

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**DEGRADACIÓN DE MICROPLÁSTICOS
PROCEDENTES DE ENVASES
ALIMENTARIOS MEDIANTE EL EMPLEO
DE MICROORGANISMOS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

BESS ALICIA NEWRICK

JUNIO, 2023



Agradecimientos:

En primer lugar, quiero agradecer a Adriana Laca y Amanda Laca, mis tutoras de TFM, por toda la ayuda que recibí y el tiempo y trabajo que me han dedicado, y por haberme guiado hasta donde estoy ahora.

También quiero dar las gracias al departamento de Ingeniería química y Tecnología del Medio Ambiente, y en especial a Marta Sánchez y Alba Sánchez, por toda la ayuda y el apoyo que me han ofrecido desde el primer momento. También dar una especial mención al coordinador y profesor del máster Manuel Rendueles, y al resto del equipo docente por todo el conocimiento que me han transmitido durante el curso.

Por último, y no menos importante, quiero agradecer a mi familia, en especial a mis padres y a mis hermanos, por su apoyo continuo y por ser mi mayor motivación durante el máster, ya que sin ellos no habría logrado llegar hasta aquí.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. CONSIDERACIONES TEORICAS	11
2.1. DEFINICIÓN, ORIGEN Y CLASIFICACIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS	11
2.2. USO DEL PLÁSTICO EN EL SECTOR ALIMENTARIO	13
2.3. LOS MICROPLÁSTICOS Y SUS EFECTOS SOBRE EL MEDIOAMBIENTE	15
2.4. LOS MICROPLÁSTICOS Y SUS EFECTOS SOBRE LA SALUD HUMANA	18
2.5. LA BIODEGRADACIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS	25
3.1. OBTENCIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS MODELO.....	25
3.2. ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN	26
3.3. ANÁLISIS GRAVIMÉTRICO DE LOS MPs	28
3.4. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE LOS MPs	29
3.5. CRECIMIENTO DE <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i>	29
3.6. DETERMINACIÓN DE LOS AZÚCARES TOTALES	30
3.7. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS MICROPLÁSTICOS: ESTEREOMICROSCOPIA, MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) Y FTIR.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS DE HDPE	35
4.2. BIODEGRADACIÓN DE LOS MPs DE HDPE.....	36
4.3. CRECIMIENTO DE <i>COMAMONAS TESTOSTERONI</i>	40

4.4.	CONSUMO DE AZÚCARES	42
4.5.	EVOLUCIÓN DEL PH	44
4.6.	OBSERVACIÓN DE LOS MPs AL SEM	45
4.7.	CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DE LOS MPs	47
5.	CONCLUSIONES	52
6.	ABREVIATURAS	54
7.	BIBLIOGRAFIA.....	55
8.	ANEXO.....	69

RESUMEN

El crecimiento exponencial de la producción y el consumo del plástico, especialmente en sectores como la industria de los envases alimentarios, está generando problemas graves de contaminación que afectan tanto al medio ambiente como a la salud humana. Un tema principal de preocupación es la liberación de pequeñas partículas de plástico (<5 mm), conocidas como microplásticos (MPs). Estos MPs son muy resistentes a la degradación, y se han detectado incluso en los hábitats más remotos, de manera que surge una necesidad urgente de controlar este tipo de contaminación. En los últimos años está despertando especial interés la búsqueda de enfoques biotecnológicos alternativos, tales como la biodegradación catalizada por la acción de microorganismos.

El presente trabajo evalúa la capacidad de la bacteria *Comamonas testosteroni* para llevar a cabo la biodegradación de microplásticos de polietileno de alta densidad (HDPE) a una concentración de 500 mg/L y con un rango de tamaños de 100-250 μm . En cuanto a los resultados del ensayo, se observó una reducción de la masa inicial de polímero del $12,30 \pm 0,82$ % después de 8 días de incubación, indicando que esta bacteria es capaz de emplear los microplásticos de HDPE como fuente de carbono. Otros indicativos de la biodegradación se obtuvieron mediante un análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM), que reveló la formación de una biopelícula en las superficies de los microplásticos, así como cambios estructurales. Los cambios en las propiedades químicas se analizaron a través de SEM-EDS y espectroscopía de infrarrojos de transformada de Fourier (FTIR). Este trabajo muestra que la presencia de *C. testosteroni* acelera el proceso de biodegradación de MPs, y abre las vías para futuras aplicaciones que podría contribuir a reducir la problemática causada por la acumulación masiva de estas micropartículas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Número de publicaciones por año relacionadas con la biodegradación de microplásticos.....	9
Figura 2: Resumen de las principales fuentes de residuos plásticos, origen de los MPs y vías de migración a medios acuáticos	12
Figura 3: Ejemplo de diversas morfologías de MPs encontrados en muestras de aguas residuales urbanas.....	12
Figura 4: Gráfico sobre la distribución del uso de plásticos a nivel mundial y los plásticos de uso extendido dentro de la industria alimentaria.....	15
Figura 5: Interacciones de los microplásticos en los sistemas acuáticos.....	16
Figura 6: Diferentes rutas de emisión y exposición de los seres vivos a los MPs	18
Figura 7: Orígenes y efectos de los MPs en la salud humana.	19
Figura 8: Material empleado para la obtención de los microplásticos empleados como modelo.....	26
Figura 9: Metodología experimental de los ensayos de degradación de microplásticos por <i>Comamonas testosteroni</i>	27
Figura 10: Curva de calibración para azúcares totales.....	31
Figura 11: Estereomicroscopio y microscopio electrónico de barrido.....	32
Figura 12: Espectrofotómetro	34
Figura 13: Imágenes de la morfología, tamaño y color de los microplásticos.....	36
Figura 14: Seguimiento de la masa residual de los microplásticos.....	37
Figura 15: Cinética de degradación de los MPs.....	39
Figura 16: Crecimiento de <i>C. testosteroni</i> durante el ensayo de degradación	40
Figura 17: Curva de crecimiento de <i>C. testosteroni</i> en caldo nutritivo.....	41
Figura 18: Representación del crecimiento de <i>C. testosteroni</i> frente al tiempo para la obtención de la tasa de crecimiento específica máxima	42
Figura 19: Variación de los azúcares totales frente al tiempo determinados por el método fenol-sulfhídrico.....	43
Figura 20: Variación del pH frente al tiempo de incubación.....	44
Figura 21: Micrografías SEM de los microplásticos de polietileno siguiendo los ocho días de incubación.....	46

ABSTRACT

The exponential growth in the production and consumption of plastics, especially in sectors such as the food packaging industry, is leading to inevitable problems for both the environment and human health. One of the biggest issues caused by this type of pollution is the release of small plastic particles (<5 mm) into our ecosystem, known as microplastics (MPs). MPs are highly resistant to degradation and have been detected in even the most remote habitats. Therefore, there exists an urgent need to control this microplastic pollution, through various methods, such as non-conventional biotechnological approaches including biodegradation catalysed by microorganisms.

The following work evaluates the efficiency of the bacteria *Comamonas testosteroni* to carry out the biodegradation of high-density polyethylene (HDPE) microplastics at a concentration of 500 mg/L and a size range of 100-250 µm. Regarding the results of the experiment, a reduction of the initial polymer mass of 12.30 ± 0.82 % was observed after the 8 days of incubation, indicating that this bacteria is capable of using HDPE microplastics as a carbon source. Further evidence for the biodegradation was obtained using a scanning electron microscopy (SEM) analysis which revealed the formation of a biofilm on the microplastics surfaces, as well as structural changes. Changes in the chemical properties were also analysed through SEM-EDS and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). This work shows that the use of HDPE microplastics as a carbon source for *C. testosteroni* may be a promising method for accelerating the degradation process and have further applications to avoid the multiple threats caused by microplastics accumulation.

Figura 22: Micrografías SEM de <i>C. testosteroni</i> unido a las superficies de microplásticos de polietileno.....	47
Figura 23: Fotografía SEM y análisis EDS de los microplásticos iniciales y finales.....	49
Figura 24: Espectros FTIR de los MPs de HDPE con los picos característicos del polietileno.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Bacterias aisladas y consorcios bacterianos asociados a la degradación de microplásticos.....	23
Tabla 2: Constantes para la biodegradación de MPs de HDPE para cinéticas de primer y segundo orden	40
Tabla 3: Análisis elemental normalizado de los elementos carbono (C) y oxígeno (O) realizada por el SEM.	48
Tabla 4: Índice de carbonilo e información estadística de los espectros FTIR.....	51

1. INTRODUCCIÓN

La producción y el consumo de plásticos ha aumentado de manera exponencial en las últimas décadas, alcanzando en 2022 una producción anual de más de 390 millones de toneladas a nivel mundial [1]. El plástico se ha convertido en un producto esencial en el mundo moderno, gracias a su facilidad de producción y sus bajos costes, además de sus atractivas propiedades físicas y químicas (robustez, resistencia frente a la humedad, luz y altas temperaturas) y su ligereza y durabilidad, lo que hace que este tipo de material resulte, en muchos casos, difícil de sustituir por otras alternativas disponibles en la actualidad. Aunque existen innumerables formulaciones diferentes de plástico, actualmente solo seis compuestos contribuyen a más del 90% de la producción global: el polipropileno (PP), el polietileno de alta densidad (HDPE), el polietileno de baja densidad (LDPE), el tereftalato de polietileno (PET), el cloruro de polivinilo (PVC) y el poliestireno (PS) [2]. Estos compuestos son polímeros sintéticos manufacturados a partir de derivados del petróleo, una fuente no renovable, cuyo uso está asociado a problemas de sostenibilidad a largo plazo debido a su inevitable agotamiento futuro [3].

A pesar de los numerosos beneficios del uso de los plásticos, los residuos que generan resultan muy problemáticos desde un punto de vista medioambiental, ya que son químicamente estables, resistentes a procesos naturales de corrosión y difícilmente degradables por procesos biológicos. Por tanto, la producción masiva de este tipo de materiales, combinada con la baja biodegradabilidad y la inadecuada gestión de los residuos plásticos conlleva graves problemas de contaminación a nivel global. Asimismo, está comprobado que esta polución por plásticos afecta tanto a componentes bióticos como abióticos, incluso en los hábitats más alejados de la actividad humana [4]. Actualmente, menos de un 5% de los residuos plásticos son reciclados a nivel global, de manera que, debido a la mala gestión y la eliminación incorrecta, estos desechos se acumulan gradualmente en los suelos, ríos, océanos y vertederos causando daños a los diferentes ecosistemas y suponiendo una grave amenaza para los seres vivos [5].

Se estima que aproximadamente un 44% de la producción de plásticos a nivel mundial es empleado para el embalaje y, dentro de esta categoría, un 41% del total se utiliza para la producción de envases primarios de alimentos [6]. Además, el sector alimentario emplea de forma extendida envases de un solo uso, siendo responsable de la generación de aproximadamente el 60% de los residuos plásticos, lo que hace que este sector sea el principal causante de la contaminación plástica global [7].

Las preocupaciones actuales sobre los materiales plásticos están centradas no sólo en la forma “visible” de este tipo de contaminación, sino también en la “invisible”, causada por lo que se conocen como los microplásticos (MPs) [8]. En comparación con los plásticos de gran tamaño, estas micropartículas suponen un mayor peligro tanto para la salud humana como para el medio ambiente, ya que resultan mucho más difíciles de identificar, cuantificar, caracterizar y eliminar [9]. Los MPs han sido detectados en diversos ecosistemas a nivel global, especialmente en los medios acuáticos, incluyendo los hábitats más remotos, tales como el hielo ártico o los arrecifes de coral. Además, en las últimas décadas se está observando un incremento significativo de la presencia de estos microcontaminantes en las masas de agua naturales, concentrándose mayoritariamente en las zonas costeras y llegando a alcanzar en algunos casos niveles de hasta miles de partículas por metro cúbico. Al estar presentes en todos los ámbitos naturales, los microplásticos se incorporan fácilmente a la cadena trófica llegando de forma inevitable a los seres humano con los riesgos que esto implica [10].

Con el fin de solucionar la problemática ambiental causada por los microplásticos, se están desarrollando nuevas alternativas al uso de plásticos convencionales, una de dichas alternativas es la producción de plásticos biodegradables. Sin embargo, investigaciones recientes revelan que este tipo de plásticos también están asociadas a la generación de microplásticos. Los estudios muestran que al comparar un plástico biodegradable con un plástico convencional, la cantidad de microplásticos generado en el primer caso es significativamente superior, lo que indica que, a pesar de las ventajas de los plásticos biodegradables, pueden llegar a ser incluso más problemáticos que los plásticos convencionales en relación a este tipo de contaminación microscópica [11].

El aumento de la preocupación a nivel global sobre la problemática de los MPs ha generado la publicación de numerosos estudios a escala mundial, con el objetivo de luchar contra la contaminación por microplásticos con enfoques tecnológicos tanto biológicos como no biológicos. En este contexto, debe señalarse que la eliminación de MPs supone un desafío global en el contexto de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 [12]. Muchos de dichos estudios han analizado los procesos de eliminación de MPs en plantas de tratamiento de aguas residuales, fundamentalmente mediante procesos físicos de sedimentación o filtración. No obstante, es importante destacar que estas técnicas logran únicamente separar, pero no eliminar las micropartículas, quedando estas retenidas principalmente en los lodos de depuradora. Por otra parte, el uso extendido de estos lodos como enmienda orgánica en suelos genera una mayor dispersión de los MPs, que pasan a los suelos, ocasionando la liberación inevitable de estos microcontaminantes al medioambiente [13, 14].

Respecto a los tratamientos con enfoques biológicos, es decir, aquellos basados en la acción de microorganismos como bacterias, hongos y algas, se consideran opciones atractivas desde un punto de vista tanto medioambiental como económico. Los procesos de biodegradación plantean diversas ventajas, entre las que cabe señalar que no generan contaminantes secundarios. Realizando una búsqueda avanzada en la base de datos Scopus (Elsevier), empleando la combinación de palabras claves: “microplastics” y “biodegradation”, se observa que el número de publicaciones se ha incrementado exponencialmente en años recientes (Figura 1). De este modo, queda patente que el interés por la eliminación de MPs mediante procesos de biodegradación ha aumentado de manera notable en los últimos cuatro años.

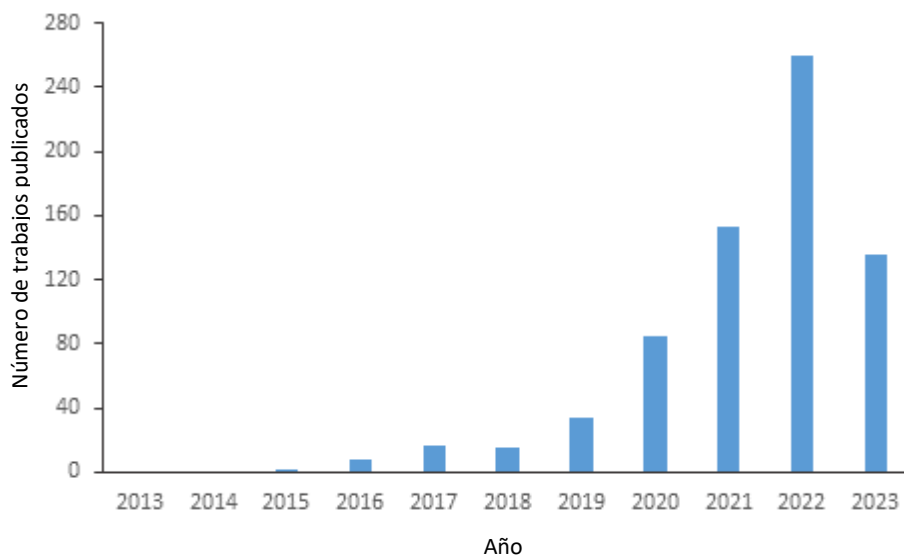


Figura 1: Número de publicaciones por año relacionadas con la biodegradación de microplásticos desde enero de 2013 hasta mayo de 2023 (Fuente: www.scopus.com)

No obstante, a pesar del creciente interés en los procesos de degradación de los MPs mediados por microorganismos, las estrategias de biorremediación y los prometedores resultados que han sido obtenidos, existe actualmente una falta de conocimiento debido a la multitud de factores que influyen sobre estos procesos [15]. Así, para una biodegradación eficiente de los MPs, es necesario el empleo de microorganismos específicos con las rutas metabólicas y los enzimas adecuados para poder llevar a cabo dicha degradación, además de determinadas condiciones ambientales (pH, humedad, temperatura...).

También pueden tener gran influencia las características del polímero a degradar, por ejemplo, la superficie externa y la morfología de los MPs, el grosor de las partículas, el tipo de plástico y la propia estructura del polímero por la existencia de regiones amorfas o cristalinas [16]. Por ello, varios aspectos de los procesos implicados en la biodegradación de microplásticos deben ser investigados a fin de incrementar el conocimiento en este campo, lo que permitirá así contribuir a reducir la contaminación por MPs en un futuro [15].

En este TFM se investiga la degradación de microplásticos procedentes de envases alimentarios mediante el empleo de la bacteria *Comamonas testosteroni*, con el fin de mejorar el conocimiento de las posibilidades de los procesos biológicos en la eliminación de estos microcontaminantes. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Selección del tipo de MP modelo, obtención y evaluación morfológica.
- Analizar la degradación de los MPs con el tiempo mediante el empleo de *C. testosteroni* en condiciones controladas.
- Evaluar los cambios estructurales experimentados por los microplásticos durante el tratamiento biológico.
- Estudiar el efecto de la presencia de MPs sobre la cinética de crecimiento de *C. testosteroni*.

2. CONSIDERACIONES TEORICAS

2.1. Definición, origen y clasificación de los microplásticos

Los microplásticos (MPs) constituyen un grupo muy heterogéneo de partículas poliméricas, pudiendo diferir en forma, tamaño, origen, tipo de material y composición química. Habitualmente son definidas por su tamaño, usando el término microplástico para toda partícula polimérica cuyo tamaño sea inferior a 5 mm [17]. Sin embargo, fuentes más recientes definen estos microcontaminantes como aquellas partículas que están en el rango de 1-5000 μm . Una excepción a las definiciones previas son las microfibras, que pueden ser considerados MPs aunque su longitud supere el límite superior de 5 mm, siempre que su diámetro sea inferior a este valor [18].

En los últimos años, se ha observado un considerable aumento en la cantidad de estudios científicos que indican los posibles efectos negativos de los MPs en la salud de los seres vivos y el medio ambiente. Debido a su existencia previamente desconocida y a la preocupación actual generalizada sobre las posibles consecuencias originadas por su presencia en el medioambiente, los microplásticos se incluyen en la categoría de “contaminantes emergentes” [19, 20].

Según su origen, los MPs se dividen en dos categorías: primarios y secundarios. Los microplásticos que pertenecen a la primera categoría son aquellos que se generan de manera directa, es decir, que se diseñan de manera intencionada para tener pequeño tamaño y se añaden a diversos productos, como cosméticos, productos de limpieza e higiene, pinturas, detergentes, etc. También pertenecen a este grupo los subproductos generados durante el lavado de materiales textiles o la producción de materiales plásticos a nivel industrial [21, 22]. Por otra parte, los microplásticos secundarios hacen referencia a aquellos contaminantes que se originan por la degradación de plásticos de mayor tamaño mediante procesos fotolíticos, biológicos y/o mecánicos. En concreto, los MPs que provienen de esta última vía son los más abundantes en medios marinos y terrestres [23]. Dentro de esta segunda categoría se pueden incluir aquellos MPs originados por la degradación de envases alimentarios, es decir, microcontaminantes que son generados a partir de plásticos más grandes que experimentan una abrasión

física que conduce a un debilitamiento de los enlaces y la subsiguiente fragmentación del material [24, 25]. En la Figura 2 se muestra un resumen de las principales fuentes de residuos plásticos, así como del origen de los MPs y sus vías de migración a medios acuáticos.

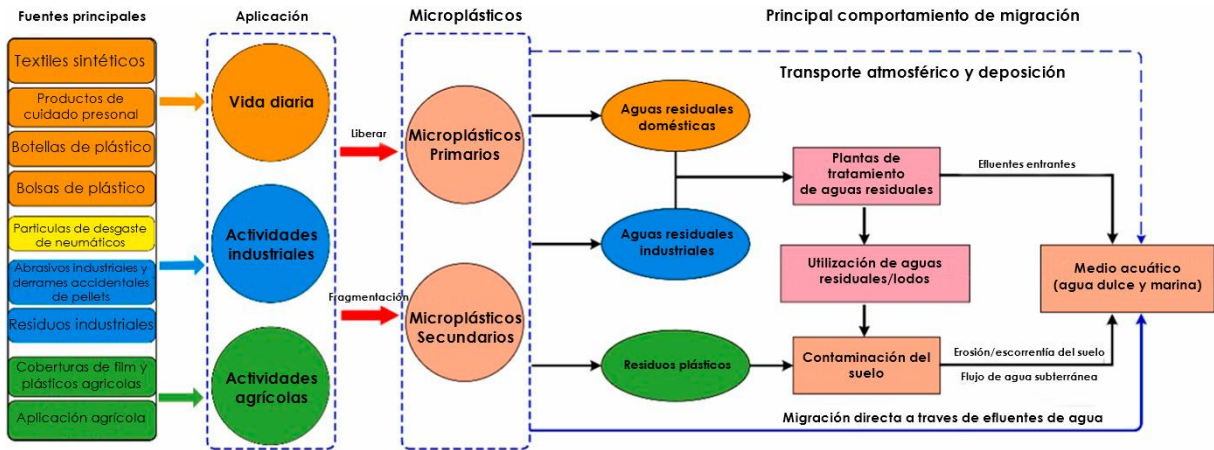


Figura 2: Resumen de las principales fuentes de residuos plásticos, origen de los MPs y vías de migración a medios acuáticos [26].

