

FACULTAD DE INGENIERÍA

Carrera de Ingeniería Ambiental

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ADAPTATIVA AL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD (LDPE) DE HONGOS DE SUELO AISLADOS DE RESIDUOS PLÁSTICOS DE LA PLAYA MARQUEZ EN VENTANILLA - PERÚ”

Tesis para optar al título profesional de:

Ingeniero Ambiental

Autor:

Moises Villodas Bastidas

Asesor:

Mg. Marco Alfredo Sánchez Peña

<https://orcid.org/0000-0001-8773-6632>

Lima - Perú

2024

JURADO EVALUADOR

Jurado 1 Presidente(a)	Carlos Alberto Alva Huapaya
	Nombre y Apellidos

Jurado 2	Margeo Javier Chumán López
	Nombre y Apellidos

Jurado 3	Haniel Torres Joauqin
	Nombre y Apellidos

Informe de Similitud

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ADAPTATIVA AL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD (LDPE) DE HONGOS DE SUELO AISLADOS DE RESIDUOS PLÁSTICOS DE LA PLAYA MARQUEZ EN VENTANILLA - PERÚ

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%	18%	3%	6%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	revistas.unap.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	docplayer.es Fuente de Internet	1%
5	repositorio.upt.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	es.scribd.com Fuente de Internet	1%

Dedicatoria

En primer lugar, a Dios, quien me guía cada momento e instante de mi vida y me da fortaleza de seguir adelante. A mi hermosa madre que siempre está conmigo, en cada paso que doy como persona y profesional y a todos los maestros que incentivaron, y potenciaron mi curiosidad y amor a la ciencia, así como también a aquellos que me guiaron y ayudaron para adquirir mis conocimientos y habilidades científicas.

Agradecimiento

Agradezco a mis tíos Falcon Bastidas Flores y Trinidad Rojas Torres por su apoyo constante, porque siempre creyeron en mí y me brindaron el apoyo necesario para culminar mi carrera y para la realización de mi tesis, gracias por ser una las principales motivaciones para seguir cumpliendo mis metas.

A mis profesores por todas sus enseñanzas en especial a la Dra. Silvia Agüero Aguilar por su esfuerzo, dedicación y apoyo para llevar adelante esta investigación y poder culminarla, gracias profesora por compartir sus experiencias y conocimientos en el área de microbiología de suelos.

Al Dr. Sady García Bendezú jefe del Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina, por el apoyo en desarrollar el trabajo de investigación.

Al Mg. Yuri Arévalo Aranda y la Br. Lisbeth Mamani Rojas que amablemente aportaron con sus conocimientos en los ensayos en el laboratorio de microbiología de suelos de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

A la Mg. Isabel de María Mimbela Talledo encargada del Laboratorio de Microbiología de Suelos, por su disposición en compartir sus conocimientos en fitopatología.

A todas mis amistades que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

JURADO EVALUADOR	2
INFORME DE SIMILITUD.....	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTO	5
TABLA DE CONTENIDO	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	10
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	28
CAPÍTULO III: RESULTADOS	54
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS.....	70
ANEXOS.....	84

Índice de tablas

TABLA 1.	17
TABLA 2.	24
TABLA 3.	40
TABLA 4.	45
TABLA 5.	46
TABLA 6.	46
TABLA 7.	48
TABLA 8.	48
TABLA 9.	50
TABLA 10.	50
TABLA 11.	51
TABLA 12.	54
TABLA 13.	54
TABLA 14.	55
TABLA 15.	56
TABLA 16.	59
TABLA 17.	61

Índice de Figuras

FIGURA 1.	ESQUEMA DE LA POLIMERIZACIÓN DEL ETILENO	19
FIGURA 2.	ESQUEMA DE LA CADENA LDPE	20
FIGURA 3.	ESQUEMA DE LA CADENA HDPE	21
FIGURA 4.	ESQUEMA GENERAL DE BIODEGRADACIÓN DE POLÍMEROS COMPLEJOS POR UNA CÉLULA FÚNGICA	23
FIGURA 5.	DIAGRAMA DE FLUJO DE LA BIODEGRADACIÓN DEL LDPE	34
FIGURA 6.	MAPA DEL ÁREA DE ESTUDIO, PLAYA MARQUEZ - VENTANILLA	35
FIGURA 7.	VISTA SATELITAL DE LOS PUNTOS DE MUESTREOS ALEATORIO SIMPLE	36
FIGURA 8.	CROQUIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE TRATAMIENTO Y REPETICIONES DE AISLAMIENTO MICROBIANO, T₁ (MEDIO SUELO), T₂ (MEDIO DE MARTIN), T₃ (MEDIO DE MARTIN + >2MM LDPE), T₄ (MEDIO DE MARTIN + 2MM LDPE Y T₅ (MEDIO DE MARTIN + < 1MM LDPE) POR CADA CEPA DE HONGO	49
FIGURA 9.	CROQUIS DE LA DISTRIBUCIÓN DE TRATAMIENTO Y REPETICIONES DEL EFECTO PH CON DOS ESPECIES DE HONGOS	51
FIGURA 10.	CROQUIS DE LA RESPIRACIÓN MICROBIANA EN PRESENCIA DE MICROPLÁSTICO LDPE A DOS DIFERENTES DIÁMETROS DE TAMAÑO	52
FIGURA 11.	TASA DE CRECIMIENTO DE LAS ESPECIES PENICILLIUM DECUMBENS THOM (H₂) Y CHAETOMIUM GLOBOSUM (H₃) EN MEDIO CON Y SIN MICROPLÁSTICO Y DIFERENTES NIVELES DE PH	60
FIGURA 12.	RESULTADO DE RESPIRACIÓN MICROBIANA DE SUELO CON MICROPLÁSTICO LDPE	62

Resumen

El objetivo principal fue determinar la capacidad adaptativa de los hongos filamentosos frente al polietileno. La investigación se realizó a partir del aislamiento de hongos filamentosos de suelo con presencia de bolsas de polietileno de baja densidad (LDPE) en descomposición muestreadas en el botadero de la playa Marquez en el distrito de Ventanilla - Perú el procesamiento de la muestras se realizó en el Laboratorio de Microbiología de suelos de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), la identificación taxonómica de hongos filamentosos con capacidad degradativa se realizó en base a características macroscópicas de crecimiento en placa y el estudio microscópico; la capacidad degradativa donde logran mayor actividad los hongos filamentosos frente al polietileno a pH :5,5 a 28°C durante 9 días se realizó mediante la técnica de Khan et al. Se aisló dos especies de hongos filamentosos; *Penicillium decumbens* Thom (H2) y *Chaetomium globosum* (H3). Demostrando mayor tasa de crecimiento *Chaetomium globosum* (0.311 mm. h-1) seguido de *Penicillium decumbens* Thom (0.222 mm. h-1) las dos cepas tienen capacidad biodegradativa frente al polietileno en diferentes escalas de calificación y según las condiciones de pH, *Chaetomium globosum* es un buen degradador de polietileno a un pH de 5,5 formando biopelícula gruesa y tiene capacidad para adherirse al polietileno, según la temperatura ambos hongos tienen capacidad biodegradativa a 28°C, la cual ha resaltado esta investigación que permite plantear estrategias de biodegradación de este álgido problema ambiental y de salud pública.

Palabras Claves

Microplástico, hongos, biodegradación, polietileno de baja densidad, suelo.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Realidad problemática

A nivel mundial la contaminación ambiental por residuos plásticos es considerada una amenaza antropogénica para la biosfera ([Sajjad et al., 2022](#)). Solo en el 2020, la fabricación de plásticos en el mundo logro llegar a los 367 millones de toneladas, ([Plastics Europe, 2022](#)), además se estima que la producción anual mundial de plásticos puede llegar a 33 mil millones de toneladas para el año 2050 ([Cincinelli et al., 2019](#)). Entre los diferentes tipos de plásticos globales, ningún polímero tiene tanta demanda como el polietileno (PE), 31,3%; [polipropileno](#) (PP), 19,7%; cloruro de polivinilo (PVC), 9,6%; [tereftalato de polietileno](#) (PET), 8,4%; poliuretano (PUR), 7,8%; y [poliestireno](#) (PS), 6,1% ([Europe Plastics, 2021](#)), considerado como el residuo plástico comúnmente encontrado en la naturaleza y ha sido reconocido como una gran amenaza para el medio ambiente ([Lee et al., 1991](#)). Debido a la mala gestión de recuperación, tratamiento, resistencia a la degradación y las técnicas de eliminación convencionales los residuos plásticos se propagan por los océanos del mundo por los vientos dominantes y las corrientes superficiales, y parte de ella termina en el sistema digestivo de los animales marinos, lo que finalmente afecta la salud humana ([Sánchez, 2020](#)). Se acumulan cada vez más en los ambientes naturales, donde pueden perdurar por largos periodos de tiempo y se fragmentan con la formación de pequeñas partículas conocidas como microplástico ([Wright, 2017](#)), por lo que en la actualidad se han convertido en la mayor preocupación al ser considerados contaminantes emergentes que se han detectado ampliamente en los ecosistemas acuáticos, especialmente en los océanos ([Nanavati et al., 2016](#)). Sin embargo, existe poco conocimiento sobre la contaminación por microplásticos (MP) en suelos y ecosistemas terrestres a pesar de ser el principal sumidero y directo de estas partículas ([Horton y Dixon, 2018](#)). Se calcula

que la contaminación por MP en la tierra puede ser de 4 a 23 veces mayor que la del océano (Horton et al., 2017). Además, bajo el contexto que se vive por la pandemia de la COVID- 19, los desechos plásticos han tomado mayor relevancia, debido al uso de mascarillas quirúrgicas y guantes desechables y plástico de un solo uso que ayudan a proteger a las personas y detener la propagación del virus; esta acción de protección agrava la situación que ya existía, pero que se ha ido incrementado con la emergencia sanitaria (Wang et al., 2022).

Solo a nivel de Perú, se logra utilizar más de 3 mil millones de bolsas plásticas anualmente, de las cuales solo en Lima Metropolitana y el Callao se produce el 46 por ciento de los residuos plásticos a nivel nacional, según (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2018). Pese que en la actualidad el país cuenta con una ley y reglamento N.º 30884, ley que regula el plástico de un solo uso y los recipientes o envases descartables, esta norma está vigente y ha ido aplicándose progresivamente a nivel de país; pero a la fecha no hay un cumplimiento riguroso por parte de los sectores competentes, viéndose agravado por la pandemia (Becerra, 2022). Por esta razón la biodegradación del polietileno por microorganismos de ecosistemas terrestres contaminados por residuos plásticos, son una solución a la desacerbada contaminación plástica que aqueja a nuestros suelos, debido a que los hongos tienen la capacidad natural de desintoxicar contaminantes e invadir sustratos mediante el uso de enzimas que actúan sobre sustancias no específicas (Sánchez, 2020).

Antecedentes Nacionales

En el trabajo desarrollado por Gonzales (2022) evaluó la capacidad de biodegradación de hongos filamentosos frente al polietileno, aisló cinco especies de hongos e identificó taxonómicamente como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*,

Aspergillus fumigatus, *Mucor sp.* y *Fusarium sp.* La capacidad degradativa de polietileno se determinó en condiciones de temperaturas de 20 y 30°C y a pH de 4.5 y 8.0; se realizó mediante la técnica empleada por Kavelman y Kendrick. Se obtuvo como resultado que el hongo *Aspergillus flavus* demostró tener una mayor capacidad biodegradativa frente al *Aspergillus niger* a un pH de 4.5, siendo indiferente las temperaturas.

[Gutiérrez \(2019\)](#) aisló bacterias y hongos de residuos plásticos con presencia de deterioro del botadero municipal de Tacna, se identificaron géneros como *Bacillos sp*, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Flavobacterium sp*, *Micrococcus sp*, *Rhodotorula sp*, *Aspergillus sp* y especies como *Penicillium vanoranjei*, *Aspergillus sp*, y *Saccharomyces cereviceae*. La biodegradación se evidencio por el equipo microfotografía de SEM al LDPE, obteniendo un promedio total de masa perdida de 172,975 mg de LDPE, que equivale a 2,8 por ciento en un período de 70 días incubación.

[Iparraguirre y Vivanco \(2015\)](#) trabajo en el aislamiento de ocho hongos filamentosos biodegradadores de polietileno de tereftalato (PET) y once de polietileno de baja densidad (LDPE). Las muestras plásticas fueron obtenidas del botadero en Santiago, Ica. En el primer aislamiento se identificaron las especies: *Aspergillus violaceofuscus*, *Aspergillus níger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Alternarla altemata*, *Penicillium purpurugenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium chrysogenum*, *Mucor sp*, *Rhízopus stolonífer*, *Papulaspora brachíata* y en el segundo especies como: *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternarla altemata*, *Bipolaris sorokinian*, *Beltrania rhombica*, *Cladosporium cladosporoides*, *Mucor sp*, *Stemphylium sp*. La cepa de mayor actividad biodegradadora en PET y LDPE pertenece

al género *Mucor sp*, perdiendo 1.3 por ciento de masa en PET a 25°C a pH 5 y 20 por ciento LDPE a temperatura 25°C y pH 5 a 7.

Uribe et al. (2010) aislaron y determinaron la actividad biodegradativa del LDPE por acción de un consorcio microbiano a partir de residuos plásticos obtenidos de un relleno sanitario, Lima, Perú. Se obtuvieron 6 cepas identificadas como *Pseudomonas sp. MP3a* y *MP3b*, *Penicillium sp. MP3a*, *Rhodotorula sp. MP3b*, *Hyalodendron sp. MP3c* y una levadura no identificada. La acción biodegradativa se demostró por variaciones en el espectro infrarrojo del polietileno con respecto al polímero sin tratamiento. Se obtuvo una reducción de 5,4 por ciento de la masa total de polietileno bajo la acción del consorcio conformado solo por bacterias a pH 7,0 y el porcentaje de masa perdida obtenido mediante el empleo de las levaduras y los hongos aislados fue de 4,8 por ciento a pH 5,5.

Méndez et al. (2007) aislaron y caracterizaron 20 cepas de hongos, obtenidos de relleno sanitario el zapallal capaz de degradar el polietileno. Los resultados de la actividad biodegradadora se realizó con la técnica empleada por Kavelman y Kendrick a unas temperaturas entre 20 y 30 °C y a pH 4.5 y 8.0. Se pudo evidenciar solo 5 (2.5 %) de la capacidad biodegradadora del polietileno a 20 °C, siendo el pH 6.5 el más óptimo, la cepa de mayor rendimiento pertenece a la especie de *Aspergillus flavus*. A temperatura de 30 °C, 6 (30%), algunas cepas evidenciaron actividad degradadora, siendo pH 6,5 el óptimo, la cepa de mayor rendimiento fue la misma del caso anterior.

Antecedentes Internacionales

Gao et al. (2022) realizaron estudios en la ciudad Qingdao en China y examinaron cientos de muestras asociadas con desechos plásticos y se aisló un hongo

llamado *Alternaria alternata* FB1 que posee una destacada capacidad de colonización en la película de polietileno (PE). A través de la observación del microscopio electrónico de barrido (SEM), encontramos que este hongo podía degradar eficientemente la película de PE. Además, las imágenes de Fourier Transform Infrared (FTIR) detectaron un pico de absorción de 17.15 m^{-1} , indicando la formación de enlaces carbonilo. Mediante análisis de Difracción de Rayos X (XRD), encontramos que la película de polietileno (PE) tratada con la cepa FB1 durante 28 días mostraron un grado de cristalinidad relativa claramente reducido. Los resultados indicaron una disminución de 62.79 por ciento a 52.02 por ciento. Sorprendentemente, el peso molecular de la película de PE disminuyó un 95 por ciento después de 120 días de tratamiento con la cepa FB1.

[Vivi et al. \(2019\)](#) evaluaron la capacidad biodegradadora de cinco cepas de hongos identificadas como: *Aspergillus brasiliensis*, *Penicillium funiculosum*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma virens*, y *Paecilomyces variotii* en películas de PCL (policaprolactona) y PVC (cloruro de polivinilo). Se realizó bajo el método ISO 846-1978 para ensayo de plásticos. Las muestras se analizaron por cambios morfológicos, pérdida de masa, microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (SEM) a los 28 días de cultivo. Después del período de incubación, las películas de PCL mostraron pérdida significativa de masa de 75 por ciento por el hongo *Chaetomium globosum* y fue menos atacado el PVC por lo que sugiere el potencial fúngico para degradar ambos plásticos.

[Khan et al. \(2017\)](#) aislaron y caracterizaron un hongo de suelo de un vertedero de residuos urbanos de Pakistán. Se evaluó la capacidad de degradación del poliéster poliuretano (PU) del hongo *Aspergillus tubingensis*, esta fue probada en diferentes

formas: (a) en placa de agar SDA, (b) en MSM líquido y (c) enterramiento en el sistema suelo. Los resultados indicaron que esta cepa de *A. tubingensis* fue capaz de biodegradar el PU. Usando microscopía electrónica de barrido (SEM), se confirmó visualmente que el micelio de del hongo colonizó el material de PU, provocando la degradación de la superficie y la formación de cicatrices. La biodegradación de PU fue mayor en el método (a) cultivo en placa, seguido por la técnica de método de cultivo líquido y el entierro suelo.

[El-Morsy et al. \(2017\)](#) realizaron una investigación cuyo objetivo fue aislar cepas fúngicas de suelos contaminados con plástico en vertederos ubicados en diferentes gobernaciones de Egipto. Los resultados mostraron que *M. ruberpodría* producir la concentración máxima de esterasa seguida de *M. sanguineus*, los mismos sucedió con tres *monascus*. Se seleccionaron especies para evaluar la biodegradación del poliuretano *monascus sp* aislado de El Sharqia fue el más eficiente en la degradación del poliuretano en forma de impranil DLN. Además, las micrografías SEM y las mediciones del potencial zeta confirmaron la adsorción y la formación de complejos entre el poliuretano y las hifas de *monascus sp*.

[Paço et al. \(2017\)](#) evaluó la respuesta del hongo *Zalerion maritium*, en exposición a gránulos de polietileno (PE). Los cambios moleculares se evaluaron a través de la de espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR-ATR) y resonancia magnética. Los resultados mostraron que durante 14 días el hongo fue capaz de usar el PE como sustrato, disminuyendo la masa y el tamaño de los gránulos PE. La variación de biomasa de 82 por ciento \pm 2,1 por ciento fue acompañada por una variación de masa de los materiales poliméricos de 56,7 por ciento \pm 2,9 por ciento, es decir, hubo una eliminación superior a 43 por ciento observado previamente para cepas

fúngicas.

[Gajendiran et al. \(2016\)](#) desarrollo una investigación sobre la biodegradación del polietileno de baja densidad (LDPE), utilizaron hongos aislados del suelo de vertedero, basado en el análisis de ARNr 18S de la cepa aislada, se identificó como *Aspergillus clavatus*. La degradación de LDPE por el hongo se controló durante 90 días de incubación en medio acuoso. La degradación se confirmó por cambios en el peso de polietileno, se observó una pérdida de peso del 35 por ciento de las películas de LDPE y también por el espectros infrarrojos y cambios morfológicos mediante análisis (SEM - AFM).

[Ayala \(2015\)](#) realizó un estudio sobre la degradación del poliuretano con 4 cepas de hongos endófitos, del género *Pestalotiopsis sp*, las muestras de poliuretano termoestable fueron sometidas a cada hongo y se evaluaron las muestras del polímero mediante espectrofotometría infrarroja (FT-IR) y microscopía electrónica de barrido (SEM), sometidas a 100 días. Los resultados de los espectros obtenidos con (FT-IR) reflejan un cambio en la composición del polímero al ser sometido a los diferentes hongos, mostrando un aumento en la absorbancia de los picos correspondientes a alcoholes (3600 y 3200 cm^{-1}), ácidos carboxílicos (3200 y 2800 cm^{-1}) e isocianatos (2370 cm^{-1}).

Definiciones

Polímeros

Son sustancias compuestas por grandes moléculas, lo que significa que tienen un alto peso molecular y que se forman por la unión de enlaces covalentes de unidades moleculares discretas denominadas monómeros. ([Acuña, 2017](#)). Estos polímeros pueden

ser artificiales como naturales, siendo “el polímero más común en la tierra la celulosa, un compuesto orgánico que se encuentra en las paredes celulares de las plantas” (Johnson, 2019). Además, siendo utilizado para elaborar productos textiles y papel. Los polímeros artificiales “incluyen materiales como el polietileno que es uno de los plásticos más comunes y con fácil acceso como bolsas de compras hasta contenedores de almacenamiento y poliestireno utilizado para producir vasos desechables”.

También los polímeros se pueden definirse por su comportamiento al calor y estructura, como polímeros sintéticos flexibles conocidos como termoplásticos, siendo otros permanentemente rígidos como termoestables y por último los elastómeros con propiedades similares al caucho.

Tabla 1.

Cronología de la creación de materiales poliméricos y su origen

Polímero	Acrónimo	Origen	Año
Caucho	-	Natural	1839
Parkesina	-	Semisintético	1862
Celuloide	-	Semisintético	1863
Rayón	-	Semisintético	1894
Baquelita	BK	Sintético	1907
Vinilo	PVC	Sintético	1926
Polietileno de baja densidad	LDPE	Sintético	1935
Politetrafluoroetileno	PTFE	Sintético	1938
Poliestireno	PS	Sintético	1938
Nylon	PA	Sintético	1939
Tereftalato de polietileno	PET	Sintético	1941
Poliéster insaturado	UP	Sintético	1942
Polipropileno	PP	Sintético	1951
Polietileno de alta densidad	HDPE	Sintético	1951
Poliestireno extruido	XPS	Sintético	1954
Poliésteres termoplásticos	-	Sintético	1970
Polímeros de cristal líquido	LCP	Sintético	1985

Nota. Breve cronología de la invención de los materiales poliméricos

Fuente: Extraído de Castañeda et al., (2020).

Plástico

“Son polímeros sintéticos generalmente de naturaleza química hidrófoba, que normalmente poseen una alta durabilidad y resistencia, suelen no tener un punto de fusión fijo y poseen en determinado intervalo de temperaturas características flexibles y moldeables” (Acuña, 2017). Los polímeros sintéticos pueden tardar entre 100 y 1000 años para descomponerse en el ambiente de acuerdo al tipo de clasificación plástica. La American Society for Testing Materials (ASTM) define plástico como:

“Cualquier material de un extenso y variado grupo que contiene como elemento esencial una sustancia orgánica de gran peso molecular, siendo sólida en su estado final; ha tenido o puede haber tenido en alguna etapa de su manufactura (fundido, cilindrado, prensado, estirado moldeado, etc.) diferentes formas de fluidificación, junta o separada, de presión o calor”.

(Norma ASTM, como se citó en Garavito, 2007)

Polietileno (PE)

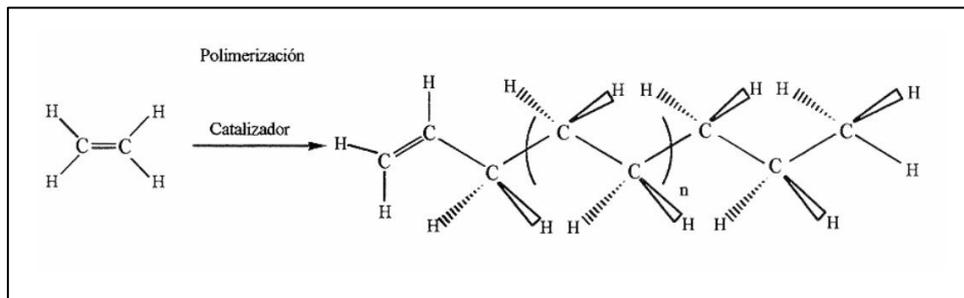
Desde un punto de vista químico y estructural el polietileno es el polímero más sencillo y se define como:

Resina sintética versátil y ligera hecha de la polimerización de etileno. El polietileno es un integrante de la familia de resinas de poliolefina. Es el plástico más empleado en el mundo, y su transformación se convierte en productos desde bolsas de compras, envolturas de alimentos transparentes y hasta botellas de detergente; también puede cortarse o hilarse en fibras sintéticas o varias para obtener las propiedades

elásticas de un caucho (Augustyn et al., 2019). Al mismo tiempo cuenta con una resistencia química buena, poca permeabilidad al vapor y excelentes propiedades eléctricas y ligereza de peso.

Figura 1.

