

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**“Biodegradación de microplásticos  
procedentes de envases alimentarios  
empleando *Paenibacillus macquarensis*”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**DAVID VALDÉS GARCÍA**

**JUNIO, 2024**



## Agradecimientos

Quiero dar las gracias a mis tutoras del Trabajo de Fin de Máster, Adriana Laca y Amanda Laca por la atención y el tiempo que han dedicado a ayudarme a realizar este trabajo. Además, agradezco a todos los miembros del Grupo de Tecnología de Bioprocesos y Reactores de la Universidad de Oviedo por acogerme tan bien y transmitirme sus conocimientos y experiencia dentro y fuera del laboratorio.

También quiero dar las gracias a mis padres y a mi hermano por apoyarme durante toda mi vida académica y animarme mientras he realizado este trabajo.

## Índice

Resumen .....	1
Abstract.....	2
Lista de figuras .....	3
Lista de tablas .....	5
1. Introducción.....	6
2. Consideraciones teóricas .....	10
2.1. Envases plásticos alimentarios .....	10
2.2. Origen, clasificación y dispersión de los microplásticos.....	12
2.3. Efecto de los microplásticos sobre el medioambiente y la salud humana.....	13
2.4. Proceso de biodegradación de los microplásticos .....	15
3. Material y métodos .....	19
3.1. Preparación de los microplásticos modelo .....	19
3.2. Cultivo y preparación del preinóculo de <i>Paenibacillus macquarensis</i> .....	20
3.3. Ensayos de biodegradación .....	20
3.4. Análisis gravimétrico.....	21
3.5. Crecimiento de <i>Paenibacillus macquarensis</i> .....	22
3.6. Cinética de biodegradación .....	24
3.7. Cuantificación de carbohidratos totales.....	24
3.8. Medida de pH .....	25
3.9. Análisis de los microplásticos por estereomicroscopía, FTIR y SEM .....	25
4. Resultados y discusión .....	28
4.1. Caracterización del crecimiento de <i>Paenibacillus macquarensis</i> .....	28
4.2. Mecanismo de biodegradación de los MPs con <i>Paenibacillus macquarensis</i> .....	29
4.2.1. Experimento de biodegradación a 10°C .....	29
4.2.2. Experimento de biodegradación a 20 °C .....	33

4.2.3.	Experimento de biodegradación a 30°C .....	38
4.2.4.	Comparación de los distintos ensayos de biodegradación .....	42
4.3.	Cambios en la composición de los MPs .....	44
4.4.	Observación de la estructura de los MPs.....	47
5.	Conclusiones.....	50
6.	Abreviaturas y símbolos .....	51
7.	Bibliografía.....	52

## Resumen

Debido al uso generalizado de materiales plásticos en diversos sectores, incluido el envasado de alimentos, los residuos derivados se encuentran ampliamente extendidos en el medioambiente. En particular, la liberación de pequeñas partículas (0,1  $\mu\text{m}$  - 5 mm) conocidas como microplásticos (MPs) supone un riesgo tanto para los ecosistemas como para la salud humana. Se ha detectado contaminación por MPs en la mayoría de los ecosistemas terrestres y acuáticos, de manera que cada vez existe más interés en encontrar estrategias que permitan su eliminación. En particular, interesa investigar tratamientos que permitan su degradación, siendo de gran interés conocer la capacidad de los microorganismos para biodegradar estos microcontaminantes.

Concretamente, este trabajo analiza la capacidad de *Paenibacillus macquarensis*, bacteria psicotrofa que habita en ambientes contaminados, para biodegradar microplásticos de polietileno de alta densidad (PEAD), uno de los polímeros más abundantes en los envases alimentarios. Asimismo, se ha ensayado el efecto de la temperatura, y partiendo de una concentración inicial de MPs de 500 mg/L se obtuvo una disminución en peso del 7,00%, 11,00% y 13,00 % al cabo de 30 días de incubación a 10°C, 20°C y 30°C, respectivamente. Además, mediante SEM y FTIR se observaron cambios en la estructura y composición de la superficie de los MPs, que corroboran el proceso de biodegradación de los MPs por parte de estas bacterias. Los ensayos realizados muestran que *P. macquarensis* es capaz de biodegradar cantidades apreciables de MPs de PEAD y que en el proceso de biodegradación influyen notablemente las condiciones ambientales. Las potenciales aplicaciones de los microorganismos para combatir la problemática que causa la contaminación por MPs son evidentes, aunque resulta necesario llevar a cabo más investigaciones al respecto.

## Abstract

Due to the wide use of plastic materials in various sectors, including food packaging, plastic waste is widespread in the environment. In particular, the release of small particles (0.1  $\mu\text{m}$  - 5 mm) known as microplastics (MPs) poses a risk to both ecosystems and human health. MPs contamination has been detected in most terrestrial and aquatic ecosystems, so there is increasing interest in finding strategies to remove them. In particular, the investigation of treatments that allow their degradation is of great interest to determine the capacity of microorganisms to biodegrade these micropollutants.

