



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE GUAYAQUIL

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON CAPACIDAD
BIODEGRADADORA DE PLÁSTICOS PET DEL CENTRO DE RECICLAJE
FABRICIO VALVERDE EN PUERTO AYORA-GALÁPAGOS

*Trabajo de titulación previo a la obtención del título de ingeniería en
biotecnología*

AUTORA:

LUISA MICHELLE ROMERO VILLACIS

TUTOR:

JOFFRE RICARDO MEDINA VILLAVICENCIO

GUAYAQUIL-ECUADOR

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Luisa Michelle Romero Villacis con documento de identificación N° 2000116265 manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; **“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE PLÁSTICOS PET DEL CENTRO DE RECICLAJE FABRICIO VALVERDE EN PUERTO AYORA-GALÁPAGOS”** y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 30 agosto del 2023

Atentamente,



Luisa Michelle Romero Villacis

C.I. 2000116265

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Luisa Michelle Romero Villacis con documento de identificación No. 2000116265, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación del tema **“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE PLÁSTICOS PET DEL CENTRO DE RECICLAJE FABRICIO VALVERDE EN PUERTO AYORA-GALÁPAGOS”**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería en biotecnología , en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 30 de agosto del 2023

Atentamente,



Luisa Michelle Romero Villacis

C.I. 2000116265

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Joffre Ricardo Medina Villavicencio con documento de identificación N° 0917305146 docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON CAPACIDAD BIODEGRADADORA DE PLÁSTICOS PET DEL CENTRO DE RECICLAJE FABRICIO VALVERDE EN PUERTO AYORAGALÁPAGOS”**, realizado por Luisa Michelle Romero Villacis con documento de identificación N° 2000116265, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 30 de agosto del 2023

Atentamente,



Joffre Ricardo Medina Villavicencio

0917305146

DEDICATORIA

El presente proyecto de investigación se lo dedico a mi madre Zandra Villacis, quien con su amor, esfuerzo y apoyo me ha ayudado a cumplir una meta más en mi vida, le dedico esta tesis ya que gracias a ella he podido salir adelante con mis estudios y he aprendido a ser una mujer responsable, perseverante y fuerte.

A mi hermana Mareva Romero y a mi padre Fausto Romero, quienes con sus constantes consejos me han ayudado a seguir adelante a pesar de las adversidades y dificultades que he llegado a tener a lo largo de esta etapa de mi vida.

Le dedico este trabajo a todos mis familiares, amigos y profesores que han estado brindándome su apoyo incondicional y conocimiento para lograr cumplir este sueño de culminar la carrera.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a Dios por haberme bendecido con una familia excelente que me ha brindado apoyo y amor incondicional durante este largo periodo de tiempo.

A las personas que hicieron posible esta investigación, a la Universidad Politécnica Salesiana y a sus excelentes docentes, sobre todo a mi tutor Joffre Medina quien me ha llenado de conocimiento, me ha brindado asesoría, me ha dedicado tiempo y ha confiado en mi durante este periodo de tres meses. También quiero agradecer a mi cotutora Verónica Montenegro por brindarme sus conocimientos estadísticos y a la docente Carina Hidalgo por apoyarme y confiar siempre en mi potencial al igual que por brindarme de sus extendidos conocimientos.

Quiero agradecer también al Licenciado Joel Vera, director de proyectos de la ESPOL por haberme ayudado en el análisis de mis muestras, lo cual hizo posible este proyecto investigativo.

Finalmente agradezco a mis amigos, por brindarme su confianza, su amor y su alegría en cada clase, por hacer feliz mi estadía en la Universidad y sobre todo por su apoyo incondicional.

Resumen

En el presente trabajo se aisló e identificó hongos con capacidad biodegradadora de plásticos a base de tereftalato de polietileno del centro de reciclaje Fabricio Valverde en Puerto Ayora-Galápagos. La identificación de los hongos se realizó mediante pruebas microscópicas y macroscópicas. En las pruebas macroscópicas se analizó el color, textura y crecimiento de la colonia, mientras que en las pruebas microscópicas se estudió estructuras de los hongos como los conidióforos, hifas, fiálides y conidios por lo que se pudo identificar hongos del género *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*. Así mismo en los ensayos de biodegradación se evaluaron tres tratamientos con los hongos aislados, en donde se obtuvo que los hongos tienen la capacidad de disminuir el peso de la lámina de tereftalato de polietileno (PET) a la que se lo expuso, en el caso de *Penicillium* disminuyó el peso del plástico en 0,14%, *Fusarium* lo disminuyó en un 0,06% y *Aspergillus* en un 0,34% siendo este último el de mayor efectividad. Así mismo estos hongos fueron capaces de cambiar la estructura química del tereftalato de polietileno ya que se encontró disminución de las bandas correspondientes a alcanos y a grupos ésteres al ser sometidas estas muestras a cuarenta y un días de biodegradación. El cambio estructural químico se lo midió a través de la técnica de espectroscopia infrarrojos por transformada de Fourier.

Palabras clave: biodegradación, identificación, tereftalato de polietileno, hongos, espectrometría.

Abstract

In the present work, fungi with biodegrading capacity of plastics based on polyethylene terephthalate were isolated and identified from the Fabricio Valverde recycling center in Puerto Ayora-Galápagos. The identification of the fungi was carried out through microscopic and macroscopic tests. In the macroscopic tests, the color, texture and growth of the colony were analyzed, while in the microscopic tests fungal structures such as conidiophores, hyphae, phialides and conidia were studied, so it was possible to identify fungi of the genus *Penicillium*, *Fusarium* and *Aspergillus*. Likewise, in the biodegradation tests, three treatments with the isolated fungi were evaluated, where it was obtained that the fungi have the ability to reduce the weight of the polyethylene terephthalate (PET) sheet to which it was exposed, in the case *Penicillium* decreased the weight of the plastic by 0.14%, *Fusarium* decreased it by 0.06% and *Aspergillus* by 0.34%, the latter being the most effective. Likewise, these fungi were capable of changing the chemical structure of polyethylene terephthalate since a decrease in the bands corresponding to alkanes and ester groups was found, since some samples of these samples were at forty-one days of biodegradation. The chemical structural change was measured using the Fourier transform infrared spectroscopy technique.

Keywords: biodegradation, identification, polyethylene terephthalate, fungi, spectrometry.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Capítulo 1	12
Antecedentes	12
1.1 Introducción	12
1.2 Problema	13
1.4 Pregunta de investigación	15
1.5 Objetivos	15
1.5.1 Objetivo general.	15
1.5.2 Objetivos específicos.	16
1.6 Hipótesis	16
Capítulo 2	17
Marco teórico	17
2.1 Fundamentación teórica	17
2.1.1 Contaminación Ambiental	17
2.1.3 Biodegradación.	19
2.1.4 Enzimas fúngicas involucradas en la biodegradación plástica	21
2.1.4.1 Lacasas (EC 1.10.3.2)	21
2.1.4.2 Carboxilasas (EC 4.1.1)	21
2.1.4.3 Lipasas (EC 3.1.1.3)	22
2.1.4.4 Cutinasas (E.C 3.1.1.74)	22
2.1.4.5 Ésterasas	22
2.1.4.6 Proteasas (EC 3.4)	23
2.1.5 Aislamiento microbiano.	23
2.1.6 Generalidades de los hongos	24
2.1.6.1 <i>Penicillium sp.</i>	25
2.1.6.2 <i>Fusarium sp.</i>	26
2.1.6.3 <i>Aspergillus sp.</i>	27
2.1.7 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier FT IR.....	28
2.1.7.1 Transmitancia.....	29
Capítulo 3	30
Materiales y métodos	30
3.1 Diseño	30

	10
3.2 Población y muestra	30
3.2.1 Población	30
3.2.2 Muestra	30
3.3 Variables	31
3.3.1 Variable independiente:	31
3.3.2 Variable dependiente:	31
3.2 Recogida de datos	32
Tabla 4.	32
3.3 Protocolos	33
3.3.1 Metodología	33
3.3.2 Obtención de las muestras.	33
3.3.3 Técnica de muestreo en botellas	33
3.3.4 Muestreo de sedimento	34
3.3.5 Fase de laboratorio	34
3.3.5.1.3 Aislamiento de los hongos en muestras de botellas	35
3.3.6 Lavado de las botellas.	35
3.3.6.1 Aislamiento de hongos de las muestras de botellas.	35
3.3.7 Identificación de los hongos.	35
3.3.8 Ensayo de biodegradación.	36
3.3.9 Análisis por FT IR	36
Capítulo 4	38
Resultados y discusión	38
4.1 Análisis de los datos	38
4.2 Evaluación del ensayo de biodegradación.	38
4.3 Análisis de resultados	42
4.4 Identificación de hongos	45
4.5 Presentación de los datos	48
4.6 Microscopia del plástico a base del tereftalato de polietileno (PET) luego del ensayo de biodegradación.	61
4.7 Discusión	62
Capítulo 5	66
Conclusiones y recomendaciones	66
5.1 Conclusiones	66
5.2 Recomendaciones	67
Bibliografía	68

Anexos 77

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 Introducción.

La contaminación y los efectos negativos que provocan los plásticos a nivel mundial en la flora y la fauna han sido demostrados en varios estudios. Los macro y micro plásticos se han detectado en ríos y en todos los mares, en donde al menos 690 especies se han visto afectadas por desechos, de los cuales el 92% pertenece a plásticos. Al año los seres humanos producen un aproximado de 1,300 millones de toneladas de desechos plásticos en todo el mundo (López et al., 2020). En 2019 en Galápagos fueron recolectadas 22 toneladas de plásticos en las playas de Galápagos durante jornadas de limpieza (Carrere, 2019). Las consecuencias principales que trae la contaminación por parte de los plásticos es la muerte de las especies marinas y terrestres, dado que muchas veces estos plásticos suelen ser confundidos con comida y en el caso de especies marinas estas suelen morir por asfixia o quedar atrapados en estos materiales (Schnurr REJ, 2018). Según un estudio que se realizó en el año 2021, se determinó que 36 especies endémicas de Galápagos han sido afectadas de forma negativa por la contaminación provocada por estos polímeros plásticos (Carrere, 2021). Por esta razón existen estudios de como biodegradar materiales orgánicos e inorgánicos utilizando biotecnología ambiental.

Los macros y micro plásticos están asociados a la contaminación antropogénica en todo el mundo, en el caso de los plásticos PET al ser usados se desechan y acumulan en muchas partes terrestres del planeta, incluso tienden a formarse islas artificiales de estos plásticos en ecosistemas marinos (Ioakeimidis et al., 2016).

Existen muchos estudios que describen e investigan los microorganismos de interés capaces de biodegradar plásticos de toda índole. En 2021 se encontró que *Trichoderma harzianum* tubo la capacidad de biodegradar el plástico en un 40% entre los 90 a 120 días, esto se realizó midiendo la diferencia del peso final con el peso inicial de la muestra. Por otro lado, se puede comparar que los microorganismos genéticamente modificados tienen un porcentaje de biodegradación del 90% (Tournier et al., 2020).

Galápagos es una reserva natural de la humanidad que, al ser un ecosistema poco explotado con respecto a aislamiento de microorganismos, existe la posibilidad para desarrollar la bioprospección de microorganismos con capacidad de biodegradación de plásticos a base de tereftalato de polietileno PET.

1.2 Problema.

La razón principal para realizar este estudio es que los plásticos fabricados con tereftalato de polietileno (PET) en la Isla Santa Cruz ubicada en el archipiélago de Galápagos representan una de las principales causas de riesgo para las especies endémicas y nativas que lo habitan. En la actualidad se conoce que estos plásticos han afectado a 36 especies de animales que habitan en las Islas Galápagos. Un claro ejemplo es el caso de las tortugas que han muerto y en sus autopsias se han encontrado residuos plásticos en su tracto digestivo (Comercio, 2021). Así mismo, en Galápagos se lleva un control estricto con respecto al reciclaje. Sin embargo, según estudios se ha revelado que tan solo el 10% de los polímeros a base de tereftalato de polietileno usados para botellas o envases se recicla y por consiguiente se reutiliza (Papadopoulou, 2019).

La importancia de este estudio es encontrar soluciones innovadoras que nos permitan biodegradar estos plásticos de alta resistencia con ayuda de microorganismos. Para que de esta manera en las Islas Galápagos se pueda tener un mayor control de estos plásticos y que no existan repercusiones negativas en la fauna endémica de este archipiélago.

Es importante aludir que el presente trabajo investigativo tiene como finalidad dar a conocer nuevas alternativas biotecnológicas que permitan desarrollar nuevas tecnologías que tengan la capacidad de disminuir la contaminación antropogénica de las islas Galápagos.

1.3 Delimitación.

Las muestras se recolectaron en el centro de reciclaje Fabricio Valverde situado en la parte alta de Puerto Ayora en Galápagos el 5 de mayo del 2023. Las coordenadas del sitio son: -0,797653, -99,20861.

El transporte de las muestras hacia Guayaquil se lo realizó el 6 de mayo del 2023. El trabajo experimental se realizó en la Universidad Politécnica Salesiana sede Guayaquil en un periodo de tres meses. Sin embargo, la principal limitación de este estudio fueron el uso de los laboratorios y falta de personal para las supervisiones.

Imagen 1.

Vista Satelital del Centro de Reciclaje Fabricio Valverde.



Nota. Adaptado de Google Maps, vista satelital en tiempo real.

1.4 Pregunta de investigación.

¿Es posible aislar e identificar hongos con capacidad de realizar cambios estructurales en plásticos a base de tereftalato de polietileno del centro de reciclaje Fabricio Valverde ubicado en Puerto Ayora?

1.5 Objetivos.

1.5.1 Objetivo general.

Aislar hongos con potencial biodegradador de plásticos PET del centro de reciclaje Fabricio Valverde en Puerto Ayora-Galápagos.

1.5.2 Objetivos específicos.

- Identificar los hongos aislados a través de caracterización morfológica macroscópica y microscópica.
- Evaluar el cambio estructural de los plásticos PET a través de la técnica de FTIR.

1.6 Hipótesis.

Hipótesis: Existe cambio estructural en los plásticos a base de tereftalato de Polietileno luego de tratarlos con distintos hongos aislados del centro de reciclaje Fabricio Valverde.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1 Fundamentación teórica.

2.1.1 Contaminación ambiental.

La contaminación ambiental, sobre todo la que es producida por los desechos plásticos se ha convertido en uno de los mayores desafíos ecológicos en la actualidad. El incremento en la fabricación de plásticos de un solo uso está superando la capacidad global para gestionarlos de manera efectiva. Por lo que la producción de polímeros desechables abruma la capacidad del mundo para lidiar con ellos (Parker, 2019).

La producción masiva del plástico comenzó en el siglo XX, entre el año 1950 y ha experimentado un crecimiento exponencial. El término "plástico" también se emplea para describir un conjunto de materiales artificiales o fibras sintéticas derivadas del gas o petróleo. Los objetos plásticos de un solo uso representan una fuente significativa de desechos marinos; elementos como bolsas, botellas y pajitas conllevan un riesgo físico para la vida marina (Schlossberg, 2017).

El consejo de gobierno de régimen especial de Galápagos anuncio la resolución: Nro Resolución 05-CGREG-2015, la cual que restringe el uso y compra de plásticos de un solo uso como; sorbetes, recipientes, botellas fabricadas con tereftalato de polietileno, envases no retornables y fundas tipo camisa ya que estos repercuten negativamente en las especies endémicas y nativas del archipiélago dado que muchas veces estos polímeros provocan la muerte de las especies, alterando así el ecosistema marino y terrestre (Lasso, 2018).

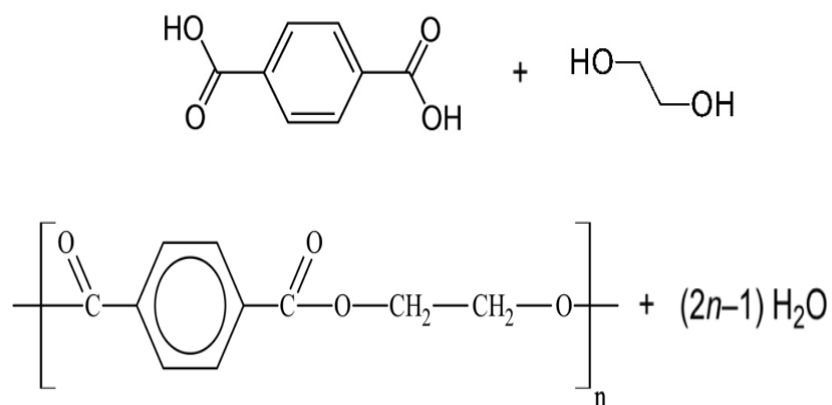
2.1.2 Tereftalato de polietileno.

