



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
OCEANOGRÁFICAS



POTENCIAL DE HONGOS MARINOS EN LA REDUCCIÓN DE PLÁSTICO EN EL OCÉANO

Mario Stefano Ferrari Guevara

Seminario de Título presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar al Título de
BIÓLOGO MARINO

Profesor Guía: Marcelo Gutiérrez

Concepción, Chile

20 de Abril 2023

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesor(a) Guía

Doctor Marcelo Gutiérrez

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Director de Tesis

Nombre y Grado (s) Académico (s)

Ha sido aprobada por la
Siguiete Comisión
Evaluadora

Doctor Silvio Pantoja

(Nombre y Grado (s) Académico (s))

Doctor Fernando Cruzat

(Nombre y Grado (s) Académico (s))

Jefe de Carrera

Doctor Ariel Valenzuela

(Nombre y Grado (s) Académico (s))

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mis más sinceros agradecimientos a mi familia, en especial a mi madre, mi hermana y mis abuelos, ya que siempre han sido un apoyo incondicional en mi vida y me han alentado a dar lo mejor de mí. Abuelita Yoli este trabajo es para ti, donde sea que estés viendo. También quiero agradecer a mis amigos Danny, Nicolás, Alejandra y Martín que siempre me dieron energía y ánimo durante esta etapa. A Karina por ser una amiga y compañera excepcional, ya que, sin su buena disposición, ayuda y motivación, no habría logrado realizar todas las actividades que implicaban este estudio. A todo el equipo que conforma el laboratorio de Geoquímica Orgánica Marina: Cristóbal, Paulina, Jeannette, Víctor, Amanda y Pedro, por su excelente disposición para ayudarme ante cualquier adversidad y por generar un ambiente agradable de trabajo en el laboratorio. Finalmente quiero agradecer al Dr. Marcelo Gutiérrez, por aceptar ser mi profesor guía y por ayudarme y motivarme de manera entusiasta a llevar a cabo esta investigación. También al Dr. Silvio Pantoja y al Dr. Fernando Cruzat por aceptar ser parte de mi comisión.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS DE TRABAJO	8
<i>Objetivo general</i>	8
<i>Objetivos específicos</i>	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
<i>Área de estudio y muestro</i>	9
<i>Aislamiento de hongos marinos</i>	11
<i>Preparación del polvo de Polietileno</i>	11
<i>Preparación de medios de cultivo sólido</i>	12
<i>Preparación de placas Petri</i>	12
<i>Inoculación de hongos marinos en placas de cultivo</i>	13
<i>Identificación de actividad enzimática lignícola</i>	13
<i>Tasa de crecimiento</i>	13
<i>Crecimiento de hongos en medios líquidos</i>	14
<i>Extracción y amplificación de ADN de cepas de hongos</i>	15
<i>Identificación taxonómica de cepas de hongos</i>	16
RESULTADOS.....	17
<i>Pruebas de los medios de cultivo</i>	17
<i>Aislamiento de cepas de hongos marinos desde las muestras plásticas</i>	17
<i>Identificación de especies por extracto de ADN</i>	19
<i>Crecimiento de las cepas en medios de cultivo de aislación</i>	19
<i>Evidencia para la presencia de actividad lignícola</i>	20

<i>Crecimiento de hongos marinos con potencial para la degradación de LDPE/PET en medios líquidos</i>	22
<i>Tasas de crecimiento</i>	27
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de los principales tipos de plástico que se encuentran en el medio marino. Se muestran las enzimas y los grupos de hongos potencialmente implicados en la degradación del plástico. El subrayado azul indica hongos productores de lacasa. El subrayado verde indica hongos productores de peroxidasa, el subrayado amarillo indica hongos productores de poliesterasa y el subrayado rojo indica hongos productores de cutinasa. PE, polietileno; PP, polipropileno; PS, poliestireno; PU, poliuretano; Nylon, poliamidas; PET, tereftalato de polietileno. Ilustración extraída de Zeghal et. al., (2021).	5
Figura 2: Jaula de acero inoxidable con los diferentes fragmentos de plástico (PET, LDPE y PS) en su interior.....	9
Figura 3: Ubicación de zona del área de estudio en la localidad de Dichato, Bahía Coliumo, región del BíoBío, Chile.....	10
Figura 4: Esquema que muestra la inoculación de cepas con potencial actividad lignícola en medios líquidos con plásticos como única fuente de carbono.....	14
Figura 5: Esquema de procesos de dilución y extracción de sales para cuantificación de biomasa fúngica.	15
Figura 6: Fotos de crecimientos de las cepas ST7 H6 y ST7 H9 inoculadas en distintos medios de cultivo, observaciones corresponden al séptimo día. Control ST7H6 (A); Control ST7H9 (B); Crecimiento vertical de hifas ST7H6 (C); PET + extracto de levadura ST7H6 (D); PS + extracto de levadura ST7H9 (E).....	17
Figura 7: Fotos de placas de agar del aislamiento de hongos marinos a partir de las muestras de fragmentos de plástico y de madera en medios de cultivo Control al cabo de 7 días. Poliestireno (A); Polietileno (B); PET (C); Níspero (D).	18
Figura 8: Árbol filogenético realizado en el programa IQTREE. La escala de colores denominada “Bootstrap” indica el nivel de alineamiento entre las cepas aisladas y las bases de datos.....	19

Figura 9: Fotos de placas de agar (medio control) de cepas fúngicas marinas aisladas con potencial en la degradación del plástico. *Alternaria sp.* (A); *Alternaria ellipsoidea* (B); *Cladosporium sp.* (C); *Ilyonectria sp.* (D); *Ilyonectria lirioidendri* (E). Vistas al microscopio con un aumento de 40x: Hifas y estructuras reproductivas *Alternaria sp.* (F); Hifas *Alternaria ellipsoidea* (G); Hifas y estructuras reproductivas *Cladosporium sp.* (H); Hifas *Ilyonectria sp.* (I); Hifas aglomeradas en estructuras esféricas *Ilyonectria lirioidendri* (J).20

Figura 10: Fotos de placas de agar con coloración rojiza en cultivos de *trametes versicolor* en medio lignina (A) y en medio Normal (B) como pruebas de oxidación positiva de guayacol tras 7 días de incubación.....21

Figura 11: Fotos de placas de agar (medio control) de las 5 cepas de 9 aisladas que muestran una reacción positiva al medio con guayacol. Crecimiento micelial ramificado de la especie *Alternaria sp.* (A). Crecimiento radial de las cepas: *Alternaria ellipsoidea* (B); *Cladosporium sp.* (C); *Ilyonectria sp.* (D); *Ilyonectria lirioidendri* (E). En la ilustración F se observan estructuras reproductivas de *Alternaria sp.*. G, H, I y J se observan hifas de las cepas *Alternaria ellipsoidea*; *Cladosporium sp.*; *Ilyonectria sp.* e *Ilyonectria lirioidendri* respectivamente.....21

Figura 12: Vista inferior de cultivos en medios líquidos con muestras plásticas como únicas fuentes de carbono: Micelio blanco translucido de *Alternaria sp.* con plásticos LDPE (A); Micelio blanco translucido de *Alternaria ellipsoidea* adherido a plásticos PET (B); Micelio marrón oscuro de *Cladosporium sp.* adherido al fondo del matraz y alrededor de los plásticos LDPE (C); Micelio blanco transparente de la cepa *Ilyonectria sp.* adherido alrededor de plásticos PET (D); Micelio blanco de la cepa *Ilyonectria lirioidendri* adherido a plásticos LDPE (E).....22

Figura 13: Fotos de plásticos LDPE y PET colonizados por cepas fúngicas lignícolas al cabo de un mes. Estructuras reproductivas y micelio sobre LDPE (Columna izquierda) y PET (Columna derecha): *Alternaria sp.* (A; B); *Alternaria ellipsoidea* (C; D); *Cladosporium sp.* (E; F); *Ilyonectria sp.* (G; H); *Ilyonectria lirioidendri* (I; J).23

Figura 14: Gráfico comparativo entre pesos iniciales y pesos finales de los fragmentos plásticos de LDPE (A) y PET (B) de cada cepa y de pérdida de peso de los fragmentos plásticos de LDPE (C) y PET (D) para cada cepa	25
Figura 15: Promedio de biomاسas obtenidas en medios de cultivo de plásticos PET, LDPE y control con glucosa; Promedios de las pérdidas de peso de los plásticos PET y LDPE.	26
Figura 16: Biomasa promedio en gramos de <i>Alternaria ellipsoidea</i> (A) y <i>Cladosporium sp.</i> (B) para los tratamientos en medios líquidos Control, PET y LDPE.	27
Figura 17: Tasas de crecimiento de cada cepa para cada tratamiento expresadas en mm · día ⁻¹	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Porcentajes de la diferencia entre pesos iniciales y finales (en triplicado) de las muestras plásticas (LDPE y PET) sometidas en medios de cultivos líquidos con plásticos como única fuente de carbono para cada cepa positiva al guayacol.	24
Tabla 2: Promedio de biomاسas (gramos) de las 5 cepas lignícolas al cabo de un mes en medios de cultivo líquido con glucosa, LDPE y PET como fuentes de carbono.	26
Tabla 3: Promedio de las tasas de crecimiento en $\text{mm} \cdot \text{día}^{-1}$ para cada tratamiento de cada cepa.	27
Tabla 4: Resumen de resultados de distintos experimentos realizados con cepas de hongos marinos aislados para la evaluación de un potencial de degradación de plásticos.	29

RESUMEN

La contaminación de plástico en el ambiente marino produce una serie de impactos negativos para el ecosistema, donde las consecuencias se agudizan con el tiempo, afectando de manera severa e irreversible a diversos organismos marinos. En los últimos años, se han descubierto hongos marinos capaces de degradar estos polímeros sintéticos como *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.* y *Zelerion maritimum*. En este trabajo se evaluó la capacidad potencial para degradar plásticos de cepas de hongos marinos presentes en el submareal de la zona costera de Dichato, región del Biobío, mediante la exposición de fragmentos de diferentes tipos plásticos a condiciones marinas naturales. Se logro aislar un total de 9 cepas, principalmente desde fragmentos de polietileno. Las cepas aisladas fueron sometidas a pruebas de oxidación de guayacol lo que permitió identificar 5 cepas con un complejo enzimático potencialmente utilizable en la degradación del plástico. Posteriormente, estas cepas fueron incubadas con distintos plásticos (PET, LDPE) como única fuente de carbono, obteniendo la degradación de polietileno por parte de las 5 cepas como resultado en un periodo de un mes. Adicionalmente, se calcularon las tasas de crecimiento de las cepas en placas Petri con 5 fuentes de carbono durante 15 días, alcanzándose un crecimiento máximo de 86 mm en solo 11 días para una de las cepas en la totalidad de los tratamientos. Nuestros resultados sugieren que cepas de hongos marinos aislados desde ambientes submareales representan una alternativa potencial para la degradación de plásticos aplicable a procesos de biorremediación.

ABSTRACT

Plastic pollution in the marine environment produces a series of negative impacts on the ecosystem, where the consequences become more severe over time, affecting various marine organisms. In recent years, some marine fungi able to degrade these synthetic polymers have been discovered, such as *Aspergillus spp*, *Fusarium spp*, *Penicillium spp* and *Zelerion maritimum*. In this work, we analyze the potential of marine fungi isolated from the subtidal zone of Dichato, Biobio region, to degrade plastics by exposing fragments of different types of plastics to natural marine conditions. A total of 9 strains were isolated, mainly from polyethylene fragments. The isolated strains were subjected to guaiacol oxidation tests which allowed the identification of 5 strains with an enzymatic complex potentially usable in plastic degradation. Subsequently, these strains were incubated with different plastics (PET, LDPE) as the only carbon source, obtaining the degradation of polyethylene by the 5 strains in a period of one month. Additionally, the growth rates of the strains were calculated in Petri dishes with 5 carbon sources for 15 days, reaching a maximum growth of 86 mm in only 11 days for one of the strains in the totality of the treatments. Our results suggest that marine fungal strains isolated from subtidal environments represent a potential alternative for the degradation of plastics applicable to biodegradation treatments.

INTRODUCCIÓN

Los plásticos son polímeros sintéticos compuestos de carbono, hidrógeno y oxígeno derivados de productos petroquímicos (Deepika, et al., 2015; Wayman y Niemann, 2021). La alta demanda y el uso masivo de estos materiales sintéticos es debido a las propiedades químicas que presentan como la dureza, ligereza, hidrofobicidad (Ganesh et al., 2020), resistencia y longevidad (Sekhar et al., 2016). En función de su fuerza y resistencia, los plásticos se clasifican en dos grandes categorías: Termoestables (duros y duraderos; no conservan su forma una vez formados) y termoplásticos (menos rígidos que los termoestables; se moldean fácilmente y conservan su forma original) (Ganesh et al., 2020; Liu et al., 2022). Los tipos y usos más comunes son el polipropileno (PP; tuberías, envases); el polietileno (PE; botellas, bolsas de comestibles); cloruro de polivinilo (PVC; tuberías, envases); poliestireno (PS; material aislante, envases de alimentos, tazas desechables); tereftalato de polietileno (PET; botellas de bebidas, fibras textiles), poliamidas (PA; fibras, construcción), policaprolactona (PCL; producción de PU, aplicaciones biomédicas) (Zimmermann 2020; Zhegal et al., 2021). En consecuencia, los plásticos son importantes para nuestra economía, nuestro estilo de vida y para el progreso humano en general. Sin embargo, el uso indiscriminado de plásticos ha generado graves consecuencias en nuestro medio ambiente y ecosistemas. La producción mundial de estos materiales no ha dejado de aumentar en los últimos 50 años, alcanzando los 390.7 millones de toneladas en 2021 donde 352.3 Mt son de origen fósil, 32.5 Mt reciclados y solo 5.3 Mt de plásticos biodegradables (PlasticsEurope, 2023). Una parte significativa de este plástico acaba en los océanos (Barnes et al., 2009; Galgani et al., 2013; Law, 2017; Zeghal et al., 2021; Wayman y Niemann, 2021), estimándose que el plástico marino flotante oscila entre 70.000 – 270.000 toneladas (Eriksen et al., 2014; Van Sebille et al., 2015). Se ha sugerido que en 2050 se producirán unos 12.000 millones de toneladas de residuos plásticos y si las estrategias actuales de gestión de residuos persisten, estos seguirán acumulándose en los océanos y vertederos (Geyer et al., 2017). A medida que estos plásticos se degradan, se descomponen en pequeñas partículas conocidas como: macro plásticos (>5 mm), micro plásticos (1 – 5 mm) y nano plásticos (<1mm) (Oberbeckmann et al., 2020; Liu et al., 2022; Wayman & Niemann, 2021). Estas partículas pueden jugar

un rol como mecanismo de desplazamiento para una amplia gama de especies de algas, insectos, bacterias y hongos, representando así una potencial amenaza para los ecosistemas introduciendo especies invasoras (De Tender et al., 2015). Existen dos aspectos principales de la toxicidad de plásticos y micro plásticos en organismos: el primero es el efecto de intoxicación que consiste en la ingesta de estos polímeros inhibiendo el crecimiento en animales, destruyendo sus tejidos y flora intestinal (Rodríguez-Seijo et al., 2017; Wang et al., 2019; Zhu et al., 2019). El segundo es el efecto de toxicidad de la carga, lo que significa que los plásticos también pueden adsorber otro tipo de sustancias tóxicas como contaminantes emergentes (COPs), antibióticos (amoxicilina, ciprofloxacino) y metales pesados (As, Cu, Zn, etc), pudiendo afectar de manera indirecta la biología de los organismos (Zhang et al., 2017; Wang et al., 2020; Wang et al., 2021).