Specifically, this work analyses the capacity of *Paenibacillus macquarensis*, a psychrotrophic bacterium that lives in contaminated environments, to biodegrade high-density polyethylene (HDPE) microplastics, one of the most abundant polymers in food packaging. The effect of temperature has also been tested, starting from an initial MPs concentration of 500 mg/L, where a decrease in weight of 7.00%, 11.00% and 13.00% was obtained after 30 days of incubation at 10°C, 20°C and 30°C, respectively. Furthermore, changes in the structure and composition of the MPs surface were observed by SEM and FTIR, which corroborate the process of MPs biodegradation by these bacteria. The tests carried out show that *P. macquarensis* is able to biodegrade appreciable amounts of HDPE MPs and that the biodegradation process is strongly influenced by environmental conditions. The potential applications of microorganisms to combat the problem of MPs pollution are evident, although further research is needed.

## Lista de figuras

Figura 1. Producción mundial de residuos plásticos (millones de toneladas) (Statista, 2024).....	11
Figura 2. Principales fuentes de residuos plásticos, origen de los microplásticos, dispersión y posibles alternativas de tratamiento (Arpia et al., 2021).....	12
Figura 3. Interacciones de los microplásticos en los sistemas terrestre y acuático (Behera & Das, 2023). ....	13
Figura 4. Mecanismo del proceso de degradación y metabolismo de los microplásticos por bacterias (Emisha et al., 2024). ....	16
Figura 5. Esquema de la biodegradación de MPs y factores que afectan al proceso (Newrick et al., 2024). ....	18
Figura 6. Tapones de PEAD de los que se obtuvieron los MPs (a) y tamiz para separar la fracción inicial de plástico triturado (b). ....	19
Figura 7. Aspecto del filtro con los MPs retenidos una vez secos. ....	22
Figura 8. Matraces incubados en un experimento de biodegradación de MPs. ....	23
Figura 9. Recta de calibrado del método del fenol-sulfúrico representando la concentración de los patrones de glucosa (mg/L) frente a su absorbancia medida a 492 nm. ....	25
Figura 10. Espectrómetro FTIR Spotlight 200i de Perkin Elmer. ....	26
Figura 11. Microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL-6610LV.....	27
Figura 12. Crecimiento de <i>Paenibacillus macquarensis</i> en ausencia de MPs a 20 °C y 30 °C. ....	28
Figura 13. Representación gráfica de las tasas de crecimiento específicas máximas de <i>P. macquarensis</i> sin MPs a a) 20 °C y b) 30 °C. ....	29
Figura 14. Evolución de la concentración de MPs, en g/L, durante el ensayo de biodegradación a 10 °C.....	30
Figura 15. Cinética de degradación de primer orden de los MPs a 10°C.....	31
Figura 16. Crecimiento de <i>Paenibacillus macquarensis</i> durante el ensayo de degradación a 10 °C. ....	32
Figura 17. Evolución de la concentración de azúcares, en ppm, durante el experimento de biodegradación a 10 °C.....	32
Figura 18. Evolución del pH durante el experimento de biodegradación a 10 °C.....	33

Figura 19. Evolución de la concentración de MPs, en g/L, durante el ensayo de biodegradación a 20 °C.....	34
Figura 20. Cinética de degradación de primer orden de los MPs a 20 °C. ....	34
Figura 21. Crecimiento de <i>Paenibacillus macquarensis</i> durante el ensayo de degradación a 20 °C. ....	35
Figura 22. Tasa de crecimiento específica máxima para <i>P. macquarensis</i> a 20 °C en presencia de MPs. ....	36
Figura 23. Evolución de la concentración de azúcares, en ppm, durante el experimento de biodegradación a 20 °C.....	37
Figura 24. Evolución del pH durante el experimento de biodegradación a 20 °C.....	37
Figura 25. Evolución de la concentración de MPs, en g/L, durante el ensayo de biodegradación a 30 °C.....	38
Figura 26. Cinéticas de degradación de los MPs a 30 °C.....	39
Figura 27. Crecimiento de <i>Paenibacillus macquarensis</i> durante el ensayo de degradación a 30 °C. ....	39
Figura 28. Tasa de crecimiento específica máxima para <i>P. macquarensis</i> a 30 °C en presencia de MPs. ....	40
Figura 29. Evolución de la concentración de azúcares, en ppm, durante el experimento de biodegradación a 30 °C.....	41
Figura 30. Evolución del pH durante el experimento de biodegradación a 30 °C.....	41
Figura 31. Evolución de la concentración de MPs, en g/L, para los experimentos de biodegradación realizados a diferentes temperaturas. ....	43
Figura 32. Crecimiento de <i>Paenibacillus macquarensis</i> durante los ensayos de biodegradación realizados a diferentes temperaturas. ....	44
Figura 33. Evolución de la concentración de azúcares, en ppm, durante los experimentos de biodegradación realizados a diferentes temperaturas. ....	44
Figura 34. Espectro FTIR de los MPs control. ....	45
Figura 35. Imágenes al estereomicroscopio de los MPs de PEAD antes (a) y después (b) del ensayo de biodegradación a 30 °C. ....	47
Figura 36. Micrográficas electrónicas de barrido de los MPs de PEAD tomados al inicio (a) y al final de los ensayos de biodegradación a 10°C (b), 20°C (c) y 30°C (d).....	48



