanos como de animales, por lo que deja ver otra perspectiva sobre la presencia de hongos en diversos ambientes ya que como lo sugiere Gkoutselis G., *et al.*, 2021, los microplásticos actúan como vectores de hongos altamente patógenos, lo que implica un riesgo para la salud de las personas, incluso más allá de la contaminación por plásticos.

IX. Conclusiones

Ante la problemática ambiental por causa de los plásticos, las investigaciones relacionadas a su eliminación han visto con buenos ojos la biodegradación como la opción más amigable con el ambiente. Se han usado para este fin diferentes organismos, desde polillas, coleópteros, larvas, gusanos, bacterias y desde luego hongos. Los hongos filamentosos son organismos de poca popularidad en la sociedad, pero de gran importancia dentro de un laboratorio, estos organismos se encuentran en una gran variedad de ambientes debido a la capacidad de adaptación y a su mecanismo para la obtención de nutrientes a través de la secreción de enzimas.

Este trabajo evaluó la degradación de poliestireno tipo cristal y tipo expandido por diferentes cepas que fueron aisladas y se identificaron aquellas que generaron mayor porcentaje de degradación. Los hongos evaluados demostraron capacidad para degradar plástico al hacer de estos materiales su fuente de carbono, los resultados muestran que prácticamente todos los hongos pueden realizarlo en diferente medida. Debido a la falta de uniformidad de los datos, no fue posible observar alguna relación entre el tiempo de incubación con el porcentaje de degradación. *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp fueron los géneros identificados como los causantes de mayor degradación para poliestireno expandido y poliestireno cristal respectivamente.

Si bien el poliestireno es un producto sintético y del cual algunos autores lo refieren como imputrescible, los resultados obtenidos en este trabajo dejan ver que si es posible degradarlo con métodos biológicos. En la revisión realizada se muestra continuamente la importancia de la aplicación de métodos biodegradables para la eliminación de estos materiales, sin embargo, hay que reconocer que estos son procesos lentos y que aún continúan en investigación, por lo que nos lleva a tomar acciones responsables. De acuerdo a la problemática que en prácticamente todos los trabajos de investigación se han planteado, se ha pretendido obtener de microorganismos la solución al mal manejo de plásticos, sin embargo, es de reconocer que hasta la fecha los resultados son en condiciones de laboratorio y

que se ha reconocido que es necesaria la recombinación genética para lograr mejores resultados y que estos sean aplicables en la industria, como lo hace ver Soriano en el 2020. Por lo tanto aunque es una medida plausible a largo plazo, la solución a la contaminación por plásticos debería ser no utilizarlos.

X. Literatura

1. Abarca M. L., (2000) Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial, Rev Iberoam Micol, 17.
2. Aguirre A. I., Ulloa M, Aguilar S. Cifuentes J. y Valenzuela R. (2014) Biodiversidad de hongos en México, Revista Mexicana de Biodiversidad.
3. Arena O. M. y Chiappa C. X. (2017) Bacterias y hongos con potencial biodegradador de hidrocarburos en diversos ambientes, Microbiología ambiental en México, p. 246-263.
4. Arias C. y Piñeros P. (2008) Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Paramos de la Guasca y Cruz Verde, Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
5. Arribas A. H. (2021) Microorganismos de la plastisfera y la biodegradación del plástico por la microbiota digestiva de diferentes insectos, Tesis de grado, Universidad de Salamanca, España.
6. Amundio P. W. (2018) Caracterización del poliestireno expandido residual a nivel global: una revisión de literatura, Universidad de Santander. DOI: 10.13140/RG.2.2.22356.71046.
7. Andino R. F. y Castillo R. J. (2010) Identificación de microorganismos en los alimentos, Universidad de Ingeniería, Estelí, Nicaragua.
8. Asociación Nacional de Poliestireno Expandido [ANAPE] (s.f) Proceso de fabricación de poliestireno expandible, Recuperado el 7 de noviembre de 2021 de <http://www.anape.es/index.php?accion=producto>
9. Betancourth M., Botero J. E. y Rivera S. P. (2004) Bio películas: una comunidad microscópica en desarrollo, Colombia Médica, 35 (3)
10. Bustamante P. B., (1994) La degradación de los plásticos, Revista universitaria Eafit, 94, p 67-86.
11. Burkert, F. M., Maugeri, F. y Rodrigues, M. (2004). Optimization of extracellular space lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresour. Technol*, 91, pp. 77-84.

