

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal



CAPACIDAD DEGRADATIVA DE PLÁSTICOS DEL HONGO PUDRIDOR DE
MADERA *Bjerkandera adusta*

PROYECTO DE TÍTULO PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA
EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

VJERUSCKA SOPHIA RUIZ CALDERÓN
LOS ÁNGELES – CHILE

2023

**“CAPACIDAD DEGRADATIVA DE PLASTICOS DEL HONGO PUDRIDOR DE
MADERA *Bjerkandera adusta*”**

Alumna

**Vjeruscka Sophia Ruiz Calderón
Ingeniera en Biotecnología Vegetal**

Profesora Guía

**Dra. Ángela Machuca Herrera
Profesora Asociada
Bioquímico**

Jefe de Carrera

**Pedro Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero de (E) Forestal**

Directora de Departamento

**Dra. Marely Cuba Díaz
Profesora Titular
Bióloga**

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecerle a mi Mamá, Marinka Calderón, mi eterno pilar, quien siempre fue el impulso para concretar su sueño en esta tierra. Sin ella no podría haber terminado este proceso y le agradeceré eternamente por la mujer que creó y por siempre creer en mí, sé que está orgullosa de lo que hemos logrado. A mi Mamaali, por impulsar mi carrera universitaria, a mi Hermana Zaskya por apoyarme y animarme desde un principio. A Sergio, por tu cariño, por estar a mi lado y sostenerme, motivándome siempre a seguir. A María Pía, quien siempre me entrego una palabra de aliento y un abrazo, gracias por ser un ejemplo a seguir.

A mi querida profesora guía, Doctora Ángela Machuca Herrera, le agradezco inmensamente su paciencia y dedicación, por haberme apoyado y considerado siempre. Por la confianza y cariño que caracterizo nuestras largas reuniones en su oficina con dulces, té y detalles. Por aconsejarme en el ámbito académico y personal, estando presente en los momentos más difíciles durante estos años. Gracias por siempre tener unos minutos para conversar. A la profesora Yudith Guillen, quien siempre estuvo dispuesta a ayudar, por entregar su conocimiento, su eterno cariño y preocupación. A mis compañeros de Laboratorio Sebastián V, Sebastián T, Barbara y Christian, por el apoyo durante el desarrollo práctico de mis tesis, por las risas y buenos momentos en el laboratorio. A Francisca y María José por ayudarme y darme ánimos en este proceso. Agradezco infinitamente a mis amigas y compañeras de este proceso, Marcela, Constanza, Solange y Valentina, gracias por entender mi carácter y por el cariño, por las alegrías y discusiones, por ser ese rayito de luz en los días grises en la universidad. A todos quienes estuvieron presentes en mis años universitarios, por inspirarme a ser la mejor versión de mí misma.

Finalmente, agradezco a la Dra. Isabel Carrillo perteneciente al Centro de Investigación de Polímeros Avanzados (CIPA), Dr. Regis Teixeira del Centro de Biotecnología UdeC (CB-UdeC), Dr. Ricardo Oliva y Sr. Alexis Estay del Centro de Espectroscopia y Microscopia Electrónica (CESMI), por brindar su colaboración para llevar a cabo esta etapa, lo que contribuyó significativamente en los resultados obtenidos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	10
Abstract.....	11
I. Introducción	12
II. Marco teórico	14
2.1 Plásticos y su impacto ambiental	14
2.2 Biodegradación microbiana de plásticos	17
2.3 Hongos degradadores de plástico	19
2.4 Biodegradación enzimática	20
III. Hipótesis de trabajo.....	22
IV. Objetivos.....	22
4.1 Objetivo General.....	¡Error! Marcador no definido.
4.2 Objetivos Específicos	¡Error! Marcador no definido.
V. Material y Métodos.....	¡Error! Marcador no definido.
5.1 Especie fúngica	¡Error! Marcador no definido.
5.2 Activación de la cepa fúngica	¡Error! Marcador no definido.
5.3 Tipos de plásticos y preparación	¡Error! Marcador no definido.
5.4 Tratamiento de los plásticos con <i>B. adusta</i> en medio de cultivo sólido	¡Error! Marcador no definido.
5.5 Determinación de la pérdida de peso de los plásticos.....	¡Error! Marcador no definido.
5.6 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	¡Error! Marcador no definido.
5.7 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	¡Error! Marcador no definido.

5.8	Tratamiento de los plásticos con <i>B. adusta</i> en medio de cultivo líquido....	¡Error! Marcador no definido.
5.9	Determinación de Peroxidasas y Lacasas.....	¡Error! Marcador no definido.
5.10	Concentración de proteínas solubles	¡Error! Marcador no definido.
VI.	Resultados	¡Error! Marcador no definido.
6.1	Tratamiento de los plásticos con <i>B. adusta</i> en medio de cultivo sólido	¡Error! Marcador no definido.
6.2	Análisis de modificaciones producidas en los plásticos tratados con <i>B. adusta</i> en cultivo solido.....	¡Error! Marcador no definido.
6.2.1	Análisis de espectroscopía de FT-IR	¡Error! Marcador no definido.
6.2.2	Análisis Termogravimétrico (TGA)	¡Error! Marcador no definido.
6.2.3	Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM).	¡Error! Marcador no definido.
6.3	Tratamiento de los plásticos con <i>B. adusta</i> en medio de cultivo líquido.....	47
6.3.1	Crecimiento de <i>B. adusta</i> y pérdida de peso de los plásticos.....	¡Error! Marcador no definido.
6.3.2	Determinación de actividad enzimática y contenido de proteínas solubles	¡Error! Marcador no definido.
6.3.3	Análisis de SEM.....	¡Error! Marcador no definido.
VII.	Discusión	¡Error! Marcador no definido.
VIII.	Conclusiones	¡Error! Marcador no definido.
IX.	Bibliografía	¡Error! Marcador no definido.
X.	Anexos	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de los plásticos más comunes. Imagen editada de Daly et al. (2021)
..... ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 2.** Disposición de las muestras de plásticos y discos de agar-micelio de *B. adusta* durante el tratamiento en medio PDA en placas Petri. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 3.** Crecimiento de *B. adusta* en las placas con medio PDA, en presencia de los diferentes plásticos, a los 10 y 40 días de incubación a 24°C (filas superiores), y las respectivas placas control, sin inocular, donde en algunos casos es posible observar la presencia de contaminantes (filas inferiores). ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 4.** Aspecto de los plásticos sometidos a tratamiento. Fila superior: plásticos originales, fila intermedia: plásticos control sin inocular, fila inferior: plásticos después del tratamiento por 40 días con *B. adusta*. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 5.** Pérdida de peso (%) de los plásticos tratados con *B. adusta*, durante 40 días de incubación en medio de cultivo sólido PDA. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con su respectivo control ($p < 0,05$) (análisis ANOVA y prueba de Tuckey). (*) indica mayor pérdida de peso, significativamente diferente ($p < 0,05$) respecto a todos los otros plásticos tratados. ¡Error! Marcador no definido.
- Figura 6.** Espectros FT-IR de las muestras PVC original (A), muestra control no inoculada (B) y muestra tratada con *B. adusta* (C) por 40 días. Las flechas hacia abajo indican aumento en la intensidad de zonas de la curva, y las flechas hacia arriba indican disminución en la intensidad. ¡Error! Marcador no definido.

Figura 7. Espectros FT-IR de muestras PBAT original (A), muestra control no inoculada (B) y muestra tratada con *B. adusta* por 40 días (C). Las flechas indican aumento en la intensidad de zonas de la curva. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 8. Espectros FT-IR de las muestras LDPE original (A), muestra control no inoculada(B), y muestra tratada con *B. adusta* por 40 días (C). Las flechas hacia abajo indican aumento en la intensidad de zonas de la curva. ... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 9.. Termogravimetría (TGA) del plástico PVC control (A) y PVC tratado con *B. adusta* (B). La gráfica de color verde indica la curva de pérdida de masa (TG) y la curva azul representa la derivada del cambio de masa (DTG). . **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 10. Termogravimetría (TGA) del plástico PBAT control (A) y PBAT tratado con *B. adusta* (B). La gráfica de color verde indica la curva de peso (TG) y la curva azul representa la derivada del cambio de peso (DTG). **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 11. Termogravimetría (TGA) del plástico LDPE control (A) y LDPE tratado con *B. adusta* (B). La gráfica de color verde indica la curva de peso (TG) y la curva azul representa la derivada del cambio de peso (DTG). **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 12. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico PVC original (A, B, C), muestras de PVC control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de PVC tratado con *B. adusta* en medio PDA (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 13. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico PBAT original (A, B, C), muestras de PBAT control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de PBAT tratado con *B. adusta* en medio PDA (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico y los círculos rojos indican la presencia de cristales de oxalato. **¡Error! Marcador no definido.**

Fig 14. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de la muestra PBAT tratada con *B. adusta* mostrando la presencia de cristales de oxalato de calcio (A, D) y presencia de hifas (B, C). Análisis de espectroscopia de energía dispersiva de Rayos X para caracterización de los cristales (E). **¡Error! Marcador no definido.**

Fig 15. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico LDPE original (A, B, C), muestras de LDPE control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de LDPE tratado

con *B. adusta* en medio PDA (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico y los círculos rojos indican la presencia de cristales de oxalato. **¡Error! Marcador no definido.**

Marcador no definido.

Figura 16. Crecimiento de *B. adusta* en matraces con medio PD, en presencia de los diferentes plásticos, a los 20 y 40 días de incubación a 24°C donde en algunos casos se puede observar el crecimiento micelial en la superficie del plástico, y las respectivas placas control, sin inocular. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 17. Crecimiento micelial (mg) de *B. adusta* en medio líquido PD en presencia de plásticos, a los 40 días de incubación. Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos con $p < 0,05$ (ANOVA, test de Tuckey). **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 18. Pérdida de peso (%) de los plásticos tratados con *B. adusta*, durante 40 días de incubación en medio de cultivo líquido PD. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre cada tratamiento y su control respectivo ($p < 0,05$) (análisis ANOVA y prueba de Tuckey). (*) indica mayor pérdida de peso, significativamente diferente ($p < 0,05$) respecto a todos los otros plásticos tratados..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 19. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico PVC original (A, B, C), muestras de PVC control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de PVC tratado con *B. adusta* en medio PD (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 20. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico PBAT original (A, B, C), muestras de PBAT control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de PBAT tratado con *B. adusta* en medio PD (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 21. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico LDPE original (A, B, C), muestras de LDPE control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de LDPE tratado con *B. adusta* en medio PD (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico. **¡Error! Marcador no definido.**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los plásticos que se utilizaron en el ensayo. 24

Tabla 2. Actividad de peroxidasas, contenido de proteínas y cambios de pH en los caldos de *B. adusta* en presencia de los plásticos a los 20 y 40 días de tratamiento en medio de cultivo líquido PD..... 52

Resumen

En los últimos años la contaminación por plásticos sintéticos ha crecido exponencialmente y ha alcanzado los más diversos ecosistemas, por lo que se hace necesario buscar alternativas urgentes para su (bio)degradación. Los hongos de pudrición blanca de la madera tienen una eficiente capacidad de degradación de polímeros naturales a través de la producción de enzimas extracelulares, lo que los hace de interés para el tratamiento de residuos industriales, como los plásticos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de biodegradación de diferentes tipos de plásticos por una cepa nativa del hongo *Bjerkandera adusta*, bajo condiciones de cultivo sólido y líquido, determinando su potencial para la biorremediación de plásticos. Los plásticos tratados con *B. adusta* fueron: Polietileno de baja densidad (LDPE), poli(adipato co-tereftalato de butileno) (PBAT), policloruro de vinilo (PVC), Nitrilo, polietileno (PE) y polipropileno (PP). En medio sólido (agar- papa-dextrosa) los plásticos tratados con *B. adusta* por 40 días mostraron una eficiente colonización y una pérdida de peso que siguió la tendencia PVC > PBAT > LDPE > Nitrilo > PE, con una reducción máxima de 43,8 % en PVC. Los análisis espectroscópicos (FT-IR), termogravimétricos (TGA) y de microscopía electrónica de barrido (SEM), demostraron la biodegradación y/o modificación provocada por *B. adusta* en los plásticos, con cambios en algunos grupos funcionales y en la estabilidad térmica, además de perforaciones importantes en la superficie de los polímeros, principalmente en PVC y PBAT. En medio líquido (papa-dextrosa), los plásticos tratados durante 40 días con el hongo mostraron una eficiente colonización, pero con una pérdida de peso máxima (9,23%) 5 veces menor que la obtenida en medio sólido, siguiendo la misma tendencia anterior (PVC > PBAT > LDPE). En medio líquido, se analizó la producción de enzimas extracelulares por *B. adusta*, detectándose actividad de peroxidasa, principalmente en presencia de PVC y LDPE, aunque no de lacasa. Los análisis de SEM revelaron la presencia de perforaciones en la

superficie de los plásticos, principalmente en PVC y PBAT. Los resultados indican que *B. adusta* es una especie prometedora para degradar plásticos, principalmente del tipo PVC en medio de cultivo sólido. Otras condiciones de tratamiento deberían ser probadas buscando mejorar las variables aquí analizadas.

Abstract

In recent years, synthetic plastic pollution has grown exponentially and reached the most diverse ecosystems, so it is necessary to look for urgent alternatives for (bio)degradation. White wood-root fungi have an efficient ability to degrade natural polymers through the production of extra-cellular enzymes, which makes them of interest for the treatment of industrial waste, such as plastics. Therefore, the objective of this study was to evaluate the biodegradation capacity of different types of plastics by a native strain of the *Bjerkandera adusta* fungus, under solid and liquid culture conditions, determining its potential for plastics bioremediation. Plastics treated with *B. adusta* were low-density polyethylene (LDPE), poly (butylene co-tereftalate adipate) (PBAT), polyvinyl chloride (PVC), nitrile, polyethylene (PE) and polypropylene. (PP). In solid medium (potato-dextrose agar) plastics treated with *B. adusta* for 40 days showed efficient colonization and weight loss that followed the trend PVC > PBAT > LDPE > Nitrile > PE, with a maximum reduction of 43.8% in PVC. Spectroscopic (FT-IR), thermogravimetric (TGA) and scanning electron microscopy (SEM) analyses demonstrated the biodegradation and/or modification caused by *B. adusta* in plastics, with changes in some functional groups and in thermal stability, as well as important perforations on the surface of the polymers, mainly in PVC and PBAT. In liquid medium (potato-dextrose), plastics treated for 40 days with the fungus showed efficient colonization, but with a maximum weight loss (9.23%) 5 times lower than obtained in solid medium, following the same previous trend (PVC > PBAT > LDPE). In liquid medium, the production of extra-cellular enzymes by *B. adusta* was analyzed, with peroxidase activity being detected, mainly in the presence of PVC and LDPE, but not lacase. SEM analyses revealed the presence of perforations on the surface of plastics, mainly in PVC and PBAT. The results indicate that *B. adusta* is a promising species for

degrading plastics, mainly of the type PVC in the middle of solid cultivation. Other treatment conditions should be tested seeking to improve the variables analyzed here.

I. Introducción

La contaminación por plásticos en los rellenos sanitarios provoca un deterioro visual del paisaje, contaminación de los suelos con pequeñas partículas de plástico y liberación de gases de efecto invernadero y sustancias químicas peligrosas (De Souza-Machado et al. 2018). La presencia de micro y nanoplásticos en el medio ambiente está creciendo rápidamente debido a la ubiquidad global de los macroplásticos (Mattsson et al. 2017). Estos materiales podrían tener importantes impactos químicos y físicos sobre el medio ambiente y la salud humana (Peiponen et al. 2019). Debido a estas consecuencias, se ha vuelto necesario buscar alternativas para descontaminar el medio ambiente (Kaushal et al. 2021). La biorremediación es una biotecnología respetuosa con el medio ambiente y de bajo costo, que se puede realizar en el sitio ya que involucra procesos naturales con plantas o microorganismos. En ese sentido, los hongos tienen aplicaciones prácticas prometedoras para remediar ambientes contaminados por plásticos, utilizando su eficiente capacidad de colonización de sustratos y enzimática degradativa de una gran variedad de sustancias contaminantes (Sánchez, 2020).

Los hongos son organismos ubicuos, capaces de colonizar una variedad de diferentes matrices (suelo, agua, aire) y sobrevivir en una variedad de ambientes naturales donde ayudan a mantener el equilibrio del ecosistema (Anastasi et al. 2013). El factor clave para fines de biorremediación de plásticos con hongos es la producción de enzimas extracelulares como lacasas, peroxidasas y esterases, algunas de las cuales están directamente involucradas en la unión a la superficie de los plásticos facilitando la consiguiente biodegradación (Wei y Zimmermann 2017). Dentro de este contexto, los hongos de pudrición blanca tienen un gran potencial, ya que son productores de enzimas

y han demostrado su capacidad para el tratamiento de residuos industriales (Da Luz et al. 2013)

Bjerkandera adusta es un basidiomiceto de la pudrición de madera que pertenece a los hongos de pudrición blanca. Los hongos de pudrición blanca son los degradadores de lignina más eficaces de la naturaleza (Eriksson et al. 1990) y también pueden oxidar compuestos xenobióticos, incluidos contaminantes ambientales (Higson 1991). El interés biotecnológico de la especie *B. adusta*, surge de su capacidad para atacar sustratos poliméricos y degradar compuestos aromáticos (Kang et al. 2019) tales como la lignina, que es una macromolécula recalcitrante. De aquí surge el interés en investigar la posibilidad sobre si este hongo es capaz de degradar eficientemente polímeros naturales de la pared celular vegetal (Hernández-Bueno et al. 2021), también podría degradar sustancias poliméricas sintéticas como son los plásticos.

II. Marco teórico

2.1 Plásticos y su impacto ambiental

Según la Asociación de Plásticos de Europa, la producción anual de plástico fue de 360 millones de toneladas en 2018, y se estima que alcance los 500 millones de toneladas para el 2025 (PlasticsEurope 2019). Aproximadamente el 60 % del plástico ingresa al medio ambiente como desecho plástico (Geyer et al. 2017). La demanda de plástico comprende principalmente polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), tereftalato de polietileno (PET), poliuretano (PU) y poliestireno (PS) (Rodrigues et al. 2019). En consecuencia, los residuos plásticos se originan de los principales productos plásticos mencionados anteriormente. La industria del embalaje consume la mayor proporción de plásticos producidos y es la principal fuente de residuos plásticos en el mundo, debido a la aplicación generalizada de productos desechables (PlasticsEurope 2019). Los desechos plásticos no biodegradables eliminados por la industria del embalaje comprenden principalmente PP, PE, PS y PET (Rodrigues et al. 2019).

Los plásticos sufren una lenta degradación en el ambiente, por lo que pueden persistir durante décadas o incluso cientos de años, generando niveles cada vez mayores de desechos a nivel global, lo que provoca problemas graves en diferentes ecosistemas (García et al. 2017). Por lo tanto, la eliminación de desechos plásticos y sus riesgos ambientales son problemas a considerar. Existen diversas formas de hacer una gestión integral de residuos plásticos (Ali et al. 2021a) tales como el reciclaje, la incineración, el uso en rellenos sanitarios, entre otras. Aunque algunos plásticos se pueden reciclar, hay muchos pasos involucrados que requieren una recolección separada, transporte a largas

distancias, procesamiento y remanufactura (Muhonja et al. 2018). Sin embargo, el alto costo de estos procedimientos, el bajo valor comercial de los plásticos y el bajo costo de las materias primas limitan su reciclaje. Además, cuando los residuos plásticos se incineran, se liberan al ambiente gases de efecto invernadero (CO₂) y otros gases irritantes (HCl), los cuales son peligrosos y nocivos, tanto para el ambiente, como para quienes deben manipular estos residuos (García et al. 2017).

Existe un tipo de plástico biodegradable conocido como bioplástico (BP), que es un polímero de base biológica o biodegradable o ambos, lo que implica que no todos los bioplásticos son biodegradables, y que ciertos plásticos no bio-basados también pueden ser biodegradables (Nandakumar et al. 2021). Si el plástico se obtiene completa o significativamente desde una fuente biológica, puede considerarse un bioplástico de base biológica (Rahman y Bhoi 2021). Los bioplásticos pueden ser descompuestos por microorganismos como bacterias, hongos, algas (Pei et al. 2011) existentes en la naturaleza hasta componentes como CO₂, H₂O, CH₄ y biomasa, los que pueden integrarse al ecosistema en pequeñas cantidades, y sin generar subproductos residuales (Mohan et al. 2020).

Los bioplásticos se clasifican en tres clases (Sankhla et al. 2020):

i) BP biodegradables y de base biológica, que derivan de sustancias biológicas renovables (maíz, papa, arroz, soya, caña de azúcar, trigo y aceite vegetal) en lugar de petróleo (Lackner 2015). El ácido poliláctico (PLA) y los polihidroxialcanoatos (PHA) son los principales biopolímeros que se descomponen bajo condiciones ambientales (Ashok et al. 2017). PLA es un derivado del almidón, y está sustituyendo a los plásticos basados en combustibles fósiles, debido a su alta resistencia mecánica, plasticidad térmica y naturaleza compostable (Sankhla et al. 2020).

ii) BP biodegradables y derivados del petróleo, derivan de fuentes no renovables (Folino et al. 2020). El BP principal en esta categoría es la policaprolactona (PCL), el polisuccinato de butileno (PBS) y poli (adipato co-tereftalato de butileno) (PBAT) (Emadian et al. 2017).

iii) BP no biodegradables y de base biológica, que derivan total o parcialmente de sustancias biológicas. Representados principalmente por el biopolietileno (bio-PE), el biopolitereftalato (bio-PET) y la bio-poliamida. El bio-PE y bio-PET no son biodegradables, pero pueden reciclarse eficientemente (Sankhla et al. 2020).