Esquema de la polimerización del etileno



Fuente: Extraído de Augustyn et al., 2019

Polietileno de baja densidad (LDPE)

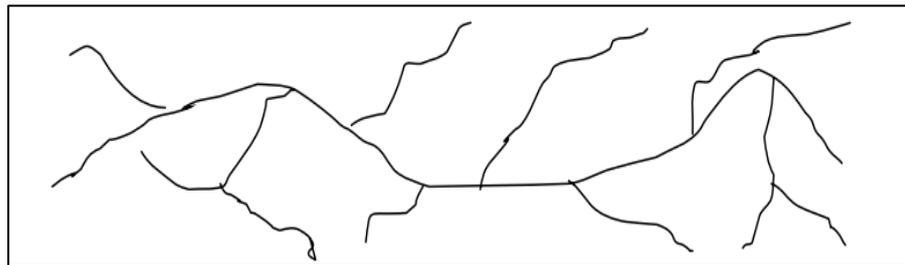
Se le conoce por sus siglas en ingles Low Density Polyethylene (LDPE) y en español como (PEBD). Además, tiene una cadena amplia o larga y ramificada lo que implica un mayor volumen y por ello una densidad menor (0.915-0.930 g/cm³), es por ello que se obtiene:

A partir de etileno gaseoso altas temperaturas hasta aproximadamente 350° C, con la presencia de óxido y a presiones muy elevadas (aproximadamente 50,000 lbf/pg² o 350 MPa.) estos procesos forman una estructura polimérica con ramas largas y cortas. Debido a que las ramas obvian que las moléculas de polietileno se mezclen. Su punto de fusión es de aproximadamente 110° C, a todo esto, le debemos añadir que el PEBD es un material muy flexible. Los usos primordiales son bolsas de basura y comestibles,

juguetes, aislamiento de cables y alambres, mantillo agrícola, botellas exprimibles, y artículos para el hogar. Contiene un código de reciclaje de plástico de LDPE es número 4. (Augustyn et al., 2019).

Figura 2.

Esquema de la cadena LDPE



Fuente: Augustyn et al., 2019

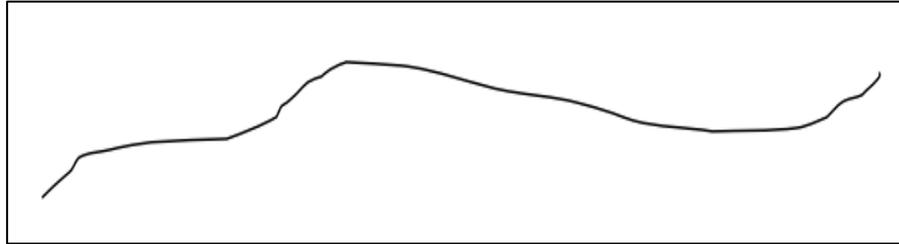
Polietileno de alta densidad (HDPE)

Se le conoce por sus siglas en inglés High Density Polyethylene (HDPE) y en español como (PEAD). Se trata de un polietileno con poca o nula ramificación de la cadena, permitiendo un empaquetamiento más reducido, tiene una densidad (0.950-0.965 g/cm³).

Se obtuvo este homopolímero por polimerización con catalizadores Ziegler (haluros de titanio y compuestos de alquilaluminio), a bajas presiones (30 bares) y temperaturas de 100-200°C. También se incluyen los polímeros obtenidos con catalizadores Phillips (trioxido de cromo en soporte de sílice). Se obtienen por reactor agitado, loop reactor o lecho fluidizado. Entre sus muchas aplicaciones destaca la fabricación de tubos, botellas y tapones (Sáenz De Juano, 2006, p.8).

Figura 3.

Esquema de la cadena HDPE



Fuente: Augustyn et al., 2019

Microplástico (MP)

Según la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA) “son partículas de plástico con un diámetro de 5 mm y estos puede ser clasificados según su origen como microplásticos primarios y secundarios” (GESAMP, 2015 citado en NOAA). Los microplásticos pueden ser clasificado según su origen como primarios o secundarios:

El primero se refiere a partículas producidas originalmente con tamaños de 5 mm, en forma de gránulos, granulados a base de plástico para la industria cosmética, o como vector para medicamentos en medicina. Los microplásticos secundarios son aquellos generados por la fragmentación de partículas plásticas más grandes, incluyendo macro y mesoplásticos, como botellas de vidrio y bolsas de plástico. (Cole, Lindeque, Halsband, y Galloway, 2011.p 2589).

Hongo

Los hongos constituyen un reino grande y diverso de organismos eucariotas clasificados morfológicamente como levaduras, hongos filamentosos y hongos

dismórficos. (Schmit y Mueller, 2007). Muchos son aerobios obligados o facultativos, cada uno tiene al menos un núcleo, una membrana nuclear, un retículo endoplásmico, mitocondrias y un aparato secretor (Mitchell, 2011, citado en Estrada y Ramírez, 2019). También son secretores de enzimas que biodegradan una gran variedad de compuestos orgánicos, su crecimiento permite desarrollar un micelio aéreo con órganos de fructificación, se reproducen sexual y asexualmente, no realizan fotosíntesis porque no tienen clorofila y se nutren a partir de materia orgánica, tienen la pared celular formada por quitina fuertemente rígida (González et al., 2016).

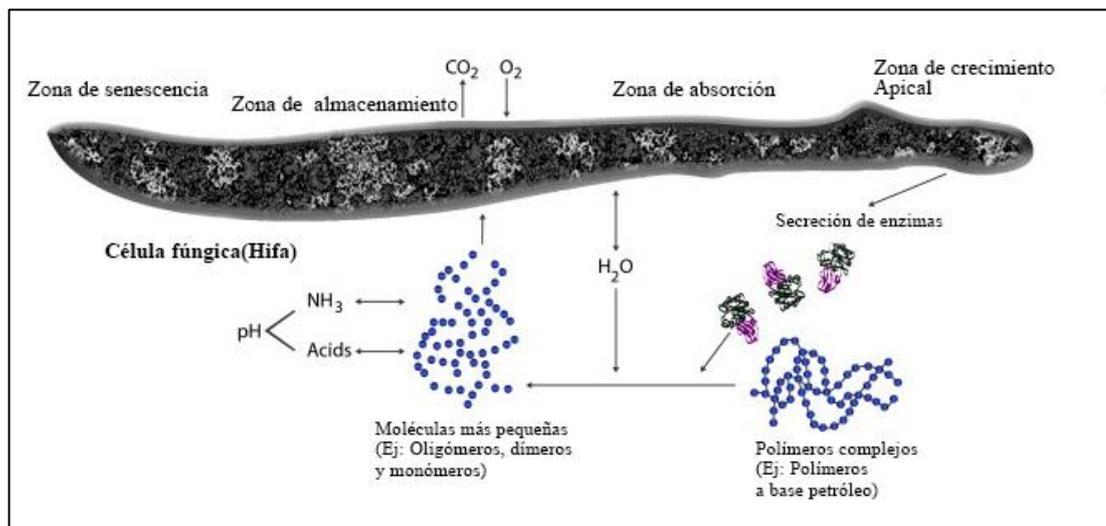
Hongos degradadores de polímeros

Estos organismos pueden ser saprótrofos, organismos obligados u oportunistas (Schmit y Mueller, 2007). Los hongos se encuentran en diferentes ambientes y algunos de ellos han evolucionado para adaptarse y crecer incluso en ambientes terrestres y marinos bajo condiciones extremas (Sánchez, 2020). Los hongos tienen la capacidad de extenderse a través de sustratos en su búsqueda de nutrientes con su estructura de red filamentosa, explorando y creciendo en lugares que son más difíciles de alcanzar para otros microorganismos. Son capaces de descomponer y utilizar estos contaminantes para crecer o poner sus componentes químicos a disposición de otros microorganismos. Como consecuencia, los hongos filamentosos juegan un papel crucial en la degradación y mineralización de diversos contaminantes ambientales al catalizar reacciones químicas importantes (Črešnar y Petrič, 2011). Los hongos son organismos heterótrofos que se alimentan absorbiendo nutrientes del exterior de sus células. Liberan enzimas digestivas por exocitosis fuera de sus hifas, que descomponen macromoléculas y moléculas orgánicas en compuestos orgánicos más pequeños para absorberlos nuevamente, liberando CO₂ y H₂O en condiciones aeróbicas y CH₄ en

condiciones anaeróbicas, si la mineralización del ocurre el sustrato (Pathak y Navneet, 2017).

Figura 4.

Esquema general de biodegradación de polímeros complejos por una célula fúngica



Fuente: Adaptado de Sánchez, 2020

Degradación Biológica

“Es la descomposición aeróbica o anaeróbica de un material por acción enzimática de microorganismos tales como bacterias, hongos y algas bajo condiciones normales del medio ambiente” (Yepes, 2014). Además las características de algunos compuestos químicos de poder ser utilizado por los microorganismos para producir energía y crear otras sustancias como aminoácidos, tejidos y nuevos organismos.

La degradación del plástico con lleva a producir productos como el CO_2 , componentes celulares, sales inorgánicas y micelas correspondientes de las materias naturales, y esto se lleva a cabo:

En condiciones con presencia de oxígeno, los productos de la biodegradación son: CO₂ y H₂O, estos son absorbidos por la naturaleza y así se cierra el ciclo del C. Una vez que un que un producto cumple con su vida útil, pasa a la categoría de residuo y cuando es recuperado por la naturaleza a través de la biodegradación, el ciclo se ha completado y esa materia vuelve a entrar al proceso (Yepes, 2014).

Tabla 2.

Cuadro de clasificación taxonómica de las especies

Taxonomía de la cepa H ₂		Taxonomía de la cepa H ₃	
Reino	Hongos	Reino	Hongos
Filo	Ascomicota	Filo	Ascomicota
Clase	Eurotiomicetos	Clase	Sordariomicetos
Orden	Eurotiales	Orden	Sordariales
Familia	Aspergilláceas	Familia	Chaetomiaceas
Género	<i>Penicillum</i> , 1809	Género	<i>Chaetomium</i> Kunze, 1817
Especie	<i>Penicillum decumbens</i> Thom	Especie	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze

Fuente: Especie Fungorum Plus

Biopelículas

“Una biopelícula es un sistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas” (Gutierrez, 2013). El exopolímero que es producido por los mismos microorganismos, forma una matriz adherente en donde éstos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos.

En muchos ambientes, representa una estrategia de supervivencia, pues proporciona una protección contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana y cuenta con un sistema de canales, que le permite establecer un vínculo con el medio externo para hacer intercambio de nutrientes y eliminar metabolitos de

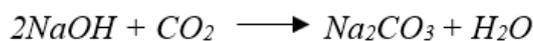
desecho (Nina, 2020).

“Además de crecer en superficies inanimadas, pueden formarse en tejido vivo y provocar infecciones similares a las desarrolladas por bacterias en estado libre, presentando una mayor resistencia tanto a los antibióticos, como al sistema inmunológico” (Marquez, et al, 2008). “Los microorganismos formadores de biopelículas, tienen ventajas sobre los microorganismos suspendidos, como por ejemplo una mayor persistencia dentro del sistema, mayores tasas de crecimiento, de actividad metabólica y de resistencia a la toxicidad” (Nina, 2020).

Respiración microbiana

Es la absorción de oxígeno (O₂) respirado o la liberación de dióxido de carbono (CO₂) producido como resultado de la respiración microbiana de las poblaciones de bacterias, hongos, algas y protozoos pertenecientes al suelo. La respiración es el resultado de la degradación de la materia orgánica. La formación de CO₂ es el último paso de la mineralización del carbono (García et al., 2016).

La captura de CO₂ producido ocurre mediante las reacciones químicas:



1.2 Formulación del problema

A continuación, se presenta la formulación del problema general y específicos de la investigación.

Formulación general del problema

¿Los hongos aislados de residuos de plásticos en suelo de playa Marquez tendrán la capacidad adaptativa del polietileno de baja densidad (LDPE)?

Formulación específicos del problema

- ¿Se podrá caracterizar las propiedades fisicoquímicas como pH, conductividad y humedad gravimétrica del suelo con el crecimiento de los hongos de estudio?
- ¿Podremos realizar el aislamiento e identificación de hongos extraídos de suelo aplicando técnicas morfológicas y análisis molecular?
- ¿Se podrá realizar la medición de la eficiencia de los hongos a través del diámetro de las colonias en respuesta a su tasa de crecimiento y desarrollo a mayores y menores pH en el medio martin en presencia de LDPE (< 1mm) y la respiración microbiana, el diámetro de dos niveles de LDPE (2 mm y 1mm)?

1.3 Objetivos

El objetivo general debe formularse como la búsqueda de la solución al problema de investigación. Los objetivos específicos son pasos consecutivos que permiten lograr el objetivo general.

1.4 Hipótesis

Hipótesis General

- **H1:** Habrá hongos de suelo presentes en los microplásticos provenientes de los residuos plásticos de la playa Marquez en Ventanilla Perú que se adapten al LDPE.
- **H0:** No habrá hongos de suelos presentes en los microplásticos provenientes de los residuos plásticos de la playa Marquez en Ventanilla Perú que se adapten al LDPE.

Hipótesis Específicas

- **H2:** Se aislaron cuatro especies de hongos provenientes del (LDPE) de los residuos de la playa Marquez en Ventanilla Perú para su identificación por técnicas morfológicas y análisis molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- **H3:** Será posible caracterizar las propiedades fisicoquímicas del suelo y relacionarlo con el crecimiento de los hongos de estudio.
- **H3:** Al realizar la medición de la eficiencia de los hongos a través del diámetro de las colonias en respuesta a su tasa de crecimiento, respiración microbiana, el diámetro de dos niveles de LDPE (2 mm y 1mm) y desarrollo a mayores y menores pH del suelo de origen, se determinó que si son eficientes

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación según su enfoque es cuantitativo de diseño experimental aplicado. De alcance básica exploratoria (Creswell, 2015).

2.2 Población

La población se puede considerar que obtuvo en dos partes para el proceso de evaluación y determinación inicial fueron tres muestras de suelo recolectadas aleatoriamente en área de 40 m².

Para la determinación de microorganismos en el laboratorio de cada muestra se hicieron diluciones seriadas de tres réplicas de cada muestra haciendo una población de 9 diluciones esto nos permitió calcular las Unidades Formadoras de Colonia por gramos de suelo analizado (UFC/g).

2.3 Muestra

Se obtuvo 3 muestras representativas de suelos aproximadamente 1 Kg cada uno con presencia de contaminación por microplástico.

2.4 Materiales

a) Equipos y/o instrumentos

- Estufa (105°C)
- Balanza analítica
- Balanza gramera

- Incubadora Thermo Scientific (28°C)
- Autoclave (121°C)
- Micropipeta de 1000 µl
- Micropipeta de 1 mL
- Micropipeta de 10 mL
- Multi-Parameter Consort C1020
- Conductimetry **Thermo Scientific Orion star A2120**
- Agitador vortex VELP
- Destilador de agua Durastill
- Desionizador de agua Kalstein
- Cámara de flujo laminar
- Cámara Canon Power shot SX520 HS
- Microscopio Leica DM750 ICC50 HD
- Estereoscopio Leica EZ4
- GPS: UTM Geo Map
- Contador de colonias blue pard
- Esterilizador infrarrojo IR 900

- Vernier (mm)

b) Reactivos y soluciones

- Agua destilada

- Agua desionizada

- Medio de Martin

- Medio V8

- Ácido Clorhídrico (HCl) 0.5 N

- Hidróxido de Sodio (NaOH) 1 N

- Tetraciclina 500 mg

c) Materiales de laboratorio

- Placas de petri

- Tubos de ensayos (15 mL)

- Tubos de ensayos (50 mL)

- Gradillas y soportes

- Matraces de 250 mL

- Beaker 100 mL

- Fiola 500 mL

- Probeta 100 mL

- Mechero

- Asa de bacteriológica

- Tips de 1 mL y 10 mL

- Tamices >2 mm, >1mm y < 1mm

d) Materiales de escritorio

- Bolsa ziploc

- Gel pack refrigerante

- Cooler

- Papel Kraft

- Libreta de notas

2.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

2.5.1. Técnicas

Las técnicas empleadas en la investigación fueron las siguientes:

• Revisión Bibliográfico:

Se realizó una extensa búsqueda bibliográfica de estudios sobre la biodegradación del microplástico en suelo por hongos filamentosos, fuentes que comprobaron la efectividad de la biodegradación, se utilizó la literatura

encontrada en la base de datos de revistas científicas: Elsevier, Google Scholar, Scielo, repositorios de universidades del Perú y congresos de los últimos años. Se incluyeron estudios originales, escritos en inglés que investigaran la contaminación plástica en ecosistemas terrestres, la biodegradación del microplástico por hongos y la contaminación por residuos sólidos en suelos.

- **Técnica Experimental:**

El trabajo de investigación se ejecutó en el laboratorio de microbiología de suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM), para el aislamiento, purificación, pruebas de adaptabilidad y biodegradación del microplástico y parámetros complementarios de la muestra de suelo extraído de la playa Marquez-Ventanilla, los cuales fueron análisis fisicoquímicos: pH, conductividad eléctrica y humedad gravimétrica.

2.5.2. Instrumentos de recolección de datos

Para la recolección de datos obtenidos durante el experimento se usó los siguientes instrumentos:

- **Cadena de custodia- preexperimental**

La cadena de custodia permitió organizar la información obtenida durante la toma de muestra, considerando la codificación, transporte, identificación de parámetros a analizar, dicho instrumento fue accedida por el laboratorio particular de Servicios de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas y Fertilizantes - LASPAF de la UNALM.

- **Tabla de registro de datos**

La tabla de Excel 2019, permitió registrar y uniformizar los datos trabajados en laboratorio de los análisis de tasa de crecimientos y respiración microbiana de las cepas estudiadas (nexo 1 y 2).

2.5.3. Método de análisis de datos

Los datos logrados fueron analizados estadísticamente mediante la estrategia de estadística descriptiva que nos permite analizar e interpretar los valores numéricos obtenidos a través de cuadros (anexo 7 y 11), así mismo se desarrolló un análisis de varianza (ANOVA) y (ANOVA) de Welch, que permitió identificar la relación existente entre las medias de los resultados adquiridos, usando el software R.

2.6 Procedimiento

En el presente trabajo de investigación se llevaron a cabo las siguientes etapas.

Figura 5.

Diagrama de flujo de la biodegradación del LDPE



2.6.1. Muestreo de suelo

El lugar de recolección de la muestra corresponde a la playa Marquez, ubicado en el distrito de Ventanilla de la provincia constitucional del Callao. Las coordenadas geográficas del área de estudio son para la latitud de $11^{\circ} 56' 40.9''$ S, para la longitud $77^{\circ} 08' 12.8''$ W y para la altitud 71 msnm. En la figura 5 se muestra la ubicación del campo, se seleccionó este lugar debido a su antigüedad y su gran cantidad de desechos de plásticos en la arena. Además, en la actualidad este lugar está considerado como una de las playas más contaminadas de Perú y de Sudamérica.

Figura 6.

Mapa del área de estudio, playa Marquez - Ventanilla

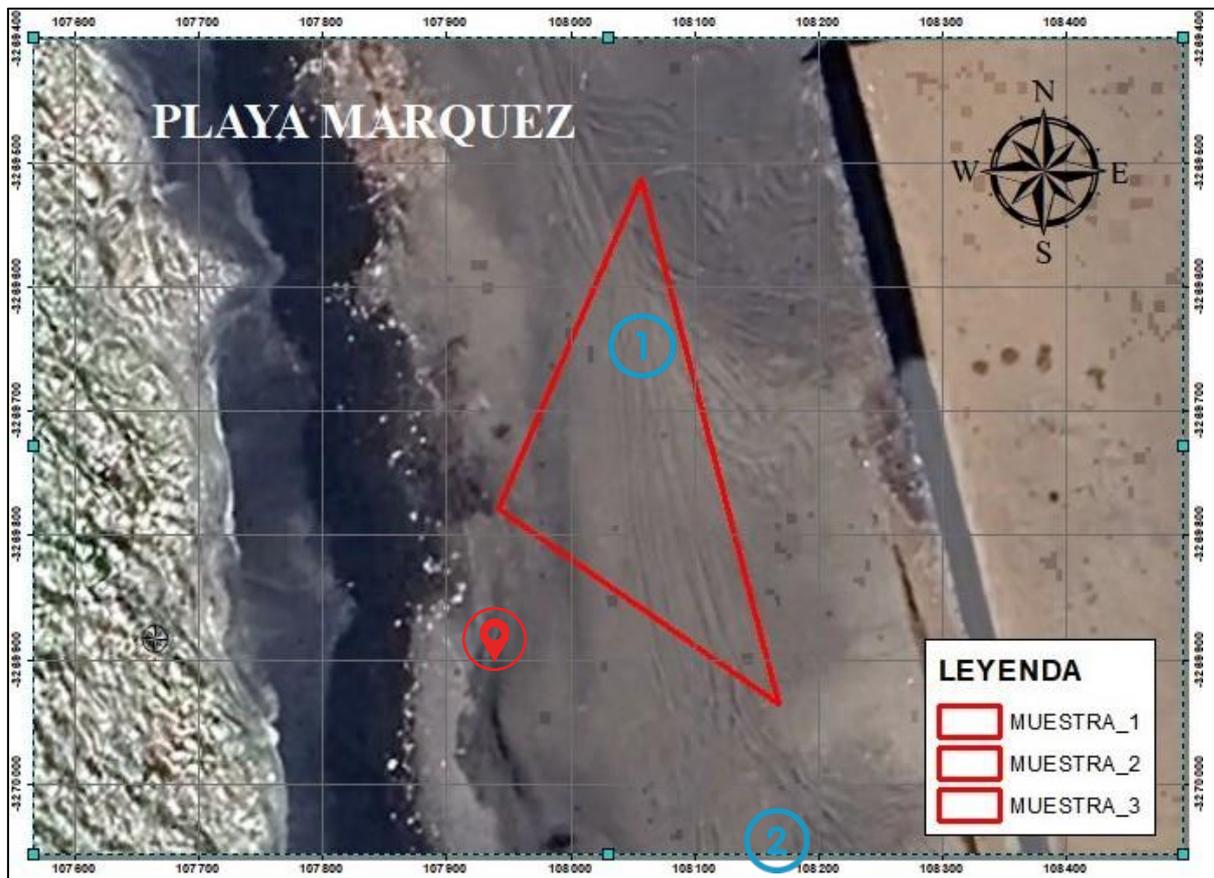


El muestreo se realizó en el mes de noviembre del año 2018, en tres puntos elegidos aleatoriamente a una profundidad máximo de 10 cm y con una distancia aproximada de 10 m por cada punto de muestreo, se obtuvieron 3 submuestra,

obteniendo 3 muestras finales representativas de aproximadamente 1 Kg de suelo contaminada con microplástico, se colocaron en bolsas ziploc de primer uso y se procedió a conservarlo en un cooler con cadena fría (4°C) para su traslado al laboratorio de microbiología de suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM) para ser analizadas.

Figura 7.

Vista satelital de los puntos de muestreos Aleatorio Simple



Fuente: Google Earth Pro, 2018

2.6.2. Determinación de parámetro fisicoquímico

Para la determinación del porcentaje de Humedad gravimétrica, potencial de

Hidrogeno (pH) y Conductividad eléctrica (CE), se empleó el método descrito por (United States Department of Agriculture [USDA], 2022), adaptado por en el laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas y Fertilizantes - LASPAF de la UNALM.

- Humedad gravimétrica (%)

- a) Se peso 10 g de muestra de suelo en peso húmedo (P_{mhd}) en una lata de aluminio, dos repeticiones por muestra, se colocaron en una estufa a temperatura de 105 °C por 24 horas.
- b) Pasado el tiempo determinado, las muestras se retiraron de la estufa, se pesaron hasta obtener un peso seco constante (P_{mse}), para posterior tener el porcentaje de humedad para 10 g de suelo seco.

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{P_{mhd} - P_{mse}}{P_{mse}} \times 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de humedad

- Potencial de hidrogeno (pH)

El pH de suelo fue medido en liquido sobrenadante en equilibrio a una suspensión de suelo - agua relación 1:1 en volumen: volumen.

- a) Se midió 20 mL de suelo en un vaso de capacidad de 100 mL.
- b) Se adiciono 20 mL de agua destilada, se agito intermitentemente durante 30 minutos y se dejó en reposo 15 minutos.
- c) Terminado el reposo se procedió a realizar la lectura de pH_w de suelo, se midió con un multiparámetro de marca consort y modelo C1020.

- Conductividad eléctrica (CE)

La conductividad de suelo fue medida en liquido sobrenadante en equilibrio a una suspensión de suelo- liquido en una relación de 1:5 en volumen: volumen.