## Lista de tablas

Tabla 1. Principales bacterias empleadas en los estudios de degradación de microplásticos (Li et al., 2023; Newrick et al., 2024). .....	17
Tabla 2. Índices carbonílicos y vinílicos calculados para los MPs muestreados. ....	46
Tabla 3. Análisis elemental normalizado de la composición en carbono y oxígeno de los MPs.....	47

## 1. Introducción

En los últimos años, el uso de plásticos se ha incrementado notablemente, convirtiéndose en un material esencial para la fabricación de una gran variedad de productos debido a su relativo bajo coste y la facilidad asociada a su producción. Desde 2020, se producen más de 367 millones de toneladas de plásticos anualmente a nivel global, y se prevé que esta cifra aumente de manera exponencial en los próximos 20 años (Li et al., 2023; Xu et al., 2020). En concreto, el uso de polímeros sintéticos derivados del petróleo ha crecido un 12 % a nivel mundial en la última década, lo que en la actualidad da lugar a que se generen más de 60 millones de toneladas de residuos que son desechados antes de la finalización de su ciclo de vida cada año (Arpia et al., 2021; Pathak & Navneet, 2023).

Gran parte de la producción global de plásticos tiene como fin el envasado de otros productos, siendo más del 40% del plástico utilizado en embalaje empleado para la producción de envases primarios de alimentos, muchos de ellos de un solo uso, de manera que la industria alimentaria es responsable de la generación de aproximadamente el 60% de los residuos plásticos a nivel mundial (Yates et al., 2019). Así, el sector agroalimentario es el principal causante a nivel mundial de la contaminación por plásticos. En Europa, de la demanda total de materiales plásticos, más de 20 millones de toneladas son empleadas cada año en la producción de embalajes, y se estima que unas 8,2 millones de toneladas son utilizadas para la producción de envases alimentarios (Geijer, 2019). Concretamente, el 37% de todos los alimentos comercializados en la Unión Europea se presentan envueltos en plásticos, y las nuevas tendencias en el sector alimentario, como la venta de platos preparados o para llevar, conllevan el incremento de estas cifras, en contraposición con las regulaciones cada vez más exigentes en materia de reciclaje y empleo de plásticos de un solo uso que se están imponiendo en el sector por parte de las instituciones europeas (Schweitzer et al., 2018).

A pesar de las ventajas asociadas al empleo de plásticos en la industria alimentaria, por ejemplo, la mejora de la resistencia física y durabilidad de los productos, los residuos generados, tanto a partir de los procesos de producción como derivados de su uso resultan perjudiciales para el medioambiente. Si no son gestionados adecuadamente, la dificultad y el tiempo necesario para la degradación de este tipo de materiales en la naturaleza suponen graves problemas de contaminación. La inapropiada gestión de estos residuos

que, en muchas ocasiones es llevada a cabo, se refleja en que menos de un 5% de los restos de materiales plásticos generados mundialmente son reciclados, resultando en su progresiva acumulación en los entornos naturales, donde van a parar a océanos, ríos y suelos, dañando la fauna y flora de los distintos ecosistemas contaminados (Bacha et al., 2023).

El riesgo que supone este tipo de contaminación no solo es debido a su forma macroscópica, sino que también es causado por las partículas conocidas como microplásticos (MPs), que en comparación con los plásticos de mayor tamaño pueden conllevar más riesgos, tanto para el medioambiente como para la salud humana. Además, la identificación, caracterización y cuantificación de estas micropartículas resulta mucho más complicado; siendo también su eliminación del medio mucho más difícil que en el caso de los macroplásticos (Auta et al., 2018; Lambert & Wagner, 2018). La detección de los MPs en una gran diversidad de ecosistemas, y especialmente en los medios acuáticos, ha generado una creciente preocupación sobre estos microcontaminantes que en la última década han incrementado significativamente su presencia en el medio natural, concentrándose mayoritariamente en las masas de agua, desde donde se incorporan fácilmente a la cadena trófica y, por tanto, afectando irremediablemente al ser humano (Osman et al., 2023).

Se han publicado numerosos estudios que profundizan en los problemas ocasionados por los microplásticos en el medioambiente. Por una parte, con el fin de combatir los efectos que conlleva la producción y el uso de productos plásticos se han llevado a cabo numerosos estudios con el objetivo de desarrollar bolsas, envoltorios y envases alimentarios biodegradables, y, por otra, diversas investigaciones se centran en la búsqueda de alternativas para la eliminación de estas micropartículas, mediante procesos físicos, químicos y/o biológicos (Wei et al., 2021).

Gran parte de los trabajos publicados en este tema han estudiado los procesos de eliminación de MPs en el contexto de las etapas llevadas a cabo en las plantas de tratamiento de aguas residuales, analizando los procesos físicos de filtración o sedimentación. No obstante, estas técnicas únicamente consiguen separar las partículas de MPs, pero no eliminarlas, quedando acumuladas en los lodos de depuradora generados,

cuyo uso posterior como enmienda orgánica en suelos agrícolas favorece la liberación de los MPs al medioambiente (Masiá et al., 2020; Sol et al., 2020; Sol Sánchez et al., 2020).