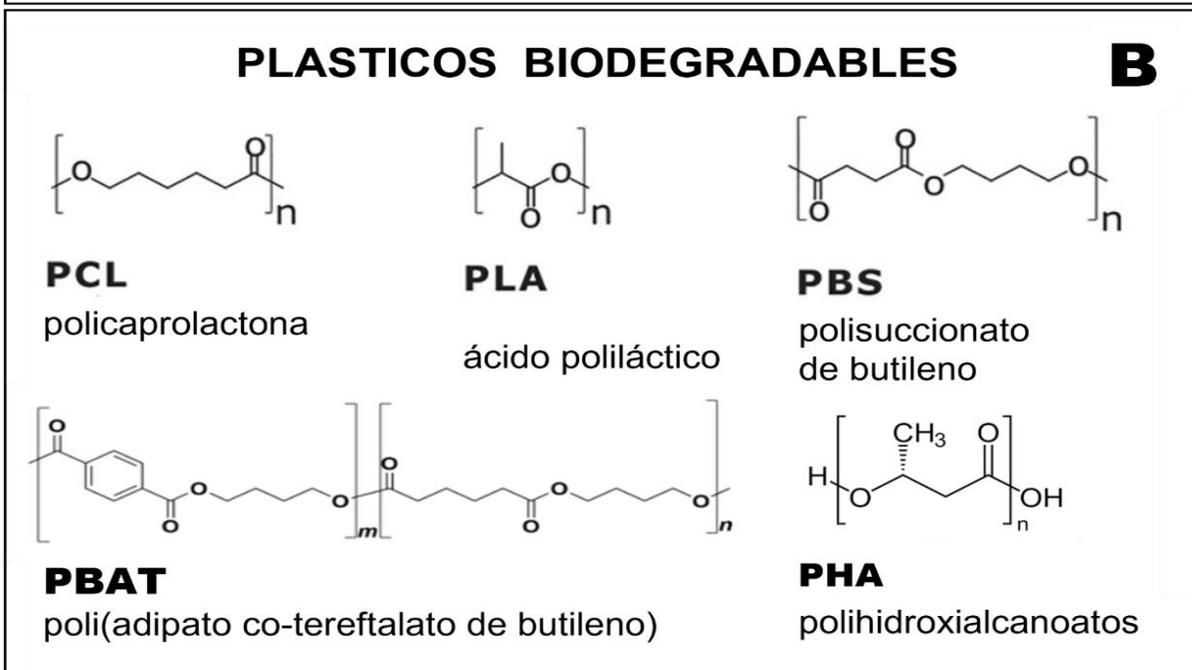
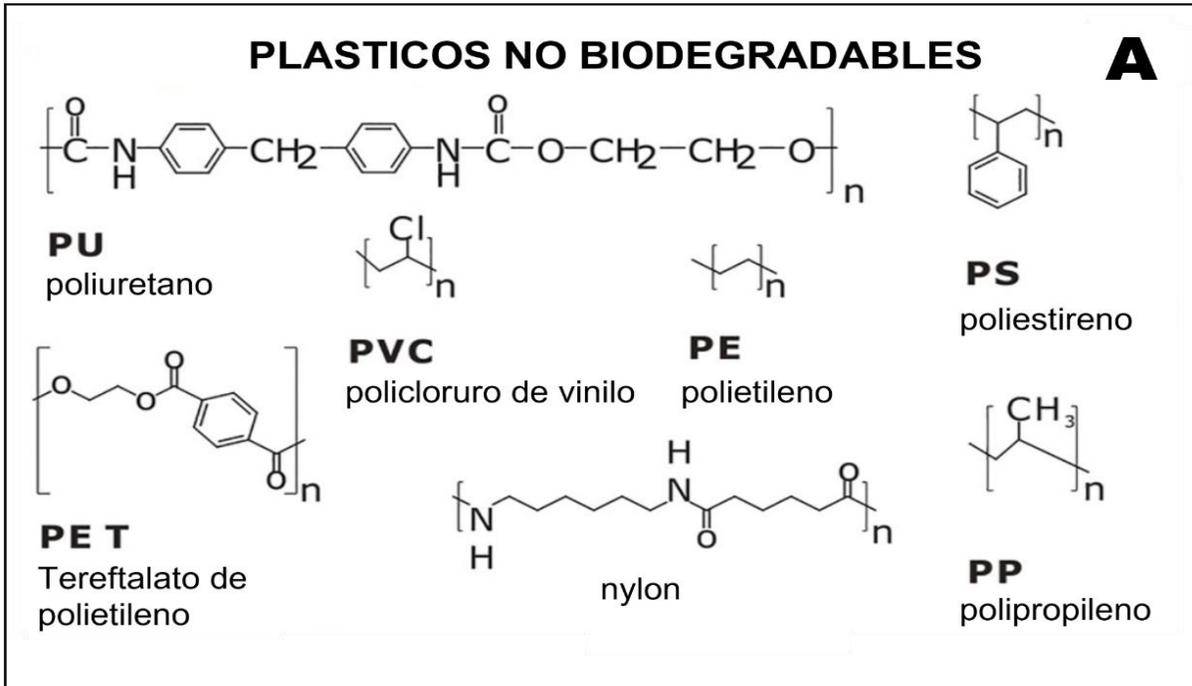


Figura 1. Estructura de los plásticos más comunes. Imagen editada de Daly et al. (2021)

Los BP representan el 0,5% de los aprox. 335 millones de toneladas de la producción anual de plástico, y se espera que aumenten a aprox. 2,65 millones de toneladas en 2023 (PlasticsEurope 2019). Aunque la producción de BP sigue aumentando, su aporte para resolver el problema global de la acumulación de plástico en el medio ambiente es mínimo, principalmente debido al costo. El plástico a base de petróleo es demasiado barato y su uso está extendido en el mundo. El precio de los BP producidos por el proceso actual es aproximadamente 3 a 10 veces el de los PP y PE convencionales (Luyt y Malik 2019), y, además, algunos BP no son tan buenos como los plásticos convencionales (Shahlari y Lee 2012).

Hoy en día, el desarrollo de BP a partir de biomasa renovable se ha convertido en un tema de gran interés (Moshood et al. 2022). Los BP generalmente se elaboran a partir de materias primas renovables como lignina, celulosa, almidón y bioetanol, y aunque algunos han mostrado excelentes propiedades fisicoquímicas, mecánicas y degradables en muchas aplicaciones industriales, es bien sabido que los BP actualmente no sustituyen a los plásticos convencionales (Rujnićsokele y Pilipović 2017).

2.2 Biodegradación microbiana de plásticos

La biodegradación microbiana de los plásticos implica la liberación de enzimas extracelulares por parte del microorganismo, la unión de la enzima a la superficie del plástico y la hidrólisis de los polímeros a intermediarios pequeños, que finalmente son asimilados por las células microbianas como fuente de carbono (C) para liberar CO₂ (Mohan et al. 2020).

Los microorganismos que colonizan la superficie del plástico primero causan una reducción en el tamaño del polímero, degradándolo en monómeros que pueden ser absorbidos por las células microbianas, y luego estas unidades monoméricas actúan en el interior de sus células a través de la degradación enzimática, utilizando los monómeros como fuente de C para el crecimiento (Glaser 2019). Este proceso puede modificarse aún más si los plásticos son tratados antes del ataque microbiano para descomponer el

polímero a través de métodos químicos o físicos que incluyen calentamiento, enfriamiento, congelación, descongelación o degradación química (Kaushal et al. 2021).

El esquema general de degradación microbiana resume el proceso en cuatro etapas esenciales: colonización, biofragmentación, asimilación y mineralización (Ali et al. 2021b). La etapa de colonización se refiere a la formación de biopelículas por especies individuales o un consorcio microbiano que conduce al deterioro de la superficie del polímero plástico (Ru et al. 2020). La unión microbiana en la superficie del plástico puede llevarse a cabo mediante la producción de varios polisacáridos y/o proteínas hidrófobas las cuales penetran y alteran el tamaño de los poros del polímero y alteran el carácter morfológico de la superficie plástica (Iram et al. 2019). En esta etapa desempeñan un papel esencial las secreciones extracelulares (metabolitos y enzimas) microbianas en el proceso de biodegradación. El pH del medio también es un factor crucial, que podrá verse alterado debido a las actividades metabólicas microbianas, conduciendo a una mayor erosión superficial en el sustrato (Obradors y Aguilar 2000).

Durante la biofragmentación, la estructura polimérica del plástico se descompondrá debido a la acción de enzimas específicas, como hidrolasas, oxidorreductasas y/o radicales libres (Ali et al. 2021a). Los enlaces químicos que unen los monómeros de la cadena del polímero son similares a los que se encuentran en los materiales lignocelulósicos naturales (Kawai 2009), por lo que se ha sugerido que las enzimas degradadoras de lignocelulosa podrían ser eficaces para la biofragmentación de residuos plásticos. La biofragmentación puede ser iniciada por hidrólisis y llevada a cabo por una amplia gama de enzimas hidrolíticas tales como despolimerasas, y oxidativas como peroxidasas y otras enzimas oxidativas en general (Ali et al. 2021b). En la última etapa de asimilación, la célula microbiana utiliza los monómeros producidos como fuentes de C y energía (Ali et al. 2021a), muchos de los cuales son mineralizados por enzimas intracelulares (Iram et al. 2019).

A pesar de que los plásticos representan productos químicos no naturales (xenobióticos), en los últimos años se han identificado varios organismos capaces de metabolizar estos polímeros (Mohan et al. 2020). Se sabe que más de 90 microorganismos, incluidas

bacterias y hongos, degradan los plásticos, principalmente en condiciones *in vitro* (Jumaah 2017). Además, existen algas e insectos degradadores en ambientes naturales, pero escasamente descritos (Ali et al. 2021a).

2.3 Hongos degradadores de plástico

Los hongos filamentosos han sido importantes en la degradación y mineralización de diversos contaminantes ambientales al catalizar reacciones químicas importantes (Sánchez 2009), liberando enzimas digestivas por exocitosis fuera de sus hifas para descomponer las macromoléculas orgánicas en componentes más pequeños para luego absorberlos nuevamente (Daly et al. 2021). Finalmente, liberan CO₂ y H₂O en condiciones aerobias, y CH₄ en condiciones anaerobias (Pathak 2017). Algunos hongos, poseen un potente sistema enzimático y capacidad de absorción y producción de biosurfactantes naturales (como hidrofobinas), que les permiten utilizar plásticos como fuente de C y electrones, proporcionándoles materiales celulares y una fuente de energía (Olicon-Hernandez et al. 2017).

La mayor parte de las investigaciones de degradación de residuos plásticos ha sido realizada con hongos filamentosos del filo Ascomycota, principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* (Srikanth et al. 2022). Por el contrario, escasos estudios han sido realizados con especies pertenecientes al filo Basidiomycota, donde se encuentran los hongos pudridores de madera, conocidos por ser eficientes productores de enzimas extracelulares ligninolíticas (Daly et al. 2021).

En general, los hongos utilizados en diferentes investigaciones de degradación de plásticos han sido aislados de ambientes contaminados con residuos plásticos (Sangale et al. 2019, Munir et al. 2018, Muhonja et al. 2018). Mathur et al. (2011) utilizaron *A. niger* aislado de un vertedero de desechos plásticos para la degradación de HDPE, y Malachova et al. (2020) analizaron la capacidad de degradación de PVC de *T. hamatum* y *T. abietinum* en medio líquido, obteniendo resultados prometedores. Spina et al. (2021), estudiaron la comunidad fúngica presente en desechos plásticos de un relleno sanitario,

aislando 95 especies de hongos, en su mayoría pertenecientes al filo Ascomycota. La mayoría de estos hongos (97%) fue capaz de crecer en presencia de polvo de PE como única fuente de C y especies de *Fusarium* toleraron mejor una alta concentración de PE. Las especies, *F. oxyporum*, *F. falsiforme* y *P. lilacinum*, provocaron importantes fenómenos de oxidación en el polímero y cambios en la morfología (Spina et al. 2021).

Resulta de interés ampliar las investigaciones en relación con la capacidad de los hongos basidiomicetes de pudrición de madera para degradar o modificar residuos plásticos. Al respecto, el hongo de pudrición blanca *B. adusta*, fue investigado por Romero et al. (2007) quienes estudiaron su capacidad para degradar policarbonato proveniente de discos compactos (CDs), donde las hifas fúngicas que se encontraban entre los fragmentos de los CD crecieron a través de la capa de aluminio, produciendo solubilización del aluminio. Además, a través de microscopia electrónica de barrido (SEM) se reveló que el hongo era capaz de modificar las estructuras de policarbonato, generando perforaciones, ranuras y desgaste del material, lo que confirmó la degradación del polímero por la acción de *B. adusta*. Da Luz et al. (2013) demostraron la degradación de bolsas de plástico biodegradable por el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus*, donde luego de un periodo de 45 días de incubación, el plástico que se usa comúnmente en los supermercados mostró grietas y pequeñas perforaciones en la superficie, lo que se corroboró con análisis de espectroscopia infrarroja (FT-IR) y SEM. Además, se observó la degradación del tinte de las bolsas, así como la formación de cuerpos fructíferos del hongo (Da Luz et al. 2013). En el estudio de Kang et al. (2019), *B. adusta* TBB-03 se aisló y caracterizó por su capacidad de degradar HDPE en presencia de un sustrato lignocelulósico, donde luego de 90 días, se formaron grietas en la superficie de las muestras tratadas, tanto en medio líquido como sólido, lo que se confirmó con SEM. El análisis Raman mostró que la estructura amorfa del HDPE fue degradada por la acción de enzimas producidas por *B. adusta* (Kang et al. 2019). Hock et al. (2019) investigaron a los hongos *P. ostreatus*, *P. abalones* y *Agaricus bisporus* en la biorremediación de plásticos, utilizando PE y PS como única fuente de C. Los resultados mostraron desarrollo de biomasa, lo que indicó degradación y utilización de los materiales plásticos, donde A.

bisporus resultó ser la mejor especie para utilizarse en la degradación de PS y PE (Hock et al. 2019).

2.4 Biodegradación enzimática

Los hongos son organismos con una gran capacidad para producir y secretar enzimas extracelulares que pueden descomponer los polímeros plásticos (Kaushal et al. 2021; Temporiti et al. 2022). Las enzimas pueden degradar los plásticos a través de diferentes mecanismos, dependiendo del tipo de enzima y del tipo de plástico involucrado (Mohan an et al. 2020). La acción de las enzimas sobre los plásticos provoca ruptura de enlaces, fragmentando los polímeros, generando microplásticos que pueden incluir monómeros, oligómeros o fragmentos más pequeños del plástico original (Zeenat et al. 2021).

En la literatura se describen dos grandes grupos de enzimas involucradas en la degradación de los plásticos: las oxidorreductasas, donde se encuentran las peroxidasas, lacasa, monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO), y las hidrolasas, donde se encuentran las esterases, lipasas y cutinasas (Srikanth et al. 2022). Las enzimas oxidativas extracelulares descomponen el plástico utilizando oxígeno molecular (O_2) para realizar reacciones de oxidación en los enlaces químicos presentes en las estructuras del polímero plástico (Temporiti et al. 2022). La degradación varía dependiendo del tipo de plástico y la enzima oxidativa involucrada, pero siguen el mismo mecanismo de acción, en donde el primer paso es el reconocimiento y la unión de la enzima a la superficie del plástico, a través de interacciones con los grupos químicos presentes en el polímero (Rovaletti et al. 2023). Luego, la enzima utiliza el O_2 y lo transforma en especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales atacan los enlaces químicos presentes en el polímero plástico (Kaushal et al. 2021). Estas reacciones oxidativas rompen los enlaces, lo que debilita la estructura del material (Mohan an et al. 2020). Cuando los enlaces están debilitados, el plástico se fragmenta en pedazos más pequeños, que pueden liberarse al medio ambiente o seguir degradándose (Andrady et al. 2022). Por otro lado, están las hidrolasas, que participan en la escisión del polímero plástico, las cuales conducen a la fragmentación de largas cadenas de C en dos pasos (Okal et al. 2023). En el primer paso de la interacción enzima-polímero, las enzimas se unen a la superficie plástica a través

de interacciones hidrofóbicas (Wilkes et al. 2017). En la segunda etapa de reacción, las cadenas de polímero se descomponen por medio de hidrólisis, en monómeros o dímeros más pequeños, que el hongo puede consumir como fuente de C (Barth et al 2015).

III. Hipótesis de trabajo

Una cepa nativa del hongo de pudrición blanca de la madera *Bjerkandera adusta* es capaz de biodegradar una variedad de polímeros plásticos, bajo condiciones de cultivo sólido y líquido, provocando pérdidas de peso y modificaciones superficiales diferenciadas en el material, dependiendo del tipo de plástico, lo que estaría relacionado con la capacidad del hongo de producir enzimas oxidativas extracelulares.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad de biodegradación de diferentes tipos de plásticos de uso cotidiano por una cepa nativa del hongo pudridor de madera *Bjerkandera adusta*, bajo condiciones de cultivo sólido y líquido, determinando su potencial para la biorremediación de desechos plásticos.

4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la capacidad degradativa de diferentes tipos de plástico de *B. adusta*, a través de la pérdida de peso, luego de un periodo de tratamiento bajo condiciones de cultivo sólido y líquido.
2. Determinar los posibles cambios o alteraciones producidas en los materiales plásticos luego del tratamiento con *B. adusta* mediante el uso de técnicas espectroscópicas, termogravimétricas y de microscopía electrónica.

3. Evaluar la producción de enzimas oxidativas extracelulares de *B. adusta*, como lacasas, peroxidasas y LPMO en medio de cultivo líquido en presencia de diferentes tipos de plásticos.

V. Material y Métodos

5.1 Especie fúngica

La especie fúngica utilizada en este estudio corresponde al hongo de pudrición blanca de la madera *Bjerkandera adusta*, cepa 122, perteneciente a la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de Hongos, del Campus Los Ángeles de la Universidad de Concepción, la cual fue aislada previamente desde un árbol de fresno (*Fraxinus excelsiur*) en el Campus Concepción, región del Biobío (Guillén et al. 2011).

5.2 Activación de la cepa fúngica

En placas Petri con medio de cultivo extracto de malta (0,1%) - agar (1%) (EMA) y papa dextrosa - agar (1%) (PDA), se realizó la inoculación de *B. adusta* para su reactivación. En cada placa se inocularon 3 discos de agar-micelio (5 mm diámetro), tomados desde placas de la colección de cultivos. Las placas se inocularon bajo condiciones de asepsia, y luego se incubaron durante 10 días a 24°C en oscuridad.

5.3 Tipos de plásticos y preparación

La selección de los plásticos sintéticos se realizó con enfoque en artículos de uso doméstico cotidiano y en artículos de uso sanitario debido a la contingencia de la pandemia por COVID, como bolsas de supermercado tradicionales (LDPE) y biodegradables (PBAT), guantes desechables de nitrilo y vinilo (PVC), delantales protectores (PE) y mascarillas quirúrgicas y KN95 (PP). Los plásticos de uso sanitario eran nuevos, y las bolsas de supermercado (tradicional y biodegradable), correspondían a bolsas ya utilizadas anteriormente.

Luego de la recolección de los diferentes tipos de plástico (LDPE, PBAT, PVC, NITRILO y PE), éstos se cortaron en tiras de 7,0 x 2,0 cm, las cuales se dejaron en baño con etanol al 70% para su desinfección por 5 min, bajo cámara de flujo laminar, y luego se dejaron secar al aire para que el etanol se evaporara. Los plásticos de tipo PP (mascarillas) se autoclavaron por 15 min a 121°C. Finalmente, a todos los plásticos se les dio un pulso de luz UV germicida durante 5 min, bajo cámara de flujo laminar.

Posteriormente, las tiras de plástico se pesaron en balanza analítica (AE, modelo AAA-160LE) bajo cámara de flujo laminar y el peso de cada tira se registró en gramos (g). Las tiras de plástico fueron manipuladas con pinzas estériles y guardadas en bolsas o placas estériles.

Tabla 1. Clasificación de los plásticos que se utilizaron en el ensayo.

Clasificación	Uso del Plástico
LDPE	Bolsa de supermercado blanca con rojo
PBAT	Bolsa biodegradable
PVC	Guante procedimiento transparente
NITRILO	Guante procedimiento azul
PE	Traje protector azul
PP-Q	Mascarilla quirúrgica celeste
PP-KN	Mascarilla KN95 blanca

LDPE: Polietileno de baja densidad; PBAT: poli (adipato co-tereftalato de butileno); PVC: Policloruro de vinilo; PE: Polietileno; PP: Polipropileno

5.5 Tratamiento de los plásticos con *B. adusta* en medio de cultivo sólido

Para la preparación del medio PDA (diluido 10 veces respecto a la receta DIFCO) se pesaron 1,95 g de medio y se disolvieron en 500 mL de agua destilada utilizando un agitador magnético. Empleando un pHmetro (Hanna, modelo HI-4211) se ajustó el pH a 5,0 con HCl al 0,1M, se vació en un frasco con tapa rosca y se autoclavó (Huxley HL-

340), a 120 °C/ 15 min. Cuando la temperatura del medio disminuyó a aprox. 35°C, se dispensaron 20 mL de medio en cada placa Petri (1cm) bajo condiciones de asepsia.