Podemos encontrar diferentes tipos de degradabilidad en los plásticos. Los plásticos fotodegradables se descomponen por la acción de la luz solar (radiación UV) y los plásticos termo degradables se descomponen por la acción del calor (Da luz et al., 2019; Zimmermann, 2020). Cuando los plásticos se encuentran expuestos a estas condiciones en la naturaleza, se pueden dividir y reducir a compuestos de baja masa molecular siendo posteriormente asimilados por microorganismos (Gross et al., 2002; Koutny et al., 2005). Este proceso se denomina biodegradación y consiste en la mineralización de los plásticos por bacterias y hongos, la formación de biopelículas en la superficie de los plásticos, la destrucción de su estructura esquelética principal y la despolimerización de las cadenas laterales bajo la acción de enzimas específicas para producir oligómeros, dímeros y monómeros (Zimmermann, 2020; Liu et al., 2022). Diversos análisis mostraron que los principales factores que influyen en el proceso de biodegradación son la especificidad de las enzimas y la temperatura (Ganesh et al., 2020; Tamnou et al., 2021), además de un consorcio biológico compuesto por múltiples enzimas y microorganismos, ya que se han observado mejores resultados en comparación con una sola enzima o un solo microorganismo para la degradación de plásticos (Singh & Wahid, 2015; Taniguchi et al., 2019). A pesar de estas opciones, la mayoría de los plásticos que se han utilizado en nuestra sociedad son de un solo uso y no biodegradables, transformándose en un problema

ambiental que requiere la búsqueda de alternativas de remediación. Recientemente, se han descubierto hongos marinos que son capaces de degradar plásticos considerados no biodegradables. Estudios afirman que los principales géneros implicados en este proceso corresponden a *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Fig. 1) (Ameen et al., 2015; Sowmya et al., 2015; Xu et al., 2015; Raghavendra et al., 2016; Alshehrei et al., 2017; Ojha et al., 2017; Brunner et al., 2018; Sangale et al., 2019; Zhang et al., 2020) y que los filos más comúnmente asociados a estos polímeros sintéticos son Ascomycota, Chytridiomycota y Cryptomycota (Kettner et al., 2017; Lacerda et al., 2020).

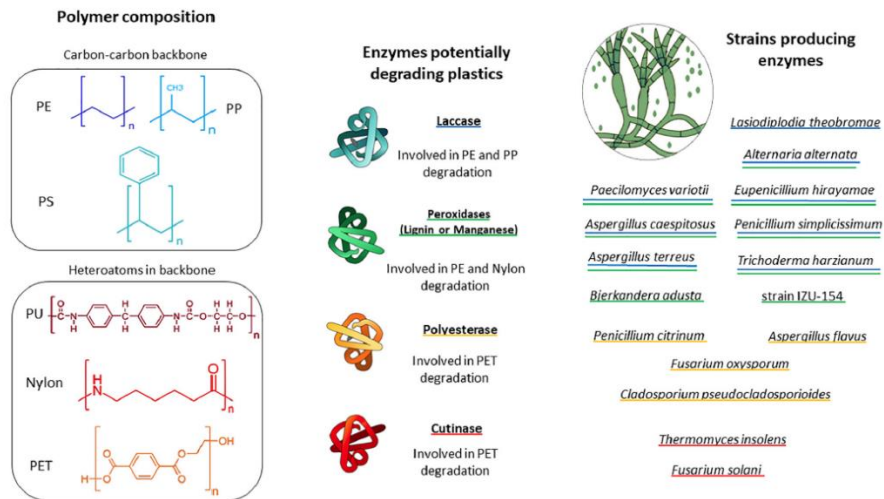


Figura 1: Esquema de los principales tipos de plástico que se encuentran en el medio marino. Se muestran las enzimas y los grupos de hongos potencialmente implicados en la degradación del plástico. El subrayado azul indica hongos productores de lacasa. El subrayado verde indica hongos productores de peroxidasa, el subrayado amarillo indica hongos productores de poliesterasa y el subrayado rojo indica hongos productores de cutinasa. PE, polietileno; PP, polipropileno; PS, poliestireno; PU, poliuretano; Nylon, poliamidas; PET, tereftalato de polietileno. Ilustración extraída de Zeghal et. al., (2021).

Los hongos desempeñan un papel dominante en los entornos terrestres y marinos, donde prosperan en asociaciones simbióticas con plantas y animales y son parte integral del ciclo de nutrientes en diversos ecosistemas (Gladfelter et. al., 2019), como en procesos de nitrificación, desnitrificación (Stief et al., 2014; Maeda et al., 2015) y fijación del carbono (Cathrine y Raghukumar, 2009). Los hongos son capaces de degradar compuestos

sintéticos, como por ejemplo contaminantes orgánicos persistentes (COP) (Singleton, 2001), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Cerniglia y Sutherland, 2001), benceno tolueno, etilbenceno y xilenos (compuestos BTEX) (Buswell, 2001) y pesticidas (Pinto et al., 2012). La versatilidad metabólica de los hongos y su capacidad para degradar compuestos complejos indica que la biodegradación de plásticos en el medio ambiente podría ser un rasgo metabólico potencial de algunos hongos (Vaksmaa et al., 2021).

Los hongos producen proteínas hidrofóbicas que pueden adherir el micelio a sustratos hidrofóbicos (Liu et al., 2022). Así, el micelio tiene la capacidad de degradar sustratos plásticos generando grietas, picaduras y agujeros, erosiones superficiales, reducción del peso de los materiales, cambios en el peso molecular del polímero y la formación de nuevos grupos funcionales (Hakkarainen, 2002). Producto de estas reacciones también se obtiene agua, dióxido de carbono o metano (Ezziyyani et al., 2007; Zimmermann 2020; Zehgal et al., 2021), dependiendo de la extensión del proceso y las reacciones asociadas. Las principales enzimas involucradas en la degradación del plástico son la manganeso peroxidasa (MnP), la lignina peroxidasa (LiP) y las lacasas, comúnmente asociadas a la degradación de la lignina (Ameen et al., 2015; Xu et al., 2015; Zimmermann 2020, Zehgal et al., 2021). La lignina es un polímero aromático natural de biomasa leñosa vegetal y considerado bastante complejo y recalcitrante a la degradación. El complejo enzimático encargado de procesar lignina se compone de peroxidasas, lacasas y oxidasas que conducen a la producción de peróxido de hidrogeno extracelular (Ruiz-Dueñas et. al., 2009; Xu et al., 2015). Estas enzimas catalizan reacciones de oxidación-reducción, en las que intervienen radicales libres, transformando varios compuestos en productos oxidados o polimerizados (Wei y Zimmermann, 2017). La lacasa es una enzima que contiene cobre en su sitio activo, mientras que la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP) contienen Fe (Wong, 2009; Bonugli-Santos et al., 2010). La lignina peroxidasa es una proteína hemo que se caracteriza por un alto potencial redox, y permite la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos (Tien et al., 1984; Wong, 2009). La MnP es una glicoproteína dependiente de H_2O_2 que requiere Mn^{2+} para oxidar fenoles monoaromáticos y colorantes aromáticos (Kuwahara et al., 1984; Wong, 2009). Por otra parte, la lacasa, una oxidasa multicobre, cataliza la reducción de O_2 a H_2O , oxida las

aminas aromáticas (D'Sousaz et al., 2006) e interviene en la oxidación de la columna vertebral de carbono de los polímeros (Amobonye et al., 2021). Una forma viable y accesible para identificar estas enzimas, consiste en emplear el reactivo guayacol, ya que, al reaccionar, las cepas positivas a enzimas lignícolas pueden detectarse por la formación de un halo marrón rojizo en el medio de cultivo (Warishi et. al., 1992; Arora et. al., 2001; Muñoz, 2012; Rao, 2012; Xu, et. al., 2015; Huy et. al., 2017).

Actualmente, la técnica más empleada para estimar la biodegradación del plástico es determinar la pérdida de peso/masa de un polímero específico en un periodo de tiempo durante el cual el plástico es expuesto a condiciones ambientales o a microbios cultivados (Ameen et. al., 2015; Alshehrei, 2017; Deepika et al., 2015; Raghavendra et. al., 2016; Sangale et. al., 2019). Al emplear esta metodología con una cepa fúngica marina aislada en un ambiente estéril, registrando la biomasa producida por el organismo, podemos interpretar que el incremento de la biomasa ocurre por el carbono a disposición originado en el plástico (Paço et. al., 2017; Zeghal et. al., 2021).

Considerando los antecedentes antes planteados que posicionan a los hongos como potenciales organismos capaces de tener una acción degradativa sobre polímeros de plástico, en este trabajo se propone investigar el potencial efecto de hongos marinos aislados desde el ambiente submareal en la reducción de diferentes tipos de plástico.

HIPOTESIS DE TRABAJO

- a) Los hongos marinos presentes en ambientes costeros de la región del Biobío son capaces de crecer utilizando plásticos como sustrato de fijación.
- b) Los hongos marinos capaces de crecer sobre plásticos presentan actividad de enzimas potencialmente capaces de degradar polímeros de plástico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar cepas de hongos marinos de las costas de la región del Biobío que presenten la capacidad potencial de degradar polímeros de plástico.

Objetivos específicos

- 1 Aislar hongos marinos a partir de fragmentos de plástico expuestos a condiciones naturales en ambientes costeros de la región de Biobío.
- 2 Realizar cultivos *in vitro* de la(s) cepa(s) aislada(s) en medios enriquecidos en polímeros de plástico.
- 3 Evaluar la presencia de enzimas lignícolas en las cepas de hongos aisladas.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio y muestro

Se fabricó una jaula en acero inoxidable de 30x20x20 cm³ (Fig. 2) compuesta de tres compartimientos interiores de iguales dimensiones. En cada uno de estos se puso a disposición un alambre de acero inoxidable donde se amarraron con hilo de pescar 12 muestras de plástico de 2 cm² aproximadamente. Cada compartimento incluía un plástico distinto: Tereftalato de polietileno (PET), Polietileno (LDPE) y Poliestireno (PS). Además, se introdujo un trozo de madera de maqui y otro de nispero como sustratos de control. La jaula fue instalada en Bahía Coliumo, en la región del Bío-bío, Chile, mediante buceo autónomo a 5 m de profundidad (Fig. 3). Los fragmentos de plástico incluidos en la jaula fueron expuestos a las condiciones marinas naturales durante 35 días, desde el 7 de abril 2022 hasta el 12 de mayo 2022. Durante el muestreo se extrajeron 2 fragmentos de cada plástico y 1 trozo de cada madera que fueron almacenados en bolsas limpias herméticas hasta su procesamiento en el laboratorio. Las 8 muestras fueron transportadas a la misma temperatura del agua (11°C) y en ausencia de luz al laboratorio.



Figura 2: Jaula de acero inoxidable con los diferentes fragmentos de plástico (PET, LDPE y PS) en su interior.

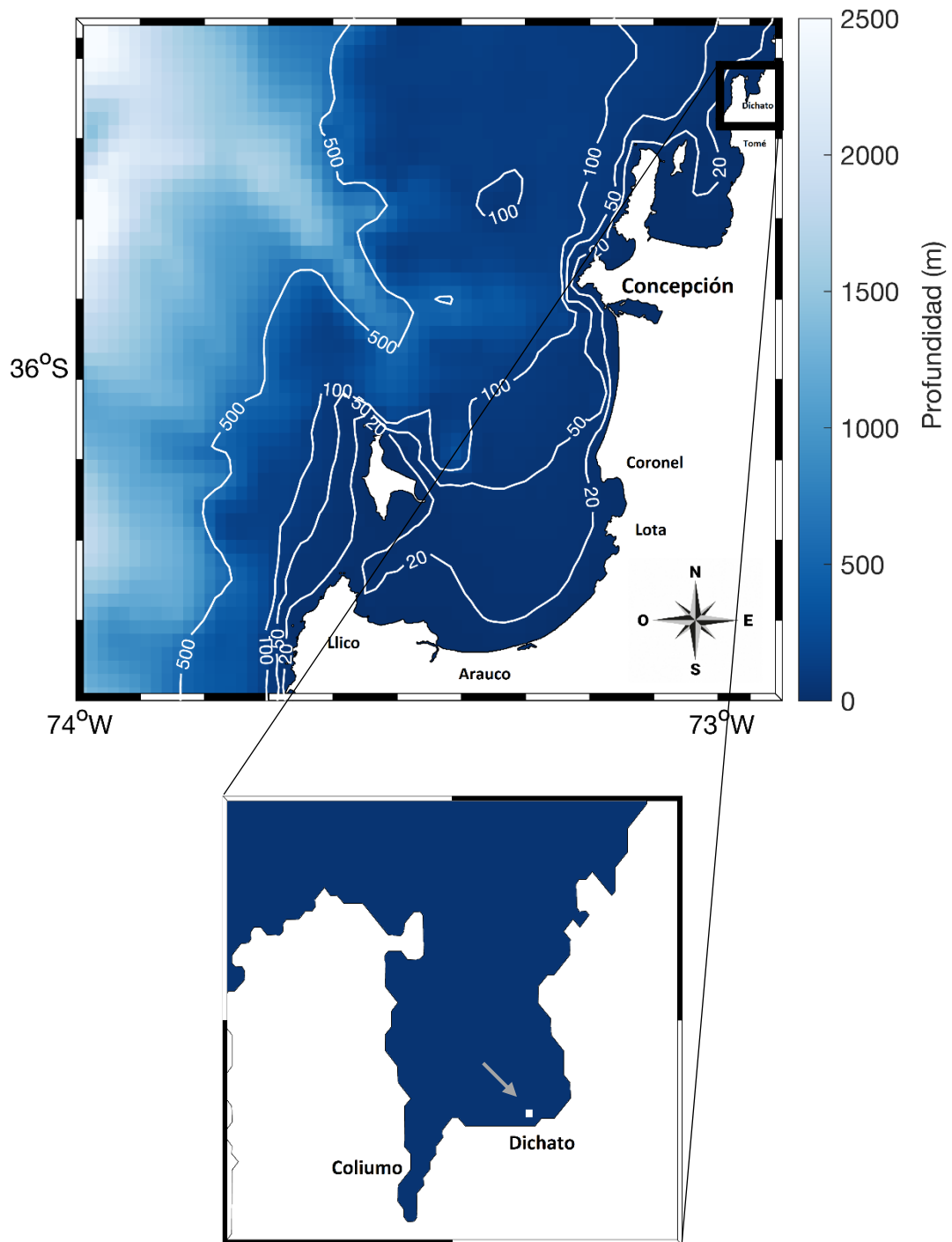


Figura 3: Ubicación de zona del área de estudio en la localidad de Dichato, Bahía Columo, región del Bío-bío, Chile.

Aislamiento de hongos marinos

Cada fragmento de plástico recolectado se introdujo directamente desde su recipiente a una placa Petri conteniendo medio de cultivo sólido para hongos marinos y se incubaron a 21°C y agitación (92 rpm) durante 7 días. El medio de cultivo de aislamiento utilizado fue preparado de acuerdo a lo establecido por Johnson & Sparrow (1961). Las cepas fueron aisladas extrayendo un trozo de agar de 1 cm² aproximadamente desde la placa original hacia una nueva con el mismo medio de cultivo en duplicado (para evitar contaminaciones) y se volvieron a incubar bajo las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió en caso de contaminación hasta obtener cepas puras de los hongos. Una vez que las cepas presentaron un crecimiento considerable, fueron guardadas en un refrigerador a 5°C para evitar un crecimiento excesivo y conservarlas para futuros análisis.