El tereftalato de polietileno es un plástico que está sintetizado a partir del ácido tereftálico y del etilenglicol. Es un material altamente resistente a compuestos químicos, además de que es uno de los plásticos más usados a nivel global para la fabricación de botellas, fibras para textiles y una gran variedad de empaques (Sagong, 2020).

El tereftalato de polietileno es un poliéster termoplástico. Además, los plásticos PET son uno de los más utilizados a nivel industrial debido a su durabilidad y su bajo peso, 2 millones de toneladas de botellas y jarras son las que se consumen al año a nivel mundial (Eberl, 2009). Sin embargo, una de sus principales desventajas es que las botellas de PET tienden a degradarse dentro de 500 años (Jaramillo, 2014).

Figura 1.

Síntesis del tereftalato de polietileno a través de la policondensación del ácido tereftálico y etilenglicol.



2.1.3 Biodegradación.

La biodegradación es un proceso en donde varias sustancias tienden a perder sus propiedades originales debido a la descomposición o conversión de sus moléculas en otros compuestos secundarios. Es un proceso natural en el cual un material cambia a través de factores externos, como lo es la acción biológica y factores ambientales en tiempos determinados dependiendo de la complejidad del material. Es importante mencionar que existen dos clasificaciones de biodegradación; anaerobia y aerobia (Avante, 2021).

La biodegradación de plásticos se basa en la despolimerización de la cadena principal en cadenas más cortas. Muchos factores pueden influir en este proceso, como por ejemplo la hidrofobicidad, cristalinidad, elasticidad, temperatura de fusión y sobre todo la estructura química (Zara, 2022).

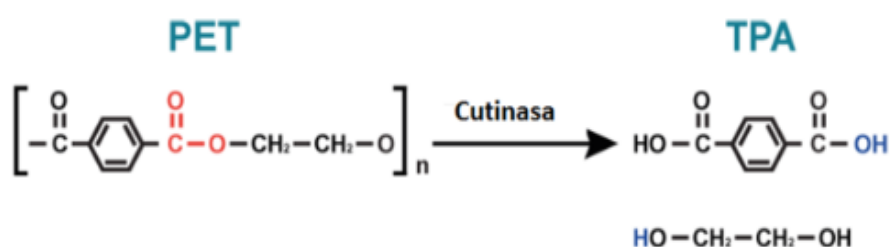
En la actualidad diversos investigadores están centrando su atención en los hongos filamentosos como objeto de estudio, con el propósito de encontrar soluciones alternativas para abordar la contaminación medioambiental. En este ámbito tenemos varias ventajas que estos proveen como lo es con su crecimiento típico apical de las hifas, lo cual les permite extender sus redes miceliales en diferentes tipos de materiales (Asemoloye et al., 2020). Así mismo al tener este crecimiento característico de las hifas por los materiales poliméricos estas ayudan a penetrar las secreciones propias de las enzimas producidas por los hongos que van a tener la capacidad de reducir estos compuestos químicos. Entre las enzimas más características tenemos a las lipasas, carboxilésterasas, cutinasas y proteasas mismas que pueden modificar la superficie plástica, aumentando su capacidad hidrofílica (Temporiti et al., 2022).

La biodegradación del PET se da a través de una aproximación de los microorganismos hacia la superficie del polímero, posterior a esto hay una secreción de

enzimas por parte de los microorganismos mismas que son encargadas de despolimerizar hasta formar biomasa. En el caso del PET se hidroliza la cadena por acción de hidrolasas dando formación al etilenglicol EG y ácido tereftálico TPA (Gottfried, 2019).

Figura 2.

Reacción química del PET frente a hidrolasas producidas por hongos.



Nota. Adaptado de “Las cutinasas como una herramienta valiosa para la descontaminación de residuos plásticos” (p.32), por C. Peña, 2018, *Mensaje bioquímico*, 42(32).

2.1.4 Enzimas fúngicas involucradas en la biodegradación plástica.

Las enzimas fúngicas que están involucradas en la biodegradación plástica son las hidrolasas y oxidorreductasas.

Las hidrolasas son moléculas de naturaleza proteica encargadas de catalizar reacciones de ruptura de agua o también conocido como hidrolisis (Gómez, 2022).

Las oxidorreductasas son proteínas con capacidad enzimática cuya función principal radica en facilitar reacciones de óxido-reducción, es decir, procesos que involucran la transferencia de electrones o la eliminación de átomos de hidrógeno de los sustratos específicos en los que operan. En estas reacciones una molécula cede electrones o átomos de hidrógeno mientras que otra los acepta, lo que resulta en un cambio en los niveles de oxidación de ambas moléculas (Mora, 2020).

2.1.4.1 Lacasas (EC 1.10.3.2).

Enzimas que pertenecen a las oxidorreductasas debido a que usan el oxígeno para oxidar compuestos fenólicos y no fenólicos para reducir el oxígeno molecular a agua (Surwase et al., 2016).

2.1.4.2 Carboxilasas (EC 4.1.1).

Las carboxilasas, que se engloban dentro de la categoría de las liasas, son enzimas que facilitan la ruptura de enlaces químicos en moléculas sin requerir la adición de agua, es decir, sin hidrólisis. En el contexto de la descomposición de plásticos, las carboxilasas también han captado atención debido a su potencial para influir en la descomposición de ciertas variantes de plásticos. Específicamente, ciertas carboxilasas han evidenciado la capacidad para descomponer plásticos como el polietileno tereftalato (PET) y otros polímeros de tipo poliéster. Estos plásticos poliéster presentan

en su estructura grupos carboxilo funcionales, lo que los convierte en susceptibles a la influencia de las carboxilasas (Gricajeva et al., 2021).

2.1.4.3 Lipasas (EC 3.1.1.3).

Las lipasas fúngicas son enzimas extracelulares de tipo triacilglicerol acilhidrolasas, que tienen la capacidad de llevar a cabo la hidrólisis de enlaces éster presentes en sustratos insolubles de triglicéridos y monoglicéridos, transformándolos en ácidos grasos libres y glicerol. Los principales géneros de hongos que producen estas lipasas incluyen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Candida*, *Rhizomucor*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Beauveria*, *Eremothecium*, *Ophiostoma*, *Humicola*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Geotrichum Trichoderma* (Singh et al., 2012).

2.1.4.4 Cutinasas (E.C 3.1.1.74).

Las cutinasas actúan mediante la aceleración de la hidrólisis de los enlaces éster que están presentes en la estructura de la cutina, lo que provoca la descomposición de esta macromolécula en sus elementos más básicos, como ácidos grasos y glicerol. En lo que respecta a la descomposición de plásticos, las cutinasas han generado un interés significativo debido a su potencial para descomponer ciertas categorías de plásticos. Algunos tipos de plástico, como los poliésteres, comparten similitudes estructurales con la cutina de las plantas. Estudios han confirmado que las cutinasas podrían tener la capacidad de degradar plásticos poliésteres específicos, por ejemplo, el polietileno tereftalato (PET), que se utiliza en envases de bebidas y textiles (Dimarogona et al., 2015).

2.1.4.5 Ésterasas.

Las ésterasas son enzimas clasificadas como hidrolasas que fragmentan ésteres en alcoholes y ácidos al añadir moléculas de agua. Además, desempeñan un papel en la

descomposición de plásticos, un proceso que es llevado a cabo tanto por bacterias como por hongos. Estas enzimas actúan catalizando la ruptura de enlaces éster mediante la introducción de una molécula de agua, lo que conlleva a la separación del éster en sus componentes constituyentes. Las ésterasas abarcan una diversidad de funciones biológicas y tienen una relevancia fundamental en diversos procesos metabólicos y degradativos (Brunner et al., 2018).

2.1.4.6 Proteasas (EC 3.4).

Las proteasas son enzimas que escinden la cadena peptídica larga en péptidos cortos o descomponen las proteínas en cadenas polipeptídicas por hidrólisis. Estas son secretadas por especies como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* (Srinivasan et al., 2020).

2.1.5 Aislamiento microbiano.

Aislar microorganismos autóctonos constituye una de las técnicas fundamentales empleadas en los campos de la microbiología y la biotecnología ambiental. Esta práctica nos permite explorar las posibles y novedosas aplicaciones que estos microorganismos pueden tener en términos de su capacidad para la remediación ambiental. Muchas veces se logran aislar microorganismos que tienen resistencia a agentes tóxicos o a su vez se logra encontrar a microorganismos con potencial biotransformador y biorremediador (Lolo Wal Marzan, 2016). Por su parte, la biodegradación es la descomposición de materiales en el transcurso del tiempo. Existen gran cantidad de polímeros que debido a su resistencia tardan mucho en biodegradarse, un claro ejemplo son los plásticos PET, mismos que tardan alrededor de 500 años en poder descomponerse por completo (Eduardo Botero Jaramillo, 2014). Es por esta razón es que es de suma importancia estudiar métodos alternativos para poder

descomponer estos materiales inorgánicos y evitar la pérdida de ecosistemas que se da por la contaminación.

2.1.6 Generalidades de los hongos.

Los hongos son organismos eucariotas. Se dividen en organismos pluricelulares, unicelulares, heterótrofos y cosmopolitas. La reproducción de los hongos se puede dar de forma sexual y asexual, la misma que se da a través de las esporas o por trozos de micelio (Vidal, 2016).

La clasificación de los hongos se da a través de cuatro Phylums generales los cuales son:

Phylum Chytridiomycota: Es el Phylum más simples y primitivos de los hongos y aparecieron hace más de 500 millones de años. Son hongos que tienen quitina y celulosa en sus paredes celulares. La mayoría de estos hongos son unicelulares. Sin embargo, hay especies que son multicelulares. Estos hongos producen gametos y zoosporas (LibreTexts, 2023).

Phylum Zygomycota: Esta división tiene aproximadamente 1100 especies. Tienen nutrición parasita o saprofita lo que significa que se alimentan de restos de plantas o animales terrestres. Son considerados los primeros hongos verdaderos terrestres ya que forman micelios, hifas y esporangios además de que presentan un crecimiento rápido (Vidal, 2016).

Phylum Ascomycota: En esta división se encuentran la mayoría de los hongos conocidos en la actualidad con más de 60000 especies. Son mayormente conocidos por su importancia comercial ya que muchas especies de esta división juegan un papel sumamente importante en la elaboración de cervezas y procesos industriales que se

relacionan con la fermentación. Estos se caracterizan por la formación de un ascus. Con respecto a su anatomía tienen septos con poros simples y cuerpos de Woronin, tienen una reproducción sexual y vegetativa y pueden ser parásitos, simbioses o saprofitos (Vidal, 2016).

Phylum Basidiomycota: Tiene aproximadamente 30000 especies dentro de la división. Su meioesporangio es un basidio en donde se forman las esporas, tienen septos con fibulas y doliporos. Su reproducción es sexual y vegetativa y su morfología es simple y algunas especies pueden formar estructuras complejas como las setas o cuerpos fructíferos (Vidal, 2016).

Las estructuras principales que se logran ver al microscopio para la identificación de los hongos son las esporas, basidios, ascos, cistidios y las hifas. (Zabel, 2020).

2.1.6.1 *Penicillium sp.*

Penicillium es grupo de hongos filamentosos que pertenece al filo Ascomycota, Una de las características más destacadas del género *Penicillium* radica en su método de reproducción asexual, el cual involucra estructuras densas con forma de pinceles. Es precisamente de estas estructuras de donde proviene el nombre del taxón *penicillus*. Las especies pertenecientes al género *Penicillium* presentan una morfología característica de forma de pincel, que se manifiesta en cadenas de conidios formadas a partir de una célula especializada llamada fiálide. La fiálide es una estructura en forma de botella que surge del conidióforo, la cual se encuentra conectada a la base de la métula. La métula proporciona apoyo a la fiálide, y esta, a su vez, da soporte a la rama. A partir de esta rama pueden originarse otras ramas o una única estructura denominada estipe. Por otro lado tenemos a su caracterización macroscópica en donde las colonias al inicio de

su crecimiento tienen un tono blanco que con el transcurso del tiempo desarrollan tonalidades como gris, rosado, verde y azul (Gómez, 2020).

Tabla 1.

Taxonomía de Penicillium sp.

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Penicillium</i>

2.1.6.2 *Fusarium sp.*

El género *Fusarium* abarca a un conjunto de hongos con estructura filamentosa que se encuentran distribuidos alrededor del mundo. Pueden encontrarse en el suelo, alimentos almacenados y en plantas. Debido a su capacidad para crecer a temperaturas de 37°C, son considerados hongos oportunistas. Cuando se observan bajo el microscopio, las fiálides, que son las estructuras de reproducción asexual, suelen tener una forma fina que se asemeja a una botella. Estas fiálides pueden ser simples o ramificadas, así como cortas o largas. Además, pueden ser mono fialídicas, lo que significa que las esporas emergen de un solo poro de la fiálide, o polifialídicas, donde emergen de varios poros. Los conidios tienen una forma similar a la de una medialuna, son de color claro y presentan divisiones septadas en su estructura. Este hongo crece en varios medios de cultivo, como por ejemplo PDA, Sabouraud, SNA y SLA, el pigmento de las colonias tienden a ser color blancas, beige grise, naranja, café y violeta (Tapia et al., 2014).

Tabla 2.

Taxonomía de Fusarium sp.

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Familia	Nectriaceae
Género	<i>Fusarium</i>

2.1.6.3 *Aspergillus sp.*

Aspergillus es un grupo de hongos que constituye más de cien especies y se caracteriza por su forma filamentosa. Estos hongos, que forman parte de este género, son saprófitos y se ubican en entornos que presentan niveles elevados de humedad. Con respecto a su morfología tienen conidióforos con una vesícula en su extremo apical, además de una célula de pie basal en el extremo opuesto, que se conecta con la hifa. Las características de la vesícula pueden variar según la especie. La estructura de las cabezas conidiales se caracteriza por un conidióforo que presenta un ensanchamiento en su extremo, similar a una vesícula. Estos conidióforos están rodeados por estructuras alargadas conocidas como fiálides. Las colonias que se desarrollan en condiciones de laboratorio exhiben una variedad de colores. Inicialmente, suelen ser blancas, pero con el tiempo, este color puede cambiar a tonalidades como el amarillo, marrón, verde e incluso negro. Estos cambios de color dependen de la especie particular de *Aspergillus* que está siendo cultivada. En términos de textura, las colonias tienen un aspecto similar al algodón o al terciopelo (López, 2023).

Tabla 3.*Taxonomía de Aspergillus sp.*

Taxonomía	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Familia	Trichocomaceae.
Género	<i>Aspergillus</i>

2.1.7 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier FT IR.

La técnica de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT IR) es una técnica aplicable a una amplia variedad de compuestos químicos como los polímeros y compuestos orgánicos. Este equipo se utiliza para obtener un espectro infrarrojo de emisión o absorción de un gas, líquido o sólido. Este espectrómetro recopila los datos en una amplia gama y de manera simultánea. Es una técnica analítica que se puede usar para identificar la concentración de los compuestos de interés y así mismo determinar la estructura química que tienen los compuestos a través de sus espectros (Scientific, 2023).

2.1.7.1 Transmitancia.

La transmitancia en la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) hace referencia a la cantidad de radiación infrarroja que atraviesa una muestra y llega al detector. El FTIR es un método analítico empleado para obtener detalles sobre la composición química y las estructuras moleculares de sustancias. Esto se logra al estudiar cómo la radiación infrarroja interactúa con las vibraciones de las moléculas. En este contexto el porcentaje de transmitancia del FTIR resulta fundamental para analizar la forma en que distintos grupos funcionales en las moléculas reaccionan ante la radiación infrarroja. Al medir la transmitancia a diferentes longitudes de onda o números de onda, se genera un gráfico infrarrojo que exhibe las absorciones características de los enlaces químicos presentes en la muestra. Mediante la interpretación de estos picos de absorción, es posible reconocer los grupos funcionales presentes y obtener información sobre la estructura molecular de la muestra (Primpke et al., 2018).

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1 Diseño.

El diseño experimental de este estudio es a través de estadística descriptiva, se analiza los resultados que se dan luego de someter tres muestras a ensayos de biodegradación con tres especies diferentes de hongos (*Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*). La variable independiente a estudiar es el crecimiento de la cepa y la variable dependiente son las muestras de plásticos fabricados con tereftalato de polietileno. Se describe los resultados del cambio estructural de las muestras PET a través de diagramas de barras y de dispersión. Es un estudio cuantitativo y cualitativo.

3.2 Población y muestra.

3.2.1 Población.

Las botellas de plástico y el sedimento se lo tomo del centro de reciclaje Fabricio Valverde ubicado en la parte alta de la isla Santa Cruz en Galápagos, tomando en cuenta que es el único botadero de la isla Santa Cruz, además de que se maneja el reciclaje de una forma muy estricta, lo que ayudo a obtener muestras de botellas en fase de degradación y sedimento con pedazos de plástico.