Posteriormente, y bajo cámara de flujo laminar, se incorporaron dos tiras de cada plástico previamente esterilizado y pesado, a cada placa con medio PDA, hacia los bordes de la placa y luego se inocularon en el centro con 2 discos de agar-micelio (5 mm) tomados de placas stock con crecimiento activo de *B. adusta* (Figura 2). Las placas inoculadas se incubaron en estufa Binder (BD 720-730L) a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ por un periodo de 40 días, realizando anotaciones periódicas de los cambios observados. Cada tratamiento fue inoculado en duplicado por cada tipo de plástico, y controles apropiados fueron preparados utilizando placas que contenían las tiras de plástico, y no los inóculos fúngicos.

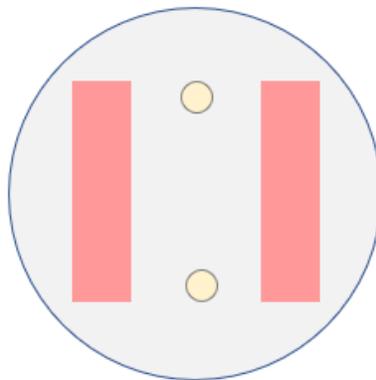


Figura 2. Disposición de las muestras de plásticos y discos de agar-micelio de *B. adusta* durante el tratamiento en medio PDA en placas Petri.

5.5 Determinación de la pérdida de peso de los plásticos

Completado el periodo de 40 días, se procedió a retirar las tiras de plástico de las placas Petri con ayuda de pinzas estériles, las que fueron cuidadosamente lavadas con agua destilada, y con un cepillo suave se retiraron todos los restos de micelio y medio de cultivo, para luego ser dejadas en estufa a 30°C durante 24h. Una vez secas, las tiras de plástico fueron pesadas en balanza analítica, y la pérdida de peso se determinó según la siguiente ecuación:

$$PP = \frac{(P_0 - P_1)}{P_0} \times 100\%$$

Donde PP corresponde a la pérdida de peso (%), P_0 al peso inicial (g) de las tiras de plástico y P_1 al peso (g) después del tratamiento fúngico (Vivi et al. 2019).

Las tiras de plástico tratadas y control de todos los plásticos, fueron almacenadas individualmente en bolsas de plástico con cierre hermético, en un lugar seco, hasta la realización de los análisis que se describen a continuación. Aquellos plásticos que resultaron tener la mayor pérdida de peso se seleccionaron para realizar los análisis espectroscópicos, gravimétricos y por microscopía electrónica.

5.6 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Las muestras de los plásticos de PVC, PBAT y LDPE (tratadas y control), fueron analizadas a través de espectroscopía de IR con transformada de Fourier (FT-IR por sus siglas en inglés), en un equipo Perkin Elmer Modelo Spectrum Two con accesorios específicos para el estudio de polímeros, y con sistema ATR (Reflectancia Total Atenuada). La preparación de la muestra consistió en moler un trozo del plástico junto con bromuro de potasio (KBr) en un mortero hasta homogeneizar, luego en una prensa se forma una pastilla, la cual se coloca en el equipo para realizar la lectura. Los análisis por FT-IR se realizaron en el rango entre 400 y 4000 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y una incidencia del láser de 15 repeticiones. Estos análisis se realizaron en el Centro de Investigación de Polímeros Avanzados (CIPA), Concepción, Chile, gentileza de la Dra. Isabel Carrillo.

5.7 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Pequeños fragmentos tomados de las muestras de plástico PVC, PBAT y LDPE (tratadas y control), los cuales se recortaron (1,0x0,5cm) y con pinzas se dispusieron en portaobjetos metálico de 10mm, se recubrieron con un baño de oro (Au 100% puro) utilizando un metalizador (SPI-MODULE PF-18) por medio de ionizado a alto vacío durante 60 s, lo cual es imprescindible para muestras no conductoras. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6380LV conectado

a una computadora para la captura de imágenes. Las micrografías SEM se obtuvieron a 500µm, 10µm y 5µm. Para la caracterización de los cristales de oxalato de calcio se utilizó espectroscopia de energía dispersiva de rayos (EDS) en el mismo equipo con un software AZTCONE. El análisis se realizó en el Centro de Espectroscopia y Microscopia Electrónica (CESMI), Concepción, Chile, gentileza del Dr. Ricardo Oliva y del Sr. Alexis Estay.

5.7 Termogravimetría (TGA)

Las muestras de plásticos fueron analizadas por TGA en un analizador TA Instruments, modelo Q50. El ensayo consistió en analizar el comportamiento y estabilidad térmica de las muestras de PVC, PBAT y LDPE (tratadas y control) con el fin de determinar las temperaturas de degradación y cantidad de residuos generados, a través del software Universal Analysis 2000. El comportamiento y estabilidad térmica de las muestras se evaluaron en un rango de temperatura de 25 a 600 °C, empleando un barrido de calentamiento de 10 °C/ min. Estos análisis se realizaron en el Centro de Investigación de Polímeros Avanzados (CIPA), Concepción, Chile, gentileza de la Dra. Isabel Carrillo.

5.8 Tratamiento de los plásticos con *B. adusta* en medio de cultivo líquido

Para determinar la producción de enzimas por *B. adusta* en presencia de los plásticos se realizó un ensayo en medio de cultivo líquido, bajo las mismas condiciones del tratamiento en medio sólido (ítem 5.4), excepto porque se usó caldo papa dextrosa (PD casero). Los plásticos seleccionados para este ensayo fueron aquellos que presentaron mayor pérdida de peso en medio sólido: PVC, PBAT y LDPE. El caldo papa-dextrosa (PD) se preparó utilizando 48 g de papa con cáscara cortada en trozos, los que se hirvieron en 2,4 L de agua destilada durante 30 min. La infusión obtenida se filtró a través de una gasa y se corrigió el volumen a 2,4 L. Luego se agregaron 4,8 g de dextrosa y se calentó a fuego lento, revolviendo constantemente durante 1-2 min hasta que la mezcla se volvió homogénea. Se ajustó el pH a 5 utilizando HCl 1 M y luego se dispensaron 150 mL de medio en matraces Erlenmeyer (250 mL). Una vez sellados con tapón de algodón-

gasa y papel aluminio, los matraces se esterilizaron durante 15 min a 121°C en autoclave Huxley 340.

Se recortaron tiras de cada tipo de plástico, y se les determinó el peso (g) de la misma forma ya descrita (ítem 5.3). En esta ocasión las tiras de plástico se esterilizaron en autoclave dentro de tubos Falcon, a 121°C durante 15 min, con excepción de PBAT que se autoclavó sólo durante 5 min, debido a sus propiedades. Bajo cámara de flujo laminar se dispusieron dos tiras de cada plástico en cada matraz conteniendo el medio PD, y luego los matraces se inocularon con dos discos de micelio-agar (5 mm) tomados de placas con crecimiento activo de *B. adusta* (10 días). El ensayo fue realizado en triplicado para cada condición, y los matraces fueron incubados durante 40 días en oscuridad a 24± 2°C. Los controles conteniendo los plásticos, y no inoculados, fueron preparados e incubados en idénticas condiciones.

A los 20 días de incubación, se tomó una alícuota de 10 mL de cada matraz para análisis de enzimas, proteínas y pH, y al finalizar el periodo de incubación (40 días) se separó la biomasa fúngica del medio líquido mediante filtración al vacío y utilizando papel filtro previamente seco y pesado. La biomasa fúngica se secó en estufa a 60°C durante 48 h para determinación del peso seco (g). A los caldos filtrados se les midió el pH y luego se almacenaron en tubos Falcon a 4°C hasta la determinación de las actividades enzimáticas. Las tiras de plástico fueron cuidadosamente separadas del medio de cultivo con ayuda de pinzas estériles y luego fueron lavadas, secadas y pesadas de la misma forma previamente descrita (ítem 5.5), para determinación de la pérdida de peso (%).

5.9 Determinación de Peroxidasas y Lacasas

La actividad de las enzimas peroxidasas y lacasas fue determinada siguiendo la metodología de Bourbonnais y Paice (1990), utilizando 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) como sustrato y para el caso de las peroxidasas, peróxido de hidrogeno (H₂O₂) como co-sustrato. La mezcla reaccional fue preparada adicionando a una cubeta de vidrio: 770 µL de tampón acetato de sodio 50 mM pH 3.6, 1000 µL de caldo enzimático, 30 µL de H₂O₂ 20 mM y 200 µL de ABTS 2

mM, para completar un volumen final de 2000 μ L. La mezcla se homogenizó invirtiendo la cubeta tapada e inmediatamente se colocó en el espectrofotómetro (TU-1810 Split Beam UV/Vis) para leer la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm durante 5 min, con intervalos de 10 s. La actividad de lacasa se determinó de la misma forma, excepto porque la mezcla reaccional no contenía H_2O_2 , y en su lugar se utilizó igual volumen de buffer. La actividad de peroxidasa y lacasa se expresó como μ moles de ABTS oxidado ($\epsilon_{420}=36.000 M^{-1} cm^{-1}$) por unidad de tiempo (UI/mL).

5.10 Concentración de proteínas solubles

La concentración de proteínas solubles fue determinada en los extractos enzimáticos por el método Bradford (1976), añadiendo 1mL de reactivo Bradford a tubos de ensayo y 100 μ L de los caldos enzimáticos. Luego de incubar durante 5 min a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a 595 nm. Los valores de absorbancia fueron transformados a concentración de proteínas (mg/mL) usando una curva de calibración preparada con Albúmina de suero bovino (BSA) 0,5 mg/mL.

5.1 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos consistieron en un análisis de homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Cochran C, Hartley, Bartlett y la significancia estadística utilizando la prueba de Tuckey con un $p < 0,05$ (análisis One-way ANOVA), a través del software Statistica v10. Para los análisis de % de pérdida de peso de los plásticos (tanto en medio líquido como en medio sólido) se realizó transformación de datos utilizando la función $\sqrt{\quad}$ (raíz cuadrada).

VI. Resultados

6.1 Tratamiento de los plásticos con *B. adusta* en medio de cultivo sólido

Dependiendo del tipo de plástico, se observaron diferentes comportamientos en la colonización y desarrollo micelial de *B. adusta* durante el periodo de tratamiento en medio sólido PDA (Fig. 3). Las primeras evaluaciones de los ensayos se realizaron a los 10 días de tratamiento, donde fue posible observar crecimiento micelial de *B. adusta* en todas las placas, más o menos abundante, dependiendo del tipo de plástico. Luego de 20 días, el crecimiento del micelio completó las placas, creciendo sobre las tiras de plástico y cubriéndolas casi totalmente. Finalizado el tiempo de tratamiento (40 días), el micelio aéreo algodonoso de *B. adusta* se observaba más denso. El desarrollo micelial aparente siguió la tendencia PE > PVC > LDPE ≈ PBAT > PP > nitrilo, siendo las placas que contenían PE donde se observó visualmente la mayor cantidad de micelio (Fig. 3).

A pesar de los tratamientos de desinfección de los plásticos y las condiciones de asepsia durante la preparación de las placas, se pudo observar desarrollo de contaminantes (bacterianos y/o fúngicos), tanto en las placas tratamiento como en las control. Sin embargo, las contaminaciones fueron mucho más evidentes en las placas control, que contenían los plásticos no inoculados, principalmente en PBAT, LDPE, PVC y nitrilo (Fig.3, placas control). Por el contrario, en las placas tratamiento aparentemente la presencia de *B. adusta* impidió el desarrollo de los contaminantes, o éstos fueron mínimos, como en el caso de las placas que contenían PVC y nitrilo en las cuales el crecimiento de los contaminantes se detuvo debido al crecimiento micelial de *B. adusta*, que se desarrolló sobre los contaminantes (Fig. 3).

A los 40 días, y al retirar las tiras de los diferentes plásticos tratados con *B. adusta*, se observó en el caso de LDPE, pérdida de la coloración roja original (Fig.4). En tanto, PVC

y nitrilo presentaron un cambio aparente en su textura, mostrándose más elásticas a la manipulación.

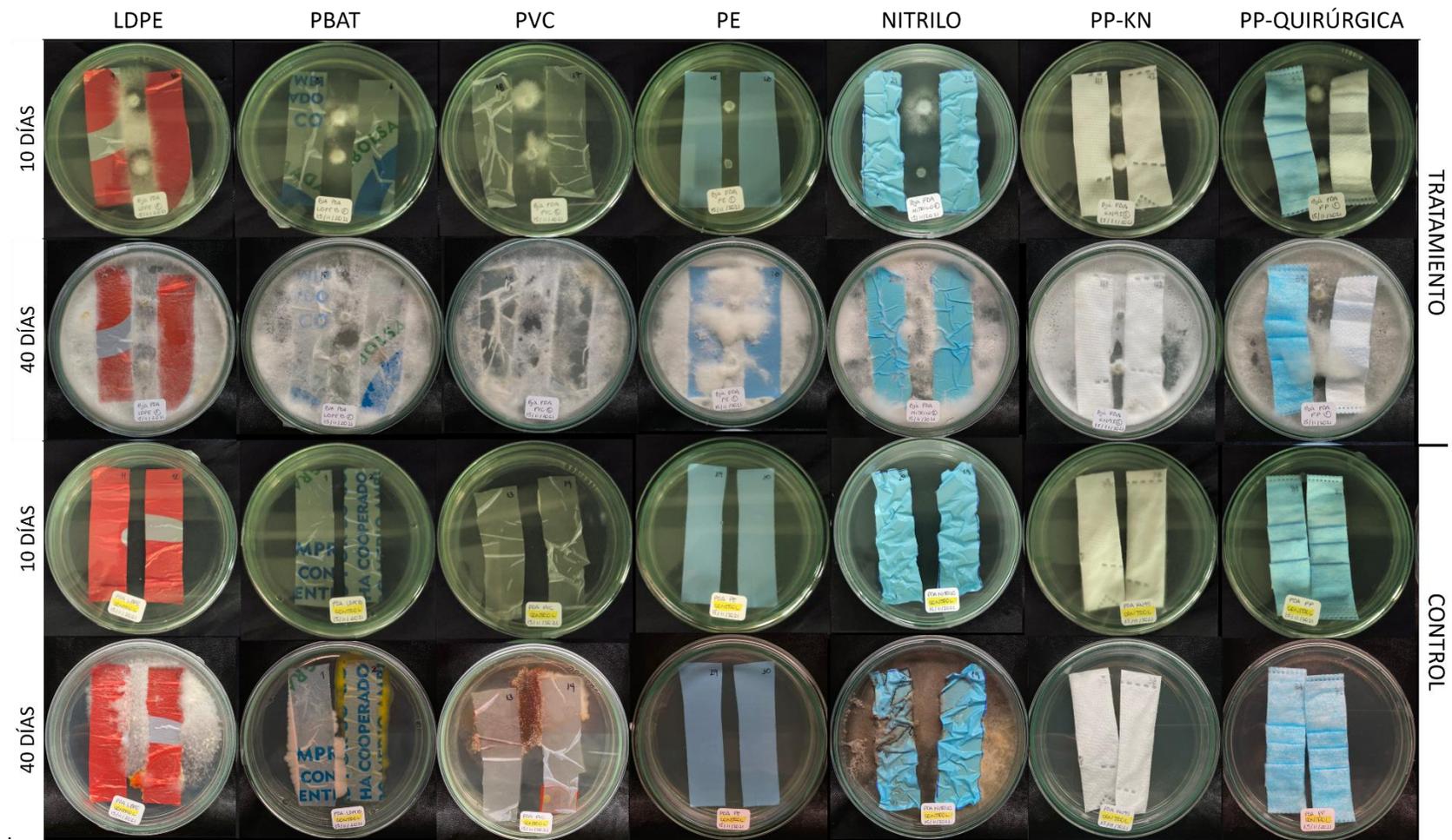


Figura 3. Crecimiento de *B. adusta* en las placas con medio PDA, en presencia de los diferentes plásticos, a los 10 y 40 días de incubación a 24°C (filas superiores), y las respectivas placas control, sin inocular, donde en algunos casos es posible observar la presencia de contaminantes (filas inferiores).

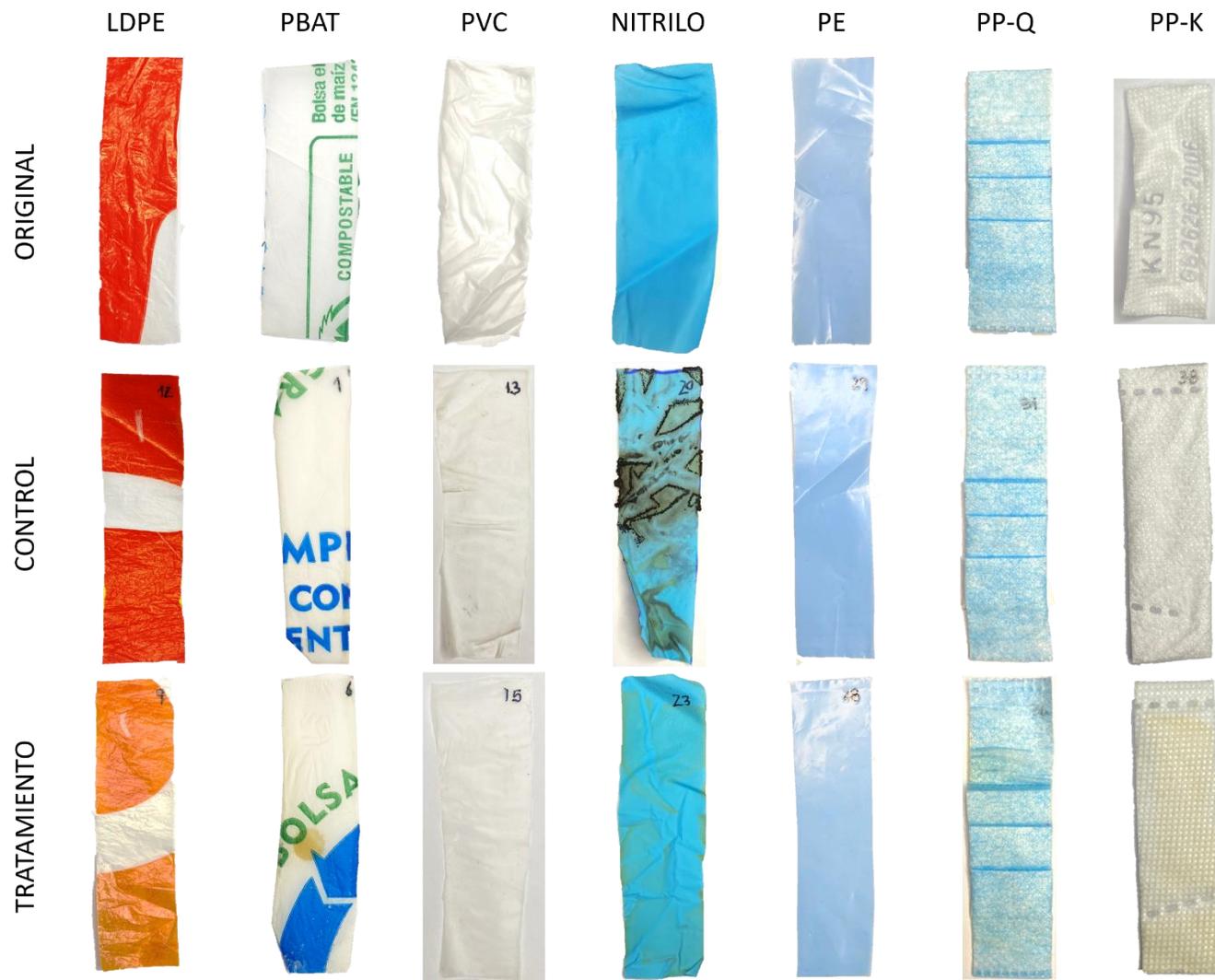


Figura 4. Aspecto de los plásticos sometidos a tratamiento. Fila superior: plásticos originales, fila intermedia: plásticos control sin inocular, fila inferior: plásticos después del tratamiento por 40 días con *B. adusta*.

Los resultados del tratamiento de los plásticos con *B. adusta* mostraron una pérdida de peso que siguió la tendencia PVC > PBAT > LDPE > NITRILO > PE, con una reducción máxima de 43,8% en PVC, significativamente diferente de la pérdida de peso respecto al PVC control (16,0%). Una pérdida de peso mínima de 1,9% fue obtenida con las muestras de PE, en tanto que los plásticos de tipo PP (mascarillas quirúrgicas y KN95), no presentaron pérdida de peso (Fig. 5). Entre los diferentes plásticos (sin considerar los controles), PVC presentó la mayor pérdida de peso, siendo diferente significativamente ($p > 0,05$) con todos los otros plásticos.