Preparación del polvo de Polietileno

Se seleccionaron 2 gramos de polietileno transparente a partir de una bolsa de embalaje de papel higiénico, los cuales fueron cortados en pequeños trozos. Se calentaron 40 mL de xileno (20 mL/g) (Obtenido desde Sigma-Aldrich) a 85°C en un vaso precipitado de 250 mL sobre una placa de agitación Thermolyne® Nuova™ (AC/DC input 240 V) a 300 rpm con un agitador magnético bajo campana de extracción. Una vez la temperatura fue alcanzada, el plástico fue introducido y la disolución se mantuvo bajo las mismas condiciones durante 2 horas (Georgiopoulou et. al., 2021; Wong et al., 2015; Pappa et. al., 2001, Pramila et. al., 2011). Enseguida, la mezcla fue precipitada con 76 mL de 2-propanol (proporción 1.9 AS/S), lo cual se añadió de manera gradual con una pipeta manteniendo la temperatura (Georgiopoulou et. al., 2021). La solución se dejó enfriar y se filtró, utilizando un filtro de fibra de vidrio de 0.7 µm. El plástico particulado se secó a temperatura ambiente bajo campana durante 48 horas. El contenido se trituró con una espátula de acero inoxidable y un mortero.

Preparación de medios de cultivo sólido

Para la preparación del medio de cultivo control, se utilizó agua de mar 1L (filtrada con un filtro de membrana 0.22 μm); agar 18 g; extracto de levadura 0.1 g; Glucosa 1 g y Cloranfenicol 200 mg (Johnson & Sparrow, 1961). En el caso de los medios de cultivos con plásticos, se prepararon 3 medios similares al anterior reemplazando la fuente de carbono (glucosa) por polímeros plásticos (PET, PS y LDPE) (Alshehrei, 2017; Pramila et. al., 2011) Para esto, se efectuó previamente un raspado de una botella de bebida PET y de un envase de yogurt PS con el fin de obtener plástico particulado (polvo de plástico o micro plástico). Se agregó a la primera mezcla 1 g de PET (Tereftalato de polietileno), a la segunda 1 g de PS (Poliestireno) y a la tercera 1 g de polvo de polietileno (LDPE) preparado como se indicó anteriormente. Además, para evaluar la influencia del extracto de levadura en el crecimiento fúngico, se realizaron en paralelo los mismos medios de cultivos con plástico como fuente de carbono, pero sin extracto de levadura. Cada elemento fue pesado en una balanza SHIMADZU (modelo AUX 220. 220 g x 0,1 mg) e introducido en un matraz con el agua de mar. Las mezclas fueron calentadas a 55 – 60°C durante una hora a 120 rpm en una placa de agitación Thermolyne® Nuova™ (AC/DC input 240 V) (Fig. 2). Una vez preparadas, las mezclas de cultivo fueron esterilizadas por auto clavado a 121 °C. Adicionalmente, se prepararon medios de cultivo con lignina (99.8 %, Sigma-Aldrich) – utilizando los mismos elementos que el medio control y reemplazando la glucosa – como única fuente de carbono, diluyendo 1 gramo en 5 mL de Etilenglicol (99.8 %, Sigma-Aldrich) y agitando en un tubo de ensayo a 3000 rpm con un Vortex durante unos segundos (Sun, et. al., 2016).

Preparación de placas Petri

Una vez que los medios estuvieron auto clavados, se dejaron enfriar las mezclas y se vertió 25 mL aproximadamente en cada placa Petri, las cuales se dejaron solidificar con sus tapas semi abiertas. Cuando los medios de cultivo solidificaron, cada placa se selló con Parafilm en su alrededor y fueron conservadas en refrigerador a 5 °C para su posterior inoculación. El procedimiento se realizó bajo un gabinete de bioseguridad LABCONCO®, que fue previamente esterilizada con etanol 70 % y radiación UV durante 15 minutos.

Inoculación de hongos marinos en placas de cultivo

En una primera instancia, con el objetivo de probar la eficacia de los medios de cultivo, se inocularon 10 placas Petri con tejido de cepas previamente aisladas desde sedimentos de la región de Biobío (cepario de hongos Laboratorio profesor Marcelo Gutiérrez). Las cepas A (ST7 H6) y B (ST7 H9) se probaron en 5 medios distintos: (a) Control, (b) PS + extracto de levadura, (c) PS sin extracto de levadura, (d) PET + extracto de levadura y (e) PET sin extracto de levadura. Se introdujo un fragmento pequeño de agar con tejido de las cepas de aproximadamente 0.25 cm² en cada placa. Enseguida los cultivos se sellaron con Parafilm, se dejaron a temperatura ambiente durante 7 días en un recipiente de poliestireno y privados de luz (Rani et al., 2017; Pramila et al., 2011; Xu et al., 2015).

Posteriormente, las cepas aisladas desde los fragmentos plásticos se inocularon en los siguientes medios: Control, PET + extracto de levadura, PS + extracto de levadura, LDPE + extracto de levadura y Lignina + extracto de levadura.

Identificación de actividad enzimática lignícola

Para evaluar la capacidad de las cepas fúngicas de producir enzimas que degradan la lignina, se utilizó la oxidación del compuesto guayacol como método de detección. Para esto, se añadió 0.4 ml L⁻¹ del reactivo guayacol (Muñoz, 2012) al medio de cultivo control cuando se encontraba a una temperatura inferior a 40°C previo al vertimiento en placa. Las nueve cepas aisladas fueron inoculadas en este medio durante un periodo de 9 días. Aquellas que reaccionaron positivamente al guayacol fueron seleccionadas para análisis posteriores. Adicionalmente, se realizó un medio de cultivo con guayacol y lignina como única fuente de carbono, inoculando la especie *Trametes versicolor* como referencia.

Tasa de crecimiento

Las cepas positivas a enzimas lignícolas fueron sembradas en placas Petri con los medios Control, PET, PS, LDPE y Agar (Mismos elementos que el medio Control, solamente se eliminó la glucosa). Las placas se incubaron a 21°C con una agitación de 92 rpm durante 15 días. Con la ayuda de una regla milimétrica se midió el crecimiento diario de la colonia en milímetros (mm día⁻¹). Los resultados obtenidos fueron graficados y se calculó la

pendiente para la determinación de la tasa de crecimiento. Los resultados obtenidos para cada cepa fueron sometidos a una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con el fin de evaluar diferencias entre tratamientos. Adicionalmente se realizó una comparación múltiple versus el tratamiento Control con el test de Dunn. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Prism (GraphPad Software).

Crecimiento de hongos en medios líquidos

Las cepas positivas a enzimas lignícolas fueron cultivadas en 3 medios distintos, el primer medio estuvo compuesto de 1L de agua de mar; 1 g glucosa; 200 mg Cloranfenicol. El segundo compuesto de 1L de agua de mar; 200 mg Cloranfenicol y 1 lámina de LDPE de 1 cm². El tercero compuesto de 1L de agua de mar; 200 mg Cloranfenicol y 1 lámina de PET de 1 cm². Cada tratamiento fue realizado dentro de matraces Erlenmeyer de 100 mL por triplicado y cada lámina plástica fue pesada previamente (Fig. 4). Los cultivos se mantuvieron a 21°C con una agitación de 90 rpm durante 1 mes. (Ameen et al., 2015; Khruengsai et al., 2021).

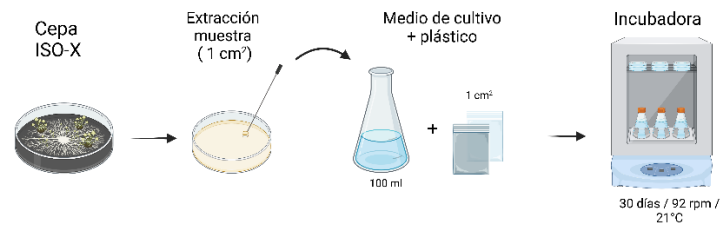


Figura 4: Esquema que muestra la inoculación de cepas con potencial actividad lignícola en medios líquidos con plásticos como única fuente de carbono.

Una vez terminada la incubación, los cultivos fueron trasladados a tubos plásticos Eppendorf 50 mL – los cuales fueron pesados previamente – se centrifugaron a 3500 rpm durante 4 minutos y el sobrenadante fue eliminado con la ayuda de una pipeta de vidrio de 5 mL. Los tubos Eppendorf fueron rellenos con agua Millipore® y centrifugados nuevamente descartando el sobrenadante para diluir y expeler sales disueltas. Este proceso se repitió 3 veces de manera individual (Fig. 5). Posteriormente, las muestras fueron congeladas a -80°C durante 24h y luego liofilizadas para la determinación de la biomasa de hongos en miligramos. Por otro lado, las láminas de plástico fueron recuperadas previo

al liofilizado. Enseguida se lavaron con agua destilada para eliminar la biomasa adherida y los componentes del medio. El peso seco de estas láminas se comparó con sus pesos iniciales respectivos. La pérdida de peso se calculó mediante la fórmula: *pérdida de peso* $\% = (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial} \times 100$ (Osman et. al., 2018; Sarkhel et. al., 2020).

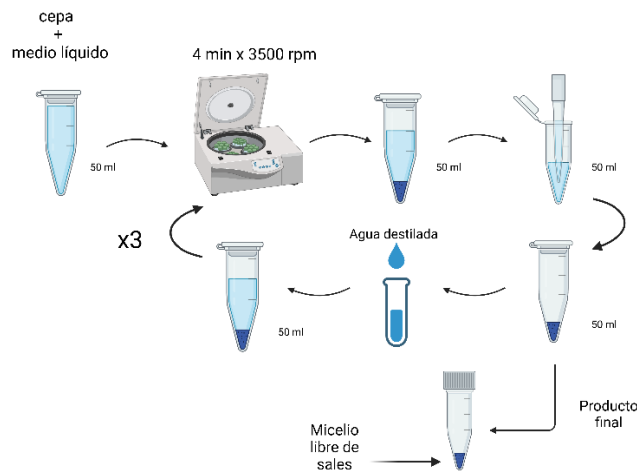


Figura 5: Esquema de procesos de dilución y extracción de sales para cuantificación de biomasa fúngica.

Los resultados fueron presentados como la diferencia entre el peso inicial y el peso final de cada plástico. Las diferencias entre los pesos iniciales y finales de los fragmentos plásticos de LDPE y PET expuestos a las diferentes cepas, fueron sometidas a la prueba no paramétrica de Wilcoxon, ($p\text{-value} = 0.05$). Los porcentajes de pérdida de peso para LDPE y PET se compararon entre cepas con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se realizó una comparación múltiple entre todos los grupos con el test de Dunn.

Extracción y amplificación de ADN de cepas de hongos

Para la extracción de ADN se empleó el Kit Nucleospin® Plant II, utilizando 20 mg de biomasa seca liofilizada de cada cepa aislada. Inicialmente, para efectuar la lisis celular, se agregaron 400 μL de Buffer PL1 a cada muestra transferida en tubos 1.5 mL los cuales fueron homogeneizados con un agitador Vortex e incubados durante 10 minutos a 65°C. Los siguientes pasos de la extracción y posterior elusión del ADN extraído se realizaron

de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit de extracción. Las concentraciones de los extractos de ADN se midieron con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). La cepa ISO8 no formó parte de este experimento debido a que el matraz con la biomasa correspondiente se rompió y se contaminó.

Se realizó una amplificación por PCR de la región ITS con los partidores ITS1F y ITS4R del ADN ribosomal de los hongos. Se utilizaron 8 microtubos de 2 mL, cada uno conteniendo 7,4 μ L de agua, 10 μ L de mix de PCR, 0,8 μ L de cada partidor y 1 μ L de ADN. Se utilizó agua estéril de grado PCR como control negativo y una muestra de ADN de laboratorio con certeza de amplificación como positivo. Se tiñeron 5 μ L de cada producto PCR con el colorante Blue/Orange Loading Dye 6x y se llevó a un termociclador (BOECO Thermal Cycler TC-PRO) con el siguiente programa: 95 °C durante 2 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 20 s, 55 °C durante 15 s y 72 °C durante 5 min, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. El éxito de la amplificación se confirmó mediante electroforesis (50 min a 80V) en gel de agarosa y la imagen del ADN teñido con Diamond™ Nucleic Acid Dye mediante luz UV.

Identificación taxonómica de cepas de hongos

Los productos de PCR fueron enviados al Laboratorio de servicios MacroGen® para secuenciación aplicando el método Sanger. Los resultados obtenidos fueron entregados en formato FASTA. Las secuencias fueron procesadas con el programa Quiime2. Posteriormente, se buscaron secuencias similares en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (Blast; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se escogieron secuencias que presentaron mayor identidad porcentual con las secuencias de las cepas y se procedió a hacer la alineación con el software MAFFT. Los resultados taxonómicos fueron importados al software IQTREE, donde se realizó un árbol filogenético.

RESULTADOS

Pruebas de los medios de cultivo

Se observaron estructuras filamentosas blancas a partir del 3er día en todos los tratamientos. Al cabo del 7mo día, se apreció la colonización de la totalidad de la placa en los distintos sustratos (Fig 6A-E). En los medios de cultivo control (Fig. 6A) y PET + extracto de levadura (Fig. 6D) se detectó una posible contaminación probablemente debido a la manipulación durante el procedimiento de inoculación. Sin embargo, el objetivo de este ensayo se enfocó en la estandarización de medios de cultivo enriquecidos en plásticos para futuros análisis, por lo tanto, no representó un inconveniente para los resultados.

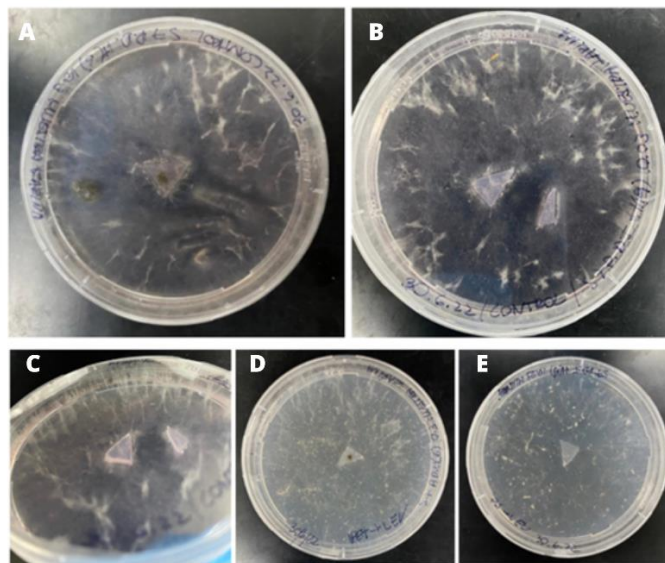


Figura 6: Fotos de crecimientos de las cepas ST7 H6 y ST7 H9 inoculadas en distintos medios de cultivo, observaciones corresponden al séptimo día. Control ST7H6 (A); Control ST7H9 (B); Crecimiento vertical de hifas ST7H6 (C); PET + extracto de levadura ST7H6 (D); PS + extracto de levadura ST7H9 (E).