Los MPs presentan composiciones muy variadas, pudiendo estar constituidas por polímeros convencionales como polietileno, poliamidas, acrílicos, poliésteres, polipropileno u otros polímeros industriales más especializados. No obstante, la mayor parte de estas partículas presentes en el medio ambiente están formadas de polietileno (PE), polipropileno (PP), policloruro de vinilo (PVC) y tereftalato de polietileno (PET), entre los cuales el PE es el material que contribuye a la mayor fracción de MPs encontrados en una multitud de hábitats diferentes [27, 28].

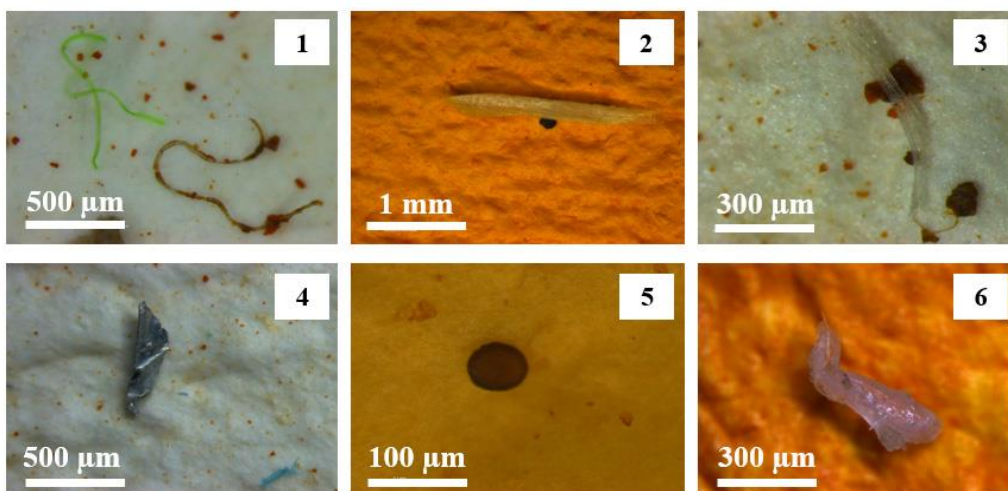


Figura 3: Ejemplo de diversas morfologías de MPs encontrados en muestras de aguas residuales urbanas. 1) Fibras. 2) y 3) Fragmentos. 4) Film. 5) Pellet y 6) Espuma [29].

En cuanto a los daños ocasionados por estas partículas, son de gran influencia tanto su tamaño como su forma. Los MPs presentan morfologías muy variadas que han sido encontradas en todo tipo de medios acuáticos, terrestres y aéreos, tales como fibras, esferas, fragmentos, láminas y películas [30]. En la Figura 3 se muestra un ejemplo de algunas de las morfologías encontradas en aguas residuales urbanas. Su dispersión a través de diferentes ambientes está críticamente relacionada con la interacción fluido-partícula, y los estudios existentes demuestran que la morfología tiene un papel esencial en el comportamiento de los MPs, generando diferencias en las velocidades de asentamiento obtenidas por modelos basados en geometrías esféricas, que son los aplicados habitualmente [31]. Asimismo, la morfología de los MPs también está relacionada con la colonización de las micropartículas por microorganismos, lo que a su vez conduce a cambios en la densidad y el comportamiento de los materiales. Por ejemplo, la formación de biopelículas por agentes biológicos hace que los microplásticos se hundan más fácilmente en medios acuosos, ya que favorecen la heteroagregación con sólidos suspendidos en el agua [32, 33]. Esto explica en parte la gran dificultad que supone el estudio de estas partículas y la generación de modelos de comportamiento en diferentes ecosistemas.

2.2. Uso del plástico en el sector alimentario

El plástico tiene un papel esencial en el envasado de alimentos, ya que favorece la preservación de la calidad y la seguridad del producto. Además, contribuye al aumento de su vida útil (y, por tanto, a la reducción del desperdicio), la protección de los productos durante el transporte, el almacenamiento y la manipulación de los alimentos, y facilita la trazabilidad y el etiquetado nutricional. No obstante, el uso extensivo de materiales de embalaje en la industria alimentaria ha derivado en un problema a nivel global, incrementando la cantidad de residuos llevados a vertederos y provocando el agotamiento de recursos naturales. Además, los residuos plásticos procedentes del embalaje de alimentos, si no son gestionados adecuadamente, perduran en el medioambiente mucho más tiempo que los productos que contienen. Por otra parte, el

uso de plásticos para el envasado de alimentos puede estar relacionado con problemas de salud en los consumidores, ya que se asocia a la liberación de escamas de plástico en los alimentos por el contacto directo de estos con el material de empaquetado. Esto conduce a la ingesta de forma directa de MPs contenidos en los alimentos, además de otras sustancias químicas con efectos desconocidos sobre la salud [34].

Como se muestra en la figura 4, el sector del embalaje es el responsable del uso de casi la mitad del plástico producido a nivel mundial, debido al elevado número de aplicaciones y su vida útil relativamente corta. Además, esta producción global de plástico está en crecimiento exponencial y se estima que puede llegar a triplicarse para el año 2060 [35]. Dentro del sector de embalaje, la producción de envases desechables de un solo uso genera aproximadamente un 50% de los residuos plástico producidos anualmente [36].

Una manera de afrontar esta situación es la gestión de residuos plásticos, que se puede llevar a cabo de diferentes maneras, como el reciclaje, la incineración o el depósito en vertederos. El reciclaje y la reutilización de plásticos son esenciales para prevenir la dispersión de estos residuos en el medio ambiente, pero también es importante lograr una economía circular de estos materiales. Una de las mejores soluciones para combatir el problema de la contaminación por plásticos es limitando su consumo. En 2015, la Unión Europea (UE) restringía y regulaba el uso de bolsas de plástico con el objetivo de reducir el consumo de estas a un máximo de 40 bolsas por persona y año en 2025. Asimismo, en 2021 entró en vigor una medida adoptada por la Comisión Europea que prohíbe los plásticos de un solo uso (pajitas, bastoncillos de algodón, menaje de cocina desechable, etc.) [37].

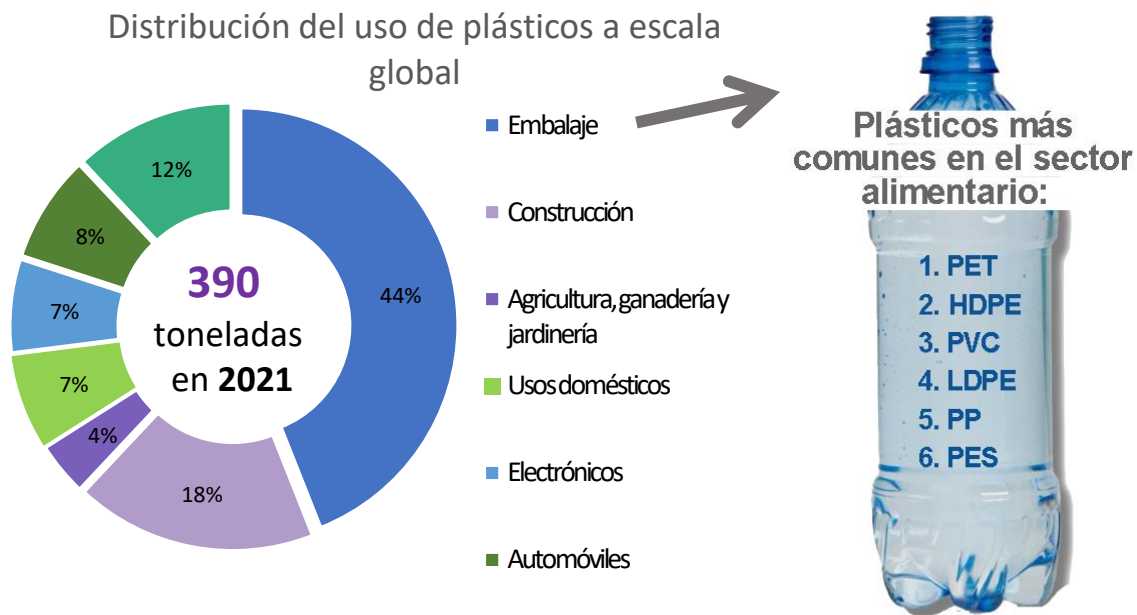


Figura 4: Gráfico sobre la distribución del uso de plásticos a nivel mundial y los plásticos de uso extendido dentro de la industria alimentaria (datos mostrados para el año 2021) [20].

Aunque la tendencia a reciclar está en aumento, debe señalarse que las tasas son muy inferiores en plásticos que en otros materiales de envasado como vidrio, papel o metales. Esto se debe a que, a pesar de los grandes avances tecnológicos, factores como el uso de una multitud de polímeros sintéticos diferentes y sus aplicaciones en diferentes sectores dificultan enormemente el reciclado de estos productos. Por ello, actualmente, el reciclaje de muchos polímeros resulta económicamente inviable frente a la producción de plástico nuevo, debido a los costes de recogida, separación, tratamiento y reprocesamiento de los residuos generados [38]. En 2019, se estimó que solo el 9% de los envases de un solo uso llegaban a reciclarse, lo que resalta la gran importancia de la gestión adecuada de estos materiales para evitar la generación de MPs [39].

2.3. Los microplásticos y sus efectos sobre el medioambiente

La creciente presencia de estas partículas plásticas en diferentes ecosistemas a nivel mundial es actualmente un tema de gran preocupación medioambiental. Debido a las diferencias de sus patrones de comportamiento frente a plásticos de mayor tamaño, sus implicaciones biológicas y ecológicas siguen siendo desconocidas. La contaminación

de los MPs está presente en todos los sistemas ambientales acuáticos, atmosféricos y terrestres, que están relacionados entre sí a través de redes de conexión que influyen en las tasas de retención y en el flujo de las partículas [34, 42, 43].

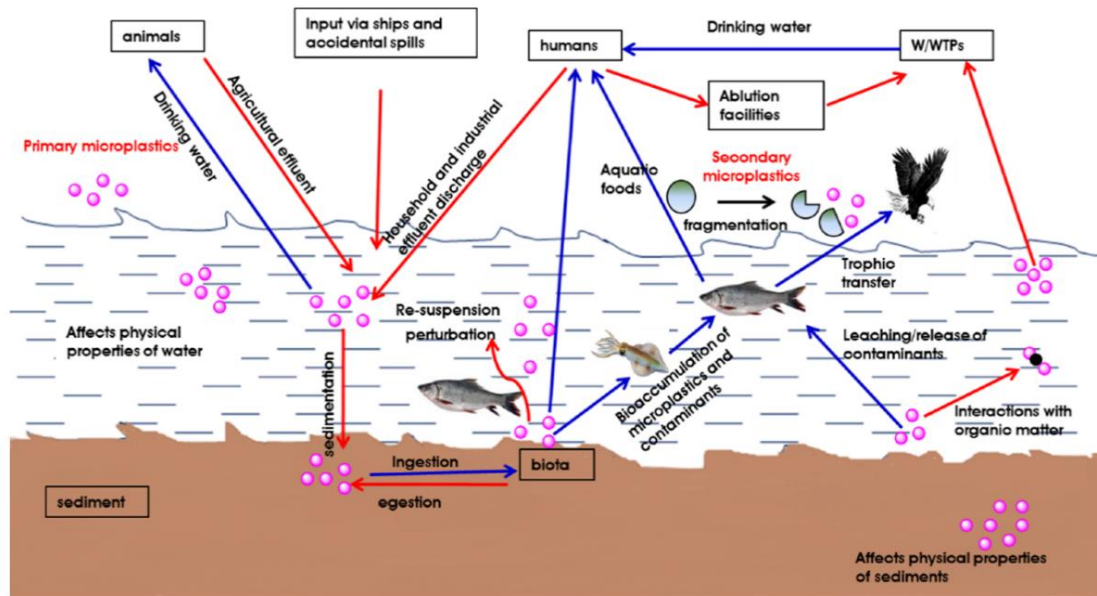


Figura 5: Interacciones de los microplásticos en los sistemas acuáticos [43].

En la actualidad la gran mayoría de los estudios sobre la contaminación por MPs se centran en los ambientes acuáticos, sobre todo marinos, así como en las interacciones de los MPs con los diversos ecosistemas de estos entornos. En la figura 5 se muestra una visión global de dichas interacciones. Por su amplia extensión en las masas de agua naturales, los microplásticos pueden llegar a tener un gran impacto sobre la flora y la fauna de estos medios. Además, los MPs son capaces de actuar como vectores para la distribución a largas distancias de metales pesados y contaminantes orgánicos de diversa naturaleza que son adsorbidos sobre la superficie de las micropartículas, sirviendo de este modo como sumideros para varios compuestos dañinos e incrementando su biodisponibilidad, transporte y toxicidad [25-27]. Por otra parte, los mecanismos de degradación de los plásticos en el medioambiente conllevan la potencial liberación de aditivos tóxicos empleados en el proceso de manufacturación [5]. Los MPs también proporcionan un soporte adecuado para el desarrollo de biopelículas microbianas que contengan bacterias, algas u hongos, que podría ser la causa de la dispersión a gran escala de patógenos y genes de resistencia a compuestos antimicrobianos [44].

Debido a su pequeño tamaño, el zooplancton confunde los microplásticos con su fuente de alimento natural, ingiriéndolos y provocando así su entrada en la cadena trófica. Numerosos estudios en diferentes animales acuáticos (moluscos, peces, etc.) concluyen que estos microcontaminantes pueden obstruir el tracto digestivo, afectar a los patrones de reproducción, producir daño en distintos órganos, debilitar e incluso llegar a causar la muerte de los organismos estudiados [41, 45]. Por tanto, la persistencia, ubicuidad y el incremento exponencial de la contaminación por microplásticos puede tener a largo plazo un impacto enorme sobre la biodiversidad marina y el equilibrio de los ecosistemas acuáticos, debido fundamentalmente a su efecto dañino sobre los productores primarios de la cadena alimenticia, lo que a su vez puede afectar negativamente a la industria alimentaria, especialmente a la pesca y la acuicultura [46, 47].

En cuanto a la presencia de los MPs en los hábitats terrestres, se considera que estos pueden conducir a la alteración de la geoquímica del suelo debido a su interacción con la biota [48]. En concreto, se ha observado que son capaces de interactuar con componentes orgánicos del suelo, generando desequilibrios en los parámetros fisicoquímicos del suelo, y reduciendo el crecimiento y la productividad de las plantas [49]. La fauna del suelo también puede verse impactada de forma perjudicial por estas partículas, por ejemplo, se ha descrito en la bibliografía que los MPs afectan negativamente al ciclo reproductivo, crecimiento y esperanza de vida de nemátodos y anélidos. Se supone que estos efectos son ocasionados por el daño al ADN, los mecanismos de toxicidad y bioacumulación, la genotoxicidad, las alteraciones metabólicas y la neurotoxicidad, entre otros factores [50, 51].

Por último, investigaciones recientes han detectado la presencia de MPs en la atmósfera, en áreas tanto urbanas como rurales, y se ha visto que estas micropartículas pueden ser transportadas en el aire, dispersándose a distancias muy largas desde su origen y pudiendo llegar así a los lugares más remotos del planeta [52]. No obstante, la contaminación atmosférica con MPs es el aspecto menos investigado, a pesar de que los microplásticos presentes en el aire pueden ser inhalados de forma directa, lo que supone un riesgo grave para la salud. Entre los diferentes factores que influyen sobre su

transporte atmosférico y su distribución en ambientes terrestres y acuáticos, se puede destacar la dirección del viento, las dimensiones y la morfología de las partículas, las precipitaciones, la actividad antropogénica y la densidad de la población humana [53].

2.4. Los microplásticos y sus efectos sobre la salud humana

A pesar de que aún se desconocen cuáles son los riesgos a largo plazo de la exposición a los MPs en los humanos, existe un consenso sobre sus potenciales efectos nocivos sobre los seres vivos, debido fundamentalmente a varios factores como su persistencia en el entorno o sus propiedades bioacumulativas [54]. Además, no solo son peligrosas por la propia naturaleza de las partículas, sino que en muchos casos durante el proceso de manufacturación se pueden incorporar sustancias con propiedades tóxicas, como los pigmentos añadidos, ignífugos bromados, ftalatos o bisfenol A. Asimismo, diversos compuestos tales como patógenos, metales pesados o hidrocarburos aromáticos policíclicos, pueden quedar retenidos sobre la superficie de los MPs, que actúan como intermediarios en el proceso de bioacumulación [55, 56].

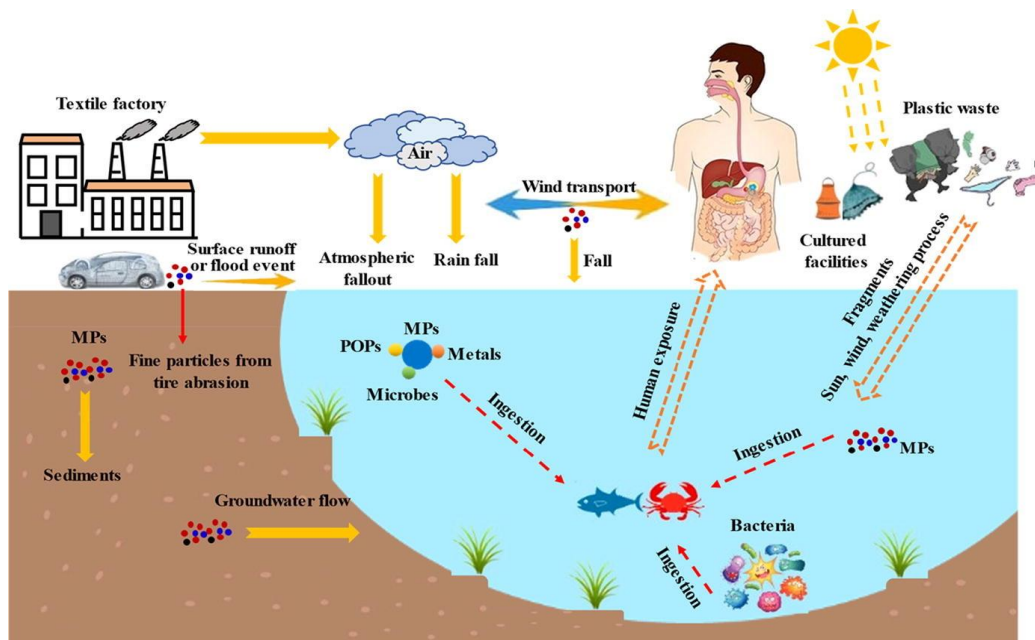


Figura 6: Diferentes rutas de emisión y exposición de los seres vivos a los MPs [57].

En cuanto a los potenciales efectos de los MPs sobre la salud humana, existe aún una brecha de conocimiento, ya que los estudios realizados sobre la toxicidad de estas micropartículas en humanos están todavía en desarrollo [40]. Los MPs tiene tres vías

principales de entrada, mediante inhalación, por la ingesta de alimentos o por contacto dérmico con estas partículas, aunque la ingesta es la vía más importante de entrada de los MPs en los seres humanos (Figura 6). Se estima que un ser humano llega a introducir en su sistema entre 39.000 y 52.000 microplásticos cada año [58].

Los MPs ingeridos pueden causar bloqueos del aparato digestivo, originando respuestas inflamatorias y produciendo alteraciones en la microbiota. En cuanto a su entrada por vía aérea, la deposición de las partículas en los pulmones depende de su tamaño y su densidad. Los MPs menos densos y de menor tamaño se depositan en las zonas más profundas de los pulmones, generando inflamación y la liberación de factores quimiotácticos. En estudios recientes se ha detectado la presencia de estos contaminantes tanto en tejidos pulmonares como en la corriente sanguínea en humanos [59, 60]. Otros trabajos revelan la posibilidad de que los microplásticos puedan incluso atravesar la barrera dérmica, donde una vez entran en contacto con las membranas mucosas o al ser absorbidos, llegan a generar estrés oxidativo y citotoxicidad, ocasionando respuestas inflamatorias, reacciones inmunitarias, y alteraciones endocrinas y metabólicas [45]. Se ha planteado que generan daños en el ADN, pudiendo incluso contribuir a la aparición de diferentes cánceres (figura 7) [61–63].