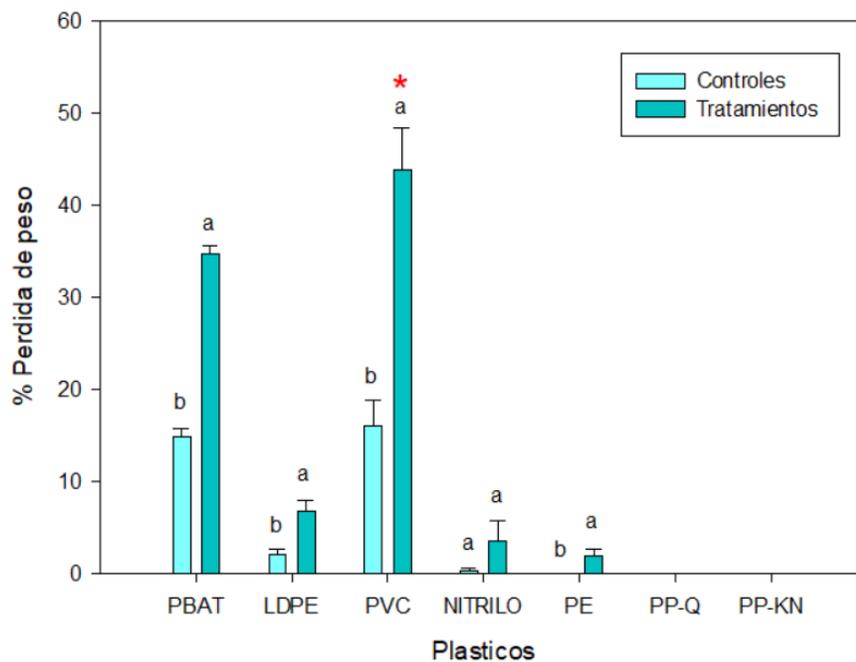


Figura 5. Pérdida de peso (%) de los plásticos tratados con *B. adusta*, durante 40 días de incubación en medio de cultivo sólido PDA. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos con su respectivo control ($p < 0,05$) (análisis ANOVA y prueba de Tuckey). (*) indica mayor pérdida de peso, significativamente diferente ($p < 0,05$) respecto a todos los otros plásticos tratados.

6.2 Análisis de modificaciones producidas en los plásticos tratados con *B. adusta* en cultivo sólido

Aquellos plásticos que presentaron las mayores pérdidas de peso luego del tratamiento con *B. adusta* (PVC, PBAT, LDPE), se seleccionaron para analizar posibles cambios estructurales a través de espectroscopía infrarroja, termogravimetría y microscopía electrónica.

6.2.1 Análisis de espectroscopía de FT-IR

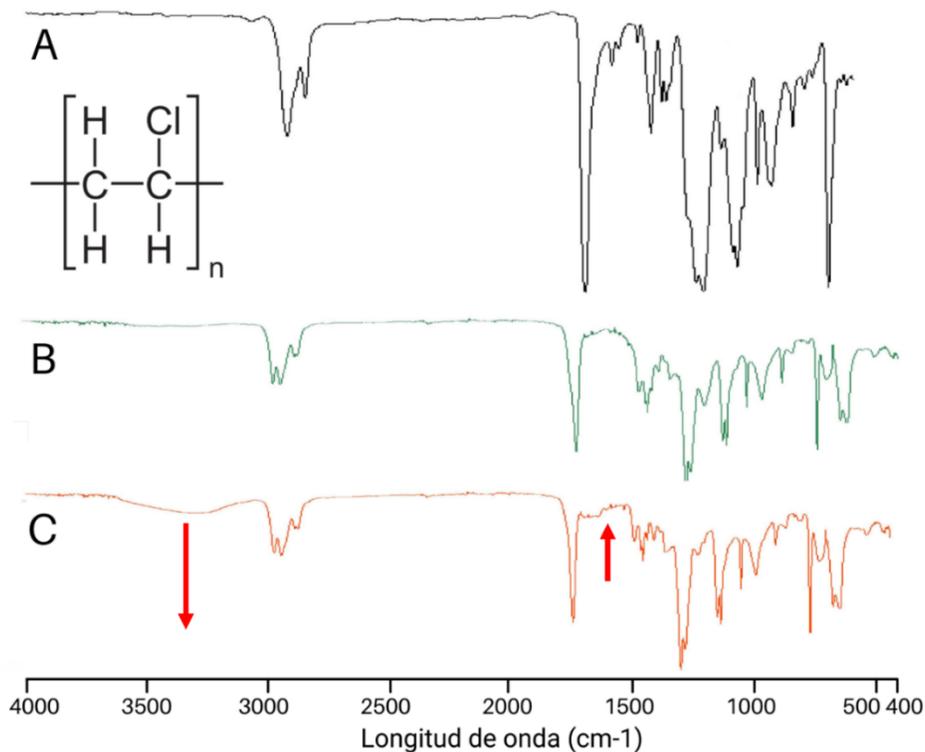


Figura 6. Espectros FT-IR de las muestras PVC original (A), muestra control no inoculada (B) y muestra tratada con *B. adusta* (C) por 40 días. Las flechas hacia abajo indican aumento en la intensidad de zonas de la curva, y las flechas hacia arriba indican disminución en la intensidad.

En la muestra de PVC original no sometida a tratamiento (Fig. 6A) se pueden observar bandas fuertes entre los 1000-1100 cm⁻¹ debido a la presencia de cloro en la estructura.

Entre los 2850-2900 cm^{-1} una banda de tensión de los enlaces -C-H; a 1750 cm^{-1} tensión correspondiente a grupos -C-C y a 720-730 cm^{-1} flexión de grupos metileno (-CH₂). Después de la biodegradación, se puede observar la formación de grupos -OH en la muestra de PVC tratada con *B. adusta* (Fig. 6C), formación que no se observa en la muestras original y control (Fig. 6A-B). A 1600 cm^{-1} se observa una disminución de un peak correspondiente al grupo -C-C. Entre los 2850 y 600 cm^{-1} se evidencia la reducción de la intensidad de todo el espectro, principalmente de la muestra tratada (Fig.6C), la muestra control también presentó un reducción menor en todo el espectro (Fig. 6B), indicando ruptura de los enlaces -C-H, -C-C, -C-Cl y -CH₂.

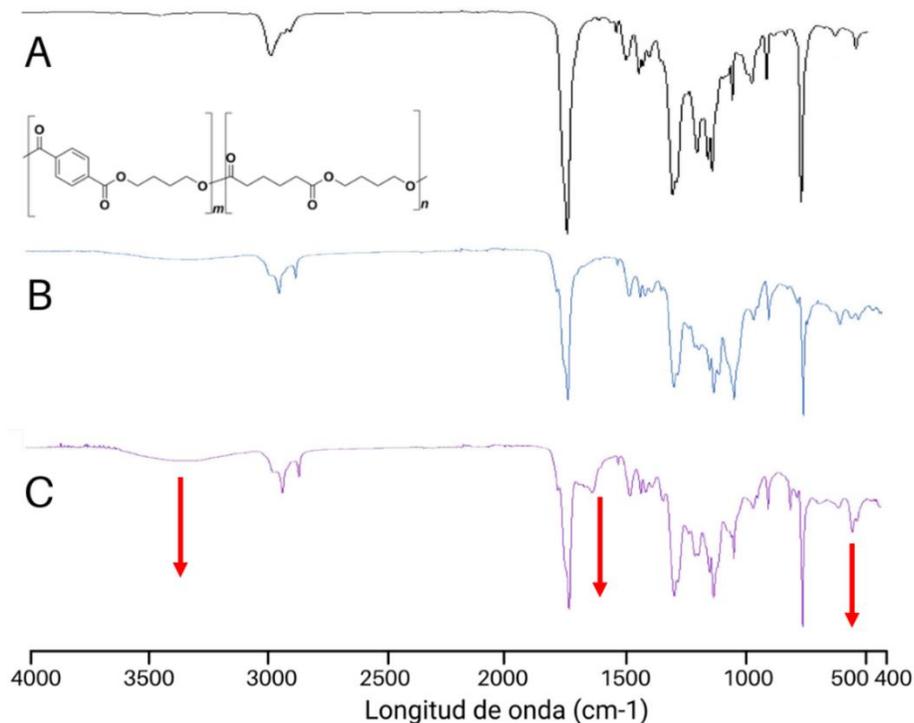


Figura 7. Espectros FT-IR de muestras PBAT original (A), muestra control no inoculada (B) y muestra tratada con *B. adusta* por 40 días (C). Las flechas indican aumento en la intensidad de zonas de la curva.

En el caso del material PBAT original (no sometido a tratamiento), se observan peaks a 2950 cm^{-1} que representa el estiramiento del metileno (-CH₂), a 1710 cm^{-1} que representa

el estiramiento de los grupos carbonilo (-C=O) y a 1507 cm^{-1} que corresponde al estiramiento del grupo -C=C- en el anillo del benceno. Los picos entre $1268\text{-}929\text{ cm}^{-1}$ corresponden a los enlaces -C-O- y 717 cm^{-1} representa la flexión del grupo -C-H del benceno (Fig. 7A). Después de la biodegradación, se puede observar entre los $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, la formación de grupos -OH en PBAT tratado con *B. adusta* (Fig. 7C), lo cual no se observa en la muestra control (Fig. 7B) o en la muestra original (Fig. 7A). A los 2950 cm^{-1} se puede observar un peak más débil (Fig. 7B-C) en comparación al plástico original (Fig. 7A). El peak de 1710 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo disminuye su intensidad después de la biodegradación en comparación al control y al plástico original. Luego de 40 días, las bandas se vuelven más débiles, indicando biodegradación.

En el caso del LDPE original (no sometido a tratamiento), se observan 3 bandas características del plástico: 2900 cm^{-1} , correspondiente a tensión de los enlaces metilo (-C-H), a los 1450 cm^{-1} correspondiente a enlaces C-C y a 750 cm^{-1} correspondiente a la flexión del enlace metileno (-CH_2) (Fig. 8A). Después de la biodegradación en el plástico LDPE tratado (Fig. 8C), el principal cambio se observa entre los $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ donde aparece la formación de grupos -OH , en la muestra control (Fig. 8B) no se observa formación de nuevos grupos funcionales. No se observan cambios significativos en las bandas características del plástico. Las bandas que aparecen a los 1640 cm^{-1} , 875 cm^{-1} y $650\text{-}420\text{ cm}^{-1}$ corresponden a ruido producido por el tinte de la muestra analizada (Fig. 4).

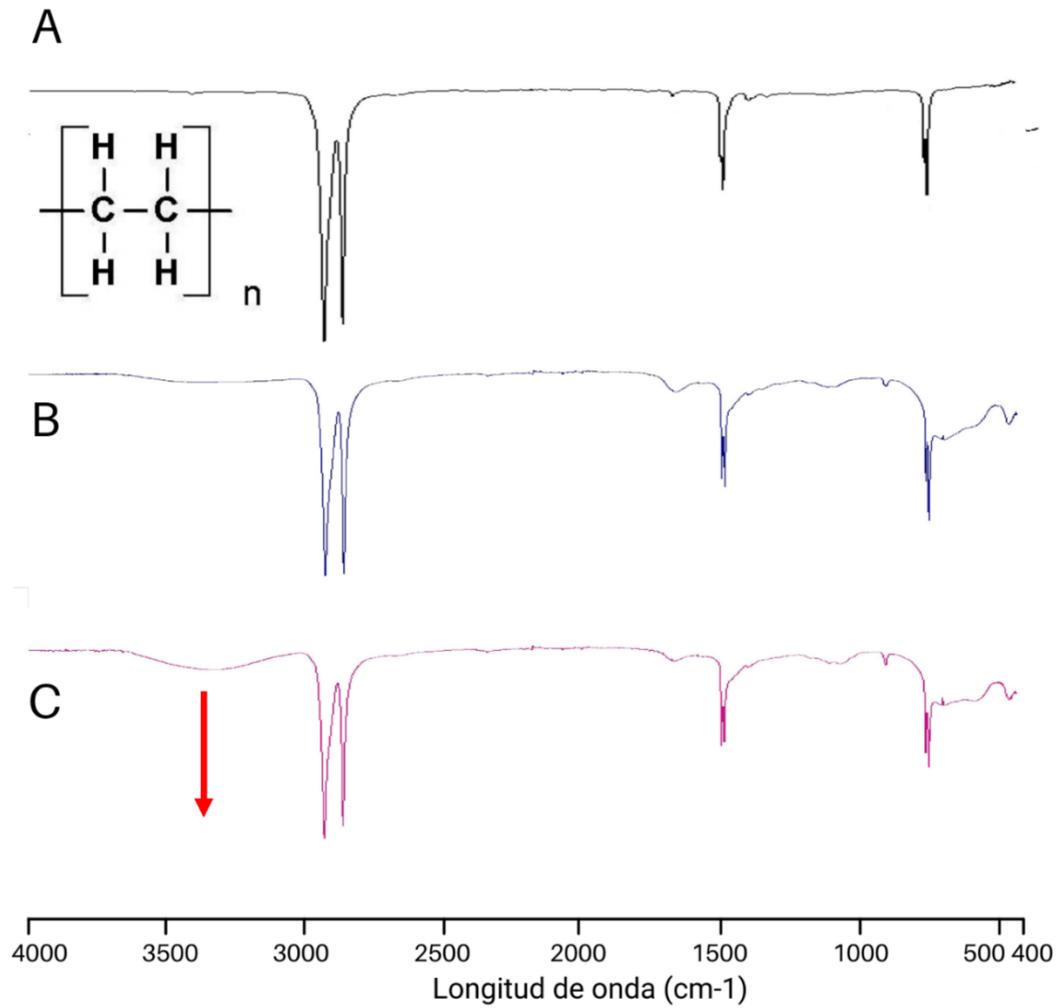


Figura 8. Espectros FT-IR de las muestras LDPE original (A), muestra control no inoculada(B), y muestra tratada con *B. adusta* por 40 días (C). Las flechas hacia abajo indican aumento en la intensidad de zonas de la curva.

6.2.2 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis de TGA en el plástico PVC tratado con *B. adusta* reveló una temperatura de inicio de degradación (T_0) de 212,68°C, donde comienza la degradación térmica, hasta los 473,83°C donde se registra la temperatura final de degradación (T_f), con un peak de temperatura de degradación (T_{deg}) correspondiente a 294,29°C (Fig. B), siendo ligeramente menor a la temperatura de degradación del PVC control (Fig. 9A) (Anexo 1), lo que indica que el tratamiento con *B. adusta* afectó la estabilidad térmica del plástico, reduciendo su temperatura de degradación. La pérdida de masa provocada por la temperatura fue de 73,56% en la muestra de PVC tratada y de 38,04% en el control, indicando que la muestra de PVC tratada con *B. adusta* tiene menor estabilidad térmica que el control respectivo (Fig. 9).

En el caso del plástico PBAT, luego de ser tratado con *B. adusta*, mostró una T_0 de 299,73°C, donde comienza la degradación térmica, hasta los 450,43°C donde se registra T_f , con un peak de T_{deg} correspondiente a 387,97°C (Fig. 10C), mostrando similitud en este caso con la T_{deg} de la muestra control, con 384,60 °C (Fig. 10B). Cabe destacar que la pérdida de masa de PBAT tratado con *B. adusta* fue del 100%, lo que indica que no quedaron residuos después del proceso, ya que el material se desintegró por completo debido a la temperatura aplicada. En la figura 10 B, se puede observar una pérdida de masa aparente del 129%, lo que luego corroborar con el analista, el valor es incorrecto y corresponde al 100%. La causa es un error del equipo, ya que la pérdida progresiva de masa se muestra en la curva de color verde, que cuando llega a cero, indica la pérdida total de masa de la muestra. Por otra parte, el plástico PBAT control mostró una pérdida de masa correspondiente a 93,34%, generando un residuo de 6,66% (Anexo 2). Los resultados revelan que la muestra de PBAT tratada con *B. adusta* tiene menor estabilidad térmica en comparación al control.

En el caso del plástico LDPE tratado con *B. adusta*, se obtuvo una T_0 de 313,15°C, donde comienza la degradación térmica, que aumenta hasta los 483,51°C donde se registra la T_f , con un peak de T_{deg} correspondiente a 411,71°C (Fig. 11C), siendo menor a la T_{deg} del LDPE control, con 447,71°C (Fig. 11B). La pérdida de masa resultante luego del proceso

térmico fue del 55,77% para LPDE tratado con *B. adusta*, semejante a la pérdida de masa del LDPE control (57,02%) (Anexo 3), sugiriendo estabilidades térmicas semejantes entre las muestras tratadas con el hongo y los controles respectivos.

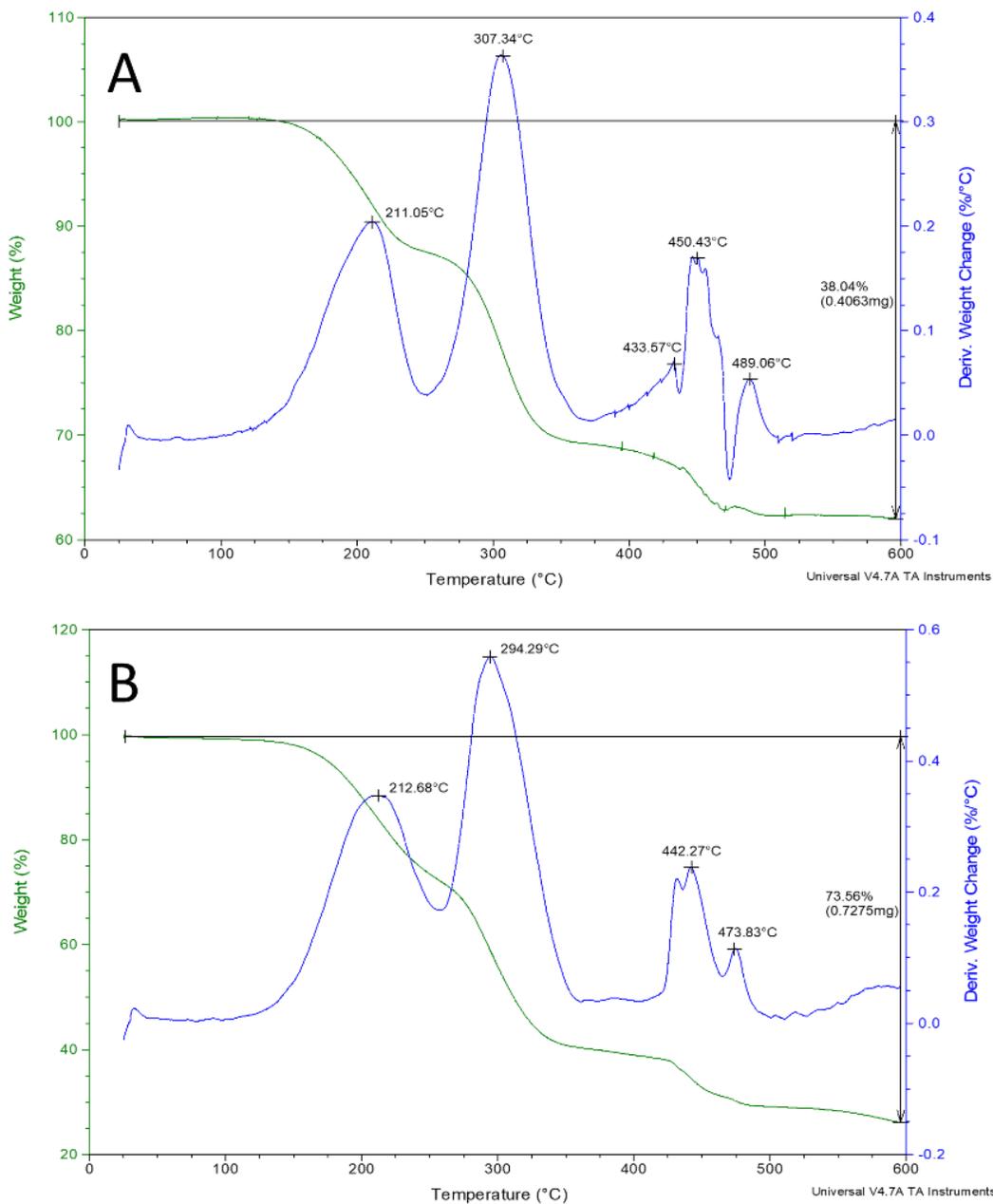


Figura 9. Termogravimetría (TGA) del plástico PVC control (A) y PVC tratado con *B. adusta* (B). La gráfica de color verde indica la curva de pérdida de masa (TG) y la curva azul representa la derivada del cambio de masa (DTG).