Aislamiento de cepas de hongos marinas desde las muestras plásticas

Al extraer los fragmentos plásticos desde el mar, se observaron cambios en su coloración y en su estructura. La figura 7A muestra el fragmento de poliestireno inicialmente blanco opaco, y la coloración café anaranjado con una coloración central predominante al final

de la incubación. Los fragmentos de polietileno (Fig. 7B) y tereftalato de polietileno (Fig. 7C) presentaron un cambio de coloración de transparentes a amarillos. El fragmento de poliestireno (Fig. 7A) presentó irregularidades en sus bordes externos en comparación al corte liso que predominaba al inicio del experimento. Por otra parte, el fragmento de polietileno (Fig. 7B) presentó un cambio en su estructura volviéndose menos liso y rígido. El trozo de madera de níspero recuperado y el tereftalato de polietileno no presentaron diferencias físicas a simple vista. Todas las muestras inoculadas sobre los medios de cultivo en placas Petri presentaron crecimiento fúngico de diversas cepas, las cuales se diferencian por su coloración, ramificación del micelio (Fig.7 A-D) y estructuras reproductivas morfológicamente distintas al observarlas al microscopio. También se apreciaron algunas levaduras formando colonias circulares de color blanco (Fig. 7A). El crecimiento de hongos en los sustratos plásticos fue más diverso, pero no tan rápido como el del fragmento de madera (Fig. 7D), donde se logró apreciar una sola especie dominante que colonizó la totalidad de la placa.

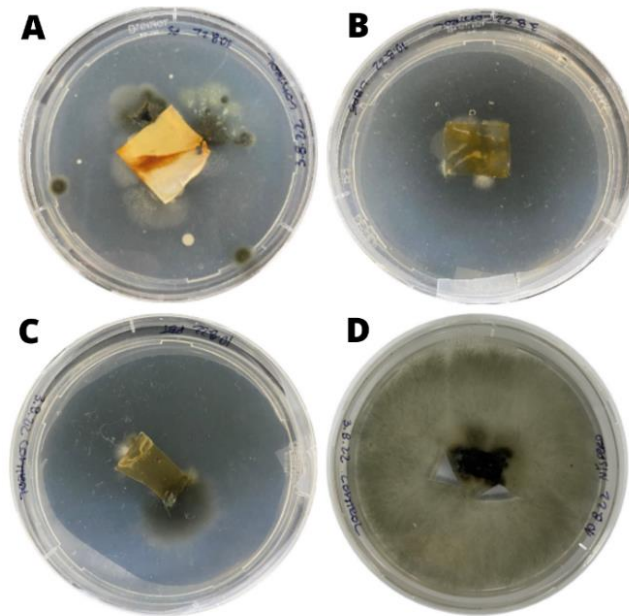


Figura 7: Fotos de placas de agar del aislamiento de hongos marinos a partir de las muestras de fragmentos de plástico y de madera en medios de cultivo Control al cabo de 7 días. Poliestireno (A); Polietileno (B); PET (C); Níspero (D).

Identificación de especies por extracto de ADN

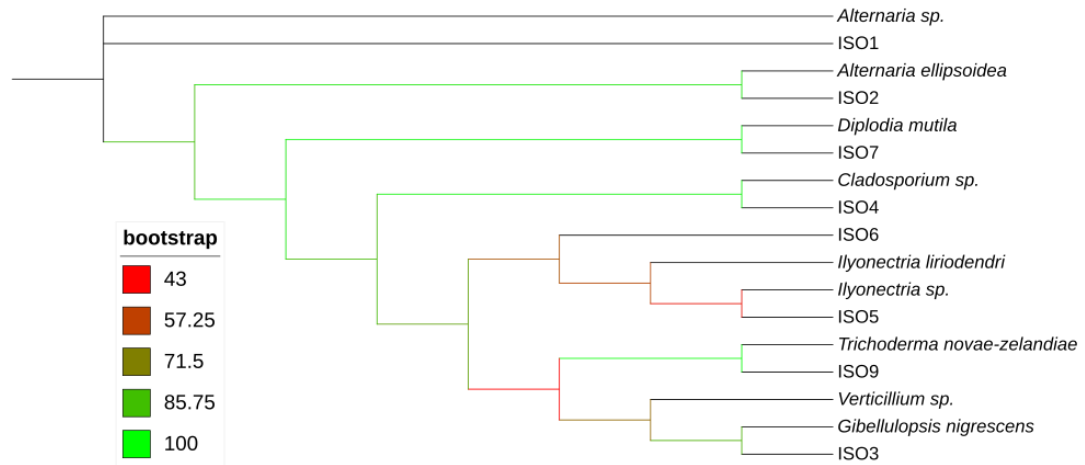


Figura 8: Árbol filogenético realizado en el programa IQTREE. La escala de colores denominada “Bootstrap” indica el nivel de alineamiento entre las cepas aisladas y las bases de datos.

El análisis filogenético (Figura 8) permitió inferir la taxonomía de las cepas aisladas, encontrándose un alto soporte para las cepas ISO2, ISO4, ISO7 e ISO9 que se alinearon fuertemente con secuencias de *Alternaria ellipsoidea*, *Cladosporium sp.*, *Diplodia mutila* y *Trichoderma novae-zelandiae*, respectivamente. Por otro lado, con un menor soporte, la cepa ISO1 se alineó con secuencias de *Alternaria sp.*, la ISO3 con *Gibellulopsis nigrescens*, la ISO6 con *Ilyonectria liriodendri* y la ISO5 con *Ilyonectria sp.*

Crecimiento de las cepas en medios de cultivo de aislamiento

Con excepción de *Cladosporium sp.* (Fig. 9C), las cepas aisladas alcanzaron el crecimiento máximo dentro de las placas Petri en un periodo de 7 días bajo las condiciones de incubación. Bajo el microscopio con un aumento de 40x, las hifas se observaron creciendo de manera radial expandiéndose sobre la superficie del medio de cultivo y mostrando estructuras reproductivas (Fig. 9A-J). Particularmente, las hifas de la cepa ISO6 (Fig. 9E) indicaron un color blanquecino semi transparente difíciles de percibir sin un contraste de luz, mientras que sus estructuras reproductivas se lograban apreciar de manera clara, distribuyéndose en conformaciones esféricas compuestas igualmente de

micelio (Fig. 9J). *Alternaria sp.* reveló conidios en cadena ramificados (Fig. 9G) al igual que *Alternaria ellipsoidea* (Fig. 9F) (Carrillo, 2003). *Cladosporium sp.* comprende cadenas ramificadas similares a conidios unicelulares, elipsoides o cilíndricos (Fig. 9H) (INSST, 2022). *Ilyonectria sp.* (Fig. 9I) presentó estructuras semejantes a microconidias con forma ovalada (Chaverri, et al., 2011), mientras que las esporas de *Ilyonectria liriodendri* (Fig. 9J) no se lograron identificar con certeza.

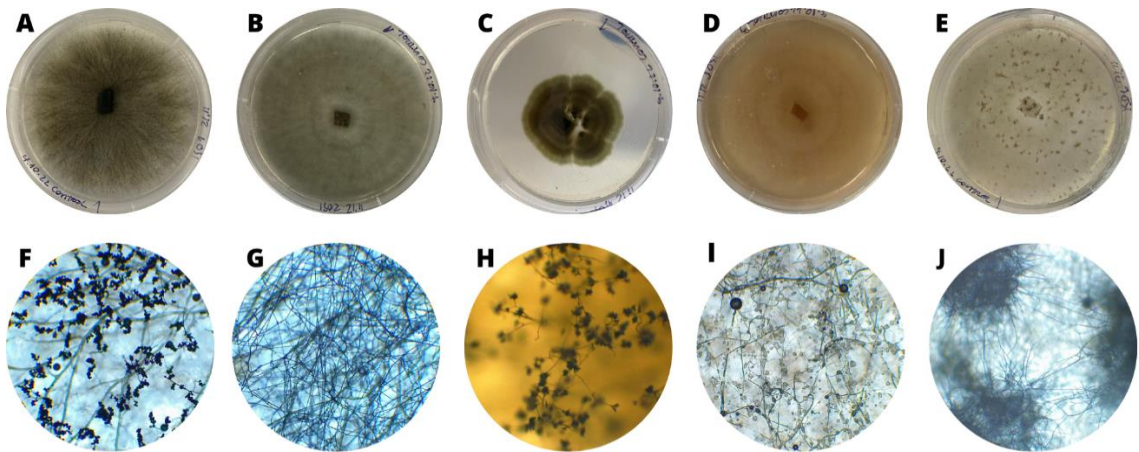


Figura 9: Fotos de placas de agar (medio control) de cepas fúngicas marinas aisladas con potencial en la degradación del plástico. *Alternaria sp.* (A); *Alternaria ellipsoidea* (B); *Cladosporium sp.* (C); *Ilyonectria sp.* (D); *Ilyonectria liriodendri* (E). Vistas al microscopio con un aumento de 40x: Hifas y estructuras reproductivas *Alternaria sp.* (F); Hifas *Alternaria ellipsoidea* (G); Hifas y estructuras reproductivas *Cladosporium sp.* (H); Hifas *Ilyonectria sp.* (I); Hifas aglomeradas en estructuras esféricas *Ilyonectria liriodendri* (J).

Evidencia para la presencia de actividad lignícola

Se probó el método de la reacción oxidativa entre el guayacol y el complejo enzimático de lignina con la cepa de hongo terrestre lignícola *Trametes versicolor*, observándose una coloración rojiza en los medios de cultivo y alrededor de los tejidos inoculados como plantearon Xu et al., (2015) & Muñoz (2012). El halo de color rojo con forma circular en el medio lignina (Fig. 10A) fue de 4,2 cm de diámetro, mientras que en el medio normal (Fig. 10B) fue de 5,8 cm aproximadamente. El crecimiento de las hifas se distribuyó de manera diferente. En el medio lignina se aprecia como el micelio esta más concentrado,

resaltando su coloración blanca y su desarrollo acotado. En el medio normal el micelio se dispone de una forma más homogénea llegando cerca del límite de la coloración del medio.

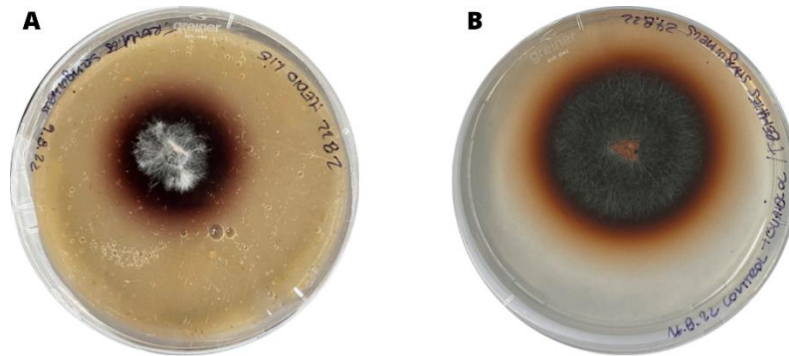


Figura 10: Fotos de placas de agar con coloración rojiza en cultivos de *trametes versicolor* en medio lignina (A) y en medio Normal (B) como pruebas de oxidación positiva de guayacol tras 7 días de incubación.

Posteriormente, se procedió a emplear la misma metodología con las cepas aisladas (Fig. 11). De las 9 cepas aisladas, *Alternaria sp.*, *Alternaria ellipsoidea*, *Cladosporium sp.*, *Ilyonectria sp.* e *Ilyonectria lirioidendri* dieron positivo a la presencia enzimas lignícolas. En la figura 11 de manera horizontal se pueden apreciar las hifas y/o esporas de las cepas correspondientes a su imagen superior.

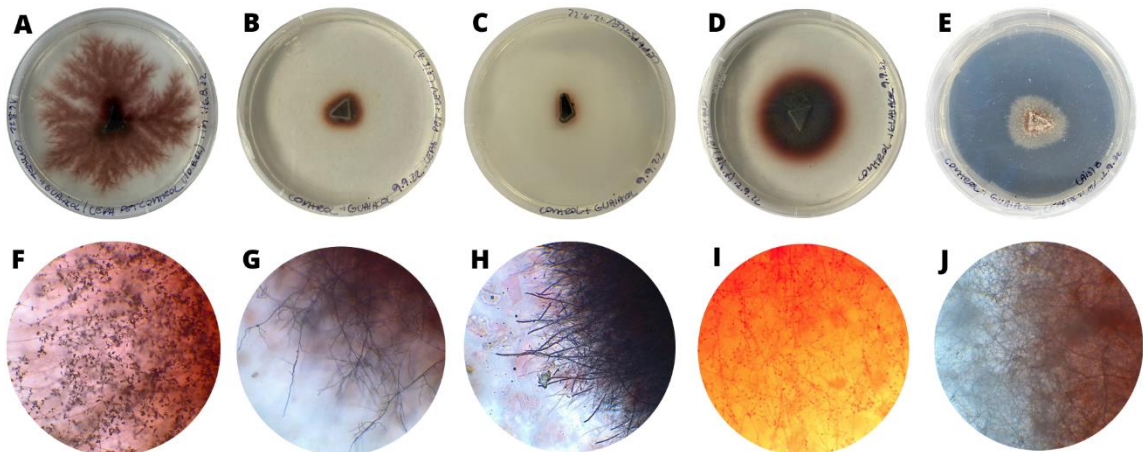


Figura 11: Fotos de placas de agar (medio control) de las 5 cepas de 9 aisladas que muestran una reacción positiva al medio con guayacol. Crecimiento micelial ramificado de la especie *Alternaria sp.* (A). Crecimiento radial de las cepas: *Alternaria ellipsoidea* (B); *Cladosporium sp.* (C); *Ilyonectria sp.* (D);

Ilyonectria liriodendri (E). En la ilustración F se observan estructuras reproductivas de *Alternaria sp.*. G, H, I y J se observan hifas de las cepas *Alternaria ellipsoidea*; *Cladosporium sp.*; *Ilyonectria sp.* e *Ilyonectria liriodendri* respectivamente.

Crecimiento de hongos marinos con potencial para la degradación de LDPE/PET en medios líquidos

Al cabo de 30 días, los resultados de los experimentos con plásticos como única fuente de carbono en medios líquidos presentaron colonias fúngicas adheridas a los sustratos (Fig. 12) donde *Alternaria sp.* (Fig. 12 A), *Alternaria ellipsoidea* (Fig. 12B), *Ilyonectria sp.* (Fig. 12D) e *Ilyonectria liriodendri* (Fig. 12E) desarrollaron hifas con una tonalidad blanca/semi transparente, difiriendo visualmente de cuando son cultivadas en medio solido (Fig. 9). En el caso de *Cladosporium sp.* (Fig. 12C), el micelio presentó un color café, similar a cuando es cultivado en condiciones normales (Fig. 9C). *Cladosporium sp.* fue la única cepa que desarrollo micelio sobre las superficies del matraz además de colonizar los fragmentos plásticos (Fig. 12C).

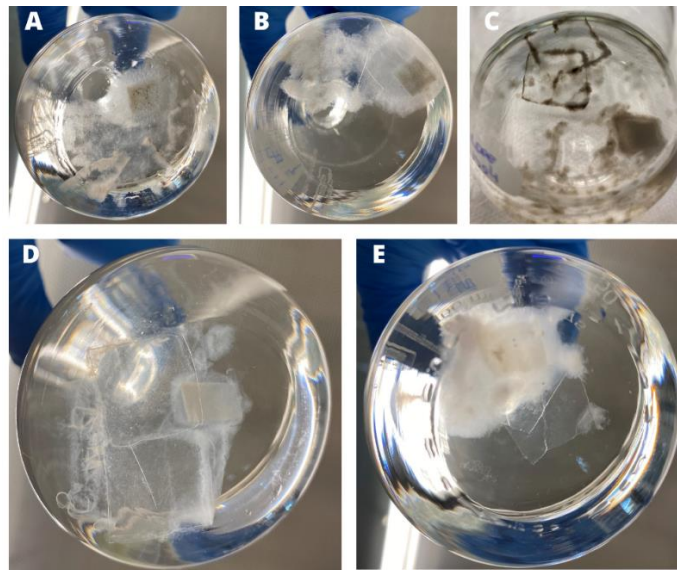


Figura 12: Vista inferior de cultivos en medios líquidos con muestras plásticas como únicas fuentes de carbono: Micelio blanco translucido de *Alternaria sp.* con plásticos LDPE (A); Micelio blanco translucido de *Alternaria ellipsoidea* adherido a plásticos PET (B); Micelio marrón oscuro de *Cladosporium sp.* adherido al fondo del matraz y alrededor de los plásticos LDPE (C); Micelio blanco transparente de la cepa *Ilyonectria sp.* adherido alrededor de plásticos PET (D); Micelio blanco de la cepa *Ilyonectria liriodendri* adherido a plásticos LDPE (E).