Por otro lado, los procesos de biodegradación para el tratamiento de medios contaminados por microplásticos han resultado ser opciones muy prometedoras. Estos tratamientos se basan en la acción de los microorganismos capaces de degradar los MPs como consecuencia de su propia actividad metabólica, sin generar otros residuos, y han demostrado ser alternativas potencialmente viables desde un punto de vista económico y medioambiental (Arpia et al., 2021). Se han desarrollado diversas investigaciones acerca de las posibilidades de biorremediación de lugares contaminados por estas micropartículas mediante la acción de las comunidades de microorganismos que pueden estar presentes en los ecosistemas naturales, ya que se ha demostrado que algunas de las bacterias aisladas de estos suelos y aguas son capaces de utilizar los microplásticos como fuente de carbono (Park & Kim, 2019; Singh & Wahid, 2015).

Sin embargo, pese al incipiente interés en estos procesos de degradación de MPs llevados a cabo por microorganismos, las estrategias de biorremediación y los resultados que han sido logrados, todavía falta información en lo que respecta a la interacción entre microorganismos y MPs, tanto en el medio natural, como en condiciones controladas, debido a la variedad de factores que influyen en estos procesos. Se ha comprobado que para una óptima biodegradación de los MPs, se necesita de la participación de ciertos microorganismos específicos con el metabolismo y los enzimas necesarios, además de que las condiciones ambientales, como la temperatura o el pH, deben ser las adecuadas; también influyen las propias características fisicoquímicas de los MPs a degradar, como son la composición, la estructura o la morfología de estos polímeros, entre otras muchas (Arpia et al., 2021; Gong et al., 2018).

De acuerdo a lo comentado anteriormente, el objetivo de este Trabajo de Fin de Máster ha sido estudiar en condiciones controladas el proceso de biodegradación de microplásticos de polietileno de alta densidad (PEAD) procedentes de envases alimentarios mediante el empleo de una bacteria modelo, *Paenibacillus macquarensis*, con el fin de conocer el interés que puede presentar este microorganismo en relación a la

problemática de los MPs. Este objetivo general se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el efecto de la presencia de los MPs en el crecimiento de *Paenibacillus macquarensis*.
- Analizar el proceso de biodegradación de los MPs con el tiempo empleando *P. macquarensis*.
- Evaluar el efecto de la temperatura en la biodegradación bacteriana de los MPs.
- Investigar los cambios superficiales experimentados por los microplásticos durante el proceso de biodegradación.

## 2. Consideraciones teóricas

### 2.1. Envases plásticos alimentarios

El envasado de los alimentos es necesario y muy importante para su mantenimiento en condiciones óptimas y seguras para su consumo posterior; este previene de su deterioro a lo largo de la cadena de distribución, protegiendo los productos durante su transporte y almacenamiento y alargando su vida útil. Además, facilita la trazabilidad y la obtención de información sobre los productos por medio del etiquetado (Dörnyei et al., 2023; González-López et al., 2023).

Sin embargo, el empleo excesivo en el sector alimentario de materiales de embalaje, gran parte de ellos plásticos, ha derivado en un problema a escala mundial, incrementando la cantidad de residuos que deben ser gestionados, lo que tiene efectos tanto a nivel económico como medioambiental. Además, el proceso de producción de estos envases supone el agotamiento de los recursos naturales de origen fósil en el caso de los materiales plásticos derivados del petróleo, una fuente no renovable, cuyo uso también implica problemas a largo plazo (Balasubramanian et al., 2010; Jadhav et al., 2021).

La producción global de plástico sigue creciendo exponencialmente en la industria envasadora y se estima que llega a generar más del 40% de los residuos plásticos producidos anualmente (Figura 1) (Statista, 2024). Los compuestos utilizados en la producción de envases alimentarios son de mayor a menor frecuencia el tereftalato de polietileno (PET), el polietileno de alta densidad (PEAD), que representa un 65 % de los residuos plásticos generados a nivel mundial, el policloruro de vinilo (PVC), el polietileno de baja densidad (PEBD), el polipropileno (PP) y el poliestireno (PS) (Pathak & Navneet, 2023; Ramkumar et al., 2022). Su empleo en el embalaje es el destino de casi la mitad del plástico que se produce mundialmente, debido a la multitud de aplicaciones que presentan y a su corto período de vida útil (Landrigan et al., 2023).

Los desechos plásticos procedentes del envasado de alimentos, si no se gestionan correctamente, pueden permanecer en el medioambiente mucho más tiempo que los productos que son contenidos en ellos. Además, el empleo de materiales plásticos para el envasado de alimentos puede estar asociado con problemas de salud para las personas que los consumen, debido a la liberación de partículas plásticas en los alimentos a través del

contacto directo con el empaquetado. Esto resulta en la ingesta directa de microplásticos presentes en los alimentos, así como de otras sustancias cuyos efectos sobre la salud aún son desconocidos (Jadhav et al., 2021; Sharma et al., 2021).