Figura 7: Orígenes y efectos de los MPs en la salud humana [64].

2.5. La biodegradación de los microplásticos

Inicialmente, la contaminación por MPs se consideró una amenaza irreversible, que podría conducir a un desequilibrio grave de los sistemas biológicos, debido a la baja degradabilidad y la imposibilidad de recuperar los fragmentos plásticos una vez introducidos a los ecosistemas. Sin embargo, investigaciones recientes están poniendo de manifiesto nuevas formas de remediar esta problemática, con el estudio de técnicas como la biodegradación, es decir, la eliminación de las micropartículas mediante procesos de degradación biológica llevados a cabo por diferentes organismos [65].

Diferentes trabajos han demostrado la capacidad de algunos organismos superiores para biodegradar plásticos, en concreto, las larvas de diversos insectos, incluyendo ciertas polillas (*Galleria mellonella* L., *Achroia grisella* F.) y varias especies de escarabajos pertenecientes a la familia Tenebrionidae (*Tenebrio molitor* L., *Tribolium castaneum* H., *Zophobas atratus* F.) [66]. Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo con las larvas de *Achroia grisella* F., se alcanzaron porcentajes de degradación de polietileno de alta densidad del 70% en un periodo de 8 días [67].

En los procesos de degradación biológica por microorganismos, estos transforman los polímeros orgánicos en dióxido de carbono, metano, agua, biomasa y sustancias inorgánicas como productos finales [68]. La gran superficie de los MPs favorece la sedimentación y el crecimiento microbiano, de forma que actúan como nichos ecológicos específicos para ciertos microorganismos capaces de emplearlos como fuente de carbono [69]. Esto es posible gracias a la capacidad de diversas especies microbianas de adherirse a la superficie de las partículas mediante el desarrollo de biopelículas, lo que permite la colonización de la superficie de los microplásticos. Esta formación de biopelículas es indispensable no solo para la degradación microbiológica de los MPs, sino también para promover la supervivencia de las colonias adheridas. Tras la formación de las biopelículas, se produce la liberación de enzimas extracelulares, que logran estimular procesos de oxidación e hidrólisis de los polímeros plásticos. No obstante, estas enzimas solo son capaces de actuar sobre la parte accesible de los MPs, por lo que la reacción de degradación es un proceso de erosión superficial, que puede

tardar en iniciarse varios días o incluso semanas. Los enzimas que han sido identificados por su implicación en el proceso degradativo pertenecen en su mayoría a las categorías de oxidorreductasas, lipasas, esterasas y cutinasas, aunque, por lo general, una degradación completa no se consigue con la acción de un único tipo de enzima, sino mediante una combinación de varios [69].

La transformación biológica de los MPs se ve notablemente afectada por las condiciones ambientales, como la temperatura, la humedad, la luz, el pH, etc., que a su vez influyen sobre las especies presentes en cada ecosistema. Además, existe en la actualidad una enorme variedad de tipos de materiales plásticos, por lo que se debe tener en cuenta la biodegradabilidad específica de cada polímero. Los microorganismos involucrados en este tipo de procesos han sido aislados e identificados a partir de muestras de orígenes muy variados, como suelos de manglares, vertederos, medios acuáticos y aguas residuales industriales [70, 71].

Los microorganismos empleados en la bibliografía para la eliminación de microplásticos de polietileno incluyen diferentes géneros de bacterias (*Bacillus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Comamonas*...) y hongos (*Fusarium*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Acremonium*, *Aspergillus*...) y se describen porcentajes de eliminación de entre 4 y 100%, según el caso analizado [69]. Por ejemplo, el hongo marino *Zalerium maritimum* puede degradar hasta un 56% de microplásticos de polietileno en un periodo de 28 días [71]. Otro estudio sobre la degradación de MPs de polietileno por un consorcio de hongos, incluyendo las especies *Penicillium simplicissimum*, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata*, y *Fusarium sp.* encontrados en un vertedero de China, mostró una reducción del peso inicial de plástico del 27% después de tres meses [72].

En la tabla 1 se recogen varios estudios llevados a cabo sobre diferentes bacterias asociadas a la biodegradación de microplásticos. La tabla muestra las especies bacterianas empleadas para el ensayo de degradación de MPs y otros materiales poliméricos sintéticos, especificando la duración del ensayo y el porcentaje de degradación logrado. Tal y como puede observarse, no existe un único método para analizar el proceso de biodegradación de los MPs, sino que existen metodologías

diversas para la determinación de la eficacia de eliminación de los materiales plásticos. Para la obtención de evidencias del proceso de degradación, se analizan las propiedades morfológicas, químicas, térmicas y estructurales de los MPs a lo largo del tiempo, y para ello se pueden utilizar técnicas microscópicas, métodos gravimétricos, etc. [73–75]. En concreto, para el seguimiento de los cambios en la composición química, se emplean técnicas como la espectrofotometría de Transformada de Fourier (FTIR) y la cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS) [76, 77].

Debe señalarse que en este TFM se analizará la biodegradación de polietileno de alta densidad. El HDPE es uno de los plásticos más empleados a escala mundial y hasta un 40% de su producción tiene como destino la elaboración de productos plásticos de un solo uso, como, por ejemplo, los envases alimentarios [78]. Debido a su peso molecular elevado, este tipo de material no se encuentra directamente disponible para ser asimilado como fuente de carbono por los microorganismos, sino que primero debe ser degradado hasta compuestos de menor tamaño. Por lo tanto, para utilizar este polímero, las células deben primero adherirse a la superficie del plástico para causar la rotura de las cadenas de polietileno hasta reducir su tamaño, ya sea mediante excreción de enzimas extracelulares o proteínas de membrana catalíticas. Estos compuestos se van a ver posteriormente sometidos a diferentes transformaciones químicas, incluyendo la formación de nuevos grupos moleculares y la escisión de enlaces [79].

Tabla 1: Bacterias aisladas y consorcios bacterianos asociados a la degradación de microplásticos.

Especies aisladas/consorcio	Tipo de microplástico	Duración del experimento	Porcentaje de degradación total	Métodos de detección de biodegradación	Autor y fecha de publicación
No especificado	Poliiolefinas	33 días	100%	FTIR, EDS, espectroscopia Raman	Liu <i>et al</i> , 2023 [77]
<i>Lysinibacillus</i> sp.	PP, PE	26 días	4% (PP) 9% (PE)	CG-MS, SEM	Jeon <i>et al</i> , 2021 [75]
Consorcio microbiano (<i>Bacillus</i> sp. Y <i>Paenibacillus</i> sp.)	HDPE, LDPE	60 días	14.7%	FE-SEM, analizador termogravimétrico, GC-MS, FTIR	Park <i>et al</i> , 2019 [76]
<i>Cupriavidus neactor</i>		21 días	33.7%	Gravimetría, SEM, GC-MS	Montazer <i>et al</i> , 2018 [80]
Consorcio microbiano (<i>Aneurinibacillus</i> sp. y <i>Brevibacillus</i> sps.)	LDPE, HDPE, PES	90 días	47% (LDPE), 58% (HDPE) 56% (PES)	FTIR, SEM, AFM	Skariyachan <i>et al</i> 2018 [81]
<i>Bacillus gottheilii</i>	PE, PET, PP, PES	40 días	6.2% (PE) 3.0% (PET) 3.6% (PP) 5.8% (PES)	FTIR, SEM, gravimetría	Auta <i>et al</i> , 2017 [82]
<i>Chelatococcus</i> sp. E1	LDPE	80 días	44.5%	FTIR	Jeom y Kim, 2013 [83]
<i>Nitrosomonas</i> y <i>Nitrobacter</i> sp, <i>Burkholderia</i> sp.y <i>Pseudomonas</i> sp.	HDPE, PP	90 días	15%-20% (HDPE) 5%-9% (PP)	Gravimetría	Muenme <i>et al</i> , 2016 [73]
<i>Microbacterium paraoxydans</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PE (pretratado)	60 días	61% (<i>M. paraoxydans</i>), 50.5% (<i>P. aeruginosa</i>)	Gravimetría, FTIR	Rajandas <i>et al</i> , 2012 [74]

FTIR= Espectrofotometría de Transformada de Fourier, AFM= Microscopio de fuerza atómica

FE-SEM= Microscopio electrónico de barrido de Emisión de campo, EDS= Espectrómetro de dispersión de energía, GC-MS = Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masa

Este TFM se centra específicamente en los procesos de biodegradación de microplásticos por acción bacteriana, empleando, en concreto, la especie *Comamonas testosteroni*. Esta bacteria es un bacilo gram negativo perteneciente al género *Comamonas* y a la familia *Comamonadaceae* (antiguamente clasificada dentro del género *Pseudomonas*), que recibe su nombre debido a su capacidad de emplear testosterona como fuente de carbono [84]. *C. testosteroni* se caracteriza por su amplia distribución en el medioambiente, y por su elevada capacidad de resistencia en ambientes hostiles durante largos periodos de tiempo [85]. Esta especie ha sido aislada e identificada en suelos, organismos saprófitos acuáticos y organismos vegetales, y rara vez ha sido descrita como patógeno en humanos [86].

Su elevada capacidad para degradar compuestos sintéticos como los plásticos fue inicialmente descrita al aislar una cepa capaz de degradar un detergente de ropa. Un descubrimiento reciente acerca de esta bacteria es su capacidad para emplear una ruta metabólica que le permite obtener los nutrientes necesarios a partir de moléculas plásticas y de otras moléculas complejas, como la lignina. De este modo, esta especie es capaz de degradar las largas cadenas de carbono presentes en las moléculas de plástico y, además, se han identificado varias rutas metabólicas en esta bacteria cuya activación podría tener aplicaciones industriales importantes por los productos finales generados. Estos estudios recientes muestran el enorme potencial de *Comamonas testosteroni* que podría ser una opción futura para un sistema eficiente de reciclaje de plásticos a gran escala, así como para la generación de nuevos compuestos de interés biotecnológico [87, 88].

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención de los microplásticos modelo

El polímero seleccionado para llevar a cabo los ensayos fue el polietileno de alta densidad (HDPE). Este tipo de plástico se seleccionó debido a varios factores, como su uso extendido en la producción de envases alimentarios. Diferentes estudios detectaron la presencia de microplásticos en muestras de heces humanas y el HDPE fue el polímero predominante, cuyo origen puede provenir del contacto directo entre los envases de plástico y los alimentos [89]. Además, este tipo de polímero aparece con gran frecuencia en aguas residuales urbanas, ya que debido a su baja densidad tiende a flotar sobre el agua, dificultando su separación mediante los procesos de sedimentación frecuentemente empleados en el tratamiento de dichas aguas [90].

Los microplásticos se prepararon a partir de tapones de HDPE de un envase alimentario comercial, en concreto de una botella de leche fermentada líquida. Durante todo el TFM, se utilizó siempre este material de partida a fin de mantener la homogeneidad en el tipo de plástico seleccionado, para así evitar posibles variaciones en los resultados causados por otros compuestos empleados como aditivos, por ejemplo, los colorantes, durante el proceso de manufacturación, ya que podrían tener potenciales efectos tóxicos sobre los microorganismos. Estos plásticos se trituraron con un molinillo multifunción de alta velocidad (High speed multifunction GRINDER, HC-150) a una velocidad de 28000 rpm en intervalos de un minuto, dejando cinco minutos de reposo entre los intervalos para evitar así el sobrecalentamiento del plástico. Tras dejar que se asentara el polvo fino formado, se tamizó el producto resultante y se recogió la fracción de microplásticos con un tamaño entre 100-250 μm . Se seleccionó este rango de tamaños ya que la tasa de biodegradación aumenta a medida que disminuye el tamaño de las partículas debido al consecuente aumento del área superficial, facilitando el estudio del proceso de degradación en tiempos más cortos en MPs de menor tamaño como los escogidos aquí [91]. Además, diversos estudios han encontrado que la mayoría de los MPs que se detectan en muestras de diferentes medios naturales se encuentran en este rango de tamaños, lo que hace que partículas de estas dimensiones sean objeto de investigación en diferentes ensayos de degradación [92, 93]. En la figura 8 se puede

observar el material empleado en el proceso de obtención de los MPs utilizados como modelo en este TFM.



Figura 8: Material empleado para la obtención de los microplásticos empleados como modelo. Se muestran los tapones de HDPE procedentes de un envase alimentario (a), el molinillo empleado para su trituración (b) y los tamices de diferentes tamaños de malla para separar la fracción de MPs de 100-250 μm .

Posteriormente se llevó a cabo la esterilización de los microplásticos. Para ello, se dejaron sumergidos en etanol al 70% en una cabina de flujo laminar hasta que se evaporó por completo y, una vez secos, se almacenaron en un recipiente estéril cerrado hasta su utilización [76].

3.2. Ensayos de biodegradación

Los ensayos de degradación fueron llevados a cabo con la bacteria *Comamonas testosteroni* NCIMB 8955, cepa suministrada en forma de liófilo por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Los ensayos se realizaron por duplicado y trabajando siempre en condiciones estériles.

Para preparar el pre-inóculo, se tomaron con un asa de siembra dos o tres colonias de *C. testosteroni* cultivada en una placa Petri de Nutrient Broth (anexo I) y se inocularon en 50 mL de Nutrient Broth, que se incubó durante 24 horas a 200 rpm y 30°C. Una vez observado crecimiento (turbidez) en el pre-inóculo, se prepararon seis matraces Erlenmeyer de una capacidad de 1L con 300 mL del mismo medio, a los que se

adicionaron 600 μL del medio crecido con la bacteria y 150 mg de microplásticos previamente esterilizados (para alcanzar la concentración final deseada de 500 mg/L). Los matraces se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm y a 30°C durante los ocho días que duraron los ensayos.

A fin de seguir el proceso de degradación, se tomaron muestras periódicamente. Durante el seguimiento, los matraces a partir de los cuales se tomaron las muestras se alternaron con el fin de extraer el mismo volumen de cada matraz, para así evitar posibles errores experimentales. La figura 9 muestra un esquema de la metodología experimental seguida en los ensayos de degradación, así como de la toma de muestras.

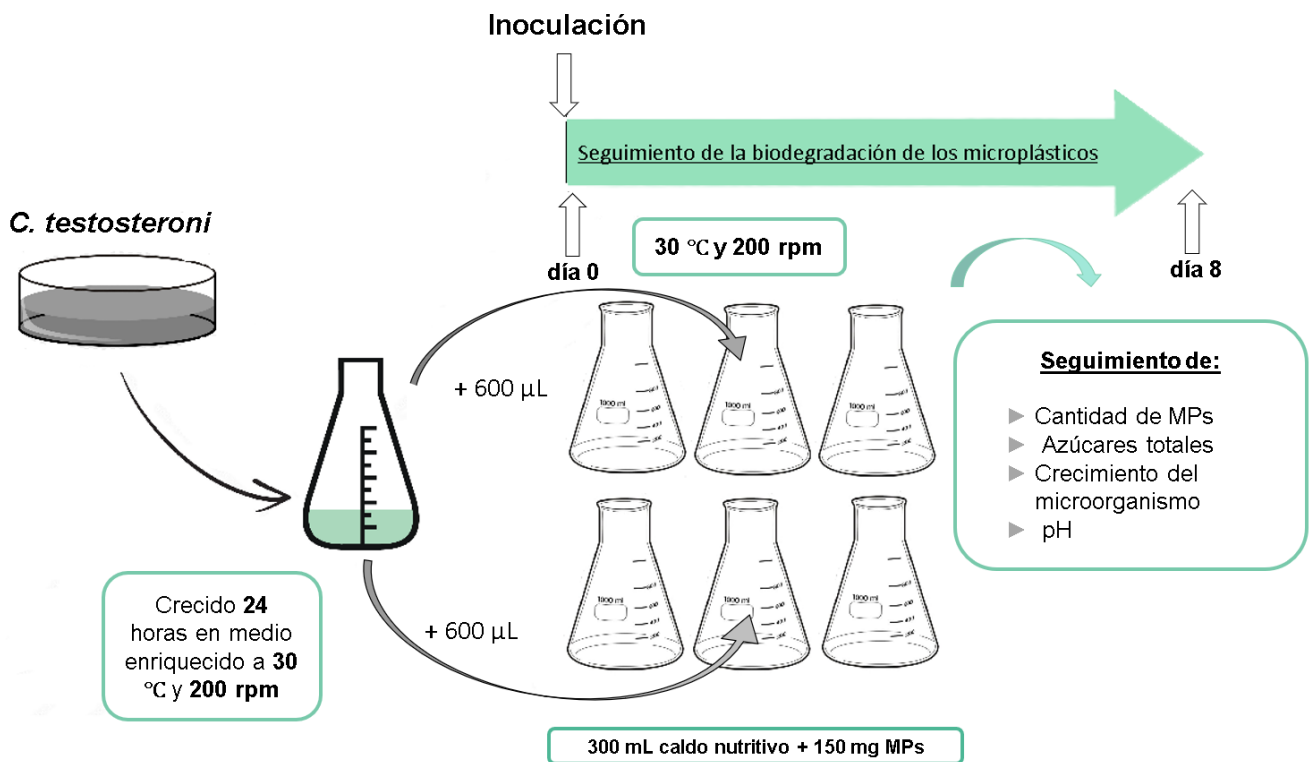


Figura 9: Metodología experimental de los ensayos de degradación de microplásticos por *Comamonas testosteroni* en Nutrient Broth con una concentración inicial de microplásticos de HDPE de 500 mg/L.

3.3. Análisis gravimétrico de los MPs

Para seguir el proceso de degradación, se empleó un método gravimétrico, una técnica ampliamente usada en estudios de degradación de plásticos [73, 74, 82, 94]. Este procedimiento requiere un paso previo de eliminación de la biomasa formada y un lavado intenso de los microplásticos. Para ello, se tomaron muestras por duplicado de 20 mL de los matraces en tubos Falcon estériles en varios momentos a lo largo de la fermentación y se conservaron a -4°C hasta su posterior análisis. A cada tubo se adicionó un volumen de 20 mL de peróxido de hidrógeno a una concentración del 30%. Se transfirieron los tubos cerrados a un baño de agua a 60°C durante 45 minutos, y, una vez transcurrido ese tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Una vez frías, las muestras se filtraron sobre papel de filtro Whatman™ de grado 1, con un diámetro de poro de 11 µm, y se dejaron secar sobre placas de Petri abiertas en una estufa a 60°C durante 24 horas. Una vez secas, las placas con los filtros se transfirieron a un desecador durante un mínimo de 10-15 minutos y se pesaron en una balanza de precisión Sartorius analytic (Sartorius, Alemania). La cantidad de MPs degradados se obtiene por diferencia de pesada tomando como referencia la concentración de MPs en la muestra inicial.

Este método empleado para detectar la degradación de los microplásticos se verificó llevando a cabo el proceso anteriormente descrito con una cantidad conocida de MPs. Para ello, se prepararon por triplicado unos tubos Falcon estériles con el mismo medio de cultivo, pero sin adicionar el inóculo, y se pesaron cantidades conocidas de MPs en cada uno. Después se filtraron, se secaron y se pesaron usando el mismo método y se determinó el porcentaje de recuperación de MPs. El porcentaje de reducción de la masa de los MPs se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$Pérdida de masa (\%) = (masa\ inicial - \frac{masa\ final}{masa\ inicial}) \times 100; \quad (1)$$

Los MPs filtrados procedentes de las muestras tomadas a distintos tiempos, se guardaron en placas Petri selladas para su visualización bajo el estereomicroscopio y el SEM para el análisis de su morfología, así como para analizar su estructura mediante FTIR.

3.4. Cinética de degradación de los MPs

En los ensayos de degradación, la velocidad de reacción se obtuvo a partir de los datos experimentales. En este caso, el único parámetro que se tuvo en cuenta fue la concentración del polietileno, y se determinó la cinética de reacción de primer y segundo orden con respecto a esta concentración. La cinética de primer orden de degradación de los MPs se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$-r_s = K \cdot S \quad (2)$$

A partir de la ecuación previa, e integrando con respecto al tiempo, se obtuvo la siguiente expresión que, al representarse gráficamente, si la cinética es de primer orden, se obtendrá una línea de tendencia cuya pendiente es la constante cinética de degradación (K) (3).

$$-\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = K \cdot t \quad (3)$$

También se empleó la ecuación para una cinética de segundo orden:

$$-r_s = K \cdot S^2 \quad (4)$$

En este caso la siguiente ecuación puede emplearse para la regresión lineal:

$$\frac{1}{S} - \frac{1}{S_0} = K \cdot t \quad (5)$$

Donde S y S₀ son las concentraciones del sustrato, en este caso el HDPE, en un momento dado y a tiempo inicial, respectivamente, y t es el tiempo expresado en días.