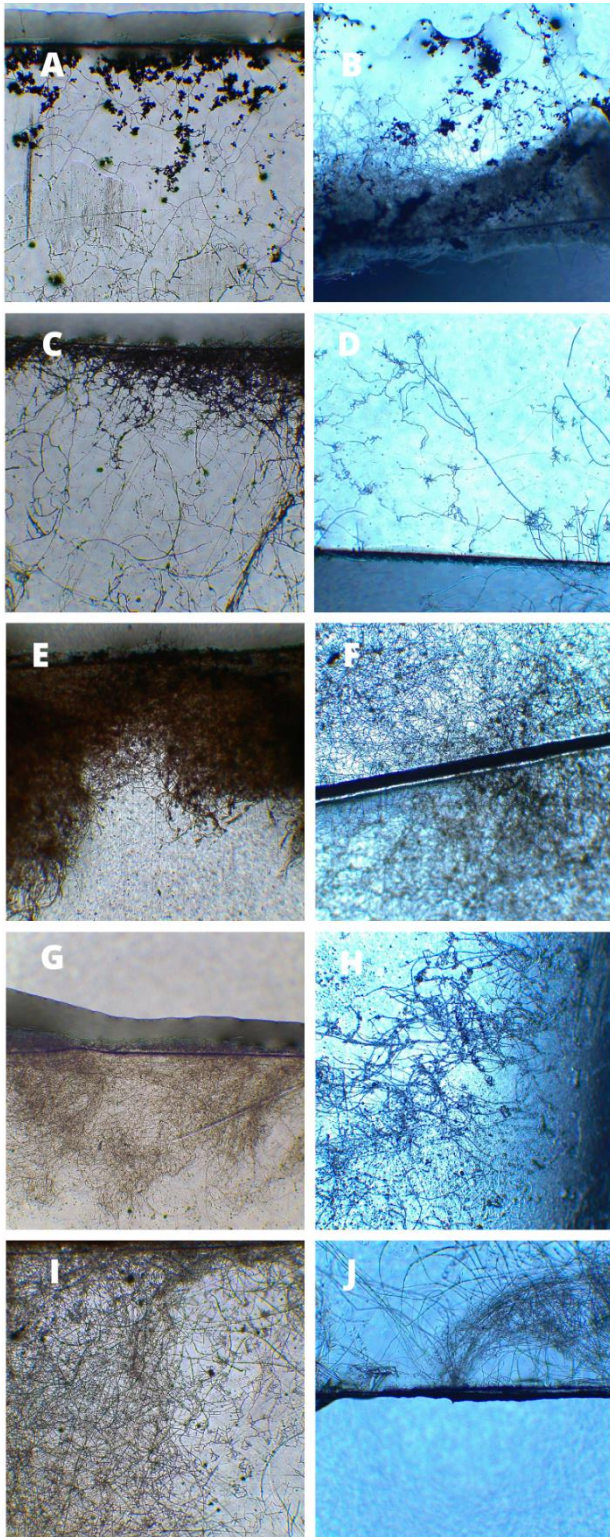


Figura 13: Fotos de plásticos LDPE y PET colonizados por cepas fúngicas lignícolas al cabo de un mes. Estructuras reproductivas y micelio sobre LDPE (Columna izquierda) y PET (Columna derecha): *Alternaria sp.* (A; B); *Alternaria ellipsoidea* (C; D); *Cladosporium sp.* (E; F); *Ilyonectria sp.* (G; H); *Ilyonectria liriiodendri* (I; J).

Adicionalmente, los fragmentos de plástico fueron observados al microscopio con un aumento de 40x, donde se logró apreciar como las hifas se disponían adheridas al sustrato en los plásticos de polietileno y tereftalato de polietileno (Fig. 13). Las muestras de LDPE fueron donde más se observaron estructuras reproductivas, especialmente en el tratamiento con *Cladosporium sp.* (Fig. 13E). Esta cepa también fue la única que presentó una colonización en la totalidad de la superficie del fragmento de plástico PET (Fig. 13F) (la línea media que se aprecia en la imagen corresponde a la zona central del plástico), al contrario del resto de las cepas que solamente se adhirieron en las extremidades de los plásticos. No se identificaron zonas degradadas en los plásticos por parte de los hongos al microscopio.

Tabla 1: Porcentajes de la diferencia entre pesos iniciales y finales (en triplicado) de las muestras plásticas (LDPE y PET) sometidas en medios de cultivos líquidos con plásticos como única fuente de carbono para cada cepa positiva al guayacol.

<i>Peso (g)</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Alternaria ellipsoidea</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Ilyonectria sp.</i>	<i>Ilyonectria liri dendri</i>
<i>LDPE₁</i>	0,42%	3,29%	11,17%	0,97%	0,91%
<i>LDPE₂</i>	3,14%	0,66%	3,31%	0,61%	2,48%
<i>LDPE₃</i>	2,50%	1,14%	1,18%	2,11%	0,00%
<i>PET₁</i>	0,00%	6,61%	0,00%	0,00%	0,13%
<i>PET₂</i>	0,00%	0,00%	0,42%	0,00%	0,00%
<i>PET₃</i>	0,00%	0,00%	0,45%	0,00%	0,00%

Al finalizar las incubaciones, cada fragmento plástico fue pesado después de ser limpiado. Los valores fueron expresados en porcentaje y representan la reducción de cada plástico con respecto al peso inicial al cabo de 30 días (Tabla 1). En general, se observó la degradación del polietileno por parte de todas las cepas de hongos marinos testeados, alcanzando un máximo de 11,17 % por *Cladosporium sp.* en una de las réplicas. A excepción de *Alternaria ellipsoidea*, quien mostró el mejor rendimiento en la degradación del tereftalato de polietileno (PET) con un 6,61% en una de las réplicas, *Cladosporium sp.* e *Ilyonectria liri dendri* tuvieron un leve impacto en la degradación del PET, mientras

que *Alternaria sp.* e *Ilyonectria sp.* no revelaron degradación alguna para este plástico. Las pruebas estadísticas no revelaron diferencias significativas entre las diferencias de peso de los fragmentos plásticos de LDPE (Fig. 14 A) ni de PET entre el tiempo inicial y final (Fig. 14 B). Tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar los porcentajes de reducción de peso de los fragmentos plásticos de LDPE (Fig. 14 C) y PET (Fig. 14 D) entre las distintas especies.

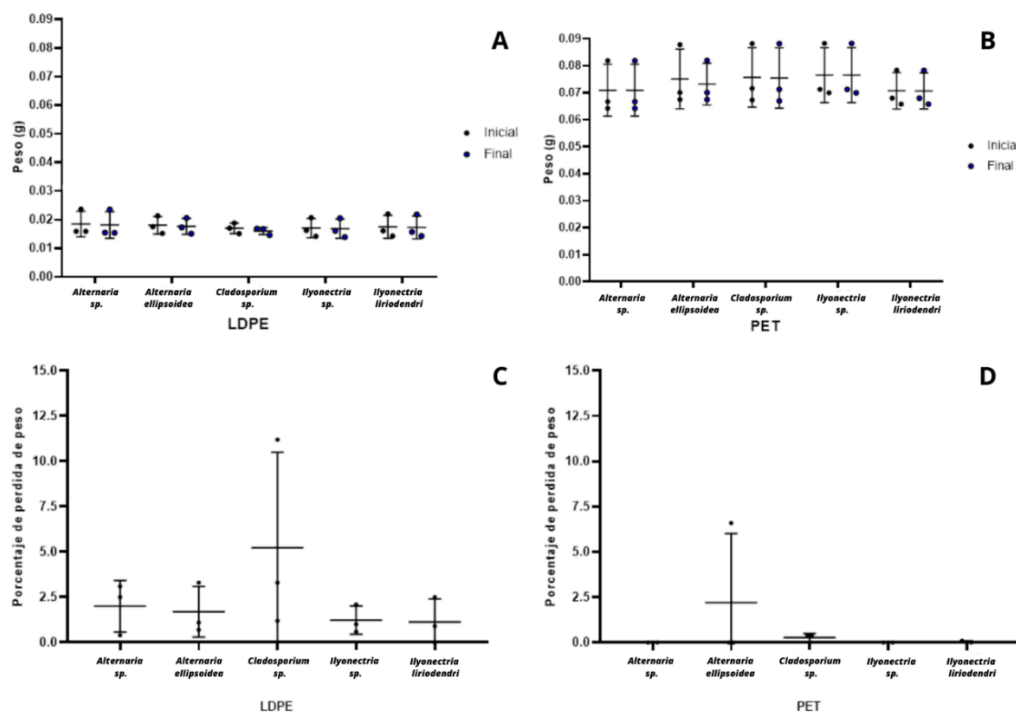


Figura 14: Gráfico comparativo entre pesos iniciales y pesos finales de los fragmentos plásticos de LDPE (A) y PET (B) de cada cepa y de pérdida de peso de los fragmentos plásticos de LDPE (C) y PET (D) para cada cepa.

Adicionalmente, se pesaron los micelios obtenidos de las incubaciones de LDPE y PET de cada cepa (Fig. 12), comparándolos con el micelio producido de las cepas cultivadas en medios líquidos bajo condiciones normales (Tabla 2). La biomasa producida por las 5 cepas en los medios control fue considerablemente mayor a las biomazas producidas en los tratamientos con plásticos (Fig. 15).

Tabla 2: Promedio de biomاسas (gramos) de las 5 cepas lignícolas al cabo de un mes en medios de cultivo líquido con glucosa, LDPE y PET como fuentes de carbono.

<i>Peso (g)</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Alternaria ellipsoidea</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Ilyonectria sp.</i>	<i>Ilyonectria liriodendri</i>
<i>Control</i>	0,042	0,041	0,039	0,024	0,049
<i>LDPE</i>	0,005	0,007	0,007	0,005	0,007
<i>PET</i>	0,008	0,004	0,008	0,006	0,007

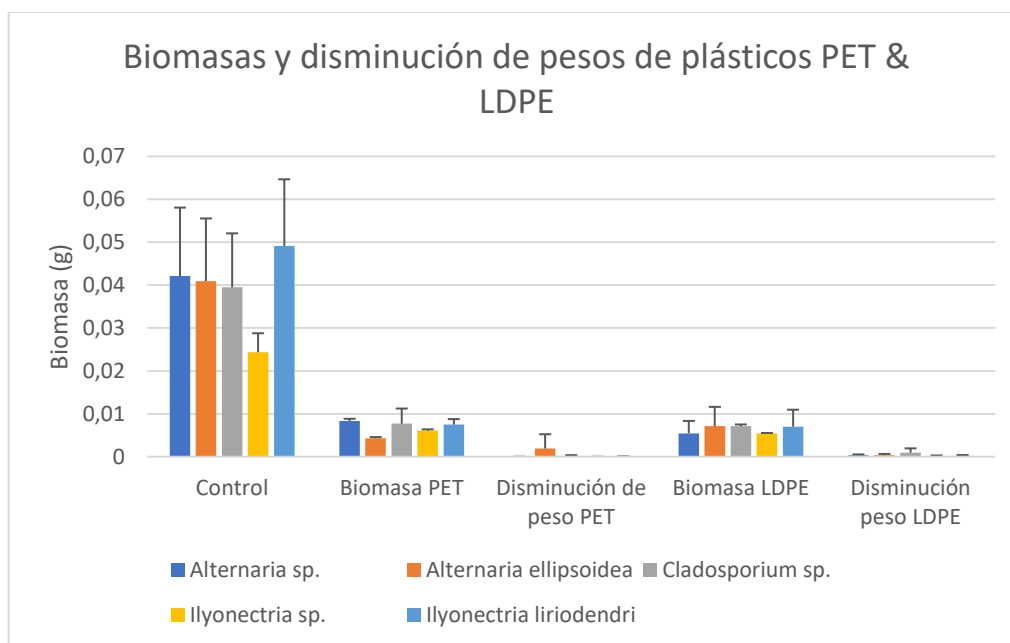


Figura 15: Promedio de biomاسas obtenidas en medios de cultivo de plásticos PET, LDPE y control con glucosa; Promedios de las pérdidas de peso de los plásticos PET y LDPE.

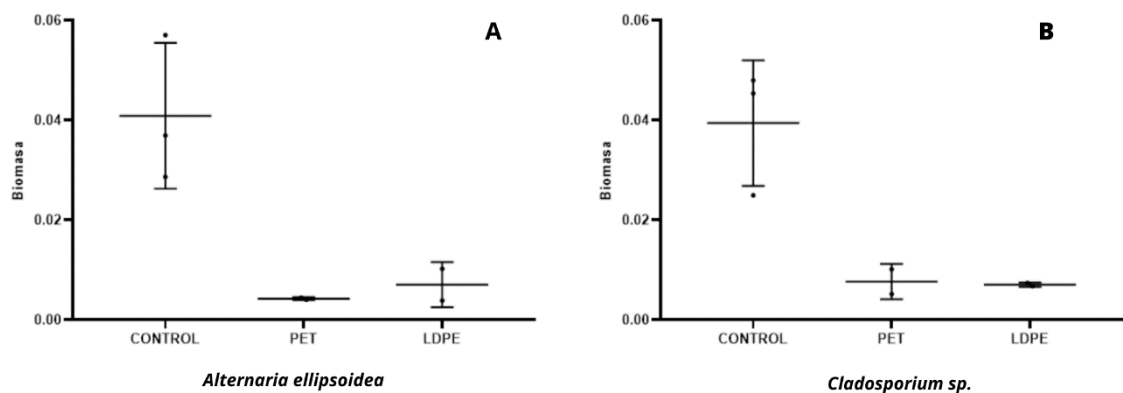


Figura 16: Biomasa promedio en gramos de *Alternaria ellipsoidea* (A) y *Cladosporium sp.* (B) para los tratamientos en medios líquidos Control, PET y LDPE.

Además, los promedios de las biomásas obtenidas en los tratamientos con PET y LDPE demuestran ser mayores en peso en comparación con los promedios de pérdida de peso de ambos fragmentos plásticos (Fig. 15). Los resultados estadísticos no revelaron diferencias significativas entre las biomásas obtenidas para los 3 tratamientos de cada especie. A pesar de que *Alternaria ellipsoidea* y *Cladosporium sp.* presentaron mayor porcentaje de degradación para PET y LDPE, respectivamente, las biomásas producidas para ambas especies en ambos tratamientos fueron mucho mayores a las reducciones de peso de los fragmentos plásticos (Fig. 16) y mucho menores a las biomásas obtenidas en medios líquidos control (Fig. 15).

Tasas de crecimiento

Tabla 3: Promedio de las tasas de crecimiento en $\text{mm} \cdot \text{día}^{-1}$ para cada tratamiento de cada cepa.