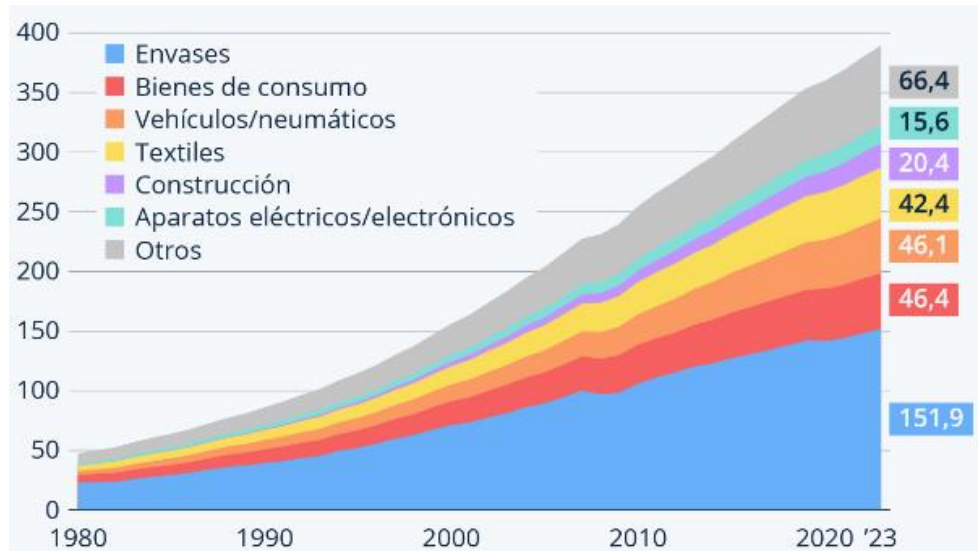


Figura 1. Evolución de la producción mundial de residuos plásticos (millones de toneladas) (Statista, 2024).

Aunque en el contexto actual de la economía circular, que busca un uso sostenible de los plásticos, se potencia el reciclaje y la reutilización de los envases alimentarios y, a pesar de que las diversas regulaciones a nivel europeo sobre plásticos de un solo uso son cada vez más restrictivas, es destacable que las cantidades recicladas son muy inferiores en los plásticos que en otros tipos de material, tales como el vidrio, el papel o ciertos metales, que también se emplean en el envasado de alimentos y bebidas. Esto es debido a varios motivos, entre los que debe señalarse que, dado que existen multitud de polímeros sintéticos diferentes que pueden ser utilizados, resulta muy difícil su recogida y separación, así como la clasificación posterior de estos materiales en las plantas de reciclaje. Además, muchas veces el reciclaje de los envases de alimentos es un proceso más costoso que la producción de plástico a partir de materias primas vírgenes, debido a los costes asociados a la recogida, separación y postratamiento de los residuos generados. Se estima que solamente un 9 % de los envases desechables de un solo uso llegan a ser reciclados, lo que hace patente que, para evitar la generación de MPs, es fundamental gestionar adecuadamente estos materiales y sus residuos (Hopewell et al., 2009).

## 2.2. Origen, clasificación y dispersión de los microplásticos

Los MPs se definen como partículas de plástico con un tamaño entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 5 mm generadas fundamentalmente como resultado del uso y la degradación de los materiales plásticos de mayor tamaño, así como de su adición de manera intencionada a productos de uso cotidiano, sobre todo del sector cosmético (Auta et al., 2018; Gong et al., 2018).

Así, se puede hablar de MPs primarios y secundarios. A la categoría de primarios pertenecen aquellos que se originan de forma directa durante el proceso productivo, es decir, los que se fabrican específicamente para su posterior adición a otros productos, y también aquellos formados como subproductos de la producción y el uso de ciertos materiales plásticos, como los textiles. Mientras que los MPs secundarios se generan por el deterioro y la degradación de los materiales plásticos de mayor tamaño, como envases o botellas, que debido a procesos mecánicos y biológicos por la exposición a la intemperie son fragmentados, liberando estas micropartículas al medioambiente (Hossain et al., 2023; Li et al., 2023). En la Figura 2, se muestra esquemáticamente el proceso de generación de ambos tipos de MPs en función de su origen, así como sus posibles destinos.



Figura 2. Principales fuentes de residuos plásticos, origen de los microplásticos, dispersión y posibles alternativas de tratamiento (Arpia et al., 2021).



Los MPs liberados acaban en el medio natural, acumulándose en suelos o masas de agua, o bien llegan a las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), a través de las emisiones industriales y urbanas o con el vertido de macroplásticos que son fragmentados por la erosión del agua y el aire. Su pequeño tamaño, alta estabilidad y durabilidad son las características que hacen que los microplásticos sean perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana. Además, su superficie sirve como medio para la formación de biopelículas de microorganismos y/o compuestos tóxicos que quedan adsorbidos sobre ellos (Hossain et al., 2023; Semcesen & Wells, 2021; Sharma et al., 2021).

### 2.3. Efecto de los microplásticos sobre el medioambiente y la salud humana

La cada vez mayor presencia de estas partículas plásticas en diversos ecosistemas a escala global es en la actualidad una gran preocupación ambiental. Dado que su comportamiento y efectos difieren de los plásticos de mayor tamaño, las implicaciones de la contaminación por microplásticos aún son desconocidas, especialmente considerando su presencia tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos e incluso en la atmósfera (Chaukura et al., 2021; H. Liu et al., 2023).