12. Camacho, A., M. Giles, A. Ortégón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez. (2009) Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
13. Cappitelli F. y Sorlini C., (2008) Microorganisms attack synthetic polymers in items representing our cultural heritage, *Applied and environmental microbiology*, 74(3), p. 564–569.
14. Cardozo S. M. (2020), Biodegradación del poliestireno expandido por larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleóptera: Tenebrionidae), en condiciones de laboratorio, Tesis de licenciatura, UNAD. Bogotá, Colombia.
15. Castro O. D., Peña M. C. y Farrés A. (2010) Producción y características de cutinasas: Una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
16. Cazar M., Evaluación del grado de deterioro y el nivel de contaminación de los residuos plásticos de cubiertas de invernaderos provenientes de las florícolas del Distrito Metropolitano de Quito, Escuela Politécnica Nacional Ladrón de Guevara, Ecuador Quito.
17. Cedeño D. J. y Merino C. J. (2020) Valoración *in vitro* de la biodegradación de polietileno de baja densidad mediante hongos filamentosos aislados del relleno sanitario de Pichacay, Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca, Ecuador.
18. Condori A. K. (2020) Biodegradación de Poliestireno expandido mediante *Pseudomonas* sp. Aisladas del botadero de Residuos sólidos de la ciudad de Azángaro. Tesis de grado. Universidad Nacional de Juliaca, Juliaca, Peru.
19. Cepero G. M., Restrepo R. S., Franco M. A., Cárdenas T. M. y Vargas E. N. (2012) Biología de Hongos, Colombia, *Ediciones Unidades*.
20. Cletus G., Shireen R., Ullanat V., Shrikrishna A., Joshi A., Hiremath L. y Entoori K., (2021) Fungal biodegradation of low-density polyethylene using consortium of *Aspergillus* species under controlled conditions, *Elsevier*, e07008.

21. Clutario M. y Cuevas V. C. (2001) Colonization of Plastics by *Xylaria* sp. *Philippine Journal of Science*. 130, (2).
22. Constantine M., Rau I., Vasilescu G., Arsene M. y Jecu L. (2012) Colonization and degradation of polyethylene composites by fungal strains isolated, *Scientific Bulletin*, 14.
23. Cuevas V. C., Manaligod R. C. (1997) Isolation of decomposer fungi with plastic degrading ability. *Philippine Journal of Science* 126, 117-130.
24. Daviran Y. P. (2017) Biodegradación de la Espuma de Poliestireno por la larva del *Tenebrio molitor* para la producción de Abono, Tesis de licenciatura, Universidad Cesar Vallejo, Lima, Peru.
25. Deepika S. y Madhuri J. (2015) Biodegradation of low density polyethylene by microorganisms from garbage soil. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*.3(1), 15-21.
26. Díaz del Castillo R. F. (2012) Conformado de materiales plásticos, Departamento de Ingeniería, UNAM.
27. Diteval (2019) Poliestireno expandido, Recuperado el 15 de enero de 2022 de <https://ditevalicopor.com/2019/04/08/poliestireno-expandido/>
28. Duarte L. Y., Echevarría H. A., Martínez C. B. (2016) Identification and characterization of *Fusarium* spp. isolates present in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Cuba, *Rev. Protección Veg.*, 31(3).
29. Eggins W., Mills J., Holt A. y Scott G. (1971) Biodegradation and biodegradation of Synthesis polymers, 267-279. IM. Syker G. & Skinner F. A. *Microbial Aspects of pollution*. The Society for applied bacteriology.
30. Esmaeili A, Pourbabae AA, Alikhani HA, Shabani F. y Esmaeili E. (2013) Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by Mixed Culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in Soil. *Plos one* 8(9), e71720.
31. Espinosa A. L. (2018) Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos, Tesis de grado, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.