- a) Se midió 20 g de suelo en un vaso de capacidad de 100 mL.
- b) Adicionar 50 mL de agua destilada, se agito intermitentemente por 30 minutos en agitador reciprocante.
- c) Se filtro usando un papel filtro y embudo, y se tomó la lectura del sobrenadante con un conductímetro de marca **Thermo Scientific y modelo Orion star A2120 corregida a 25°C.**

2.6.3 Aislamiento y caracterización microbiológica de suelo

Para fines del trabajo de investigación dio inició con la determinación de la población de hongo totales presente en el suelo, para luego proceder a su purificación e identificación taxonómica.

2.6.3.1. Aislamiento de hongos de suelo

Este procedimiento emplea el protocolo de laboratorio de microbiología de suelos (LMS) de la Facultad Agronomía de la (UNALM) descrito por [SSSA \(1994\)](#), adaptado por [García et al. \(2016\)](#). Las muestras se mantuvieron conservadas de forma adecuada en cadena fría (+4°C) antes y después de llegar al (LMS), posteriormente se procedió a realizar la siembra, para esto se utilizó el método de dilución en placas lo cual permitió sembrar y cuantificar colonias de hongos totales, para esto se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- a) Se peso 10 g de suelo seco equivalente a la masa de suelo húmedo; y se añadió a un frasco de vidrio con 90 mL de agua desionizada, previamente autoclavada a 121 °C por 15 minutos. Se agito vigorosamente por dos minutos con un agitador vortex hasta homogenizar la muestra.

- b) Con una pipeta estéril se tomó un 1 mL de la suspensión y se transfirió a un tubo con 9 mL de agua desionizada (10^{-2}), y así sucesivamente con las diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .
- c) Se transfirió una alícuota de 1mL de las diluciones realizadas a las placas Petri estériles (tres placas por dilución) y se incorporó el medio de cultivo medio de Martin a cada placa. Para inhibir la población bacteriana se añadió 10 mL de tetraciclina (antibiótico) por L de medio a pH 7.8 propio del suelo.
- d) Todas las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 28 °C, fueron controladas cada 2 días hasta su crecimiento óptimo.
- e) Al cabo de ocho días de siembra se obtuvo colonias en las placas y se hizo el conteo respectivo que contuvieran de 20-80 colonias y fueron expresados en UFC/g de suelo seco.

Al final del procedimiento se obtuvo dos morfotipos de hongos posiblemente de degradadores de plástico con las codificaciones H₂ y H₃, listo para para ser purificadas.

2.6.3.2. Purificación de hongos

Para el aislamiento se seleccionó los dos únicos morfotipos de hongos posibles degradadores de plástico codificados como H₂ y H₃, mediante un asa bacteriológica se transfirió una punción de hifas en cada placa Petri con medio V8 a pH 7.8, tres repeticiones por muestra, todas las placas se sellaron con parafilm, y se incubaron a 28 °C, fueron controladas cada 3 días para su crecimiento descrito por [SSSA \(1994\)](#), adaptado por [García et al. \(2016\)](#). Ocho días después, donde el crecimiento de los dos micromicetos fue óptimo, se procedió a realizar la prueba de identificación taxonómica para las dos cepas fúngicas.

2.6.3.3 Identificación taxonómica de las dos cepas de hongos

Las cepas fúngicas H₂ y H₃ purificadas en placa de agar V-8, se identificaron en base al examen microscópico, análisis morfológico y análisis Molecular (PCR) a través de la Clínica de Diagnostico de Fitopatología y Nematología de la (UNALM), obteniendo resultados después de un mes de solicitado el servicio, como se muestra en el (anexo 48 y 49).

2.6.4. Fase pre-experimental: Prueba de crecimiento de hongos de suelo en presencia de microplástico (LDPE)

En esta segunda fase se sometió a los dos hongos identificado como *Penicillium decumbens* Thon (H₂) y *Chaetomium globosum* (H₃) a una prueba de crecimiento de medio de cultivo de Martin, con su fuente de carbono de glucosa (C₆H₁₂O₆) y el resto fue remplazado como fuente de carbono, el microplástico (LDPE) de diferentes diámetros (>2, 2 y <1mm) y esterilizado con luz ultravioleta (UV). Adicionalmente se utilizó medio del propio suelo como un tratamiento.

2.6.4.1 Efectividad de crecimiento del hongo en diferentes medios de cultivos de prueba con y sin microplástico (LDPE)

Para fines de este estudio se tomó como referencia el ensayo de efectividad degradadora de polietileno y se adaptó los procedimientos descritos por [Khan et al. \(2017\)](#). Los hongos *P. Decumbens* y *C. Globosum* fueron sometidos a prueba de crecimientos en medios modificados (tabla 2).

Tabla 3.

Medio de cultivo de Martin modificado para evaluar la degradación LDPE

Medio de cultivo de Martin (MMG)		Medio de cultivo de Martin + LDPE	
C ₆ H ₁₂ O ₆ (Glucosa)	10.00 g	Microplástico (LDPE)	10.00 g
Peptona	5.00 g	Peptona	5.00 g

K ₂ HPO ₄	1.00 g	K ₂ HPO ₄	1.00 g
Rosa bengala	0.03 g	Rosa bengala	0.03 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.50 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.50 g
Agar	20.00 g	Agar	20.00 g
Agua destilada	1000 ml	Agua destilada	1000 ml
pH	5.5	pH	7.8

Fuente de carbono (LDPE) 10 g/L

Fuente de carbono (C₆H₁₂O₆) 10g/L

Esto se llevó a cabo bajo el siguiente procedimiento:

- a) Se preparó diferentes medios de cultivos: medio de suelo (MS), medio Martin más Glucosa (MMG), medio Martin sin glucosa con microplástico de LDPE > 2 mm (MM LDPE >2mm), medio Martin sin glucosa con microplástico de LDPE 2 mm (MMLDPE2mm) y medio Martin sin glucosa con microplástico de LDPE < 1mm (MMLDPE<1mm). Previamente autolavado a 121°C por 15 minutos y a pH 7.8.
- b) Se utilizó por cada 125 ml de medio de Martin sin glucosa, 1.25 g de microplástico (LDPE) previamente cortado y sometido al método de tamizado en seco. Esto fue vertido en cada placa Petri en cinco tratamientos con cinco repeticiones a excepción del primer medio de suelo (MS) y medio Martin más Glucosa (MMG).
- c) Una vez solidificado el medio y se procedió hacer la transferencia de una punta de las hifas a cada placa con dos punciones por cada morfotipo de hongo. Una vez culminado la siembra las placas se envolvieron con parafilm y fueron incubadas a 28 °C durante ocho días.
- d) Después de 3 días de incubación, donde el crecimiento de los hongos se observó en los cinco medios con o sin de plástico (>2 mm, 2 mm y < 1 mm), se tomó lectura de crecimiento hasta los ocho días pasada la siembra, se registraron

fotografías de la posible degradación de microplástico de LDPE en las muestras de ensayo.

2.6.5. Fase 1: Prueba de curva de pH

En esta tercera fase se sometió a los hongos *P. Decumbens* y *C. Globosum* a la prueba de curva de pH en medio de Martin (MM) sin glucosa y con glucosa.

2.5.5.1 Efecto del pH sobre el crecimiento de los hongos (H2) *P.*

Decumbens* y (H3) *C. Globosum

El ensayo se llevó a cabo a escala de laboratorio, se realizó 16 tratamientos por repeticiones, cada tratamiento con medio Martin sin glucosa (MMSG) y medio Martin con microplástico de LDPE en dimensiones de <1 mm (MMLDPE<1 mm) a diferentes niveles de pH 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5 por cada cepa encontrada H2 y H3.

- e) Para la prueba biodegradación, se agregó por cada matraz de 150 ml de medio de martin sin glucosa, 1.5 g de microplástico de LDPE de dimensiones de <1 mm de diámetro, previamente esterilizado con luz ultravioleta (UV) por 30 minutos y 15 minutos de oscuridad.
- f) Una vez plaqueado con (MMSG) y (MMLDPE<1 mm), se llevó a cabo un repique en cada placa de las dos cepas de hongos estudiadas. Una vez finalizado el ensayo, las placas se envolvieron con parafilm y fueron incubadas a 28 °C hasta su crecimiento óptimo.
- g) Al tercer día de incubación se hizo la primera lectura de crecimiento y la medición de diámetro de la colonia de H3 y H2 con una regla de medición en mm seguido del tercer, sexto y noveno día, como se muestra en el (anexo 3).

2.6.6. Fase 2: Respiración microbiana

En esta cuarta fase se sometió a los hongos (H₂) *Penicillium decumbens*

Thon y (H_3) *Chaetomium globosum* a la prueba de respiración, que consiste en cuantificar la cantidad de oxígeno respirado y la cantidad de anhídrido carbónico (CO_2) de los dos hongos de suelo en presencia de contaminación de microplástico (LDPE).

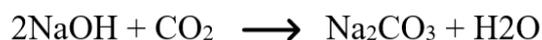
2.6.6.1. Ensayo de respiración microbiana.

La respiración microbiana, se llevó a cabo por el método de trampa de álcali descrito por (Alef, 1995, adaptado por García et al., 2016). Este ensayo se llevó a escala de laboratorio bajo el siguiente procedimiento:

- a) Se requirió un total de 23 recipientes de boca ancha de 500 mL limpios y esterilizados con luz ultravioleta; 4,5 Kg de arena autoclavado a una temperatura de 121°C por 15 minutos.
- b) Se preparó 500 ml por cada solución de NaOH a 1 N y HCl a 0.5 N para la prueba de respiración microbiana. También una solución de 30 ml de agua destilada esterilizada, disuelta con 0,5 mm² de micelio por cada especie de hongo.
- c) Una vez obtenido todos los materiales se procedió a pesar 150 g de arena autolavado en cada frasco, usando una piseta con agua destilada estéril se humedeció la arena hasta llevarlo a capacidad de campo.
- d) Luego de tener los frascos listos, 16 de ellos se dividieron en 4 tratamientos con cuatro repeticiones por cada morfotipo de hongo, se agregó 0.09 de LDPE de tamaño de >2 mm y 1 mm de diámetro, se homogenizó la arena con el microplástico.



- e) Se procedió agregar un inóculo de 1 ml a una concentración de 3.5×10^4 solución de hongos H₂ y H₃ por cada tratamiento.
- f) Los siete francos sobrantes, se utilizó en la preparación de cuatro basales, se pesó 150 g de arena, 1 ml de inóculo por cada hongo con 13 mL de una solución 1N de NaOH y los 3 frascos restantes fueron utilizado de blanco, solo con 13mL de 1N de NaOH.
- g) Todos los recipientes fueron incubados, tapados herméticamente y sellado con cinta, luego se ubicaron en un lugar fresco y oscuro, a fin de permitir el desarrollo de los microorganismos del suelo, se esperó 7 días para la lectura de medición de CO₂ emitido. La captura de CO₂ producido ocurre mediante la reacción:



- h) El CO₂ liberado se atrapó en un vial que contenía 13 mL de solución de 1N de NaOH; al final del período de incubación el vial se trasvasó cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer, y se enjuago el vial con agua estéril colocándolo en el matraz, se añadió 13 mL de solución de 1N de BaCl₂ para precipitar el BaCO₃ de acuerdo a la reacción:
- i) Para calcular la cantidad de CO₂ desprendido por la respiración durante el intervalo de 7 días, se utilizó la siguiente formula:

$$\text{CO}_2 = \frac{[(v \times Nb) - (g \times Na)] \times 22}{P \times ddi}$$

CO₂: cantidad de CO₂ capturado (mg).

v: volumen de base empleado (mL).

Nb: normalidad de la base empleada.

g: gasto de ácido registrado (mL).

Na: normalidad de ácido.

P: peso seco de muestra de suelo (g).

ddi: días desde instalación o última lectura.

Ecuación 2. Respiración microbiana

2.7. Variables evaluadas

Tabla 4.

Fase 1: Definición de variable de la tasa de crecimiento por efecto de pH

Tipo de Variable	Variable	Definición conceptual	Indicadores	Instrumentos
Independiente	Hongos, microplásticos (LDPE) y niveles de pH	Microorganismos heterótrofos que se alimentan absorbiendo nutrientes. (Sánchez, 2019) Macromoléculas que se forman a partir de la unión de moléculas pequeñas o monómeros. (Keenan y Wood, 1976)	g (MP)/L medio de cultivo.	Análisis microbiológico
Dependiente	Tasa de crecimiento de colonia H2* y H3**	Lectura de los diámetros de crecimiento micelial de la colonia fúngica del día inicial y final (Rojas y Hormanza, 2014)	Crecimiento de la colonia en mm / día	Contador de colonias y vernier en unidades de (mm)

H2* *Penicillium decumbens* Thom

H3** *Chaetomium globosum*

Tabla 5.

Fase 2: Definición de variable del ensayo de respiración microbiana

Tipo de Variable	Variable	Definición conceptual	Indicadores	Instrumentos
Independiente	Hongos y microplásticos (LDPE)	Son organismos heterótrofos que se alimentan absorbiendo nutrientes. (Sánchez, 2019) Es un plástico sintético estable, que consiste de largas cadenas de monómeros de etileno. (Mohee et al. 2008)	mg CO ₂ / g de suelo seco. día	Análisis de respiración microbiana.
Dependiente	Respiración microbiana H2* y H3**	Consiste en cuantificar la cantidad de O ₂ respirado y CO ₂ producido. (García, 2017)	mg CO ₂ / g de suelo seco. día	Bureta de Mohr.

H2* *Penicillium decumbens Thom*

H3** *Chaetomium globosum*

2.8. Diseño experimental

El diseño estadístico empleado fue un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial de 2 x 2 x 4 con cuatro repeticiones, pues consistió en tres (3) factores (2 Cepas, 2 MP y 4 nivel de pH), arrojando 16 tratamientos haciendo un total de 64 unidades experimentales, más 1 blanco por cada nivel de pH y MP. El paquete estadístico utilizado fue R con el que se analizó la varianza (anexo 7) y se hizo la prueba de comparación de múltiple de medias con Tukey.

Tabla 6.

Unidades experimentales de la investigación

Tratamientos	Cepas	Microplástico	Nivel de pH	Repeticiones
T ₁	H ₂	Con MP	5.5	4

T ₂	H ₂	Con MP	6.5	4
T ₃	H ₂	Con MP	7.5	4
T ₄	H ₂	Con MP	8.5	4
T ₅	H ₃	Con MP	5.5	4
T ₆	H ₃	Con MP	6.5	4
T ₇	H ₃	Con MP	7.5	4
T ₈	H ₃	Con MP	8.5	4
T ₉	H ₂	Sin MP	5.5	4
T ₁₀	H ₂	Sin MP	6.5	4
T ₁₁	H ₂	Sin MP	7.5	4
T ₁₂	H ₂	Sin MP	8.5	4
T ₁₃	H ₃	Sin MP	5.5	4
T ₁₄	H ₃	Sin MP	6.5	4
T ₁₅	H ₃	Sin MP	7.5	4
T ₁₆	H ₃	Sin MP	8.5	4

H₂ *Penicillium decumbens* Thom

H₃ *Chaetomium globosum*

MP Microplástico (LDPE)

El modelo aditivo lineal fue el siguiente:

Modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + ai + \beta j + ck + (a\beta)ij + (ac)ik + (\beta c)jk + (a\beta c)ijk + \varepsilon_{ijkl}$$

$$i = 1, 2 \quad a; \quad j = 1, 2 \quad \beta; \quad k = 1, 2 \quad c; \quad l = 1, 2, \dots, n$$

Dónde:

μ : es el efecto de la media general.

ai : es el efecto del i-ésimo nivel del factor A

βj : es el efecto del j-ésimo nivel del factor B

ck : es el efecto del k-ésimo nivel del factor C

$(a\beta)ij$, $(ac)ik$, $(\beta c)jk$: representan los efectos de las interacciones dobles, en los niveles ij , ik y ck respectivamente.

ε_{ijkl} : representa el error aleatorio

Tabla 7.

Cuadro del análisis de varianza (ANOVA)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F calculado
A	a -1	SC _A	CM _A	CM _A /CM _E
B	b -2	SC _B	CM _B	CM _B /CM _E
C	c -3	SC _C	CM _C	CM _C /CM _E
AB	(a -1) (b-1)	SC _{AB}	CM _{AB}	CM _{AB} /CM _E
AC	(a-1) (c-1)	SC _{AC}	CM _{AC}	CM _{AC} /CM _E
BC	(b-1) (c-1)	SC _{BC}	CM _{BC}	CM _{BC} /CM _E
ABC	(a-1) (b-1) (c-1)	SC _{ABC}	CM _{ABC}	CM _{ABC} /CM _E
Error	abc (n- 1)	SC _E	CM _E	
Total	abcn -1	SC _T		

2.9. Tratamiento en estudio

Tabla 8.

Fase pre- experimental: Tratamientos establecidos en la investigación del crecimiento del hongo en diferentes medios de cultivos más prueba con y sin microplástico (LDPE)

Tratamiento	Fuente	Cepas	Fuente de Carbono			
			C ₆ H ₁₂ O ₆ g/L	LDPE >2mm g/L	LDPE 2mm g/L	LDPE <1mm g/L
T₁	MS	H2	0	0	0	0
T₂	MMG	H2	10	0	0	0
T₃	MMSG + MP	H2	0	10	0	0
T₄	MMSG + MP	H2	0	0	10	0
T₅	MMSG + MP	H2	0	0	0	10
T₆	MS	H3	0	0	0	0
T₇	MMG	H3	10	0	0	0
T₈	MMSG + MP	H3	0	10	0	0
T₉	MMSG + MP	H3	0	0	10	0
T₁₀	MMSG + MP	H2	0	0	0	10

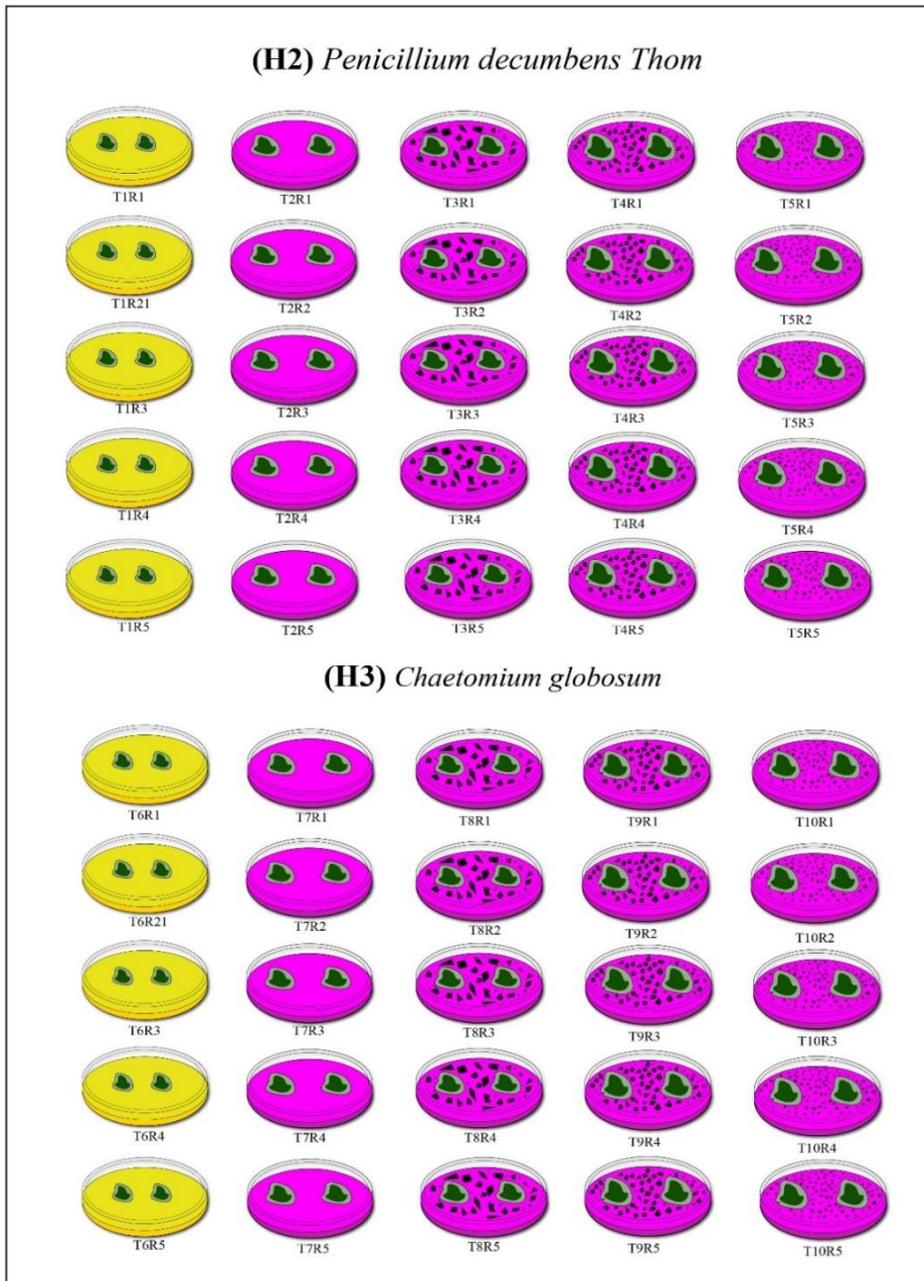
H₂ *Penicillium decumbens* Thom

H₃ *Chaetomium globosum*

MP Microplástico (LDPE)

Figura 8.

Croquis de la distribución de tratamiento y repeticiones de aislamiento microbiano, T₁ (medio suelo), T₂ (medio de martin), T₃ (medio de martin + >2mm LDPE), T₄ (medio de martin + 2mm LDPE y T₅ (medio de martin + < 1mm LDPE) por cada cepa de hongo



Fuente: Elaboración propia, 2023.

Tabla 9.

Fase 1: Tratamientos establecidos en la investigación del efecto de pH sobre el crecimiento de los hongos (H₂) P. Decumbens y (H₃) C. Globosum

Tratamientos	Fuente	Cepas	Nivel de pH	MP (LDPE)<1mm (g/L)
T ₁	MMSG	H ₂	5.5	10.00
T ₂	MMSG	H ₂	6.5	10.00
T ₃	MMSG	H ₂	7.5	10.00
T ₄	MMSG	H ₂	8.5	10.00
T ₅	MMSG	H ₂	5.5	0.00
T ₆	MMSG	H ₂	6.5	0.00
T ₇	MMSG	H ₂	7.5	0.00
T ₈	MMSG	H ₂	8.5	0.00
T ₉	MMSG	H ₃	5.5	10.00
T ₁₀	MMSG	H ₃	6.5	10.00
T ₁₁	MMSG	H ₃	7.5	10.00
T ₁₂	MMSG	H ₃	8.5	10.00
T ₁₃	MMSG	H ₃	5.5	0.00
T ₁₄	MMSG	H ₃	6.5	0.00
T ₁₅	MMSG	H ₃	7.5	0.00
T ₁₆	MMSG	H ₃	8.5	0.00

Tabla 10.

Fase 1: Blancos establecidos de los tratamientos de la investigación del efecto de pH sobre el crecimiento de los hongos (H₂) P. Decumbens y (H₃) C. Globosum

Blancos	Fuente	Cepas	Nivel de pH	MP (LDPE)<1mm (g/L)
B ₁	MMSG	-	5.5	10.00
B ₂	MMSG	-	6.5	10.00
B ₃	MMSG	-	7.5	10.00
B ₄	MMSG	-	8.5	10.00
B ₁	MMSG	-	5.5	0.00
B ₂	MMSG	-	6.5	0.00
B ₃	MMSG	-	7.5	0.00
B ₄	MMSG	-	8.5	0.00

Figura 9.