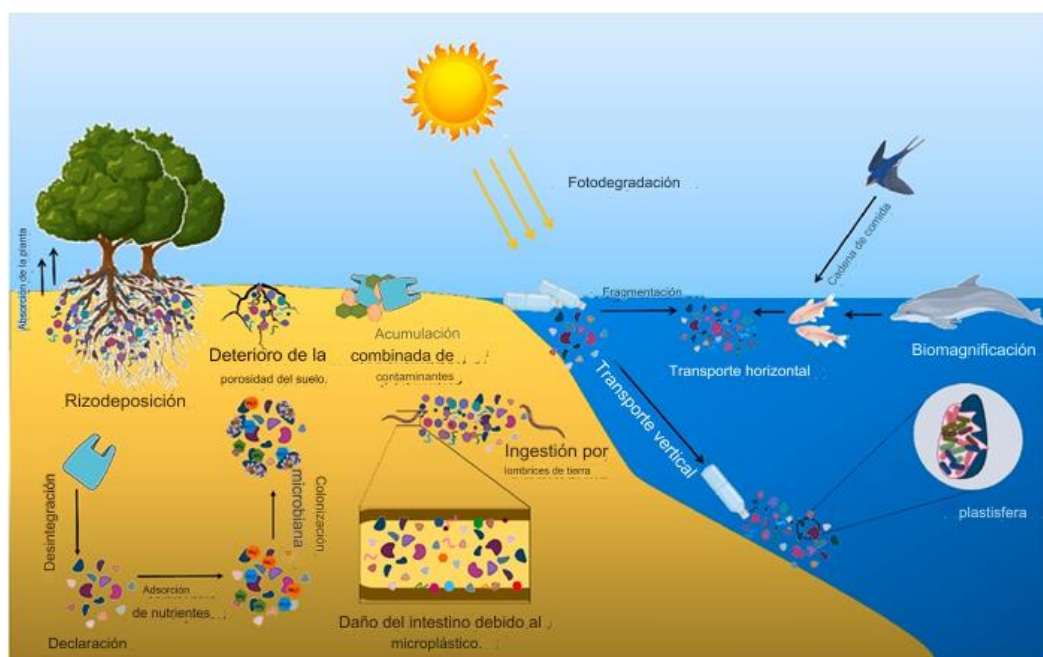


Figura 3. Interacciones de los microplásticos en los sistemas terrestre y acuático (Behera & Das, 2023).

Para tratar de remediar esto, la mayoría de los estudios que actualmente se llevan a cabo sobre la contaminación por MPs se centran en la interacción de los MPs con los diferentes ecosistemas, principalmente en los entornos marinos, ya que por la magnitud en que se

extienden en las masas de agua naturales, pueden llegar a impactar notablemente en la fauna y la flora presentes en estos medios. En la Figura 3, se resumen los efectos que pueden tener los MPs en los componentes abióticos y bióticos del medioambiente.

Tal como se ha indicado previamente, los MPs son capaces de actuar como vectores de metales pesados, compuestos tóxicos y otros contaminantes que son adsorbidos sobre su superficie, facilitando su transporte, incluso a largas distancias, y favoreciendo su biodisponibilidad, introduciéndolos junto a ellos mismos en la cadena trófica. Por otra parte, la propia degradación de los residuos plásticos libera algunos de los compuestos empleados como aditivos en su proceso de fabricación, que pueden resultar tóxicos también. Además, los MPs también pueden ser un soporte adecuado para el crecimiento de microorganismos en su superficie en forma de biopelículas que contengan bacterias u hongos, contribuyendo a su dispersión a gran escala (Akdogan & Guven, 2019; Huang et al., 2021; Joo et al., 2021; Sharma et al., 2021).

El reducido tamaño de los MPs conduce a su entrada en la cadena trófica por distintas vías. Algunos de los organismos que ocupan las primeras posiciones de consumidores, como el zooplancton, ingieren de manera natural materia orgánica particulada, por lo que confunden los MPs con sus fuentes de alimento, causando su incorporación en la cadena trófica. Una vez que han sido ingeridos, los MPs pueden generar diversas patologías; así, diversos estudios realizados en organismos acuáticos, como moluscos y peces, concluyen que estos contaminantes pueden obstruir su sistema digestivo, generarles problemas en el crecimiento y la reproducción o producirles daño en diferentes órganos, llegando incluso a causarles la muerte. Por tanto, el aumento de la presencia de los MPs puede afectar notablemente a la biodiversidad de los ecosistemas acuáticos (Arpia et al., 2021; Li et al., 2021; Pan et al., 2022)

Por otro lado, en los entornos terrestres, estas micropartículas pueden modificar los parámetros fisicoquímicos del suelo al interactuar con sus componentes. La bibliografía indica que su bioacumulación en plantas puede disminuir su crecimiento y productividad, especialmente en cultivos. Además, pueden afectar el ciclo reproductivo de animales como anélidos y nematodos, provocando alteraciones metabólicas y otros efectos genotóxicos (Tian et al., 2022; Wahl et al., 2021).