Tratamiento	<i>Alternaria sp.</i>	s/d	<i>Alternaria ellipsoidea</i>	s/d	<i>Cladosporium sp.</i>	s/d	<i>Ilyonectria sp.</i>	s/d	<i>Ilyonectria liriodendri</i>	s/d
Control	8.41	± 0.2	7.24	± 0.09	2.62	± 0.24	6.42	± 0.19	7.04	± 0.03
PET	8.20	± 0.15	6.73	± 0.09	1.54	± 0.04	5.49	± 0.12	6.22	± 0.34
PS	7.39	± 0.82	6.73	± 0.07	1.45	± 0.16	4.93	± 0.11	4.93	± 0.11
LDPE	7.85	± 0.72	6.54	± 0.3	1.53	± 0.12	5.21	± 0.36	5.77	± 0.23
Agar	8.60	± 0.12	6.75	± 0.06	1.57	± 0.03	5.13	± 0.35	5.96	± 0.15

Alternaria sp. presentó las mayores tasas de crecimiento para todos los tratamientos, mientras que *Cladosporium sp.* mostró un desarrollo mucho más lento para todos los tratamientos en comparación al resto de las cepas (Tabla 3). En la figura 17 se ilustran las diferentes tasas de crecimiento para cada tratamiento de cada cepa de hongo marino. Los resultados de los análisis estadísticos indicaron que las tasas de crecimiento de *Cladosporium sp.* son significativamente distintas a las tasas de las demás cepas. El resto de las especies no presentó diferencias significativas entre sí en sus crecimientos.

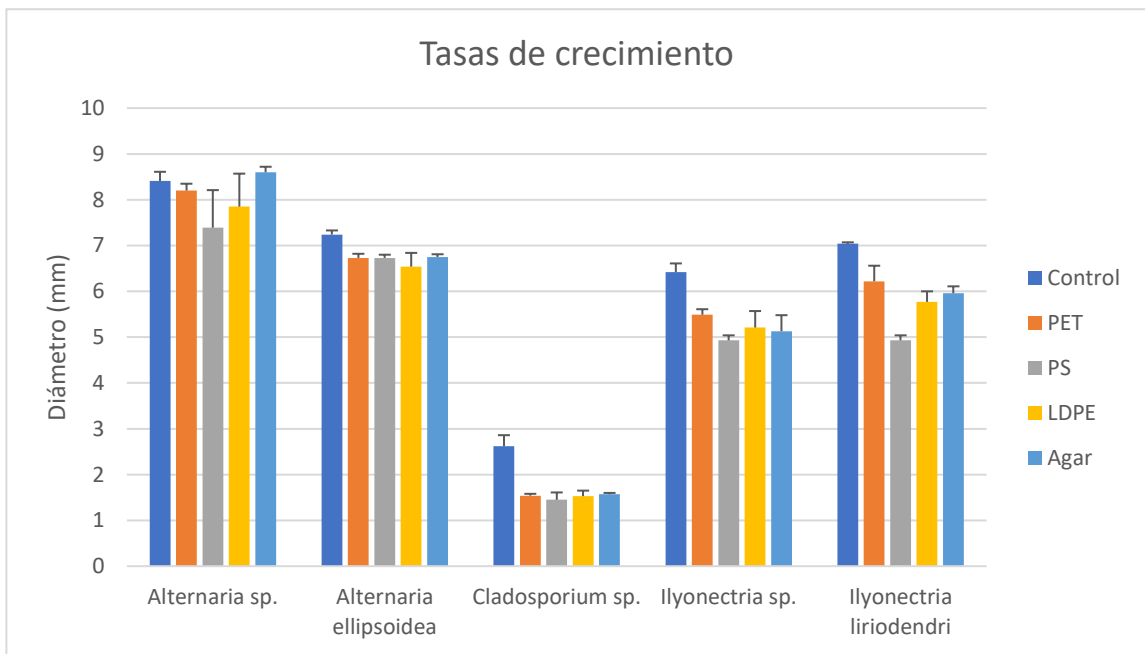


Figura 17: Tasas de crecimiento de cada cepa para cada tratamiento expresadas en $\text{mm} \cdot \text{día}^{-1}$.

Tabla 4: Resumen de resultados de distintos experimentos realizados con cepas de hongos marinos aislados para la evaluación de un potencial de degradación de plásticos.

Cepa ID	Sustrato de aislamiento	Taxonomía	Guayacol (+ o -)	Crecimiento control (mm · día ⁻¹)	Promedio de degradación de LDPE (%)	Promedio de degradación de PET (%)
ISO1	PET	<i>Alternaria sp.</i>	+	8.41 ± 0.2	2 ± 1.4	0 ± 0
ISO2	PET	<i>Alternaria ellipsoidea</i>	+	7.24 ± 0.1	1.7 ± 1.4	2.2 ± 3.8
ISO3	PET	<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	-	-	-	-
ISO4	PS	<i>Cladosporium sp.</i>	+	2.62 ± 0.2	5.2 ± 5.3	0.3 ± 0.2
ISO5	PS	<i>Ilyonectria sp.</i>	+	6.42 ± 0.2	1.2 ± 0.8	0 ± 0
ISO6	PS	<i>Ilyonectria liriodendri</i>	+	7.04 ± 0.03	1.1 ± 1.3	0 ± 0.1
ISO7	Níspero	<i>Diplodia mutila</i>	-	-	-	-
ISO8	Maqui	-	-	-	-	-
ISO9	LDPE	<i>Tricoderma novae zelandiae</i>	-	-	-	-

Los principales resultados obtenidos durante la serie de experimentos realizados para la determinación de potencial de degradación de plásticos de cepas de hongos marinos aislados desde el submareal de la zona costera de la localidad de Dichato son presentados en la Tabla 4. Solamente las cepas positivas al guayacol se estudiaron en profundidad, las que fueron encontradas en los fragmentos plásticos de tereftalato de polietileno y poliestireno. *Alternaria ellipsoidea* presentó mayor degradación para el PET (2.2 % ± 3.8) y *Cladosporium sp.* una mayor degradación para el LDPE (5.2 % ± 5.3). La especie con la mayor tasa de crecimiento fue *Alternaria sp.* (8.41 ± 0.2 mm·día⁻¹).

DISCUSIÓN

En este estudio se lograron aislar 9 cepas de hongos marinos a partir de fragmentos de plástico (Tereftalato de polietileno, polietileno de baja densidad y poliestireno) y de madera (níspero y maqui) como sustratos de asentamiento. Los resultados de ADN permitieron identificar 5 especies: *Alternaria ellipsoidea* (ISO2), *Diplodia mutila* (ISO7), *Ilyonectria liriodendri* (ISO6), *Gibellulopsis nigrescens* (ISO3) y *Trichoderma novae-zealandiae* (ISO9). Por otra parte, se logró identificar a nivel de género las cepas ISO1, ISO4 e ISO5 que corresponden a *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.* e *Ilyonectria sp.* respectivamente (Fig. 6). Algunas de las cepas no presentaron un gran porcentaje de similitud con secuencias conocidas (< 50%), lo que indicaría que sus identificaciones son solo aproximativas. Estudios relacionados con el análisis poblacional de cepas marinas fúngicas obtuvieron resultados similares donde no se lograron clasificar algunas secuencias (De Tender et. al., 2017; Kettner et al., 2017, Kettner et. al., 2019). Esto podría estar asociado a la carencia de secuencias de hongos marinos en las bases de datos utilizadas de referencia o especies no registradas. Al emplear el reactivo guayacol en los medios de cultivo para identificar cepas con un complejo enzimático capaces de degradar lignina y potencialmente polímeros de plástico, se determinó que *Alternaria sp.*, *Alternaria ellipsoidea*, *Cladosporium sp.*, *Ilyonectria sp.* e *Ilyonectria liriodendri* mostraron una reacción positiva, tiñendo el medio de color marrón rojizo. Esta reacción ocurre debido a que las enzimas lignícolas pueden oxidar compuestos aromáticos y el guayacol es un compuesto fenólico que posee un anillo aromático en su estructura (Wang, 2009).

Los ensayos en medios líquidos con plásticos como única fuente de carbono para evaluar degradabilidad mostraron la mayor actividad degradativa en cepas de *Alternaria ellipsoidea* con un 6,61% para el tereftalato de polietileno y *Cladosporium sp.* con un 11.17% para el polietileno (Tabla 2). Además, se encontró que el polietileno fue el plástico que mayor diferencia de peso obtuvo al estar expuesto a las diferentes cepas de hongos, siendo *Alternaria ellipsoidea* la especie que mostró una mayor degradación. Por otra parte, *Cladosporium sp.* no presentó diferencias significativas en el tipo de plástico que consume, sin embargo, fue la especie que obtuvo un mayor consumo de tereftalato de

polietileno (Fig. 14). Se sugiere, a partir de los resultados que no existe evidencia significativa de una relación directa entre alguna cepa y el tipo de plástico que consuman. Estudios similares con hongos, han informado la reducción del peso de sustratos plásticos como única fuente de carbono y la producción de biomasa bajo condiciones similares para los géneros encontrados en este trabajo. Actualmente, el género *Alternaria* incluye más de 250 especies y está distribuido de forma ubicua en diversos ambientes terrestres y marinos (Y. Chen et al., 2021; A.Q. Chen et al., 2021) y se ha reportado que *Alternaria alternata* ha logrado producir hasta un 73,4 % de biomasa a partir de polietileno en 4 semanas (Ameen et al., 2015). *Alternaria alternata* también logró reducir 95% del peso del polietileno tras un tratamiento de 120 días (Gao et al., 2022) y *Alternaria solani* causó una pérdida de peso del 65,8% en sustratos de poliéster-poliuretano (PS-PUR) en un periodo de 3 semanas (Ibrahim et al., 2009). En el caso del género *Cladosporium*, registros previos señalan que *Cladosporium cladosporiales* obtuvo el mejor rendimiento entre las 12 cepas que participaron en la degradación de polietileno y poliuretano con un crecimiento aproximado del halo de $4 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ (Brunner et al., 2018), *Cladosporium tenuissimum* causó 25,9 y 65,3% de pérdida de peso de espumas de PE-PU en distintos tratamientos, respectivamente (Álvarez-Barragán et al., 2016) y *Cladosporium halotolerans* degradó hasta un 80% de poliuretano (PU) en un periodo de 3 días a 28°C rompiendo los grupos carbonilo y los enlaces C-N-H (Zhang et al., 2022). Los resultados obtenidos en este trabajo, en términos de reducción de peso de sustratos plásticos por intermedio de actividad de hongos marinos, fueron significativamente más bajos comparado con los trabajos mencionados, lo que puede ser explicado en algunos casos por los tiempos de incubación más acotados que se utilizaron, por ejemplo, al comparar con el estudio realizado por Gao et al., 2022. Se sugiere que estas diferencias pueden deberse por un lado a las condiciones de experimentación o bien a las diferencias intrínsecas de la capacidad enzimática de las especies de hongos utilizadas.

Las biomásas producidas por *Alternaria alternata*, *Cladosporium sp.* e *Ilyonectria lirioidendri* producto de la degradación de PET y LDPE, fueron superiores a la reducción de peso de los plásticos y *Alternaria sp.* e *Ilyonectria sp.* produjeron biomasa a pesar de que los fragmentos de PET no presentaron variación en sus pesos post tratamiento. Los

resultados estadísticos indicaron que no hay una relación ni una proporcionalidad entre la reducción de peso de los plásticos y el exceso de biomasa producida. Estos resultados no nos permiten demostrar que la biomasa producida se originó a partir de la metabolización de los plásticos por parte de las cepas utilizadas, como si fue el caso en otros estudios (Ameen et al., 2015; Alshehrei, 2017; Paço et. al., 2017; Sangale et al., 2019). Se sugiere que algunos factores no tomados en consideración, pudieron haber afectado este experimento como, por ejemplo, la presencia y solubilización de aditivos en los medios de cultivo presentes en los polímeros (Zehgal et. al., 2021), o la presencia de nutrientes disueltos en el agua de mar utilizada. De ser así, se podría mejorar la metodología utilizando agua destilada y medio salino mineral (MSM) para recrear un medio marino libre de carbono y aditivos, pudiendo evaluar con mayor precisión la producción de micelio por degradación de plástico (Brunner, et al., 2018; Khruengsai, et al., 2021). El agar también representa una fuente de carbono (Zehgal et al., 2021), en consecuencia, el injerto de agar que se introdujo en los matraces pudo influir en la producción de biomasa, ya que los hongos marinos también pueden producir enzimas que les permiten degradar este polímero, además del alginato, los carragenanos y los ulvanos (polímeros comunes en el ambiente marino) (Wang, et al., 2017; Balavanova et al., 2018). Las hifas de los hongos pueden acceder al agar para su desarrollo sin intervenir directamente en la degradación de plásticos (Zehgal, et al., 2021). Por otra parte, no se determinó ninguna correlación entre la degradación de plásticos en medios líquidos y las tasas de crecimiento. De hecho, siendo *Cladosporium sp.* la especie con la tasa de crecimiento más baja, fue donde se encontró una mayor reducción de peso de polietileno. Este resultado puede estar relacionado a las enzimas específicas producidas por la cepa aislada, teniendo un mayor impacto en la degradación del plástico al secretar mayores concentraciones de lacasas y peroxidasas (Zehgal et al., 2021). Consistentemente, se ha registrado que el género *Cladosporium* puede producir enzimas como pectinasas, agarasas, carragenasas, xilanasas, lacasas, peroxidasas, taninasas, invertasas, celulasas y reductasas dependiendo de la especie (Mohamed et al., 2021). Otro estudio realizado por Bonugli-Santos et al. (2010), determinó que la especie *Cladosporium cladosporioides* aislada desde nidarios marinos, produjo altas concentraciones de MnP y lacasa bajo salinidades de 12,5% y 23% p/v, respectivamente. En contraste, la cepa *Alternaria sp.*, que presentó la tasa de

crecimiento más elevada ($8,41 \text{ mm} \cdot \text{día}^{-1}$), no tuvo un desempeño relevante ni significativo en la degradación de sustratos plásticos. Para el resto de las cepas, no se encontraron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento al compararlas entre tratamientos, indicando que el crecimiento de los hongos marinos en medios sólidos bajo condiciones de cultivo no se vio afectado al remplazar la glucosa por fuentes de carbono sintéticas (PET, LDPE, PS) ni tampoco al sustraerla, siendo el agar el único polímero presente en el medio.

De manera similar al género *Cladosporium*, Ameen et al. (2015) evaluó la capacidad degradadora de un consorcio de hongos marinos al estar expuestos a sustratos de LDPE como única fuente de carbono durante 4 semanas, y demostró que *Alternaria alternata* fue la especie que produjo las mayores concentraciones de lacasas y manganeso peroxidasa. En este estudio, la especie *Alternaria ellipsoidea* presentó mayor degradabilidad para el tereftalato de polietileno, lo que sugiere que las enzimas también estarían involucradas en la degradación de este plástico. No obstante, estudios afirman que las principales enzimas involucradas en la degradación del tereftalato de polietileno por intermedio de hongos marinos, son las cutinasas, que muestran un sitio activo expuesto y flexible accesible a sustratos poliméricos, lo que permite su actividad contra poliésteres sintéticos (Zimmermann 2020). Una cutinasa de *Glomerella cingulata*, un hongo fitopatógeno, hidrolizó compuestos de PET (Nyon et al., 2009). El hongo termófilo *Thermomyces insolens* produjo una cutinasa capaz de hidrolizar películas de PET reduciendo su peso de casi el 100% tras 96h de reacción con la enzima y *Fusarium solani* redujo el 5% del peso de sustratos de PET a través de cutinasas igualmente (Ronkvist et al., 2009). También se ha reportado que especies de *Penicillium* participan en la degradación del PET (Sepperumal et al., 2013) como *Penicillium citrinum* que produjo una cutinasa que hidrolizaba parcialmente las fibras de PET (Liebminger et al., 2007). La degradación de este plástico en este estudio por parte de *Alternaria ellipsoidea*, podría explicarse por la posible síntesis de esta enzima.