3.2.2 Muestra.

Se tomaron tres muestras, de las cuales dos fueron de botellas con deterioro notorio y una muestra de sedimento que estaba en el cuadrante junto a las botellas degradadas. Las botellas fueron escogidas del cuadrante 1. Para el ensayo de biodegradación del plástico e identificación de los hongos se aisló un hongo por cada

muestra. Dando así un estudio de tres hongos aislados de cada muestra específica; dos hongos de las botellas y un hongo del sedimento. Se realizó la recolección únicamente de tres muestras debido a las restricciones de la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG) y de los permisos otorgados por el Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de Santa Cruz. La distancia que hay entre Puerto Ayora hacia Guayaquil es más de 1160km.

3.3 Variables.

3.3.1 Variable independiente:

Crecimiento de cepas

Temperatura

Tiempo

3.3.2 Variable dependiente:

Cambio estructural PET

Peso del plástico PET

3.2 Recogida de datos.

Tabla 4.

Peso del plástico antes del ensayo de biodegradación.

Muestra	Peso (g)	Fecha
Plástico 1	0,1367	22/06/2023
Plástico 2	0,1607	22/06/2023
Plástico 3	0,1369	22/06/2023

Tabla 5.

Peso del plástico después de cuarenta y un días del ensayo de biodegradación.

Muestra	Peso (g)	Fecha
Plástico 1	0,1365	01/08/2023
Plástico 2	0,1606	01/08/2023
Plástico 3	0,1364	01/08/2023

Tabla 6.

Peso del plástico antes y después del ensayo de biodegradación.

Muestra	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)
Plástico 1	0,1369	0,1365
Plástico 2	0,1607	0,1606
Plástico 3	0,1367	0,1364

3.3 Protocolos.

3.3.1 Metodología.

El estudio realizado fue del tipo correlacional, explicativo. Se efectuó un muestreo no probabilístico intencional y en la recolección de datos se aplicó la técnica observacional (Méndez et al., 2006).

3.3.2 Obtención de las muestras.

Las muestras se recolectaron en la Isla Santa Cruz en Galápagos. Ubicado en el centro de reciclaje Fabricio Valverde con coordenadas: -0,797653, -99,20861.

Haciendo uso de todas las medidas de bioseguridad se llevó guantes, mandil, cofia y mascarilla para realizar la recolección de la muestra. Por otro lado, para la conservación y transporte de la muestra se utilizó seis fundas ziploc en donde se guardó cada muestra en una funda ziploc por cada una y se aseguró con fundas ziploc adicionales sobre las anteriores para tener un mejor almacenamiento, conservación, y así evitar que entre o salgan partículas de las muestras. Adicional a esto para el transporte se usó una hielera con varios geles refrigerantes por abajo y encima de las muestras recolectadas. La fecha del muestreo fue el 5 de mayo y el transporte fue el 6 de mayo.

3.3.3 Técnica de muestreo en botellas.

Se realizó un muestreo selectivo de 2 botellas plásticas en el centro de reciclaje Fabricio Valverde, en la zona de plásticos. Para la recolección se seleccionó el cuadrante uno, dado que en ese cuadrante se encontró mayor cantidad de botellas con notoria degradación. Las botellas recolectadas para el estudio son botellas con un desgaste

notorio, es decir que en su estructura se encuentran varias fisuras, color más opaco y composición más delgada en comparación a la estructura original.

3.3.4 Muestreo de sedimento.

Se realizó un muestreo aleatorio simple de sedimento que estaba en zona de contención y almacenamiento de plásticos más antiguos del centro de reciclaje, se tomó un aproximado de 100g de muestra. El sedimento recolectado tiene varios pedazos de plásticos pequeños entre la muestra de tierra. El cuadrante que se eligió fue el número 1 de los distintos cuadrantes.

Las muestras se mantuvieron en estado de congelación a una temperatura de 4°C para que se mantengan preservadas hasta la fecha del 15 de junio del 2023 en donde se comenzó con la metodología dentro del laboratorio (Montesinos et al., 2015).

3.3.5 Fase de laboratorio.

3.3.5.1 Aislamiento de hongos con posible capacidad biodegradadora de polietileno de tereftalato.

3.3.5.1.2 Aislamiento de los hongos en muestra de sedimento.

Siguiendo la metodología de (Usha, 2011) se transfirió un gramo de muestra de suelo a un matraz cónico que contuvo 99 ml de agua destilada estéril. Este contenido se agitó durante 30 minutos a 150rpm y se diluyó en serie, en este caso se realizó diluciones hasta 10⁻³.

Para la siembra y el aislamiento de hongos se sigue la metodología de (Kaiding, 2018). En donde se preparó el medio PDA añadiendo estreptomycin al 1% y luego de que se esterilizó la caja Petri con el medio de cultivo se esperó a que se enfrié y se

añadió 1ml de suspensión microbiana por cada dilución. Finalmente se incubó a 28 ± 20 C en la oscuridad durante tres días.

Para la resiembra y aislamiento de hongos específicos se usa el agar dextrosa de patata (PDA) siguiendo el mismo procedimiento descrito por (Kaiding 2018).

3.3.5.1.3 Aislamiento de los hongos en muestras de botellas.

3.3.6 Lavado de las botellas.

Según la metodología de Méndez se lavaron las botellas con agua destilada estéril hasta que quedó libre de adherencias en la superficie, posterior a esto se fraccionaron las botellas y se lavaron con solución de cloranfenicol en agua destilada estéril a una concentración de 0,5mg/mL por 60 minutos, luego se colocaron los fragmentos de plástico en agua estéril por 30 minutos adicionales (Méndez et al., 2006).

3.3.6.1 Aislamiento de hongos de las muestras de botellas.

Para el aislamiento de los hongos, se fraccionó los plásticos en muestras más pequeñas y se sembraron en medio PDA según el método modificado de (Méndez et al., 2006).

Al tener dos muestras de botellas se fraccionó tres pedazos de plástico por cada muestra y se la sembró directamente en el medio PDA con estreptomycin.

3.3.7 Identificación de los hongos.

La morfología fúngica se estudió macroscópicamente mediante la observación de las características de la colonia color, textura y crecimiento. Para la identificación microscópica se realizó el montaje en azul de lactofenol con cinta transparente y el montaje en microplaca. Con ayuda de estas dos técnicas se observó bajo el microscopio

las estructuras de los conidios, conidióforos, hifas, fiálides y disposición de esporas. Se contrasta las observaciones para identificar los hongos basándonos en la literatura de (Aneja, 2007).

3.3.8 Ensayo de biodegradación.

El ensayo de la actividad degradadora del tereftalato de polietileno se realizó según los procedimientos descritos por (Kavelman et al., 1978). En donde se utilizó el polietileno de tereftalato (PET) como fuente de carbono del ensayo de biodegradación. El inóculo se lo obtiene del medio de cultivo ya incubado y con crecimiento de hongos de interés. Se realiza un barrido en la superficie del hongo de interés y se lo suspendió en agua destilada estéril hasta que se obtuvo una turbidez de 0,5 en la escala de Mac Farland, luego se adicionó un mililitro de la suspensión en una caja Petri con el medio agar PDA (Méndez et al., 2006).

Para finalizar el proceso se siguió la metodología de (Iparraguirre, 2015) en donde se coloca el plástico PET lavado y desinfectado con fluconazol y cloranfenicol cortado en pedazos de 6,5x1 cm y se manda a incubación a 24°C con un pH de 6,5 y se espera cuarenta y un días para analizar la degradación.

3.3.9 Análisis por FT IR.

El análisis por FT IR se lo realizó de forma externa, en donde las muestras antes y después del ensayo de biodegradación se las analizó dentro de las instalaciones de la Escuela Superior Politécnica del Litoral con el encargado Joel Vera mismo que es investigador de la ESPOL y coordinador de los laboratorios de análisis.

Para la muestra control, se analizó los tres plásticos antes de someterlos al ensayo de biodegradación. El tamaño de los plásticos fue de 6,5cm x 1cm, debido a que en este estudio se quiso analizar el film directo del tereftalato de polietileno, es decir

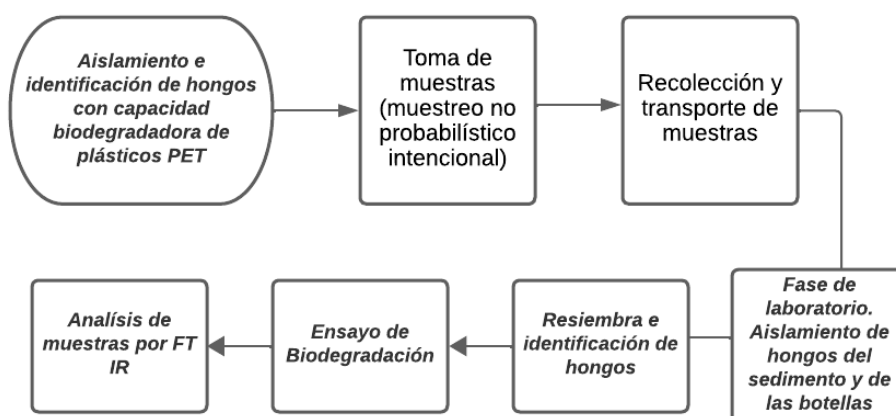
sin ningún pretratamiento para la lectura en el infrarrojo por transformada de Fourier. Se tomaron muestras de 6,5 cm x 1 cm debido al tamaño del detector del equipo.

Las muestras se leyeron en el día cero y luego de cuarenta y un días para analizar el cambio conformacional, las muestras se las llevaron filtradas y lavadas para evitar que los microorganismos influyan en el espectro que se obtendrá. Se siguió la metodología de (Iparraguirre, 2015) en donde se lavaron los tres plásticos durante 60 minutos con fluconazol, adicional a este primer lavado, se tomó agua destilada estéril en tres distintos vasos de precipitación y se lavaron las muestras tres veces más con el fin de eliminar todo rastro de residuo.

Para finalizar el proceso se secaron las muestras de PET con papel filtro y se las colocó en la estufa a 40°C por 30 minutos antes de su debida lectura.

Diagrama 1.

Resumen de la metodología realizada.



Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1 Análisis de los datos.

Tabla 7.

Contraste del peso perdido por acción de los hongos frente al tereftalato de polietileno luego de cuarenta y un días.

Muestra	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Peso Perdido (g)	Peso Perdido (mg)
Plástico 1	0,1367	0,1365	0,0002	0,2
Plástico 2	0,1607	0,1606	0,0001	0,1
Plástico 3	0,1369	0,1364	0,0005	0,5

Nota. La tabla 7 indica el peso perdido de cada muestra de plástico dentro del periodo en el que se realizó el ensayo de biodegradación. Se muestra el peso inicial de las láminas de tereftalato de polietileno y el peso final que fue tomado luego de cuarenta y un días del ensayo de biodegradación. Se puede determinar que la pérdida del peso fue de 0,2 mg, 0,1 mg y 0,5 mg.

4.2 Evaluación del ensayo de biodegradación.

Según un estudio realizado en el año 2021 se evalúa el porcentaje de biodegradación a través de la diferencia del peso inicial con el peso final de la muestra dividido para el peso inicial y multiplicado por cien (Sandoval et al., 2022).

Fórmula para medir el porcentaje de biodegradación del plástico a base de tereftalato de polietileno.

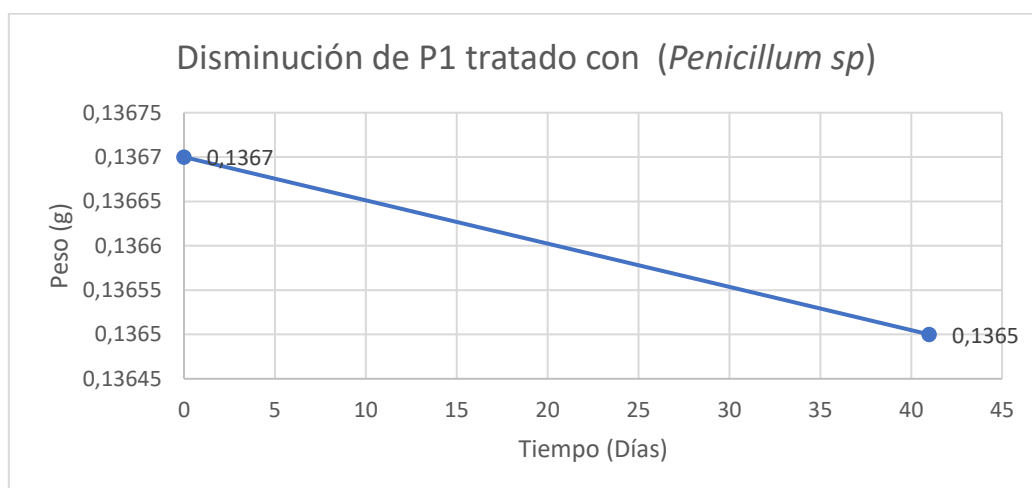
$$\text{Porcentaje de biodegradación de PET} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final})}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Plástico 1

$$\text{Porcentaje de biodegradación de P 1} = \frac{(0,1367g - 0,1365g)}{0,1367g} \times 100 = 0,14\%$$

Figura 3.

Representación de la disminución del peso del P1 tratada con *Penicillum sp.*



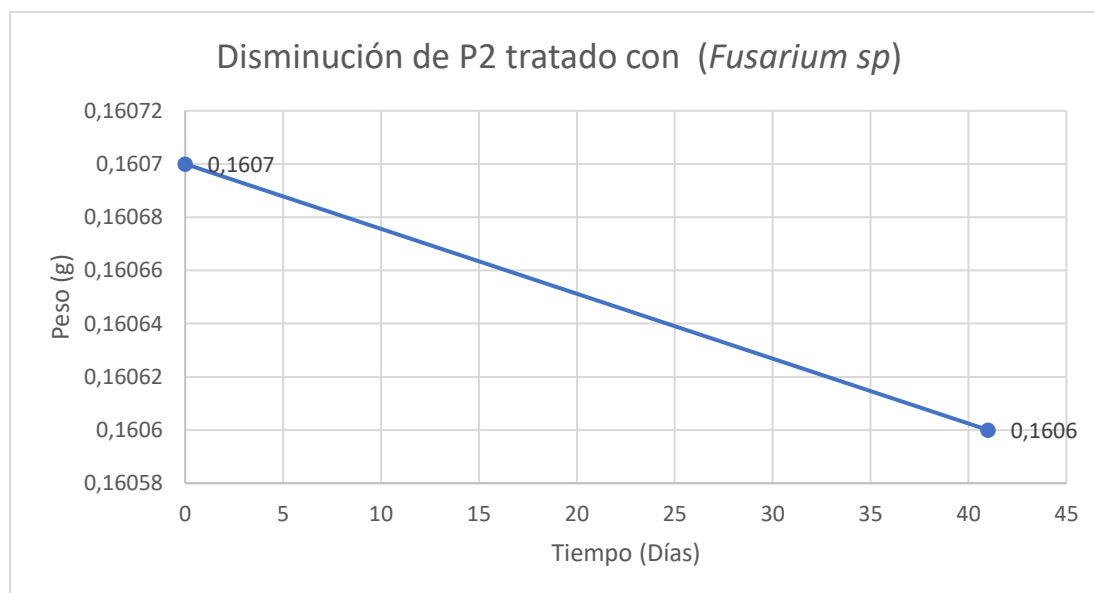
Nota. En la figura 3 podemos ver que el peso inicial del plástico a base de tereftalato de polietileno es de 0,1367 g que luego del tratamiento de biodegradación con *Penicillum sp* por un periodo de cuarenta y un días disminuye a 0,1365 g. Es decir que el hongo del género *Penicillum sp* fue capaz de disminuir el peso de la muestra con 0,2 mg. Por otro lado, basándonos en la fórmula de porcentaje de biodegradación descrita por Sandoval tenemos que el porcentaje de biodegradación del tratamiento con este hongo es del 0,14%.

Plástico 2

$$\text{Porcentaje de biodegradación de P 2} = \frac{(0,1607g - 0,1606g)}{0,1607g} \times 100 = 0,06\%$$

Figura 4.