Recientemente, algunos estudios también han alertado de la detección de MPs en la atmósfera y de los riesgos que pueden suponer al ser inhalados. Ya se conocía que estas partículas podían ser generadas por la erosión del viento de los residuos plásticos, que resultan fragmentados y después transportados por el aire o las precipitaciones, dispersándose a largas distancias; sin embargo, los efectos de la contaminación atmosférica con MPs han sido menos estudiados (Behera & Das, 2023; Zhang et al., 2020).

Asimismo, aunque todavía no se conocen completamente los riesgos a largo plazo derivados de la exposición a los MPs, existe un consenso generalizado sobre sus posibles efectos negativos para la salud humana. Esto se debe principalmente a factores como su persistencia en el medio ambiente y su capacidad de acumulación a lo largo de la cadena alimentaria. (Enyoh et al., 2020; Joo et al., 2021; Sharma et al., 2021)

Se estima que aproximadamente entre 39000 y 52000 microplásticos se introducen en el organismo de un ser humano anualmente por diferentes vías, siendo la ingesta la más importante de ellas (Cox et al., 2020). Una vez ingeridos, los MPs pueden llegar a dañar gravemente el sistema digestivo, desencadenando respuestas inflamatorias, disrupciones endocrinas y alteraciones en el metabolismo. Su entrada por otras vías también es posible; por medio del aire inhalado o incluso a través de la piel, las partículas de MPs pueden introducirse y llegar a depositarse en distintos tejidos del cuerpo humano, como los pulmones, provocando procesos de inflamación y alteraciones del sistema inmunitario (Rahman et al., 2021; Vethaak & Legler, 2021).

#### 2.4. Proceso de biodegradación de los microplásticos

Algunas de las bacterias que se han aislado de aguas y suelos contaminados pueden utilizar los microplásticos como fuente de carbono en situaciones de escasez de nutrientes en el medio, colonizando su superficie y secretando enzimas extracelulares para su degradación. Precisamente, en los procesos de biodegradación bacteriana de los microplásticos de polímeros como el polietileno, se ha corroborado que distintas comunidades bacterianas pueden actuar de manera conjunta, incrementando la eficiencia de degradación de los MPs pese a los posibles efectos tóxicos de los metabolitos liberados (Singh & Wahid, 2015). Este hecho es posible gracias a la capacidad de algunas especies

microbianas de desarrollar biopelículas, lo que permite la colonización de la superficie de los MPs. Tras la formación de las biopelículas, se produce la liberación de diversas enzimas, tales como lipasas, esterases y oxidoreductasas, que dan lugar a reacciones de hidrólisis y oxidación de los polímeros. Cabe destacar que estos fenómenos se producen de forma superficial y lentamente, pudiendo tardar en producirse varias semanas (Li et al., 2023; Park & Kim, 2019). En la Figura 4 se muestra un esquema general de dichos procesos.

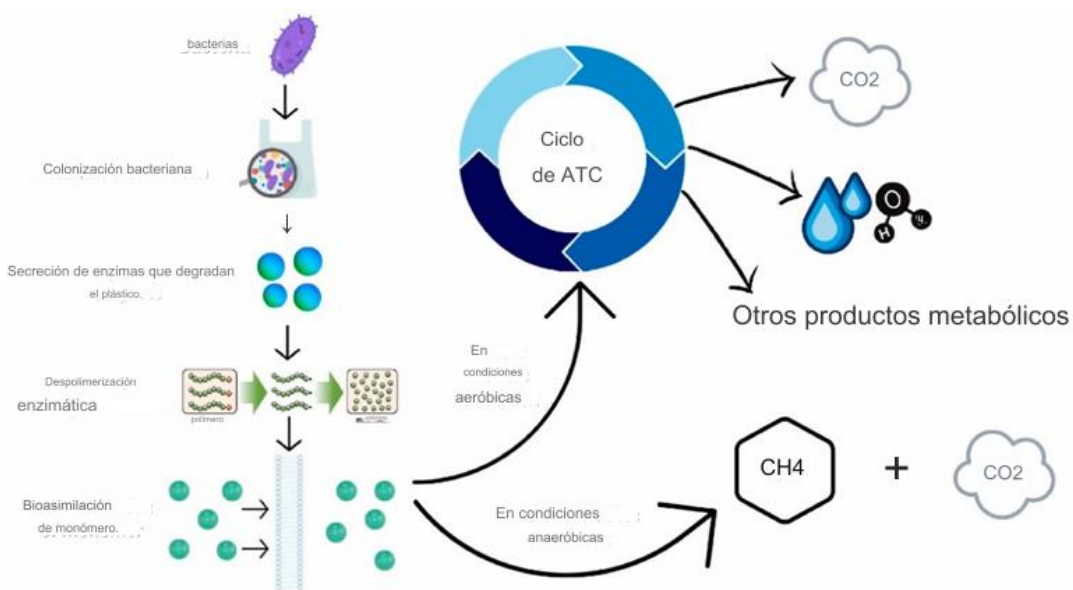


Figura 4. Mecanismo del proceso de degradación de los microplásticos por acción bacteriana (Emisha et al., 2024).