3.5. Crecimiento de *Comamonas testosteroni*

Para seguir el crecimiento de la bacteria y analizar los efectos de los microplásticos sobre este, se determinaron las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) mediante el recuento en placa. Para obtener muestras representativas de las bacterias adheridas a los MPs y en suspensión en el medio de cultivo, se pesó en condiciones estériles un gramo del medio de cada matraz en una bolsa estéril y se mezcló con 9 mL de una disolución de cloruro de sodio (NaCl) al 7%, que se llevó a un homogeneizador de laboratorio STOMACHER® 80 BIOMASTER (Seward, Reino Unido) para separar las bacterias de la superficie de las micropartículas. A partir de esta dilución inicial, se realizaron las diluciones seriadas necesarias para obtener una concentración adecuada

de UFC/ml para el recuento en placa. Estas placas se prepararon con Nutrient Broth y agar (20 g/L) (Anexo I), y tras realizar las siembras se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Para estudiar el posible efecto de los MPs de HDPE sobre *C. testosteroni*, se realizó una curva de crecimiento de la bacteria en Nutrient Broth, en varios matraces Erlenmeyer de 500 mL, cada uno con un volumen de caldo de cultivo de 100 mL, en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, pero sin añadir microplásticos. Se tomaron medidas de la densidad óptica a 600nm (DO_{600nm}) empleando el espectrofotómetro de ultravioleta-visible GENESYS (Thermoscientific, EE. UU.) a lo largo del tiempo hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Para medir la absorbancia se tomaron volúmenes de 2 mL, y para el blanco se empleó medio de cultivo sin inocular.

También se calcularon las tasas de crecimiento específicas máximas (μ_{max}) de la bacteria en Nutrient broth con y sin MPs. Esta tasa se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \cdot X \quad (6)$$

A partir de la expresión previa, se obtuvo la siguiente ecuación empleada para la regresión lineal:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_{max} \cdot t \quad (7)$$

Donde X y X_0 son las concentraciones del microorganismo en un momento dado y a tiempo inicial, respectivamente, y t es el tiempo expresado en horas.

3.6. Determinación de los azúcares totales

Para el seguimiento de los azúcares totales durante los ensayos de degradación se empleó el método fenol-sulfhídrico [95]. En primer lugar, se preparó una curva de calibración usando cinco muestras patrón con concentraciones conocidas de glucosa entre 20 mg/L y 100 mg/L. A partir de estas disoluciones se tomaron 0.5 mL, a los que se añadieron 1 mL de fenol al 5% y 2.5 mL de ácido sulfúrico al 96%. Tras mezclar por inversión los tubos, la mezcla se dejó reaccionar durante 45 minutos y se midieron las absorbancias por triplicado a una longitud de onda de 492 nm, empleando un espectrofotómetro HACH DR/2400 (Hach, Estados Unidos).

Estas medidas de las absorbancias a 492 nm de las disoluciones patrón se representaron frente a la concentración de glucosa en ppm (mg/L), donde se obtuvo la siguiente ecuación de la recta de calibrado; $y = 0.0152 \cdot x + 0.0513$, con un coeficiente de terminación de $R^2 = 0.9954$ que se muestra en la figura 10.

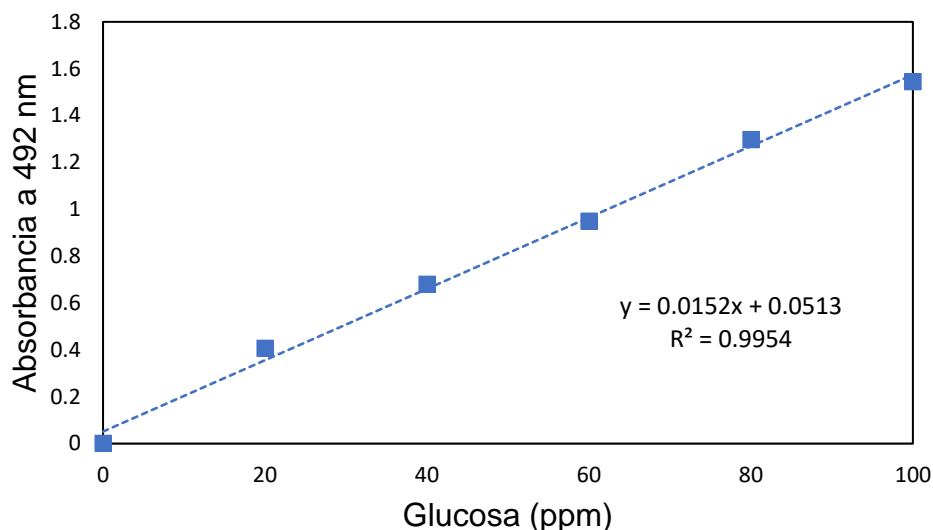


Figura 10: Curva de calibración de la concentración de glucosa frente al tiempo.

A partir de la ecuación de la curva de calibración se realizó el cálculo de las concentraciones de azúcares durante el experimento a partir de las medidas obtenidas de la absorbancia de las muestras. Para ello, durante los ocho días, se tomaron por duplicado muestras de un volumen de 5 mL en tubos estériles Falcon que se almacenaron a -4°C hasta su análisis. Para la preparación de las muestras, estas se diluyeron con agua destilada empleando una relación volumétrica 1:10 de la muestra. Siguiendo el método descrito previamente, se midieron las absorbancias de estas muestras a la misma longitud de onda, y empleando la ecuación de la recta de calibración se determinó la concentración de azúcares totales en el medio.

3.7. Análisis de la morfología y estructura química de los microplásticos: estereomicroscopía, microscopía electrónica de barrido (SEM) y FTIR

El análisis de la morfología de los microplásticos se realizó mediante un estereomicroscopio Leica M205FA de la unidad de Microscopía Fotónica y Proceso de Imágenes de la Universidad de Oviedo. Las muestras de los microplásticos que fueron analizadas se obtuvieron tras la eliminación de los microorganismos mediante el proceso previamente descrito empleando peróxido de hidrógeno, y tras dicho tratamiento, los MPs quedaron retenidos sobre papel de filtro que se observó directamente en el equipo. Para el análisis se tomaron muestras iniciales, en un punto intermedio (día 5) y al final del experimento (día 8). El análisis con este estereomicroscopio semiautomático se realizó con un objetivo 5x (a una distancia de trabajo de 19 mm), empleando una luz de reflexión generada por un anillo de LED con iluminación completa. En la figura 11.a se muestra una fotografía del equipo empleado para tomar estas imágenes.

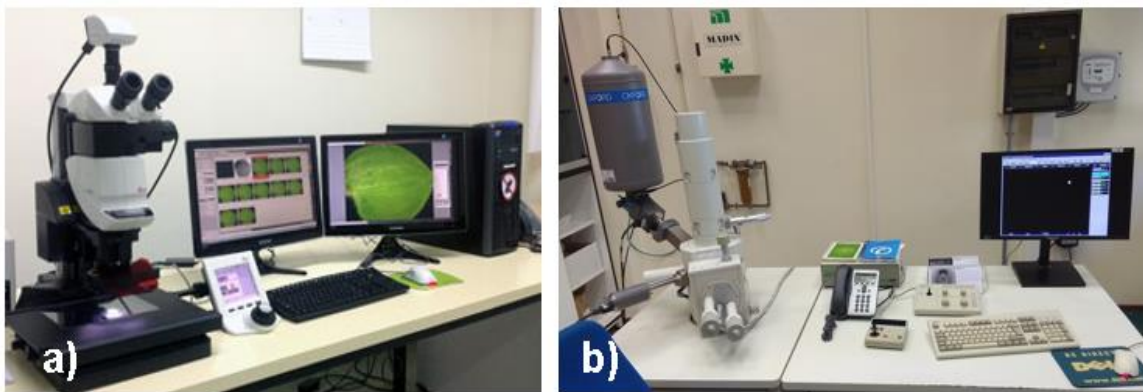


Figura 11: Estereomicroscopio Leica M205FA a) microscopio electrónico de barrido JEOL, JSM5600b)

Con el fin de obtener imágenes tridimensionales para la observación de la morfología superficial y las posibles modificaciones sufridas por los MPs por acción de los microorganismos, se llevó a cabo un análisis con un microscopio electrónico de barrido JEOL, JSM5600 (JEOL Ltd., Japón), (figura 11.b). Para ello se prepararon dos tipos de muestras; la primera para la visualización de las biopelículas de *Comamonas testosteroni* adheridas a los MPs, para la cual se tomaron muestras los días 5 y 8. El segundo tipo de muestras se tomó para la realización de una comparación estructural y

de la composición de los MPs a lo largo del experimento, tomando muestras iniciales (con y sin el tratamiento con peróxido de hidrógeno), una intermedia (día 5) y una final (día 8). Para ambos ensayos las muestras se filtraron usando filtros de fibra de vidrio (Cytiva GF/F Whatman™, China) con un tamaño de poro de 0,7 µm.

Para la visualización de los microorganismos adheridos a la superficie de los microplásticos, fue necesario llevar a cabo su fijación empleando glutaraldehído al 6% en un tampón fosfato 0,025 M (K_2HPO_4/KH_2PO_4) a un pH de 7.7. Para ello, se mezclaron volúmenes iguales de la muestra y la solución de glutaraldehído para preservar los microorganismos adheridos hasta el ensayo SEM. Posteriormente, para eliminar el glutaraldehído, se realizaron tres lavados de 15 minutos con la disolución tampón. A continuación para eliminar el contenido en agua de la muestra y asegurar una destrucción mínima de las células, se siguió un protocolo de deshidratación empleando etanol [96]. Se utilizaron soluciones de etanol en concentraciones crecientes que se dejaron actuar durante 15 minutos; 20%, 40%, 60%, 80% etanol y dos deshidrataciones finales con etanol absoluto (100%).

Para las muestras de microplásticos sin microorganismos, se siguió el procedimiento previamente descrito con peróxido de hidrógeno para obtener los MPS lavados. Estos se dejaron sumergidos sobre los filtros de vidrio en etanol 70% durante 20 minutos, y posteriormente se llevaron a una estufa a 50 °C durante 24 horas para asegurar la deshidratación completa. Todas las muestras se mantuvieron en placas Petri selladas usando parafilm hasta la visualización bajo el microscopio. Antes de la visualización bajo el SEM, las muestras deben cumplir dos condiciones para obtener la resolución deseada; deben estar completamente secas y ser conductoras. Para ello, las muestras previamente deshidratadas se sometieron a un proceso de metalización mediante pulverización en frío de oro. Además de realizarse un estudio morfológico, se llevó a cabo un análisis de la composición de las muestras mediante EDX.

Para la caracterización de los microplásticos en función de su composición química, se empleó la microespectroscopía infrarroja (FTIR) y los análisis fueron llevados a cabo por la Unidad de Espectroscopía Molecular de la Universidad Autónoma de

Madrid (UAM). Se tomaron medidas por triplicado de los MPs lavados siguiendo el protocolo mencionado con anterioridad a tiempo inicial, en un punto intermedio (día 5) y a tiempo final (día 8).

El equipo utilizado para el análisis fue un espectrofotómetro FTIR Spotlight 200i de Perkin Elmer (Figura 12) que trabaja en condiciones ambientales en los modos de Transmisión, Reflexión y Reflectancia Total Atenuada en el rango del infrarrojo medio entre $4.000-550\text{ cm}^{-1}$. El método de análisis consiste en preparar soportes transparentes a la radiación infrarroja (pastillas de KBr), depositar las muestras sobre ellos mediante el uso de una lupa y proceder a su análisis por transmisión en el sistema de microscopía infrarroja. El espectro de infrarrojo generado es analizado, de forma automática, comparando los resultados obtenidos con una base de datos almacenada en dicho equipo que contiene aproximadamente 36.000 espectros de compuestos diferentes.

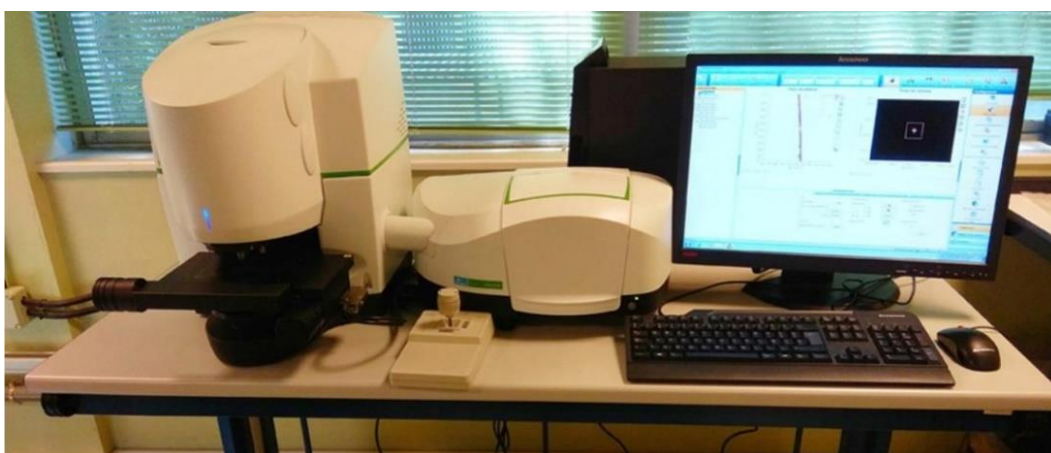


Figura 12: Espectrofotómetro FTIR Spotlight 200i de Perkin Elmer

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de los microplásticos de HDPE

La figura 13 muestra la morfología y el tamaño de los microplásticos de polietileno de alta densidad obtenidos a partir de los envases alimentarios siguiendo el protocolo descrito en la sección 3. Estas imágenes obtenidas con el estereomicroscopio muestran MPs con un rango de tamaños iniciales entre 100 y 250 μm . Como se puede observar en la figura, los plásticos presentan tamaños y formas muy heterogéneos entre sí, tanto al inicio del experimento (13.a), como al final (13.b y 13.c). En cuanto a su morfología, los MPs tienen mayoritariamente forma de fragmentos con superficies irregulares, además de algunos MPs con aspecto más fibroso. Las formas de los MPs obtenidos coinciden con los tipos de microplásticos encontrados con mayor frecuencia en diferentes medios. En un estudio realizado sobre la costa de Tarragona, España, se observó que los microplásticos más abundantes tiene forma de fibras (60%-93%) y fragmentos (5%-35%) [97]. Otro estudio realizado en el río Clyde, Escocia, encontró que los fragmentos contribuyen al 67% del total y las fibras a un 18.5% [98]. En cuanto a los tamaños más frecuentes de los MPs encontrados en diferentes hábitats, la gran mayoría de MPs encontrados tiene un tamaño comprendido entre 100 μm y 500 μm [99–101]. Por ello, los MPs obtenidos mediante esta metodología pueden ser adecuados para considerarse como un modelo de los MPs encontrados en medios naturales.

Al comparar las muestras de los microplásticos antes y después del tratamiento, no se observaron diferencias significativas bajo el estereomicroscopio. La coloración morada observada de los MPs proviene del colorante empleando en la fabricación de los envases alimentarios utilizados como material de partida. La caracterización del plástico por su color es un dato que se incluye en muchos estudios sobre la contaminación por MPs. Análisis sistemáticos de la detección de MPs revelan que los colores más abundantes son blancos y transparentes (47%), amarillos y marrones (26%) y de tonos azules y parecidos (9%), donde se podrían incluir los MPs estudiados [102]. Los pigmentos contenidos en los MPs pueden influir sobre la absorción de luz, así los pigmentos de tonos azules absorben la luz de longitud de onda larga con menor energía.

De esta forma la energía transmitida a los plásticos azules es superior que con otros colores, y consecuentemente el fotoenvejecimiento es superior [103].

Cabe añadir que debido a la falta de categorías estandarizadas establecidas para la clasificación de los MPs en base a su forma, color y tamaño, resulta muy difícil la comparación de los resultados presentados por diferentes autores [104]. Estas variaciones entre estudios de la materia de partida tienen un gran efecto sobre el ensayo de degradación de MPs, y es una de las posibles explicaciones de las grandes diferencias observadas en los resultados obtenidos, por lo que debe tenerse en cuenta.

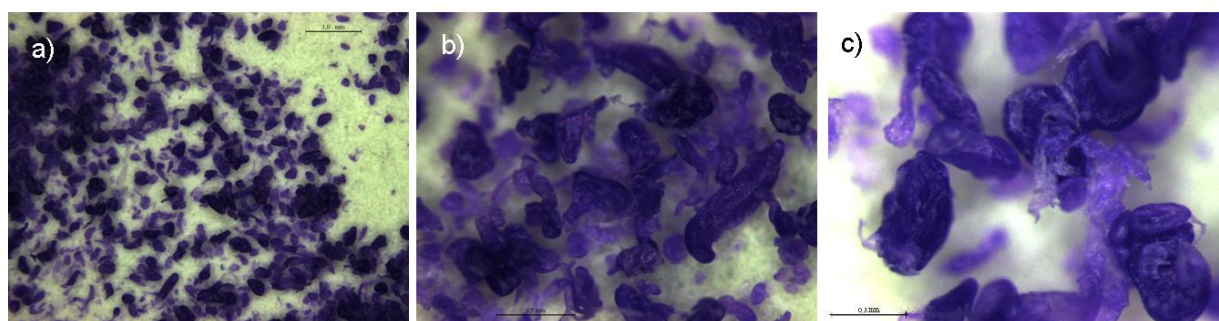


Figura 13: Imágenes de la morfología, tamaño y color de los microplásticos de HDPE obtenidas con el Estereomicroscopio Leica M205FA. La barra representa 1mm a), 0,5 mm b) y 0,3 mm c).

4.2. Biodegradación de los MPs de HDPE

Para el análisis del proceso de biodegradación de los MPs por parte de *C. testosteroni*, se ha determinado la pérdida de masa de HDPE a lo largo del tiempo que duró el experimento de degradación. En la figura 14.a se muestra la evolución de la masa residual de los MPs frente al tiempo expresado en días.

En el gráfico se observa que, durante los primeros días del experimento, la concentración de microplásticos fue ligeramente superior a la concentración inicial. Este error experimental puede ser explicado por la densidad del polietileno, que se encuentra entre 0.930 y 0.970 g/mL. Así, al tener una densidad menor a la del medio de cultivo tiende a flotar y dispersarse sobre la superficie, por lo que es posible que, a pesar de homogeneizar los matraces antes de tomar la muestra, la muestra tomada de la parte superficial tenga una concentración ligeramente superior a la real. En cualquier caso, el

error cometido respecto a la cantidad inicial es de un 5%, por lo que se considera que la toma de muestra fue realizada de forma adecuada.

La formación de una biopelícula puede influir sobre las características del material plástico, como su hidrofobicidad y su flotabilidad, ya que modifica la relación volumen:densidad [105, 106]. Con el aumento resultante de la densidad relativa de los MPs superando la del medio en el que se encuentran sumergidos, las partículas tienden a moverse hacia abajo, y como consecuencia del aumento de profundidad y consiguiente incremento de la presión, los MPs entran en equilibrio de densidad con el medio y permanecen en suspensión [107]. Este proceso de formación de la biopelícula puede llegar a tardar hasta varios días [108], lo que podría ser una posible explicación de lo que se observa durante los primeros días en los ensayos de degradación. En ambos experimentos duplicados, la concentración de los MPs mostró la misma tendencia a disminuir a partir del cuarto día de incubación. La reducción de la masa final de los microplásticos fue de un $12.30 \pm 0.82 \%$, y no se obtuvieron diferencias estadísticas entre los resultados de los experimentos I y II.

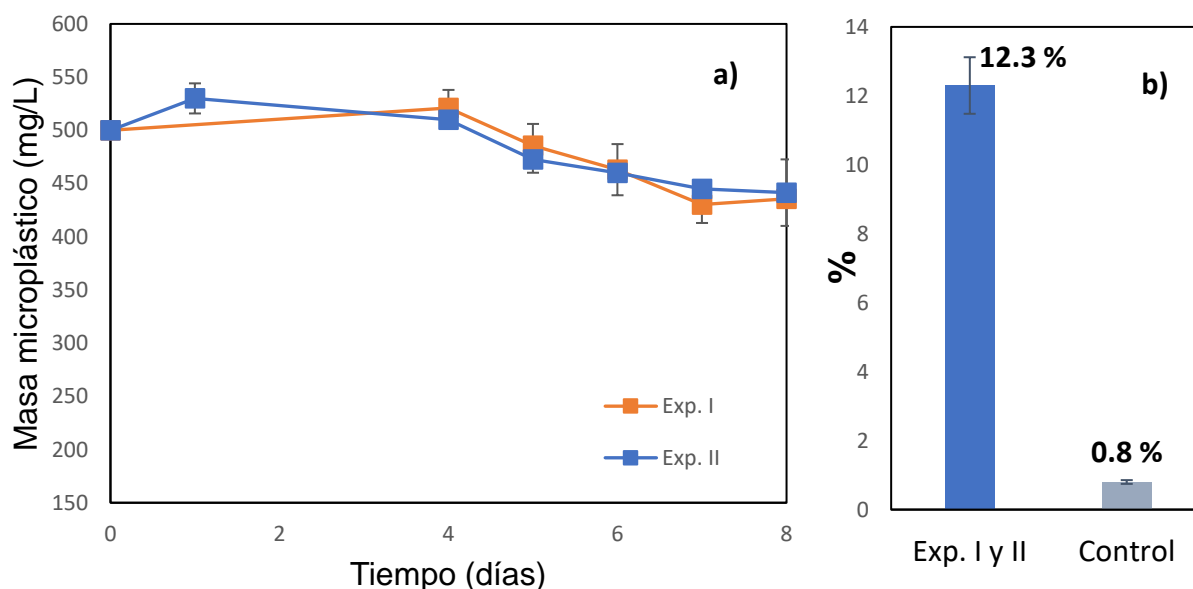


Figura 14: (a) Seguimiento de la masa residual de los microplásticos. La concentración se expresa en mg/L frente al tiempo en días, para los experimentos I y II. (b) Gráfico de barras comparando el porcentaje de degradación al cabo de 8 días en los exp. I y II (con *C. testosteroni*) y control (sin *C. testosteroni*). Las barras de error indican las desviaciones estándar.