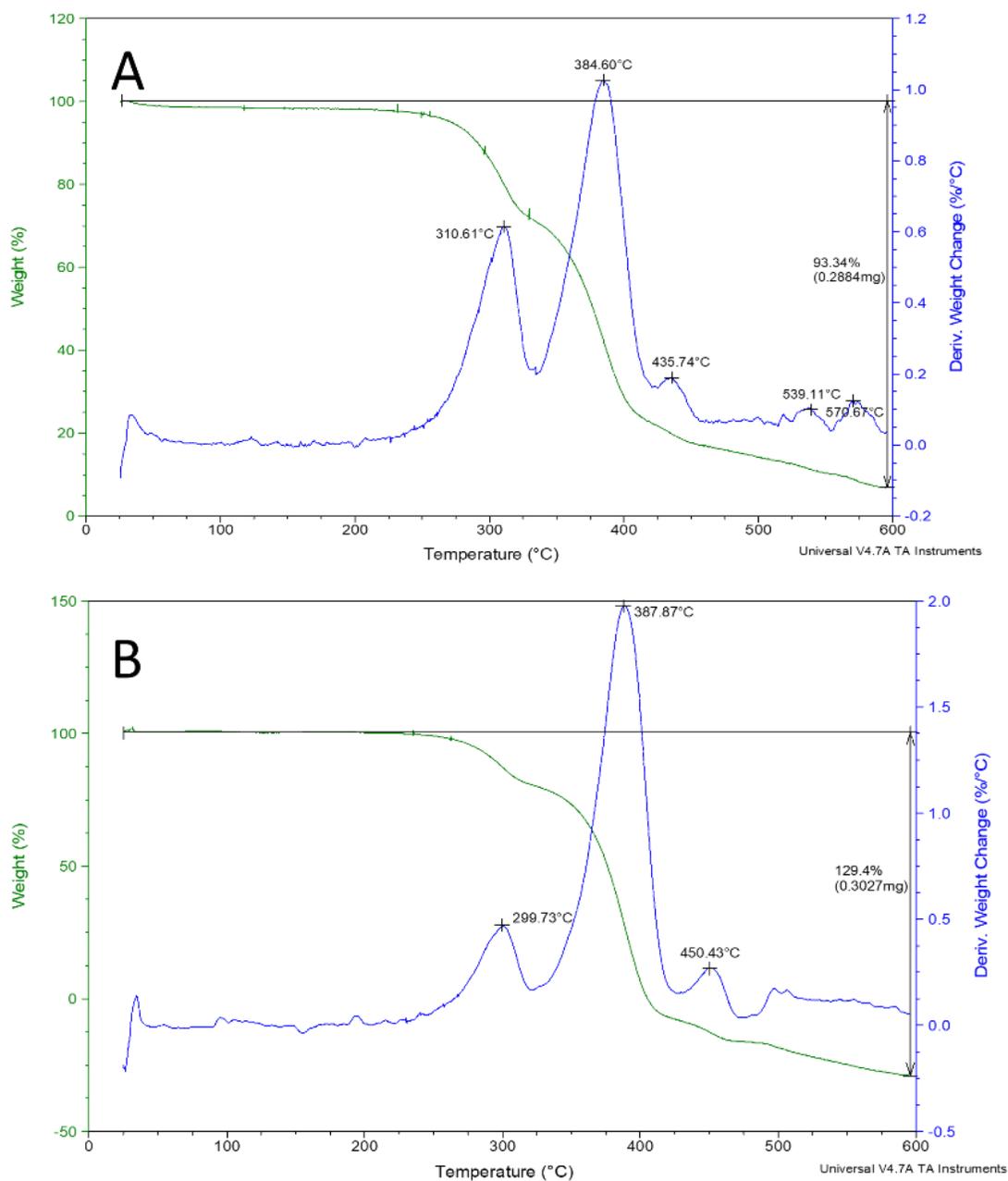


Figura 10. Termogravimetría (TGA) del plástico PBAT control (A) y PBAT tratado con *B. adusta* (B). La gráfica de color verde indica la curva de peso (TG) y la curva azul representa la derivada del cambio de peso (DTG).

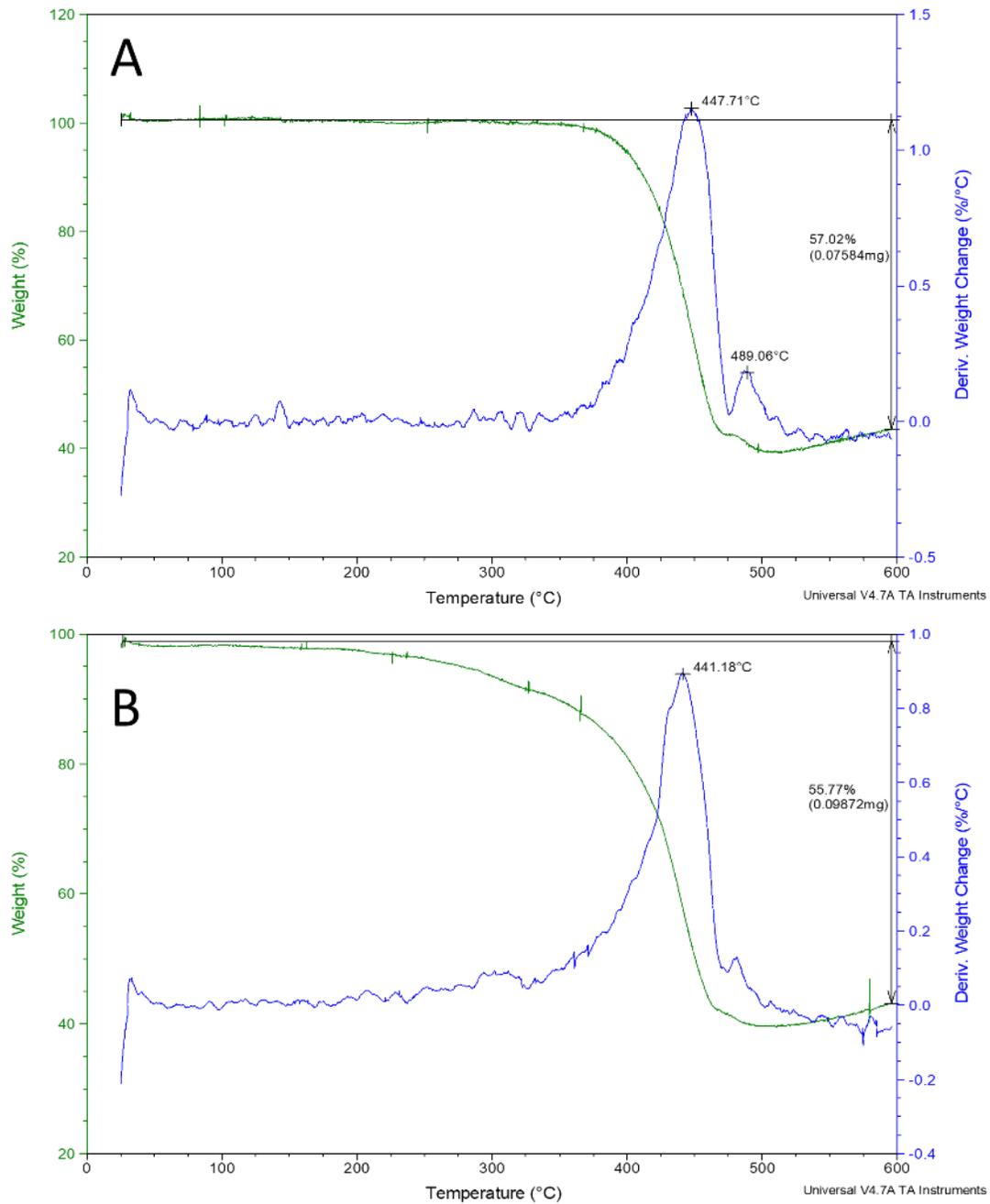


Figura 11. Termogravimetría (TGA) del plástico LDPE control (A) y LDPE tratado con *B. adusta* (B). La gráfica de color verde indica la curva de peso (TG) y la curva azul representa la derivada del cambio de peso (DTG).

6.2.3 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los análisis por microscopía electrónica de barrido de los plásticos luego de 40 días de tratamiento con *B. adusta* mostraron evidentes perforaciones en la superficie de los polímeros, que dependieron del tipo de plástico. En el caso de la muestra de PVC tratada, se pudieron observar numerosos agujeros en la superficie del material (Fig. 12 H-I). En tanto que en la muestra control, independiente de que presentara perforaciones, éstas fueron menos y de menor tamaño (Fig. 12 E-F), perforaciones que no están presentes en el plástico original (Fig.12 B-C).

La muestra de plástico PBAT, luego de 40 días de tratamiento con *B. adusta*, presentó agujeros considerables en la superficie (Fig. 13 H-I). En este caso, además, fue posible observar la aparición de cristales sobre la superficie del material (Fig. 13, indicados en círculos rojos), que posteriormente se caracterizaron por medio de espectroscopia de energía diferencial de rayos X (Fig. 14E), confirmando que se trataba de cristales de oxalato de Ca. Estos cristales no fueron detectados ni en el PBAT original ni en las muestras control (no inoculadas), indicando que fueron producto del crecimiento de *B. adusta*. Además, se puede observar la presencia de hifas (indicadas por flechas amarillas) (Fig. 14 B-C), en las zonas erosionadas de los plásticos, evidenciando el efectivo desarrollo del hongo en el material.

Luego de 40 días de tratamiento del plástico LDPE con *B. adusta*, se observaron perforaciones (Fig. 15G-I). También se observó la presencia de cristales de oxalato en la superficie del polímero, que no se observaron en el plástico original (Fig. 15A-C), pero si en el control (Fig. 15E) en menor cantidad, debido a las contaminaciones que presento. Además, no se observó ningún tipo de erosión ni perturbación en la superficie del control (15 E, F) ni plástico original (Fig. 15B, C).

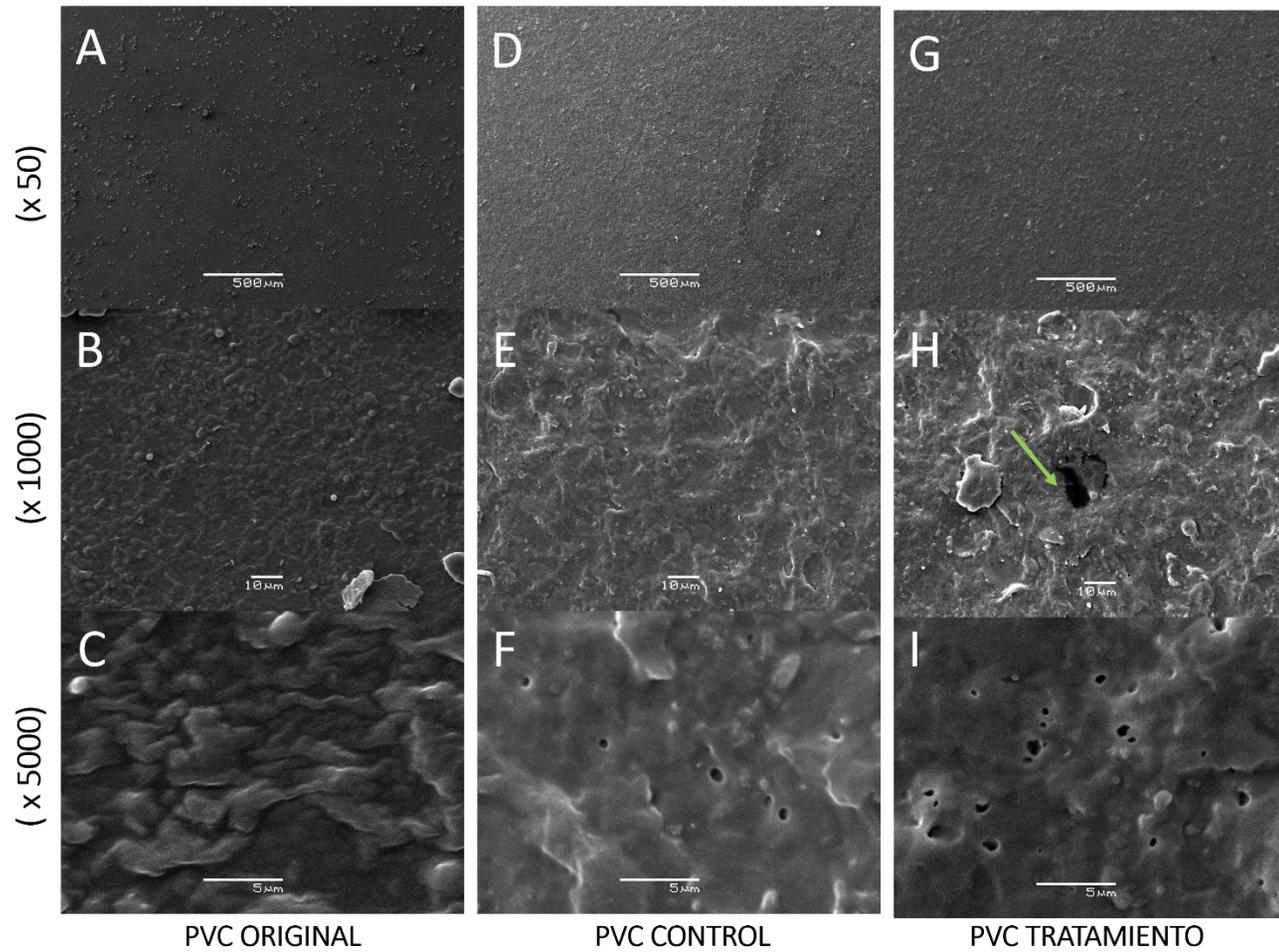


Figura 12. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico PVC original (A, B, C), muestras de PVC control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de PVC tratado con *B. adusta* en medio PDA (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico.

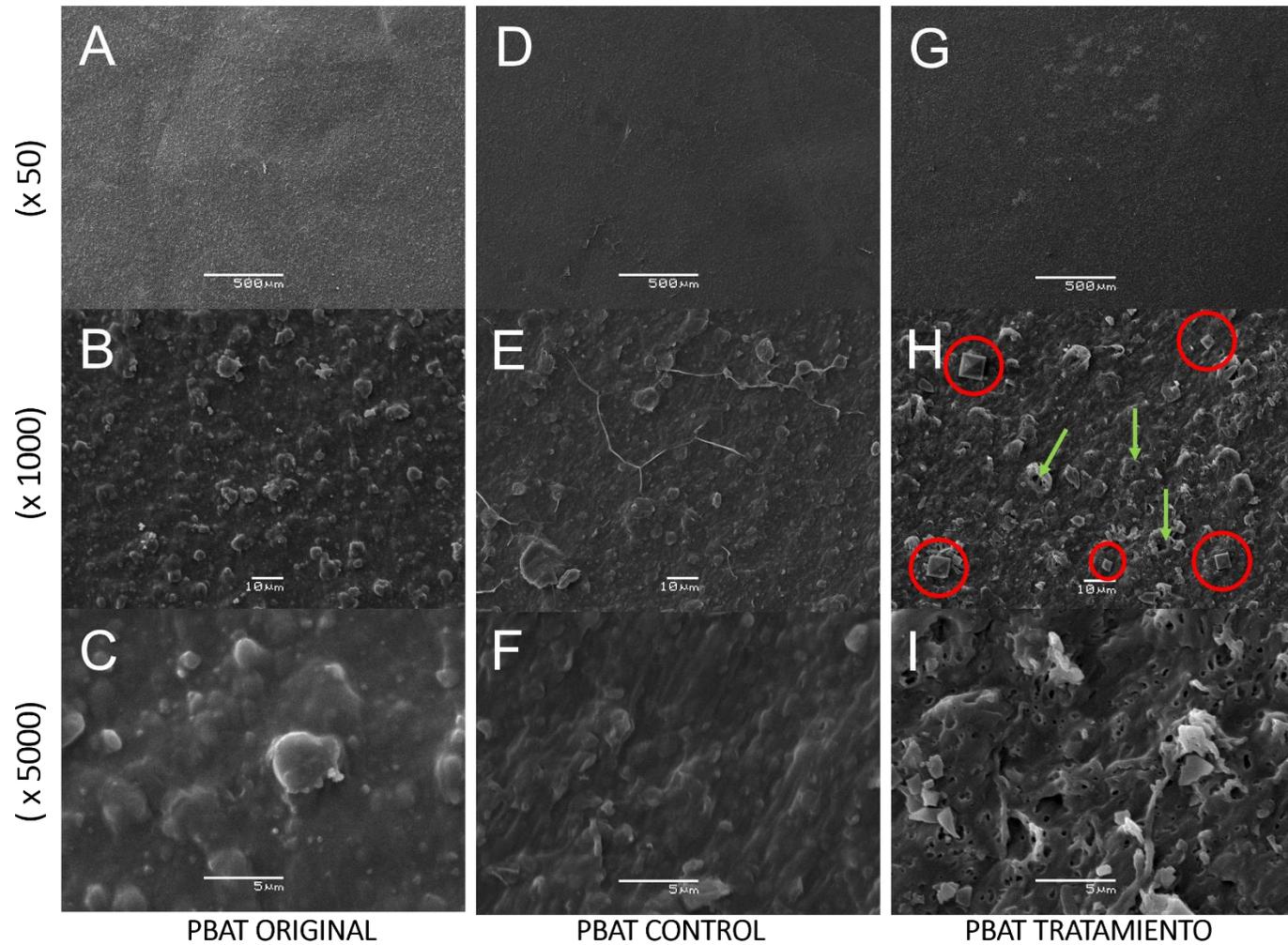


Figura 13. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico PBAT original (A, B, C), muestras de PBAT control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de PBAT tratado con *B. adusta* en medio PDA (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico y los círculos rojos indican la presencia de cristales de oxalato.

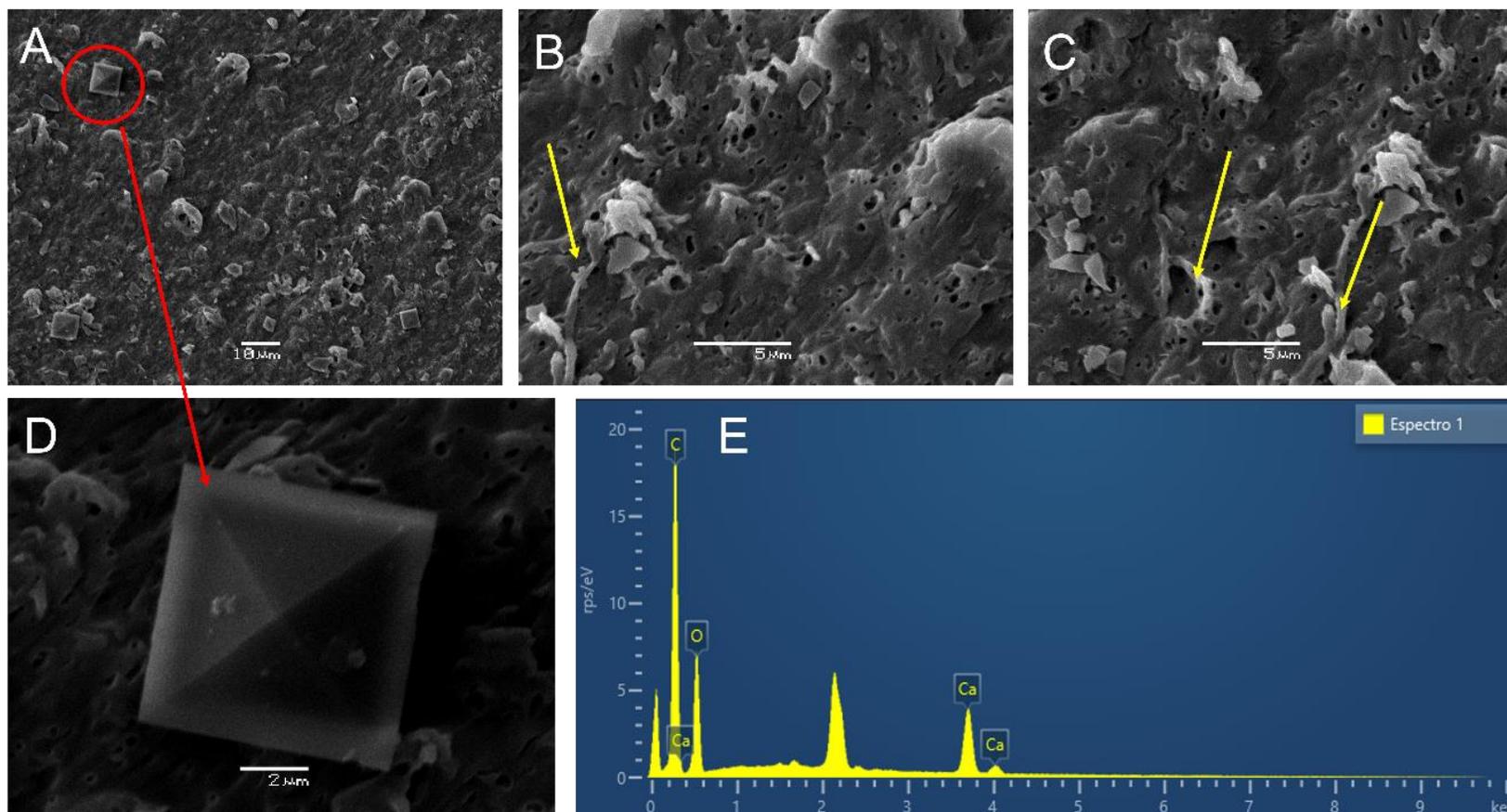


Fig 14. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de la muestra PBAT tratada con *B. adusta* mostrando la presencia de cristales de oxalato de calcio (A, D) y presencia de hifas (B, C). Análisis de espectroscopia de energía dispersiva de Rayos X para caracterización de los cristales (E).