Croquis de la distribución de tratamiento y repeticiones del efecto pH con dos especies de hongos

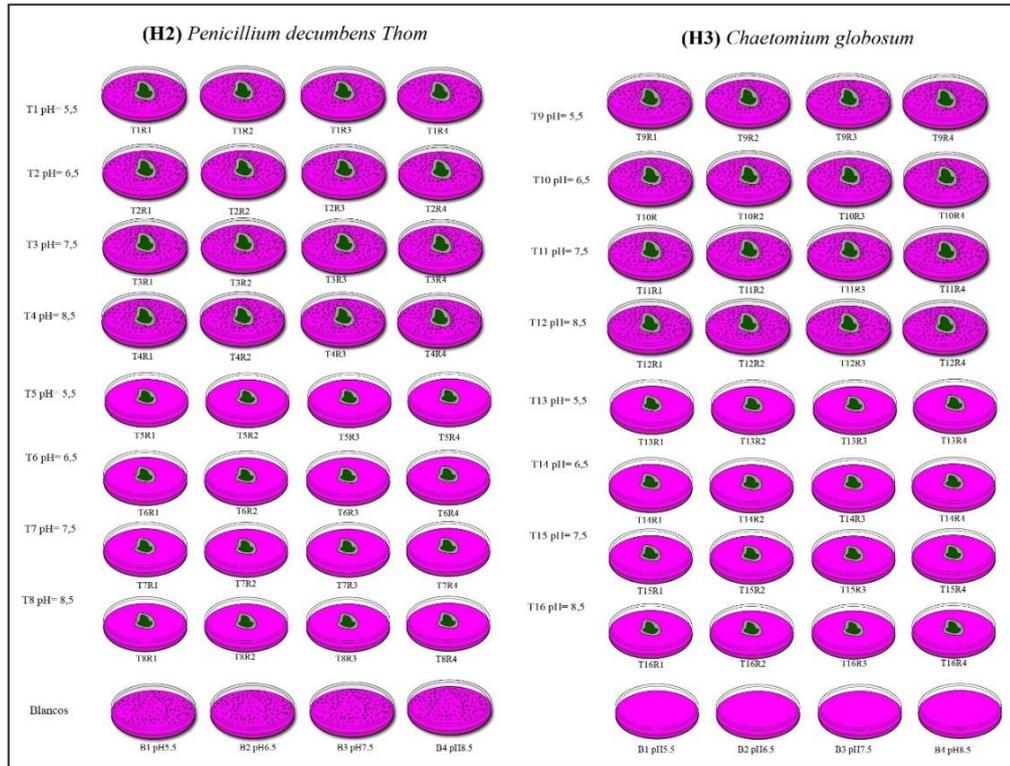


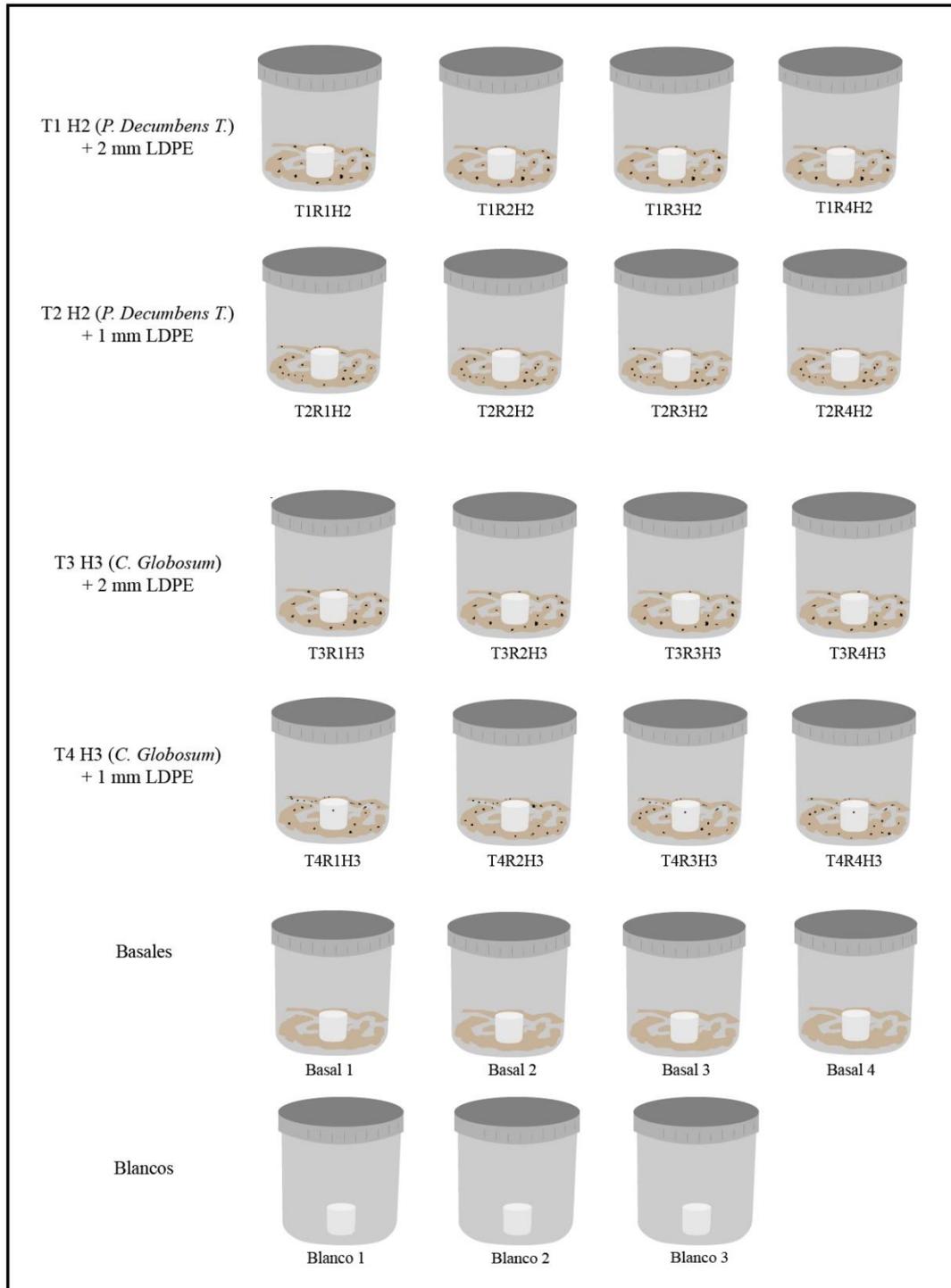
Tabla 11.

Fase dos: Tratamientos establecidos en la investigación de la respiración microbiana en presencia de LDPE a diferentes tamaños de diámetro

Tratamiento	Cepas	LDPE 1mm g	LDPE 2mm g	Arena estéril g
T ₁	H ₂	0.09	0.00	150
T ₂	H ₂	0.00	0.09	150
T ₃	H ₃	0.09	0.00	150
T ₄	H ₃	0.00	0.09	150
Basal	-	0.00	0.00	150
Blanco	-	0.00	0.00	0

Figura 10.

Croquis de la respiración microbiana en presencia de microplástico LDPE a dos diferentes diámetros de tamaño



Fuente: Elaboración propia, 2023.

2.10. Aspectos Éticos

Para desarrollar la presente investigación, se tomó en cuenta los aspectos éticos que determina el Decreto Legislativo N° 822, Ley sobre el Derecho de Autor, que aprobó el Reglamento de Propiedad Intelectual de la Universidad Privada del Norte, así como también cabe recalcar que las investigaciones consideradas tanto para cada cita y referencia se aplicó adecuadamente la norma APA 7. Así mismo el contenido de la investigación no incluye textos de plagio de otras investigaciones ya que se citó al autor correspondiente.

Con relación a los resultados obtenidos, no se alteró los datos reales ya que se realizó una fase preexperimental y se utilizó el instrumento de recolección de datos durante la ejecución del trabajo de investigación, en ese sentido es una investigación inédita por que se obtuvo datos de un tema poco estudiado con muchas limitaciones en cuanto metodología y espacio de trabajo se requiere.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

A continuación, se detalla la tabla de interpretación en la presente investigación:

Tabla 12.

Códigos de interpretación de resultados

Código	Significado
M ₁ R ₁	Muestra 1, repetición 1
M ₂ R ₁	Muestra 2, repetición 1
M ₃ R ₁	Muestra 3 repetición 1
H2_CMP_pH	Hongo 2, con microplástico a pH 5.5
H2_SMP_pH	Hongo 2, sin microplástico a pH 5.6
H3_CMP_pH	Hongo 3, con microplástico a pH 5.5
H3_SMP_pH	Hongo 3, sin microplástico a pH 5.6
H2 -1	Hongo 2, microplástico de 1 mm de diámetro
H2 -2	Hongo 2, microplástico de 2 mm de diámetro
H3 -1	Hongo 3, microplástico de 1 mm de diámetro
H3 -2	Hongo 3, microplástico de 2 mm de diámetro

Los resultados de esta investigación se han interpretado considerando su finalidad realizando un análisis crítico y objetivo. A continuación, se presentan los datos obtenidos en la investigación, los mismos que están representados en la tablas y figuras.

3.1 Caracterización de los parámetros fisicoquímicos del suelo

3.1.1 Potencial de Hidrogeno (pH) y Conductividad eléctrica (CE)

La determinación de pH y CE se realizó en el laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas y Fertilizantes - LASPAF de la UNALM, usando un Phmetro marca Inolab y un conductímetro de marca **Thermo Scientific, modelo Orion star A2120**, fue medido en liquido sobrenadante en equilibrio a una suspensión de suelo-liquido en una relación de 1:1 en volumen: volumen, realizando 1 repeticiones por cada muestra.

Tabla 13.

Resultados de la característica fisicoquímica de las muestras de suelo de playa

Código de muestra	Potencial de Hidrogeno (pH)	Conductividad Eléctrica (mS/cm)
M ₁	7.87	9.8
M ₂	7.49	10.7
M ₃	7.82	15.0

En la Tabla 13, podemos observar que el pH de las muestras de suelo M₁, M₂ y M₃ son ligeramente alcalino. Siendo la de mayor escala la muestra uno (M₁) con un valor de pH 7.87 que tiene una tendencia a ser moderadamente alcalino, típico de suelos arenosos de playa. También se puede observar que la conductividad eléctrica C.E de las muestras de suelos finales son fuertemente salinas con un valor >8 mS/cm. Siendo la mayor escala la muestra tres (M₃) con una lectura de 15.0 mS/cm.

3.1.2 Determinación de humedad gravimétrica

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la prueba de humedad gravimétrica de suelo para la obtención de los pesos de suelo húmedo equivalente a 10 g de suelo seco. Se realizó 2 repeticiones por cada muestra.

Tabla 14.

Resultados de porcentaje de humedad gravimétrica para 10 g de suelo seco

Código	Masa de la placa petri (g)	Suelo húmedo (g)	Masa de la placa + suelo (g)	Masa de la placa + suelo seco	Masa del suelo húmedo equivalente a 10 g	Humedad gravimétrica (%)
M ₁ R ₁	3.67	30	33.670	33.460	10.08	
M ₁ R ₂	3.64	30	33.640	33.380	10.08	0.45
M ₂ R ₁	3.69	30	33.690	33.540	10.05	
M ₂ R ₂	3.66	30	33.660	33.540	10.05	0.65
M ₃ R ₁	3.67	30	33.670	33.510	10.07	

M ₃ R ₂	3.66	30	33.660	33.430	10.07	0.79
-------------------------------	------	----	--------	--------	-------	------

3.2 Aislamiento y caracterización microbiológica de hongos de suelo

3.2.1 Aislamiento de hongos de suelo en contacto con residuos microplástico

Se presenta los resultados del promedio de las tres muestras de suelo de playa con presencia de microplástico (LDPE). Reportándose el crecimiento fúngico en Unidades Formadoras de Colonia UFC/g de suelo seco, siendo el crecimiento optimo en un tiempo de 192 horas a una temperatura de incubación de 28°C.

Tabla 15.

Resultados del aislamiento de la población de hongos totales de suelo de vertedero de la playa Marquez en el distrito de Ventanil

Código de campo	Humedad gravimétrica (%)	Hongos de suelo UFC/g de suelo seco
M ₁	0.45	7.0 x 10 ⁴
M ₂	0.65	2.5 x 10 ⁴
M ₃	0.79	8.0 x 10 ⁴

UFC* Unidad formadora de colonias

En la Tabla 13, se aprecia el recuento de colonias fúngicas al octavo día de crecimiento, después de realizada la siembra microbiológica. La población de hongos totales de suelos de playa nos da un mayor valor de 8.0 x 10⁴ UFC/g de suelo seco, correspondiente a la muestra tres (M₃), siendo la de menor recuento la muestra dos (M₂) con un valor de 2.5 x 10⁴ UFC/g de suelo seco. Se selecciono las placas con mejores características morfológicas obteniendo dos cepas H₂ y H₃, se identificó en base al examen microscópico, análisis morfológico y análisis Molecular (PCR) a través de la Clínica de Diagnostico de Fitopatología y Nematología de la (UNALM), obteniendo

resultados de las especies *Penicillium decumbens* Thom (H₂) y *Chaetomium globosum* (H₃).

3.2.2 Características macroscópica y microscópica

Mediante las características macroscópicas y microscópicas se empleó la clave taxonómica de Pitt (1988), los dos aislamientos fueron obtenidos de una muestra de suelo, presentando las siguientes características (anexo 14). Después de 4 días de incubación a 28°C en el medio de Martin la cepa H₂ presento las siguientes características macroscópicas: colonias de crecimiento rápido, de forma redondeada, abombada (levantada) al centro, pulverulenta de textura aterciopelada, al principio de color blanco y con el tiempo adquirió un color verde-azulado y con bordes delgado de color blanco, en el reverso incolora (anexo 21). Así mismo la cepa H₂ tuvo las siguientes características microscópicas: Micelio hialino 2.6 µm de diámetro y tabicado forman abundantes conidióforos cortos de 53 x 2.6 µm estrictamente monoverticiliados (sin ramificaciones), incoloros y lisos, tabicados con una vesícula frecuentemente en número de hasta 5; conidias redondeadas, pequeñas (2.3 µm) ligeramente pigmentadas y de pared lisa formando largas y compactas cadenas visibles fácilmente con el microscopio estereoscópico (anexo 37).

Por otra parte, se realizó la descripción de la cepa H₃ presentando las siguientes características macroscópicas: Después de 5 días de incubación a 28°C en el medio de Martin la cepa tuvo un crecimiento de colonia medio, de forma redondeada, abombada (levantada) al centro, de textura algodonosa, al principio de color blanco y con el tiempo adquirió un color verde grisáceo y con bordes grandes de color blanco, en el reverso incolora, la coloración (anexo 22). De la misma forma la cepa H₃ se sometió a una

descripción microscópica: Encontrándose solo el micelio hialino sin estructuras reproductivas por esta razón no se pudo realizar la descripción correspondiente, el crecimiento y comportamiento de esta cepa fúngica en específico, depende mucho del medio selectivo a utilizarse.

3.3 Fase preexperimental: Prueba de efectividad de crecimiento de hongo en medio de cultivos sin y con microplástico de diferentes diámetros (> 2mm, >1mm y <1mm).

Para esta fase preexperimental se trabajó con el medio de cultivo de Martin, los resultados fueron de manera preliminar y se observó el crecimiento de colonias fúngicas en los 5 tratamientos establecidos: T₁ (medio suelo), T₂ (medio de martin), T₃ (medio de martin + >2mm LDPE), T₄ (medio de martin + 2mm LDPE) y T₅ (medio de martin + < 1mm LDPE), de las cepas H₂ y H₃. En el anexo 1 y 2 muestra los resultados observados en los cuadros de los tratamientos y repeticiones empleados para la prueba de efectividad de crecimiento de los dos hongos en medio de cultivo con y sin microplástico LDPE, de los cuales el crecimiento de colonias se desarrolló casi de la misma manera y se evaluaron de la siguiente manera (1 bajo, 2 moderado, 3 abundante, 4 muy abundante), la diferencia estuvo en el aumento de la velocidad de crecimiento de las cepas de acuerdo al tiempo de incubación por 96, 144 y 192 horas. Se evidencio que la especie (H₂) *Penicillium decumbens* del T₂ obtuvo un mayor crecimiento de los diámetros de la colonia a los 8 días del aislamiento seguido del T₄ y T₅. En el caso de la especie (H₃) *Chaetomium globosum* también se obtuvo el crecimiento de colonias fúngicas en los 5 tratamientos, siendo la de mayor diámetro de crecimiento de la colonia en el T₄ seguido del T₃.

3.4 Fase 1: Medición de la tasa de crecimiento de diámetro de las colonias fúngicas en presencia de microplástico y niveles de pH al noveno día después de la siembra.

El análisis de varianza de welch (anexo 7) sobre el efecto del tipo de cepas, microplástico y pH sobre el diámetro de las colonias fúngicas al tercero, sexto y noveno día de la siembra muestra que la interacción de las tres variables es altamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 16.

*Efecto del pH en medio con y sin microplástico, sobre la tasa de crecimiento de las especies *Penicillium decumbens* Thom (H_2) y *Chaetomium globosum* (H_3)*

Tratamiento	Cepas	Microplástico	pH	Tasa de crecimiento
T ₁	H ₂	CMP	5.5	0.222 ab
T ₂	H ₂	CMP	6.5	0.141 cd
T ₃	H ₂	CMP	7.5	0.146 cd
T ₄	H ₂	CMP	8.5	0.092 ce
T ₅	H ₂	SMP	5.5	0.135 c
T ₆	H ₂	SMP	6.5	0.128 c
T ₇	H ₂	SMP	7.5	0.101 ce
T ₈	H ₂	SMP	8.5	0.062 e
T ₉	H ₃	CMP	5.5	0.311 f
T ₁₀	H ₃	CMP	6.5	0.280 af
T ₁₁	H ₃	CMP	7.5	0.241 ab
T ₁₂	H ₃	CMP	8.5	0.255 abf
T ₁₃	H ₃	SMP	5.5	0.276 af
T ₁₄	H ₃	SMP	6.5	0.227 ab
T ₁₅	H ₃	SMP	7.5	0.201 bd
T ₁₆	H ₃	SMP	8.5	0.089 ce

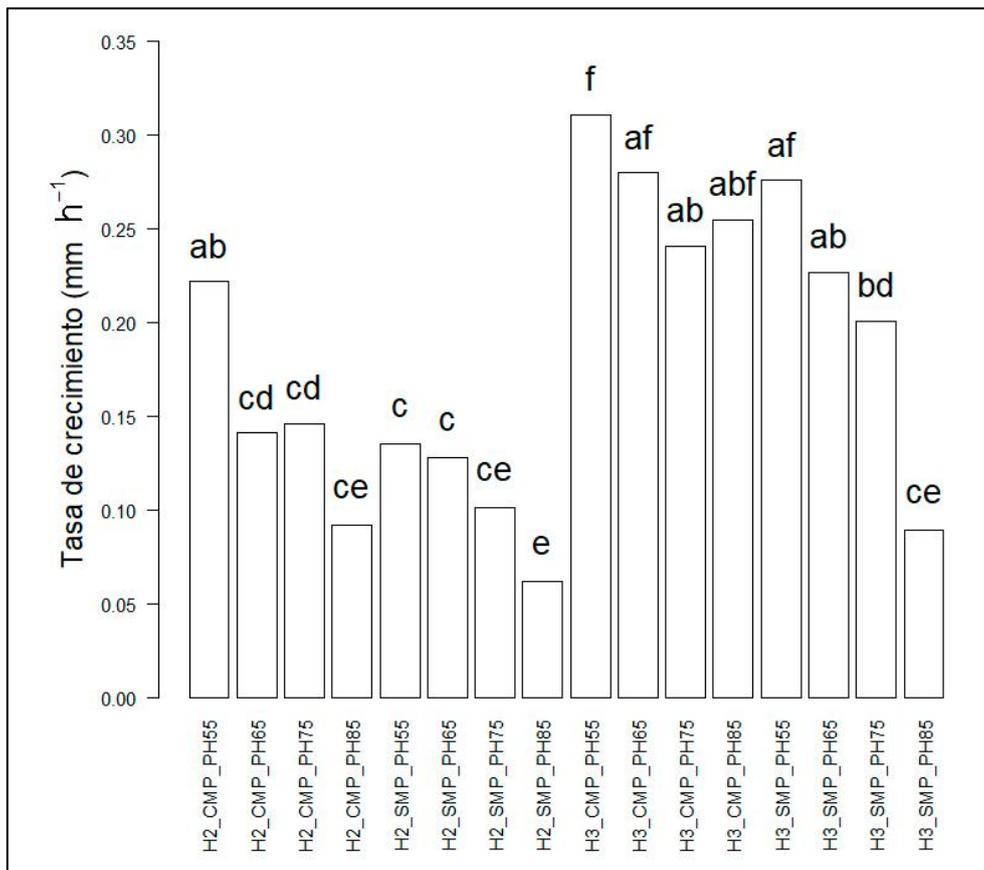
Medias de los tratamientos dentro de la misma columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) para a la prueba de Tukey

El análisis de comparación múltiples de medias (prueba de Tukey) de los tratamientos de estudios, de los factores cepas, microplástico LDPE y pH se presenta en

la la Figura 11 para el diámetro de crecimiento en mm h^{-1} con respecto al tipo de cepa, en ello se observa la tasa de crecimiento de las dos cepas fúngicas, siendo (H_3) *Chaetomium globosum* de un diámetro estadísticamente superior a la (H_2) *Penicillium decumbens Thom* con un promedio de 0.311 mm. h^{-1} y 0.222 mm. h^{-1} (H_2) respectivamente.

Figura 11.

Tasa de crecimiento de las especies Penicillium decumbens Thom (H_2) y Chaetomium globosum (H_3) en medio con y sin microplástico y diferentes niveles de pH



Letras distintas significa resultados estadísticos diferentes en función a un ($p < 0.05$) para a la prueba de Tukey

3.5 Fase 2: Respiración microbiana de los hongos inmersas en suelo de origen y dos niveles de diámetro de LDPE (2mm y 1mm).

En la tabla 17 se aprecia la respiración de los hongos de estudio (H₂) y (H₃) en dos niveles de diámetro de microplástico (LDPE), fluctúa entre 0.016 y 0.043 mg CO₂ / g de suelo seco que corresponden a los tratamientos T3 y T4 respectivamente.

En el análisis de varianza (Anexo 9) indica que hay diferencia significativa para la variable de respuesta “respiración microbiana” de las cepas fúngicas a los siete días de haberse incubado, se presenta en la (figura 12), muestra que la interacción entre los dos factores es altamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 17.

*Efecto de las especies *Penicillium decumbens* Thom (H₂) y *Chaetomium globosum* (H₃) en suelo más diferente diámetro de microplástico (LDPE) sobre la respiración microbiana*

Tratamiento	Cepas	Fuente: LDPE		Respiración mg CO ₂ / g de suelo
		(1mm) g ⁻¹	(2mm) g ⁻¹	
T ₁	H ₂	0.09	0.00	0.021 bc
T ₂	H ₂	0.00	0.09	0.035 ab
T ₃	H ₃	0.09	0.00	0.016 c
T ₄	H ₃	0.00	0.09	0.043 a

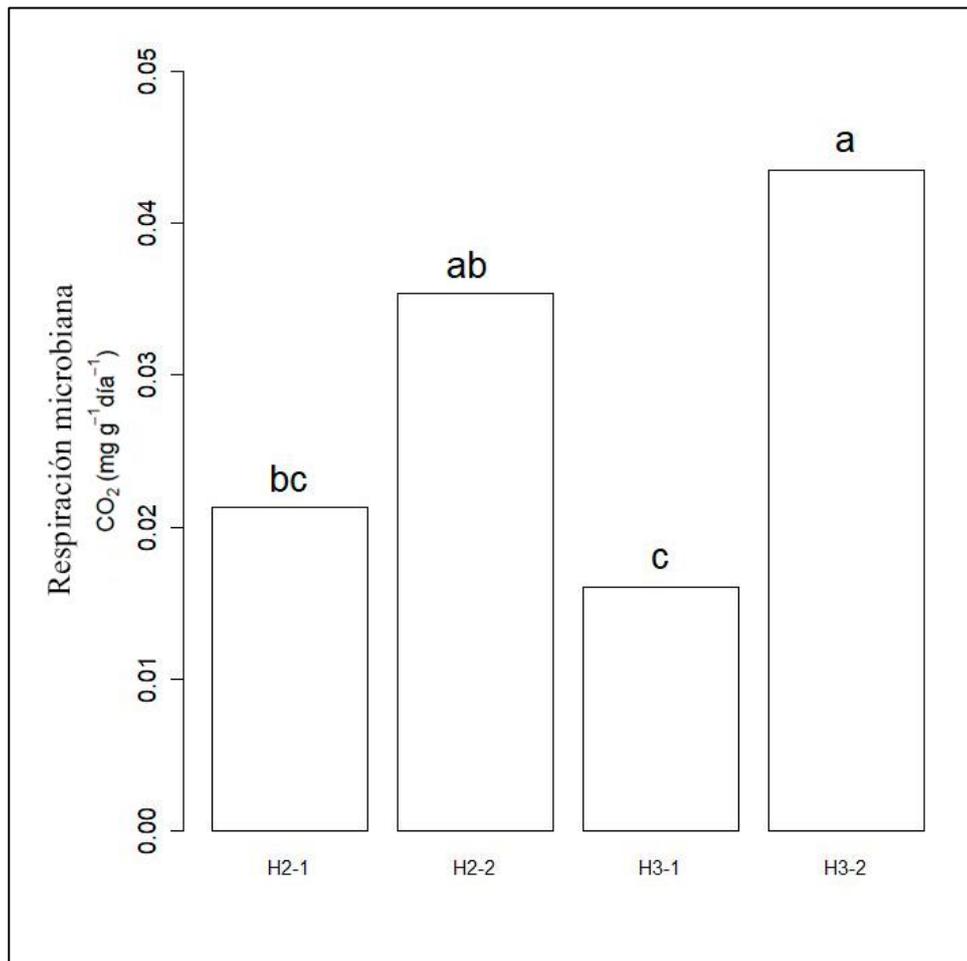
Medias de los tratamientos dentro de la misma columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) para a la prueba de Tukey

La prueba para promedios de Tukey para la respiración microbiana de suelo más microplástico (LDPE) a diámetros de 1 mm y 2 mm con respecto al tipo de cepa, siendo a diámetro de 2 mm *Chaetomium globosum* (H₃) estadísticamente superior en

comparación de *Penicillium decumbens* Thom (H₂) con un promedio de 0.043 mg CO₂ / g de suelo seco + h⁻¹ para (H₃) y 0.035 mg CO₂ / g de suelo seco. h⁻¹ para (H₂). En cambio, sucedió todo lo contrario para (H₂) a diámetro de 1 mm, se evidencio estadísticamente inferior en comparación de (H₃) a los siete días de haberse incubado respectivamente Figura 12.