Con el fin de comprobar que la disminución observada en la masa de MPs era debida a la acción de *C. testosteroni*, de manera paralela se llevó a cabo otro

experimento en idénticas condiciones, pero sin inocular la bacteria. En este experimento control se obtuvo una medida muy aproximada a la inicial, con una recuperación del 99,2% de los MPs iniciales. El análisis estadístico de los grupos control y experimentales muestra una diferencia estadística, con un P-valor de 0.015, por lo que la pérdida de masa observada es significativa, indicando la biodegradación experimentada por los MPs (figura 14.b). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con Microsoft Excel. mediante una prueba t de Student para muestras independientes con un nivel de confianza $P \leq 0.05$.

Varios estudios reportan diferentes eficacias de reducción de la masa de MPs de PE en base a su área de superficie, las especies o consorcios estudiados y las condiciones de cultivo. En un estudio se observó una degradación de MPs de HDPE de entre un 12 y 15% al cabo de 14 días, trabajo en el que se empleó la bacteria *Arthrobacter sp.* GMB5 [109]. Otro trabajo de tres semanas de duración observó una reducción del 33.7% de los MPs de polietileno empleando la bacteria *Cupriavidus necator* [80]. Incluso se pudo observar una degradación del 100% en MPs de poliolefinas (PE y PP) durante un periodo de 33 días, empleando una concentración de 0.11 mg/L de MPs, aunque no se especifica el microorganismo empleado [77]. Por otra parte, también se han realizado ensayos de degradación durante periodos de tiempo mucho más largos que el estudio realizado, incluso de hasta 3 meses [73, 81]. La gran cantidad de factores que influyen sobre la degradación de los MPs, como el tiempo de incubación, tamaño y concentración de los MPs y los microorganismos usados, dificulta enormemente la comparación de ensayos entre sí.

En cuanto a ensayos de degradación realizados con la bacteria *Comamonas testosteroni* aquí empleada, actualmente existe escasa información documentada. En un estudio sobre su capacidad de degradación de MPs de PET, se observó que la bacteria era capaz de reducir de forma importante el diámetro de los MPs en 48 horas, de 7.3 μm a 1.58 μm , demostrando el gran potencial degradativo del microorganismo. Estos datos, sin embargo, contrastan con lo aquí obtenido, ya que no se observó ninguna degradación hasta el cuarto día de cultivo, aunque este hecho puede deberse a las diferencias de tamaño de los MPs, entre otros factores [110].

Los datos obtenidos del análisis gravimétrico de los microplásticos se trataron para determinar la constante de velocidad de la degradación de los microplásticos de HDPE siguiendo una cinética de primer y segundo orden, con el fin de determinar a qué orden se ajustan mejor los datos experimentales. Esta determinación se basó en los datos comprendidos entre el día 5 y el final del experimento, ya que fue a partir de este punto donde se observó la degradación de los MPs. Esta observación coincide con lo documentado por otros estudios, que observaron degradación significativa de MPs de polietileno entre el tercer y el sexto día por una especie de *Streptomyces* [111]. Empleando las ecuaciones 3 y 5 mostradas previamente se obtuvo las rectas mostradas en la figura 15, donde se representa el logaritmo de la concentración de los MPs (S) frente al tiempo, a partir de la cuales se determinaron las constantes de velocidad para cada orden cinético.

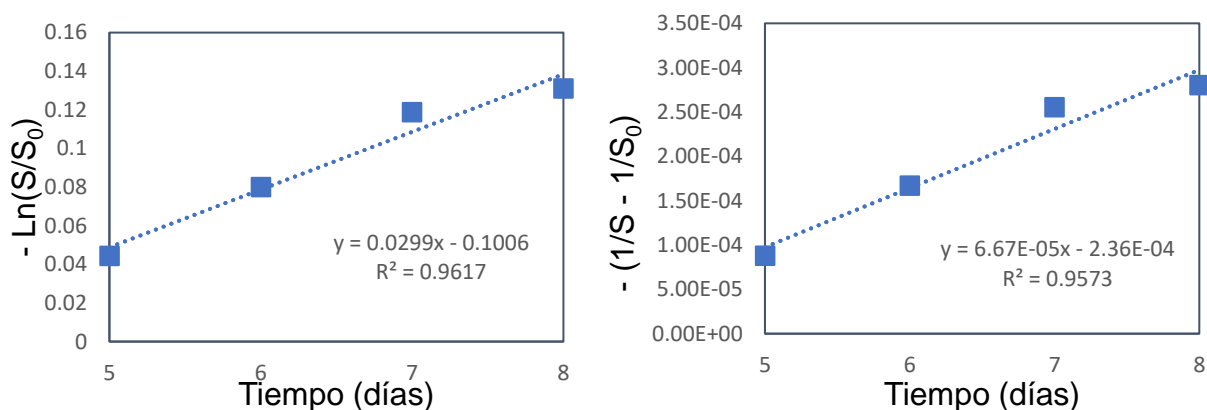


Figura 15: Cinética de degradación de los MPs de la media de los experimentos I y II. (a) Cinética de primer orden y (b) cinética de segundo orden.

En la tabla 2 se muestra una comparación entre los resultados de la cinética de primer y segundo orden. El modelo con la mejor capacidad de predecir el comportamiento de biodegradación puede estimarse mediante el valor de R^2 , de forma que, como se puede ver, el modelo de primer orden se ajusta mejor a los resultados experimentales, lo que coincide con lo observado en otros estudios [110, 111].

Tabla 2: Constantes para la biodegradación de MPs para cinéticas de primer y segundo orden

Primer orden		Segundo orden	
K (días ⁻¹)	R^2	K (L · mg ⁻¹ · días ⁻¹)	R^2
29.9·10 ⁻³	0.9617	6.67·10 ⁻⁵	0.9573

4.3. Crecimiento de *Comamonas testosteroni*

Para el estudio del crecimiento de la bacteria *C. testosteroni* y el efecto sobre este de los MPs, se llevó a cabo una comparación entre la curva de crecimiento en el medio de cultivo Nutrient Broth (sin MPs) y su crecimiento durante el ensayo de degradación con el mismo medio de cultivo y 500 mg/L MPs.

La figura 16 muestra la curva de crecimiento de la bacteria en el medio con los MPs en base logarítmica. Se observa que se produce crecimiento aproximadamente hasta el cuarto día, con un aumento de 4 unidades logarítmicas. Le sigue una fase estacionaria, donde la velocidad de muerte compensa al crecimiento, y a partir del sexto día la concentración de bacterias viables comienza a disminuir lentamente.

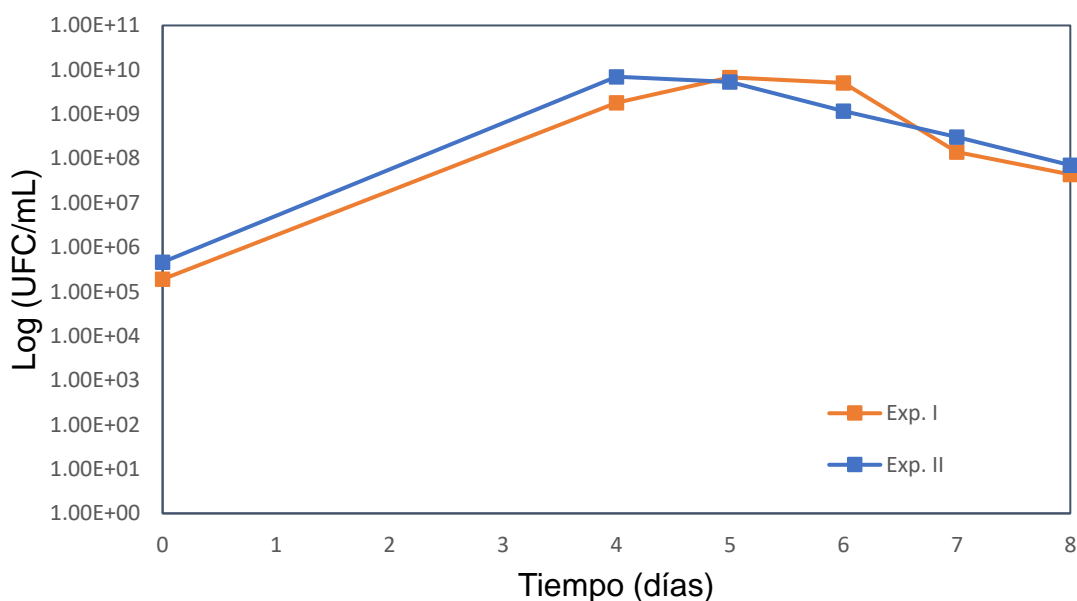


Figura 16: Crecimiento de *C. testosteroni* durante el ensayo de degradación. Se representa el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mililitro frente al tiempo en días para los experimentos I y II.

En la figura 17 se muestra la curva de crecimiento de la bacteria sin MPs durante las 50 primeras horas tras su inoculación. En este caso, el crecimiento ha sido seguido midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm. Como se observa en el gráfico, la bacteria está en crecimiento exponencial hasta aproximadamente la hora 11. A partir de este punto el crecimiento muestra una fase prolongada de desaceleración hasta aproximadamente las 30 horas, donde se alcanzó la fase estacionaria. No se observa fase de muerte, si bien se debe tener en cuenta que la medida de la DO no permite diferenciar las bacterias viables de las no viables.

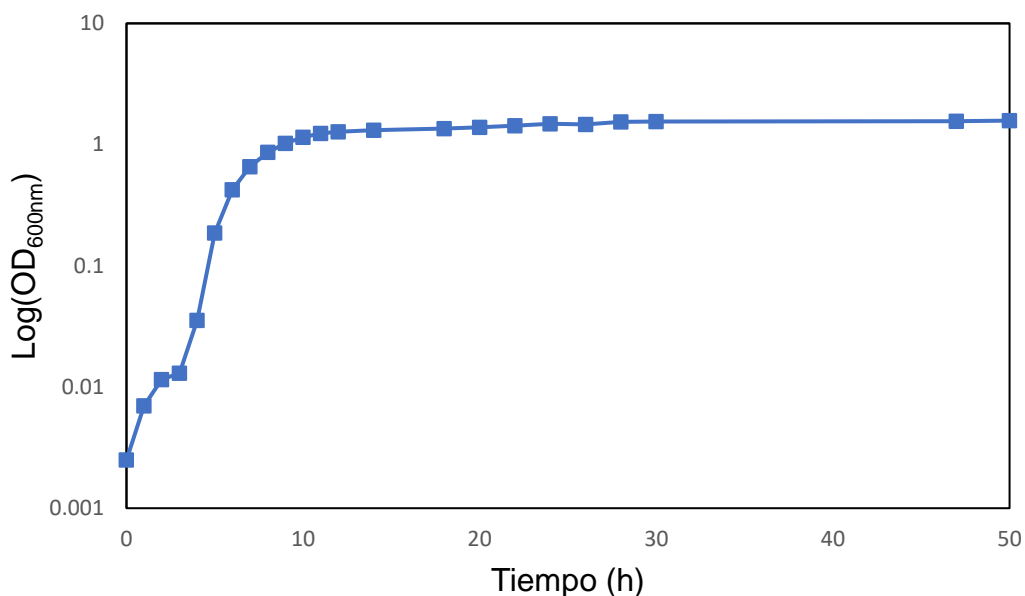


Figura 17: Curva de crecimiento de *C. testosteroni* en caldo nutritivo II expresada como el logaritmo de la densidad óptica medida a 600nm (OD₆₀₀) frente al tiempo en horas.

Al comparar ambos gráficos, se observa que durante los experimentos la concentración máxima de microorganismos no se alcanza hasta el día 4, mientras que en la curva de crecimiento de la figura 17 se alcanza la fase estacionaria poco después de haber transcurrido 1 día desde la inoculación. Esto indica que los MPs tienen algún efecto que cause el retraso del crecimiento de la bacteria.

Se determinaron las tasas de crecimiento específicas máximas de los microorganismos (μ_{max}) para ambas condiciones. En la figura 18 se muestran las representaciones gráficas de los datos durante las fases de crecimiento exponencial empleando la ecuación (7) mostrada previamente. Como se puede observar a partir de

la pendiente de las rectas obtenidas, la tasa de crecimiento específica es mucho mayor en el medio sin los MPs (18.a) que en la incubación con las partículas (18.b), siendo $\mu_{\max} = 0.2149 \text{ h}^{-1}$ y $\mu_{\max} = 0.0868 \text{ h}^{-1}$ respectivamente.

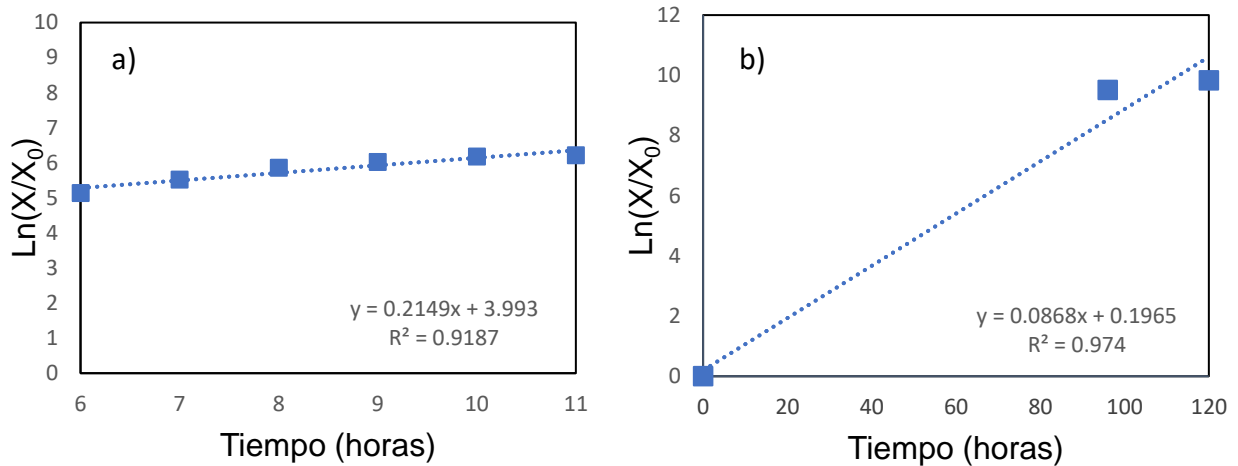


Figura 18: Representación gráfica del crecimiento de *C. testosteroni* frente al tiempo para la obtención de la tasa de crecimiento específica máxima. Para el crecimiento sin (a) y con (b) MPs.

A partir del día seis se observa en ambos ensayos realizados con MPs el decrecimiento del número de bacterias. En los procesos biológicos, muchos estudios encuentran que la degradación del plástico produce una rápida liberación de sustancias tóxicas que impiden de forma marcada el crecimiento de los microorganismos [44]. En los cultivos mixtos o consorcios bacterianos no es un problema tan notable al ser capaces de eliminar los metabolitos tóxicos producidos. Esto podría explicar el comportamiento aquí observado, ya que el momento en el que los microorganismos dejan de crecer coincide con el inicio de la degradación de los MPs (figura 14).

4.4. Consumo de azúcares

En la figura 19 se muestra la evolución de los azúcares totales presentes en el medio de cultivo expresados en mg/L frente al tiempo. Como se observa en el gráfico, los azúcares muestran una rápida reducción a partir de los primeros días del experimento, hasta aproximadamente el día 5, a partir de donde comienzan a disminuir de forma mucho más lenta. Al comparar los azúcares presentes en el medio con la cantidad de microplásticos, se observa que la degradación de estos se inicia aproximadamente a partir del cuarto día de la incubación. Es decir, el consumo de

azúcares comienza a ralentizarse coincidiendo aproximadamente con el inicio de la degradación de los microplásticos. Está clara la relación entre los procesos, sin embargo, la explicación no es tan evidente. Una primera explicación podría ser que a partir del día cinco se hayan agotado los azúcares fácilmente empleados por *C. testosteroni*, lo que motiva que busque otra fuente de carbono y comience a degradar el HDPE.

En la figura 19 se puede observar que la cantidad de azúcares residuales que están presentes en el medio al final del experimento es relativamente elevado, ya que permanecen sin consumirse casi un tercio de los azúcares iniciales. La especie *C. testosteroni*, a diferencia de la mayoría de las bacterias, carece de ciertos genes requeridos para la utilización de carbohidratos preferidos por otros microorganismos, lo que también puede evitar la competición por azúcares, otro aspecto atractivo del uso de esta bacteria. Debido a estas limitaciones genéticas, emplea otro tipo de fuentes de carbono como compuestos aromáticos con anillos de carbono, lo que explica su capacidad degradativa de los plásticos [84–86]. Sin embargo, también podría ocurrir que al comenzar a degradarse los MPs, se liberan sustancias tóxicas al medio que inhiben la actividad microbiana y por ello se ralentiza la velocidad de consumo de azúcares, a pesar de estar todavía presentes en el medio en alta concentración.

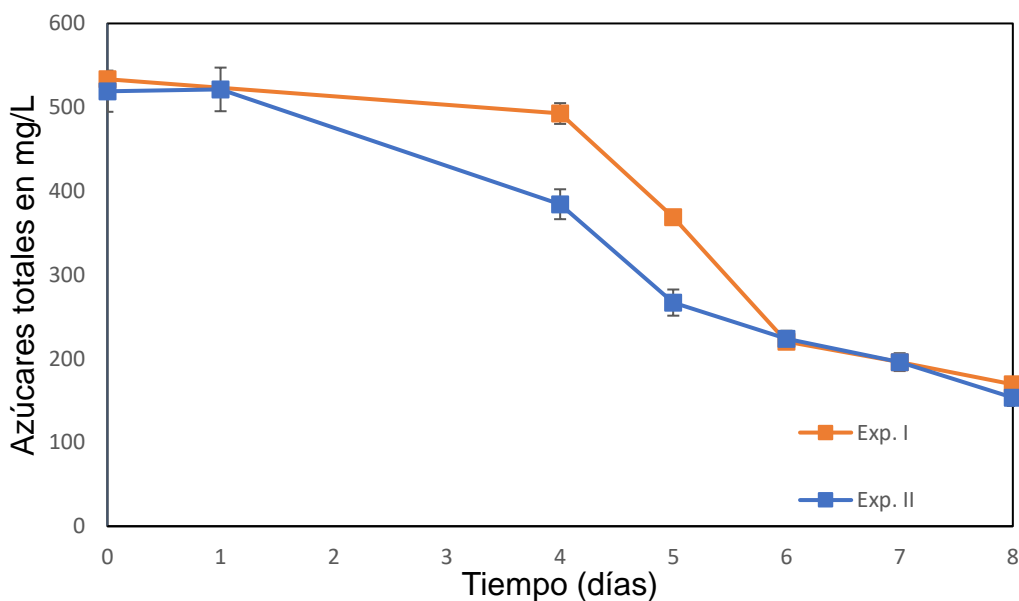


Figura 19: Variación de los azúcares totales frente al tiempo determinados por el método fenol-sulfhídrico, expresado en mg/L. Se muestra la variación de los azúcares totales para el experimento I y II. Las barras de error indican la desviación estándar.

4.5. Evolución del pH

La figura 20 muestra la evolución del pH durante ambos experimentos. Se observa que durante el ensayo el pH del medio tiende hacia un valor aproximado de 9. A pesar de la falta de información sobre el efecto del pH en los procesos de degradación de plásticos por *C. testosteroni*, otros estudios de degradación de fuentes alternativas de carbono por esta bacteria como el ftalato de dimetilo encontraron que el pH óptimo para este tipo de procesos de degradación transcurre a un pH de 9 [113].

El efecto del pH sobre la degradación de MPs de PET por *C. testosteroni* también ha sido analizado, donde se observó que efectivamente, el pH puede tener un impacto importante en la eficacia de degradación [110]. Se observó que la degradación era superior en condiciones alcalinas (pH=12) frente a condiciones de pH = 7, demostrando que el control del pH en el medio puede ser un factor importante para optimizar las condiciones de degradación de MPs [110].

