

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN POR HONGOS FILAMENTOSOS SOBRE MATERIALES POLIMÉRICOS

ANDRES ANTONIO HERNÁNDEZ CASTILLO
Código: 1042003334

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
Facultad de Ciencias Básicas
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2019

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN POR HONGOS
FILAMENTOSOS SOBRE MATERIALES POLIMÉRICOS**

ANDRES ANTONIO HERNÁNDEZ CASTILLO
Código: 1042003334

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR
POR EL TÍTULO DE MICROBIÓLOGO**

TUTOR ACADÉMICO
José Félix Ortiz Lemus. PhD

DIRECTORES DEL PROYECTO
María Andrea Reyes
Edinson Andres Puentes

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
Facultad de Ciencias Básicas
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA

2019

Nota de aceptación

Jurado 1

Jurado 2

Pamplona, agosto 09 de 2019

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	8
1. OBJETIVOS	13
GENERAL.....	13
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. MARCO REFERENCIAL.....	15
4. METODOLOGÍA	17
4.1. LOCACIÓN DE ESTUDIO.....	17
4.2. AISLAMIENTO DE LA CEPA FÚNGICA.....	17
4.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	17
4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA	17
4.4.1. Inóculo.....	18
4.4.2. Preparación del medio e incubación.....	19
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	20
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	21
6.1. AISLAMIENTO DE LAS CEPAS FÚNGICAS	21
6.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	22
6.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA.....	24
7. CONCLUSIONES	28
8. RECOMENDACIONES.....	29
9. GLOSARIO	30
10. ABREVIATURAS	31
11. BIBLIOGRAFÍA.....	32
12. ANEXO 1	39
Anexo 1. ACTIVIDADES LLEVADAS A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOCORROSIÓN.....	39
1.1. Cuantificación de microorganismos a partir de muestras líquidas y/o sólidas, usando Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).....	39
1.1.1. EXTRACCIÓN DE ADN.....	39

1.1.2. Cebadores usados en la qPCR.....	39
1.1.3. Amplificación de ADN por qPCR.....	40
1.2. Evaluación de Productos Antimicrobianos	41
1.3. Determinación de la velocidad de máxima de picadura.	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de polietileno (ASTM D 883-00., 2000).....	10
Tabla 2. Composición del medio basal de sales (gramos/L).....	18
Tabla 3. Ponderación del crecimiento fúngico (ASTM G21: 2015).....	19
Tabla 4. Características macroscópicas y microscópicas.....	21
Tabla 5. Observación microscópica (objetivo 40x) de los diferentes montajes con respecto al polímero evaluado y microorganismo inoculado.....	25
Tabla 6. Medida del crecimiento fúngico sobre los distintos polímeros.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacción de polimerización del polietileno (Brydson J., 1999; Malpass, D. B., 2010).....	9
Figura 2. Secuencia editada de <i>Fusarium oxysporum</i>	23
Figura 3. Secuencia editada de <i>Fusarium equiseti</i>	24

INTRODUCCIÓN

Los polímeros sintéticos pertenecientes a la categoría de los termoplásticos (como el polietileno, el polipropileno, ente otros), son comúnmente utilizados en redes de distribución de gas, agua y alcantarillado. Al igual que muchos otros tipos de materiales, éstos pueden presentar incidentes y/o fallas como consecuencia de errores en el diseño, instalación, condiciones de servicio y factores ambientales. Estadísticamente, este tipo de tuberías presentan números bajos de incidentes relacionados con fallas en comparación con otros sistemas, reduciendo la probabilidad de daños a personas y bienes (muertes, lesiones, incendios y explosiones) (Farshad., 2006).

Entre los factores que influyen en una posible falla (puntual o generalizada) por deterioro de las propiedades mecánicas de la tubería, se encuentran algunos efectos ambientales que incluyen cargas mecánicas, efectos térmicos, radiación, influencias químicas y factores biológicos (Farshad., 2006).

La amplia aplicabilidad de los polímeros los ha llevado a ser utilizados de forma masiva, en algunos casos sustituyendo a los metales, como es el caso de las tuberías de distribución de gas. Por ello, entender los procesos de degradación de dichos materiales en el ambiente es esencial para la prevención de fugas, eventos catastróficos y pérdidas económicas.

La degradación en los materiales poliméricos puede ser ocasionada por cambios fisicoquímicos en el material, ocasionados por su exposición a la radiación Ultra Violeta (UV), a cambios térmicos, a ambientes químicamente agresivos o a microorganismos. Estos factores ocasionan escisión de enlaces y/o transformaciones químicas en la matriz polimérica.

El proceso de degradación biológica incluye 4 etapas. En la primera sucede un deterioro superficial (acción de microorganismos y factores abióticos que permiten fragmentar el material), la segunda es la despolimerización (conversión enzimática del polímero en monómeros), la tercera es la asimilación (absorción de compuestos) y la cuarta la mineralización (liberación de CO₂, N₂, CH₄, H₂O y sales) (Shah, et al., 2008).

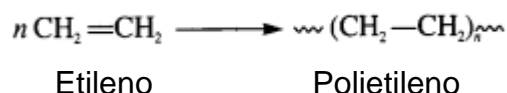
Desarrollo histórico de los materiales plásticos

En los últimos 150 años se introdujeron al mercado los materiales plásticos, los cuales con el tiempo se han convertido en un eje fundamental con gran utilidad en nuestra vida cotidiana moderna (Brydson J., 1999). Hace aproximadamente unos 70 años se dieron las bases para lograr la obtención de los polímeros; abriendo así una gran distancia entre los polímeros sintéticos y los naturales; cuando el

químico alemán Karl Ziegler y de manera simultánea el italiano Giulio Natta, desarrollaron lo que hoy se conoce como catalizadores de Ziegler-Natta. Los cuales consisten en compuestos que catalizan la polimerización de los componentes principales de los polímeros actuales (polietileno y polipropileno), a temperaturas y presiones mucho más bajas que las utilizadas en aquella época (Brydson J., 1999).

Un polímero puede definirse como una molécula de gran tamaño, formada por la unión de pequeñas moléculas (monómeros), repetidamente. Tomando como ejemplo el polietileno (**Figura 1**), este se forma por unidades repetitivas de grupos (C₄H₂) –(etileno).

Figura 1. Reacción de polimerización del polietileno (Brydson J., 1999; Malpass, D. B., 2010).



Las tuberías de polietileno (en adelante PE), son de uso cotidiano para la industria encargada del transporte de agua potable, gas natural y sistemas de desagües. El ambiente en que se encuentran estos sistemas de tuberías los mantiene continuamente sometidos a estrés ambiental, pudiendo sufrir cambios debido a la agresividad del suelo, humedad, cambios de temperatura y ataques microbianos. Además, se puede producir cierta degradación física durante las operaciones de manejo e instalación (Ghabeche, et al., 2015).

Tipos y nomenclatura de los polietilenos

De acuerdo a la IUPAC el polietileno se puede clasificar con respecto a su densidad o peso molecular y ser nombrados por abreviaturas.

La Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (por sus siglas en inglés ASTM) clasifica a los tipos de polietileno, de acuerdo a su densidad (**Tabla 1**).

Tabla 1. Tipos de polietileno (ASTM D 883-00., 2000).

Nombre	Siglas	Densidad (g/cm ³)
Polietileno de alta densidad	HDPE	≥ 0.941
Polietileno de media densidad lineal	LMDPE	0.926-0.940
Polietileno de media densidad	MDPE	0.926-0.940
Polietileno de baja densidad lineal	LLDPE	0.919-0.925
Polietileno de baja densidad	LDPE	0.910-0.925

Tereftalato de Polietileno (PET)

Es un polimérico sintético que se obtiene principalmente mediante una reacción de policondensación entre el ácido tereftálico y el etilenglicol, perteneciente al grupo de los poliésteres; usado principalmente en el envase y empaque de alimentos (Jankauskaite et al., 2008).