Representación de la disminución del peso de la muestra P2 tratadas con *Fusarium sp.*



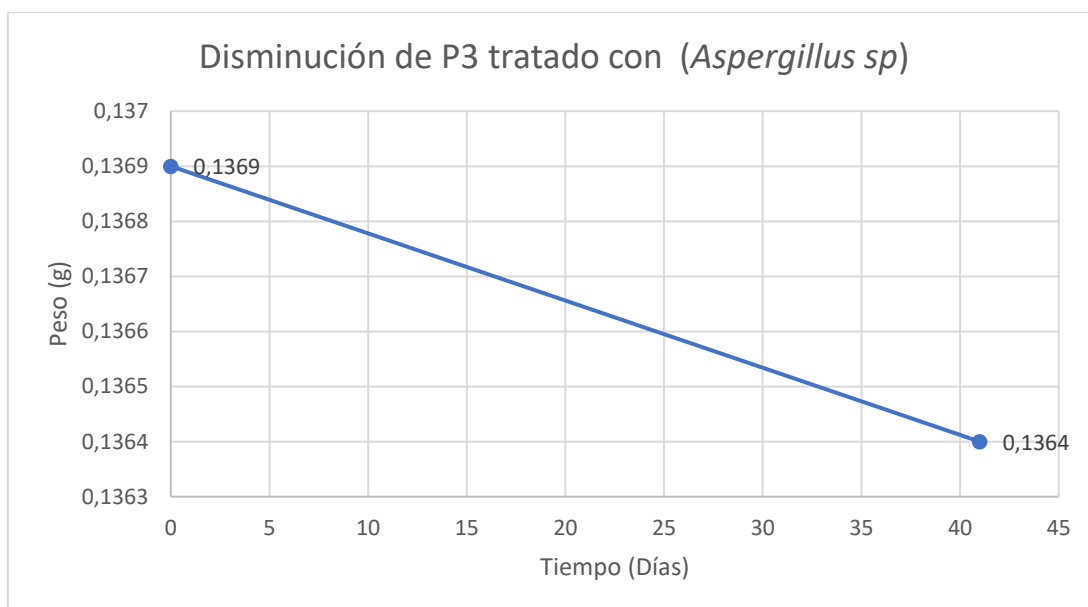
Nota. En la figura 4 podemos ver que el peso inicial del plástico a base de tereftalato de polietileno es de 0,1607 g que luego del tratamiento de biodegradación con *Fusarium sp.* por un periodo de cuarenta y un días disminuye a 0,1606 g. Es decir que el hongo del género *Fusarium sp.* fue capaz de disminuir el peso de la muestra con 0,1mg. Por otro lado, basándonos en la fórmula de porcentaje de biodegradación descrita por Sandoval tenemos que el porcentaje de biodegradación del tratamiento con este género es del 0,06% siendo este el hongo con menor capacidad de biodegradación.

Plástico 3

$$\text{Porcentaje de biodegradación de P 3} = \frac{(0,1369g - 0,1364g)}{0,1369g} \times 100 = 0,36\%$$

Figura 5.

Representación de la disminución del peso de la muestra P3 tratadas con *Aspergillus*



Nota. En la figura 5 podemos ver que el peso inicial del plástico a base de tereftalato de polietileno es de 0,1369 g que luego del tratamiento de biodegradación con *Aspergillus sp* por un periodo de cuarenta y un días disminuye a 0,1364 g. Es decir que el hongo del género *Aspergillus sp* fue capaz de disminuir el peso de la muestra con 0,5mg. Por otro lado, basándonos en la fórmula de porcentaje de biodegradación descrita por Sandoval tenemos que el porcentaje de biodegradación del tratamiento con este hongo es del 0,36% siendo este el resultado con mayor efectividad de este estudio.

4.3 Análisis de resultados.

Tabla 8.

Crecimiento de hongos aislados de la muestra de sedimento.


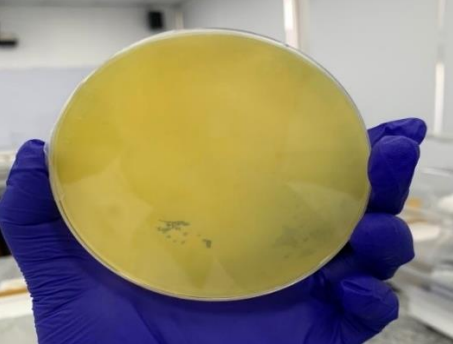
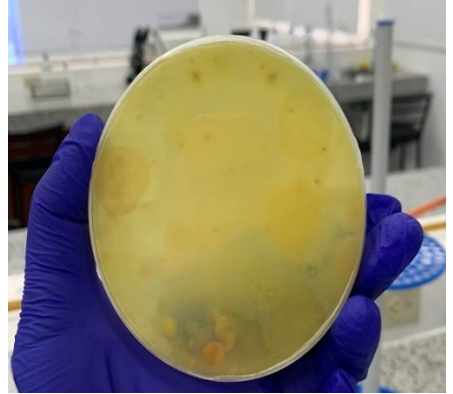
Dilución	Fotografía	Observación.
<p>Dilución 10^{-1}</p> <p>Se logran ver varias colonias aisladas de hongos filamentosos, sin embargo lo que más prevalece en el medio de cultivo PDA son las levaduras.</p>		<p>Se logra ver colonias de levaduras aisladas en mayor cantidad que los hongos filamentosos debido al metodo de aislamiento de los microorganismos ya que al diluir el sedimento las levaduras tienen capacidad de crecer de una forma más rápida por ser unicelulares y más simples.</p>
<p>Dilución 10^{-2}</p> <p>Se logra analizar colonias de levaduras, ocupan gran cantidad de la superficie del medio de cultivo</p>		<p>Para el ensayo de biodegradación se eligió aislar una colonia de hongos filamentosos tomadas de la muestra con dilución 10^{-1}.</p>
<p>Dilución 10^{-3}</p> <p>Se logran ver colonias de hongos filamentosos, sin embargo, hay mayor cantidad de levaduras.</p>		

Tabla 9.

Crecimiento de hongos aislados de la muestra de la botella plástica 1.

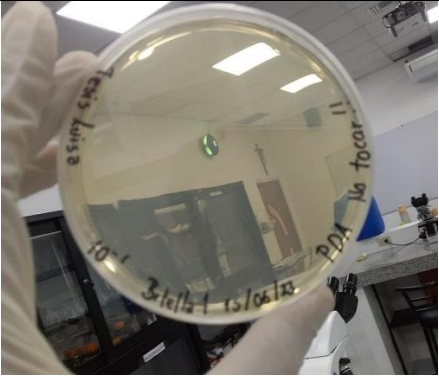

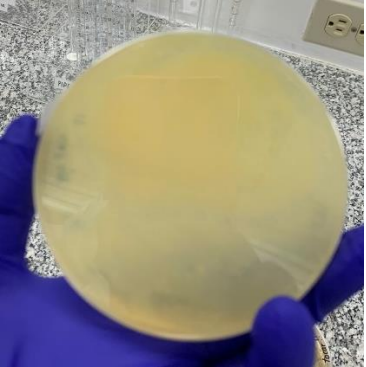



Botella 1	Fotografía	Observación.
No se evidencia crecimiento de hongos ni levaduras.	 <p>A photograph of a petri dish held in a gloved hand. The dish is inverted, showing a clear, yellowish agar surface with no visible microbial growth. The dish has handwritten text on its lid: 'Luisa', '3/16/15/16/17', and '20/11/16'.</p>	No se evidencia crecimiento debido a que se realizó una mala técnica de aislamiento debido a que al esterilizar los materiales se los mantuvo mucho tiempo en el fuego y se los usó inmediatamente.
Crecimiento de levaduras y hongos filamentosos, se puede evidenciar consorcios microbianos.	 <p>A photograph of a petri dish held in a blue gloved hand. The agar surface shows a large, irregular, yellowish growth with a filamentous, fuzzy texture, indicating the presence of filamentous fungi and yeasts.</p>	A diferencia de la primera imagen se mantuvo un mejor manejo de la técnica, se respetaron los tiempos de descontaminación de materiales. Debido a que hay una gran cantidad de hongos filamentosos se decidió aislar el segundo hongo filamentoso de esta muestra para el ensayo de biodegradación.
Crecimiento de levaduras, no muestran hongos filamentosos	 <p>A photograph of a petri dish held in a blue gloved hand. The agar surface shows a uniform, yellowish growth, which is identified as yeast, with no filamentous structures visible.</p>	Se observa levaduras ya que la muestra de plástico no se lavó de manera ardua para eliminar los residuos de tierra que tenían, por lo que prevaleció el crecimiento de levaduras.

Tabla 10.

Crecimiento de hongos aislados de la muestra de la botella plástica 2.

Botella 2	Fotografía	Observación.
<p>Se observa crecimiento de hongos filamentosos alrededor del plástico, formación de consorcio de hongos.</p>	 <p>A photograph of a petri dish held by a hand in a blue glove. The dish contains a yellow agar medium with a piece of white plastic. Fungal growth is visible as a fuzzy, greyish-white mass around the plastic. The lid of the dish has handwritten text: 'Tesis Luisa', 'Botella 2', '15/06/23', and 'V. Oca'.</p>	<p>En el aislamiento de la segunda botella se pulió la metodología por lo que se logró tener un crecimiento de hongos filamentosos más notorio. Se eligió la tercera muestra debido a que hay una mayor variedad de hongos filamentosos. Por lo tanto de la tercera muestra se aislo el tercer hongo para el ensayo de biodegradación.</p>
<p>Se observa crecimiento de hongos alrededor del plástico, se puede determinar varias colonias de hongos filamentosos.</p>	 <p>A photograph of a petri dish with a yellow agar medium and a piece of white plastic. Several distinct, fuzzy fungal colonies of different colors (white, grey, and dark) are growing around the plastic.</p>	<p>En el aislamiento de la segunda botella se pulió la metodología por lo que se logró tener un crecimiento de hongos filamentosos más notorio. Se eligió la tercera muestra debido a que hay una mayor variedad de hongos filamentosos. Por lo tanto de la tercera muestra se aislo el tercer hongo para el ensayo de biodegradación.</p>
<p>Se observa crecimiento de hongos alrededor del plástico, se puede determinar varias colonias de hongos filamentosos que forman consorcios.</p>	 <p>A photograph of a petri dish with a yellow agar medium and a piece of white plastic. Several distinct, fuzzy fungal colonies of different colors (white, grey, and dark) are growing around the plastic, forming a consortium.</p>	<p>En el aislamiento de la segunda botella se pulió la metodología por lo que se logró tener un crecimiento de hongos filamentosos más notorio. Se eligió la tercera muestra debido a que hay una mayor variedad de hongos filamentosos. Por lo tanto de la tercera muestra se aislo el tercer hongo para el ensayo de biodegradación.</p>

4.4 Identificación de hongos.

Tabla 11.

Hongo aislado de la botella plástica 1.

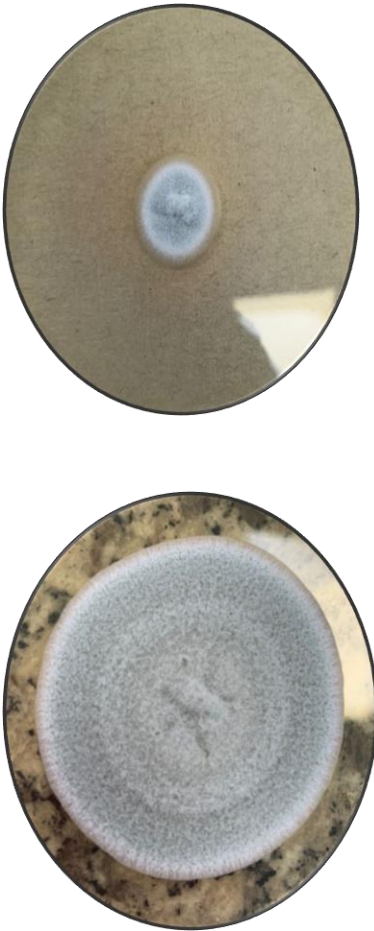
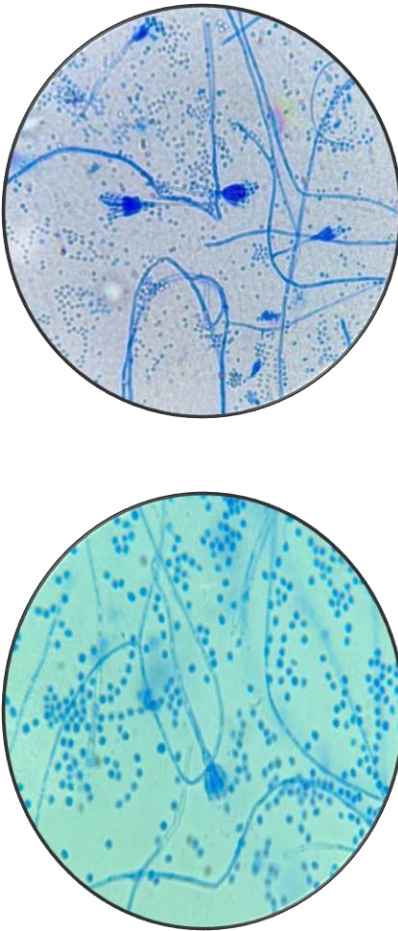
Vista macroscópica	Vista microscópica 100X	Observación
		<p>Caracterización macroscópica: Se logra observar que el hongo tiene una textura granular-aterciopelada. Es de crecimiento rápido y su color inicial es blanco que a través del tiempo se torna verdoso-grisaseo.</p> <p>Caracterización microscópica: Se observa que existe hifas septadas, sus conidióforos portan metulas que contienen entre 3 a 5 fiálides mismas que desprenden los conidios (esporas).</p> <p>Microorganismo aislado: <i>Penicillium sp</i></p>

Tabla 12.

Hongo aislado de la botella plástica 2.

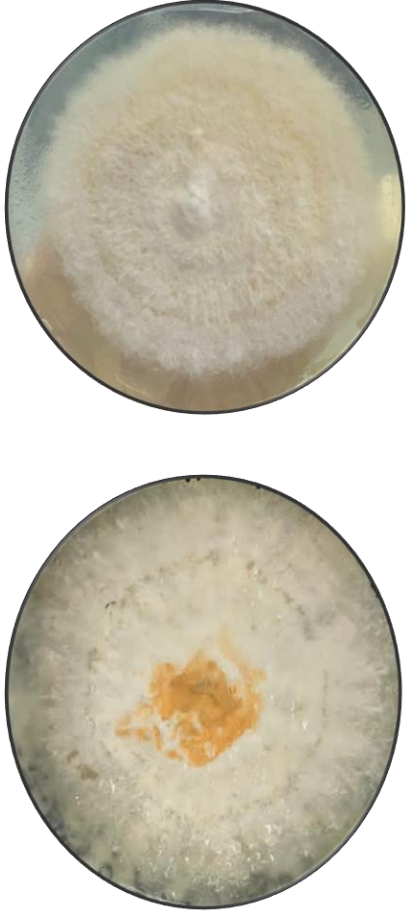
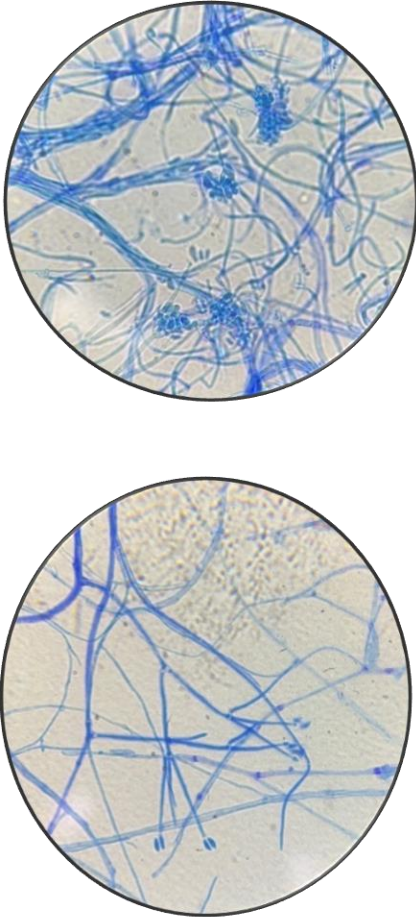

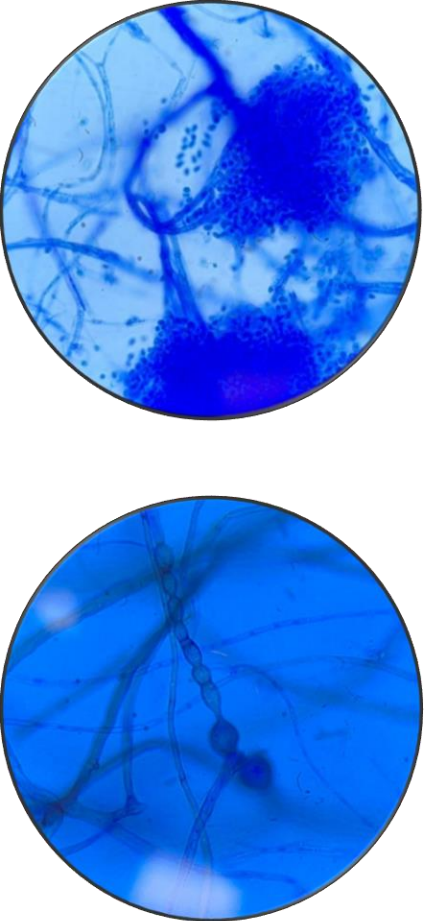
Vista macroscópica	Vista microscópica 100X	Observación
		<p>Caracterización macroscópica: Se logra observar que el hongo tiene una textura aterciopelada. Es de crecimiento rápido y su color inicial es blanco que a través del tiempo se torna amarillo desde el centro del medio de cultivo.</p> <p>Caracterización microscópica: Se observa que existe hifas septadas, tiene fiálides finas, alargadas y ramificadas de las cuales surgen los conidios que son ligeramente curvos en forma de luna y carecen de conidióforos.</p> <p>Microorganismo aislado: <i>Fusarium sp.</i></p>

Tabla 13.