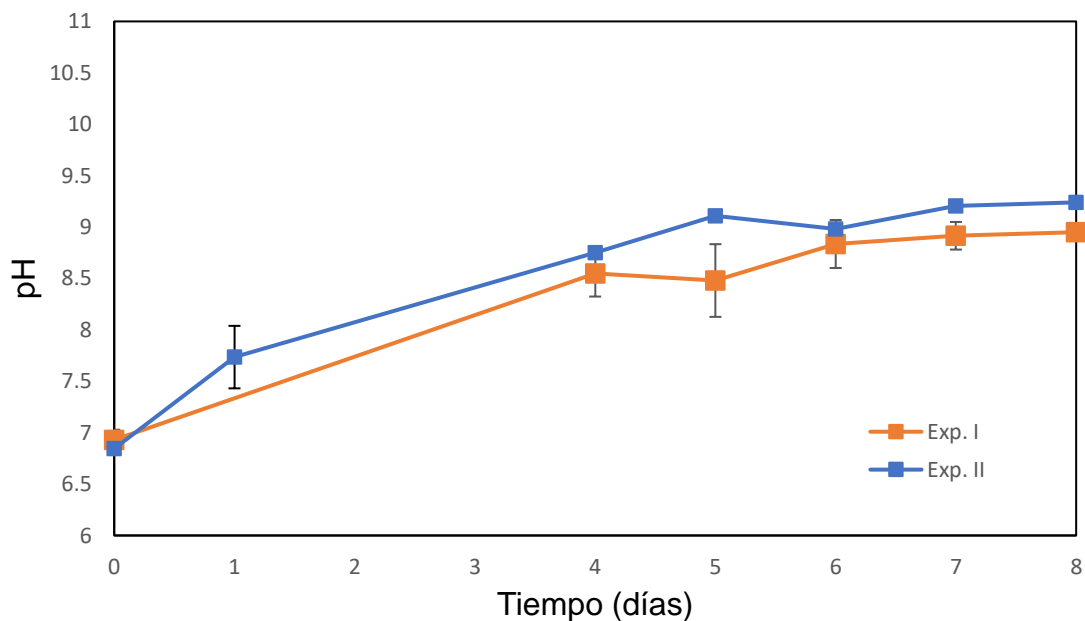


Figura 20: Variación del pH frente al tiempo de incubación. Se muestra la evolución para los experimentos I y II. Las barras de error indican las desviaciones estándar.

4.6. Observación de los MPs al SEM

Los posibles cambios producidos sobre la superficie y la morfología externa de los MPs tras el ensayo de degradación biológica se comprobaron mediante un análisis SEM. Estudios previos revelan que la degradación de MPs por microorganismos conduce a alteraciones superficiales como cambios en la textura o rugosidad de la superficie y la formación de agujeros, hoyos y grietas [114].

En la figura 21 se muestran una serie de imágenes de los MPs siguiendo los ocho días de la incubación con la bacteria, mostradas a x500 y x1000 para su visualización. Las micrografías electrónicas de barrido muestran que el plástico sin tratar (21.a, 21.b) tiene una superficie más lisa, mientras que en las siguientes imágenes aparece una deteriorización localizada en la superficie de los MPs, que genera una mayor rugosidad. Además, en las muestras de los MPs tratados se puede apreciar la aparición de imperfecciones sobre la superficie como los agujeros indicados en la imagen (figura 21.d). En las fotografías correspondientes a las muestras obtenidas el último día se aprecia la adhesión de las bacterias sobre la superficie, que permanecieron unidas a pesar del proceso de lavado al que se sometieron los MPs. Esto podría indicar que a medida que avanza el proceso de degradación se produce una mayor colonización de los MPs y aumenta la fuerza de adhesión de las bacterias a la superficie.

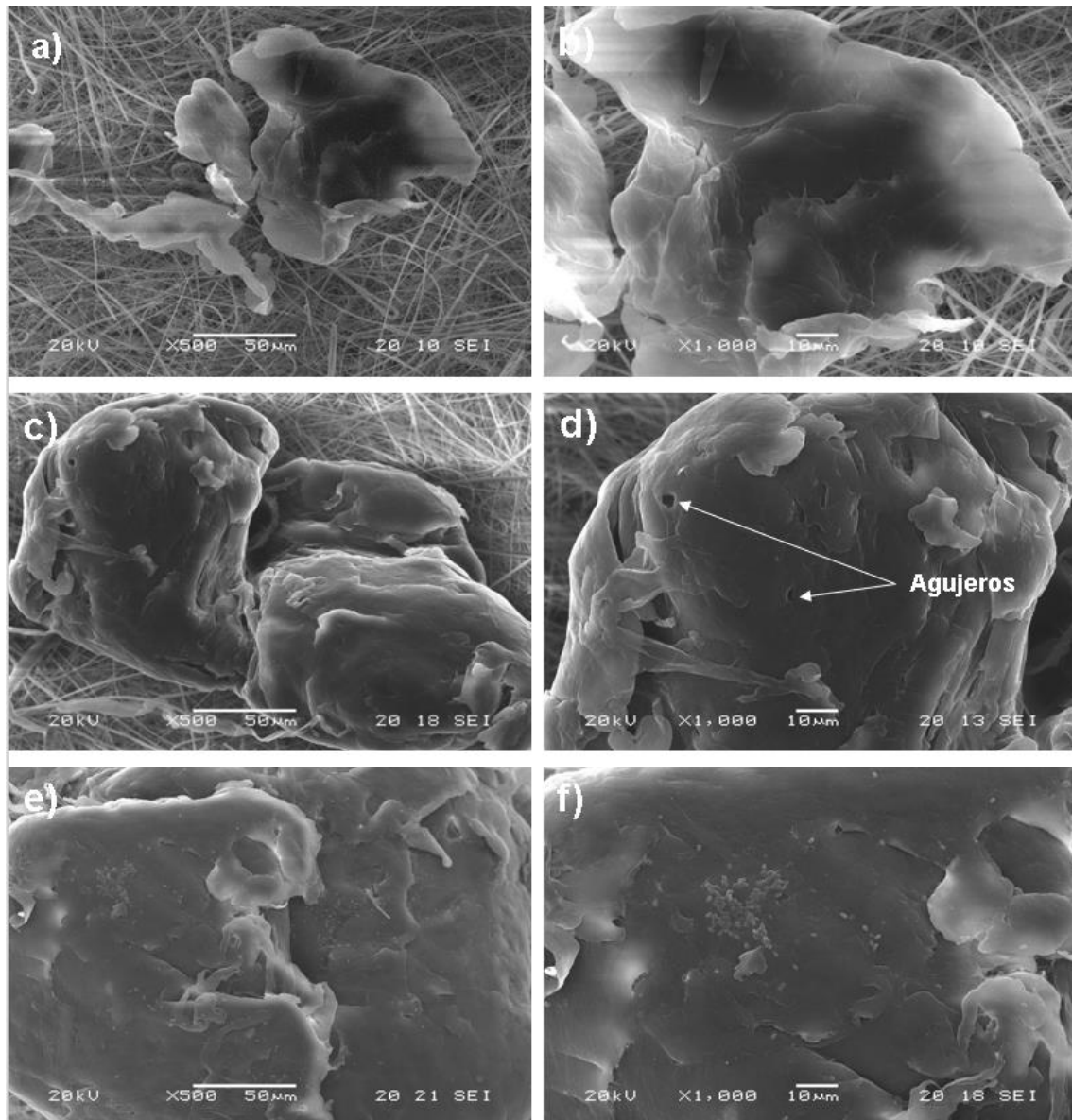


Figura 21: Micrografías SEM de los microplásticos de polietileno siguiendo los ocho días de incubación. Se muestran los MPs iniciales con tratamiento a una magnificación de 500x (a) y 1000x (b), al quinto día a una magnificación de 500x (c) y 1000x (d), y al final del ensayo de degradación, a una magnificación de 500x (e) y 1000x (f). Las imágenes (a), (c) y (e) se muestran con una escala de 50 µm y las imágenes (b), (d) y (f) a una escala de 10 µm.

En cuanto a la interacción entre la bacteria y los MPs, la figura 22 muestra unas imágenes de la adhesión de los microorganismos a las superficies mediante el análisis SEM. Las imágenes, mostradas a 500x y 5000x para una mejor visualización, revelan la formación de biopelículas superficiales, tanto en las muestras tomadas el día 5 (22.a) como en las muestras finales (22.b). Las imágenes mostradas a 500x muestran que la colonización de los MPs es superior transcurridos los ocho días (22.c) con respecto al quinto día (22.a), cuando es más limitada. Numerosos estudios afirman que la formación

de biopelículas es un paso crítico en la iniciación de la degradación de los plásticos, de forma que las micrografías indican el inicio de esta actividad [115, 116].

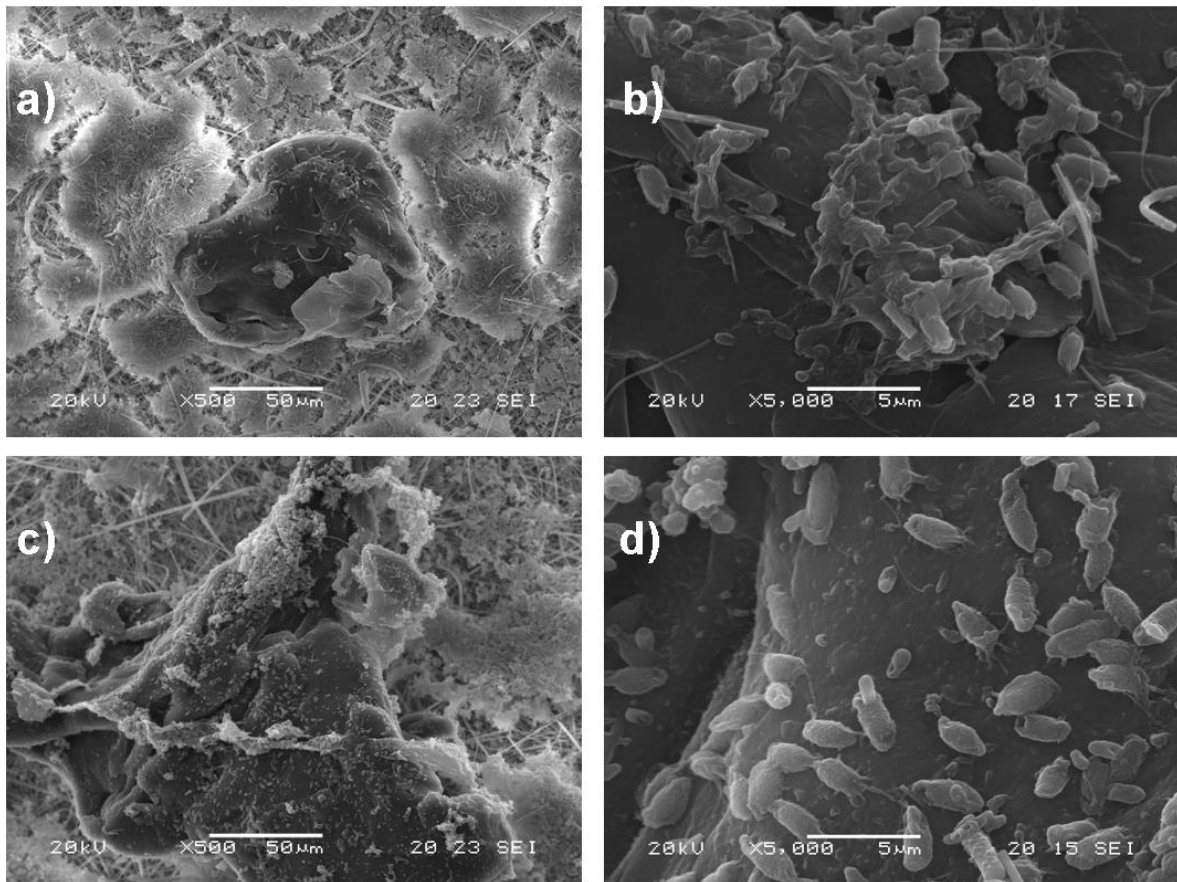


Figura 22: Micrografías SEM de *C. testosteroni* unido a las superficies de microplásticos de polietileno. Se muestran los MPs al quinto día a una magnificación de 500x (a) y 5000x (b), y las muestras de MPs al final del ensayo de degradación, a una magnificación de 500x (c) y 5000x (d). Las imágenes (a) y (c) se muestran con una escala de 50 μm y las imágenes (b) y (d) a una escala de 5 μm.

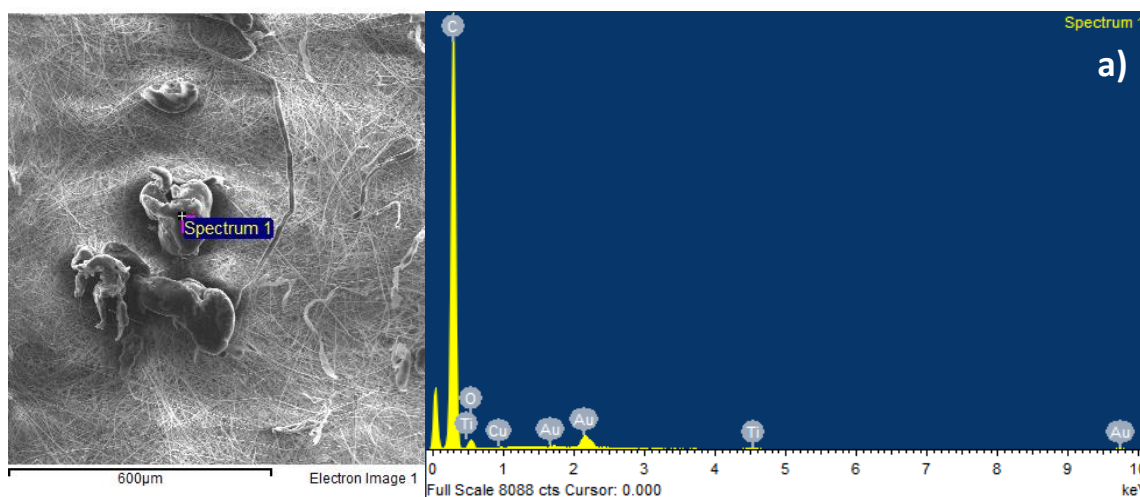
4.7. Cambios en la composición de los MPs

En la tabla 3 se representan los datos obtenidos tras el análisis elemental llevado a cabo sobre la superficie de las partículas mediante el microscopio electrónico de barrido, donde carbono (C) y oxígeno (O) fueron los elementos mayoritarios detectados, junto con cantidades relativamente bajas de sodio (Na), silicio (Si) y titanio (Ti). La presencia de estos últimos elementos podría deberse a los aditivos del plástico empleados durante el proceso de manufacturación o por interferencias del filtro de vidrio, sin embargo las cantidades detectadas por esta metodología son tan bajas que no resultan significativas [117].

Tabla 3: Análisis elemental normalizado de los elementos carbono (C) y oxígeno (O) realizada por el SEM sobre la superficie de los microplásticos siguiendo el ensayo de degradación. Se muestran los análisis de muestras iniciales (con y sin tratamiento con H2O2), y al quinto y octavo día.

Muestra		C	O	O/C
Tiempo=0	Sin trat.	92.11	7.67	0.08
	Con trat.	91.98	7.72	0.08
Tiempo=5		91.07	8.55	0.09
Tiempo=8		90.26	9.48	0.11

Los espectro obtenidos (figura 23), que se muestran para las micropartículas iniciales sin tratar (a) y finales (b), caracterizados por un pico fuerte de C y un pico más bajo de O, coinciden con lo encontrado por otros estudios con análisis SEM en microplásticos de polietileno [98, 118]. Cabe destacar que esta técnica no permite la detección de elementos muy ligeros como el hidrogeno (H), helio (He) o litio (Li), y es por ello que a pesar de que el polietileno de alta densidad contiene hidrógeno (fórmula química generalizada: $(C_2H_4)_n$), no se incluye en el análisis [119].



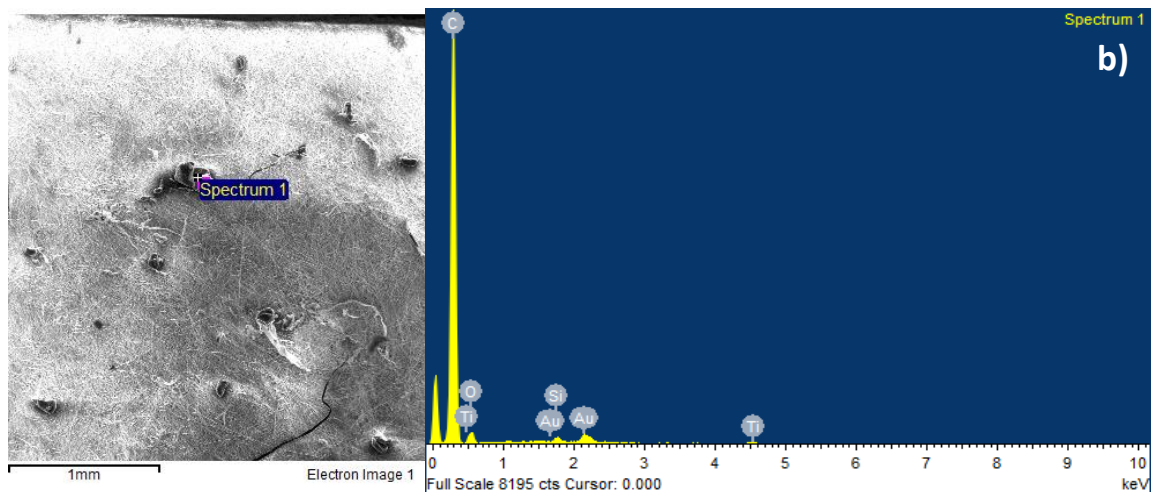


Figura 23: Fotografía SEM y análisis EDS de los microplásticos iniciales (a) y finales (b).

A partir de estos datos se calculó la relación O/C para analizar la variación de la composición química de los MPs. En cuanto al análisis de las micropartículas de HDPE a tiempo inicial, se compararon las muestras tratadas con peróxido de hidrógeno y las muestras sin tratamiento, entre las cuales no se encontró ninguna diferencia significativa. Durante el experimento la relación O/C mostró una tendencia a incrementarse de forma gradual, que podría indicar la oxidación superficial de los MPs, lo que coincide con los resultados de otros estudios [120, 121]. En un estudio sobre la oxidación y fragmentación de plásticos, se encontró que muestras de MPs extraídas del mar que habían sufrido procesos de degradación biológica tenían una relación O/C de 0.1-0.2, lo que indica que el proceso de incubación de los plásticos con la bacteria acelera las reacciones de degradación que se desarrollan en el medioambiente [122]. Sin embargo, las mediciones llevadas a cabo en este trabajo no son suficientes para confirmar este resultado, ya que solo se realizó un análisis por muestra.

Para confirmar que efectivamente se estaba produciendo una oxidación de la superficie de los MPs por acción de las bacterias inoculadas, se analizaron cuatro muestras tomadas a distintos tiempos mediante espectroscopía de infrarrojos FTIR. Como se puede observar en los espectros FTIR (figura 24), los microplásticos analizados muestran los picos característicos del polietileno alrededor de 2918, 2848, 1466 y 722 cm^{-1} [123].

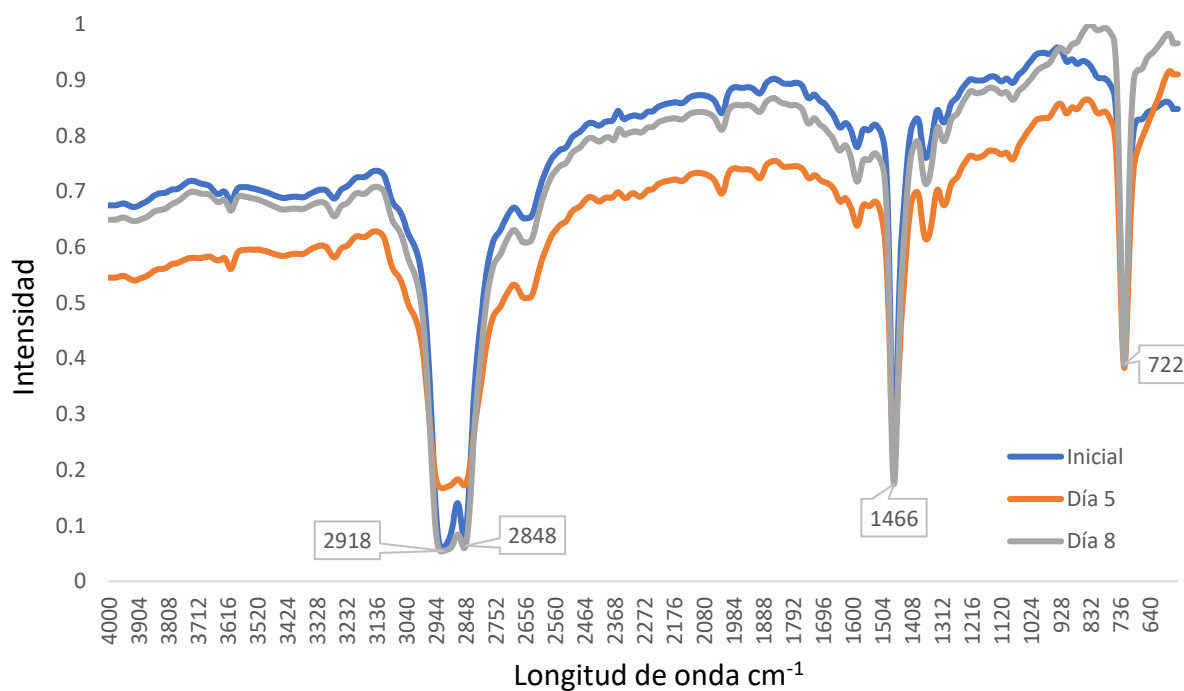


Figura 24: Espectros FTIR de los MPs de HDPE con los picos característicos del polietileno.