Polipropileno

Al igual que el polietileno el polipropileno pertenece a la categoría de los termoplásticos; siendo este el polímero de más baja densidad (0,90 g/cm³) entre los polímeros comercialmente dominantes. Fue producido por primera vez mediante reacción de polimerización por Giulio Natta en 1954. Es usado en productos para la industria automotriz, juguetes, artículos para el hogar, aislamiento para cables eléctricos, tuberías, entre otros usos (Martin B., 2005).

Hongos filamentosos degradadores de Polímeros

El desarrollo de un microorganismo a partir de un polímero, depende principalmente de la constitución y las características del material; así como también de las condiciones ambientales y climáticas propicias para su desarrollo (Lucas et al., 2008). Los hongos son microorganismos que poseen la capacidad para degradar polímeros sintéticos; debido a su capacidad para producir un abundante número de enzimas hidrolíticas (lipasas, esterases, ureasas y proteasas) (Shimao., 2001; Lucas, et al., 2008).

Mediante numerosos estudios se ha evidenciado la capacidad que poseen los hongos para degradar diferentes polímeros sintéticos, estas cepas fúngicas han sido aisladas de diferentes fuentes: suelo de manglares (Kathiresan., 2003;

Immanuel, et al., 2014), suelo de vertederos de basura (Morsy, et al., 2017; Ojha, et al., 2017; Das y Kumar., 2014;), agua marina (Devi, et al., 2015), entre otros. Es conocido que los hongos representan un vasto y amplio grupo de organismos que obtiene su energía a partir de compuestos orgánicos (Warnock., 2012). En algunas ocasiones dichos compuestos son muy complejos y necesitan ser reducidos a sus formas menos complejas (monómeros), para poder ser incorporados y asimilados como nutrientes. Dicho proceso es facilitado por enzimas (depolimerasas) que catalizan la síntesis de los polímeros (Dyakov y Zinovyeva., 2007). Debido a propiedades intrínsecas de cada polímero (como la hidrofobicidad, entre otros), que no permiten una fácil adhesión de los microorganismos a la superficie y por ende proceder a la degradación del material; en la literatura se citan numerosos pre tratamientos (Mahalakshmi y Niren., 2012; Flórez, et al., 2014; Myint, et al., 2012) que causan la oxidación del material y facilitan su proceso de degradación por microorganismos (dichos pre tratamientos muchas veces pueden surgir en el medio ambiente como procesos espontáneos).

Los Hongos poseen la capacidad de formar biopelículas al igual que las bacterias, mediante la formación de consorcios celulares (Fanning y Mitchell., 2012; Finkel y Mitchell., 2011; Li, et al., 2014; Mukherjee, et al., 2012), incluidos por una matriz polimérica extracelular. Este proceso ocurrido probablemente durante la colonización y degradación por parte de los hongos en los materiales poliméricos, no es muy bien conocido; sobre todo los factores fisicoquímicos que intervienen en el proceso (Webb, et al., 1999). Se ha evidenciado que algunas especies de hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. poseen la capacidad de formar biopelículas (Mowat, et al., 2009; Medina, et al., 2019). Las etapas en la formación de biopelículas incluyen: adhesión, colonización, producción de polisacáridos, maduración y dispersión (Donlan., 2002; Chandra, et al., 2001; Blankenship y Mitchell., 2006). Dentro de las técnicas que se pueden utilizar para estimar la biodegradación de un material polimérico se encuentran; la evaluación de las modificaciones macroscópicas (colonización del material, formación de grietas, decoloración, rugosidad), la pérdida de peso del material (que en la mayoría de los casos suele ser lenta e incluso no representativa) y la producción de metabolitos producto del proceso de despolimerización (Lucas, et al., 2008).

Conorcios bacterianos en el proceso de biodegradación

En la naturaleza, las comunidades microbianas realizan el proceso degradativo de una manera dinámica y dependiente del tiempo; por lo que nos muestra una respuesta dinámica al sustrato, alcanzando una mayor biomasa cuando trabajan juntos que cuando actúan solos. Este proceso es conocido como crecimiento sinérgico. Además, los microorganismos pueden usar enzimas con actividades complementarias (sinergia enzimática). Por lo tanto, la sinergia en el crecimiento y

la actividad enzimática, son dos procesos que están relacionados en los consorcios microbianos. Los microorganismos que prosperan en diferentes entornos como consorcios microbianos se mantienen adaptándose al cambio ambiental; la forma principal como se pueden aglomerar y adherirse a una superficie es mediante la formación de biopelículas a partir de la cooperación y/o simbiosis entre los mismos (Van Dyk y Pletschke, 2012; Cragg et al., 2015; Bhardwaj et al., 2012; Syranidou et al., 2019; Urbanek et al., 2018).

Formación de Biopelículas

Una biopelícula es definida como “comunidades de microorganismos que crecen envueltos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie”

Las principales fuerzas que impulsan la formación de biopelículas son: acceso a fuentes de nutrientes, la formación de micronichos favorables, protección frente a condiciones ambientales nocivas y establecimiento de relaciones de cooperación con otras especies (Flemming et al., 2016). Aunque una biopelícula puede consistir en una sola especie, la mayoría de las biopelículas naturales contienen consorcios de múltiples especies.

1. OBJETIVOS

GENERAL

- Determinar la capacidad de biodegradación por hongos filamentosos sobre materiales poliméricos.

ESPECÍFICOS

- Identificar morfológica y molecularmente los hongos asociados a la biodegradación de materiales poliméricos.
- Evaluar la capacidad biodegradadora de hongos filamentosos sobre Polietileno de Media Densidad (MDPE), Polietileno de Baja Densidad (LDPE), Polipropileno (PP) y Tereftalato de Polietileno (PET), mediante la capacidad para colonizar el polímero.

2. JUSTIFICACIÓN

Es de vital importancia para la industria del gas que se mantenga de manera óptima la integridad estructural de las tuberías utilizadas en su distribución. Evitando problemas que pueden ocasionar fallas, rupturas y/o fugas; ya que esto impactaría directamente sobre el ecosistema, la sociedad y la economía. El factor biológico está incluido dentro de los posibles constituyentes que desencadenarían una falla en tuberías a base de polímeros sintéticos (Farshad., 2006). Este trabajo se realizó a raíz de una falla generada en un segmento de tubería utilizada para la distribución de gas natural en la ciudad de Pereira. En donde a partir de los estudios previos realizados se aislaron dos (2) hongos filamentosos, que luego de una revisión bibliográfica, estos posiblemente poseen la capacidad de utilizar como fuente de carbono en su metabolismo, materiales poliméricos de los cuales están fabricadas dichas tuberías. La evaluación de la capacidad de degradación de estos microorganismos, en relación con los factores ambientales; permitirán inferir sobre su posible influencia en fallas ocasionadas en estos sistemas.

3. MARCO REFERENCIAL

La normativa actual usada para evaluar la degradación de polímeros está basada en métodos estandarizados. La normativa americana de referencia es la ASTM, incluyendo la sexta versión de la ASTM G21: 2015; en la cual se evalúa la resistencia de los materiales poliméricos a los hongos, determinando el efecto de los hongos sobre las propiedades de los materiales poliméricos sintéticos tales como tubos, varillas, laminas y películas. De igual manera existen otro tipo de normativa referente en otros continentes como: la JIS (Japanese Industrial Standards) y la ECN (European Normative Reference).

La biodegradación de los polímeros por microorganismos representa una problemática a nivel de integridad, seguridad y confianza en los sistemas de tuberías utilizados.

Los posibles mecanismos para la degradación microbiana de los materiales poliméricos incluyen el ataque directo por ácidos o enzimas, la formación de ampollas debido a la evolución del gas, el agrietamiento y la desestabilización del polímero por cloruros y sulfuros concentrados. En la literatura se han realizado numerosos estudios que incluyen en primera medida la realización de pretratamientos (procesos abióticos), para facilitar el proceso de degradación influenciado por hongos. Dichos pretratamientos son utilizados con el fin de, facilitar su acceso al material, (ya que su estado hidrofóbico lo limita), debido a la falta de grupos funcionales y el alto peso molecular (Flórez, et al., 2014). Mediante la utilizaron pretratamientos como la termo-oxidación (100°C), foto-oxidación mediante Luz Ultravioleta (luz UV >300 nm) y tratamiento con ácido nítrico, Mahalakshmi y Niren en 2012, evaluaron la degradación de películas de polietileno (PE); evidenciando que, las películas del polímero pretratadas fueron degradadas de una manera efectiva con respecto a las no tratadas.