Al no tener la certeza de cuáles fueron las enzimas específicas que intervinieron en la degradación del LDPE y el PET por parte de *Cladosporium sp.* y *Alternaria ellipsoidea* respectivamente, se podrían emplear a futuro métodos que incluyan por ejemplo,

espectrofotometría para identificar las diferentes enzimas mencionadas, con el fin de determinar con mayor exactitud cuales producen estas especies y para cual tipo de plástico, obteniendo así, una aproximación más asertiva de sus respectivas capacidades degradativas. La actividad de lignina peroxidasa (LiP) puede ser determinada mediante la oxidación de alcohol veratrílico; la manganeso peroxidasa (MnP) utilizando fenol y la lacasa mediante la oxidación del ácido 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) (Atalla et al., 2010; Bonugli-Santos et al., 2010; Ameen et al., 2015; Khruengsai et al., 2021). Otro método que podría ayudar a corroborar la significancia de estos procesos es la utilización de la microscopía electrónica de barrido (SEM), ya que permite examinar y evaluar la colonización de los sustratos plásticos por microorganismos además de visualizar simultáneamente grietas, picaduras y deformaciones en las superficies, lo que puede indicar si el polímero está degradado (Zettler et al., 2013; Mukherjee et al., 2014; Zehgal et al., 2021; Vaksmaa et al., 2021). Adicionalmente, diversos estudios han utilizado la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), permitiendo detectar semi cuantitativamente cambios en la configuración original de los polímeros como, por ejemplo, la introducción de grupos carbonilo durante la oxidación, lo que se corresponde con a su degradación (Osman et al., 2018; Xu et al., 2019; Almond et al., 2020).

Otros aspectos a tomar en cuenta, que podrían mejorar considerablemente los resultados de los experimentos en medios líquidos, son: el tratamiento previo de los fragmentos plásticos y la adición de alcohol veratrílico y H_2O_2 a los medios de cultivo. Estudios recientes sugieren que la velocidad de degradación biótica del polietileno de baja densidad (LDPE) puede mejorar mediante su oxidación previa. Al exponer el plástico a luz ultravioleta o a altas temperaturas, se reducen en compuestos de baja masa molecular, generando partes amorfas o fracciones oligoméricas que los hongos prefieren para degradar (Yamada-Onodera et al., 2001; Bonhomme et al., 2003; Ojeda et al., 2009; Da Luz et al., 2015; Ojha et al., 2017). Por otro lado, el alcohol veratrílico aumenta la actividad de la lignina peroxidasa y la tasa de mineralización de la lignina, considerándose un mediador redox (Faison et al., 1985; Schoemaker et al., 1990). Además, la actividad catalítica de la enzima lignina peroxidasa (LiP) depende del peróxido de hidrógeno

(H₂O₂), mientras que la enzima manganeso peroxidasa (MnP) requiere del H₂O₂ para actuar como precursor en el inicio del ciclo de la peroxidasa (Moreira et al., 2001; Wong, 2009, Xu et al., 2015).

La mayoría de las investigaciones sobre hongos marinos relacionadas con la degradación de plásticos se han basado principalmente en el polietileno, ya que es uno de los polímeros sintéticos más producidos y comercializados, lo que representa una importante contribución al problema mundial actual sobre contaminación de residuos plásticos (Zimmermann 2020). Así mismo, estudios han descubierto mayor degradabilidad en el polietileno que en otros plásticos. Aparentemente existe una afinidad entre las enzimas de hongos lignícolas y las estructuras químicas pertenecientes al polietileno y sus derivados (Wong 2009; Gómez-Méndez et al., 2018; Zimmermann 2020). Se han descrito varias especies de hongos marinos con actividad enzimática contra este plástico. Por ejemplo, cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* aisladas del Mar Rojo redujeron el peso de las películas y el polvo de LDPE en más de un 40% (Alshehrei, 2017). También se han identificado especies de *Candida*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Emericella*, *Eurotium*, *Exophiala*, *Geosmithia*, *Paecilomyces*, *Pichia*, *Zalerion*, *Phialophora*, *Cladosporium* y *Aspergillus* que han demostrado tener impactos significativos en la degradación del polietileno (Pramila, 2011; Paço et al., 2017; Ameen et al., 2015; Devi et al., 2015; Sindujaa et al., 2011).

Cabe mencionar que las investigaciones sobre hongos marinos, al igual que la degradación de plásticos a través de microorganismos, son temas innovadores en la actualidad y aún falta mucho por descubrir. Sin embargo, los antecedentes indican que los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*, tienen un gran potencial en la degradación de plásticos y proporcionan buenos candidatos para estudiarlos en profundidad y su uso en procesos de biorremediación. Hasta ahora, los estudios en el campo de la biorremediación por hongos se han centrado principalmente en entornos terrestres (Reyes-César et al., 2014; Marco-Urrea et al., 2015; Godoy et al., 2016). Los hongos afiliados a los géneros *Cladosporium* y *Aspergillus* se encuentran entre los que se sabe que participan en la degradación de hidrocarburos alifáticos, mientras que se ha demostrado que los representantes de *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Mucor* participan en la

degradación de hidrocarburos aromáticos más recalcitrantes (Amend et al., 2019), transformándolos en productos intermedios de menor toxicidad medioambiental y aumentando la descomposición por otros microorganismos (Steliga, 2012). No obstante, se han registrado algunos hongos marinos involucrados en la degradación de estos compuestos como, por ejemplo, Maamar et al. (2020) que logró aislar tres especies marinas de *Penicillium*: *P. cyclopium*, *P. chrysogenum* y *P. polonicum* capaces de degradar petróleo. En otro estudio, Velez et al. (2020) lograron aislar 25 hongos desde sedimentos marinos en regiones de perforación petrolífera, donde las cepas pertenecientes a los géneros *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Phialocephala* y *Cladosporium* mostraron capacidad para degradar hexadecano y 1-hexadeceno como fuentes únicas de carbono. Elshafie et al. (2007) por su parte, demostraron que *P. chrysogenum* era capaz de degradar n-alcanos y petróleo crudo de bolas de alquitrán recogidas en las playas de Omán. En otro aspecto, Bonugli-Santos et al. (2010) sugiere que la síntesis de LiP y lacasas de *C. Cladosporioides* posee un uso potencial para aplicaciones industriales y para la biorremediación de zonas altamente contaminadas por sales. Las principales enzimas implicadas en estos procesos de biorremediación son las lacasas y peroxidasas (LiP & MnP) (Field et al., 1996; D'Souza et al., 2006), las cuales también se utilizan en aplicaciones industriales para degradar contaminantes orgánicos recalcitrantes, HAP, tintes industriales y clorofenoles (Qin et al., 2014). En consecuencia, las cepas de hongos marinos lignícolas representan un gran potencial de biorremediación ligado a la contaminación por polímeros plásticos en los océanos. En particular, la cepa del género *Cladosporium*, encontrada en este estudio puede tener varias cualidades beneficiosas que aún necesitan ser investigadas.

CONCLUSIONES

Se logró aislar 9 cepas de hongos marinos a partir de sustratos plásticos (principalmente tereftalato de polietileno y poliestireno), de las cuales 5 dieron positivo al reactivo guayacol, indicando la presencia de enzimas lignícolas (lacasas, LiP y MnP). Si bien los resultados obtenidos indicaron una leve degradación de los plásticos y tasas de crecimiento relativamente normales (a excepción de *Cladosporium sp.*), representan una evidencia de que los géneros *Alternaria* y *Cladosporium* poseen potenciales enzimáticos capaces de degradar plásticos. Se piensa que existen más cepas con estas propiedades en las aguas marinas de Chile, y que son objeto de interés para ser investigadas en profundidad, ya que la capacidad de los hongos marinos para regular su metabolismo y adaptarse a diferentes entornos y sustratos, indica que el número de hongos marinos con potencial para degradar plásticos podría estar subestimado (Zeghal, et al., 2021).

Si buscamos obtener un desarrollo óptimo de los hongos marinos, para que puedan expresar sus cualidades degradativas en su totalidad, es necesario tomar en cuenta factores abióticos como el pH, la temperatura, la presión y la salinidad, como lo encontrado para cepas de *Peniophora sp.*, donde estudios afirman que tenía la capacidad de regular la expresión de sus enzimas en función de la salinidad (Otero et al., 2017). Adicionalmente, para potenciar la degradación se podría tomar en cuenta el tratamiento previo a los sustratos plásticos implicados en las series de análisis a través de luz UV, para facilitar posteriormente la acción de las enzimas de las cepas de hongos marinos.

Finalmente, para corroborar la degradación de plásticos por medio de actividad enzimática proveniente de hongos marinos, la complementación de metodologías como SEM, FTIR y actividad enzimática por espectrofotometría, ayudaría a obtener resultados más robustos y permitiría aproximarse a eventuales tratamientos de biorremediación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Amend, A., Burgaud, G., Cunliffe, M., Edgcomb, V. P., Ettinger, C. L., Gutiérrez, M. H., ... & Gladfelter, A. S. (2019). Fungi in the marine environment: Open questions and unsolved problems. *MBio*, 10(2), e01189-18.

Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., & Pillai, S. (2021). Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. *Science of the Total Environment*, 759, 143536.

Albertsson AC (1980). The shape of the biodegradable curve for low and high density polyethylenes in prolonged series of experiments. *Europ. Polym. J.*, 16: 623-630.

Almond, J., Sugumaar, P., Wenzel, M. N., Hill, G., and Wallis, C. (2020). Determination of the carbonyl index of polyethylene and polypropylene using specified area under band methodology with ATR-FTIR spectroscopy. *e-Polymers* 20, 369–381.

Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of low density polyethylene by fungi isolated from Red sea water. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 1703-9.

Álvarez-Barragán, J., Domínguez-Malfavón, L., Vargas-Suárez, M., González-Hernández, R., Aguilar-Osorio, G., and Loza-Tavera, H. (2016). Biodegradative Activities of Selected Environmental Fungi on a Polyester Polyurethane Varnish and Polyether Polyurethane Foams. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5225–5235.

Arora, D. S., & Gill, P. K. (2001). Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*, 77(1), 89-91.

Atalla, M. M., Zeinab, H. K., Eman, R. H., Amani, A. Y., & Abeer, A. A. E. A. (2010). Screening of some marine-derived fungal isolates for lignin degrading enzymes (LDEs) production. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(4), 591-9.

- Balabanova, L., Slepchenko, L., Son, O., & Tekutyeva, L. (2018). Biotechnology potential of marine fungi degrading plant and algae polymeric substrates. *Frontiers in microbiology*, 9, 1527.
- Barnes DKA, Galgani F, Thompson RC, Barlaz M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 364:1985–98.
- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A.-M., Lemaire, J., Sancelme, M., and Scott, G. (2003). Environmental biodegradation of polyethylene. *Poly. Degrad. Stab.* 81, 441–452.
- Bonugli-Santos, R. C., Durrant, L. R., Da Silva, M., & Sette, L. D. (2010). Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(1), 32-37.
- 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), e0202047.
- Buswell, J. A. (2001). Fungal biodegradation of chlorinated monoaromatics and BTEX compounds. In *British Mycological Society Symposium Series* (Vol. 23, pp. 113-135).
- Carrillo, L. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Universidad Nacional de Salta, Argentina, 118, 20.
- Cathrine, S. J., & Raghukumar, C. (2009). Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa, India. *Mycological research*, 113(1), 100-109.
- Cerniglia, C. E., & Sutherland, J. B. (2001). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. In *British Mycological Society Symposium Series* (Vol. 23, pp. 136-187).
- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A. Y., & Samuels, G. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Studies in mycology*, 68(1), 57-78.

- Chen, A., Mao, X., Sun, Q., Wei, Z., Li, J., You, Y., ... & Li, Y. (2021). *Alternaria* mycotoxins: An overview of toxicity, metabolism, and analysis in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(28), 7817-7830.
- Chen, Y., Awasthi, A. K., Wei, F., Tan, Q., & Li, J. (2021). Single-use plastics: Production, usage, disposal, and adverse impacts. *Science of the total environment*, 752, 141772.
- Da Luz, J. M. R., da Silva, M. D. C. S., dos Santos, L. F., & Kasuya, M. C. M. (2019). Plastics polymers degradation by fungi. In *Microorganisms* (pp. 261-270). Vienna, Austria: IntechOpen.
- Da Luz, J. M. R., Paes, S. A., Ribeiro, K. V. G., Mendes, I. R., & Kasuya, M. C. M. (2015). Degradation of green polyethylene by *Pleurotus ostreatus*. *PLoS One*, 10(6), e0126047.
- De Tender, C. A., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., & Dawyndt, P. (2015). Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea. *Environmental science & technology*, 49(16), 9629-9638.
- De Tender, C., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Vangeyte, J., Catrijsse, A., Dawyndt P., & Ruttink, T. (2017). Temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North Sea. *Environmental science & technology*, 51(13), 7350-7360.
- Deepika, S., & Jaya, M. R. (2015). Biodegradation of low density polyethylene by microorganisms from garbage soil. *J Exp Biol Agric Sci*, 3, 1-5.
- Devi, R. S., Kannan, V. R., Nivas, D., Kannan, K., Chandru, S., & Antony, A. R. (2015). Biodegradation of HDPE by *Aspergillus* spp. from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Marine pollution bulletin*, 96(1-2), 32-40.
- D'Souza, D. T., Tiwari, R., Sah, A. K., & Raghukumar, C. (2006). Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and microbial technology*, 38(3-4), 504-511.

Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., ... & Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PloS one*, 9(12), e111913.

Elshafie, A., AlKindi, A. Y., Al-Busaidi, S., Bakheit, C., & Albahry, S. N. (2007). Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marine Pollution Bulletin*, 54(11), 1692-1696.

Ezziyyani, M.; Requena, M.E.; Egea-Gilabert, C.; Candela, M.E. (2007). Biological control of phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Phytopathology*. 155, 342–349.

Faison, B. D., & Kirk, T. K. (1985). Factors involved in the regulation of ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 299–304.

Field, J. A., Baten, H., Boelsma, F., & Rulkens, W. H. (1996). Biological elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in solvent extracts of polluted soil by the white rot fungus, *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Environmental technology*, 17(3), 317-323.

Gao, R., Liu, R., & Sun, C. (2022). A marine fungus *Alternaria alternata* FB1 efficiently degrades polyethylene. *Journal of Hazardous Materials*, 431, 128617.

Galgani F, Hanke G, Werner S, De Vrees L. (2013). Marine litter within the European Marine Strategy Framework Directive. *ICES J. Mar. Sci.* 70:1055–64.

Ganesh, K.A., Anjana, K., Hinduja, M., et al., (2020). Review on plastic wastes in marine environment – biodegradation and biotechnological solutions. *Mar. Pollut. Bull.* 150, 110733.

Georgiopoulou, I., Pappa, G. D., Vouyiouka, S. N., & Magoulas, K. (2021). Recycling of post-consumer multilayer Tetra Pak® packaging with the Selective Dissolution-Precipitation process. *Resources, Conservation and Recycling*, 165, 105268.

Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances*, 3(7), e1700782.