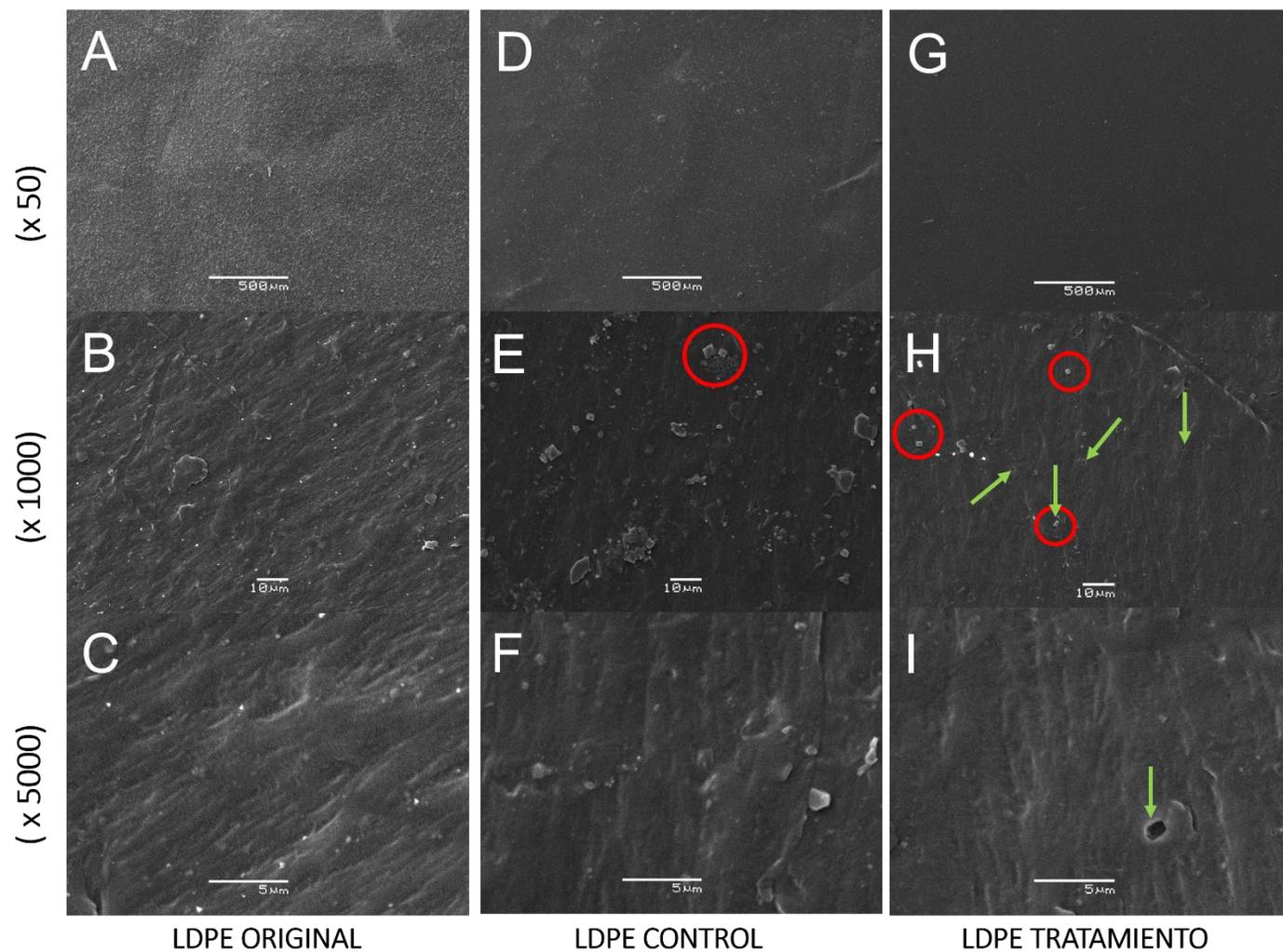


Fig 15. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico LDPE original (A, B, C), muestras de LDPE control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de LDPE tratado con *B. adusta* en medio PDA (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico y los círculos rojos indican la presencia de cristales de oxalato.

6.3 Tratamiento de los plásticos con *B. adusta* en medio de cultivo líquido

Aquellos plásticos que mostraron las mayores pérdidas de peso luego del tratamiento con *B. adusta* en medio de cultivo sólido PDA (PVC, PBAT y LDPE), fueron sometidos a tratamiento en medio líquido utilizando caldo PD, con la finalidad de evaluar el crecimiento del hongo, la pérdida de peso de los plásticos, y las enzimas extracelulares producidas por el hongo en presencia de los plásticos.

6.3.1 Crecimiento de *B. adusta* y pérdida de peso de los plásticos

El crecimiento micelial de *B. adusta* en presencia de plásticos se caracterizó por ser abundante, en comparación al control, e incluso creciendo sobre el plástico (Figura 16). A los 20 días, se observó un aumento significativo en crecimiento micelial en presencia de plásticos, especialmente en LDPE, dado que, al ser más ligero, flotaba y esto permitió que el micelio en la superficie se desarrollara en el plástico también. Mientras que en los plásticos PVC y PBAT se encontraban en el fondo del matraz envueltos por el micelio de *B. Adusta*. A los 40 días se pudo observar, un aumento considerable de micelio en presencia de PVC y PBAT, los cuales estaban envueltos por el micelio de *B. adusta*. En LDPE, se observó que el micelio crecía sobre la superficie del plástico (Fig. 16). El control de *B. adusta* sin plástico mostró un crecimiento más débil en comparación con los tratamientos. Los controles de plástico (sin inocular) no presentaron contaminaciones durante el proceso de incubación.

En presencia de los diferentes plásticos (PVC, PBAT y LDPE) el crecimiento micelial de *B. adusta* en medio líquido no presentó diferencias significativas (Fig. 16), al finalizar el periodo de incubación (40 días). La producción de biomasa en presencia de los plásticos estuvo en torno a los 40 mg, en tanto en los cultivos control de *B. adusta*, en ausencia de los plásticos, la biomasa alcanzada fue de 46 mg, a los 40 días.

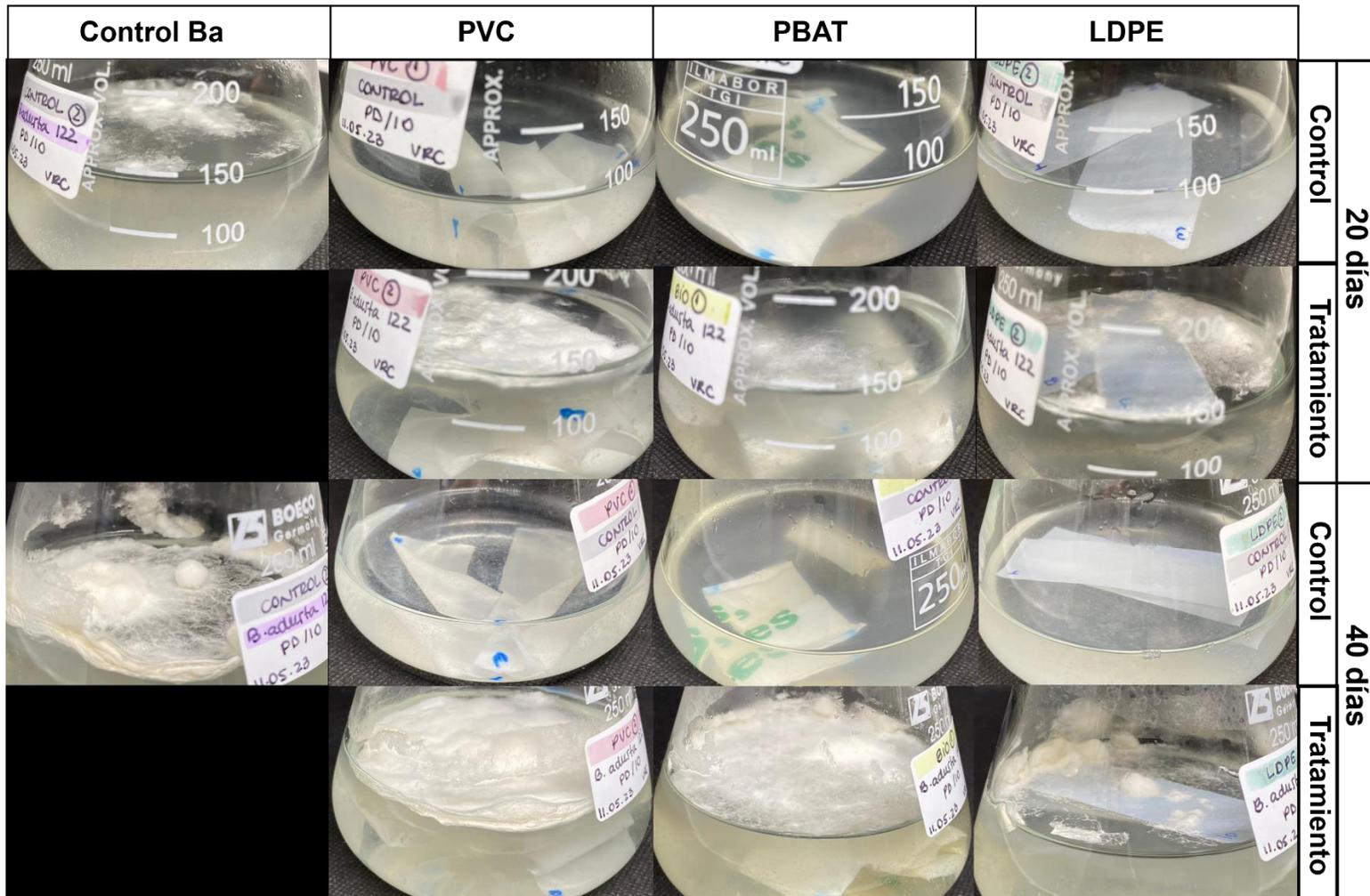


Figura 16. Crecimiento de *B. adusta* en matraces con medio PD, en presencia de los diferentes plásticos, a los 20 y 40 días de incubación a 24°C donde en algunos casos se puede observar el crecimiento micelial en la superficie del plástico, y las respectivas placas control, sin inocular.

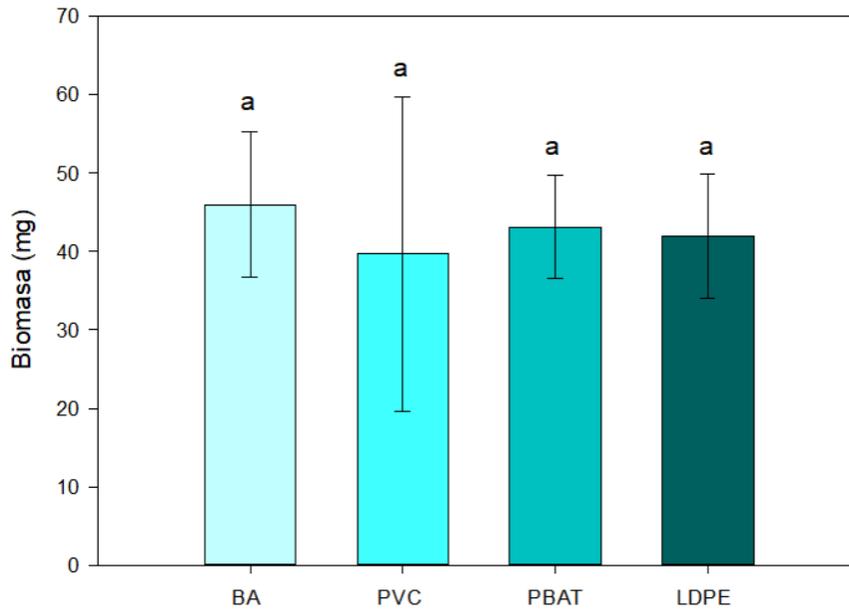


Figura 17. Crecimiento micelial (mg) de *B. adusta* en medio líquido PD en presencia de plásticos, a los 40 días de incubación. Letras diferentes sobre cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos con $p < 0,05$ (ANOVA, test de Tuckey).

Los resultados del tratamiento de los plásticos con *B. adusta* en medio líquido mostraron una pérdida de peso que tuvo la siguiente tendencia $PVC > PBAT > LDPE$ (Fig. 18), con la mayor pérdida de peso de 9,23% en PVC, significativamente diferente respecto a los otros plásticos. Al realizar la comparación de forma independiente de los plásticos respecto a sus controles, presentaron diferencias significativas, con excepción del plástico LDPE, que además mostró una mínima pérdida de peso.

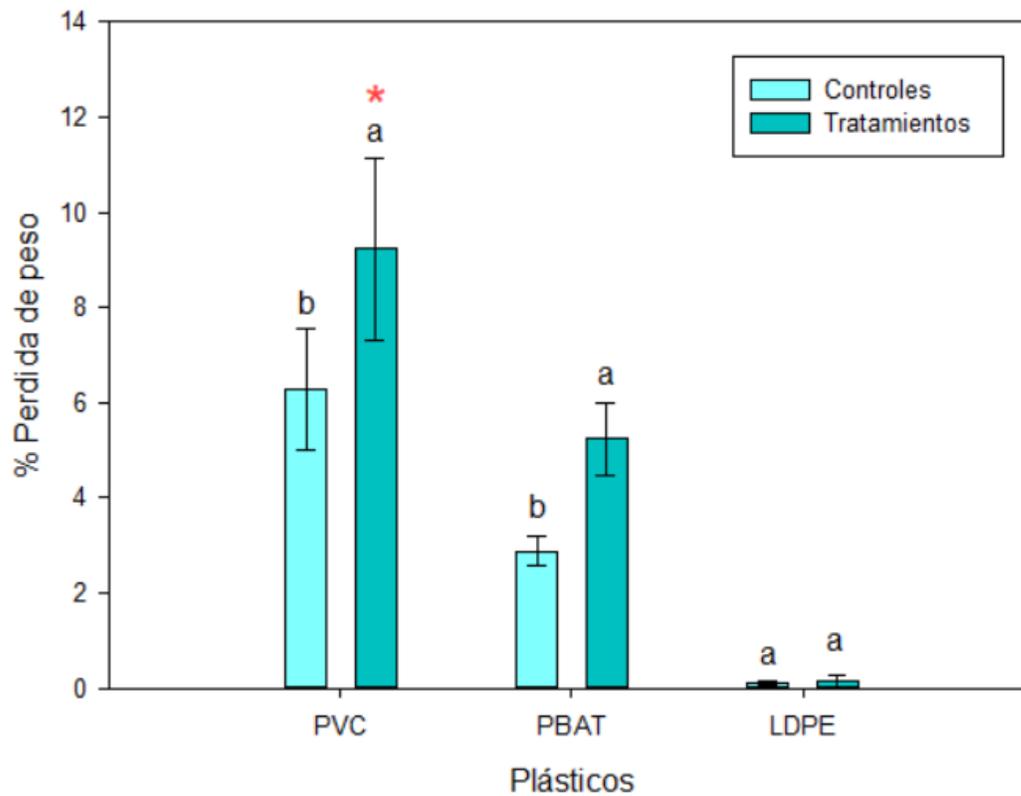


Figura 18. Pérdida de peso (%) de los plásticos tratados con *B. adusta*, durante 40 días de incubación en medio de cultivo líquido PD. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre cada tratamiento y su control respectivo ($p < 0,05$) (análisis ANOVA y prueba de Tuckey). (*) indica mayor pérdida de peso, significativamente diferente ($p < 0,05$) respecto a todos los otros plásticos tratados.

6.3.2 Determinación de actividad enzimática y contenido de proteínas solubles

Al determinar la actividad enzimática de peroxidasas y lacasas a los 20 y 40 días de incubación, en los caldos extracelulares de *B. adusta*, en presencia y ausencia de los plásticos, fue posible detectar actividad sólo de peroxidasa. En algunos casos la actividad de peroxidasa disminuyó entre los 20 y 40 días, pero en otros aumentó levemente (Tabla 2). Al finalizar el ensayo (40 días) en presencia del plástico LDPE se obtuvo la mayor actividad de peroxidasa, respecto a los otros plásticos y también respecto al cultivo control de *B. adusta* (ausencia de plásticos) (Tabla 2).

Las proteínas solubles en los caldos extracelulares, en ausencia o presencia de los plásticos, no mostraron diferencias importantes entre los diferentes caldos y días de tratamiento (Tabla 2). Los valores fueron bajos, siendo el caldo en presencia de PVC donde se detectó la mayor concentración de proteínas ($0,13 \pm 0,03$ mg/mL) a los 20 días de tratamiento (Tabla 2). En relación al pH de los caldos, no se observaron cambios importantes respecto al pH inicial de los medios de cultivo (pH = 5), en presencia o ausencia de los plásticos. La tendencia fue hacia una leve disminución respecto al pH inicial, siendo la mayor disminución detectada en el medio de cultivo en presencia de PVC (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad de peroxidasas, contenido de proteínas y cambios de pH en los caldos de *B. adusta* en presencia de los plásticos a los 20 y 40 días de tratamiento en medio de cultivo líquido PD.

	Peroxidasas (UI/L)		Proteínas solubles (mg/mL)		pH	
	20 días	40 días	20 días	40 días	20 días	40 días
Control Ba	0,42 ± 0,14	1,08 ± 0,29	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	4,8 ± 0,1	4,9 ± 0,1
PVC	1,08 ± 0,14	0,67 ± 0,72	0,13 ± 0,03	0,07 ± 0,01	4,5 ± 0,2	4,3 ± 0,1
PBAT	0,58 ± 0,29	0,50 ± 0,25	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,03	4,9 ± 0,1	5,0 ± 0,0
LDPE	0,58 ± 0,14	2,08 ± 2,10	0,10 ± 0,04	0,05 ± 0,00	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,2

Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas ± DE, medidos a los 40 días de incubación, pH inicial 5. Control Ba corresponde a los cultivos inoculados con el hongo, en ausencia de plásticos.

6.3.3 Análisis de SEM

Luego de 40 días de tratamiento con *B. adusta* en medio líquido PD, los plásticos fueron analizados por SEM, lo que reveló la presencia de perforaciones en la superficie de los polímeros, dependiendo del tipo de plástico. En las muestras de PVC tratadas con *B. adusta*, se pueden observar numerosas perforaciones en la superficie (Fig. 20 H-I), las cuales alcanzaron en muchos casos mayores tamaños que las que se observaron en las muestras control, y además se presentaron en mayor frecuencia (Fig. 20 E-F). Dichas perforaciones no se detectaron en la superficie del plástico PVC original (Fig. 20 B-C). Resultados semejantes fueron observados en el caso de las muestras de PBAT tratadas con *B. adusta* (Fig. 21 H-I), cuyas perforaciones fueron diferentes y más abundantes a las observadas en las muestras control (Fig. 21 E-F). Las grietas que se observan en las muestras control de PBAT, corresponden a la degradación del plástico en contacto con el medio líquido. Además, este presentó contaminaciones que pusiesen afectar.

En el caso de la muestra de LDPE tratada con *B. adusta* (Fig. 22 H-I), también se pueden observar pequeñas perforaciones, pero en menor cantidad en comparación con los plásticos PVC y PBAT. El control LDPE (Fig. 22 E-F) no presenta perforaciones en la superficie, así como tampoco el plástico original (Fig. 22 B-C).

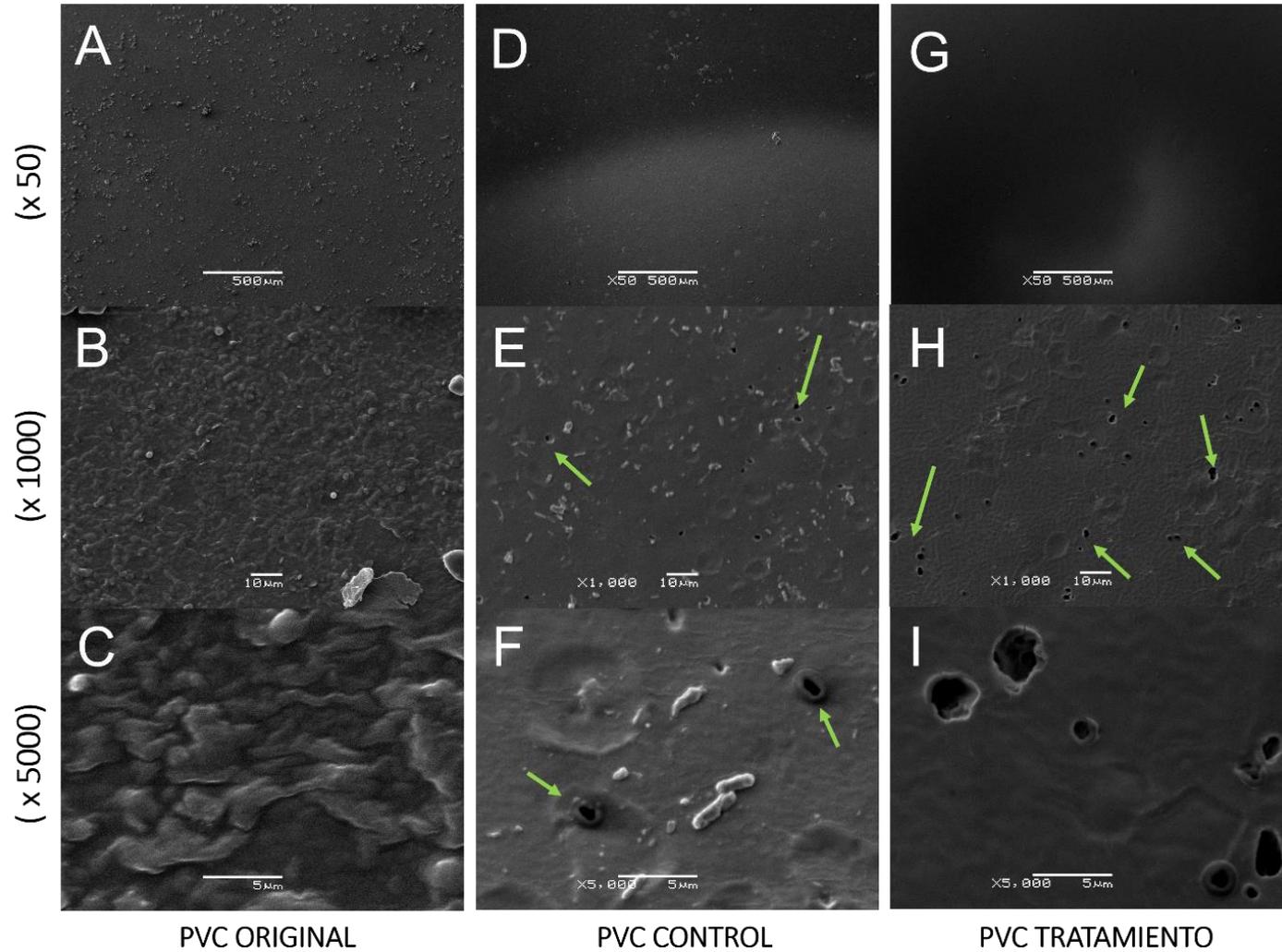


Fig 19. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico PVC original (A, B, C), muestras de PVC control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de PVC tratado con *B. adusta* en medio PD (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico.