La evaluación de la biodegradación del polietileno de baja densidad, utilizando cepas fúngicas del género ***Aspergillus spp.*** fue comprobada por Deepika y Madhuri en 2015; mediante la capacidad de deterioro del polietileno en polvo, analizándolo con la formación de halos claros debido al crecimiento por la utilización del polietileno como única fuente de carbono; en el estudio encontraron hongos con potenciales de degradación como: ***Aspergillus niger*** (26.17%) y ***A. flavus*** (16.45%) en un periodo de evaluación de seis (6) meses.

La gran biodegradabilidad del polietileno por parte de los microorganismos y principalmente los hongos con respecto a las bacterias, fue comprobado por Muhonja, et al en 2018. Ya que la exposición continua de los materiales a factores ambientales conduce a procesos como la desintegración, el deterioro del material y la degradación de sus componentes (Gu., 2003).

En cuanto al polipropileno Jeyakumar, et al en 2013, evaluaron el efecto combinado del tratamiento previo (tratamiento térmico y/o UV) y el uso de hongos en la degradación de polipropileno observando que las muestras pretratadas permitieron una fácil colonización y, por ende, una aceleración en el proceso de biodegradación.

Biodegradación mediada por consorcios bacterianos

Se ha demostrado la eficiencia de diferentes cepas bacterianas en la degradación de polímeros sintéticos, empleando cultivos mixtos en forma de consorcios microbianos. La biodegradación de películas de polietileno fue evaluada por Negi et al (2011), mediante la utilización de dos tipos diferentes de consorcios, que constaban con microorganismos pertenecientes a los géneros ***Microbacterium sp.*** ***Pseudomonas sp.*** y ***Bacterium sp.*** en donde dichos consorcios causaron la degradación superficial significativa de las películas de polietileno observándose cambios en las características estructurales. En general la vía de degradación posible del polímero requiere la formación de biopelículas en la superficie del polímero (Restrepo et al., 2014); las bacterias generalmente colonizan un sustrato mediante la formación de biopelículas; dichas estructuras están constituidas por especies mixtas en la mayoría de los ambientes (Fanning y Mitchell., 2012). Se ha evidenciado que las células que forman parte de estas biopelículas hacen un uso más efectivo de sus enzimas degradativas extracelulares que las células bacterianas de vida libre. Ya que, mientras que las enzimas de las bacterias plantónicas se diluyen en el ambiente, las producidas por las bacterias sésiles son retenidas en la matriz polimérica extracelular (Flemming y Wingender., 2010; Flemming et al., 2016).

Recientemente se ha evidenciado que no solo las bacterias utilizan la formación de biopelículas para aferrarse a una superficie sólida y proceder a su colonización; si no que también los hongos filamentosos y las levaduras utilizan estas estructuras como método de colonización (Iñigo y Del Pozo; 2018; Krüger et al., 2019; Richardson y Rautemaa., 2019; Wuyts et al., 2018).

4. METODOLOGÍA

4.1. LOCACIÓN DE ESTUDIO.

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Biocorrosión de la Corporación para la Investigación de la Corrosión (CIC). El material biológico fue obtenido a partir de muestreos realizados sobre el trazado de tuberías de distribución de gas natural que presentaron fugas secundarias a fallas estructurales.

4.2. AISLAMIENTO DE LA CEPA FÚNGICA.

Se realizaron dos frotis con hisopos estériles en las zonas de las fallas en tuberías de polietileno de media densidad (MDPE) de 2 pulgadas de diámetro utilizando el medio PDA para permitir el crecimiento fúngico. Los aislamientos se identificaron preliminarmente a través de sus características macroscópicas y microscópicas (Kathiresan., 2003; Ojha, et al., 2017; Immanuel, et al., 2014), empleando la clave taxonómica “Key to miscellaneous genera”, de Pitt y Hocking (1997). Posteriormente los microorganismos aislados fueron identificados molecularmente.

4.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La identificación del hongo aislado fue realizada en las instalaciones del laboratorio de CorpoGen en Bogotá; a partir de cultivos crecidos de cada una de las cepas en agar PDA. El procedimiento utilizado se describe como sigue:

- Aislamiento y purificación del ADN.
- Amplificación por PCR con los iniciadores ITS4 e ITS5 de la región genética denominada ITS del ADNr fúngico.
- Purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación mediante método Sanger con los iniciadores ITS4 e ITS5.
- Limpieza y ensamblaje de las secuencias para obtener la secuencia problema.
- Análisis taxonómico de la secuencia mediante la herramienta BLAST, del NCBI, comparando contra la colección de nucleótidos (nr/nt), del mismo NCBI, que comprende las bases de datos: GenBank, EMBL, DDBJ y PDB.

4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA

Ya que en la siguiente metodología se emplea el medio basal de sales (**Tabla 2**), que carece de una fuente de carbono. Se espera que las cepas fúngicas aisladas a partir del frotis realizado a la tubería de polietileno de media densidad y que poseen la capacidad de degradar el polímero puedan adherirse a la superficie de

las piezas; observándose de acuerdo a su grado de colonización abundantes estructuras características como una extensa red de hifas. lo que evidenciaría la posible utilización del polímero como fuente de carbono y energía.

Tabla 2. Composición del medio basal de sales (gramos/L).

Componente	Cantidad (gramos/L)
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,1
(NH ₄) (NO ₃)	0,3
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5
NaCl	1
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
CaSO ₄ . 2H ₂ O	0,0023
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,001
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,001

(Pramila y Ramesh 2015; Roy et al., 2008).

4.4.1. Inóculo

Las cepas de referencia (ATCC) usadas de acuerdo a la norma ASTM G21: 2015 en el presente estudio, fueron utilizadas solo como controles para ser contrastadas con los aislamientos realizados; ya que estos microorganismos poseen gran afinidad por el uso de plastificantes, celulosa, lubricantes, estabilizadores y colorantes como fuente de alimentos.

Se siguió la metodología empleada por la norma ASTM G21: 2015 como sigue:

Se realizó la suspensión de esporas de dos (2) especímenes de hongos ATCC usados como microorganismos de referencia, de acuerdo a lo estipulado por la norma ASTM G21: 2015 (*Aspergillus niger* y *Chaetomiun globosum*); por lo cual no fueron tenidos en cuenta como microorganismos con potencial biodegradativo para este estudio. Además de un hongo filamentoso aislado de una de las tuberías que presentaron falla (*Fusarium equiseti*).

Para preparar la suspensión de esporas se utilizaron cultivos conservados de 2 semanas de edad. La suspensión se preparó lavando la superficie del micelio, usando aproximadamente 10 mL de SDS al 0,5 % y raspando suavemente con un asa de Digrafsky la superficie del cultivo. Seguidamente esta solución se vertió en un frasco Schott estéril (de 100 mL) conteniendo perlas de vidrio

(aproximadamente 15-30) y agitando vigorosamente para liberar las esporas. Esta suspensión de esporas se filtró utilizando un embudo de vidrio con filtro de fibra de vidrio estéril. Posteriormente se centrifugó la suspensión de esporas (1000 xg / 5 min), se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml de agua destilada estéril. Finalmente se cuantificó la suspensión de esporas en cámara de Neubauer, hasta alcanzar una densidad aproximada de 2×10^5 a 10^6 esporas/mL (Cañedo V y Ames T., 2004; ASTM G21-15).