Figura 12.

Resultado de respiración microbiana de suelo con microplástico LDPE



Letras distintas significa resultados estadísticos diferentes en función a un (p<0.05) para a la prueba de Tukey.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1 Discusiones

La contaminación plástica ha provocado una grave crisis ambiental para los sistemas ecológicos terrestres. Por lo tanto, es de interés científico explorar los diversos microorganismos que degradan el microplástico en el suelo y saber los parámetros fisicoquímicos que están involucrados, para un mayor entendimiento y aceleración de la biodegradación del microplástico. En este estudio, se aisló y estudio dos cepas fungales respecto a la biodegradación de partículas de (LDPE) de muestras de suelo más microplástico donde se encontraron microorganismos alcalofilos (Figura 7), teniendo un valor de $\text{pH} > 7.5$ clasificado como ligeramente alcalino, esto no afecta el crecimiento y la producción de los hongos. Según [Romero et al, \(2008\)](#) el rango de pH ideal de estos microorganismos puede variar dependiendo de la especie de hongo. Algunos pueden crecer mejor en un ambiente ácido, mientras que otros prefieren un ambiente alcalino, pero en general, un pH entre 5.5 y 7.5 suele ser adecuado para su crecimiento para la gran mayoría de las especies de hongos. De acuerdo [Rojas, \(2004\)](#) la microbiota fúngica con capacidad de crecer en medios altamente alcalinos con pH 8-10, hace suponer que tengan la propiedad de segregar enzimas alcalino tolerantes o alcalinoactivas, requeridas para la degradación de los sustratos presentes en el suelo.

Por otra parte, la conductividad eléctrica (CE) de las muestras de suelos se encontraron fuertemente salinas con un valor >8 mS/cm, se muestra una relación directa con la humedad gravimétrica en (%) de la M_3 y la cantidad de hongos reportados (Tabla 13). Según [Gutiérrez, \(2019\)](#) los hongos necesitan una cierta cantidad de humedad para sobrevivir y reproducirse, si el ambiente está demasiado seco, los hongos no podrán crecer adecuadamente. Por otro lado, si el ambiente está demasiado húmedo, puede

proporcionar un entorno propicio para el crecimiento excesivo de hongos. En ese sentido se comprende los valores encontrados en el punto de muestreo 3, debido a que la muestra tomada estaba más cerca al mar, por ende, conlleva a tener una mayor humedad de suelo (Anexo 14).

Los resultados de los análisis estadísticos de la tasa de crecimiento de las dos cepas de hongos, podemos determinar que fueron afectados a diferentes niveles de pH, siendo favorable en el medio ácido con microplástico (CMP). Se observa que el valor óptimo para las dos cepas fúngicas es a pH 5.5, la cepa H₃ *Chaetomium globosum* tuvo la de mayor tasa de crecimiento del diámetro de 0.311 mm. h⁻¹ en comparación a la cepa H₂ *Penicillium decumbens Thom* de 0.222 mm. h⁻¹. Según [Gutiérrez, \(2019\)](#) el desarrollo de la flora microbiana en el suelo a un nivel de pH 5 la predominancia en su mayoría son los hongos, evidenciando un mayor crecimiento de su población en comparación a otros niveles de pH superiores.

El crecimiento de la cepa *Chaetomium globosum* fue 27.75 mm en promedio, a los 3 días aproximadamente después de la siembra, comenzando a formar hifas al segundo día mientras la cepa *Penicillium decumbens Thom* tuvo un 15.5 mm, siendo inferior al primero (Figura 12). Las dos cepas de estudio crecieron en todos los tratamientos a pH 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5 con (CMP) y sin (SMP), donde el pH 5.5 con microplástico (CMP) tenía valores superiores de tasa de crecimiento al medio sin microplástico (SMP). Esto puede deberse a las condiciones en que crece los hongos en el suelo y toleran un amplio rango de pH (5 a 9) sin impedir su desarrollo ([Rousk et al., 2010](#)), sin embargo, algunos hongos muestran preferencia por ciertos valores de pH, ([Winterhoff et al., 1992](#)) e incluso algunas especies de ellos han evolucionado para adaptarse y crecer en ambientes terrestres y marinos bajo condiciones extremas

(Raghukumar, 2017).

Los análisis de la varianza factorial nos indicaron que si hay diferencia significativa de la tasa de crecimiento para H₂ CMP a pH 5.5 en comparación de los tratamientos H₂ CMP a pH 6.5, 7.5, 8.5 y H₂ SMP a pH 5.5, 6.5, 7.5, 8.5; pero al comparar el crecimiento de la cepa H₃ podemos determinar que sin hay diferencia significativa de los crecimientos en los tratamientos H₃ CMP a pH 5.5, H₃ CMP a pH 6.5, H₃ CMP a pH 8.5, en comparación de los tratamientos H₃ SMP a diferentes niveles de pH. [Gutiérrez \(2019\)](#) indicando que a pH 5 predominan los hongos evidenciando una erosión del biofilm en el polietileno de baja densidad (LDPE). De acuerdo [Sánchez \(2020\)](#), la actividad microbiana sobre los plásticos está dada por una acción enzimática y esto se debe a los hongos que invaden sustratos mediante el uso de enzimas que tienen la capacidad de desintoxicar contaminantes y pueden actuar sobre sustratos inespecíficos, la capacidad de los hongos para producir hidrofobinas para el recubrimiento de superficies para unir hifas a sustratos hidrofóbicos e hifas.

Se ha informado que, en general, los hongos degradan mejor el PE y el poliuretano que las bacterias ([Pathak y Navneet, 2017](#); [Muhonja et al. 2018](#)). Esto se debe a que los hongos poseen un sistema enzimático intracelular actúa como un mecanismo interno para la desintoxicación y juega un papel importante en la adaptación fúngica ([Jeon et al. 2016](#); [Olicón-Hernández et al. 2017](#); [Schwartz et al. 2018](#)). Este sistema enzimático es mediado por la familia del citocromo P450 (CYP) epoxidasas (enzimas de Fase I) y transferasas (enzimas de Fase II) más diversas que los animales, las plantas o las bacterias, en ese sentido los hongos juegan un papel crucial en la degradación y mineralización de diversos contaminantes ambientales al catalizar importantes reacciones químicas ([Shin et al., 2018](#)). En consecuencia, *Chaetomium*

globosum posee una mejor tasa crecimiento para degradar LDPE que *Penicillium decumbens Thom* (Figura 13).

Los resultados obtenidos de la respiración microbiana, indicaron que la actividad fúngica entre los distintos tratamientos alcanzando valores de CO₂ acumulado de 0.021, 0.035, 0.016 y 0.043 mg CO₂ / g de suelo seco. h⁻¹ en H2-1, H2-2, H3-1 y H3-2, respectivamente. Esto puede deberse a la aplicación de residuos microplástico y provocar un incremento en la respiración respecto a la muestra basal (anexo 4). De acuerdo [Luo et al., \(2022\)](#), esto se debe a que los hongos pueden adaptarse y sobrevivir en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes, bajo pH y baja la humedad. Este incremento se puede atribuir al contenido de fuente de C presente en los materiales de microplástico, los cuales pueden estar suministraron la fuente necesaria para la proliferación de los hongos responsables de la descomposición ([Guerrero et al., 2022](#)).

El tratamiento H3-2 con MP (LDPE) con diámetro de 2 mm fue el que presentó un mayor desprendimiento de CO₂ con un valor promedio de 0.043 mg CO₂ / g de suelo seco. día, mientras H₂-2 presento 0.035 mg CO₂ / g de suelo seco. día, los tratamientos H3-1 y H2-1, presentaron menor incremento de la respiración, esto se debe a que estos tratamientos posiblemente contienen un material de más difícil descomposición. ([Guerrero et al., 2022](#)). Esto se puede atribuir a que los microplástico presentaron distintas etapas de descomposición ya que cada uno tuvo un proceso biológico donde el colapso físico y la transformación bioquímica de las moléculas de los complejas de los materiales muertos se convirtieron en moléculas simples e inorgánicas ([Juma, 1998](#)). El desprendimiento de CO₂, puede considerarse como uno de los parámetros sensibles a los cambios que ocurren en la transformación de compuesto de carbono ([Ayala, 2015](#)).

4.2 Limitaciones

En cuanto a la principal limitación, estuvo relacionado con el aislamiento microbiológico de los hongos de suelo, debido que la Universidad Privada del Norte no contaba con una “Cámara de flujo laminar” para poder llevar a cabo la siembra microbiológica y asegurar un aislamiento sin presencia de contaminación por otro agente externo a la muestra de trabajo, por ello todos los ensayos microbiológicos como parámetros fisicoquímicos se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas y Fertilizantes - LASPAF de la UNALM.

Otra de las limitaciones fue no contar con equipos modernos como Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR-ATR) y microscopio electrónico de barrido (SEM) para poder llevar a cabo los análisis de cuantificación de la biodegradación de los microplástico por acción de los hongos aislados de los suelos de la playa Marquez.

4.3 Implicancia

En cuanto a la implicancia teórico, el trabajo de investigación permitió integrar estudios tanto nacional e internacional relacionado con la misma finalidad del presente estudio, que conllevó en encontrar una revisión bibliográfica de cepas fungales que puedan adaptarse y biodegradar los residuos microplástico en el suelo. Con relación a la implicancia práctica, en base a los resultados obtenidos después de la obtención de los hongos, *Chaetomium globosum* (H₃) y *Penicillium decumbens Thom* (H₂), se demostró su capacidad para adaptarse al medio con microplástico LDPE a diferentes niveles de pH, en base a ello puede ser considerado como una herramienta de solución a la contaminación plástica en ambiente terrestre y suelo (botaderos), ya que hasta la

actualidad la calidad de suelo es deficiente, asimismo es una opción natural que no afecta a la salud humana e inofensivo para el medio ambiente a comparación agentes químicos oxidantes que son utilizados en la actualidad para dicho propósito.

4.4 Conclusiones

Los hongos que presentaron una mejor capacidad adaptativa fueron *Chaetomium globosum* (H₃) y *Penicillium decumbens Thom* (H₂). Ya que presentaron una mayor tasa de crecimiento y una mayor respiración microbiana.

Los hongos de estudios presentaron una población microbiana baja en condición < 1% de humedad gravimétrica del suelo. Los niveles de pH fueron ligeramente alcalinos y con una CE fuertemente salina por ese motivo hubo un retraso en la actividad de crecimiento, esas fueron las condiciones en que ambos hongos se encontraron.

Se aislaron e identificaron dos cepas de hongos de suelos contaminando con microplástico LDPE en Ventanilla las cuales fueron, las pruebas morfológicas mostraron la presencia de *Penicillium decumbens Thom* y *Chaetomium globosum* y el análisis molecular (PCR) realizado en la clínica de diagnóstico de fitopatología y nematología de la UNALM, confirmo el hallazgo.

El hongo *Chaetomium globosum* (H₃) en el medio de cultivo de Martín + microplástico LDPE < 1 mm de diámetro y a pH 5.5 presento una mayor tasa de crecimiento con un resultado de 0.311 mm. hora⁻¹ en comparación con otros niveles de pH propuestos, esto se debe a la fuente de C y al pH 5.0 donde predominan los hongos evidenciando un mejor crecimiento desarrollo de la colonia, también tuvo una mayor respiración microbiana en presencia de LDPE de 2 mm de diámetro con un resultado de 0.222 mm. hora⁻¹, en comparación al hongo *Penicillium decumbens Thom* (H₂), esto se

debe a que los hongos pueden adaptarse y sobrevivir en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes, bajo pH y baja la humedad.

Se logró encontrar un hongo, no reportado por la comunidad científica de especie *Penicillium decumbens Thom* biodegradador de LDPE. Sin embargo, se necesitan mayor investigación sobre la actividad enzimática y mecanismos involucrados en las vías de biodegradación.

4.5 Recomendaciones

- Es necesario que la comunidad científica estandarice protocolos metodológicos de biodegradación de microplástico para un seguimiento y comparación efectivos.
- Se requiere estandarizar un método para la identificación y cuantificación de plásticos en el suelos y ecosistemas terrestres. Por lo tanto, es urgente desarrollar un método de análisis preciso y efectivo para analizar microplástico en muestras de suelo.
- Se requiere utilizar equipo de espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR-ATR), para evidenciar la biodegradación por medio de grupo funcionales.
- Por otro lado, es recomendable realizar un proceso físico al material antes de ser suministrado a los microorganismos con el fin de garantizar una esterilización efectiva en la muestra.

REFERENCIAS

- Acuña, N. R. (2017). Revisión bibliográfica sobre los microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material. Bogota, Colombia. Obtenido de <https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/5608/Acu%C3%B1aMolinaNelsonRicardo2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ayala, L. (2015). Polyurethane degradation studies with endophytic fungi of the genus *Pestalotiopsis*. In *Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador* (Vol. 1, Issue 1). <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9934/TESISlauraayalabucheli.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Augustyn, A., Hosch, W., & Lotha, G. (04 de Abril de 2019). *Encyclopedia Britannica*. Obtenido de <https://www.britannica.com/science/polyethylene>
- Castañeta, G., Gutiérrez, A. F., Nacaratte, F., y Manzano, C. A. (2020). Microplastics: a Contaminant That Grows in All Environmental Areas, Its Characteristics and Possible Risks To Public Health From Exposure. *Revista Boliviana de Química*, 37(3), 160–175. <https://doi.org/10.34098/2078-3949.37.3.4>
- Cincinelli, A., Martellini, T., Guerranti, C., Scopetani, C., Chelazzi, D., y Giarrizzo, T. (2019). A potpourri of microplastics in the sea surface and water column of the Mediterranean Sea. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 110, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.026>
- Črešnar, B., y Petrič, Š. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom.

Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1814(1), 29–35.

<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.020>

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., y Galloway, T. (2011). Los microplásticos como contaminantes en el medio marino: una revisión. *Contaminación marina*, 2588-2597. doi:<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>

CEPAL. (2021). Economía circular en América Latina y el Caribe Oportunidad para una recuperación transformadora. In *Naciones Unidas*.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5771932&info=resumen&idioma=SPA%0Ahttps://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5771932&info=resumen&idioma=ENG%0Ahttps://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5771932>

El-Morsy, E., Hassan, H., y Ahmed, E. (2017). Biodegradative activities of fungal isolates from plastic contaminated soils. *Mycosphere*, 8(8), 1071–1086. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/8/13>

Europe Plastics. (2021). Plásticos – Situación en 2020. In *PlasticsEurope*. https://plasticseurope.org/es/wp-content/uploads/sites/4/2021/11/ES_Plastics_the_facts-WEB-2020_May21_final_updatedJuly2021.pdf

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

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

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128617>

Gonzales, V. C. (2022). Capacidad Biodegradativa De Hongos Filamentosos Frente Al Polietileno. *Revista de Investigaciones*, 9(3), 205–217.

<https://doi.org/10.26788/riepg.v9i3.1625>

González, N. A. ., Casanova, F., y Cetzal Ix, W. (2016). Sistemas Agroforestales Y Biodiversidad. *Agroproductividad*, 9, 56–60.

[https://www.researchgate.net/profile/Monica_Ramirez-](https://www.researchgate.net/profile/Monica_Ramirez-Mella/publication/309351584_Calabaza_chihua_Cucurbita_argyrosperma_Huber_alternativa_para_alimentacion_animal_en_el_tropico/links/580a60be08aeef1bfee3f6b2.pdf#page=58)

[Mella/publication/309351584_Calabaza_chihua_Cucurbita_argyrosperma_Huber_alternativa_para_alimentacion_animal_en_el_tropico/links/580a60be08aeef1bfee3f6b2.pdf#page=58](https://www.researchgate.net/profile/Monica_Ramirez-Mella/publication/309351584_Calabaza_chihua_Cucurbita_argyrosperma_Huber_alternativa_para_alimentacion_animal_en_el_tropico/links/580a60be08aeef1bfee3f6b2.pdf#page=58)

Gutiérrez, A. (2019). Biodegradación del polietileno de baja densidad utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna. *Tesis*, 1–98. <http://repositorio.upt.edu.pe/bitstream/UPT/1269/1/Gutierrez-Alvarez-Ana.pdf>

GESAMP. (2015). *Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: A global assessment*. London: International Maritime Organization. Obtenido de https://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-stfgatus/descriptor-10/pdf/GESAMP_microplastics%20full%20study.pdf

Gutierrez, J. G. (2013). Biodegradación de Polietileno de baja densidad. Mexico: Universidad Nacional Autonoma de México. Obtenido de <https://www.zaragoza.unam.mx/wp->

García, S., Calderón, C y Pérez, W. (2016). Microbiología y Bioquímica del Suelo,

- Guía de Prácticas. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. 61 pp
content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_gutierrez_pescador.pdf
- Garavito, J. (2007). Plásticos Protocolo curso de Proceso de Manufactura. Escuela
Colombia de Ingeniería , Bogotá, Colombia. 29 pp
- Horton, A. A., y Dixon, S. J. (2018). Microplastics: An introduction to environmental
transport processes. *WIREs Water*, 5(2), 1–10. <https://doi.org/10.1002/wat2.1268>
- Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E., y Svendsen, C. (2017).
Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current
understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities.
Science of the Total Environment, 586, 127–141.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.190>
- Iparraguirre, K. del R., y Vivanco, M. (2015). Aislamiento y caracterización de hongos
filamentosos biodegradadores de polietileno de tereftalato y polietileno de baja
densidad - Ica. *Universidad Nacional San Luis Gozaga de Ica*.
<http://repositorio.unica.edu.pe/handle/UNICA/2196>
- Johnson. (05 de Diciembre de 2019). *ThoughtCo*. Obtenido de
<https://www.thoughtco.com/what-is-a-polymer-820536>
- Khan, S., Nadir, S., Shah, Z. U., Shah, A. A., Karunarathna, S. C., Xu, J., Khan, A.,
Munir, S., y Hasan, F. (2017). Biodegradation of polyester polyurethane by
Aspergillus tubingensis. *Environmental Pollution*, 225, 469–480.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.012>
- Koelmans, A. A., Mohamed Nor, N. H., Hermsen, E., Kooi, M., Mintenig, S. M., y De

- France, J. (2019). Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Research*, 155, 410–422.
- Kellogg Soil Survey Laboratory Methods Manual (2014). Publications from USDA-ARS / UNL Faculty. 2115. <https://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/2115>
- Soil Survey Staff. (2022). Kellogg Soil Survey Laboratory methods manual. Soil Survey Investigations Report No. 42, Version 6.0. U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.
- Shin, J., Kim, JE, Lee, YW, y Son, H. (2018). Citocromo P450 fúngico y el P450 complemento (CYPome) de *Fusarium graminearum*.toxinas 10, 112.
- Lee, B., Pometto, A. L., Fratzke, A., y Bailey, T. B. (1991). Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3), 678–685.
<https://doi.org/10.1128/aem.57.3.678-685.1991>
- Méndez, C. R., Vergaray, G., Béjar, V. R., y Cárdenas, K. J. (2007). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Peruana de Biología*, 13(3), 203–205. <https://doi.org/10.15381/rpb.v13i3.2338>
- Ministerio del Ambiente. (2018). Problemas de Residuos Sólidos en el Perú (MINAM) . Askha.E.I.R.L.Lima,Perú..http://www.minam.gob.pe/proyecologios/Ecologios/contenidos/biblioteca/biblioteca/biblioteca/m1_rrss_A1L1_Problematica_rrss_Peru.pdf
- Nanavati, W. P., French, C., Lane, K., Oros, O. H., y Beresford-Jones, D. (2016). Testing soil fertility of Prehispanic terraces at Viejo Sangayaico in the upper Ica catchment of south-central highland Peru. *Catena*, 142, 139–152.

<https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.03.007>

Nina, J. (2020). *Capacidad de biodegradación de Pseudomonas aeruginosa frente al polietileno de baja densidad* [tesis de doctorado, Universidad Nacional del Altiplano]. <https://doi.org/10.26788/riepg.v9i3.2027>

Paço, A., Duarte, K., da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Pereira, R., Pereira, M. E., Freitas, A. C., Duarte, A. C., y Rocha-Santos, T. A. P. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Science of the Total Environment*, 586, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.017>

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

Pitt, J. (1988). A Laboratory guide to Common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. North Ryde, N. S. W., Australia. Second. 187 p.

Plastics Europe. (2022). Plastics Europe Association of Plastics Manufacturers. Plastics—The Facts 2022. *The Facts 2022, October*, 81. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>

Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., Knight, R., y Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 4(10), 1340–1351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>

Ayala, L. (2015). Polyurethane degradation studies with endophytic fungi of the genus

Pestalotiopsis. In *Laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador* (Vol. 1, Issue 1).

<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9934/TESIS LAURA AYALA BUCHELI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Castañeta, G., Gutiérrez, A. F., Nacaratte, F., & Manzano, C. A. (2020). Microplastics: a Contaminant That Grows in All Environmental Areas, Its Characteristics and Possible Risks To Public Health From Exposure. *Revista Boliviana de Química*, 37(3), 160–175. <https://doi.org/10.34098/2078-3949.37.3.4>

Cincinelli, A., Martellini, T., Guerranti, C., Scopetani, C., Chelazzi, D., & Giarrizzo, T. (2019). A potpourri of microplastics in the sea surface and water column of the Mediterranean Sea. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 110, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.026>

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

Creswell, J. W. (2015). 57Revisiting Mixed Methods and Advancing Scientific Practices. In S. N. Hesse-Biber & R. B. Johnson (Eds.), *The Oxford Handbook of Multimethod and Mixed Methods Research Inquiry* (p. 0). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199933624.013.39>

El-Morsy, E., Hassan, H., & Ahmed, E. (2017). Biodegradative activities of fungal isolates from plastic contaminated soils. *Mycosphere*, 8(8), 1071–1086. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/8/13>

Europe Plastics. (2021). Plásticos – Situación en 2020. In *PlasticsEurope*.

https://plasticseurope.org/es/wp-content/uploads/sites/4/2021/11/ES_Plastics_the_facts-WEB-2020_May21_final_updatedJuly2021.pdf

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

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

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128617>

Gonzales, V. C. (2022). Capacidad Biodegradativa De Hongos Filamentosos Frente Al Polietileno. *Revista de Investigaciones*, *9*(3), 205–217.

<https://doi.org/10.26788/riepg.v9i3.1625>

González, N. A. ., Casanova, F., & Cetzal Ix, W. (2016). Sistemas Agroforestales Y Biodiversidad. *Agroproductividad*, *9*, 56–60.