Hongo aislado de la botella plástica 3.

Vista macroscópica	Vista microscópica 100X	Observación
		<p>Caracterización macroscópica: Se logra ver un crecimiento rapido, tienen textura algodonosa y el color inicial es un blanco, que con el pasar de los dias se torna negro desde en centro hasta los extremos del cultivo.</p> <p>Caracterización microscópica: Se observa que existe hifas hialinas septadas. Su reproduccion es sexual y asexual por lo que se puede observar ascosporas y conidióforos que forman una vesicula en donde un gran numero de fiálides se forman y desprenden grandes cantidades de conidios.</p> <p>Microorganismo aislado: <i>Aspergillus sp.</i></p>

4.5 Presentación de los datos.

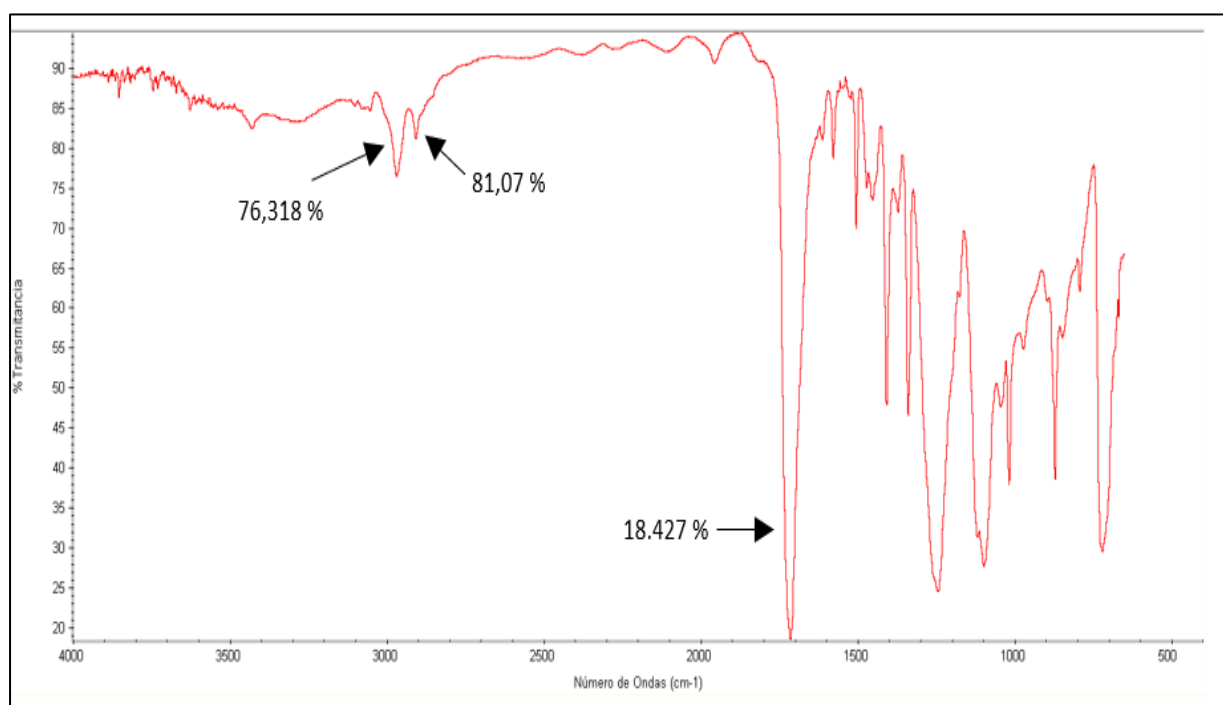
Tabla 14.

Datos del espectro de transmitancia FT IR de la muestra control.

Rango del número de onda (X)	Transmitancia (Y)	Grupo funcional
1780-1650 \approx 1714,9 cm^{-1}	18,427 %	C=O
2960-2850 \approx 2959,2 cm^{-1}	76,318 %	C-H
2960-2850 \approx 2908,14 cm^{-1}	81,07%	C-H

Figura 6.

Espectro de transmitancia de la muestra control.



Nota. En la figura 6 se puede analizar la muestra control del estudio, la cual es una muestra que no ha sido expuesta a ningún ensayo de biodegradación. Se puede determinar los principales grupos funcionales que son los ésteres y los alcanos. En el rango de $1714,9\text{ cm}^{-1}$ se puede observar la banda del grupo éster misma que es fuerte y su pico es pronunciado, en donde su transmitancia es de $18,427\%$. Así mismo tenemos el grupo de alcanos entre el rango 2850 cm^{-1} - 2960 cm^{-1} donde observamos los picos de menor tamaño en comparación al grupo éster. Tenemos valores de transmitancia de $81,07\%$ y $76,318\%$ del grupo alcano C-H, en el rango de 2000 cm^{-1} - 1660 cm^{-1} se observan el grupo benceno C=C con una intensidad débil (sobretonos), finalmente en el rango 500 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} podemos detectar y observar la huella digital de nuestro compuesto.

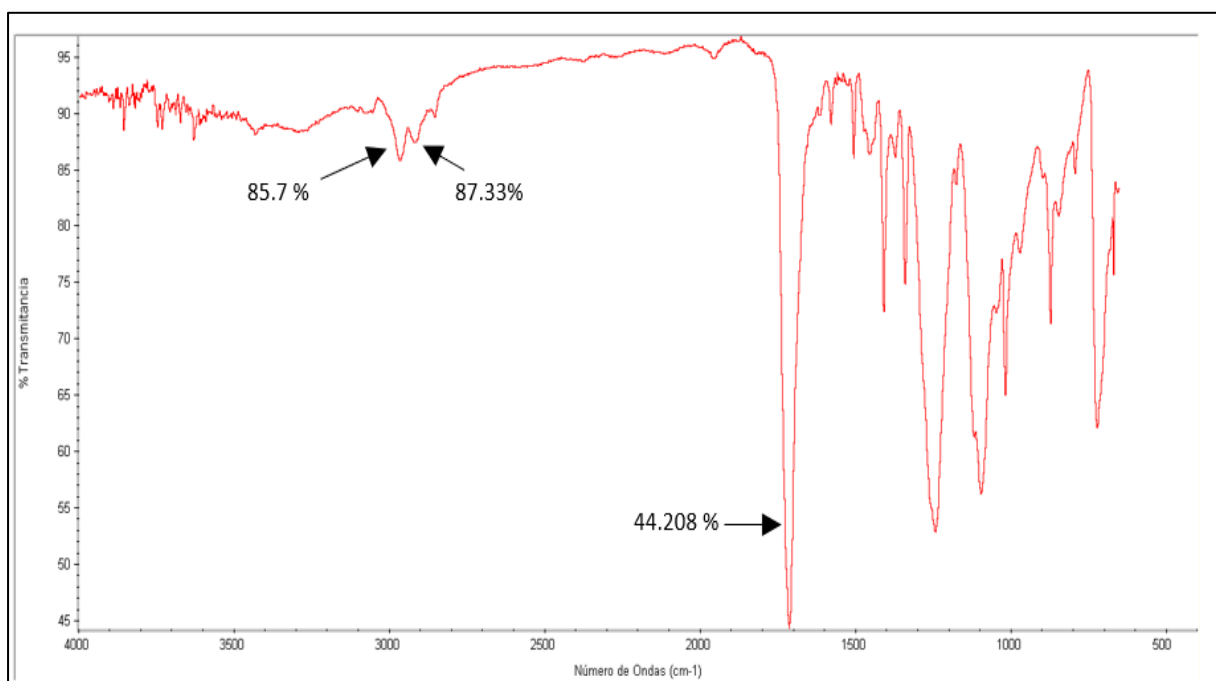
Tabla 15.

Datos del espectro de transmitancia FT IR del plástico 1 sometido al ensayo de biodegradación con Penicillium sp.

Rango del número de onda (X)	Transmitancia (Y)	Grupo funcional
1780-1650 \approx 1712,7 cm^{-1}	44,208%	C=O
2960-2850 \approx 2955,97 cm^{-1}	85,7 %	C-H
2960-2850 \approx 2923,66 cm^{-1}	87,33%	C-H

Figura 7.

Espectro de transmitancia del plástico 1 luego del tratamiento de biodegradación con Penicillium sp.



Nota. En el espectro mostrado de la figura 7 se puede analizar la muestra P1 del estudio luego de 41 días de estar sometido al ensayo de biodegradación con el hongo del género *Penicillium sp.* Se puede determinar los principales grupos funcionales que son los ésteres y los alcanos. En el rango de $1712,7\text{cm}^{-1}$ se puede observar la banda del grupo éster misma que es fuerte y su pico es pronunciado, en donde su transmitancia es de 44,208%. Así mismo tenemos el grupo de alcanos entre el rango 2850 cm^{-1} a 2960 cm^{-1} en donde observamos los picos de menor tamaño en comparación al grupo éster. Tenemos valores de transmitancia de 87,33% y 85,7% del grupo alcano C-H, en el rango de 2000 cm^{-1} - 1660 cm^{-1} se observan el grupo benceno C=C con una intensidad débil (sobretonos), finalmente en el rango 500 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} podemos detectar y observar la huella digital de nuestro compuesto.

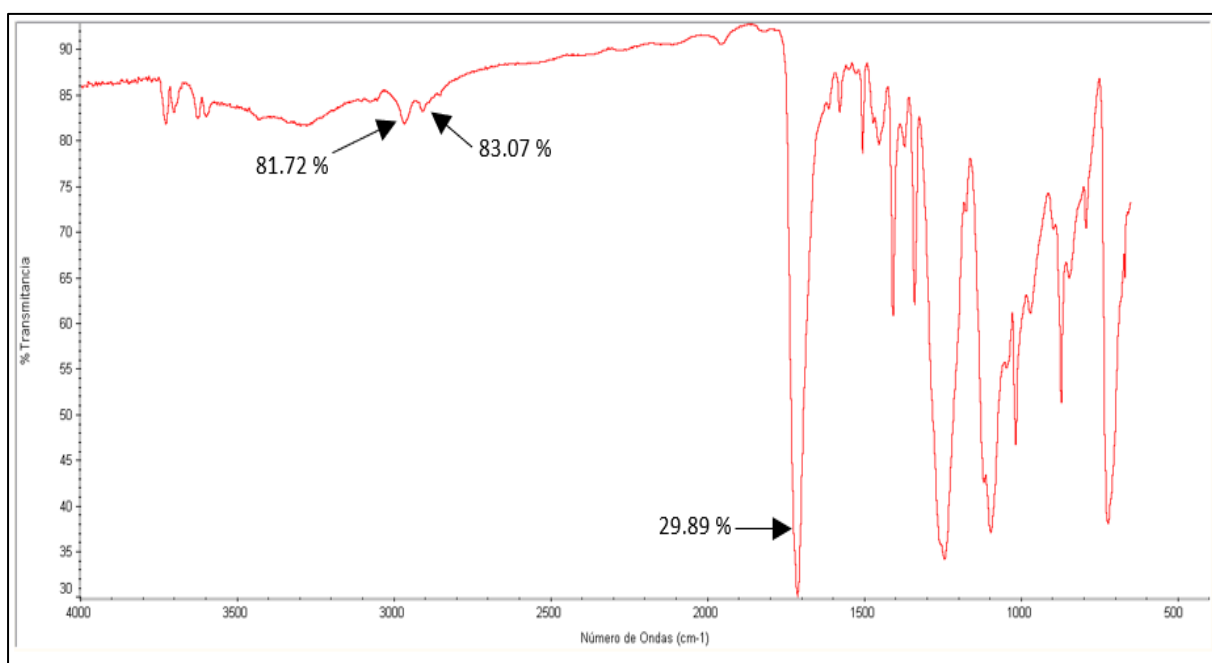
Tabla 16.

Datos de FT IR del plástico 2 sometido al ensayo de biodegradación con Fusarium sp.

Rango del número de onda (X)	Transmitancia (Y)	Grupo funcional
1780-1650 \approx 1712,49 cm^{-1}	29,89%	C=O
2960-2850 \approx 2957,88 cm^{-1}	81,72 %	C-H
2960-2850 \approx 2909,51 cm^{-1}	83,07%	C-H

Figura 8.

Espectro de transmitancia del plástico 2 luego del tratamiento de biodegradación con Fusarium sp.



Nota. En el espectro mostrado en la figura 8 se puede analizar la muestra P2 del estudio luego de 41 días de estar sometido al ensayo de biodegradación con el hongo del género *Fusarium sp.* Se puede determinar los principales grupos funcionales que son los ésteres y los alcanos. En el rango de $1712,49\text{cm}^{-1}$ se puede observar la banda del grupo éster misma que es fuerte y su pico es pronunciado, en donde su transmitancia es de 29,89%. Así mismo tenemos el grupo de alcanos entre el rango 2850 cm^{-1} a 2960 cm^{-1} en donde observamos los picos de menor tamaño en comparación al grupo éster. Tenemos valores de transmitancia de 83,07% y 81,72% del grupo alcano C-H, en el rango de 2000 cm^{-1} - 1660 cm^{-1} se observan el grupo benceno C=C con una intensidad débil (sobretonos), finalmente en el rango 500 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} podemos detectar y observar la huella digital de nuestro compuesto.

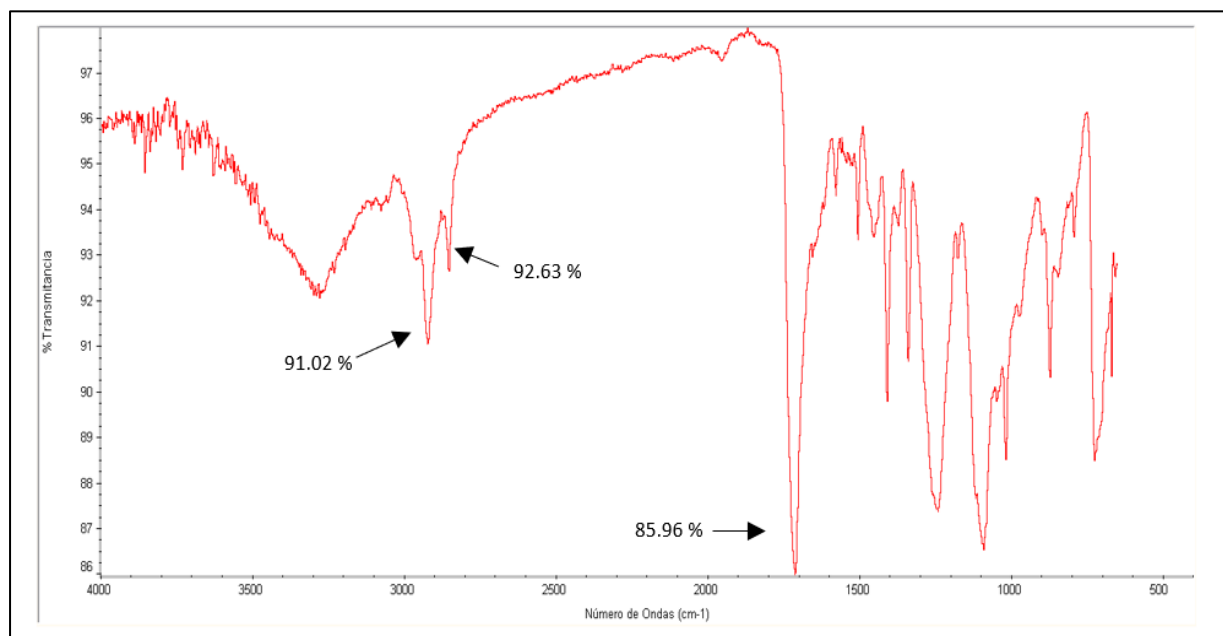
Tabla 17.

Datos de FT IR del plástico 3 sometido al ensayo de biodegradación con Aspergillus sp.

Rango del número de onda (X)	Transmitancia (Y)	Grupo funcional
1780-1650 \approx 1712,49 cm^{-1}	85,96%	C=O
2960-2850 \approx 2923,5 cm^{-1}	91,02 %	C-H
2960-2850 \approx 2852,21 cm^{-1}	92,63%	C-H

Figura 9.

Espectro de transmitancia del plástico 3 luego del tratamiento de biodegradación con Aspergillus.