32. Fuentes C. V. (2013) Reciclamiento de poliestireno, Trabajo profesional para obtener título de Ingeniero químico, Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.
33. Fundación UNAM, En México, el consumo nacional de unicele es de 125 mil toneladas anuales, Recuperado de <https://www.fundacionunam.org.mx/unam-al-dia/en-mexico-el-consumo-nacional-de-unicele-es-de-125-mil-toneladas-anuales/>
34. Geyer R, Jambeck J. y Law L. (2017) Production, use, and fate of all plastics ever made, Jambeck, *Law Sci. Adv.* 3: e1700782.
35. Gómez G. M., León E. J., Rodríguez R. C. (2018) Producción de láminas de hongos para la enseñanza, *Hechos Microbiológicos*, 9(1-2), 20-27.
36. Gkoutselis G., Rohrbach S., Harjes J., Obst M., Brachmann A., Horn M. A., y Rambold G. (2021) Microplastics accumulate fungal pathogens in terrestrial ecosystems, 11(13214) | <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92405-7>
37. González T., Yagüe S., Terrón M., Carbajo J. M., Arana A., Téllez A. y González A. E. (2006) Enzimas fúngicas: ¿una alternativa para la decoloración de los efluentes de destilería? *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba. 40, 3-12.
38. Gu J. D. (2003) Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances
39. Guevara R. M. (2010) Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas, Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud. 16, 9-10.
40. Guerra C. M., Ortiz G. G., Herrera A. A. y Albores G. R. (2016) Iniciativa con proyecto de decreto por el que se reforma la fracción vi del artículo 7 de la ley general para la prevención y gestión integral de los residuos, *Gaceta: LXIII/1SPO-113/61565*, recuperado de https://www.senado.gob.mx/64/gaceta_del_senado/documento/61565

41. Gutiérrez P. J. (2013) Biodegradación de polietileno de baja densidad por consorcios microbianos, Tesis de pregrado, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
42. Gutiérrez J., Flores L. y Villagómez J. (2018) Estudio de la degradación de PET por consorcios fúngicos, Jóvenes en la Ciencia, 4, 941-946.
43. Hernández M. D., Ferrera C. R. y Alarcon A. (2019) *Trichoderma* Importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial.
44. Hernández R. O. (2014) Caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Penicillium* sp. obtenidos de frutos de manzana (*Malus x domestica* Borkh) en México y pruebas de agresividad, Tesis de maestría, Colegio de Posgrados.
45. Hibbett, D. S., A. Ohman, D. Glotzer, M. Nuhn, P. Kirk y R. H. Nilsson. (2011) Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* 25, p. 38-47.
46. Hurtado G. C. (2014) Estudiantes de la UNAM crean tecnología mexicana para el reciclaje de unicef, Parentesis.com, Recuperado el 9 de septiembre de 2021 de https://parentesis.com/noticias/mas-redes/salud/Jovenes_estudiantes_de_la_UNAM_crear_tecnologia_mexicana_para_el_reciclaje_de_unicef
47. Idowu O. K., Obasola E. F. y Blessing I.N. (2019) Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by certain indigenous bacteria and fungi, *Int.J. Environ. Stud.* 76, 428-440.
48. Ji-Young A, Yang-Hoon K, Jiho M. y Jeewon L. (2006) Accelerated degradation of dipentylphthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase and toxicity evaluation of its degradation products using bioluminescent bacteria. *Curr. Microbiol.* 52, 340-344.
49. Jiménez G., (2019), Biodegradación del poliestireno expandido por larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae) en condiciones de

laboratorio, Tesis de grado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Bogotá, Colombia.