Con el fin de obtener información cuantitativa sobre las modificaciones estructurales del HDPE, se estimaron los valores del índice de carbonilo (IC) durante el experimento. La zona de absorción a una longitud de $1650-1850\text{ cm}^{-1}$, que permite observar cambios en los grupos carbonilo en diferentes plásticos, se conoce como el “estiramiento carbonilo” [124]. Por tanto, el índice se determina mediante la relación entre el pico del enlace C=O (aproximadamente a 1714 cm^{-1}) dentro del “estiramiento carbonilo” y un pico de referencia ($1420-1500\text{ cm}^{-1}$). Se encontró que el incremento de esta relación se asocia directamente a la degradación oxidativa o térmica del plástico, de manera que sirve para medir el nivel de biodegradación [125].

La tabla 4 muestra los valores de los índices de carbonilo para las muestras iniciales, intermedias (día 5) y finales. Estos índices se calcularon como la relación $1714/1466\text{ cm}^{-1}$.

Tabla 4: Índice de carbonilo e información estadística de los espectros FTIR. Se muestra el índice de carbonilo promedio (IC) y la desviación estándar para las muestras iniciales con y sin tratamiento, al día 5 y al día 8.

Muestra		IC
Tiempo = 0	Sin trat.	0.12 ± 0.03
	Con trat.	0.12 ± 0.03
Tiempo = 5		0.34 ± 0.08
Tiempo = 8		0.27 ± 0.04

Como se observa en la tabla 4, el tratamiento con peróxido de hidrógeno no tuvo ningún efecto significativo sobre el índice de carbonilo. Por otra parte, se observa un incremento del IC tras el ensayo. Este hecho coincide con lo encontrado en otros estudios de biodegradación, sugiriendo una acumulación gradual de grupos carbonilo sobre la superficie de los MPs por acción de *C. testosteroni* [124–126]. Se observa que los valores del IC una vez iniciada la degradación muestran una oxidación muy similar tanto para el día 5 como el día 8, y teniendo en cuenta las desviaciones estándar, se pueden considerar aproximadamente iguales. Además, se ve que estos valores son claramente superiores a los obtenidos a tiempo inicial, indicando la acción degradativa de los microorganismos.

Estos resultados muestran por tanto el incremento del IC, sin embargo, se debe tener en cuenta que se tomó un número reducido de muestras, ya que los espectros se obtuvieron a partir de una única muestra, y no permite observar posibles diferencias entre los matraces donde se produjeron las reacciones. Además, el tamaño de los MPs puede influir también en las medidas, y debido a la gran heterogeneidad entre estos, podrían aparecer diferencias en su evolución durante la biodegradación, por lo que para generar unos resultados más preciso sería necesario realizar un número superior de medidas.

5. CONCLUSIONES

- La caracterización de los MPs bajo el estereomicroscopio reveló que las partículas obtenidas por trituración de tapones de envases alimentarios son heterogéneas entre sí, tanto en tamaño como en morfología. Además, los MPS mostraban principalmente forma de fragmentos, y algunos con aspecto más fibroso, que coinciden con las morfologías encontradas más frecuentemente en muestras de aguas en el medioambiente.
- El ensayo de degradación mostró una reducción de la masa inicial de los MPs de un 12.30 ± 0.82 %, sin diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos I y II. Los datos experimentales se ajustan a una cinética de primer orden, con una constante cinética $K = 29.9 \cdot 10^{-3} \text{ días}^{-1}$.
- Se observó que la degradación de los MPs de HDPE no fue inmediata, sino que se inició sobre el día 4, demostrando que la biodegradación requiere primero la colonización de la superficie de los MPs y la formación de biopelículas, lo que coincide con otros estudios de biodegradación.
- La presencia de los MPs ejerció un efecto significativo sobre el crecimiento del microorganismo, lo que pudiera deberse a la liberación de compuestos tóxicos durante la degradación de MPs. La tasa de crecimiento específica máxima era significativamente menor durante la incubación con los microplásticos que sin ellos, siendo estas tasas de 0.0868 h^{-1} y 0.2149 h^{-1} , respectivamente.
- La concentración de azúcares totales comenzó a disminuir desde el principio de la incubación, ralentizándose la velocidad de consumo una vez iniciada la degradación del MP. Al final del experimento todavía quedaba una cantidad significativa de azúcares en el medio.

- El análisis con el SEM permitió observar la aparición de deterioro localizado sobre la superficie de los MPs como agujeros o rugosidades, lo que podría ser un indicador del proceso de biodegradación.
- El análisis SEM de los MPs mostró la adherencia de *Comamonas testosteroni* a la superficie y la formación de biopelículas. Además, al comparar las imágenes de muestras del día 5 y del final del experimento, se pudo observar una diferencia significativa entre el tamaño de esta biopelícula, indicando que a medida que se prolongaba el ensayo de degradación se incrementó la tendencia de las bacterias a adherirse a los MPs.
- En análisis elemental de la superficie de los MPs sobre la composición de carbono (C) y oxígeno (O) mostró una tendencia hacia el aumento de la relación O/C durante el ensayo de degradación. Esto podría indicar la oxidación de la superficie de los MPs como consecuencia de la actividad de los microorganismos.
- El análisis por espectrofotometría de infrarrojos FTIR de los MPs mostró un incremento del índice de carbonilo tras el ensayo con respecto a las muestras iniciales, indicando el incremento del número de grupos carbonilo presentes por la degradación del plástico por la bacteria.
- Los resultados obtenidos muestran el gran potencial de *C. testosteroni* para la degradación de microplásticos, que podría servir como una útil herramienta biotecnológica para la eliminación de estos contaminantes con el fin de reducir el impacto negativo sobre nuestro ecosistema.

6. ABREVIATURAS

AFM = Microscopio de fuerza atómica

DS = Desviación estándar

EDAR = Estación depuradora de aguas residuales

EDS = Espectrofotómetro de dispersión de energía

FE-SEM = Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo

FTIR = Espectrofotometría de Transformada de Fourier

GC-MS = Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

HDPE = Polietileno de alta densidad

IC = Índice de Carbonilo

LDPE = Polietileno de baja densidad

MPs = Microplásticos

NB = Nutrient Broth

PET = Tereftalato de polietileno

PES = Poliestireno

PP = Polipropileno

PVC = policloruro de vinilo

SEM = Microscopio electrónico de barrido

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Su *et al.*, «Global transportation of plastics and microplastics: A critical review of pathways and influences», *Sci Total Environ*, vol. 831, p. 154884, jul. 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154884.
- [2] Mu. Ramkumar, K. Balasubramani, M. Santosh, y R. Nagarajan, «The plastisphere: A morphometric genetic classification of plastic pollutants in the natural environment», *Gondwana Research*, vol. 108, pp. 4-12, ago. 2022, doi: 10.1016/j.gr.2021.07.004.
- [3] R. C. Thompson, C. J. Moore, F. S. Vom Saal, y S. H. Swan, «Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends», *Phil. Trans. R. Soc. B*, vol. 364, n.º 1526, pp. 2153-2166, jul. 2009, doi: 10.1098/rstb.2009.0053.
- [4] M. Ogonowski, Z. Gerdes, y E. Gorokhova, «What we know and what we think we know about microplastic effects – A critical perspective», *Current Opinion in Environmental Science & Health*, vol. 1, pp. 41-46, feb. 2018, doi: 10.1016/j.coesh.2017.09.001.
- [5] A.-U.-R. Bacha, I. Nabi, M. Zaheer, W. Jin, y L. Yang, «Biodegradation of macro- and micro-plastics in environment: A review on mechanism, toxicity, and future perspectives», *Science of The Total Environment*, vol. 858, p. 160108, feb. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160108.
- [6] J. Yates, M. Deeney, H. White, E. Joy, S. Kalamatianou, y S. Kadiyala, «PROTOCOL: Plastics in the food system: Human health, economic and environmental impacts. A scoping review», *Campbell Systematic Reviews*, vol. 15, n.º 1-2, p. e1033, 2019, doi: 10.1002/cl2.1033.
- [7] T. Geijer, «Plastic packaging in the food sector: Six ways to tackle the plastic puzzle», *ING Think*. <https://think.ing.com/reports/plastic-packaging-in-the-food-sector-six-ways-to-tackle-the-plastic-puzzle/> (accedido 16 de mayo de 2023).
- [8] N. Hirt y M. Body-Malapel, «Immunotoxicity and intestinal effects of nano- and microplastics: a review of the literature», *Part Fibre Toxicol*, vol. 17, n.º 1, p. 57, nov. 2020, doi: 10.1186/s12989-020-00387-7.
- [9] S. Lambert y M. Wagner, «Microplastics Are Contaminants of Emerging Concern in Freshwater Environments: An Overview», en *Freshwater Microplastics : Emerging Environmental Contaminants?*, M. Wagner y S. Lambert, Eds., en *The Handbook of*

Environmental Chemistry. Cham: Springer International Publishing, 2018, pp. 1-23. doi: 10.1007/978-3-319-61615-5_1.

[10] A. I. Osman *et al.*, «Microplastic sources, formation, toxicity and remediation: a review», *Environ Chem Lett*, abr. 2023, doi: 10.1007/s10311-023-01593-3.

[11] X.-F. Wei, M. Bohlén, C. Lindblad, M. Hedenqvist, y A. Hakonen, «Microplastics generated from a biodegradable plastic in freshwater and seawater», *Water Research*, vol. 198, p. 117123, jun. 2021, doi: 10.1016/j.watres.2021.117123.

[12] <https://www.facebook.com/unep>, «UNEP and the Sustainable Development Goals», *UNEP - UN Environment Programme*. <http://www.unep.org/es/node/34181> (accedido 22 de mayo de 2023).

[13] D. Sol, A. Laca, A. Laca, y M. Díaz, «Approaching the environmental problem of microplastics: Importance of WWTP treatments», *Science of The Total Environment*, vol. 740, p. 140016, oct. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140016.

[14] P. Masiá *et al.*, «Bioremediation as a promising strategy for microplastics removal in wastewater treatment plants», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 156, p. 111252, jul. 2020, doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111252.

[15] A. A. Arpia, W.-H. Chen, A. T. Ubando, S. R. Naqvi, y A. B. Culaba, «Microplastic degradation as a sustainable concurrent approach for producing biofuel and obliterating hazardous environmental effects: A state-of-the-art review», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 418, p. 126381, sep. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126381.

[16] S. Shabbir *et al.*, «Periphytic biofilm: An innovative approach for biodegradation of microplastics», *Science of The Total Environment*, vol. 717, p. 137064, may 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137064.

[17] C. Arthur, J. Baker, y H. Bamford, «Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects and Fate of Microplastic Marine Debris», *National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum NOS-OR&R-30*, ene. 2009.

[18] N. B. Hartmann *et al.*, «Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris», *Environ Sci Technol*, vol. 53, n.º 3, pp. 1039-1047, feb. 2019, doi: 10.1021/acs.est.8b05297.

- [19] S. D. Richardson y T. A. Ternes, «Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues», *Anal. Chem.*, vol. 90, n.º 1, pp. 398-428, ene. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b04577.
- [20] P. G. Ryan, C. J. Moore, J. A. Van Franeker, y C. L. Moloney, «Monitoring the abundance of plastic debris in the marine environment», *Phil. Trans. R. Soc. B*, vol. 364, n.º 1526, pp. 1999-2012, jul. 2009, doi: 10.1098/rstb.2008.0207.
- [21] D. Zhang *et al.*, «Plastic pollution in croplands threatens long-term food security», *Glob Change Biol*, vol. 26, n.º 6, pp. 3356-3367, jun. 2020, doi: 10.1111/gcb.15043.
- [22] M. M. Patel, B. R. Goyal, S. V. Bhadada, J. S. Bhatt, y A. F. Amin, «Getting into the Brain: Approaches to Enhance Brain Drug Delivery», *CNS Drugs*, vol. 23, n.º 1, pp. 35-58, 2009, doi: 10.2165/0023210-200923010-00003.
- [23] J. Gerritse, H. A. Leslie, C. A. De Tender, L. I. Devriese, y A. D. Vethaak, «Fragmentation of plastic objects in a laboratory seawater microcosm», *Sci Rep*, vol. 10, n.º 1, p. 10945, jul. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-67927-1.
- [24] N. Tiwari, D. Santhiya, y J. G. Sharma, «Microbial remediation of micro-nano plastics: Current knowledge and future trends», *Environmental Pollution*, vol. 265, p. 115044, oct. 2020, doi: 10.1016/j.envpol.2020.115044.
- [25] Z. Akdogan y B. Guven, «Microplastics in the environment: A critical review of current understanding and identification of future research needs», *Environ Pollut*, vol. 254, n.º Pt A, p. 113011, nov. 2019, doi: 10.1016/j.envpol.2019.113011.
- [26] W. Huang *et al.*, «Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: A review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 405, p. 124187, mar. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124187.
- [27] S. Sharma, S. Basu, N. P. Shetti, M. N. Nadagouda, y T. M. Aminabhavi, «Microplastics in the environment: Occurrence, perils, and eradication», *Chemical Engineering Journal*, vol. 408, p. 127317, mar. 2021, doi: 10.1016/j.cej.2020.127317.
- [28] S. Miri, R. Saini, S. M. Davoodi, R. Pulicharla, S. K. Brar, y S. Magdouli, «Biodegradation of microplastics: Better late than never», *Chemosphere*, vol. 286, n.º Pt 1, p. 131670, ene. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131670.

- [29] A. Menéndez-Manjón *et al.*, «Long-Term Occurrence and Fate of Microplastics in WWTPs: A Case Study in Southwest Europe», *Applied Sciences*, vol. 12, n.º 4, p. 2133, feb. 2022, doi: 10.3390/app12042133.
- [30] M. Pivokonsky, L. Cermakova, K. Novotna, P. Peer, T. Cajthaml, y V. Janda, «Occurrence of microplastics in raw and treated drinking water», *Sci Total Environ*, vol. 643, pp. 1644-1651, dic. 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.102.
- [31] T. Atugoda, H. Piyumali, S. Liyanage, K. Mahatantila, y M. Vithanage, «Fate and Behavior of Microplastics in Freshwater Systems», en *Handbook of Microplastics in the Environment*, T. Rocha-Santos, M. Costa, y C. Mouneyrac, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2020, pp. 1-31. doi: 10.1007/978-3-030-10618-8_42-1.
- [32] P. O. Semcesen y M. G. Wells, «Biofilm growth on buoyant microplastics leads to changes in settling rates: Implications for microplastic retention in the Great Lakes», *Mar Pollut Bull*, vol. 170, p. 112573, sep. 2021, doi: 10.1016/j.marpolbul.2021.112573.
- [33] E. Besseling, J. T. K. Quik, M. Sun, y A. A. Koelmans, «Fate of nano- and microplastic in freshwater systems: A modeling study», *Environ Pollut*, vol. 220, n.º Pt A, pp. 540-548, ene. 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2016.10.001.
- [34] E. B. Jadhav, M. S. Sankhla, R. A. Bhat, y D. S. Bhagat, «Microplastics from food packaging: An overview of human consumption, health threats, and alternative solutions», *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, vol. 16, p. 100608, dic. 2021, doi: 10.1016/j.enmm.2021.100608.
- [35] «Plastics - the Facts 2022 • Plastics Europe», *Plastics Europe*. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/> (accedido 26 de abril de 2023).
- [36] P. J. Landrigan *et al.*, «The Minderoo-Monaco Commission on Plastics and Human Health», *Ann Glob Health*, vol. 89, n.º 1, p. 23, doi: 10.5334/aogh.4056.
- [37] «Plastics strategy». https://environment.ec.europa.eu/strategy/plastics-strategy_en (accedido 22 de mayo de 2023).
- [38] J. Hopewell, R. Dvorak, y E. Kosior, «Plastics recycling: challenges and opportunities», *Phil. Trans. R. Soc. B*, vol. 364, n.º 1526, pp. 2115-2126, jul. 2009, doi: 10.1098/rstb.2008.0311.
- [39] «Plastic pollution is growing relentlessly as waste management and recycling fall short, says OECD». <https://www.oecd.org/environment/plastic-pollution-is-growing->

relentlessly-as-waste-management-and-recycling-fall-short.htm (accedido 26 de abril de 2023).

[40] J. Song, E. Jongmans-Hochschulz, N. Mauder, C. Imirzalioglu, A. Wichels, y G. Gerdts, «The Travelling Particles: Investigating microplastics as possible transport vectors for multidrug resistant E. coli in the Weser estuary (Germany)», *Science of The Total Environment*, vol. 720, p. 137603, jun. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137603.

[41] K. Enders, R. Lenz, C. A. Stedmon, y T. G. Nielsen, «Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10 \mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 100, n.º 1, pp. 70-81, nov. 2015, doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.09.027.

[42] M. K. Viršek, M. N. Lovšin, Š. Koren, A. Kržan, y M. Peterlin, «Microplastics as a vector for the transport of the bacterial fish pathogen species *Aeromonas salmonicida*», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 125, n.º 1-2, pp. 301-309, dic. 2017, doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.08.024.

[43] N. Chaukura *et al.*, «Microplastics in the Aquatic Environment—The Occurrence, Sources, Ecological Impacts, Fate, and Remediation Challenges», *Pollutants*, vol. 1, n.º 2, pp. 95-118, jun. 2021, doi: 10.3390/pollutants1020009.

[44] J. Yuan, J. Ma, Y. Sun, T. Zhou, Y. Zhao, y F. Yu, «Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics», *Science of The Total Environment*, vol. 715, p. 136968, may 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136968.

[45] U. Anand *et al.*, «Biotechnological methods to remove microplastics: a review», *Environ Chem Lett*, feb. 2023, doi: 10.1007/s10311-022-01552-4.

[46] Q. Li, C. Ma, Q. Zhang, y H. Shi, «Microplastics in shellfish and implications for food safety», *Current Opinion in Food Science*, vol. 40, pp. 192-197, ago. 2021, doi: 10.1016/j.cofs.2021.04.017.

[47] Z. Pan, Q. Liu, J. Xu, W. Li, y H. Lin, «Microplastic contamination in seafood from Dongshan Bay in southeastern China and its health risk implication for human consumption», *Environmental Pollution*, vol. 303, p. 119163, jun. 2022, doi: 10.1016/j.envpol.2022.119163.

[48] B. Chai, Q. Wei, Y. She, G. Lu, Z. Dang, y H. Yin, «Soil microplastic pollution in an e-waste dismantling zone of China», *Waste Management*, vol. 118, pp. 291-301, dic. 2020, doi: 10.1016/j.wasman.2020.08.048.

- [49] A. Wahl *et al.*, «Nanoplastic occurrence in a soil amended with plastic debris», *Chemosphere*, vol. 262, p. 127784, ene. 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.127784.
- [50] L. Tian, C. Jinjin, R. Ji, Y. Ma, y X. Yu, «Microplastics in agricultural soils: sources, effects, and their fate», *Current Opinion in Environmental Science & Health*, vol. 25, p. 100311, feb. 2022, doi: 10.1016/j.coesh.2021.100311.
- [51] H. Yu, Y. Zhang, W. Tan, y Z. Zhang, «Microplastics as an Emerging Environmental Pollutant in Agricultural Soils: Effects on Ecosystems and Human Health», *Frontiers in Environmental Science*, vol. 10, 2022, Accedido: 15 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2022.855292>
- [52] A. Amobonye, P. Bhagwat, S. Raveendran, S. Singh, y S. Pillai, «Environmental Impacts of Microplastics and Nanoplastics: A Current Overview», *Frontiers in Microbiology*, vol. 12, 2021, Accedido: 15 de mayo de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.768297>
- [53] Y. Zhang, S. Kang, S. Allen, D. Allen, T. Gao, y M. Sillanpää, «Atmospheric microplastics: A review on current status and perspectives», *Earth-Science Reviews*, vol. 203, p. 103118, abr. 2020, doi: 10.1016/j.earscirev.2020.103118.
- [54] C. E. Enyoh *et al.*, «Microplastics Exposure Routes and Toxicity Studies to Ecosystems: An Overview», *Environ Anal Health Toxicol*, vol. 35, n.º 1, p. e2020004, mar. 2020, doi: 10.5620/eaht.e2020004.
- [55] C. Campanale, C. Massarelli, I. Savino, V. Locaputo, y V. F. Uricchio, «A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health», *Int J Environ Res Public Health*, vol. 17, n.º 4, p. 1212, feb. 2020, doi: 10.3390/ijerph17041212.
- [56] J. N. Hahladakis, C. A. Velis, R. Weber, E. Iacovidou, y P. Purnell, «An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 344, pp. 179-199, feb. 2018, doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.014.
- [57] H. Du, Y. Xie, y J. Wang, «Environmental impacts of microplastics on fishery products: An overview», *Gondwana Research*, vol. 108, pp. 213-220, ago. 2022, doi: 10.1016/j.gr.2021.08.013.