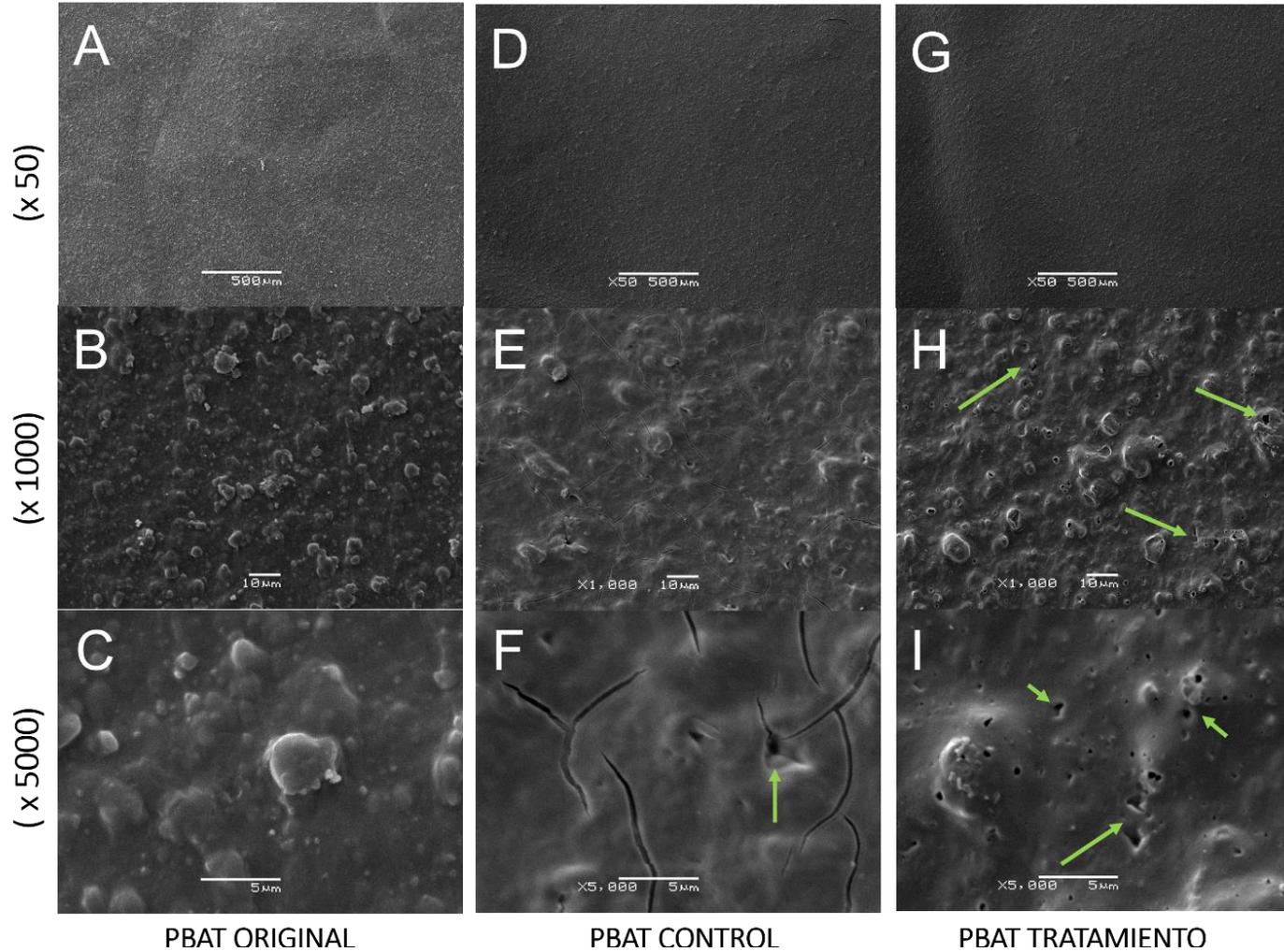


Fig 20. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico PBAT original (A, B, C), muestras de PBAT control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de PBAT tratado con *B. adusta* en medio PD (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico.

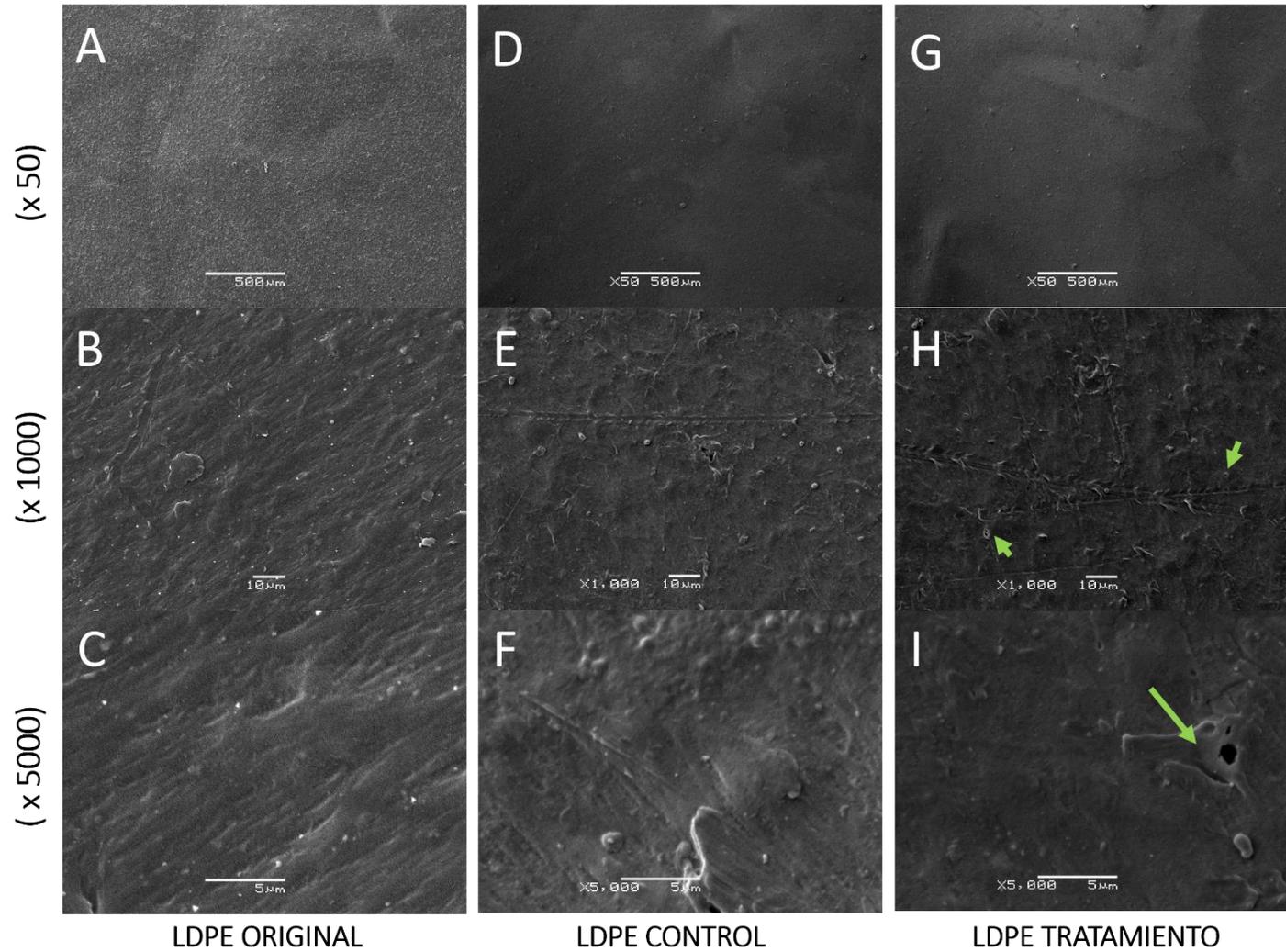


Fig 21. Microscopia electrónica de barrido (SEM) de muestras de plástico LDPE original (A, B, C), muestras de LDPE control (no inoculada) (D, E, F), y muestras de LDPE tratado con *B. adusta* en medio PD (G, H, I). Las flechas indican perforaciones en la superficie del plástico.

VII. Discusión

El uso indiscriminado del material plástico en el desarrollo de diversos artículos desechables genera gran acumulación de estos residuos, provocando graves problemas al medio ambiente (Shams et al. 2021). La búsqueda de alternativas viables y ecológicas de tratar estos residuos se presenta como una solución a largo plazo, para el tratamiento final de estos materiales, y fue el motivo de esta tesis.

En este estudio se utilizó una cepa nativa (122) del hongo de pudrición blanca *Bjerkandera adusta* debido a su capacidad enzimática de degradar polímeros naturales como la lignina (Tripathi et al. 2012), siendo un compuesto recalcitrante, así como los tintes industriales (Eichlerová et al. 2007). Además, la cepa 122 del hongo había demostrado previamente capacidad de producir enzimas lignocelulolíticas en ensayos cualitativos (Guillen et al. 2011). Estos antecedentes nos permitieron poner a prueba la capacidad de este hongo de degradar plásticos sintéticos, así como otros autores lo han realizado previamente con *Pleurotus ostreatus* (da Luz et al. 2013) y *Trametes versicolor* (Dussault et al. 2017), también de pudrición blanca. *B. adusta* 122 demostró capacidad para crecer y provocar modificaciones en diversos tipos de plásticos, donde el crecimiento micelial y la colonización de los materiales sintéticos, fueron importantes luego de 40 días de tratamiento, en medio sólido papa-dextrosa (PDA).

En cuanto a la pérdida de peso (%) de las muestras de los plásticos provocada por *B. adusta* en cultivo sólido, la tendencia fue PVC > PBAT > LDPE > NITRILO > PE, tendencia que se repitió en medio líquido (PVC > PBAT > LDPE), destacando la mayor pérdida de peso en PVC (43,6% en medio sólido, 9,23% en medio líquido). El análisis de pérdida de peso es el método principal para detectar biodegradación en polímeros sintético, tipo plásticos (Fleming 1998), donde los microorganismos atacan la superficie de los polímeros dando inicio al proceso de degradación por medio de la secreción de enzimas extracelulares y alterando la integridad de los polímeros, lo que conduce a la pérdida de peso (Srikanth et al. 2022). La reducción del peso de las muestras revela que

B. adusta tiene la capacidad de degradar las muestras de PVC, PBAT y LDPE principalmente.

La capacidad de degradación de PVC fue evaluada en *Phanerochaete chrysosporium*, un hongo de pudrición blanca (Ali et al. 2014), donde además de observarse una importante producción de biomasa en presencia de películas de PVC, *P. chrysosporium* produjo una reducción significativa en el peso molecular del PVC (178,292 Da) en comparación a su control (sin inocular) (200,000 Da), la que fue corroborada a través de análisis cromatografía de permeación en gel (GPC), FT-IR y resonancia magnética nuclear, revelando cambios estructurales en el plástico. En el estudio de Vivi et al. (2019) utilizando *Chaetomium globosum* no se observaron pérdidas de peso significativas en el PVC tratado, solo 9% de pérdida de peso, pero al realizar los análisis SEM, se observaron agujeros y erosiones en la superficie del plástico, es por esto que los autores sugieren que la degradación del PVC podría alcanzar cambios notables si se aumentara el tiempo de tratamiento, ya que solo se incubaron por 28 días (Vivi et al. 2019). Una herramienta fundamental en el estudio de la biodegradación de plásticos corresponde al FT-IR, el cual identificaría cambios químicos en los materiales producto del proceso de biodegradación (Sandt et al. 2021). Los resultados de análisis FT-IR muestran que la estructura química de los plásticos analizados cambió, después de la biodegradación con *B. adusta*. La formación de grupos -OH en las tres muestras tratadas con *B. adusta* (PVC, PBAT y LDPE) sugieren una ruptura de enlaces, lo que podría indicar un proceso de despolimerización y fragmentación de la estructura del polímero, haciéndolo más susceptible a la degradación (Gao et al. 2022; Okal et al. 2023). Además, en la muestra de PVC tratado se observó una disminución de la banda correspondiente al enlace C-C a 1600 cm^{-1} , lo que respalda la idea de una posible ruptura de enlaces. Entre los 2850 y 600 cm^{-1} se observa una disminución en la intensidad del espectro, lo que indica una degradación del plástico (Gómez-Mendez et al. 2018). Da Luz et al. (2013) probaron la capacidad de *P. ostreatus* para degradar bolsas de PE, sin tratamiento físico previo, y utilizándolas como único sustrato. En 45 días de tratamiento los autores evidenciaron degradación en la superficie del plástico y además por medio de FT-IR, observaron la

formación de grupos – OH y enlaces C-O, los que indican degradación en la estructura del plástico. Los autores afirman que estas alteraciones pudieron ser debidas a la actividad enzimática producida por *P. ostreatus*, donde además los autores observaron degradación de los tintes de las bolsas plásticas (Da Luz et al. 2013).

Otra técnica útil para la detección de modificaciones producidas por hongos en los plásticos es el análisis de SEM, que en este caso reveló que los plásticos tratados con *B. adusta* en medio sólido se vieron afectados por la acción del hongo, en un periodo de 40 días. Se observaron numerosas perforaciones, principalmente en el plástico PVC, en tanto los plásticos PBAT y LDPE también presentaron perforaciones, pero en menor cantidad y tamaño. Esto indica que *B. adusta* por medio de la colonización en la superficie del plástico, generó desgaste y erosión en la superficie del polímero plástico. Los plásticos tratados con *B. adusta* en medio líquido también revelaron perforaciones en la superficie, siendo más notorias en PVC y PBAT que en LDPE. Estos hallazgos sugieren que *B. adusta* tiene la capacidad de modificar la superficie de los plásticos.

Se pueden observar resultados similares de erosiones en la superficie del PVC luego del tratamiento con *P. chrysosporium* (Ali et al. 2014) y con *C. globosum* (Vivi et al. 2019). En plásticos menos complejos como PE (de baja y alta densidad) existe evidencia de biodegradación con hongos de pudrición blanca como *B. adusta* (Kang et al. 2019), degradando HDPE, donde a través de microscopía electrónica evidenciaron la erosión en el material por acción del hongo.

En este estudio, se observó que en el proceso de biodegradación se formaron cristales de oxalato de Ca en la superficie del plástico PBAT tratado, y en menor cantidad en LDPE. La formación de cristales de oxalato de Ca por los hongos pudridores de madera es una estrategia metabólica que les permite degradar la lignina, utilizando la madera como fuente de nutrientes (Shimada et al. 1994; Schilling y Jellison, 2007), y además también pueden utilizar esta estrategia como mecanismo de defensa y para regular el pH del medio para la acción de las enzimas (Hatakka y Hammel, 2010; Guggiari et al. 2011).

Los análisis de termogravimetría revelaron que la estabilidad térmica fue menor en la muestra del plástico PVC tratado con *B. adusta*, presentando una T_{deg} 294,29 °C, 13°C menor a la muestra control (sin tratamiento fúngico). La muestra PBAT tratado con *B. adusta* no presentó diferencias significativas entre su control ya que solo presento una diferencia de 3°C (PBAT control: 384,60°C/ PBAT tratado: 387,97°C). En el caso de LDPE tratado con *B. adusta*, presento una diferencia de 36°C grados con su control (LDPE control: 447,71°C/ LDPE tratado: 411,18°C). Esto indica que la acción del hongo afecto en la estabilidad térmica del plástico LDPE y PVC. Una menor estabilidad térmica indica que el material es más susceptible a la degradación o descomposición debido al calor (Kanwal et al. 2022), sugiriendo en este caso que la acción del hongo fue responsable de la menor estabilidad térmica. Khan et al. (2022) analizaron las muestras de plástico LDPE tratadas con el hongo *Penicillium citrinum* luego de 90 días, obteniendo como resultado que la estabilidad térmica era menor a los controles sin tratar. Malacova et al. (2020) reportaron resultados similares en presencia de *Trichoderma hamatum*, donde la estabilidad térmica de LLDPE (polietileno lineal de baja densidad) resultó menor en comparación a su control, sin tratar, luego de 60 días.

En una segunda etapa, los plásticos PVC, PBAT y LDPE fueron sometidos a tratamiento con *B. adusta*, esta vez en medio líquido papa dextrosa (PD), con la finalidad de detectar algunas enzimas extracelulares que podrían estar relacionadas con la acción modificadora de plásticos de *B. adusta*. En los caldos extracelulares de *B. adusta* luego de 20 y 40 días de cultivo en presencia de los plásticos no fue posible detectar actividad de lacasas. Estos resultados difieren de lo que indican investigaciones previas sobre la producción de lacasas por hongos pudridores de madera en la degradación de lignina (Janusz et al. (2020), Thurston, 1994) como lo es *B. adusta* (Nakamura et al. 1999). Se ha descrito la acción de lacasas en la biodegradación de plásticos como en PE (Sowmya et al. 2014) donde el plástico se trató con lacasas fúngicas de *Trichoderma harzianum* (10,71 UI/L) obteniendo una reducción de su peso (0,5%) en 10 días de incubación. En la degradación de HDPE, se detectaron la lacasas en el proceso de biodegradación del

plástico (Kang et al. 2019), las cuales según los autores podría estar involucrada en el proceso de degradación de HDPE.

En presencia de PVC, fue posible detectar la mayor actividad de peroxidasas en el caldo extracelular de *B. adusta* a los 20 días de tratamiento (1,08 UI/L), y a los 40 días una alta actividad de peroxidasa fue detectada en presencia de LDPE (2,08 UI/L). Los valores de actividad de peroxidasas en ambos periodos fueron bajos para considerar la acción de estas enzimas en la degradación de estos plásticos. Las peroxidasas, usualmente utilizadas para degradar lignina por los hongos pudridores de madera, han demostrado capacidad para la degradación de algunos plásticos. Khatoon et al. (2019) utilizando peroxidasas purificadas de *P. chrysosporium* para degradar PVC obtuvieron una pérdida de peso del plástico del 31% a las 4 semanas de tratamiento. Sowmya et al. (2014), utilizando peroxidasas producidas por *T. harzianum* (10,80 UI/L) obtuvieron una reducción del 0,6% de la masa de PE en 10 días de incubación. Un basidiomiceto estudiado en la degradación de PE (LDPE) es *Pleurotus ostreatus* (da Luz et al. 2013), donde se utilizó el plástico como sustrato y se analizaron las actividades enzimáticas, donde la mayor actividad detectada fue de peroxidasas a los 90 días con 70,76 U/g.

Este estudio demostró el potencial de *B. adusta* (cepa 122) como una alternativa prometedora para abordar la contaminación por plásticos. Podría ser una solución sostenible para el tratamiento de desechos plásticos debido a su capacidad de colonizar una variedad de plásticos y generar cambios físicos y químicos como se observaron en PVC, PBAT y LDPE. A pesar de que solo se logró identificar peroxidasas involucradas en la degradación, es necesario investigar más sobre el potencial enzimático de *B. adusta* en la degradación de plásticos.

VIII. Conclusiones

- Este estudio demostró que *B. adusta* puede colonizar y desarrollar micelio sobre varios tipos de plásticos, con impactos en la estructura química, estabilidad térmica y superficie física de los polímeros que resultó con diversas perforaciones, principalmente en PVC y PBAT.
- Los plásticos tratados con *B. adusta* en medio sólido y líquido mostraron una reducción de peso a los 40 días de incubación que siguió la tendencia PVC > PBAT > LDPE, con los mayores valores de pérdida de peso de 43,8% en medio sólido y 9,23% en medio líquido.
- A través de los análisis enzimáticos fue posible detectar actividad de peroxidasa en los caldos extracelulares de *B. adusta*, a los 20 y 40 días de tratamiento de los plásticos, principalmente en presencia de PVC y LDPE. Sin embargo, bajo las mismas condiciones no fue posible detectar actividad de lacasa.
- Es importante destacar que una variedad de factores, incluida la naturaleza química de los plásticos, las condiciones del medio de cultivo, la interacción entre el hongo y el material, pueden afectar la actividad enzimática. Es posible que *B. adusta* degrade o modifique los plásticos utilizando otros mecanismos o enzimas que no fueron evaluados en este estudio.