Nota. En el espectro mostrado en la figura 9 se puede analizar la muestra P3 del estudio luego de 41 días de estar sometido al ensayo de biodegradación con el hongo del género *Aspergillus*. Se puede determinar los principales grupos funcionales que son los ésteres y los alcanos. En el rango de $1712,49\text{cm}^{-1}$ se puede observar la banda del grupo éster misma que es fuerte y su pico es pronunciado, en donde su transmitancia es de 85,96%. Así mismo tenemos el grupo de alcanos entre el rango 2850 cm^{-1} a 2960 cm^{-1} en donde observamos los picos de menor tamaño en comparación al grupo éster. Tenemos valores de transmitancia de 92,63% y 91,02% del grupo alcano C-H, en el rango de 2000 cm^{-1} - 1660 cm^{-1} se observan el grupo benceno C=C con una intensidad débil (sobretonos) finalmente en el rango 500 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} podemos detectar y observar la huella digital de nuestro compuesto.

Tabla 18.

Comparación de la muestra control y los plásticos sometidos a diferentes ensayos de biodegradación con las especies: Penicillum, Fusarium, y Aspergillus.

Rango cm^{-1}	Transmitancia	Control	Plástico 1	Plástico 2	Plástico 3
1780-1650 cm^{-1}	C=O	18,427 %	44,208%	29,89%	85,96%
2960-2850 cm^{-1}	C-H	76,318 %	85,7%	81,72%	91,02 %
2960-2850 cm^{-1}	C-H	81,07%	87,33%	83,07%	92,63%

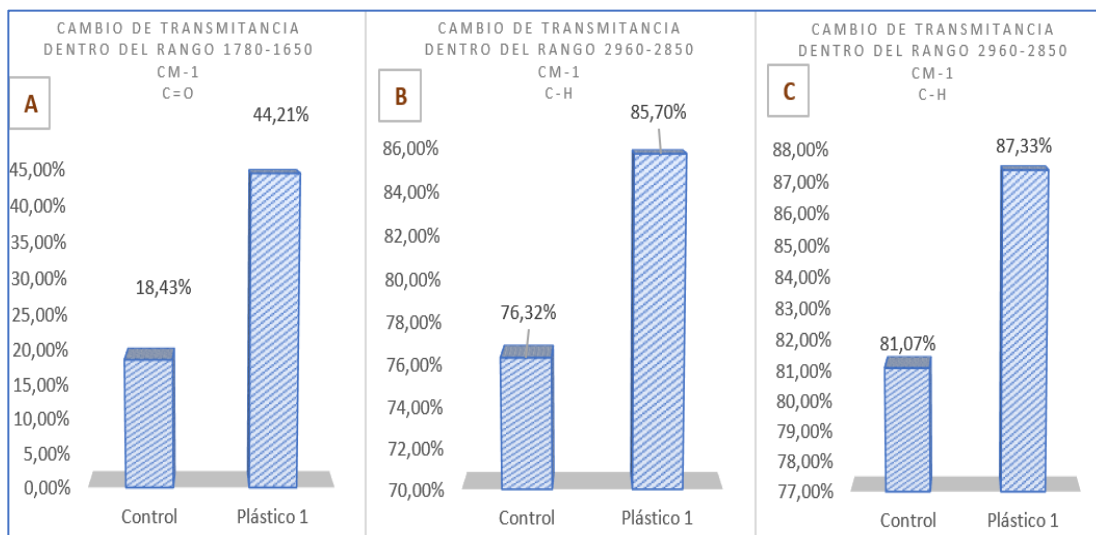
Tabla 19.

Cambio del porcentaje de transmitancia de la muestra control vs la muestra del plástico 1 tratado con Penicillum sp.

Rango cm^{-1}	Transmitancia	Control (C)	Plástico 1 (P1)	Diferencia C-P1
1780-1650 cm^{-1}	C=O	18,427 %	44,208%	18,427-44,208 =25,78 %
2960-2850 cm^{-1}	C-H	76,318 %	85,7%	76,318-85,7 =9,382 %
2960-2850 cm^{-1}	C-H	81,07%	87,33%	81,07-87,33 =6,26%

Figura 10.

Representación de la variación del porcentaje de transmitancia en los rangos 1780 cm^{-1} - 1650 cm^{-1} y 2960 cm^{-1} - 2850 cm^{-1} del plástico 1 tratado con *Penicillium sp.*



Nota. En la figura 10 tenemos la variación mediante gráficos de barras en donde se puede determinar el cambio que se dio luego de los ensayos de biodegradación en los grupos funcionales del tereftalato de polietileno, a) diferencia entre el plástico 1 y el control del grupo funcional éster del rango 1780 cm^{-1} - 1650 cm^{-1} es de 25,78%, b) diferencia entre el plástico 1 y control del grupo funcional de alcano del rango 2960 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} de 9,382%, c) diferencia entre el plástico 1 y control del grupo funcional de alcano del rango 2960 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} de 6,28%.

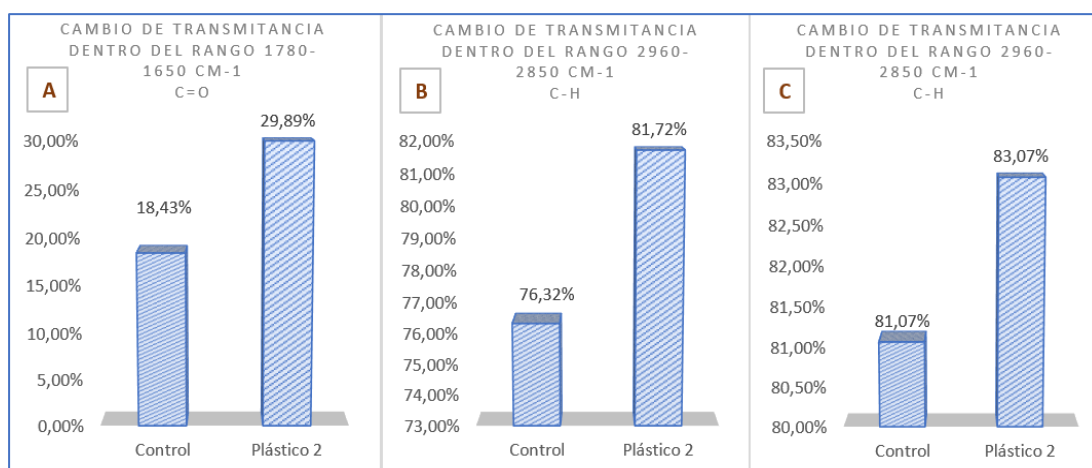
Tabla 20.

Cambio del porcentaje de transmitancia de la muestra control vs la muestra del plástico 2 tratado con Fusarium sp.

Rango cm^{-1}	Transmitancia	Control	Plástico 2	Diferencia C-P1
1780-1650 cm^{-1}	C=O	18,427 %	29,89%	18,427-29,89 =11,463 %
2960-2850 cm^{-1}	C-H	76,318 %	81,72 %	76,318-81,72 =5,402 %
2960-2850 cm^{-1}	C-H	81,07%	83,07%	81,07-83,07 = 2%

Figura 11.

Representación de la variación del porcentaje de transmitancia en los rangos 1780 cm^{-1} -1650 cm^{-1} y 2960 cm^{-1} -2850 cm^{-1} del plástico 2 tratado con Fusarium sp.



Nota. En la figura 11 tenemos la variación mediante gráficos de barras en donde se puede determinar el cambio que se dio luego de los ensayos de biodegradación en los grupos funcionales del tereftalato de polietileno, a) diferencia entre el plástico 1 y el control del grupo funcional éster del rango 1780 cm^{-1} -1650 cm^{-1} es de 11,463 %, b) diferencia entre el plástico 1 y control del grupo funcional de alcano del rango 2960 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} de 5,402 %, c) diferencia entre el plástico 1 y control del grupo funcional de alcano del rango 2960 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} de 2%.

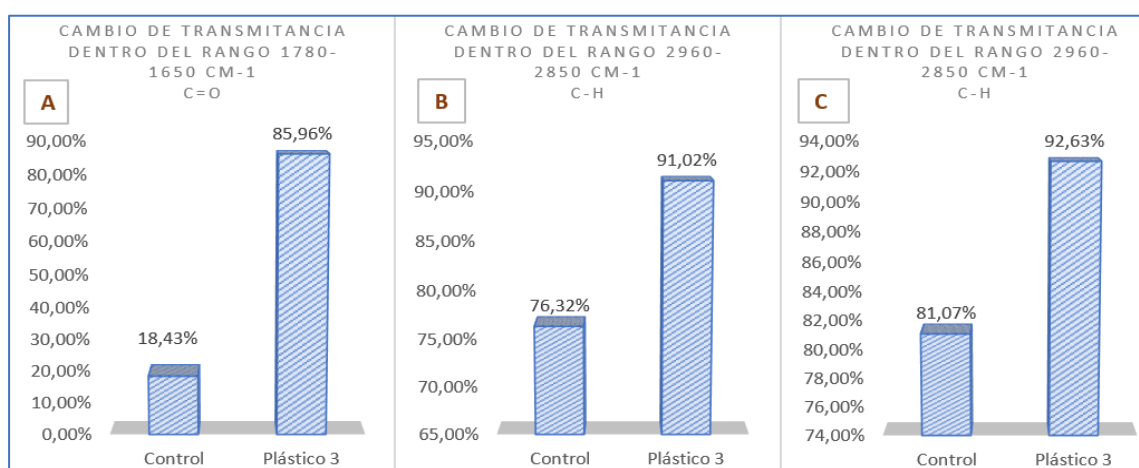
Tabla 21.

Cambio del porcentaje de transmitancia de la muestra control vs la muestra del plástico 3 tratado con Aspergillus sp.

Rango cm^{-1}	Transmitancia	Control	Plástico 3	Diferencia C-P1
1780-1650 cm^{-1}	C=O	18,427 %	85,96%	18,427-85,96 =67,53 %
2960-2850 cm^{-1}	C-H	76,318 %	91,02 %	76,318-91,02 =14,702 %
2960-2850 cm^{-1}	C-H	81,07%	92,63%	81,07-92,63 = 11,56%

Figura 12.

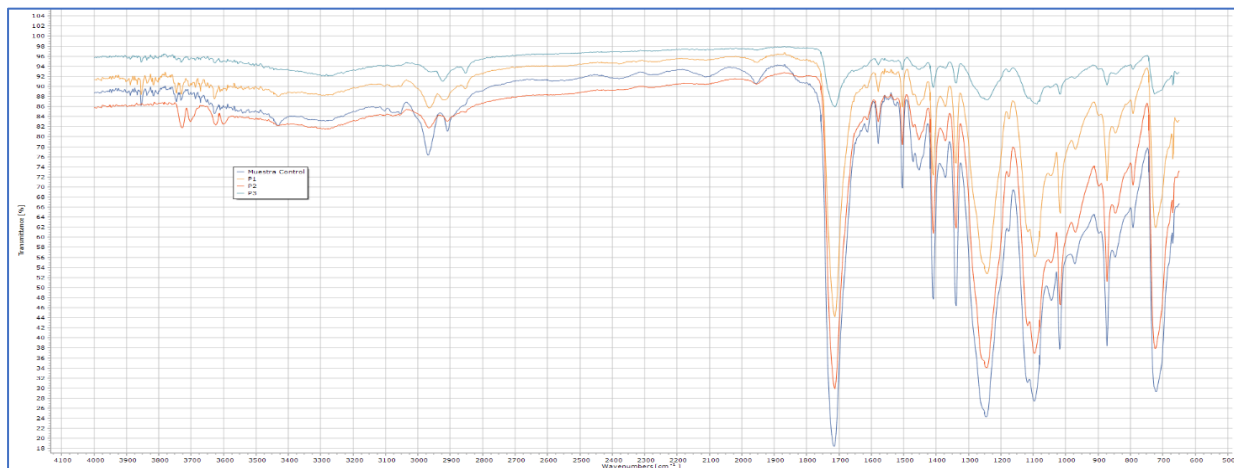
Representación de la variación del porcentaje de transmitancia en los rangos 1780 cm^{-1} -1650 cm^{-1} y 2960 cm^{-1} -2850 cm^{-1} del plástico 3 tratado con Aspergillus sp.



Nota. En la figura 12 tenemos la variación mediante gráficos de barras en donde se puede determinar el cambio que se dio luego de los ensayos de biodegradación en los grupos funcionales del tereftalato de polietileno, a) diferencia entre el plástico 1 y el control del grupo funcional éster del rango 1780 cm^{-1} -1650 cm^{-1} es de 67,53 %, b) diferencia entre el plástico 1 y control del grupo funcional de alcano del rango 2960 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} de 14,702%, c) diferencia entre el plástico 1 y control del grupo funcional de alcano del rango 2960 cm^{-1} a 2850 cm^{-1} de 11,56%.


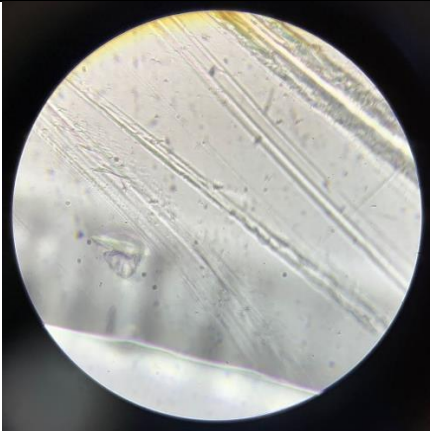

Figura 13.

Espectros de transmisión de infrarrojos de las muestras de plástico a base de tereftalato de polietileno.



Nota. En la figura 13 podemos observar la comparación de todos los espectros que se estudiaron, en donde se logra analizar la diferencia que hay en las bandas que corresponden a los grupos funcionales del tereftalato de polietileno, por lo que se puede concluir que hubo excelentes resultados ya que es notorio el cambio conformacional de los plásticos que se los sometido a biodegradación con distintos hongos como tratamiento. Así mismo tenemos que el tratamiento con *Aspergillus* en el plástico 3 fue el de mejor efectividad ya que hay un cambio drástico en el espectro en el grupo éster y alcanos, así mismo el peso que perdió fue mayor en comparación a los otros tratamientos teniendo un peso perdido del 0,36%, seguido a esto tenemos el tratamiento con *Penicillium* del plástico 1, que le sigue con un peso perdido del 0,14% y con cambios notorios en su espectro de absorción en comparación a la muestra control. Por último, tenemos que el tratamiento 2 con *Fusarium sp* fue el de menor eficiencia ya que tuvo un peso perdido del 0,06% y su cambio estructural en el espectro no es tan notorio en comparación a la muestra control.

4.6 Microscopia del plástico a base del tereftalato de polietileno (PET) luego del ensayo de biodegradación.

Descripción	Imagen
<p>Imagen tomada en 100x por el microscopio donde muestra señales de ataque enzimático por parte del hongo <i>Penicillium sp.</i> Se logra observar varias fisuras que han sido producidas por el crecimiento del hongo sobre el film de PET.</p>	
<p>Imagen tomada en 100x por el microscopio donde muestra señales de ataque enzimático por parte del hongo <i>Fusarium sp.</i> Se logra observar varias fisuras que han sido producidas por el crecimiento del hongo sobre el film de PET. Sin embargo, hay menos cambios físicos en comparación a los otros géneros de hongos (<i>Penicillium sp.</i>, <i>Aspergillus sp.</i>)</p>	
<p>Imagen tomada en 100x por el microscopio donde muestra señales de ataque enzimático por parte del hongo <i>Aspergillus sp.</i> Se logra observar gran cantidad de fisuras que han sido producidas por el crecimiento del hongo sobre el film de PET. Es importante recalcar que al ser el hongo con mayor capacidad de biodegradación y con mayores cambios estructurales es muy evidente que las fisuras en el PET sean mayores que las generadas por <i>Penicillium sp.</i> y <i>Fusarium sp.</i></p>	

4.7 Discusión.

El aislamiento e identificación de hongos aislados de plásticos con notoria degradación al igual que de sedimento han dado buenos resultados ya que se encontraron que todos los hongos tienen capacidad de biodegradar el plástico a base de tereftalato de polietileno en un tiempo de 41 días, así mismo estos hongos tuvieron la capacidad de cambiar la estructura química del PET y disminuir el peso del mismo. Los tres hongos que se aislaron son del género; *Penicillium*, *Fusarium*, y *Aspergillus*.

El género *Penicillium* se identifica por un crecimiento rápido y por el color de las colonias que son blanco con pigmentos verdosos-grisáceos mismos que son muy comunes en las especies que constituyen este género, de igual forma podemos determinar su estructura microscópica en donde los conidióforos son hialinos, tienen metulas de las cuales se derivan las fiálides que tienen forma de un matraz, sus conidios se producen en sacos largos y tienen unas formas globosas, finalmente tenemos la estructura de la ramificación de los conidióforos misma que es monoverticilada (Srinivasan et al., 2020). Por otro lado, existe una gran variedad de estudios que demuestran que *Penicillium* tiene la capacidad de cambiar las estructuras químicas del tereftalato de polietileno. En 2011 se determinó que la estructura química del PET cambia en la región $4000-650\text{ cm}^{-1}$ dando estiramientos en la intensidad de las bandas en los grupos conocidos por el éster y alcanos (Nowak et al., 2011).