4.4.2. Preparación del medio e incubación

Se cortaron trozos de aproximadamente 2 cm x 2 cm, de las de tubería de Polietileno de Media Densidad (MDPE, color amarillo), Polietileno de baja densidad (LDPE color negro), Tereftalato de polietileno (PET, color blanco) y Polipropileno (PP color verde). Posteriormente se sumergieron los trozos de cada material por separado utilizando el medio basal de sales con 15 g/L de agar-agar modificado (Pramila y Ramesh 2015; Roy et al., 2008), vertiéndolo en frascos de vidrio tapa ancha de 100 mL (aproximadamente 20 mL del medio), y los cortes obtenidos de cada tubería se colocaron sobre la superficie del agar (cada prueba se realizó por duplicado) para cada tubería se realizaron montajes tanto de la cara interna como de la cara externa del material, inoculándolas por aspersión sobre las muestras para cada tubería y con cada uno de las tres (3) cepas fúngicas por separado. Seguidamente fueron incubados a temperatura ambiente en oscuridad durante veintiocho (28) días. Pasado este tiempo, se evaluó y se determinó el crecimiento fúngico sobre el material, mediante visualización de las piezas en lupa estereoscópica en tres aumentos diferentes (8X, 40X y 80X). El resultado se estimó de acuerdo con el puntaje establecido en la ASTM G21: 2015 (**Tabla 3**). Como control negativo se utilizó el medio basal de sales más el fragmento de tubería sin inóculo fúngico. De igual forma, se evaluó la viabilidad de las esporas fúngicas de cada cepa analizada en el medio de sales minerales (SM) (ASTM G21: 2015).

Tabla 3. Ponderación del crecimiento fúngico (ASTM G21: 2015).

Ponderación	Interpretación
0	Ninguno
+	Trazas de crecimiento: (<10%)
++	Crecimiento Liviano: (entre 10 y 30%)
+++	Crecimiento Medio: (entre 30 y 60%)
++++	Crecimiento Pesado: (entre 60% y 100%)

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES





Mes	Abril		Mayo				Junio				Julio			
Semana	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Actividad														
Socialización de temática a trabajar														
Revisión bibliográfica														
Aislamiento de cepas fúngicas														
Identificación molecular														
Evaluación de la capacidad biodegradadora														
Presentación de resultados parciales														
Cuantificación de microorganismos a partir de muestras líquidas y/o sólidas, usando Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).														
Evaluación de Productos Antimicrobianos														
Determinación de la velocidad de máxima de picadura														
Informe final de resultados														




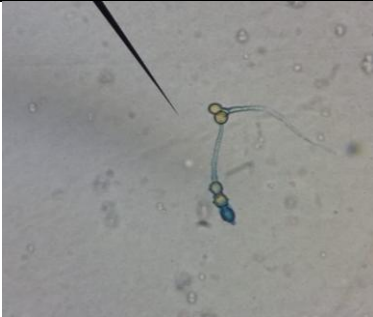
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. AISLAMIENTO DE LAS CEPAS FÚNGICAS

Mediante las características macroscópicas y microscópicas empleando la clave taxonómica de Pitt y Hocking (1997), los dos aislamientos obtenidos fueron identificados a partir del frotis realizado en la zona de la falla en la tubería de polietileno de media densidad (MDPE); de acuerdo a las siguientes característica (**Tabla 4**); conidias transmitidas por hifas aéreas o superficiales, micelio y conidio hialinos o de color brillante, conidios no septados o con más de un septo, los conidios nacen de la disminución gradual de las células fértiles (fiálides), dichas colonias exceden los 50 mm de diámetro en medio PDA. A fin de confirmar la especie de ambos hongos, fueron sometidos a caracterización molecular.

Tabla 4. Características macroscópicas y microscópicas.

<i>Fusarium</i> spp. (Aislamiento 1)		
Características macroscópicas		
		Colonia filamentososa de color blanco elevada, con pigmento morado / rosado en el anverso y color crema / curuba en el reverso.
Anverso en agar PDA	Reverso en agar PDA	Descripción
Características microscópicas		
		Hifas hialinas septadas, con Micro y Macroconidias con 3 a 4 septos.

Microconidias (40x)	Macro y microconidias (100x)	Descripción
<i>Fusarium</i> spp. (Aislamiento 2)		
Características macroscópicas		
		Colonia algodonosa de color blanco elevada en el anverso y color marrón pálido a oscuro en el reverso por la producción de pigmentos.
Anverso en agar PDA	Reverso en agar PDA	Descripción
Características microscópicas		
		Macroconidias largas y delgadas, con cierta curvatura con 4 a 5 septos; Clamidosporas en cadena de doble pared gruesa.
Macroconidias (100x)	Clamidosporas (100x)	Descripción

6.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Los resultados del análisis taxonómico a partir de la amplificación PCR con los iniciadores ITS4 e ITS5 de la región genética ITS del ADNr fúngico, mostraron una secuencia de 572 pb (**Figura 2**), los cuales comparados contra la base de datos nr/nt del NCBI indican que la secuencia problema ensamblada resultante muestra un 99% de identidad en el 99% de su longitud con secuencias de la especie *Fusarium oxysporum* (aislamiento 1), la capacidad de adherencia a la superficie de polietileno de una cepa del género *Fusarium sp.* fue evidenciada por Shah, et al., (2009), aislada partir de lodos de aguas residuales; detectando cambios como la aparición de picaduras, grietas y erosión, como consecuencia de la capacidad de degradar el polietileno. Del mismo modo se ha evaluado la actividad de la

cutinasa (FoCut5a) producida por *Fusarium oxysporum*, expresada en una cepa de *Escherichia coli*, evidenciando su potencial aplicación en la modificación superficial del PET y otros polímeros sintéticos (Dimaragona, et al., 2015).

Este es un hongo fitopatógeno y cuyo hábitat natural es el suelo. Dicho hongo posee un complejo de enzimas hidrolíticas con las que degrada la pared celular durante su proceso de penetración. Dentro de estas enzimas se podrían resaltar las Cutinasas (Dimarogona et al., 2015), capaces de hidrolizar PET y polímeros sintéticos. También poseen lacasas (**EC 1.10.3.2**), las cuales son capaces de oxidar polietileno, quitina sintasa, quinasa, pectato liasa y una gran variedad de compuestos, favoreciendo así su degradación por el hongo (Kunamneni et al., 2008). Diferentes estudios han evidenciado que, algunos hongos con mecanismos enzimáticos para degradar la pared celular de sus anfitriones; pueden utilizar estas características para degradar polímeros como el polietileno (Aro et al., 2005; Arutchelvi et al., 2008).

Figura 2. Secuencia editada de *Fusarium oxysporum*.

```

5`
TTTTCTCCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCC
TAGGTCAACATTCAGAAGTTGGGGTTTAACGGCGTGGCCGCGACGATTACCA
GTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCAA
TTTGGGGAACGCGAATTAACGCGAGTCCCAACACCAAGCTGTGCTTGAGGGT
TGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGT
GCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCA
TTTTGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTT
TTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGG
TCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAGGC
AACAAGTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCC
TCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTTTACTT
3`

```

De igual manera, el segundo aislamiento mostró una secuencia de 576 pb (**Figura 3**); la cual de acuerdo a los resultados del análisis taxonómico contra la base de datos nr/nt del NCBI, indican que la secuencia problema ensamblada resultante muestra un 99% de identidad en el 98% de su longitud con secuencias de la especie *Fusarium equiseti* (aislamiento 2).

Figura 3. Secuencia editada de *Fusarium equiseti*.