50. Kavanagh K. (2018) Fungi, Biology and Applications, Department of Biology Maynooth University Maynooth County Kildare, Ireland, p. 67-70.
51. Karimi A. M., Bazooyar F., Biria D., Zamani A. y Skrifvars M. (2020) The special effect of the *Aspergillus flavus* and its enzymes on biological degradation of the intact polylactic acid (PLA) and PLA-Jute composite, *Polymer Degradation and Stability* 179.
52. Kittur S., Paril N., Kammar S., Priya S. y Sastry D. N. (2013) Biodegradation of 40 micron plastic bags by *Aspergillus niger* and optimization of pre-treatment methods. *Environment Conservation Journal*. 14(3), 61-68.
53. Lee B., Pometto III A. L., Fratzke A. y Bailey J. R. (1991) Biodegradation of degradable plastic Polyethylene by *Phanaerochaete* and *Streptomyces* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 678-685.
54. López A. L. y Pérez M. W. (2019) Alternatives of low environmental impact for the recycling of the expanded polystyrene at the worldwide, *Informador Técnico*, 83(2), 209-219. <https://doi.org/10.23850/22565035.1638>
55. Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F., Nava S. J., (2008) Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques, *Chemosphere*, 73, p. 429–442.
56. Maldonado N., Robledo C. y Robledo J. (2018) La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica., 22(1), p. 35-45. ISSN 0123-9392, <https://doi.org/10.22354/in.v0i0.703>.
57. Manisha K., Mohd S., Avinash B. (2019) Gas chromatography-Mass spectra analysis and deleterious potential of fungal based polythene degradation products. *Scientific RepoRts*. 9, 1599 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37738-6>
58. Manisha K. sangale, Mohd S. y Avinash B. (2018) Potential of fungi isolated from the dumping sites mangrove rhizosphere soil to degrade polythene.

59. Méndez C., Vergaray G., Béjar V. J. y Cárdenas K. J. (2007) Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno, *Rev. Perú. biol.* 13(3), p.203 – 20.
60. Meyer C. I., Werner J., Jehmlich N., Will S., Neumann S. M. y Öztürk B. (2020) Synergistic biodegradation of aromatic-aliphatic copolyester plastic by a marine microbial consortium, *Nature Communications*, 11, 5790.
61. Monzón A., Rodríguez J. L., Infecciones causadas por el género *Fusarium* Tudela Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf>
62. Moore D., Robson G. D., Trinci A. P. J. (2011) 21st Century Guidebook to Fungi, Cambridge University Press, p. 29-37.
63. Núñez S. A., García R. B., Solís P, S., García G. A., (2020) Producción de pectinasas a partir de un hongo filamentoso, Instituto Tecnológico de Mérida.
64. Ojha N., Pradhan N., Surjit S., Barla A, Shrivastava A., Khatua P., Rai V. y Bosel S. (2017) Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization, *Nature, Scientific Report*, 7, 39515, doi: 10.1038/srep39515.
65. Paco A., Duarte K., Costa J.P., Santos P. S., Pereira R., Pereira M. E., Freitas A. C., Duarte A. C. y Rocha S.T. (2017) Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*, *Elsevier*. 568, 10-15.
66. Peña E., Fortich D. y Machado G. (2013) Evaluación de la degradación ambiental de películas de polipropileno mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), *Revista Colombiana de Materiales*. 4, 109 –127.
67. Peña M. C., Bermúdez G. E., Morales G. S. y Farres A. (2018) Las cutinasas como una herramienta valiosa para la descontaminación de residuos plásticos, *Mens. Bioquim.* 42, 24-35.

68. Pérez G. N., Garnica A. P., Pérez S. A., Juárez H. R., Castro M. F. (2016) Evaluación de las propiedades mecánicas del poliestireno expandido Instituto mexicano del transporte, Publicación Técnica, Querétaro, 476.
69. Petit A. K., Colina L. J., Yegres E. F., Moran G. H. y Richard-Yegres, N. (2013) Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera, *Química Viva*, 12(3), p. 288-304.
70. Pometto III A.L., Lee B. y Johnson K. (1992) Production of an extracellular Polyethylene degrading Enzyme (s) by *Streptomyces* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 731-733.
71. Reyes S. M. y Arena O. L. (2017) Bacterias y hongos con potencial biodegradador de hidrocarburos en diversos ambientes. *Microbiología ambiental en México*. 246-263.
72. Rivas L. M. y Mühlhauser M. (2014) *Alternaria* spp., *Rev Chilena Infectol*, 31 (5), 605-606.
73. Rocha S.J. (2003) Molecular markers, an useful tool for genetic selection in oil palm, *PALMAS*, 24(2).
74. Rodríguez C. A., Ortiz R. Y., Hernández P. C. y Figueroa C. (2021), Biodegradación de espumas plásticas por larvas de insectos: ¿una estrategia sustentable? *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 24, 1-10.
75. Russell J. R., Huang J., Anand P., Kucera K., Amanda Sandoval G., Dantzler K. W., Hickman D., Jee J., Kimovec F. M., Koppstein M., Marks H.D., Mittermiller P.A., Núñez S. J., Santiago M., Townes M. A., Vishnevetsky M., Williams N. E., Núñez V, M., Boulanger L, Bascom-Slack C. y Strobel S. A. (2011) Biodegradation of Polyester Polyurethane by Endophytic Fungi, *Applied and Environmental Microbiology*. 77, 6076-6084.
76. Sánchez C., Ryder A. R. y Robson G. (2015) Crecimiento de hongos degradadores de di(2-etilhexilftalato) sobre cultivos conteniendo suelo. Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería.