- Gladfelter, A. S., James, T. Y., & Amend, A. S. (2019). Marine fungi. *Current Biology*, 29(6), R191-R195.
- Godoy, P., Reina, R., Calderón, A., Wittich, R. M., García-Romera, I., & Aranda, E. (2016). Exploring the potential of fungi isolated from PAH-polluted soil as a source of xenobiotics-degrading fungi. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 20985-20996.
- Gómez-Méndez, L. D., Moreno-Bayona, D. A., Poutou-Pinales, R. A., Salcedo-Reyes, J. C., Pedroza-Rodríguez, A. M., Vargas, A., & Bogoya, J. M. (2018). Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*. *PLoS One*, 13(9), e0203786.
- Gross, R. A., & Kalra, B. (2002). Biodegradable polymers for the environment. *Science*, 297(5582), 803-807.
- Hakkarainen, M. (2002). Aliphatic polyesters: abiotic and biotic degradation and degradation products. *Degradable aliphatic polyesters*, 113-138.
- Huy, N. D., Tien, N. T. T., Huyen, L. T., Quang, H. T., Tung, T. Q., Luong, N. N., & Park, S. M. (2017). Screening and production of manganese peroxidase from *Fusarium* sp. on residue materials. *Mycobiology*, 45(1), 52-56.
- Ibrahim, I. N. (2009). Polyester-polyurethane Biodegradation by *Alternaria Solani*, Isolated from Northern Jordan Ibrahim N. Ibrahim, Anwar Maraqa, Khalid M. Hameed, Ismail M. Saadoun, Hamzah M Maswadeh and Toshiaki Nakajima-Kambe 2 3. *Adv Environ Biol*, 3, 162-170.
- Johnson, T. W., & Sparrow, F. K. (1961). Fungi in oceans and estuaries. *Fungi in oceans and estuaries*.
- Kettner, M. T., Oberbeckmann, S., Labrenz, M., and Grossart, H.-P. (2019). The Eukaryotic Life on Microplastics in Brackish Ecosystems. *Front. Microbiol.* 10:538.
- Kettner, M. T., Rojas-Jimenez, K., Oberbeckmann, S., Labrenz, M., & Grossart, H. P. (2017). Microplastics alter composition of fungal communities in aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, 19(11), 4447-4459.

- Khruengsai, S., Sripahco, T., & Pripdeevech, P. (2021). Low-density polyethylene film biodegradation potential by fungal species from Thailand. *Journal of Fungi*, 7(8), 594.
- Koutny, M., Sancelme, M., Dabin, C., Pichon, N., Delort, A. M., & Lemaire, J. (2006). Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives. *Polymer degradation and stability*, 91(7), 1495-1503.
- Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., & Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS letters*, 169(2), 247-250.
- Lacerda, A. L. D. F., Proietti, M. C., Secchi, E. R., & Taylor, J. D. (2020). Diverse groups of fungi are associated with plastics in the surface waters of the Western South Atlantic and the Antarctic Peninsula. *Molecular Ecology*, 29(10), 1903-1918.
- Law KL. 2017. Plastics in the marine environment. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 9:205–29.
- Liebminger, S., Eberl, A., Sousa, F., Heumann, S., Fischer-Colbrie, G., Cavaco-Paulo, A., & Guebitz, G. M. (2007). Hydrolysis of PET and bis-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new polyesterase from *Penicillium citrinum*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25(2-4), 171-177.
- Liu, L., Xu, M., Ye, Y., & Zhang, B. (2022). On the degradation of (micro) plastics: Degradation methods, influencing factors, environmental impacts. *Science of The Total Environment*, 806, 151312.
- Maeda, K., Spor, A., Edel-Hermann, V., Heraud, C., Breuil, M. C., Bizouard, F., ... & Philippot, L. (2015). N₂O production, a widespread trait in fungi. *Scientific Reports*, 5(1), 9697.
- Marco-Urrea, E., García-Romera, I., & Aranda, E. (2015). Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *New biotechnology*, 32(6), 620-628.

- Mohamed, G. A., & Ibrahim, S. R. (2021). Untapped potential of marine-associated *Cladosporium* species: An overview on secondary metabolites, biotechnological relevance, and biological activities. *Marine Drugs*, 19(11), 645.
- Moreira, M. T., Palma, C., Mielgo, I., Feijoo, G., & Lema, J. M. (2001). In vitro degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase. *Biotechnology and bioengineering*, 75(3), 362-368.
- Mukherjee, S., & Kundu, P. P. (2014). Alkaline fungal degradation of oxidized polyethylene in black liquor: studies on the effect of lignin peroxidases and manganese peroxidases. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(17).
- Muñoz Duarte, L. D. (2012). Evaluación de enzimas degradadoras de lignina producidas por aislamientos fúngicos de cultivos de arroz. Trabajo de grado para optar al título de Microbióloga Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, 50 pp.
- Nyon, M. P., Rice, D. W., Berrisford, J. M., Hounslow, A. M., Moir, A. J., Huang, H., ... & Craven, C. J. (2009). Catalysis by *Glomerella cingulata* cutinase requires conformational cycling between the active and inactive states of its catalytic triad. *Journal of molecular biology*, 385(1), 226-235.
- Oberbeckmann, S., & Labrenz, M. (2020). Marine microbial assemblages on microplastics: diversity, adaptation, and role in degradation. *Annual review of marine science*, 12, 209-232.
- Ojeda TFM, Dalmolin E, Forte MMC, Jacques RJS, Bento FM, Camargo FAO. (2009). Abiotic and biotic degradation of oxo-biodegradable polyethylenes. *Polymer Degradation and Stability*. 94:965-970.
- Ojha N, Pradhan N, Singh S, Barla A, Shrivastava A, Khatua P, et al. (2017). Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Nature Scientific Reports*. 7:39515.

- Osman, M., Satti, S. M., Luqman, A., Hasan, F., Shah, Z., & Shah, A. A. (2018). Degradation of polyester polyurethane by *Aspergillus* sp. strain S45 isolated from soil. *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 301-310.
- Otero, I. V. R., Ferro, M., Bacci, M., Ferreira, H., & Sette, L. D. (2017). De novo transcriptome assembly: a new laccase multigene family from the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. *AMB Express*, 7(1), 1-11.
- Pappa, G., Boukouvalas, C., Giannaris, C., Ntaras, N., Zografos, V., Magoulas, K., ... & Tassios, D. (2001). The selective dissolution/precipitation technique for polymer recycling: a pilot unit application. *Resources, conservation and recycling*, 34(1), 33-44.
- Paço, A., Duarte, K., da Costa, J. P., Santos, P. S., Pereira, R., Pereira, M. E., & Rocha-Santos, T. A. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Science of the Total Environment*, 586, 10-15.
- PlasticsEurope. 2023. *Plastics - the facts 2022*. PlasticsEurope. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>.
- Pinto, A. P., Serrano, C., Pires, T., Mestrinho, E., Dias, L., Teixeira, D. M., & Caldeira, A. T. (2012). Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Science of the Total Environment*, 435, 402-410.
- Pramila, R., & Ramesh, K. V. (2011). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water a SEM analysis. *African Journal of Microbiology Research*, 5(28), 5013-5018.
- Qin, H., Wang, H., Strong, P. J., Li, Y., Xu, Q., & Wu, Q. (2014). Rapid soil fungal community response to intensive management in a bamboo forest developed from rice paddies. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 177-184.
- Raghavendra, V. B., Uzma, M., Govindappa, M., Vasantha, R. A., & Lokesh, S. (2016). Screening and identification of polyurethane (PU) and low density polyethylene (LDPE) degrading soil fungi isolated from municipal solid waste. *Int J Curr Res*, 8(7), 34753-34761.

- Rani, A., & Singh, P. (2017). Screening of polyethylene degrading fungi from polyethylene dump site. *Int. J. Chem. Tech. Res*, 10(3), 699-704.
- Rao, S., (2012). Microbial ecology of hot and cold desert soils. (Biological Sciences. Ph.D.). University of Hong Kong Pokfulam, Hong Kong, p. 167.
- Reyes-César, A., Absalon, A. E., Fernández, F. J., González, J. M., & Cortés-Espinosa, D. V. (2014). Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 999-1009.
- Rodriguez-Seijo, A., Lourenço, J., Rocha-Santos, T. A. P., Da Costa, J., Duarte, A. C., Vala, H., & Pereira, R. (2017). Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. *Environmental Pollution*, 220, 495-503.
- Ronkvist, Å. M., Xie, W., Lu, W., & Gross, R. A. (2009). Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly (ethylene terephthalate). *Macromolecules*, 42(14), 5128-5138.
- Ruiz-Dueñas, F. J., & Martínez, Á. T. (2009). Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial biotechnology*, 2(2), 164-177.
- Sangale, M. K., Shahnawaz, M., & Ade, A. B. (2019). Potential of fungi isolated from the dumping sites mangrove rhizosphere soil to degrade polythene. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.
- Sarkhel, R., Sengupta, S., Das, P., & Bhowal, A. (2020). Comparative biodegradation study of polymer from plastic bottle waste using novel isolated bacteria and fungi from marine source. *Journal of Polymer Research*, 27, 1-8.
- Schoemaker, H. E., & Leisola, M. S. A. (1990). Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, 13, 101–109.
- Sekhar, V. C., Nampoothiri, K. M., Mohan, A. J., Nair, N. R., Bhaskar, T., & Pandey, A. (2016). Microbial degradation of high impact polystyrene (HIPS), an e-plastic with

decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide. *Journal of hazardous materials*, 318, 347-354.

Sepperumal, U., Markandan, M., & Palraja, I. (2013). Micromorphological and chemical changes during biodegradation of polyethylene terephthalate (PET) by *Penicillium* sp. *J Microbiol Biotechnol Res*, 3(4), 47-53.

Sindujaa, P., Padmapriya, M., Pramila, R., & Ramesh, K. V. (2011). Bio-degradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water. *Research Journal of Biological Sciences*, 6(4), 141-145.

Singh, L., & Wahid, Z. A. (2015). Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: a review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 70-80.

Singleton, I. (2001). "Fungal remediation of soils contaminated with persistent organic pollutants," in *Fungi in Bioremediation British Mycological Society Symposia*, ed. G. M. Gadd (Cambridge, MA: Cambridge University Press), 79–96.

Sowmya, H. V., Ramalingappa, B., Nayanashree, G., Thippeswamy, B., & Krishnappa, M. (2015). Polyethylene degradation by fungal consortium. *International Journal of Environmental Research*, 9(3), 823-830.

Steliga, T. (2012). Role of Fungi in Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Drill Waste. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(2).

Stief, P., Fuchs-Ocklenburg, S., Kamp, A., Manohar, C. S., Houbraken, J., Boekhout, T., ... & Stoeck, T. (2014). Dissimilatory nitrate reduction by *Aspergillus terreus* isolated from the seasonal oxygen minimum zone in the Arabian Sea. *BMC microbiology*, 14, 1-10.

Sun, J., Dutta, T., Parthasarathi, R., Kim, K. H., Tolic, N., Chu, R. K., ... & Singh, S. (2016). Rapid room temperature solubilization and depolymerization of polymeric lignin at high loadings. *Green Chemistry*, 18(22), 6012-6020.

Tamnou, E. B. M., Arfao, A. T., Nougang, M. E., Metsopkeng, C. S., Ewoti, O. V. N., MOUNGANG, L. M., ... & NOLA, M. (2021). Biodegradation of polyethylene by the bacterium

Pseudomonas aeruginosa in acidic aquatic microcosm and effect of the environmental temperature. *Environmental Challenges*, 3, 100056.

Taniguchi, I., Yoshida, S., Hiraga, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2019). Biodegradation of PET: current status and application aspects. *Acs Catalysis*, 9(5), 4089-4105.

Tien, M., & Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(8), 2280-2284.

Vaksmas, A., Hernando-Morales, V., Zeghal, E., and Niemann, H. (2021). "Microbial Degradation of Marine Plastics: Current State and Future Prospects," in *Biotechnology for Sustainable Environment*, eds S. J. Joshi, A. Deshmukh, and H. Sarma (Singapore: Springer), 111–154.

Van Sebille, E., Wilcox, C., Lebreton, L., Maximenko, N., Hardesty, B. D., Van Franeker, J. A., ... & Law, K. L. (2015). A global inventory of small floating plastic debris. *Environmental Research Letters*, 10(12), 124006.

Velez, P., Gasca-Pineda, J., & Riquelme, M. (2020). Cultivable fungi from deep-sea oil reserves in the Gulf of Mexico: Genetic signatures in response to hydrocarbons. *Marine environmental research*, 153, 104816.

Wang, C., Kang, J., Liang, P., Zhang, H., Sun, H., Tadó, M. O., & Wang, S. (2017). Ferric carbide nanocrystals encapsulated in nitrogen-doped carbon nanotubes as an outstanding environmental catalyst. *Environmental Science: Nano*, 4(1), 170-179.

Wang, C., Zhao, L., Lim, M. K., Chen, W. Q., & Sutherland, J. W. (2020). Structure of the global plastic waste trade network and the impact of China's import Ban. *Resources, Conservation and Recycling*, 153, 104591.

- Wang, J., Liu, X., Li, Y., Powell, T., Wang, X., Wang, G., & Zhang, P. (2019). Microplastics as contaminants in the soil environment: A mini-review. *Science of the total environment*, 691, 848-857.
- Wang, L., Nabi, G., Yin, L., Wang, Y., Li, S., Hao, Z., & Li, D. (2021). Birds and plastic pollution: recent advances. *Avian Research*, 12, 1-9.
- Wariishi, H., Valli, K., & Gold, M. H. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23688-23695.
- Wayman, C., & Niemann, H. (2021). The fate of plastic in the ocean environment—a minireview. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 23(2), 198-212.
- Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?. *Microbial biotechnology*, 10(6), 1308-1322.
- Wong, D. W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, 157, 174-209.
- Wong, S. L., Ngadi, N., & Abdullah, T. A. T. (2015). Study on dissolution of low density polyethylene (LDPE). In *Applied Mechanics and Materials* (Vol. 695, pp. 170-173). Trans Tech Publications Ltd.
- Xu, C., Singh, D., Dorgan, K. M., Zhang, X., & Chen, S. (2015). Screening of ligninolytic fungi for biological pretreatment of lignocellulosic biomass. *Canadian Journal of microbiology*, 61(10), 745-752.
- Xu, J.-L., Thomas, K. V., Luo, Z., and Gowen, A. A. (2019). FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: State of the art, challenges and prospects. *TrAC Trends Analy. Chem.* 119:115629.
- Yamada-Onodera K, Mukumoto H, Katsuyaya Y, Saiganji A, Tani Y. (2001). Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer Degradation and Stability.* 72:323-327.

Zeghal, E., Vaksmaa, A., Vielfaure, H., Boekhout, T., & Niemann, H. (2021). The potential role of marine fungi in plastic degradation—A review. *Frontiers in Marine Science*, 8, 738877.

Zettler, E. R., Mincer, T. J., and Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. *Environ. Sci. Technol.* 47, 7137–7146.

Zhang, C., Chen, X., Wang, J., & Tan, L. (2017). Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastic and algae. *Environmental pollution*, 220, 1282-1288.

Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Li, L., Lin, H., et al. (2020). Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Sci. Total Env.* 704, 1–8.

Zhang, K., Hu, J., Yang, S., Xu, W., Wang, Z., Zhuang, P., ... & Luo, Z. (2022). Biodegradation of polyester polyurethane by the marine fungus *Cladosporium halotolerans* 6UPA1. *Journal of Hazardous Materials*, 437, 129406.

Zhu, C., Li, D., Sun, Y., Zheng, X., Peng, X., Zheng, K., ... & Mai, B. (2019). Plastic debris in marine birds from an island located in the South China Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110566.

Zimmermann, W. (2020). Degradation of plastics by fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(14), 6153-6164.