- [58] K. D. Cox, G. A. Covernton, H. L. Davies, J. F. Dower, F. Juanes, y S. E. Dudas, «Correction to Human Consumption of Microplastics», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 54, n.º 17, pp. 10974-10974, sep. 2020, doi: 10.1021/acs.est.0c04032.
- [59] L. C. Jenner, J. M. Rotchell, R. T. Bennett, M. Cowen, V. Tentzeris, y L. R. Sadofsky, «Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy», *Science of The Total Environment*, vol. 831, p. 154907, jul. 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154907.
- [60] H. A. Leslie, M. J. M. Van Velzen, S. H. Brandsma, A. D. Vethaak, J. J. Garcia-Vallejo, y M. H. Lamoree, «Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood», *Environment International*, vol. 163, p. 107199, may 2022, doi: 10.1016/j.envint.2022.107199.
- [61] A. D. Vethaak y J. Legler, «Microplastics and human health», *Science*, vol. 371, n.º 6530, pp. 672-674, feb. 2021, doi: 10.1126/science.abe5041.
- [62] A. Rahman, A. Sarkar, O. P. Yadav, G. Achari, y J. Slobodnik, «Potential human health risks due to environmental exposure to nano- and microplastics and knowledge gaps: A scoping review», *Science of The Total Environment*, vol. 757, p. 143872, feb. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143872.
- [63] E. S. Gruber *et al.*, «To Waste or Not to Waste: Questioning Potential Health Risks of Micro- and Nanoplastics with a Focus on Their Ingestion and Potential Carcinogenicity», *Expo Health*, vol. 15, n.º 1, pp. 33-51, mar. 2023, doi: 10.1007/s12403-022-00470-8.
- [64] J. C. Prata, J. P. da Costa, I. Lopes, A. C. Duarte, y T. Rocha-Santos, «Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects», *Sci Total Environ*, vol. 702, p. 134455, feb. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134455.
- [65] «Biodegradation and Bioremediation - 2nd Edition». <https://www.elsevier.com/books/biodegradation-and-bioremediation/alexander/978-0-08-091637-8> (accedido 9 de enero de 2023).
- [66] A. Rodríguez-Carreón, Y. Ortiz-Rivera, C. C. Hernández-Peña, y C. Figueroa, «Biodegradación de espumas plásticas por larvas de insectos: ¿una estrategia sustentable?», *TIP RECQB*, vol. 24, may 2021, doi: 10.22201/fesz.23958723e.2021.311.
- [67] H. Kundungal, M. Gangarapu, S. Sarangapani, A. Patchaiyappan, y S. P. Devipriya, «Efficient biodegradation of polyethylene (HDPE) waste by the plastic-eating lesser

waxworm (*Achroia grisella*)», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 26, n.º 18, pp. 18509-18519, jun. 2019, doi: 10.1007/s11356-019-05038-9.

[68] Zeenat, A. Elahi, D. A. Bukhari, S. Shamim, y A. Rehman, «Plastics degradation by microbes: A sustainable approach», *Journal of King Saud University - Science*, vol. 33, n.º 6, p. 101538, sep. 2021, doi: 10.1016/j.jksus.2021.101538.

[69] S. Li *et al.*, «Recent advances in biodegradation of emerging contaminants - microplastics (MPs): Feasibility, mechanism, and future prospects», *Chemosphere*, vol. 331, p. 138776, ago. 2023, doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.138776.

[70] T. P. Tourova, D. Sh. Sokolova, T. N. Nazina, D. S. Gruzdev, y A. B. Laptev, «Phylogenetic Diversity of Microbial Communities from the Surface of Polyethylene Terephthalate Materials Exposed to Different Water Environments», *Microbiology*, vol. 89, n.º 1, pp. 96-106, ene. 2020, doi: 10.1134/S0026261720010154.

[71] A. Paço *et al.*, «Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*», *Science of The Total Environment*, vol. 586, pp. 10-15, may 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.017.

[72] H. V. Sowmya, R. Bellibatlu, G. Nayanashree, T. Basaiah, y M. Krishnappa, «Polyethylene Degradation by Fungal Consortium», *International Journal of Environmental Research*, vol. 9, pp. 823-830, jun. 2015.

[73] S. Muenmee, W. Chiemchaisri, y C. Chiemchaisri, «Enhancement of biodegradation of plastic wastes via methane oxidation in semi-aerobic landfill», *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 113, pp. 244-255, sep. 2016, doi: 10.1016/j.ibiod.2016.03.016.

[74] H. Rajandas, S. Parimannan, K. Sathasivam, M. Ravichandran, y L. Su Yin, «A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation», *Polymer Testing*, vol. 31, n.º 8, pp. 1094-1099, dic. 2012, doi: 10.1016/j.polymertesting.2012.07.015.

[75] J.-M. Jeon, S.-J. Park, T.-R. Choi, J.-H. Park, Y.-H. Yang, y J.-J. Yoon, «Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JY0216 isolated from soil grove», *Polymer Degradation and Stability*, vol. 191, p. 109662, sep. 2021, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2021.109662.

[76] S. Y. Park y C. G. Kim, «Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site»,

Chemosphere, vol. 222, pp. 527-533, may 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.159.

[77] H. Liu, X. Wen, Y. Sun, H. Zhang, H. Wang, y J. Wei, «Identification, quantification and biodegradation of microplastics from personal care products and detergents by microorganism», *Journal of Water Process Engineering*, vol. 53, p. 103754, jul. 2023, doi: 10.1016/j.jwpe.2023.103754.

[78] A. Sivan, «New perspectives in plastic biodegradation», *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, n.º 3, pp. 422-426, jun. 2011, doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.013.

[79] J. Peixoto, L. P. Silva, y R. H. Krüger, «Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 324, pp. 634-644, feb. 2017, doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.11.037.

[80] Z. Montazer, M. B. H. Najafi, y D. B. Levin, «Microbial degradation of low-density polyethylene and synthesis of polyhydroxyalkanoate polymers», *Canadian Journal of Microbiology*, nov. 2018, doi: 10.1139/cjm-2018-0335.

[81] S. Skariyachan, A. A. Patil, A. Shankar, M. Manjunath, N. Bachappanavar, y S. Kiran, «Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants», *Polymer Degradation and Stability*, vol. 149, pp. 52-68, mar. 2018, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.01.018.

[82] H. S. Auta, C. U. Emenike, y S. H. Fauziah, «Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation», *Environ Pollut*, vol. 231, n.º Pt 2, pp. 1552-1559, dic. 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2017.09.043.

[83] H. J. Jeon y M. N. Kim, «Isolation of a thermophilic bacterium capable of low-molecular-weight polyethylene degradation», *Biodegradation*, vol. 24, n.º 1, pp. 89-98, feb. 2013, doi: 10.1007/s10532-012-9560-y.

[84] M. Linares, J. L. Pruneda-Paz, L. Reyna, y S. Genti-Raimondi, «Regulation of testosterone degradation in *Comamonas testosteroni*», *J Steroid Biochem Mol Biol*, vol. 112, n.º 1-3, pp. 145-150, nov. 2008, doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.09.011.

[85] S. Farshad, F. Norouzi, M. Aminshahidi, B. Heidari, y A. Alborzi, «Two cases of bacteremia due to an unusual pathogen, *Comamonas testosteroni* in Iran and a review

literature», *J Infect Dev Ctries*, vol. 6, n.º 6, pp. 521-525, jun. 2012, doi: 10.3855/jidc.2215.

[86] J. M. Abraham y G. L. Simon, «Comamonas testosteroni Bacteremia: A Case Report and Review of the Literature», *Infectious Diseases in Clinical Practice*, vol. 15, n.º 4, p. 272, jul. 2007, doi: 10.1097/IPC.0b013e31802ce475.

[87] B. Nwadike, H. Sanuth, y O. Fagade, «Polyethylene degradation potential of Comamonas testosteroni PRC1 and Pseudomonas sp. PRC2 isolated from soil samples of plastic recycling centre, Lagos, Nigeria», mar. 2021.

[88] «Bacteria Has Natural Capacity to Recycle Plastics - Science Connected Magazine». <https://magazine.scienceconnected.org/2023/03/bacteria-has-natural-capacity-to-recycle-plastics/> (accedido 22 de mayo de 2023).

[89] A. Luqman *et al.*, «Microplastic Contamination in Human Stools, Foods, and Drinking Water Associated with Indonesian Coastal Population», *Environments*, vol. 8, n.º 12, Art. n.º 12, dic. 2021, doi: 10.3390/environments8120138.

[90] «Polyolefins • Plastics Europe», *Plastics Europe*. <https://plasticseurope.org/plastics-explained/a-large-family/polyolefins/> (accedido 23 de mayo de 2023).

[91] R. C. Hale, M. E. Seeley, M. J. La Guardia, L. Mai, y E. Y. Zeng, «A Global Perspective on Microplastics», *Journal of Geophysical Research: Oceans*, vol. 125, n.º 1, p. e2018JC014719, 2020, doi: 10.1029/2018JC014719.

[92] U. R. Gurjar *et al.*, «Microplastics in shrimps: a study from the trawling grounds of north eastern part of Arabian Sea», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 28, n.º 35, pp. 48494-48504, sep. 2021, doi: 10.1007/s11356-021-14121-z.

[93] M. Cordova y A. Wahyudi, «MICROPLASTIC IN THE DEEP-SEA SEDIMENT OF SOUTHWESTERN SUMATRAN WATERS», *Marine Research in Indonesia*, vol. 41, pp. 27-36, jun. 2016, doi: 10.14203/mri.v41i1.99.

[94] H. Auta, C. Emenike, J. Barasarathi, y S. H. Fauziah, «Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by Bacillus sp. and Rhodococcus sp. isolated from mangrove sediment», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 127, nov. 2017, doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.11.036.

- [95] S. S. Nielsen, «Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates», en *Food Analysis Laboratory Manual*, S. S. Nielsen, Ed., en Food Science Texts Series. Boston, MA: Springer US, 2010, pp. 47-53. doi: 10.1007/978-1-4419-1463-7_6.
- [96] M. A. Bello, Y. Ruiz-León, J. V. Sandoval-Sierra, S. Rezinciuc, y J. Diéguez-Uribeondo, «Scanning Electron Microscopy (SEM) Protocols for Problematic Plant, Oomycete, and Fungal Samples», *J Vis Exp*, n.º 120, p. 55031, feb. 2017, doi: 10.3791/55031.
- [97] Y. Li, P. Xiao, S. Donnici, J. Cheng, y C. Tang, «Spatial and seasonal distribution of microplastics in various environmental compartments around Sishili Bay of North Yellow Sea, China», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 186, p. 114372, ene. 2023, doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.114372.
- [98] R. M. Blair, S. Waldron, V. R. Phoenix, y C. Gauchotte-Lindsay, «Microscopy and elemental analysis characterisation of microplastics in sediment of a freshwater urban river in Scotland, UK», *Environ Sci Pollut Res*, vol. 26, n.º 12, pp. 12491-12504, abr. 2019, doi: 10.1007/s11356-019-04678-1.
- [99] J. Li, D. Yang, L. Li, K. Jabeen, y H. Shi, «Microplastics in commercial bivalves from China», *Environmental Pollution*, vol. 207, pp. 190-195, dic. 2015, doi: 10.1016/j.envpol.2015.09.018.
- [100] N. Expósito, J. Rovira, J. Sierra, J. Folch, y M. Schuhmacher, «Microplastics levels, size, morphology and composition in marine water, sediments and sand beaches. Case study of Tarragona coast (western Mediterranean)», *Science of The Total Environment*, vol. 786, p. 147453, sep. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.147453.
- [101] J. Chen *et al.*, «Distribution Patterns of Microplastics Pollution in Urban Fresh Waters: A Case Study of Rivers in Chengdu, China», *Int J Environ Res Public Health*, vol. 19, n.º 15, p. 8972, jul. 2022, doi: 10.3390/ijerph19158972.
- [102] E. Martí, C. Martín, M. Galli, F. Echevarría, C. M. Duarte, y A. Cózar, «The Colors of the Ocean Plastics», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 54, n.º 11, pp. 6594-6601, jun. 2020, doi: 10.1021/acs.est.9b06400.
- [103] X. Zhao, J. Wang, K. M. Yee Leung, y F. Wu, «Color: An Important but Overlooked Factor for Plastic Photoaging and Microplastic Formation», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 56, n.º 13, pp. 9161-9163, jul. 2022, doi: 10.1021/acs.est.2c02402.

- [104] A. Rodríguez-Seijo y R. Pereira, «Morphological and Physical Characterization of Microplastics», en *Comprehensive Analytical Chemistry*, 2017, pp. 49-66. doi: 10.1016/bs.coac.2016.10.007.
- [105] M. Mistri, M. Scoponi, T. Granata, L. Moruzzi, F. Massara, y C. Munari, «Types, occurrence and distribution of microplastics in sediments from the northern Tyrrhenian Sea», *Mar Pollut Bull*, vol. 153, p. 111016, abr. 2020, doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111016.
- [106] J. R. Jambeck *et al.*, «Marine pollution. Plastic waste inputs from land into the ocean», *Science*, vol. 347, n.º 6223, pp. 768-771, feb. 2015, doi: 10.1126/science.1260352.
- [107] S. Ye y A. L. Andrady, «Fouling of floating plastic debris under Biscayne Bay exposure conditions», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 22, n.º 12, pp. 608-613, dic. 1991, doi: 10.1016/0025-326X(91)90249-R.
- [108] C. C. Gaylarde, M. P. de Almeida, C. V. Neves, J. A. B. Neto, y E. M. da Fonseca, «The Importance of Biofilms on Microplastic Particles in Their Sinking Behavior and the Transfer of Invasive Organisms between Ecosystems», *Micro*, vol. 3, n.º 1, Art. n.º 1, mar. 2023, doi: 10.3390/micro3010022.
- [109] V. Balasubramanian *et al.*, «High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India», *Lett Appl Microbiol*, vol. 51, n.º 2, pp. 205-211, ago. 2010, doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02883.x.
- [110] J. Gong, T. Kong, Y. Li, Q. Li, Z. Li, y J. Zhang, «Biodegradation of Microplastic Derived from Poly(ethylene terephthalate) with Bacterial Whole-Cell Biocatalysts», *Polymers*, vol. 10, n.º 12, p. 1326, nov. 2018, doi: 10.3390/polym10121326.
- [111] 1 Faculty of Chemical and Petroleum Engineering, University of Tabriz, Tabriz, Iran *et al.*, «Biodegradation of high density polyethylene using *Streptomyces* species», *JCLM*, pp. 474-479, oct. 2017, doi: 10.12980/jclm.5.2017J7-94.
- [112] Q. Sun, S.-Y. Ren, y H.-G. Ni, «Effects of microplastic sorption on microbial degradation of halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in water», *Environ Pollut*, vol. 313, p. 120238, nov. 2022, doi: 10.1016/j.envpol.2022.120238.
- [113] J. Li, F. Luo, D. Chu, H. Xuan, y X. Dai, «Complete degradation of dimethyl phthalate by a *Comamonas* testosterone strain», *J Basic Microbiol*, vol. 57, n.º 11, pp. 941-949, nov. 2017, doi: 10.1002/jobm.201700296.

- [114] A. Tareen, S. Saeed, A. Iqbal, R. Batool, y N. Jamil, «Biodeterioration of Microplastics: A Promising Step towards Plastics Waste Management», *Polymers (Basel)*, vol. 14, n.º 11, p. 2275, jun. 2022, doi: 10.3390/polym14112275.
- [115] Y.-N. Han *et al.*, «Greater Biofilm Formation and Increased Biodegradation of Polyethylene Film by a Microbial Consortium of *Arthrobacter* sp. and *Streptomyces* sp.», *Microorganisms*, vol. 8, n.º 12, p. 1979, dic. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8121979.
- [116] P. Sooriyakumar *et al.*, «Biofilm formation and its implications on the properties and fate of microplastics in aquatic environments: A review», *Journal of Hazardous Materials Advances*, vol. 6, p. 100077, may 2022, doi: 10.1016/j.hazadv.2022.100077.
- [117] R. Zafar, S. Park, y C. Kim, «Surface Modification of Polyethylene Microplastic Particles during the Aqueous-phase Ozonation Process», *Environmental Engineering Research*, vol. 26, oct. 2020, doi: 10.4491/eer.2020.412.
- [118] S. Liu, M. Jian, L. Zhou, y W. Li, «Distribution and characteristics of microplastics in the sediments of Poyang Lake, China», *Water Science and Technology*, vol. 79, n.º 10, pp. 1868-1877, may 2019, doi: 10.2166/wst.2019.185.
- [119] W. J. Wolfgang, «Chapter 14 - Chemical analysis techniques for failure analysis: Part 1, common instrumental methods», en *Handbook of Materials Failure Analysis with Case Studies from the Aerospace and Automotive Industries*, A. S. H. Makhlof y M. Aliofkhaezai, Eds., Boston: Butterworth-Heinemann, 2016, pp. 279-307. doi: 10.1016/B978-0-12-800950-5.00014-4.
- [120] B. Liu *et al.*, «Process analysis of microplastic degradation using activated PMS and Fenton reagents», *Chemosphere*, vol. 298, p. 134220, jul. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134220.
- [121] Y. Yao, M. Glamoclija, A. Murphy, y Y. Gao, «Characterization of microplastics in indoor and ambient air in northern New Jersey», *Environmental Research*, vol. 207, p. 112142, may 2022, doi: 10.1016/j.envres.2021.112142.
- [122] H. Nakatani *et al.*, «Rapid oxidative fragmentation of polypropylene with pH control in seawater for preparation of realistic reference microplastics», *Scientific Reports*, vol. 13, mar. 2023, doi: 10.1038/s41598-023-31488-w.
- [123] P. Asgari, O. Moradi, y B. Tajeddin, «The effect of nanocomposite packaging carbon nanotube base on organoleptic and fungal growth of Mazafati brand dates», *Int Nano Lett*, vol. 4, n.º 1, p. 98, mar. 2014, doi: 10.1007/s40089-014-0098-3.

- [124] X. Chen, M. Xu, L. Yuan, G. Huang, X. Chen, y W. Shi, «Degradation degree analysis of environmental microplastics by micro FT-IR imaging technology», *Chemosphere*, vol. 274, p. 129779, jul. 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129779.
- [125] M. Celik, H. Nakano, K. Uchida, A. Isobe, y H. Arakawa, «Comparative evaluation of the carbonyl index of microplastics around the Japan coast», *Marine Pollution Bulletin*, vol. 190, p. 114818, may 2023, doi: 10.1016/j.marpolbul.2023.114818.
- [126] N. Ojha *et al.*, «Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization», *Sci Rep*, vol. 7, p. 39515, ene. 2017, doi: 10.1038/srep39515.

8. ANEXO

1. Preparación del medio de cultivo, Nutrient Broth (NB)

Tabla I: Composición del medio de Nutrient Broth II para *Comamonas testosteroni*

Componentes	Concentración g/L
Extracto de carne (VWR)	1
Extracto de levadura (VWR)	2
Peptona (VWR)	5
NaCl	5
Agar (VWR) (para medios sólidos)	20
Agua destilada	Hasta 1 Litro

2. Preparación de las placas de agar NB

La preparación de las placas de agar Nutrient Broth se llevó a cabo según las indicaciones en la tabla I y con agar a un 2% (20g/L). Este medio sólido fue empleado para la preparación de las placas empleadas para el crecimiento de *C. tesosteroni* y el recuento en placa.

Preparación de las placas:

1. Pesar los componentes indicados en la tabla I con una balanza de precisión, y añadir al volumen requerido de agua destilada
2. Mezclar mediante un agitador mecánico de laboratorio para disolver completamente todos los componentes y transferir a un recipiente adecuado para el autoclave.
3. Autoclavar a 121 °C durante 20 min.
4. Dejar enfriar suficiente el recipiente para su manejo, y verter aproximadamente 20 mL del medio líquido en una placa Petri estéril dentro de una cabina de flujo laminar asegurando antes condiciones estériles.
5. Dejar enfriar las placas hasta solidificarse el medio, cerrar con las tapas y mantener sellados en una cámara de frío.