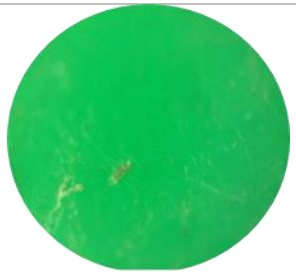



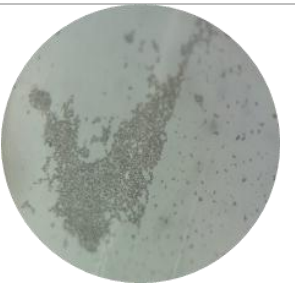

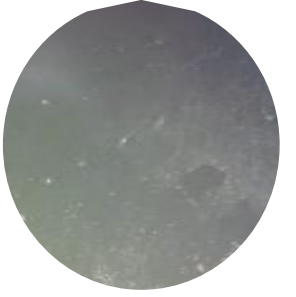


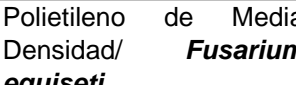
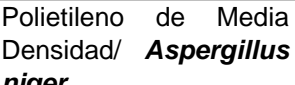
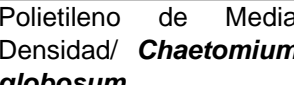
5`
TTGGAAGTAAAAGTTGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC
ATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTC
GGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAAAGGGACGGCCCGCCCGAGGACCCCT
AAACTCTGTTTTTAGTGGAAGTTCTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA
TTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCC
TCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCGCCAAATCGA
TTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCATACACCTCGTTACTGG
TAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCACTTCTGAATGTTGACCTCGGAT
CAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATACCCCGGAGGAATA
3`

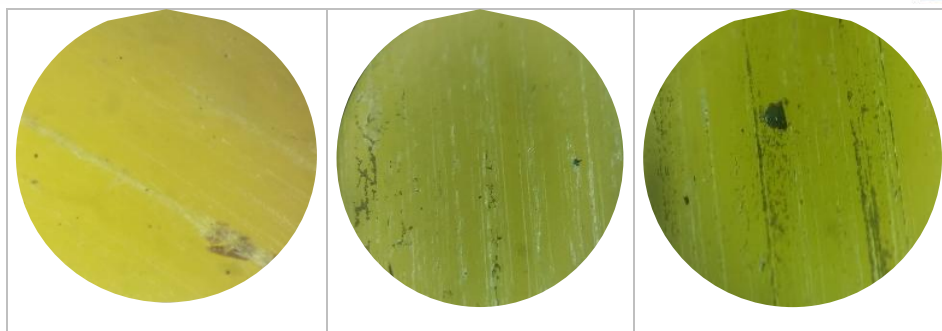
6.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIODEGRADADORA.

El hongo aislado *Fusarium oxysporum* no fue utilizado como microorganismo de prueba en la evaluación de la capacidad biodegradadora; debido a que su aislamiento e identificación fue más dispendiosa y demorada por contaminaciones repetitivas. De acuerdo a esto, el potencial biodegradativo de este microorganismo será evaluado en estudios posteriores.

La evaluación del crecimiento fúngico en los diferentes materiales poliméricos evaluados se puede apreciar en la **Tabla 5**, en donde para este estudio el grado de colonización; se determinó con respecto a la extensión del micelio fúngico distribuido en la superficie del polímero.

Tabla 5. Observación microscópica (objetivo 40x) de los diferentes montajes con respecto al polímero evaluado y microorganismo inoculado.

Material polimérico / Microorganismo inoculado		
Polipropileno/ <i>Fusarium equiseti</i>	Polipropileno/ <i>Aspergillus niger</i>	Polipropileno/ <i>Chaetomium globosum</i>
		
Tereftalato de polietileno/ <i>Fusarium equiseti</i>	Tereftalato de polietileno/ <i>Aspergillus niger</i>	Tereftalato de polietileno / <i>Chaetomium globosum</i>
		
Polietileno de baja densidad/ <i>Fusarium equiseti</i>	Polietileno de baja densidad/ <i>Aspergillus niger</i>	Polietileno de baja densidad/ <i>Chaetomium globosum</i>
		
Polietileno de Media Densidad/ <i>Fusarium equiseti</i>	Polietileno de Media Densidad/ <i>Aspergillus niger</i>	Polietileno de Media Densidad/ <i>Chaetomium globosum</i>
		



A partir de la inspección visual realizada a las piezas de tubería, se observó que la cepa fúngica estudiada (*Fusarium equiseti*) posee la capacidad de adherirse a la superficie de los diferentes materiales poliméricos analizados; observándose como una red de hifas de color blanquecino; lo que evidenciaría la posible utilización del polímero como fuente de carbono y energía, que conduciría a su degradación (Méndez et al., 2007; Shah et al., 2009). En la **Tabla 6**, se pueden apreciar los resultados de la medida del crecimiento fúngico sobre los diferentes materiales poliméricos, con sus respectivos puntajes; los cuales fueron medidos utilizando un estereoscopio y su valor fue dado bajo las observaciones visuales realizadas, de

Tabla 6. Medida del crecimiento fúngico sobre los distintos polímeros.

Tipo de tubería	Cepa Fúngica						Control Negativo	
	<i>Fusarium equiseti</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Chaetomium globosum</i>		Replica 1 [cara interna]	Replica 2 [cara externa]
	Replica 1 [cara interna]	Replica 2 [cara externa]	Replica 1 [cara interna]	Replica 2 [cara externa]	Replica 1 [cara interna]	Replica 2 [cara externa]		
MDPE	+	+	+++	+	++	+	0	0
LDPE	++	+	+++	+++	++	+	0	0
PET	++	+	+++	+++	+++	++	0	0
PP	+	+	+	+	++	+	0	0
Viabilidad de las esporas	0		+++		0			

acuerdo a lo establecido por la norma (ASTM G21: 2015). En donde se puede evidenciar que tanto *Fusarium equiseti* como las dos cepas ATCC (*Aspergillus niger* y *Chaetomium globosum*), todos presentaron crecimiento en la superficie (tanto en la cara interna como en la cara externa) de las piezas de tubería analizadas Polietileno de Media Densidad (MDPE), Polietileno de Baja densidad (LDPE), Tereftalato de polietileno (PET) y Polipropileno (PP), con crecimientos comprendidos entre el 10% al 60% con respecto al total de la superficie del polímero. De las cepas de referencia, la que presentó mayor crecimiento en las piezas de tubería fue *Aspergillus niger*. De los cuatro tipos de tubería analizados, las piezas de tubería de Polipropileno (PP) fueron las que presentaron el menor crecimiento. De igual manera, se evidenció, que la composición del medio basal de sales no cuenta con los nutrientes necesarios para el desarrollo de la cepa aislada *Fusarium equiseti* al no contar con crecimiento; ratificando de esta manera que este medio no influye en el crecimiento del hongo, si no que por el contrario su crecimiento solo estaría influenciado por la utilización de los materiales poliméricos como fuente de energía. Estos resultados también son validados con el control negativo, en donde no se observó contaminación de ningún tipo. Teniendo en cuenta que el medio basal de sales sólido no cuenta con ninguna fuente de energía para el crecimiento de los hongos, el desarrollo y crecimiento de *Fusarium equiseti* en la superficie de las piezas de tubería evaluadas, evidencian una posible utilización del material como fuente de carbono, y que; los hongos pueden proliferar a partir de una variedad de matriz que son consideradas como resistentes a ellos. Debido posiblemente a su capacidad de secretar abundantes metabolitos facilitando sus procesos metabólicos (Deshmukh, et al., 2016). Dentro de los procesos que intervienen en la colonización de un sustrato sólido, el primero es la adhesión; el cual, está dado por interacciones no específicas entre la superficie celular y el sustrato; interviniendo factores importantes como la hidrofobicidad (Rönner, et al., 1990; Webb, et al., 1999). Sin lugar a duda es de gran importancia poder determinar si estos dos microorganismos aislados a partir del polímero, actúan de una manera sinérgica sobre el material polimérico (como es de esperarse que ocurra en la naturaleza), y poder determinar de qué manera podrían desarrollar esa complementariedad metabólica; o si por el contrario actúan de manera solitaria (Van Dyk y Pletschke, 2012; Cragg et al., 2015).

7. CONCLUSIONES

Los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de las muestras recolectadas fueron identificados morfológica y molecularmente como *Fusarium equiseti* y *Fusarium oxysporum*; dichos hongos, de acuerdo a los resultados preliminares evidenciados en este estudio, podrían estar asociados a la degradación de polímeros sintéticos en concordancia con las actividades observadas en otros estudios.