Las enzimas que están involucradas en la degradación del tereftalato de polietileno son las hidrolasas y oxidorreductasas, de las cuales se derivan las lipasas, lacasas, carboxilasas, cutinasas, proteasas y ésterasas. Estas catalizan la escisión de los enlaces éster por medio de una reacción en la que se consume una molécula de agua (Temporiti et al., 2022).

En el género *Penicillium* se ha demostrado que existe varias enzimas involucradas en la degradación del PET, *Penicillium* puede secretar cutinasas, proteasas, ésterasas y lacasa (Srikanth et al., 2022). Por lo tanto, se relaciona de forma directa con los resultados que hemos obtenido en cuanto a disminución del peso del PET y al cambio estructural.

En el cambio estructural que se dio en el tereftalato de polietileno tenemos al grupo de alcanos (grupo metilo) y al grupo éster, en donde hubo aumento en el porcentaje de transmitancia ya que en el rango de 2960-2850 cm^{-1} que corresponde al enlace simple C-H hubo aumento con un porcentaje del 9,382 % y 6,26%. Así mismo la diferencia del grupo éster en el rango de 1780-1650 cm^{-1} (C=O) fue del 25,78%.

El género *Fusarium* se caracteriza por tener un crecimiento rápido, textura aterciopelada, pigmentos distintivos como el blanco, verde y rosado (Tapia et al., 2014). En nuestro estudio se encontró una textura aterciopelada de las colonias, el color fue blanco que con el pasar de 5 días comenzó a formar pigmentos amarillos desde el centro del medio hacia el exterior. Con respecto a la estructura microscópica tenemos que existe hifas septadas, tiene fiálides finas, alargadas y ramificadas de las cuales surgen los conidios que son ligeramente curvos en forma de luna y carecen de conidióforos. Lo cual se puede contrastar con el estudio realizado en el 2014 en donde las fiálides del género *Fusarium* pueden ser simples o ramificadas, así como cortas o largas. Además, pueden ser mono fialídicas, lo que significa que las esporas emergen de un solo poro de la fiálide. Los macroconidios tienen una forma similar a la de una medialuna (Tapia et al., 2014).

Con respecto a la capacidad de biodegradación de polímeros del género *Fusarium* tenemos que son capaces de secretar cutinasas y proteasas lo cual se relaciona

de manera directa con el cambio estructural que se da en el tereftalato de polietileno, al igual que en la disminución del peso del PET. Se evidencia el estiramiento de los alcanos en los rangos de 2961 cm^{-1} y 3063 cm^{-1} ya que hay un aumento en las bandas del enlace C-H (grupos metil) con un porcentaje de 5,402 % y 2% con respecto a la muestra control. Así mismo tenemos el aumento de la transmitancia del éster que es en el rango de $1780\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ con un porcentaje de 11,463 % con respecto al grupo control (Srikanth et al., 2022).

El género *Aspergillus* es un género que se caracteriza por ser de crecimiento rápido, textura algodonosa, y variedad de pigmentos, en este caso, en un inicio nuestro hongo aislado fue de color blanco grisáceo que con el tiempo se tornó color gris oscuro. Este género puede reproducirse de forma asexual y sexual, en el ámbito sexual tenemos las ascosporas y en la forma asexual tenemos la formación de conidios que surgen de los conidióforos (Lifeder, 2022).

En el caso de *Aspergillus niger* tienen cabezulas grandes, biseriadas con fiálides y métula. Los conidióforos son de pares lisas, largos y sus conidios son globosos.

Se ha demostrado que varias especies del género *Aspergillus* como *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryza* y *Aspergillus niger* tienen la capacidad de secretar enzimas hidrolasas como cutinasas, ésterasas, lipasas y carboxilasas mismas que son capaces de degradar el plástico a base de tereftalato de polietileno (Temporiti et al., 2022). Por lo tanto, los resultados que se han obtenido en este proyecto de investigación tienen relación, ya que la pérdida de peso que se obtuvo del 0,36% en un periodo de 41 días demuestra la capacidad de estas enzimas para romper enlaces químicos que en este caso son enlaces ésteres y simples.

En un estudio realizado en el 2023 se puede contrastar lo antes mencionado a través de estudios de FT IR, en donde al tratar el plástico con *Aspergillus niger* se determinó que en el rango de 2961 cm^{-1} y 3063 cm^{-1} hay estiramiento del enlace C-H (grupos metil) y en el rango del grupo éster de 1721 cm^{-1} también se encuentra el estiramiento del enlace C=O (grupo carbonilo). Donde el estiramiento hace referencia al aumento de la transmitancia. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este proyecto se pueden evidenciar a través de los estudios antes mencionados.

Es importante mencionar que el porcentaje de transmitancia se refiere a la cantidad de luz absorbida por el material que en este caso es el tereftalato de polietileno, y que a medida aumenta la transmitancia hay menor cantidad de enlaces para absorber la luz y mientras la transmitancia es más baja significa que hay mayor cantidad de enlaces para absorber la luz incidente (Nahm, 2015). Por lo que se puede verificar los resultados obtenidos ya que en los ensayos de biodegradación obtuvimos un notorio aumento del porcentaje de la transmitancia con respecto a la muestra control.

Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones.

En conclusión, a través de técnicas de microbiología y microscopia se logró aislar e identificar tres especies de géneros diferentes los cuales son *Penicillum*, *Fusarium* y *Aspergillus*. Los tres géneros de hongos aislados tuvieron un crecimiento rápido, a partir del tercer día se pudo observar sus estructuras macroscópicas y microscópicas. En las estructuras microscópicas de *Penicillum* se observó que existe hifas septadas, conidióforos que contienen metulas mismas que portan entre 3 a 5 fiálides de las que se desprenden los conidios (esporas). En el género *Fusarium* se observó que existe hifas septadas, fiálides finas, alargadas y ramificadas de las cuales surgen los conidios que son curvos en forma de luna y carecen de conidióforos. Para finalizar, en el género *Aspergillus* se detectó su reproducción sexual y asexual por lo que se puede observar ascosporas y conidióforos que forman una vesícula en donde un gran número de fiálides se forman y desprenden grandes cantidades de conidios.

Por otro lado, se logró determinar a través de la técnica FT IR que todos estos géneros tienen capacidad de biodegradar y cambiar la estructura química de los plásticos a base de tereftalato de polietileno. El hongo del género *Aspergillus* fue el más eficiente, seguido del género *Penicillum* y *Fusarium*. Se obtuvo cambios conformacionales en los grupos funcionales pertenecientes a alcanos en el rango de 1780 cm^{-1} -1650 cm^{-1} y al grupo éster en el rango 2960 cm^{-1} -2850 cm^{-1} en donde el valor de transmitancia fue aumentando, es decir se detectó menor concentración de los enlaces estudiados.

5.2 Recomendaciones.

- Realizar el ensayo de biodegradación por un periodo de tiempo mayor a los cuarenta y un días para obtener mejores resultados.
- Aumentar la cantidad de muestras recolectadas con el fin de tener más microorganismos para estudiar y así poder realizar extrapolación de la biodegradación completa del plástico a base de tereftalato de polietileno.
- Realizar un ensayo de biodegradación con consorcios microbianos para determinar la eficiencia individual y en conjunto de los hongos.
- Analizar más tipos de plásticos como el LDPE, PP, PS, PVC y HDPE con el fin de aumentar el conocimiento sobre los microorganismos con potencial biodegradador de polímeros.
- Estudiar el campo de ingeniería genética con el fin de mejorar la efectividad de las enzimas para degradar plásticos.

Bibliografía

- LibreTexts. (2023). *General Biology*. California: OpenStax. Obtenido de https://espanol.libretexts.org/Educacion_Basica/Biologia/08%3A_Protistas_y_Hongos/s/8.03%3A_Clasificaci%C3%B3n_de_Hongos
- Srinivasan, R. (2020). Beneficial Microbes in Agro-Ecology || *Penicillium*. , (), 651–667.
doi:10.1016/B978-0-12-823414-3.00032-0
- Vidal, V. S. (2016). *Manual de Micología Básica*. Chile: Universidad de Concepción y ONG micófilos. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/333774015_Manual_de_Micologia_Basica
- Srikanth, M., Sandeep, T.S.R.S., Sucharitha, K. *et al.* Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. *Bioresour. Bioprocess.* **9**, 42 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00532-4>
- Zabel, R. A., & Morrell, J. J. (2020). The characteristics and classification of fungi and bacteria. *Wood Microbiology*, 55–98. doi:10.1016/b978-0-12-819465-2.00003-6
- Anderson, A. S.-W. (2016). This is a repository copy of Reconsidering precolumbian human colonization in the. *Latin American Antiquity*, 169, 183. doi:10.7183/1045-6635.27.2.169
- Nahm, S (2015). What's the significance of % transmittance in FTIR? | *ResearchGate.. ResearchGate.* <https://www.researchgate.net/post/Whats-the-significance-of-transmittance-in-FTIR>
- Lifeder. (16 de marzo de 2022). *Aspergillus niger*. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/aspergillus-niger/>.

- Nowak, Bożena & Pająk, J. & Labuzek, Sylwia & Rymarz, Grażyna & Talik, Ewa. (2011). Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) modified with polyester "Bionolle®" by *Penicillium funiculosum*. *Polimery/Polymers*. 56. 35-44. 10.14314/polimery.2011.035.
- Temporiti MEE, Nicola L, Nielsen E, Tosi S. Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. *Microorganisms*. 2022 Jun 8;10(6):1180. doi: 10.3390/microorganisms10061180. PMID: 35744698; PMCID: PMC9230134.
- Anita Eberl, S. H.-P. (2009). Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. *J Biotechnol.*, 10;143(3):207-12. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.07.008
- Arellano, L. D. (2020). Studocu. Obtenido de Pruebas de t-Student y Fisher: <https://www.studocu.com/es-mx/document/instituto-tecnologico-de-leon/termodinamica/pruebas-de-t-student-y-fisher/8220125>
- Athena Papadopoulou, K. H. (2019). Enzymatic PET degradation. *Green and Sustainable Chemistry*, 73(9), 743–749. . doi:10.2533/chimia.2019.743
- López-Aguirre, J., Pomaquero-Yuquilema, J., & López-Salazar, J. (2020). Análisis de la contaminación ambiental por plásticos en la ciudad de Riobamba. *Polo del Conocimiento*, 5(12), 725-742. doi:http://dx.doi.org/10.23857/pc.v5i12.2139
- Ioakeimidis C, Fotopoulou KN, Karapanagioti HK, Geraga M, Zeri C, Papathanassiou E, Galgani F, Papatheodorou G. The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach. *Sci Rep*. 2016 Mar 22;6:23501. doi: 10.1038/srep23501. PMID: 27000994; PMCID: PMC4802224.
- Gómez, C. F. L. (2022). Enzimas hidrolíticas. *Lifeder*. <https://www.lifeder.com/enzimas-hidroliticas/>

Carrere, M. (2019 de Mayo de 20). Obtenido de Mongabay:
<https://es.mongabay.com/2019/05/ecuador-contaminacion-plastico-galapagos-video/>

Carrere, M. (15 de Junio de 2021). Mongabay. Obtenido de
<https://es.mongabay.com/2021/06/galapagos-especies-riesgo-contaminacion-plasticos/>

Comercio, E. (15 de Febrero de 2021). El plástico afecta a 30 especies de animales que viven en Galápagos. El plástico afecta a 30 especies de animales que viven en Galápagos. Obtenido de <https://www.elcomercio.com/tendencias/galapagos-animales-plastico-afecta-especies.html>

Eduardo Botero Jaramillo, L. M. (2014). Comportamiento mecánico del Polietileno Tereftalato (PET) y sus aplicaciones geotécnicas. Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia, (70), 201-219. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302014000100020

Gottfried J. Palm, L. R. (2019). Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. *Nature Communications*, 10, 1717. doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09326-3>

Mora, R. G. (2020). Oxidorreductasas: características, estructura, funciones, ejemplos. *Lifeder*. <https://www.leder.com/oxidorreductasas/>

Lolo Wal Marzan, M. H. (2016). Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42 (1), 65-74. doi:[10.1016/j.ejar.2016.11.002](https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.11.002)

- Parker, L. (2019, Junio 7). National Geographic. Retrieved from <https://www.nationalgeographic.com/environment/article/plastic-pollution>
- Schlossberg, T. (2017, 21 julio). El plástico, la huella más duradera de la humanidad. *The New York Times*. <https://www.nytimes.com/es/2017/07/21/espanol/contaminacion-huella-plastico.html>
- Peraza, A. M. (2017). Estudio preliminar de la biodegradación de plásticos. Obtenido de <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5762/Estudio+preliminar+de+la+biodegradacion+de+plasticos+por+bacterias+marinas.pdf?sequence=1#:~:text=Los%20pl%C3%A1sticos%20son%20compuestos%20xenobi%C3%B3ticos%20muy%20contaminantes%20en,formada%20por%20b>
- Schnurr REJ, A. V. (2018). Reducing marine pollution from single-use plastics (SUPs): A review. *Marine Pollution Bulletin*, 137, 157-171. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.001>
- Scientific, T. F. (2023). Thermo Fisher Scientific. Obtenido de Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html>
- Alisa Gricajeva;Ashok Kumar Nadda;Renata Gudiukaite; (2021). *Insights into polyéster plastic biodegradation by carboxyl éster hydrolases. Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, (), -. doi:10.1002/jctb.6745
- Tournier, V., Topham, C. M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E., & Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 216-219. doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>

- Primpke, S., Wirth, M., Lorenz, C., & Gerdt, G. (2018). Reference database design for the automated analysis of microplastic samples based on Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(21), 5131–5141. doi:10.1007/s00216-018-1156-x
- Aneja, K. (2007). *Experiments in Microbiology, Plant pathology and Biotechnology*, (Vols. Vol 4:157-162). New Delhi: Newage International Publishers.
- R., Tatiana. (2019). La utilización de plásticos y su impacto ambiental en las Islas Galápagos.. *Explorador Digital*. 2. 16-25. 10.33262/exploradordigital.v2i2.329.
- Kaiding P, K. R. (2018). Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at salur mandal plant taxonomy view project soil microbiology view project. *Pelag. Res. Library* 3, 2020-2026.
- López, B. (2023). Aspergillus. Lifer. Recuperado de: <https://www.lifer.com/aspergillus/>.
- Sandoval, Juan Andrés & Bermudez, Diana. (2021). Degradación del polietilentereftalato por medio de microorganismos. *Informador Técnico*. 85. 10.23850/22565035.3592.
- Dimarogona M., Nikolaiivits E., Kanelli M., Christakopoulos P., Sandgren M., Topakas E. Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2015;1850:2308–2317. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.08.009.
- Katherine Iparraguirre, M. L. (2015). AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS BIODEGRADADORES DE POLIETILENO DE TEREFTALATO Y POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD ·ICA. Perú.

- Guillermo Lasso. (2018) “GALÁPAGOS SIN PLÁSTICOS DE UN SOLO USO” Consejo de Gobierno de Régimen Especial de Galápagos. Noticias. “GALÁPAGOS SIN PLÁSTICOS DE UN SOLO USO”
- Kavelman R, K. B. (1978). Degradation of a plastic Polyepsilon-caprolactone by hiphomycetes. *Micologia*, 867-103.
- Singh A.K., Mukhopadhyay M. Overview of fungal lipase: A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012;166:486–520. doi: 10.1007/s12010-011-9444-3.
- Méndez, C. R., Vergaray, G., Béjar, V. R., & Cárdenas, K. J. (2006). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Peruana De Biología*, 13(3), 203–205. <https://doi.org/10.15381/rpb.v13i3.2338>
- Tapia, Cecilia, & Amaro, José. (2014). Género Fusarium. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012>
- R. Usha, T. S. (2011). Screening of Polyethylene Degrading Microorganisms from Garbage Soil. *Libyan Agriculture Research Center Journal International* 2, 200-204. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/265408136_Screening_of_Polyethylene_Degrading_Microorganisms_from_Garbage_Soil
- Hernández González, Osvaldo. (2021). Aproximación a los distintos tipos de muestreo no probabilístico que existen. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 37(3), e1442. Epub 01 de septiembre de 2021. Recuperado en 06 de agosto de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252021000300002&lng=es&tlng=es.