77. Siller R. M., Hernández E. S., Sánchez J. F., Gonzáles B. J. y Muñoz B. J. (2016) Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos, *ELSEVIER*. 35(5), 303-313.
78. Solera J. F., Rodríguez V. A. y Soto V. B. (2010) Evaluación de la producción de proteasas en dos cepas de *mucor* sp. por fermentación sumergida empleando dos tipos de medio de cultivo, *Uniciencia*. 24, 63-68.
79. Termoplásticos: aplicaciones y clasificación del poliestireno (PS). (2017) *Plastic technology México*, Recuperado de: <https://www.pt-mexico.com/articulos/detrs-del-poliestireno-ps>.
80. Terrazas B. y Rojas D. (2019) UNAM desarrolla enzima para degradación de plásticos, Recuperado de: <https://unamglobal.unam.mx/unam-desarrolla-enzima-para-degradacion-de-plasticos/>
81. Torres H. A. (2020) Efectividad del hongo *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad, Tesis de grado, Universidad Cesar Vallejo, Chiclayo, Perú
82. Ulloa M. y Hanlin R. (2012) Illustrated dictionary of mycology. Second Edition, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86.
83. 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, Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM, *Rev. Perú. biol.* 17(1), 133 – 136.
84. Valiente M., Pavone D., Identificación de cepas del hongo *Trichoderma* sp. Por métodos moleculares, Centro de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela.
85. Vargas M., Piro B., Navarro A. y Rubio M. C., (2016) Selección de un hongo filamentoso altamente productor de amilasas para ser usadas en detergentes biodegradables, *Micología ambiental*, 31(1), 19 – 27.

86. Vélez A. P. (2021) Hongos microscopicos de México: Diversidad taxonómica, funcional y uso en la biospección (Videoconferencia), CDMX, México
<https://www.facebook.com/SEQFB/videos/258921612762841>
87. Velrajan M. y Niren A. (2012) Assessment of physicochemically treated plastic by fungi, Scholars Research Library, 4374.
88. Yang-Hoon Kim, Jeewon Lee, Ji-Young Ahn,1 Man Bock Gu, y Seung-Hyeon Moon, (2002) Enhanced Degradation of an Endocrine-Disrupting Chemical, Butyl Benzyl Phthalate, by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi Cutinase, applied and environmental microbiology. 68(9), 4684–4688.
89. Yang, Y., Yang, J., Wu, W. M., Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R. y Jiang, L., (2015) Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: part 2. role of gut microorganisms, Environmental Science and Technology, 49(20), 12087–12093.
90. Yepes A. L. (2014) Degradación de Polietileno de baja densidad utilizando hongos. Revisión sistemática de la literatura. Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana. Bogota D. C., Colombia.
91. Zamundio P. W. (2018) Caracterización del poliestireno expandido residual a nivel global: una revisión de literature, Universidad de Santander, Colombia.
92. Zahra S., Abbas S., Mahsa M. y Mohsen N. (2010) Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium, PubMed, 30(3), 396-401.
93. Zhang J., Gao D., Li Q., Zhao Y., Li L., Hanfeng Lin L., Bi Q. y Zhao Y. (2019) Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of the Total Environment*. Doi:10.1016/j.scitotenv.2019.13593