El hongo aislado *Fusarium equiseti* demostró una capacidad biodegradadora de polímero asociada a la capacidad de crecer en presencia de los mismos, como única fuente de carbono, esto permite asumir que se encuentra involucrado y participa en la pérdida de material en las tuberías compuestas de Polietileno de Media Densidad (MDPE), Polietileno de baja densidad (LDPE), Tereftalato de Polietileno (PET) y Polipropileno (PP).

El polímero sintético en el que se presentó la mayor y menor actividad biodegradadora respectivamente fueron Tereftalato de Polietileno (PET) Polipropileno (PP).

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con las pruebas de biodegradación de los polímeros utilizando las dos cepas fúngicas aisladas, de tal manera que se pueda determinar la eficiencia y efectividad de dichos hongos, así como también; sería de gran importancia poder comprobar que enzimas (intra y/o extracelulares) y metabolitos podrían estar presentes durante el proceso de despolimerización del material.

De igual manera, se sugiere poder determinar de qué modo pueden influir factores de tipo ambiental como (foto-oxidación, degradación térmica, solventes químicos, entre otros), en el proceso de biodegradación causado por hongos sobre el polímero. Ya que estos factores; conocidos también como pretratamientos, simulan el envejecimiento ocurrido al material expuesto al medio ambiente durante el transcurso de años de uso.

9. GLOSARIO

ABRASIÓN: desgaste de una superficie, por la acción mecánica de rozamiento.

BIODEGRADACIÓN: proceso en el cual la estructura molecular de un material se descompone a través de procesos metabólicos o enzimáticos.

POLIETILENO: polímero preparado por la polimerización del etileno como único monómero.

POLÍMERO SINTÉTICO: a diferencia de los polímeros naturales, son polímeros que se sintetizan químicamente.

POLÍMERO: compuesto orgánico de alto peso molecular cuya estructura puede representarse por una unidad monomérica repetida.

POLIPROPILENO: polímero preparado por la polimerización del propileno como único monómero.

qPCR: técnica de biología molecular en la que se realiza la amplificación y detección de ácidos nucleicos en un solo paso.

TEREFTALATO DE POLIETILENO: polímero termoplástico obtenido mediante una reacción de condensación entre el ácido tereftálico y el etilenglicol.

TERMOPLÁSTICO: clase de material plástico que puede ser ablandado repetidamente por calentamiento y endurecido por enfriamiento. ABS, PVC, poliestireno y polietileno son materiales termoplásticos.

TIME KILL TESTING: Ensayo para evaluar la reducción *in vitro* de una población microbiana de organismos de prueba después de la exposición a un compuesto antimicrobiano.

10. ABREVIATURAS

ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
CIC	Corporación para la Investigación de la Corrosión
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECN	European Normative Reference
HDPE	High-density polyethylene
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
ITS	Internal Transcribed Spacer
JIS	Japanese Industrial Standards
LDPE	Low-density polyethylene
MDPE	Medium-density polyethylene
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PE	polyethylene
PET	polyethylene terephthalate
PP	Polypropylene
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SM	Medio de sales minerales

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aro, N, Pakula, T & Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, pg. 719–739.
- Arutchelvi, J, Sudhakar, M, Arkatkar, A, Doble, M, Bhaduri, S & Uppara, PV. (2008). 'Biodegradation of polyethylene and polypropylene', *Indian Journal of Biotechnology*. 7, pg. 9–22.
- ASTM D883-00, Standard Terminology Relating to Plastics, ASTM International, West Conshohocken, PA. (2000). pg 6-7. [En línea]. Recuperado de: <http://file.yizimg.com/175706/2011090910321097.pdf>
- ASTM G21: 2015. Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi, ASTM International, West Conshohocken, PA.
- Ben-Dov, E., Brenner, A. & Kushmaro, A. (2007). Quantification of Sulfate-reducing Bacteria in Industrial Wastewater, by Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) Using *dsrA* and *apsA* Genes. *Microb Ecol*. 54 (3), pg 439–451.
- Bhardwaj, H., Gupta, R., & Tiwari, A. (2012). Microbial population associated with plastic degradation. *Scientific Reports*. 1 (5), pg 272–274.
- Blankenship J and Mitchell A. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*. 9 (6), pg 588-594. [En línea]. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136952740600155X?via%3Dihub>
- Brydson, J., *Plastics Materials*, Vol. 7th edition, Butterworth Heinemann, (1999). Pg 1-21
- Cañedo Verónica y Ames Teresa. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. pg 29-31.
- Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Distel, D. L., Dupree, P., Etxabe, A. et al. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the tree of life. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 29, pg 108–119.
- Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., and Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen ***Candida albicans***: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*. 183(18) pg 5385–5394. [En línea]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC95423/>

Das, M and Kumar, S. (2014). Microbial deterioration of low density polyethylene by *Aspergillus* and *Fusarium* sp. International Journal of ChemTech Research. 6 (1), pg 299–305.

Deepika S and Jaya Madhuri R, (2015). Biodegradation of low density polyethylene by micro-organisms from garbage soil. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences. 3(1), pg 15-21.

Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., & Purohit, H. J. (2016). Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. Indian journal of microbiology, 56(3), pg 247–264. [En línea]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4920763/>

Devi R, Kannan V, Nivas D, Kannan K, Chandru S and Antony A. (2015). Biodegradation of HDPE by *Aspergillus* spp. from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. Marine Pollution Bulletin. pg 1-9.

Dimarogona M, Nikolaivits E, Kanelli M, Christakopoulos P, Sandgren M and Topakas E. (2015). Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). 1850 (11), pg 2308-2317.

Donlan Rodney. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 8 (9) pg 881- 890. [En línea]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732559/>

Dyakov Yu. T and Zinovyeva S.V. (2007). Chapter 1 - Plant parasite microorganisms, in Comprehensive and Molecular Phytopathology. pg 19. [En línea]. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521323500043>

Environmental Protection Agency (EPA). Permeation and Leaching. Washington DC (2004). [En línea]. Recuperado de: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/permeationandleaching.pdf>

Fanning, S., & Mitchell, A. P. (2012). Fungal biofilms. PLoS pathogens, 8(4) pg 1-4. [En línea]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320593/#ppat.1002585-Finkel1>

Farshad Mehdi. (2006). Plastic pipe systems, in Plastic Pipe Systems: Failure Investigation and Diagnosis. Elsevier Science. pg 1-27. [En línea]. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781856174961500021>

- Finkel, J. S., & Mitchell, A. P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature reviews. Microbiology*, 9(2), pg 109–118. [En línea]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3891587/>
- Flórez R, Bassi J.M., Thompson A. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene - a review. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 88, pp 83-90. [En línea]. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.014>.
- Flemming, H. C. and Wingender, J. (2010), The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, pg 623–633.
- Flemming H. C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology.* 14(9) pg 563-575.
- G.M. Guebitz, A. Cavaco-Paulo. (2008). Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalisation of synthetic polymers. *Trends Biotechnol.* 26 (1), pg 32-38.
- Ghabeche, W. Alimi L, and Chaoui K. (2015). Degradation of plastic pipe surfaces in contact with an aggressive acidic environment. *Energy Procedia.* 74. pg 351-364. [En línea]. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876610215013934>
- Gu Ji-Dong. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 52 (2), pg 69-91.
- Immanuel O. M., Ibiene A. A. and Stanley H. O. (2014). Enhanced biodegradation of polyethylene by fungus isolated from the koluama mangrove swamp in the Niger Delta. *Scholars Research Library, J. Microbiol. Biotech.Reserch*, 4 (2), pg 1-9.
- Iñigo, M., & Del Pozo, J. L. (2018). Fungal biofilms: From bench to bedside. *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 31 (1), pg 35–38.
- Jankauskaite, V, Macijauskas, G, Lygaitis, R. (2008). Polyethylene Terephthalate Waste Recycling and Application Possibilities: a Review. *Materials Science.* 14 (2), pg 119-127.
- Jeyakumar D, Chirsteen and Doble M. (2013). Synergistic effects of pretreatment and blending on fungi mediated biodegradation of polypropylenes. *Bioresource Technology* 148, pg 78-85. [En línea]. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413013047#b0025>
- Kathiresan, K. (2003). Polythene and plastic degrading microbes in an Indian mangrove soil. *Rev. Biol. Trop.*, 51(3-), pg 629-633.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., and Glöckner, F. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*. 41(1), pg 1-11.