- Surwase S.V., Patil S.A., Srinivas S., Jadhav J.P. Interaction of small molecules with fungal laccase: A surface plasmon resonance based study. *Enzym. Microb. Technol.* 2016;82:110–114. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.09.002.
- Gómez, C. F. L. (2020). Penicillium: características, morfología, hábitat, reproducción. *Lifeder*. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/penicillium-genero/>.
- Montesinos-Matías, Roberto & Ayala-Zermeño, Miguel & Berlanga-Padilla, Angélica. (2015). Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos (Manual for the conservation and maintenance of entomopathogenic fungi).
- Brunner I, Fischer M, Rüthi 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):1–14
- Aneja, K. (2007). *Experiments in Microbiology, Plant pathology and Biotechnology*, (Vols. Vol 4:157-162). New Delhi: Newage International Publishers.
- Avante. (21 de Febrero de 2021). *Revista Avante*. Obtenido de ECOLOGÍA ¿En qué consiste la biodegradación y cómo beneficia al ambiente?: <https://www.revistaavante.com/en-que-consiste-la-biodegradacion-y-como-beneficia-al-ambiente/>
- Carmen R. Méndez, G. V. (2007). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Peruana de Biología*, 203-205. doi:10.15381/rpb.v13i3.2338}
- Kaiding P, K. R. (2018). Isolation and identification of soil mycoflora in different crop fields at salur mandal plant taxonomy view project soil microbiology view project. *Pelag. Res. Library* 3, 2020-2026.

Katherine Iparraguirre, M. L. (2015). *AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS BIODegradadores DE POLIETILENO DE TEREFALATO Y POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD* ·ICA. Perú.

LibreTexts. (2023). *General Biology*. California: OpenStax. Obtenido de https://espanol.libretexts.org/Educacion_Basica/Biologia/08%3A_Protistas_y_Hongos/8.03%3A_Clasificaci%C3%B3n_de_Hongos

PEÑA, Carolina & Farrés, Amelia & Bermudez, Eva. (2018). Las cutinasas como una herramienta valiosa para la descontaminación de residuos plásticos. 42. 24.

Méndez, C. V. (2007). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Avances de las Ciencias Biológicas en el Perú*. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. *Rev. Perú*, 13(3) 203-205.

R. Usha, T. S. (2011). Screening of Polyethylene Degrading Microorganisms from Garbage Soil. *Libyan Agriculture Research Center Journal International* 2, 200-204. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/265408136_Screening_of_Polyethylene_Degrading_Microorganisms_from_Garbage_Soil

Asemoloye MD, Tosi S, Daccò C, Wang X, Xu S, Marchisio MA, Gao W, Jonathan SG, Pecoraro L. Hydrocarbon Degradation and Enzyme Activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* Isolated from Nigerian Crude Oil-Polluted Sites. *Microorganisms*. 2020 Nov 30;8(12):1912. doi: 10.3390/microorganisms8121912. PMID: 33266344; PMCID: PMC7761101.

Sagong, H. S. (2020). Decomposition of the PET film by MHETase using exo-PETase. *ACS Catalysis*, 4805-4812. doi: 10.1021/acscatal.9b05604

Vidal, V. S. (2016). *Manual de Micología Básica*. Chile: Universidad de Concepción y ONG micófilos. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/333774015_Manual_de_Micologia_Basica

Zara Z., M. D. (2022). Surface Interaction of Ionic Liquids: Stabilization of Polyethylene Terephthalate-Degrading Enzymes in Solution. *Molecules*, 27-119. doi:10.3390/molecules27010119

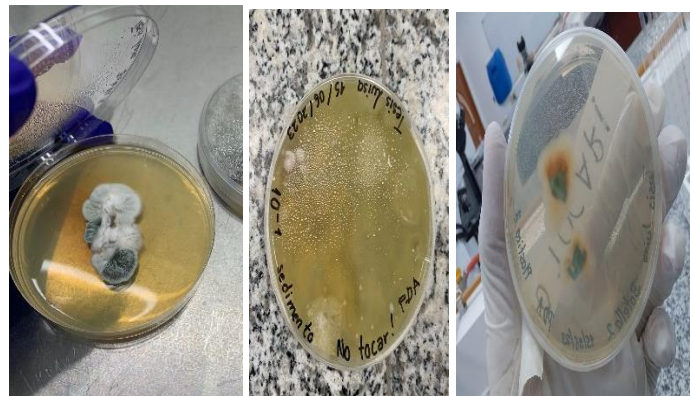
Anexos

<p>Fase de campo. Recolección de las muestras en el centro de reciclaje Fabricio Valverde.</p>	 A photograph showing a person in a blue shirt and light-colored pants crouching in a recycling center. The ground is covered with various types of waste, including plastic bags and debris. The person appears to be collecting samples from the waste.
<p>Hielera usada para el transporte y conservación de las muestras desde Baltra hacia Guayaquil.</p>	 A close-up photograph of a blue cooler with a red strap. The cooler is being held by a hand, and it is placed on a dark, textured surface, possibly a ground or a table.
<p>Fase de laboratorio. Lavado de las botellas y dilución de la muestra de sedimento.</p>	 A composite image showing three stages of laboratory work. On the left, a person wearing blue gloves is washing a clear plastic bottle in a stainless steel sink. In the middle, a dirty, sediment-filled bottle is being held over a sink. On the right, a clear plastic bottle is placed on a blue digital scale on a laboratory bench.
<p>Preparación de los medios de cultivo (PDA, Sabouraud).</p>	 A composite image showing the preparation of culture media. On the left, several small, round, yellowish-brown agar plates are arranged on a stainless steel surface. On the right, a larger agar plate is being prepared, with a bottle of liquid medium and a multi-well plate visible in the background.

Siembra de las muestras tomadas de las botellas y sedimento.



Crecimiento de los hongos luego de tres días de su siembra.



Aislamiento de los hongos seleccionados en nuevos medios de cultivo.



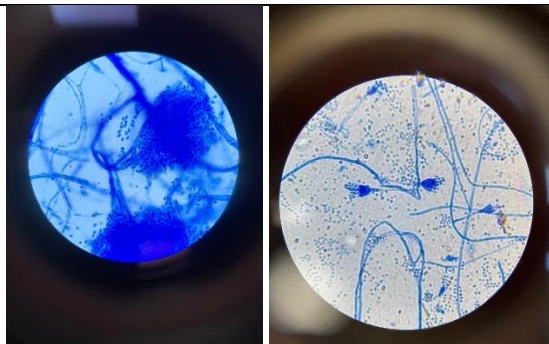
Crecimiento de la resiembra de los hongos.



Ensayo de biodegradación con *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*



Identificación de estructuras microscópicas de los hongos con azul de lactofenol.



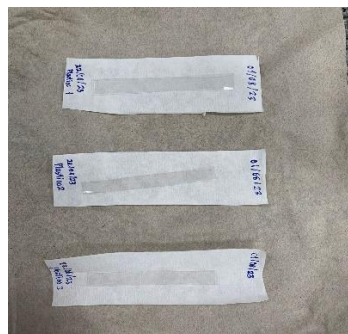
Identificación macroscópica de los hongos



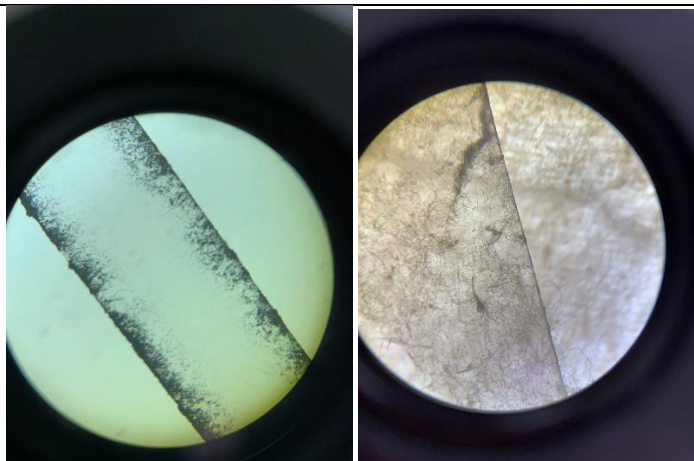
Toma de pesos de los plásticos,
inicial/final



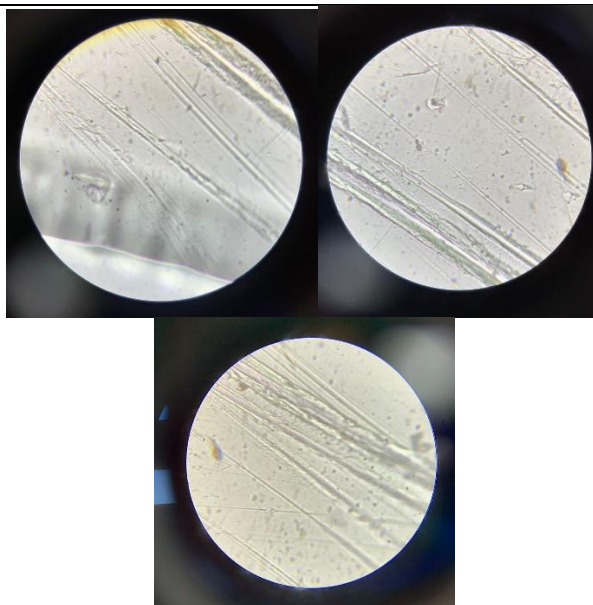
Lavado de los plásticos a base de
tereftalato de polietileno para
corrida en el FT IR



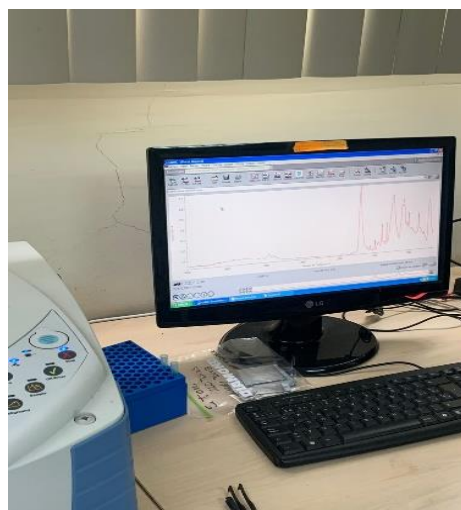
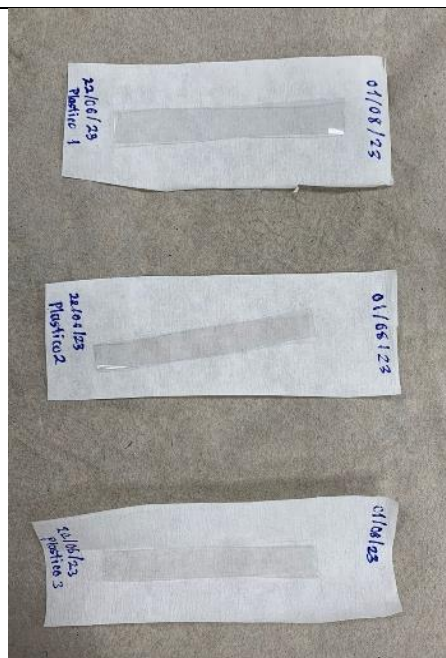
Observación de la propagación de los hongos en el film de tereftalato de polietileno



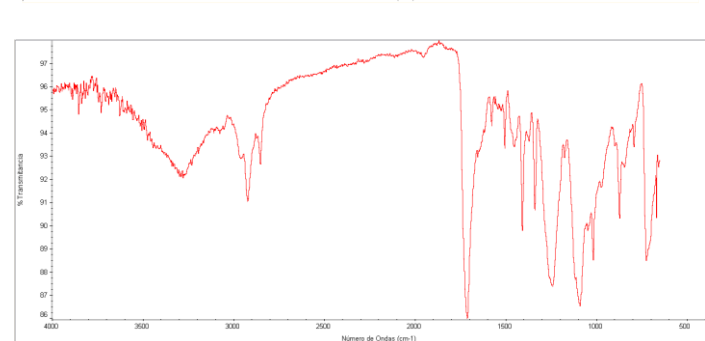
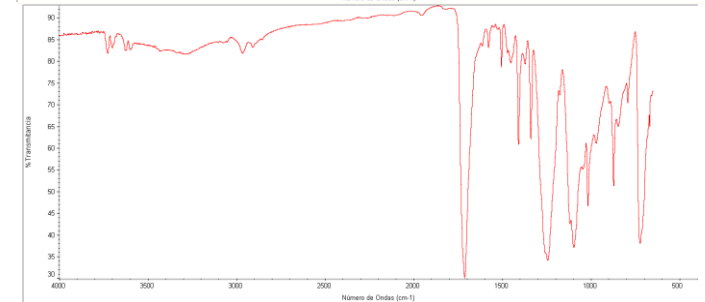
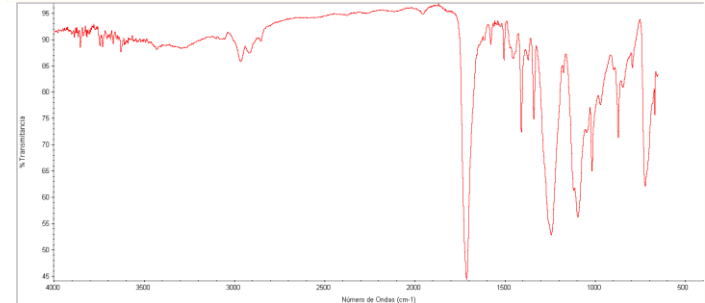
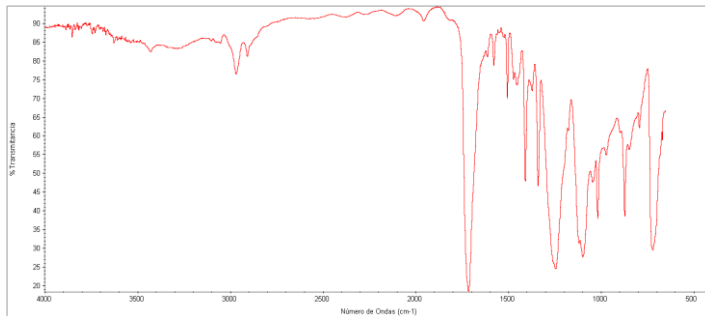
Cambios en la estructura física del plástico a base de tereftalato de polietileno



Lectura de las muestras en el FT
IR de la Escuela Superior
Politécnica del Litoral.



Espectros FT IR



Permiso y transporte de las muestras.

Oficio N° 001
Puerto Ayora, 04 de abril del 2023.

ASUNTO: SOLICITUD PARA MOVILIZACIÓN DE MUESTRAS RECOLECTADAS EN EL CENTRO DE RECICLAJE FABRICIO VALVERDE.

Directora de la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad Y Cuarentena para Galápagos
Marylin Cruz
Presente.-

De mi consideración:

Reciba un cordial y atento saludo a nombre de Luisa Michelle Romero Villacís, estudiante de Último Semestre de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana con C.I. 2000116265 y residente permanente de Galápagos.

El motivo de la solicitud es para adquirir la guía sanitaria de movilización de muestras del centro de reciclaje Fabricio Valverde:

- **Muestra de sedimento de área rural.**

200g de sedimento del suelo del área del centro de reciclaje.

Traslado de muestras en fundas ziploc y conservación en cooler con fundas de hielos.

- **Muestra de botellas plásticas PET en estado de degradación.**

Dos botellas en estado de degradación obtenidas del centro de reciclaje

Traslado de la muestra en funda ziploc y conservación en cooler con fundas de hielos.

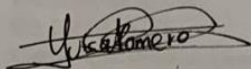
La recolección de las muestras se realizará en el centro de reciclaje Fabricio Valverde ubicado en Puerto Ayora-Galápagos las cuales serán trasladadas bajo la responsabilidad de Luisa Michelle Romero Villacis, con numero de cedula 2000116265 hacia la ciudad de Guayaquil. La fecha propuesta para la movilización es el 6 de mayo del 2023 vía aérea.

La finalidad de la movilización de estas muestras es para realizar un proyecto de investigación para mi tesis con el tema: **"Aislamiento e identificación de consorcios microbianos con capacidad Biodegradadora de plásticos PET del centro de reciclaje Valverde en Puerto Ayora-Galápagos"**.

El proyecto de investigación tiene un impacto positivo dentro del Archipiélago de Galápagos, ya que gracias a esta investigación se podrán adquirir mayores conocimientos con respecto a la biodiversidad microbiana que existe en Puerto Ayora, al igual que es una alternativa para usar la biotecnología ambiental y la capacidad biodegradadora de microorganismos como apoyo para la degradación de plásticos que son dañinos para los animales endémicos que residen en el hermoso y delicado archipiélago.

Seguro de contar con una respuesta afirmativa, anticipo mi agradecimiento de antemano.

Atentamente,



Luisa Romero Villacis,
estudiante de la UPS
CI: 2000116265
Correo electrónico: luisaromerotkd@hotmail.com



AGENCIA DE REGULACION Y
CONTROL DE LA BIOSEGURIDAD Y
CUARENTENA PARA GALAPAGOS

- 5 MAY 2023

09:30

Hora: _____
Recibido por: Quintero
Anexos: _____
Firma: _____