[https://www.researchgate.net/profile/Monica_Ramirez-](https://www.researchgate.net/profile/Monica_Ramirez-Mella/publication/309351584_Calabaza_chihua_Cucurbita_argyrosperma_Huber_alternativa_para_alimentacion_animal_en_el_tropico/links/580a60be08aeef1bfee3f6b2.pdf#page=58)

[Mella/publication/309351584_Calabaza_chihua_Cucurbita_argyrosperma_Huber_alternativa_para_alimentacion_animal_en_el_tropico/links/580a60be08aeef1bfee3f6b2.pdf#page=58](https://www.researchgate.net/profile/Monica_Ramirez-Mella/publication/309351584_Calabaza_chihua_Cucurbita_argyrosperma_Huber_alternativa_para_alimentacion_animal_en_el_tropico/links/580a60be08aeef1bfee3f6b2.pdf#page=58)

Gutiérrez, A. (2019). Biodegradación del polietileno de baja densidad utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna. *Tesis*, 1–98. <http://repositorio.upt.edu.pe/bitstream/UPT/1269/1/Gutierrez-Alvarez-Ana.pdf>

Guerrero, P., Quintero, R., Espinoza, V., Benedicto, G., & Sanchez, M. (2012).

RESPIRACIÓN DE CO₂ COMO INDICADOR DE LA ACTIVIDAD

Respiration of CO₂ as an Indicator of Microbial Activity in Organic Fertilizers of Lupinus. *Terra Latinoamericana*, 355–362

Horton, A. A., & Dixon, S. J. (2018). Microplastics: An introduction to environmental transport processes. *WIREs Water*, 5(2), 1–10. <https://doi.org/10.1002/wat2.1268>

Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E., & Svendsen, C. (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the Total Environment*, 586, 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.190>

Iparraguirre, K. del R., & Vivanco, M. (2015). Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos biodegradadores de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad - Ica. *Universidad Nacional San Luis Gozaga de Ica*. <http://repositorio.unica.edu.pe/handle/UNICA/2196>

Khan, S., Nadir, S., Shah, Z. U., Shah, A. A., Karunarathna, S. C., Xu, J., Khan, A., Munir, S., & Hasan, F. (2017). Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environmental Pollution*, 225, 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.012>

Lee, B., Pometto, A. L., Fratzke, A., & Bailey, T. B. (1991). Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3), 678–685. <https://doi.org/10.1128/aem.57.3.678-685.1991>

Luo, Y. R., Qian, Y. Q., y Qi, Y. N. (2022). Biodegradation of Polyethylene

Microplastic: A Review. *Huanjing Kexue/Environmental Science*, 43(11), 4869–4875. <https://doi.org/10.13227/j.hjkx.202206017>

Méndez, C. R., Vergaray, G., Béjar, V. R., & Cárdenas, K. J. (2007). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Peruana de Biología*, 13(3), 203–205. <https://doi.org/10.15381/rpb.v13i3.2338>

Nanavati, W. P., French, C., Lane, K., Oros, O. H., & Beresford-Jones, D. (2016). Testing soil fertility of Prehispanic terraces at Viejo Sangayaico in the upper Ica catchment of south-central highland Peru. *Catena*, 142, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.03.007>

Nina, J. (2020). *Capacidad de biodegradación de Pseudomonas aeruginosa frente al polietileno de baja densidad* [tesis de doctorado, Universidad Nacional del Altiplano]. <https://doi.org/https://doi.org/10.26788/riepg.v9i3.2027>

Paço, A., Duarte, K., da Costa, J. P., Santos, P. S. M., Pereira, R., Pereira, M. E., Freitas, A. C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Science of the Total Environment*, 586, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.017>

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

Plastics Europe. (2022). Plastics Europe Association of Plastics Manufacturers
Plastics—The Facts 2022. *The Facts 2022, October*, 81. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>

Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G.,

Knight, R., & Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal*, 4(10), 1340–1351.

<https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>

Sajjad, M., Huang, Q., Khan, S., Khan, M. A., Liu, Y., Wang, J., Lian, F., Wang, Q., & Guo, G. (2022). Microplastics in the soil environment: A critical review.

Environmental Technology and Innovation, 27, 102408.

<https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102408>

Sánchez, C. (2020a). Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology*

Advances, 40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107501>

Sánchez, C. (2020b). Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology*

Advances, 40(December 2019), 107501.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107501>

Schmit, J. P., & Mueller, G. M. (2007). An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 99–111.

<https://doi.org/10.1007/s10531-006-9129-3>

Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2010). Biodegradation of low density polyethylene by the action of a microbial consortium isolated from a landfill, Lima, Peru. *Revista Peruana de Biología*, 17(1), 133–136.

Vivi, V. K., Martins-Franchetti, S. M., & Attili-Angelis, D. (2019). Biodegradation of PCL and PVC: *Chaetomium globosum* (ATCC 16021) activity. *Folia*

Microbiologica, 64(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0621-4>

Wang, Q., Zhang, M., & Li, R. (2022). The COVID-19 pandemic reshapes the plastic pollution research – A comparative analysis of plastic pollution research before and during the pandemic. *Environmental Research*, 208(December 2021), 112634. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112634>

Winterhoff, W., Arnolds, E, J, M., Braun, U., Bujakiewicz, A. Gams, W. Hirsch, G. Kost, G. Lisiewska, M. (1992). Handbook of Vegetation Science. In *Annales de géographie* (Vol. 84, Issue 463).

Wright, S. L. (2017). *Revisión crítica Plástico y salud humana : ¿ un problema micro ?*

Sajjad, M., Huang, Q., Khan, S., Khan, M. A., Liu, Y., Wang, J., Lian, F., Wang, Q., y Guo, G. (2022). Microplastics in the soil environment: A critical review. *Environmental Technology and Innovation*, 27, 102408. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102408>

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

Sánchez, C. (2020b). Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances*, 40(December 2019), 107501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107501>

Schmit, J. P., y Mueller, G. M. (2007). An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation*, 16(1), 99–111. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9129-3>

- SSSA (Soil Science Society of America). (1994). Recovery and enumeration of viable bacteria. En D. Zuberer (Ed.), *Methods of soil analysis Part 2 – Microbiological and biochemistry properties* (pp. 119-142) R. Weaver
- Schwartz, M., Perrot, T., Aubert, E., Dumarçay, S., Favier, F., Gérardin, P., Morel-Rouhier, M., Mulliert, G., Saiag, F., Didierjean, C. y Gelhaye, E. (2018). Reconocimiento molecular de los polifenoles de la madera mediante enzimas de desintoxicación de fase II de la podredumbre blanca *Trametes versicolor*. *ciencia Rep.* 8, 8472.
- Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S., y Merino, F. (2010). Biodegradation of low density polyethylene by the action of a microbial consortium isolated from a landfill, Lima, Peru. *Revista Peruana de Biología*, 17(1), 133–136.
- Vivi, V. K., Martins-Franchetti, S. M., y Attili-Angelis, D. (2019). Biodegradation of PCL and PVC: *Chaetomium globosum* (ATCC 16021) activity. *Folia Microbiologica*, 64(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0621-4>
- Wang, Q., Zhang, M., y Li, R. (2022). The COVID-19 pandemic reshapes the plastic pollution research – A comparative analysis of plastic pollution research before and during the pandemic. *Environmental Research*, 208(December 2021), 112634. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112634>
- Winterhoff, W., Arnolds, E, J, M., Braun, U., Bujakiewicz, A. Gams, W. Hirsch, G. Kost, G., y Lisiewska, M. (1992). Handbook of Vegetation Science. In *Annales de géographie* (Vol. 84, Issue 463).
- Wright, S. L. (2017). *Revisión crítica Plástico y salud humana : ¿ un problema micro ?*

Yepes, L. M. (2014). Microbióloga Industrial. *Degradación de Polietileno de Baja*

Densidad Utilizando Hongos. Revisión. Bogota , Cundinamarca, Colombia :

Pontificia Universidad Javeriana. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10554/16184>

ANEXOS

ANEXO N° 1. Crecimiento del hongo H₂ en diferentes tratamientos.

Tratamiento	Repetición	H2* <i>Penicillium decumbens Thom</i>				
		Día 4	Día 6	Día 8	Total	Promedio
T1 (medio suelo)	R1	1, 1	1, 1	2, 2	2	1.8
	R2	1, 1	1, 1	2, 2	2	
	R3	1, 1	1, 1	1, 1	1	
	R4	1, 2	1, 1	2, 2	2	
	R5	1, 0	1, 1	2, 2	2	
T2 (medio de martin + glucosa)	R1	3, 3	4, 4	4, 4	4	3.8
	R2	3, 3	4, 4	4, 4	4	
	R3	3, 3	4, 4	4, 4	4	
	R4	3, 3	3, 3	3, 3	3	
	R5	3, 3	4, 4	4, 4	4	
T3 (medio de martin + LDPE >2mm)	R1	2, 2	3, 3	4, 3	3.5	2.9
	R2	2, 2	3, 3	3, 3	3	
	R3	2, 2	3, 3	3, 3	3	
	R4	2, 2	3, 3	3, 3	3	
	R5	1, 1	2, 2	2, 2	2	
T4 (medio de martin + LDPE 2mm)	R1	2, 2	3, 3	3, 3	3	3
	R2	2, 2	3, 3	3, 3	3	
	R3	2, 2	3, 3	3, 3	3	
	R4	1, 1	3, 3	3, 3	3	
	R5	2, 2	3, 3	3, 3	3	
T3 (medio de martin + LDPE < 1mm)	R1	2, 2	2, 3	3, 3	3	3
	R2	2, 2	3, 3	3, 3	3	
	R3	2, 2	2, 3	3, 3	3	
	R4	2, 2	3, 3	3, 3	3	
	R5	2, 2	3, 3	3, 3	3	

(1 bajo, 2 moderado, 3 abundante y 4 muy abundante).

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 2. Crecimiento del hongo H₃ en diferentes tratamientos.

Tratamiento	Repetición	<i>H3** Chaetomium globosum</i>				
		Día 4	Día 6	Día 8	Total	Promedio
T1 (medio suelo)	R1	1, 0	1, 1	1, 1	1	1.5
	R2	1, 0	2, 0	2, 0	1	
	R3	0, 0	2, 0	2, 2	2	
	R4	0, 1	1, 2	2, 2	2	
	R5	1, 1	2, 2	2, 3	2.5	
T2 (medio de martin + glucosa)	R1	1, 1	2, 2	2, 2	2	2
	R2	1, 1	2, 2	2, 2	2	
	R3	1, 1	2, 2	2, 2	2	
	R4	1, 1	2, 2	2, 2	2	
	R5	1, 1	2, 2	2, 2	2	
T3 (medio de martin + LDPE >2mm)	R1	1, 1	2, 2	2, 2	2	2
	R2	1, 1	2, 1	2, 2	2	
	R3	1, 1	2, 2	2, 2	2	
	R4	1, 1	2, 2	2, 2	2	
	R5	1, 1	2, 2	2, 2	2	
T4 (medio de martin + LDPE 2mm)	R1	1, 0	2, 1	2, 2	3	2.9
	R2	1, 1	2, 2	3, 3	2.5	
	R3	1, 1	2, 2	3, 2	3	
	R4	1, 1	3, 3	3, 3	3	
	R5	1, 1	2, 3	3, 3	3	
T3 (medio de martin + LDPE < 1mm)	R1	1, 1	2, 2	3, 3	3	2.8
	R2	1, 1	2, 2	2, 3	2.5	
	R3	1, 1	2, 2	3, 3	3	
	R4	1, 1	2, 2	2, 3	2.5	
	R5	1, 1	2, 2	3, 3	3	

(1 bajo, 2 moderado, 3 abundante y 4 muy abundante).

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 3. Crecimiento de diámetro de las colonias de hongo en respuesta a diferentes pH en medio de Martin.

pH	H2*						H3**					
	con LDPE			sin LDPE			con LDPE			sin LDPE		
	3 días	6 días	9 días	3 días	6 días	9 días	3 días	6 días	9 días	3 días	6 días	9 días
5.5	15.50	30.75	47.50	13.50	22.75	33.00	27.75	49.50	72.50	21.75	41.50	61.50
6.5	13.50	23.75	33.75	12.50	21.00	31.00	31.25	46.00	71.50	23.50	38.00	56.25
7.5	11.75	19.75	32.75	11.25	21.00	25.75	26.75	45.00	61.50	18.50	32.00	47.50
8.5	10.00	15.75	23.25	13.75	20.75	22.75	25.75	41.75	62.50	17.25	25.00	30.00

H2* *Penicillium decumbens* Thom, H3** *Chaetomium globosum*

ANEXO N° 4. Resultados de respiración microbiana de los hongos inmersas en suelo de origen y dos niveles de diámetro de PEBD (2mm y 1mm).

Tratamiento	Fuente	Repetición	Cálculo de respiración	Promedio de respiración
T ₁	H2* (1mm)	R1	0.033	0.021
	H2* (1mm)	R2	0.018	
	H2* (1mm)	R3	0.010	
	H2* (1mm)	R4	0.022	
T ₂	H2* (2mm)	R1	0.044	0.035
	H2* (2mm)	R2	0.032	
	H2* (2mm)	R3	0.025	
	H2* (2mm)	R4	0.039	
T ₃	H3** (1mm)	R1	0.017	0.011
	H3** (1mm)	R2	0.021	
	H3** (1mm)	R3	-0.001	
	H3** (1mm)	R4	0.009	
T ₄	H3** (2mm)	R1	0.051	0.043
	H3** (2mm)	R2	0.049	
	H3** (2mm)	R3	0.038	
	H3** (2mm)	R4	0.034	

(2mm)

Basal Sin inoculo R1-R4 0.019 0.019

Respiración: (mg CO₂ / g de suelo seco.día)

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 5. Prueba de normalidad de Lilliefors (Kolmogrov-Smirnov) para la tasa de crecimiento

Normalidad de Lilliefors (Kolmogrov-Smirnov)

Datos: r1

D=0.060203

p-valor=0.8178

ANEXO N° 6. Prueba de Bartlett de homogeneidad de varianzas para la tasa de crecimiento

Prueba de Bartlett de homogeneidad de varianzas

Datos: r1 por Cepa Microplástico pH

K-cuadrado de Bartlett=29.216, df=15, df=3 p-valor=0.0150

ANEXO N° 7. Análisis de varianza (ANOVA) de Welch para la tasa de crecimiento

Análisis unidireccional de medias (sin asumir varianzas iguales)

Datos: Tasa y Microplástico* pH*cepa

F=69.512, num df= 15.000, denom df=17.839, pvalor=9.942X10¹³

ANEXO N° 8. Prueba de Tukey para la tasa de crecimiento

N.º	Tratamientos	n	Media	Varianza	sd	cld	espaciado_cld
1	H2_CMP_PH5.5	4	0.222	0.001	0.033	ab	ab__
2	H2_CMP_PH6.5	4	0.141	0.000	0.016	cd	__cd_
3	H2_CMP_PH7.5	4	0.146	0.000	0.006	cd	__cd_
4	H2_CMP_PH8.5	4	0.092	0.000	0.012	ce	__c_e_
5	H2_SMP_PH5.5	4	0.135	0.000	0.013	c	__c_
6	H2_SMP_PH6.5	4	0.128	0.000	0.007	c	__c_
7	H2_SMP_PH7.5	4	0.101	0.000	0.022	ce	__c_e_
8	H2_SMP_PH8.5	4	0.062	0.000	0.017	e	____e_
9	H3_CMP_PH5.5	4	0.311	0.000	0.022	f	____f

10	H3_CMP_PH6.5	4	0.280	0.000	0.014	af	a___f
11	H3_CMP_PH7.5	4	0.241	0.001	0.027	ab	ab___
12	H3_CMP_PH8.5	4	0.255	0.002	0.041	abf	ab___f
13	H3_SMP_PH5.5	4	0.276	0.001	0.035	af	a___f
14	H3_SMP_PH6.5	4	0.227	0.002	0.041	ab	ab___
15	H3_SMP_PH7.5	4	0.201	0.001	0.032	bd	_b_d_
16	H3_SMP_PH8.5	4	0.089	0.000	0.003	ce	_c_e_

ANEXO N° 9. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para la respiración microbiana

Normalidad de Shapiro-Wilk	
Datos: r1	
W=0.96473	p-valor=0.7477

ANEXO N° 10. Prueba de Bartlett de homogeneidad de varianzas para la respiración microbiana

Bartlett de homogeneidad de varianzas		
Datos: r1 por K- cuadrado		
Tratamiento Bartlett=1.24752	df=3	p-valor=0.7417

ANEXO N° 11. Análisis de varianza (ANOVA) clásico para la respiración microbiana

	Df	Suma Sq	Mean Sq	F value	Pr>F
Tratamiento	3	0.0019208	0.0006403	10.21	0.00127**
Residuales	12	0.0007526	0.0000627		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 '***'

ANEXO N° 12. Prueba de Tukey para la respiración microbiana

Tratamineto	Respiración	groups
H2-1	0.02126667	bc
H2-2	0.03540952	ab
H3-1	0.01602857	c
H3-2	0.04352857	a
CV: 27.25367		

Respiración	std r	Min	Max	Q 25	Q 50	Q75	
H2-1	0.02126667	0.009639613	40.010790476	0.03383810	0.01629048	0.02021905	0.02519524
H2-2	0.03540952	0.008137332	40.025457143	0.04431429	0.03095714	0.03593333	0.04038571
H3-1	0.01602857	0.004762540	40.009742857	0.02126667	0.01445714	0.01655238	0.01812381
H3-2	0.04352857	0.008309717	40.034885714	0.05164762	0.03724286	0.04379048	0.05007619

ANEXO N° 13. Lugar de muestreo “Playa Marquez 2018”



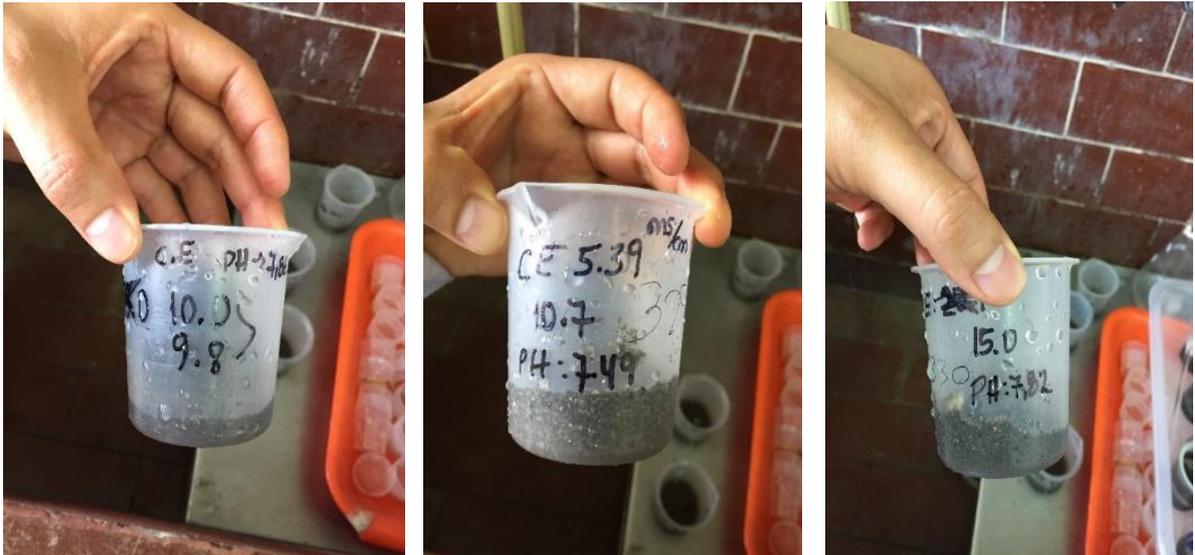
ANEXO N° 14. Recolección de muestras de suelo con presencia de macroplástico, mesoplástico y microplástico



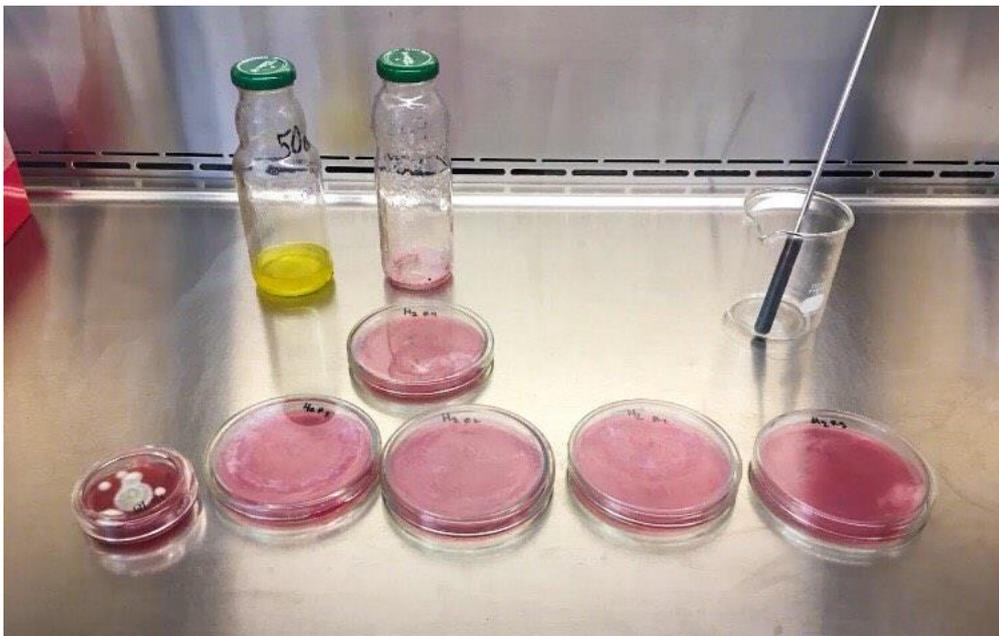
ANEXO N° 15. Pesado de las muestras de arenas para la prueba de porcentaje de humedad



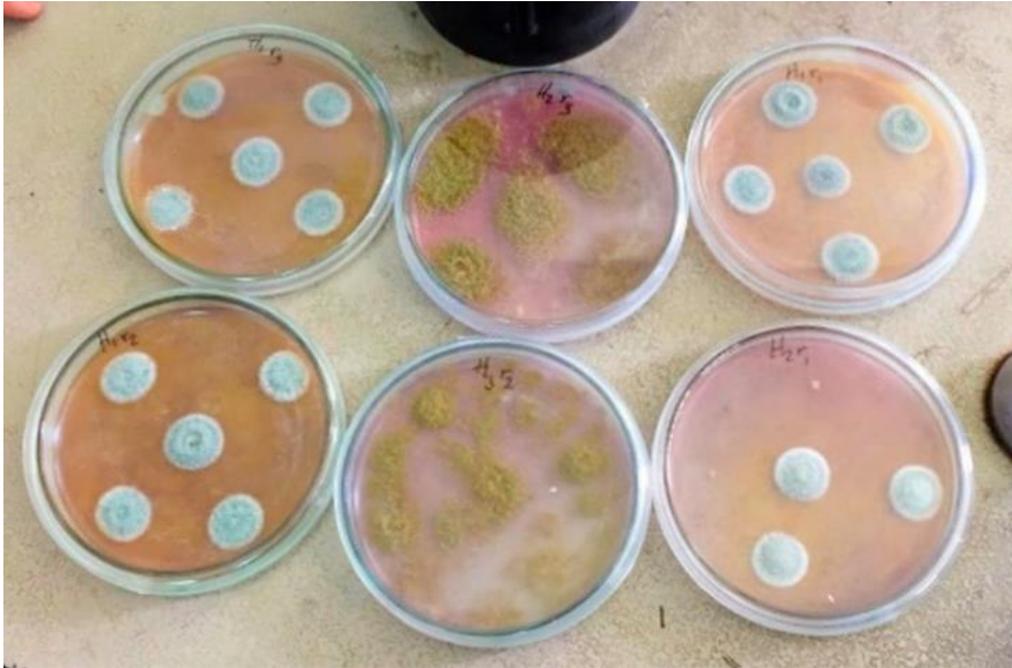
ANEXO N° 16. Medición de pH y conductividad de las muestras recolectadas de suelo