Krüger, W., Vielreicher, S., Kapitan, M., Jacobsen, I. D., & Niemiec, M. J. (2019). *Fungal-Bacterial Interactions in Health and Disease*. Pathogens (Basel, Switzerland). 8 (70), pg 1-41.

Kunamneni, A, Plou, FJ, Ballesteros, A & Alcalde, M. (2008). 'Laccases and their applications: a patent review', *Recent Patents on Biotechnology*. 2, pg 10–24.

Li Peiqian, Pu Xiaoming, Shen Huifang, Zhang Jingxin, Huang Ning, Lin Birun. (2014). Biofilm formation by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and susceptibility to environmental stress, *FEMS Microbiology Letters*, 350 (2) pg 138–145. [En línea]. Recuperado de: <https://academic.oup.com/femsle/article/350/2/138/565036>

Lucas N, Bienaime C, Belloy C, Queneudec M, Silvestre F, Saucedo J. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Hemosphere*. 73(4), pg 429-442.

Mahalakshmi, V and Niren, A. (2012). Assessment of Physicochemically treated plastic by fungi. *Annals of Biological Research*, 3 (9): pg 4374-4381.

Malpass, D. B. (2010). Introduction to Polymers of Ethylene, in *Introduction to Industrial Polyethylene: Properties, Catalysts, and Processes*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. pg 1-12. [En línea]. Recuperado de: <https://epdf.tips/queue/introduction-to-industrial-polyethylene-properties-catalysts-and-processes-wiley.html>

Martin B. Hocking. (2005). Synthetic vinyl addition polymers, chapter 23 - Commercial Addition (Vinyl-Type) Polymers, in *Handbook of Chemical Technology and Pollution Control (Third Edition)*. Academic Press. pg 737-758. [En línea]. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120887965500260>

Medina R, Grajeda J, Escoto L, Hernandez L, Guillén J, Jones G and Bautista-de Lucio V. (2019). Proteome analysis of biofilm produced by a *Fusarium falciforme* keratitis infectious agent. *Microbial Pathogenesis*. 130, pg 232-241. [En línea]. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401018315808>

Méndez CR, Vergaray G, Vilma R, Karina B, Cárdenas J. (2007). Isolation and characterization of polyethylene-biodegrading mycomycetes. *Rev. Peru. Biol*. 13(3), pg 203-205.

Morsy EM, Hassan HM, Ahmed E. (2017). Biodegradative activities of fungal isolates from plastic contaminated soils. *Mycosphere* 8(8), pg 1071–1087.

Mowat Eilidh, Williams Craig, Jones Brian, Mcchlerly Susan and Ramage Gordon. (2009). The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm? *Medical Mycology*. 47(1) pg 120–126. [En línea]. Recuperado de: https://academic.oup.com/mmy/article/47/Supplement_1/S120/1070250

Muhonja C N, Makonde H, Magoma G, Imbuga M. (2018). Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. *PLoS ONE* 13(7), pg 1-17. [En línea]. Recuperado de: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198446>

Mukherjee PK, Chandra J, Yu C, Sun Y, Pearlman E, Ghannoum MA. (2012). Characterization of *Fusarium Keratitis* Outbreak Isolates: Contribution of Biofilm to Antimicrobial Resistance and Pathogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53 (8) pg 4450-4457. [En línea]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3394686/#>

Myint B, Ravi C, Sakharkar M K, Lim CS, Sakharkar R K. (2012). Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* Species. *Indian J Microbiol*; 3, pg 411-419. [En línea]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3460136/>

NACE Standard Practice SP0775-2018 “Preparation, Installation, Analysis and Interpretation of Corrosion Coupons in Oilfield Operations”.

NACE Standard Test Method TM0194-2014. Field Monitoring of Bacteria Growth in Oil and Gas Systems.

Negi H, Gupta S, Zaidi M G H, Goel R. (2011). Studies on biodegradation of LDPE film in the presence of potential bacterial consortia enriched soil. *Biologija*. 57(4), pg 141–147.

Ojha Nupur, Pradhan Neha, Singh Surjit, Barla Anil, Shrivastava Anamika, Khatua Pradip, Rai Vivek, Bose Sutapa. (2017). valuation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports*. 7, pg 1-12. [En línea]. Recuperado de: <https://www.nature.com/articles/srep39515>

Pitt J. I. and Hocking A. D. (1997). Key to miscellaneous genera, Chapter 5- Primary keys and miscellaneous fungi, In *Fungi and Food Spoilage*-Springer US. pg 64-66.

Pramila R and Ramesh K. (2015). Potential biodegradation of low density polyethylene (LPDE) by *Acinetobacter baumannii*. *African Journal of Bacteriology Research* 7 (3), pg 24-28.

Richardson, M., & Rautemaa-Richardson, R. (2019). Exposure to *Aspergillus* in Home and Healthcare Facilities' Water Environments: Focus on Biofilms. *Microorganisms*, 7(7), pg 1-11.

Rönner U. Husmark, U. and Henriksson A. (1990). Adhesion of *bacillus* spores in relation to hydrophobicity. *Journal of Applied Bacteriology*. 69, pag 550–556.

Roy PK, Titus S, Surekha P, Tulsi E, Deshmukh C, Rajagopal C. (2008). Degradation of abiotically aged LDPE films containing prooxidant by bacterial consortium. *Polym. Degrad. Stab.* 93, pg 1917- 1922.

Shah A, Hasan F, Hameed A and Akhter J. (2009). Isolation of *Fusarium* sp. AF4 from sewage sludge, with the ability to adhere the surface of polyethylene. *African Journal of Microbiology Research*. 3(10), pg 658-663.

Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 26: pg 246-265. [En línea]. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>
[PMID:18337047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18337047/)

Shimao, Masayuki. (2001). Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*. 12, pg 242-247.

Syranidou E, Karkanorachaki K, Amorotti F, Avgeropoulos A, Kolvenbach B, Zhou N, Fava F, Corvini P, Kalogerakis N. (2019). Biodegradation of mixture of plastic films by tailored marine consortia. *Journal of Hazardous Materials*. 375, pg 33-42. [En línea]. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389419305060>

Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. (1999). Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol*. 37: pg 1846–1851.

Urbanek, A. K., Rymowicz, W., & Mirończuk, A. M. (2018). Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Applied microbiology and biotechnology*. 102 (18), pg 7669–7678. [En línea]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6132502/>

Van Dyk, J. S., and Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between

enzymes — Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30 (6), pg 1458–1480.

Warnock D.W. (2012). Chapter 61 - Fungi: Superficial, subcutaneous and systemic mycoses, in *Medical Microbiology* (Eighteenth Edition). pg 616. [En línea]. Recuperado de:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702040894000755>

Webb, J. S., Van der Mei, H. C., Nixon, M., Eastwood, I. M., Greenhalgh, M., Read, S. J., Robson, G. D., Handley, P. S. (1999). Plasticizers increase adhesion of the deteriorogenic fungus *Aureobasidium pullulans* to polyvinyl chloride. *Applied and environmental microbiology*, 65(8) pg 3575–3581. [En línea]. Recuperado de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91536/>

White T, Bruns T, Lee S & Taylor J (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Academic Press, New York. pg 315-322.

Wuyts, J., Van Dijck, P., & Holtappels, M. (2018). Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? *PLoS pathogens*. 14(10), pg 1-14.

12. ANEXO 1

Anexo 1. ACTIVIDADES LLEVADAS A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOCORROSIÓN.

1.1. Cuantificación de microorganismos a partir de muestras líquidas y/o sólidas, usando Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR).