IX. Bibliografía

- Ali MI, Ahmed S, Robson G, Javed I, Ali N, Atiq N, Hameed A (2014) Isolation and molecular characterization of polyvinyl chloride (PVC) plastic degrading fungal isolates. *Journal of Basic Microbiology* 54: 18-27
<https://doi.org/10.1002/jobm.20120046>
- Ali SS, Elsamahy T, Koutra E, Koenaros M, El-Sheekh M, Abdelkarim E, Zhu D, Sun J (2021a) Degradation of conventional plastic wastes in the environment. A review on current status of knowledge and future perspectives of disposal. *Science of the Total Environment* 771 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144719>
- Ali SS, Elsamahy T, Al-Tohamy R, Zhu D, Mahmoud YAG, Koutra E, Metwally MA, Kornaros M, Sun J (2021b) Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, Challenges and Future prospects. *Science of the Total Environment* 780 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146590>
- Alvarez-Barragau J, Dominguez-Malfavon L, Vargas-Suarez M, Gonzalez-Hernandez R, Aguilar-Osorio G, Loza-Tavera H (2016) Biodegradative Activities of Selected Environmental Fungi on a Polyester Polyurethane Varnish and Polyether Polyurethane Foams. *Applied and Environmental Microbiology* 82 <https://doi.org/10.1128/AEM.01344-16>
- Anastasi A, Tigrini V, Varese GC (2013) The Bioremediation Potential of Different Ecophysiological Groups of Fungi. *Fungi as Bioremediators. Soil Biology* 32: 479-489 https://doi.org/10.1007/978-3-642-33811-3_2
- Andrady AL, Barned PW, Bornman JF, Gouin T, Madronich S, White CC, Zepp RG, Jansen MAK (2022) Oxidation and Fragmentation of plastics in a changing environment; from UV-radiation to biological degradation. *Science of the total Environment* 851: 158022 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158022>

- Ashok A, Abhijith R, Rejeesh CR (2017) Material characterization of starch derived biodegradable plastics and its mechanical property estimation. *Materials Today: Proceeding* 5: 2163-2170 <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.09.214>
- Barth M, Oeser T, Wei R, Then J, Schmidt J, Zimmermann W (2015) Effect of Hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Biochemical Engineering Journal* 93:222-228 <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.012>
- Bourbonnais R y Paice MG (1990) Oxidation of non-phenolic substrates: An Expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett* 267:99-102
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 – 254 [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Breslmayr E, Hanzek M, Hanrahan A, Leitner C, Kittl R, Santek B, Oostenbrink C, Ludwig R (2018) A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnology for Biofuels* 11:79 <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1063-6>
- Brunner I, Fischer M, Ruthi J, Stierli B, Frey B (2018) Ability of fungi isolated from plastic debris floating in the shoreline of a lake to degrade plastics. *PLoS One* 13:8 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202047>
- Da Luz JMR, Paes SA, Nunes MD, da Silva MdCS, Kasuya MCM (2013) Degradation of Oxo-Biodegradable Plastic by *Pleurotus ostreatus*. *PLoS ONE* 8: e69386 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069386>
- Daly P, Cai F, Kubicek C, Jiang S, Grujic M, Javad M, Salah M, Giles R, Riaz A, de Vries R, Bayram G, Wei L, Druzhinina I (2021) From lignocellulose to plastics: Knowledge transfer on the degradation approaches by fungi. *Biotechnology Advances* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107770>

- De Souza-Machado A, Kloas W, Zarfl C, Hempel S, Rilling M (2018) Microplastics as a merging threat to terrestrial ecosystems. *Global Change Biology* 24:1405-1416
<https://doi.org/10.1111/gcb.14020>
- Dussault D, Mayer BF, Jaouich A, Karam A (2017) Biodegradation of a synthetic textile containing PVC by *Trametes versicolor*. *Proceedings of Academics World 68th International Conference*. 6-9
- Eichlerová I, Homolka L, Nerud F (2007) Decolorization of high concentrations of synthetic dyes by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* strain CCBAS 232. *Dyes and Pigments* 75:38-44 <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.05.008>
- Emadian S, Onay T, Demirel B (2017) Biodegradation of Bioplastics in natural environments. *Waste Management* 59:526-536
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.10.006>
- Eriksson E, Blanchette R, Ander P (1990) *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. Springer Verlag, Berlin <https://doi.org/10.1007/978-3-642-46687-8>
- European Bioplastics (2020) *Bioplastics market development update 2020*. European Bioplastics Conference, Berlin.
https://docs.europeanbioplastics.org/conference/Report_Bioplastics_Market_Data_2020_short_version.pdf
- Falade AO, Nwodo UU, Iweriebor BC, Green E, Mabinya LV, Okoh AI (2017) Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiologyopen* 6: 00394
<https://doi:10.1002/mbo3.394>
- FDA (1998) *Bacteriological Analytical Manual*, 8va Edicion, Revision A (23) 821-822
- Flemming HC (1998) Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials. *Polym Degrad Stabil, Essex* 59: 309–315
[https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(97\)00189-4](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(97)00189-4)

- Folino A, Karageorgiou A, Calabro PS, Komilis D (2020) Biodegradation of Wasted Bioplastics in Natural and Industrial Environments: A review. Sustainability 12:6030 <https://doi.org/10.3390/su12156030>
- Gao R, Liu R, Sun C (2020) A marine fungus *Alternaria alternata* FB1 efficiently degrades polyethylene. Journal of Hazardous Materials 431:128617 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128617>
- Garcia JM, Robertson ML (2017) The future of plastics recycling. Science 358:870-872 <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aag0324>
- Geyer R, Jambeck JR, Law KL (2017) Production, use, and fate of all plastics ever made. Science Advances 3: 700782 <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1700782>
- Glaser JA (2019) Biological Degradation of Polymers in the Environment. Plastics in the environment, IntechOpen <https://doi.org/10.5772/intechopen.85124>
- Gómez-Mendez LD, Moreno-Bayona DA, Poutou-Piñales RA, Salcedo-Reyes JC, Pedroza-Rodriguez AM, Vargas A, Bogoya JM (2018) Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. PLoS ONE 13: e0203786 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203786>
- Guillén Y, Götz P, Machuca A (2011) Screening for lignocellulolytic enzymes and metal tolerance in isolated of Wood-rot fungi from Chile. Interciencia 36: 860-868
- Guggiari M, Bloque R, Aragno M, Verrechia E, Job D, Junier P (2011) Experimental calcium-oxalate crystal production and dissolution by Selected Wood-rot fungi. International Biodeterioration & Biodegradation 65: 803-809 <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.02.012>
- Hatakka y Hammel (2010) Fungal biodegradation of lignocelluloses. The Mycota 10: 319-340 https://doi.org/10.1007/978-3-642-11458-8_15

Higson FK (1991) Degradation of xenobiotics by white-rot fungi. Review of Environmental Contamination and Toxicology 122:11-15 https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3198-1_4

Hernández-Bueno NS, Suárez-Rodríguez R, Balcázar-López E, Folch-Mallol JL, Ramírez-Trujillo JA, Iturriaga G (2021) A Versatile Peroxidase from the Fungus *Bjerkandera adusta* Confers Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Plants. Plants (Basel, Switzerland) 10: 859 <https://doi.org/10.3390/plants10050859>

Hock OG, Lum HW, De Qin D, Kee WK, Shing WL (2019) The growth and laccase activity of edible mushrooms involved in plastics degradation, Researchgate. Toxicology 15

Iram A, Riaz R, Iqbal RK (2019) Usage of potential micro-organisms for degradation of plastics. Environmental Biology 7-15

Janusz G, Pawlik A, Świdarska-Burek U, Polak J, Sulej J, Jarosz-Wilkolazka A, y Paszczyński A (2020) Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. International journal of molecular sciences 21: 966 <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>

Jumaah OS (2017) Screening of plastic degrading bacteria from dumped soil area. IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology Food Technology 11:93-98

Kaushal J, Khatri M, Arya SK (2021) Recent insight into enzymatic degradation of plastics prevalent in the environment: A mini review. Cleaner Engineering and Technology 2: 100083 <https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100083>

Kang B, Kim S, Song H, Lee T (2019) Accelerating the Biodegradation of High-Density Polyethylene (HDPE) Using *Bjerkandera adusta* TBB-03 and Lignocellulose Substrates. Microorganisms 7:304 <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090304>

Kanwal A, Zhang M, Sharaf F, Li C (2022) Enzymatic degradation of poly (butylene adipate co-terephthalate) (PBAT) copolymer using lipase B from *Candida antarctica*

(CALB) and effect of PBAT on plant growth. Polymer Bulletin 79: 9059-9073
<https://doi.org/10.1007/s00289-021-03946-w>

Kawai HX (2009) Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. Applied and Environmental Microbiology 227-237 <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2113-6>

Khan S, Ali SA, Ali AS (2022) Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mesophilic fungus '*Penicillium citrinum*' isolated from soils of plastic waste dump yard, Bhopal, India. Environmental Technology 44: 2300-2314
<https://doi.org/10.1080/09593330.2022.2027025>

Khatoun N, Jamal A, Ali MI (2019) Lignin peroxidase isoenzyme: a novel approach to biodegrade the toxic synthetic polymer waste. Environmental Technology 40: 1366-1375 <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1422550>

Lackner M (2015) Bioplastics—Biobased Plastics as Renewable and/or Biodegradable Alternatives to Petroplastics, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA

Lucas NSJ, Bienaime C, Belloy C, Queneudec M (2008) Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques. Chemosphere 73:429-442
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>

Luyt AS, Malik SS (2019) Can Biodegradable Plastics Solve Plastic Solid Waste Accumulation? Plastics to Energy 403-423 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813140-4.00016-9>

Madhavi V, Lele SS (2009) Laccase: Properties and applications. BioResources 4: 1694–1717

Malachova K, Novotný C, Adamus G, Lotti N, Rybkova Z, Soccio M, Šlosarčíková P, Verney V, Fava F (2020) Ability of *Trichoderma hamatum* Isolated from Plastics-Polluted Environments to Attack Petroleum-Based, Synthetic Polymer Films. Processes 8:467

- Mathur G, Mathur A, Prasad R (2011) Colonization and degradation of thermally oxidized high-density polyethylene by *Aspergillus niger* (ITCC no. 6052) isolated from plastic waste dumpsite. *Bioremediation Journal* 15:69-76
<https://doi.org/10.1080/10889868.2011.570281>
- Mattsson K, Johnson E, Malmendal A, Linse S, Hansson L, Cedervall T (2017) Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Scientific Reports* 7: 11452 <https://doi:10.1038/s41598-017-10813-0>
- Mohanan N, Montazer Z, Sharma PK, Levin DB (2020) Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Frontiers in Microbiology* 11:709
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709>
- Moshood TD, Nawanir G, Mahmud F, Mohamad F, Ahmad MH, AbdulGhani A (2022) Sustainability of biodegradable plastics: New problema or solution to solve the global plastics pollution?. *Current Research in Gren and Sustainable Chemistry* 5:100273
<https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2022.100273>
- Muhonja CN, Makonde H, Magoma G, Imbuga M (2018) Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. *PLoS One* 13 :0198446 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446>
- Munir E, Harefa RSM, Priyani N, Suryanto D (2018) Plastic degrading fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* isolated from local landfill soil in Medan. *IOP Conference Series: Earth Environmental Science* 126: 012145
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/126/1/012145>
- Nakamura Y, Sungusia MG, Sawada T, Kuwahara M (1999) Lignin-degrading enzyme production by *Bjerkandera adusta* immobilized on polyurethane foam. *Journal of bioscience and bioengineering* 88: 41–47 [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(99\)80173-x](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(99)80173-x)

- Nandakumar A, Chuah J, Sudesh K (2021) Bioplastics: A boon or bane? Renewable and Sustainable Energy Reviews 147 <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111237>
- Obradors N, Aguilar J (2000) Efficient Biodegradation of High-Molecular Weight Polyethylene Glycols by Pure Cultures of *Pseudomonas stutzeri*. Applied and Environmental Microbiology 57:2383–2388 <https://doi.org/10.1128/aem.57.8.2383-2388.1991>
- Oceguera-Cervantes A, Carrillo-Garcia A, Lopez N, Bolaños-Nuñez S, Cruz-Gomez MJ, Wachter C y Loza-Tavera H (2007) Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. Strains able to degrade polyurethane and N-Methylpyrrolidone. Applied and Environmental Microbiology 73: 6214-6223 <https://doi.org/10.1128/AEM.01230-07>
- Okal EJ, Heng G, Magige EA, Khan S, Wu S, Ge Z, Zhang T, Mortimer PE, Xu J (2023) Insights into the mechanisms involved in the fungal degradation of plastics. Ecotoxicology and Environmental Safety 262:115202 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115202>
- Olicón-Hernández, D. R., González-López, J., & Aranda, E. (2017). Overview on the Biochemical Potential of Filamentous Fungi to Degrade Pharmaceutical Compounds. Frontiers in microbiology 8: 1792. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01792>
- Osma JF, Toca-Herrera JL, Rodríguez-Couto S (2010) Uses of laccases in the food industry. Enzyme Research 918761 <https://doi.org/10.4061/2010/918761>
- Pathak-Navneet VM (2017) Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. Bioresources and Bioprocessing 4:15 <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9>
- Pei L, Schmidt M, Wei W (2011) Conversion of biomass into bioplastics and their potential environmental impacts. In: Biotechnology of Biopolymers. InTech 57-74 <https://doi.org/10.5772/18042>

- Peiponen K, Raty J, Ishaq U, Pelisset S, Ali R (2019) Outlook on optical identification of micro-and nanoplastics in aquatic environments. *Chemosphere* 214: 424-429
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.111>
- PlasticsEurope (2019) *Plastics—the Facts 2019. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data.*
- Rahman MH y Bhoi PR (2021) An overview of non-biodegradable bioplastics. *Journal of Cleaner Production* 294 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126218>
- Rodrigues M, Abrantes N, Goncalves F, Nogueira H, Marques J, Goncalves A (2019) Impacts of plastic products used in daily life on the environment and human health: what is known?. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 72:103239
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103239>
- Romero E, Speranza M, García-Guinea J, Martínez AT y Martínez MJ (2007) An anamorph of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* capable of colonizing and degrading compact disc components. *FEMS Microbiology letters*, 275:122–129
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00876.x>
- Rovaletti A, De Gioia L, Fantucci P, Greco C, Vertemara J, Zampella G, Arrigoni F, Bertini L (2023) Recent Theoretical Insights into the Oxidative Degradation of Biopolymers and Plastics by Metalloenzymes. *Int. J. Mol. Sci* 24: 6368
<https://doi.org/10.3390/ijms24076368>
- Ru J, Huo Y, Yang Y (2020) Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes. *Front. Microbiol* 11: 442 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442>
- Rujnićsokele M, Pilipović A (2017) Challenges and opportunities of biodegradable plastics: a mini review. *Waste Management and Research* 35:132-140
<https://doi.org/10.1177/0734242X16683272>
- Sánchez C (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27:85-194
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

- Sanchez C (2020) Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology advances* 40 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107501>
- Sandt C, Waeytens J, Deniset-Besseau A, Nielsen-Leroux C, Rejasse A (2021) Use and misuse of FTIR spectroscopy for studying the bio-oxidation of plastics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 258: 119841 <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119841>
- Sangale MK, Shahnawaz M y Ade AB (2019) Potential of fungi isolated from the dumping sites mangrove rhizosphere soil to degrade polythene. *Scientific Reports* 9: 5390 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41448-y>
- Sankhla IS, Sharma G, Tak A (2020) Chapter 4-Fungal degradation of bioplastics: An overview. En: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Singh, J., Gehlot, P., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands 35–47 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821007-9.00004-8>
- Schilling y Jellison (2007) Oxalate regulation by two brown rot fungi decaying oxalate-amended and non-amended wood. *Holzforschung Journal* 59: 681-688 <https://doi.org/10.1515/HF.2005.109>
- Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S (2008) Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances* 26:246–265 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
- Shahlari y Lee (2012) Mechanical and morphological properties of poly(butylene adipate-co-)terephthalate) and poly(lactic acid) blended with organically modified silicate layers. *Polymer Engineering & Science* 52: 1420-1428 <https://doi.org/10.1002/pen.23082>
- Shams M, Alam I, Mahbub MdS (2021) Plastic pollution during COVID-19: plastic waste directives and its long-term impact on the environment. *Environmental Advances* 5:100119 <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100119>

- Shimada M, Ma DB, Akamatsu Y, Hattori T (1994) A proposed role of oxalix acid in Wood decay systems of Wood-rotting basidiomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 285-296
- Sivan A (2011) New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology* 22:422–426 <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.013>
- Sowmya HV, Ramalingappa, Krishnappa M, Thippeswamy B (2014) Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR, and NMR analyses. *Environmental Monitoring and Assessment* 186: 6577–6586 <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3875-6>
- Spina F, Tummino ML, Poli A, Prigione V, Ilieva V, Cocconcelli P, Puglisi E, Bracco P, Zanetti M, Varese GC (2021) Low density polyethylene degradation by filamentous fungi. *Environmental Pollution* 274:116548 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116548>
- Srikanth M, Sandeep T, Sucharitha K, Godi S (2022) Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. *Bioresources and Bioprocessing* 9:42 <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00532-4>
- Sumathi T, Viswanath B, Sri Lakshmi A, SaiGopal DV (2016) Producción of Laccase by *Cochliobolus* sp. Isolated from Plastic Dumped Soils and Their Ability to Degrade Low Molecular Weight PVC. *Biochemistry research international* (2016) 9519527 <https://doi.org/10.1155/2016/9519527>
- Temporiti MEE, Nicola L, Nielsen E y Tosi S (2022) Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. *Microorganisms* 10:1180 <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061180>
- Thurston CF (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19–26 <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>
- Tokiwa Y, Calabia BP, Ugwu CU, Aiba S (2009) Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences* 10:3722-3742 <https://doi:10.3390/ijms10093722>

- Tripathi A, Upadhyay RC y Singh S (2012) Extracellular Ligninolytic Enzymes in *Bjerkandera adusta* and *Lentinus squarrosulus*. Indian journal of microbiology 52(3):381–387 <https://doi.org/10.1007/s12088-01102320>
- Twala, PP, Mitema A, Baburam C y Feto NA (2020) Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin. AIMS microbiology 6(3):330–349 <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020020>
- Vivi VK, Martins-Franchetti SM, Attili-Angelis D (2019) Biodegradation of PCL and PVC: *Chaetomium globosum* (ATCC 16021) activity. Folia Microbiologica 64:1-7 <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0621-4>
- Wei R, Zimmermann W (2017) Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? Microbial Biotechnology 10: 1302-1307 <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710>
- Wilkes RA y Aristilde L (2017) Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges, Journal of Applied Microbiology 123: 582–593 <https://doi.org/10.1111/jam.13472>
- Zeenat, Elahi A, Bukhari DA, Shamin S, Rehman A (2021) Plastics degradation by microbes_ A sustainable approach. Journal of King Saud University-Science 33(6):101538 <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101538>

X. Anexos

Anexo 1. Parámetros térmicos del análisis TGA de las muestras de PVC.

Control PVC		Tratamiento PVC	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
T deg (°C)	307,34	T deg	294.29
T ₀ (°C)	211,05	T ₀	212.68
T _f (°C)	489,06	T _f	473.83
% perdida	38,04 %	% perdida	73,56 %
% residuo	61,96 %	% residuo	26,44 %

Tdeg: temperatura de degradación; T0: temperatura inicial de degradación; Tf: temperatura final de degradación; % perdida: pérdida de masa del plástico; % residuo: residuos generados, cenizas en que no se queman al final del proceso.

Anexo 2. Parámetros térmicos del análisis TGA de las muestras de PBAT.

Control PBAT		Tratamiento PBAT	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
T deg (°C)	384,60	T deg	387,97
T ₀ (°C)	310,61	T ₀	299,73
T _f (°C)	579,67	T _f	450,43
% perdida	93,34	% perdida	100,00
% residuo	6,66	% residuo	0,00

Tdeg: temperatura de degradación; T0: temperatura inicial de degradación; Tf: temperatura final de degradación; % perdida: pérdida de masa del plástico; % residuo: residuos generados, cenizas en que no se queman al final del proceso.

Anexo 3. Parámetros térmicos del análisis TGA de las muestras de LDPE.

Control LDPE		Tratamiento LDPE	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
T_{deg} (°C)	447,71	T_{deg}	411,18
T_o (°C)	333,01	T_o	313,15
T_f (°C)	488,32	T_f	483,51
% pérdida	57,02	% pérdida	55,77
%residuo	42,98	%residuo	44,23

Tdeg: temperatura de degradación; T0: temperatura inicial de degradación; Tf: temperatura final de degradación; % pérdida: pérdida de masa del plástico; % residuo: residuos generados, cenizas en que no se queman al final del proceso.