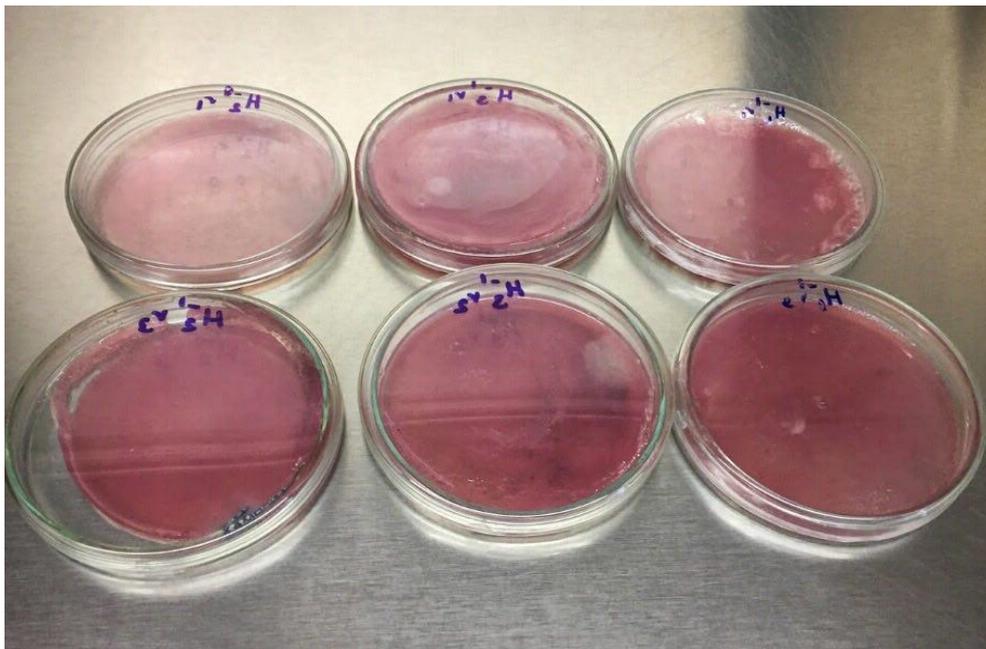
ANEXO N° 17. Siembra de las muestras recolectadas de suelo en medio Martin



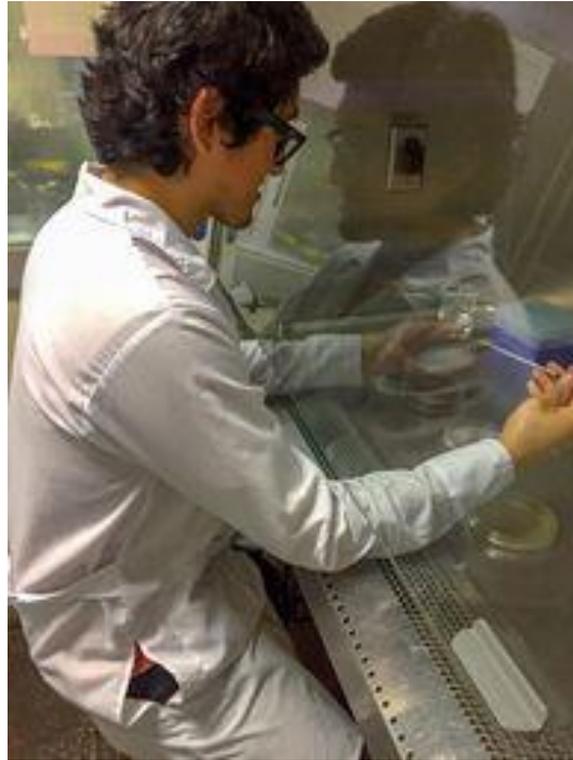
ANEXO N° 18. Obtención de la cepa H2



ANEXO N° 19. Obtención de la cepa H3



ANEXO N° 20. Aislamiento de las Cepas H2 y H3



ANEXO N° 21. Cepas aisladas y codificadas H₂ y H₃

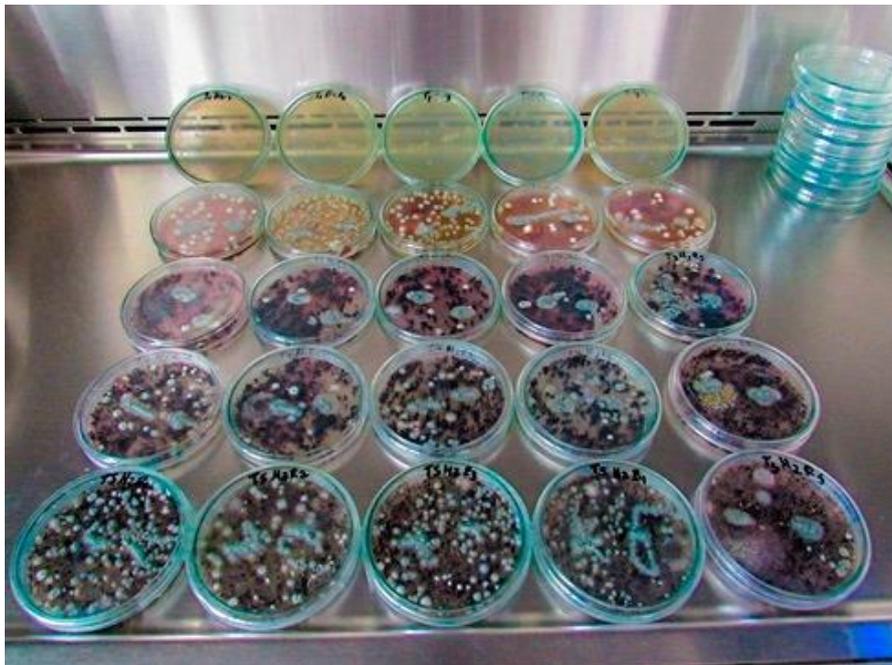


ANEXO N° 22. Pesado de microplástico para ensayos de biodegradación de polietileno

de baja densidad (LDPE)



ANEXO N° 23. Crecimiento de cepas H2 en diferentes medios: medio suelo, medio de Martin sin Glucosa y medio más microplástico



ANEXO N° 24. Crecimiento de cepas H3 en diferentes medios: medio suelo, medio de
Martin sin Glucosa y medio más microplástico



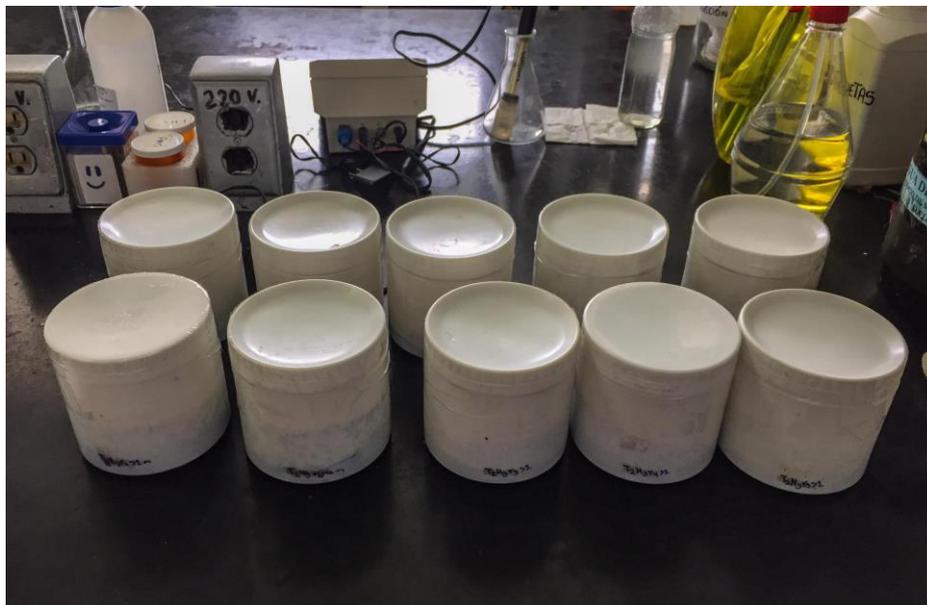
ANEXO N° 25. Pesado de arena de playa estéril para la prueba de respiración
microbiana



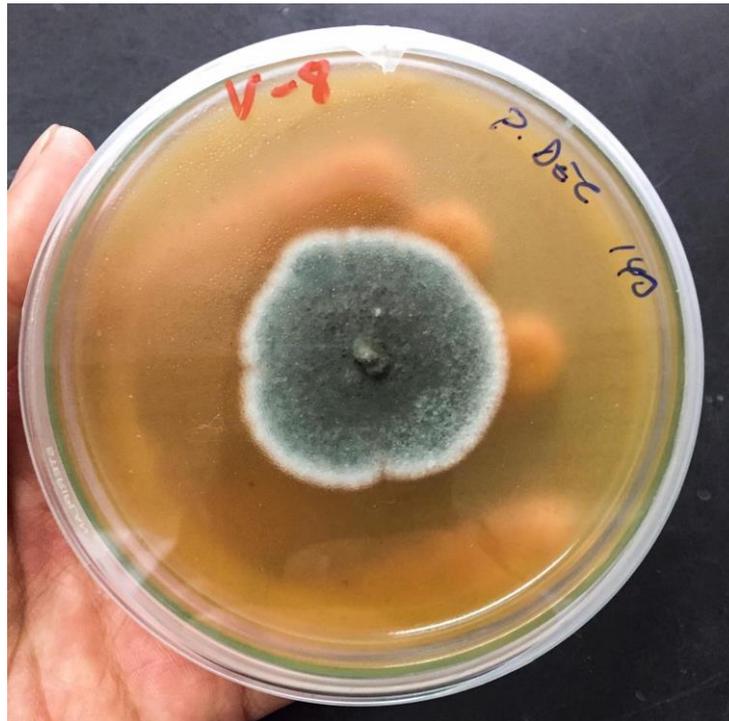
ANEXO N° 26. Ensayo de respiración microbiana de cepas H2 y H3



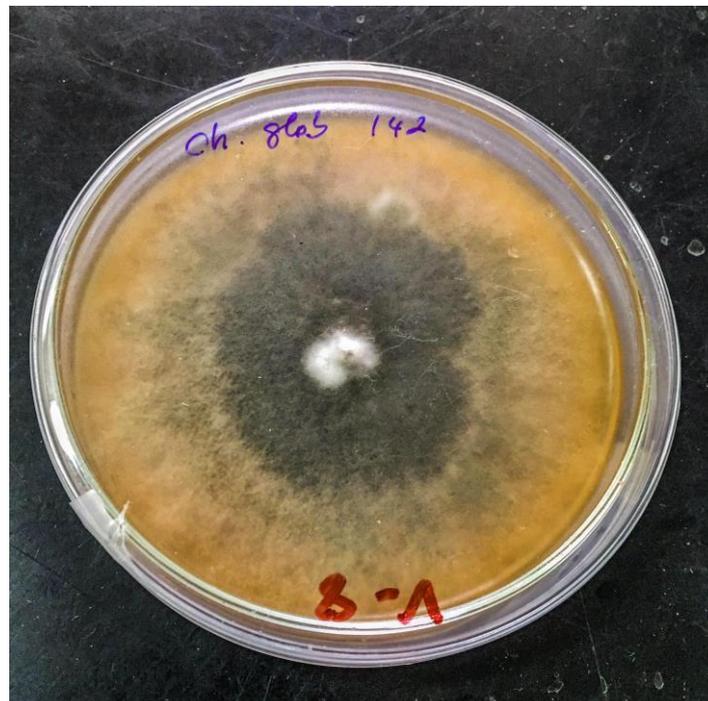
ANEXO N° 27. Envases sellados para la incubación



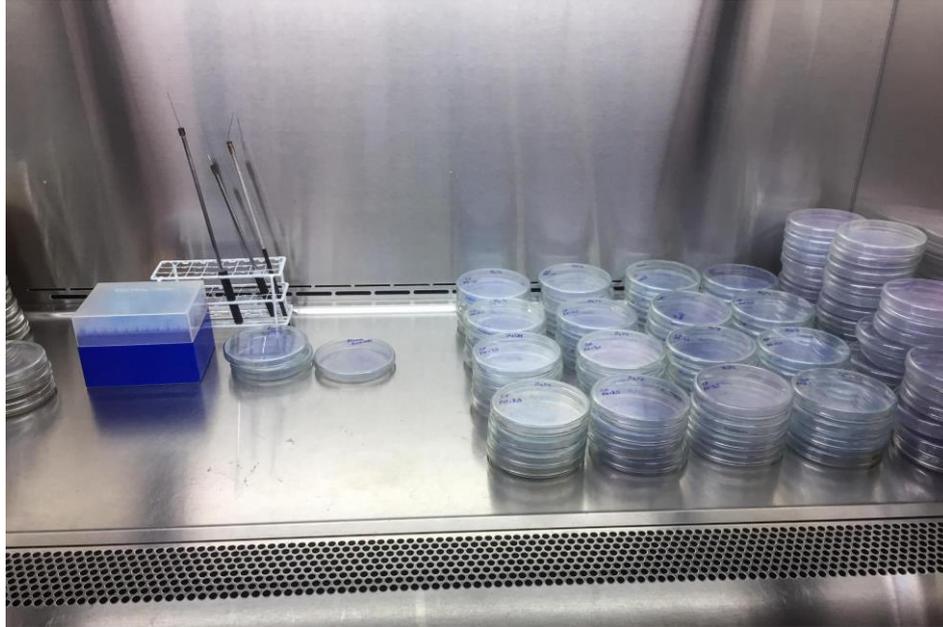
**ANEXO N° 28. Cepa H2 purificada en medio V8 para prueba bioquímica
de identificación**



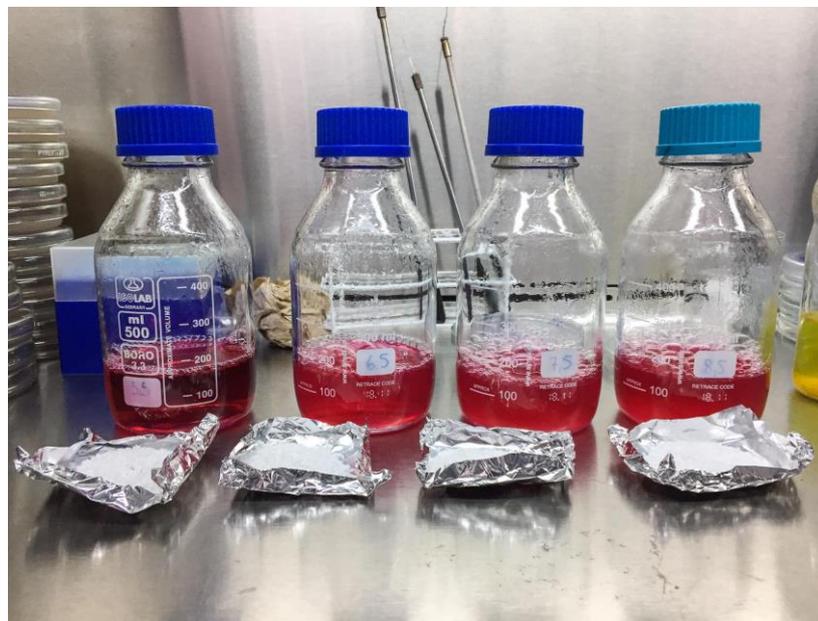
ANEXO N° 29. Cepa H3 purificada en medio V8 para prueba molecular
de identificación



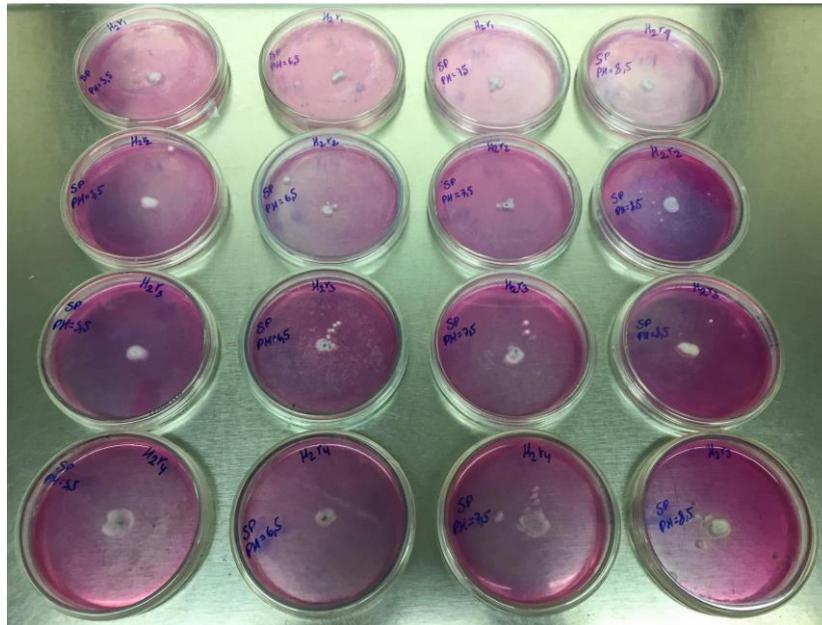
ANEXO N° 30. Material limpio para prueba de efecto del pH en el crecimiento de los
hongos H2 y H3



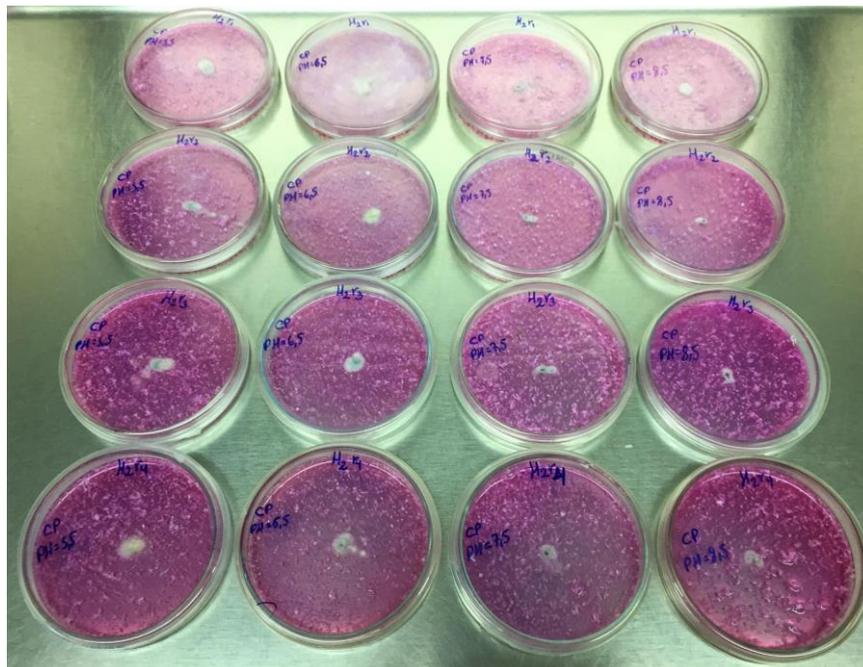
ANEXO N° 31. Preparación de medio Martín más microplástico



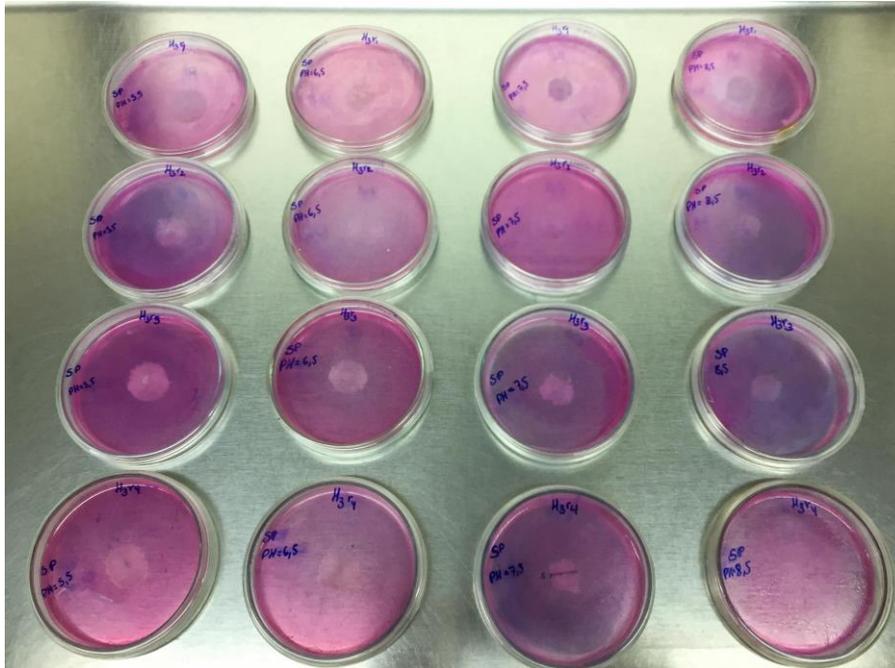
ANEXO N° 32. Primera lectura de crecimiento de cepa H2 en (MMSG) a diferentes pH



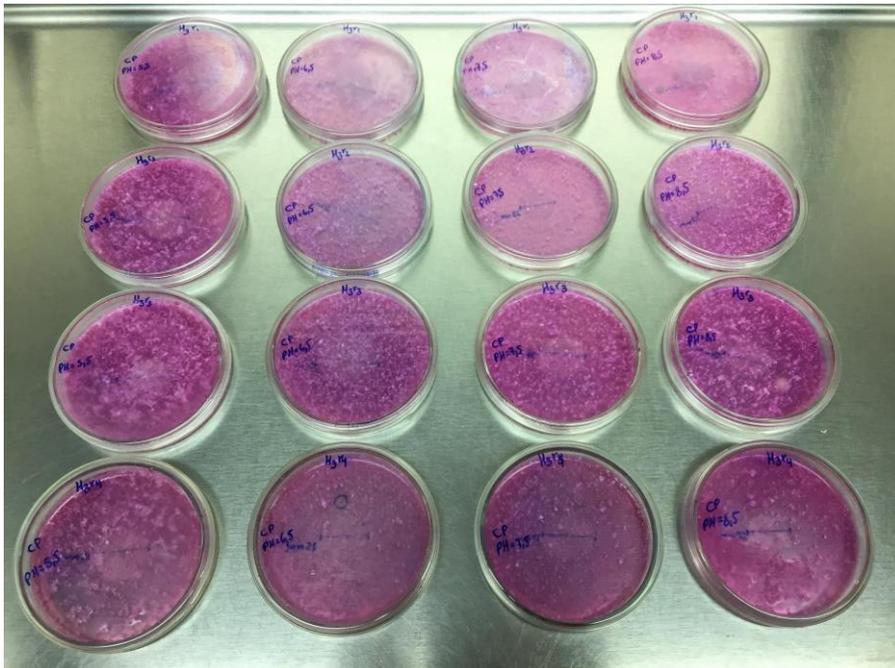
ANEXO N° 33. Primera lectura de crecimiento de cepa H2 en (MMLDPE<1mm) a diferentes pH



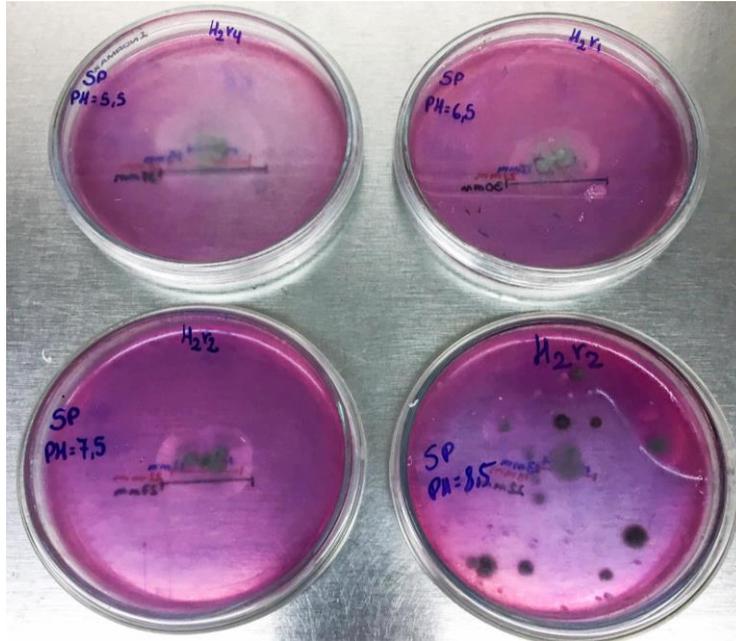
ANEXO N° 34. Primera lectura de crecimiento de cepa H3 en (MMSG) a diferentes pH