La qPCR, es una técnica de biología molecular en la que se realiza la amplificación y detección de ácidos nucleicos en un solo paso, mediante la detección de fluorescencia; la cual es proporcional al número de moléculas de ADN amplificadas. De acuerdo a sus características como son: ser un método semicuantitativo, que permite la detección de microorganismos tanto viables como no viables y que reduce los tiempos de entrega de resultados con respecto a los métodos tradicionales (medios de cultivo); se espera que esta técnica se ratifique como uno de los principales servicios de la corporación.

1.1.1. EXTRACCIÓN DE ADN.

La extracción del material genético (ADN) fue llevada a cabo utilizando el kit y protocolo de extracción PowerSoil® DNA Isolation Kit – MO BIO. Adicionalmente el ADN obtenido fue cuantificado en el NanoPhotometer NP80.

1.1.2. Cebadores usados en la qPCR

Los cebadores usados en las amplificaciones de qPCR se encuentran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cebadores usados para la amplificación del gen *dsrA* de bacterias sulfato reductoras y del gen ARNr para Bacterias Totales.

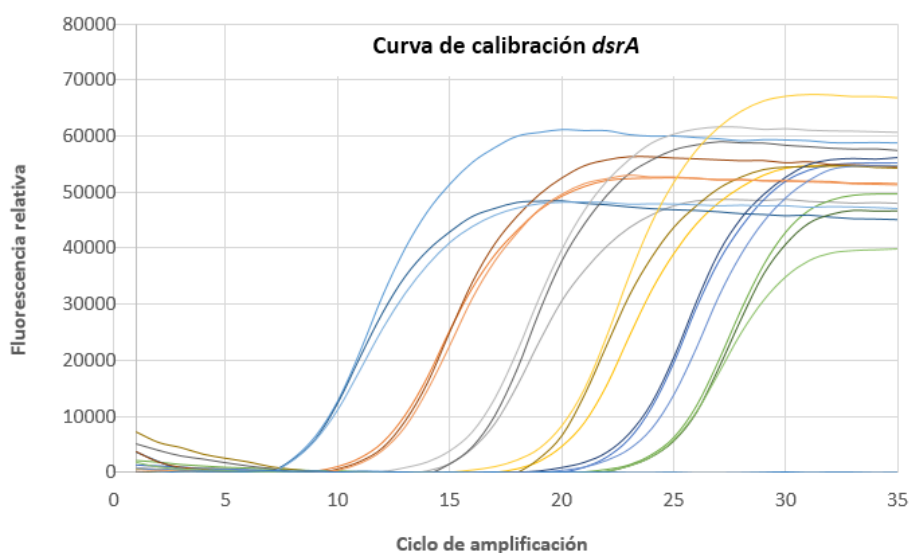
Par de cebadores	Secuencia (5'-3')	Gen reconocido	Tamaño del amplicon (pb)	Referencia
RH1-dsr-F	GCCGTTACTGTGACCAGCC	<i>dsrA</i>	164	Ben-Dov, et al., 2007.
RH3-dsr-R	gGTGGAGCCGTGCATGTT			Ben-Dov, et al., 2007.
F: S-D-Bact-0341-b-S-17	CCTACGGGNGGCWGCAG	<i>rRNA</i>	444	Klindworth, et al., 2013.
R: S-D-Bact-0785-a-A-21	GACTACHVGGGTATCTAATCC			Klindworth, et al., 2013.

11.3. Amplificación de ADN por qPCR

El ADN obtenido fue amplificado por qPCR utilizando el conjunto de cebadores *dsrA* para bacterias sulfato reductoras y del gen ARNr para bacterias totales; dependiendo del caso. La mezcla de reacción contenía 5 µL de ADN, 7,5 µL del Chai Green qPCR Master 2x, 0,3 µL de los cebadores y 1,9 µL de agua para un volumen total de 15 µL para cada reacción. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Open qPCR con las siguientes condiciones: para el gen *dsrA* una etapa de desnaturalización (94 °C/5 minutos), seguido de 35 ciclos que incluían

desnaturalización (94 °C/30 segundos), alineamiento (55 °C/30 segundos) y extensión (72 °C/45 segundos); seguido de una extensión final 72 °C/10 minutos. Para el gen *rRNA* una etapa de desnaturalización (94 °C/5 minutos), seguido de 35 ciclos que incluían desnaturalización (94 °C/30 segundos), alineamiento (57 °C/30 segundos) y extensión (72 °C/45 segundos); seguido de una extensión final 72 °C/10 minutos. En la **Figura 1** se observa la curva estándar de cuantificación de ADN para Bacterias Sulfato Reductoras.

Figura 1. Curva de amplificación de estándares ADN en tiempo real.



1.2. Evaluación de Productos Antimicrobianos

Evaluar la actividad de un Biocida (compuesto antimicrobiano), consiste en comprobar su rango de acción bactericida con respecto a una población de microorganismos después de la exposición, de acuerdo a concentración y tiempos definidos. Estas determinaciones permiten emitir recomendaciones como la concentración a utilizar y modo de uso; de tal manera que se pueda controlar la presencia de agentes biológicos en los sistemas donde se usa el antimicrobiano.

La eficiencia de los productos biocidas se evalúo de acuerdo a la metodología dada por la norma NACE TM0194-2014, como sigue:

Se preparó un Pool de las cepas a evaluar según el caso, Bacterias Sulfato Reductoras (BSR), Bacterias Productoras de Ácido (BPA), Bacterias Anaerobias

totales (BAnt) o Bacterias Heterótrofas Totales (BHT), inoculando 1 ml de cada cepa en un vial con 9 ml de medio de cultivo (Lactato sin hierro para BSR, Dextrosa Rojo de fenol para BPA, Tioglicolato para BAnt y Luria Bertani para BHT); e incubando a 32°C / 48 horas. Hasta obtener un título población de entre 10^6 y 10^8 Bacterias/mL. Seguido a esto se prepararon las concentraciones del Biocida a evaluar (dependiendo de los requerimientos establecidos para cada biocida). Finalmente, en reactores se preparó el montaje de reacción en frascos Schott de 250 ml (**Figura 2**), los cuales contenían la concentración del biocida a evaluar, 1 ml de inóculo (1 ml) y solución Buffer (PBS) hasta completar un volumen final de 100 ml. La efectividad del compuesto antimicrobiano se determinó de acuerdo a la reducción decimal del título original de cada población microbiana.

Figura 2. Ensayo *Time Kill Testing*.



1.3. Determinación de la velocidad de máxima de picadura.

Esta metodología se basa en la exposición de una muestra de metal (Biocupón) a un entorno de interés durante un periodo de tiempo, para determinar la reacción del metal al entorno y poder medir la afectación de acuerdo a las condiciones microbiológicas y químicas. Este sistema permite poder evaluar la corrosividad del sistema; así como también poder monitorear la efectividad de programas de mitigación (como es el caso del uso de Biocida).

La velocidad de picadura se evaluó de acuerdo a la metodología dada por la norma NACE SP0775-2018.

Se expusieron las piezas metálicas de referencia (Biocupones), por un periodo que varió entre 30, 60 o 90 días. Pasado este tiempo, se realizó el proceso de retiro y desmonte de las piezas. Una vez retirados se realizó una limpieza química (mediante la aplicación de Xileno y Ácido clorhídrico) para eliminar compuestos orgánicos y/o óxidos de hierro (Decapado) en la **Figura 3** se observan fotografías de Biocupones antes y después de la limpieza química; adicionalmente se realizó el registro fotográfico de cada Biocupón y así seleccionar para cada punto el

Biocupón que evidenció mayor daño aparente; y posteriormente se procedió a realizar Microscopia Cofocal 3D en los aumentos 140, 280 y 560x, y evidenciar la profundidad máxima de las picaduras. Finalmente, la velocidad máxima de picadura se determinó mediante la profundidad de la picadura, el tiempo de exposición y el perfil de anclaje del Biocupón, expresándola en milésimas de pulgada por año (mpy) (NACE SP0775-2018).

Figura 3. A-B. **A** Fotografía de Biocupón antes (izquierda) y después (derecha) de la limpieza química. **B**, Reconstrucción 3D a 560x mediante Microscopia Confocal de Biocupón expuesto por 90 días en línea de transporte de crudo.