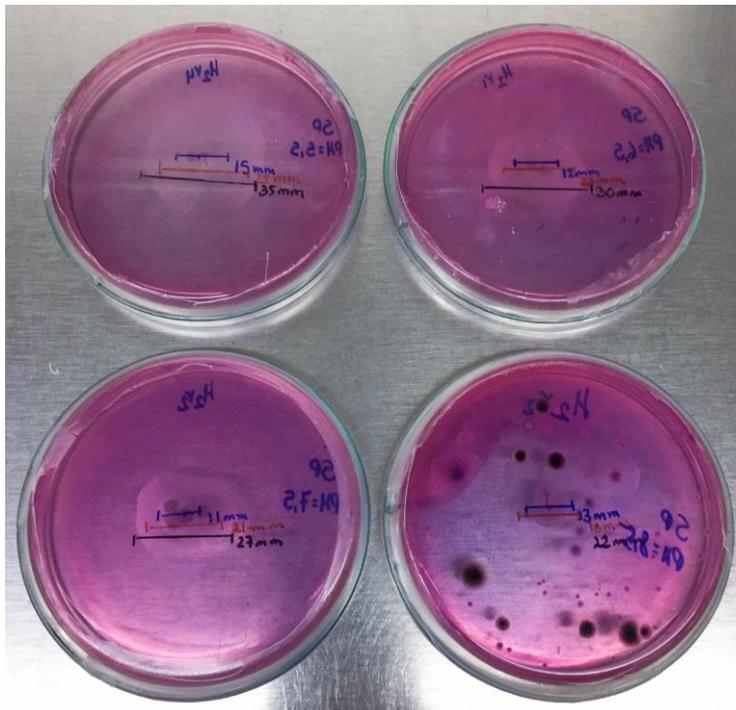
ANEXO N° 35. Lectura de crecimiento de cepa H3 en (MMLDPE<1mm) a diferentes pH



ANEXO N° 36. Tercera lectura de crecimiento de cepa H2 en (MMSG) a diferentes pH

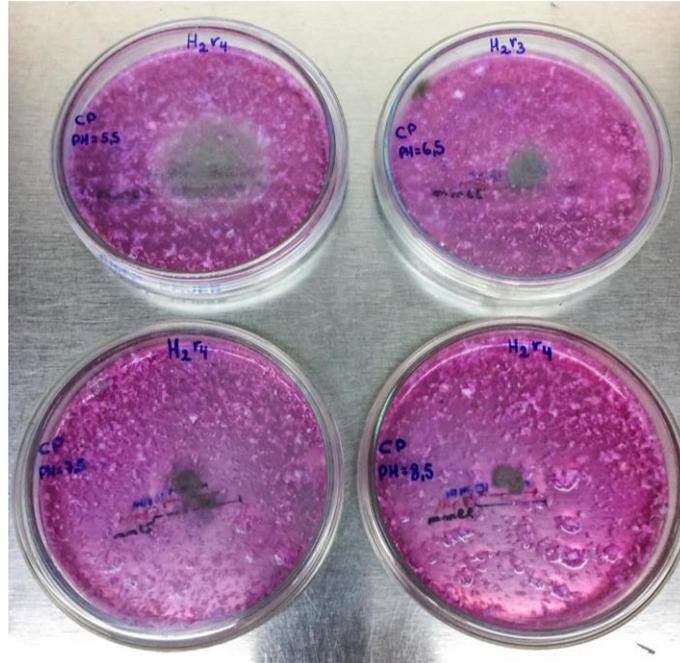


ANEXO N° 37. Medición de diámetros al tercero, sexto y noveno día de crecimiento de la cepa H2 en (MMSG) a diferentes pH

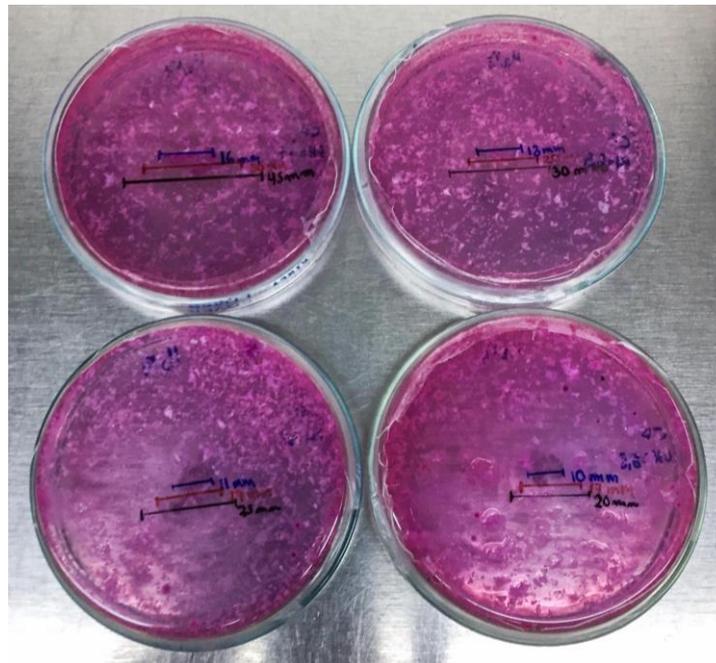


ANEXO N° 38. Tercera lectura de crecimiento de cepa H2 en (MMLDPE<1mm) a

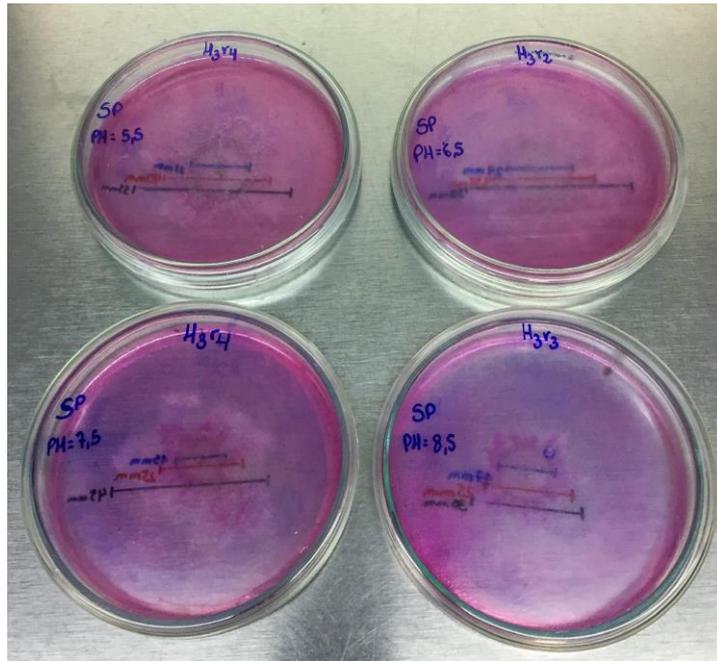
diferentes pH



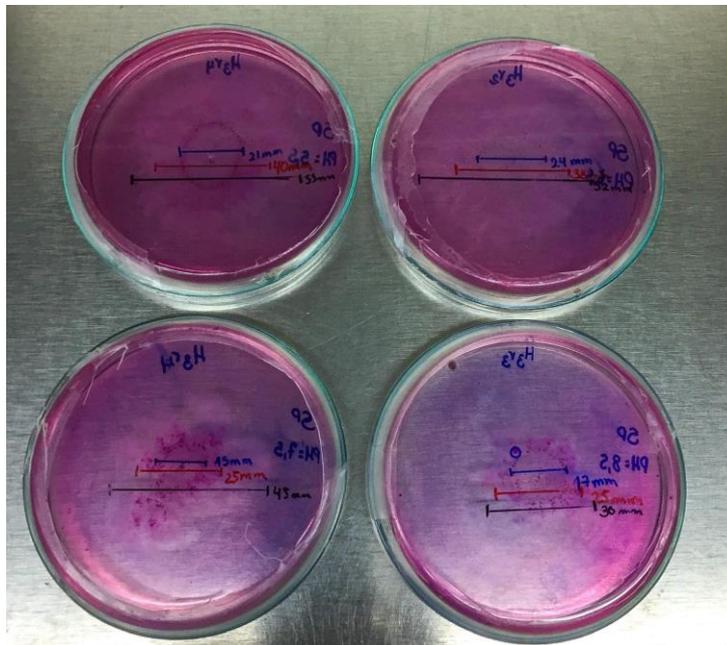
ANEXO N° 39. Medición de diámetros al tercero, sexto y noveno día de crecimiento de la cepa H2 en (MMLDPE<1mm) a diferentes pH



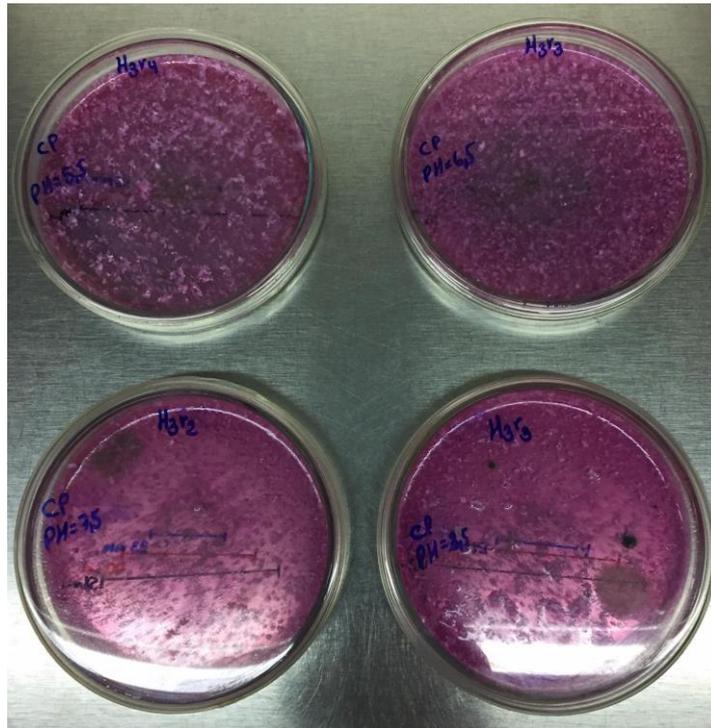
ANEXO N° 40. Tercera lectura de crecimiento de cepa H2 en (MMSG) a diferentes pH



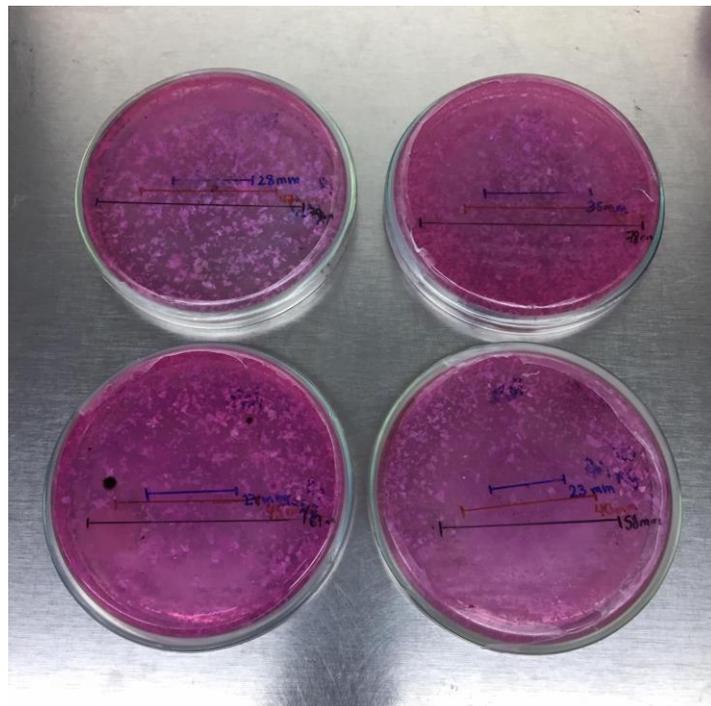
ANEXO N° 41. Medición de diámetros al tercero, sexto y noveno día de crecimiento de la cepa H3 en (MMSG) a diferentes pH



ANEXO N° 42. Tercera lectura de crecimiento de cepa H3 en (MMLDPE<1mm) a diferentes pH

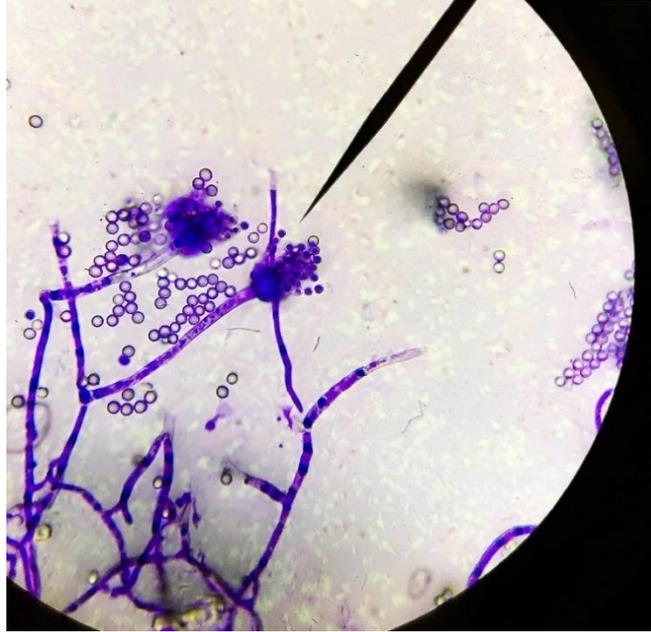


ANEXO N° 43. Medición de diámetros al tercero, sexto y noveno día de crecimiento de la cepa H3 en (MMLDPE<1mm) a diferentes pH



ANEXO N° 44. Observación al microscopio de la cepa H2 identificada como

Penicillium decumbens Thom



ANEXO N° 45. Observación al microscopio de la cepa H3 especie identificada como

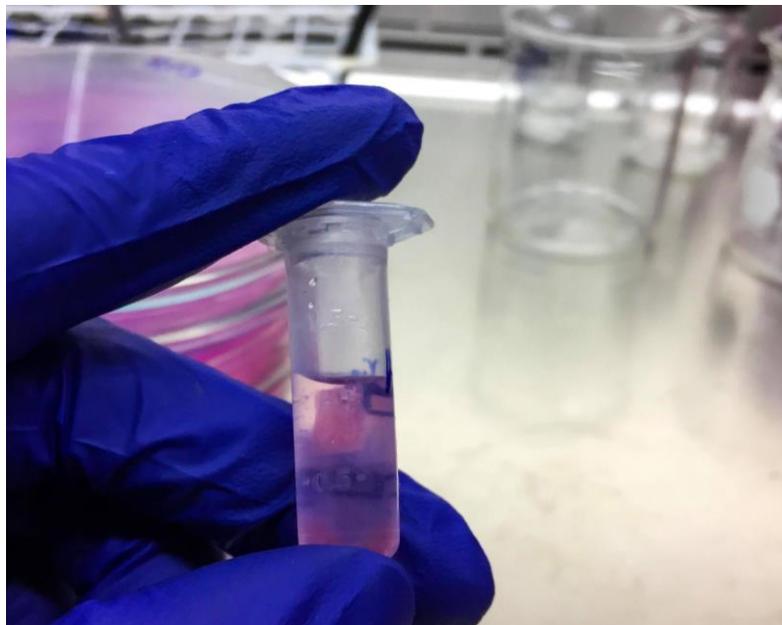
Chaetomium globosum



ANEXO N° 46. Preparación y conservación de cepas H2 y H3



ANEXO N° 47. Conservación de cepas H2 y H3



ANEXO N° 48. Resultado de la prueba molecular de la cepa H₃



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología
Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12
Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023
e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



La Molina, 05 de junio de 2019
AM 004-2019 MHZ 004
JFT 004

Sr.
Moises Villodes Bastidas
Lima
Presente.-

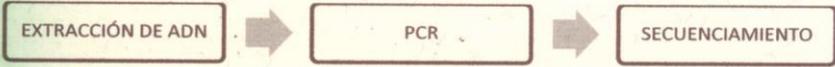
De nuestra consideración:

El resultado del análisis Molecular de las dos muestras que enviaron, es el siguiente:

1. Datos Generales

CLIENTE:	Moises Villodes Bastidas
Cantidad de muestras:	1 (Muestra A)
Número de secuencias:	2 (1 FORWARD Y 1 REVERSE)

2. Procedimiento general:



```
graph LR; A[EXTRACCIÓN DE ADN] --> B[PCR]; B --> C[SECUENCIAMIENTO]
```

- Extracción de ADN: Se realizó a partir de cultivo puro en placa. La concentración de la muestra fue de:
A: 98.9 ng/μl con calidad de 2.11 en ratio 260/280.
- PCR: Se utilizaron cebadores universales para la región ITS.
- Secuenciamiento: Tipo SANGER enviado a Macrogen Korea posteriormente analizado utilizando softwares informáticos (MEGA 7.0, BLASTN, BOLDSYSTEMS).

- 1 -



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



3. Imagen (foto de la corrida electroforética de producto amplificado)

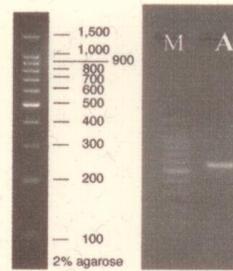


Figura 1. (M) Marcador de referencia. (A) Muestra

4. SECUENCIA CONSENSO final

>A - *Chaetomium globosum* – 525pb

```
GAGGTCACCTTGGGTTAAAAGGTGGTTTAAACGGCCGGAACCCGCGGCGGACCA
GAGCGAGATGTATGCTACTACGCTCGGTGCGACAGCGAGCCCGCCACTGCTTTTC
AGGGCCTGCGGCAGCCGAGGTCCCAACACAAGCCCGGGGGCTTGATGGTTGA
AATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTT
CAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTG
CGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGACTTATCA
GTACAGAAGACTCAGAGAGGCCATAAATTATCAAGAGTTTGGTGACCTCCGGCGG
GCGCCCGCGGTGGGGCCAGGGGCGCCCGGGGGTAAACCCCGGGGCGGCC
GCCGAAGCAACGGTATAGGTAACGTFCAATGGTTTAGGGAGTTTTGCAACTCTG
TAATGATCCCTCCGCAGGTCACCCTACGGAA
```



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

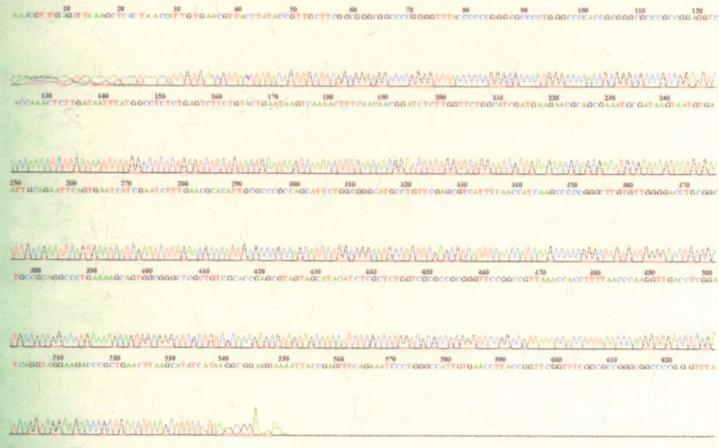
e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



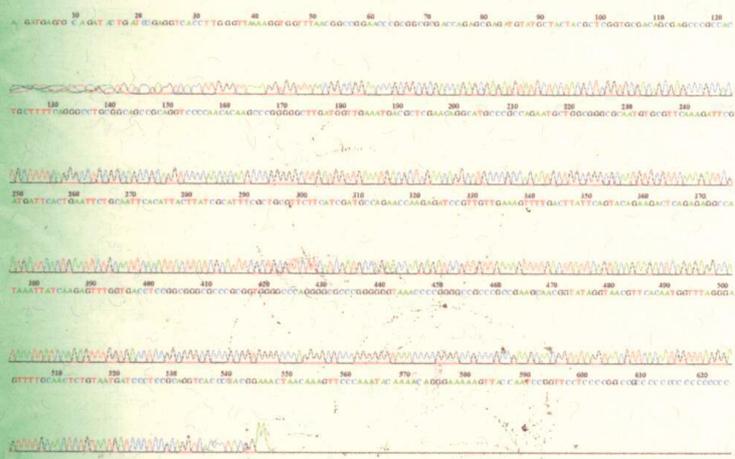
5. ELECTROFEROGRAMAS

Muestra A

File: A_1751-F-Sub1 Run End: 2019/02/08 0:24 Signal G:1751 A:1274 C:9074 F:4965
Sample: A_1751-F Lane: 13 Base spacing: 17.48813 1204 bases in 14474 scans Page 1 of 2



File: A_1754-R-Sub1 Run End: 2019/02/08 0:24 Signal G:1745 A:2273 C:4190 F:2023
Sample: A_1754-R Lane: 13 Base spacing: 17.37654 1145 bases in 14942 scans Page 1 of 2





UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología

Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12

Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023

e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



6. RESULTADO

Tabla 1: Resultados de ID molecular de la muestra A

MUESTRA	Especie	Max score	Query cover	% Identidad	ID NCBI
A	<i>Chaetomium globosum</i>	965	100%	99.81%	AB511977.1

* El Código de identificación pertenece a la base de datos del NCBI, además la base es confirmada con la base de datos de BOLDSystem.org para validar los resultados.

Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Atentamente,

Ing. Medali Huarhua Zaquinola
ESPECIALISTA
CLINICA DE DIAGNOSIS

MHZ /hmg
c.c. Archivo



Mg. Sc Walter Apaza Tapia
COORDINADOR
CLINICA DE DIAGNOSIS

ANEXO N° 49. Resultado de la prueba molecular de la cepa H₂



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología
Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12
Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023
e-mail: clinica@lamolina.edu.pe



La Molina, 20 de mayo de 2019
FI-AF 175-2019 LAC 009
JFT 144

Sr.
Moisés Villodas Bastidas
Lima
Presente

De mi consideración:

El resultado de la identificación de especie de una muestra de Planta Petri conteniendo colonia de *Penicillium* sp. (H2 r2), procedente de Lima, es el siguiente:

1. MÉTODO
Repique a medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa Agar), Agar Jugo V-8 (V-8) de la colonia de *Penicillium* sp. para obtención de colonias puras. Examen macroscópico para caracterización de las colonias y examen microscópico para determinación de las características morfológicas de las estructuras fungosas formadas. Utilización de la bibliografía correspondiente para la identificación de la especie

2. RESULTADOS
Después de 4 días de incubación a 24°C en los medios PDA y V-8 las colonias tuvieron las siguientes características: En medio PDA las colonias fueron redondeadas, abombadas (levantadas) al centro, afelpadas, pulverulentas de color verde-azulado y con un borde delgado de color blanco, (17 mm de diámetro y con un crecimiento de 4.3 mm por día); fragantes, ocasionalmente la colonia forma pequeños exudados transparentes; incolora por el envés; no forma esclerotes, ni cleistotecios. En el medio Agar V-8 las colonias tuvieron características muy parecidas. Sobre el micelio hialino (2.6 µm de diámetro) y tabicado forman abundantes conidióforos cortos de 53 x 2.6 µm (34-70 x 2.6 µm), estrictamente monoverticilados (sin ramificaciones), incoloros y lisos, tabicados con una vesícula muy pequeña sobre los cuales se forman fiálides de forma ampuliforme (9.5 x 2.6 µm) frecuentemente en número de hasta 5; conidias redondeadas, pequeñas (2.3 µm) ligeramente pigmentadas y de pared lisa formando largas y compactas cadenas visibles fácilmente con el microscopio estereoscópico.

Según las características observadas se ha determinado la siguiente especie:

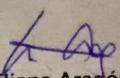
Penicillium decumbens Thom

3. REFERENCIAS

- Pitt, J. 1988. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. North Ryde, N. S. W., Australia. Second edition. 187 p.
- Raper, K. B. and Thom, C. 1949. A Manual of the *Penicillia*. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA. 875 p.

Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Atentamente,


Mg. Sc. Liliana Aragón Caballero
ESPECIALISTA
CLINICA DE DIAGNOSIS


Mg. Sc Walter Apaza Tapia
COORDINADOR
CLINICA DE DIAGNOSIS

LAC/hmg
c.c. Archivo

ANEXO N° 50. *Reactivos usados para la preparación del Medio de Martin*

para el cultivo de hongos del suelo

Medio de cultivo de Martin	
C ₆ H ₁₂ O ₆ (Glucosa)	10.00 g
Peptona	5.00 g
K ₂ HPO ₄	1.00 g
Rosa bengala	0.03 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.50 g
Agar	20.00 g
Agua destilada	1000 mL
pH	5.5

Fuente: García et al. (2016)

ANEXO N° 51. *Reactivos usados para la preparación del Medio V8*

para el cultivo y aislamiento de hongos del suelo

Medio V8	
C ₆ H ₁₂ O ₆ (Glucosa)	5.00 g
V8 (jugo de hortalizas)	200 mL
Agar	15.00 g
Agua destilada	800 mL
pH	5.0

Fuente: García et al. (2016)