Como se puede observar en la Tabla 1, se han desarrollado numerosas investigaciones sobre los procesos de biodegradación de microplásticos por parte de diferentes bacterias y en distintas condiciones. Entre los géneros evaluados predomina *Bacillus*, que ha demostrado ser capaz de degradar micropartículas de polietileno, polipropileno y PET (Auta et al., 2017, 2018, 2022; Park & Kim, 2019). Para el seguimiento de estos procesos de biodegradación, los diversos trabajos publicados se basan en el análisis de las propiedades químicas y estructurales de los MPs, así como en la pérdida de masa de los microplásticos, a lo largo del tiempo; para ello se pueden utilizar diferentes técnicas de microscopía y métodos gravimétricos, entre otros (Jeon et al., 2021; Muenmee et al., 2016).

Tabla 1. Principales bacterias empleadas en los estudios de degradación de microplásticos (Li et al., 2023; Newrick et al., 2024).

Bacterias	Polímeros degradados	Tiempo	Eficiencia de degradación	Origen de las bacterias	País
<i>Bacillus sp.</i> <i>Rhodococcus sp.</i>	PP	40 días	4,0% 6,4%	Sedimentos de manglar	Malasia
<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus gottheili</i>	PE, PET, PS, PE, PET, PP, PS	40 días	1,6%; 6,6%; 7,4% 6,2%; 3,0%; 3,6%; 5,8%	Sedimentos de manglar	Malasia
<i>Bacillus sp.</i> <i>Paenibacillus sp.</i>	PE	60 días	14,7%	Vertedero urbano	Corea del sur
<i>Arthrobacter sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	PEAD	30 días	12,0% 15,0%	Suelo costero	India
<i>Deinococcus-Thermus</i> <i>Cyanobacteria</i>	PP, PE, PET	30 días	18,0%; 14,0%; 19,7%	Agua de lago	China

En la eficiencia de los procesos de degradación biológica de los MPs influyen una serie de factores, tales como las condiciones ambientales o las propiedades de los polímeros, estos factores se detallan en la Figura 5. Algunos aspectos intrínsecos de los MPs, como el tamaño, la forma o el peso molecular pueden afectar significativamente al proceso de biodegradación microbiana. Por ejemplo, un mayor peso molecular reduce la eficiencia de degradación, mientras que un menor tamaño de los MPs aumenta la velocidad de degradación. Las condiciones ambientales también son cruciales en estos procesos, bien por factores abióticos, como el pH, la temperatura, la humedad o la radiación UV, o por factores bióticos, como la presencia de nutrientes disponibles en el medio, la formación de la biopelícula sobre la superficie de los MPs o la actividad enzimática de la comunidad microbiana. Por todo esto, resulta esencial estudiar la influencia de estos parámetros en la degradación de los MPs por parte de los microorganismos (Newrick et al., 2024).

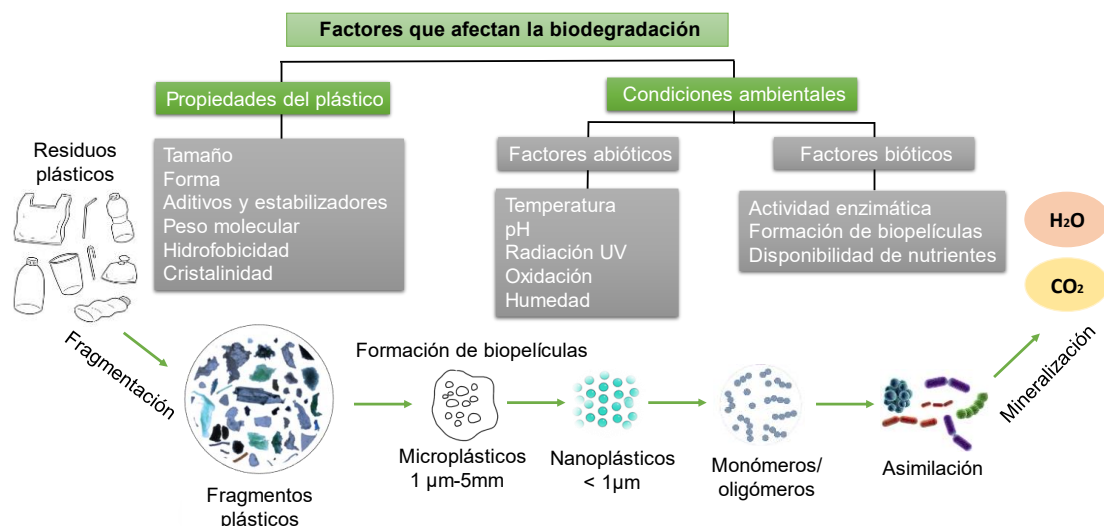


Figura 5. Esquema de la biodegradación de MPs y factores que afectan al proceso (Newrick et al., 2024).

De las bacterias que se han logrado aislar e identificar en los entornos naturales donde se acumulan residuos plásticos, como los vertederos urbanos o los estuarios, predominan las pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Rhodococcus*. Se ha corroborado que estas bacterias pueden adherirse a la superficie de los MPs y secretar enzimas extracelulares para degradar los monómeros metabolizables del microplástico. Precisamente, en los trabajos llevados a cabo sobre la eliminación biológica de microplásticos de polietileno, uno de los materiales más empleados para la producción de envases alimentarios, se estudian diferentes especies de los géneros bacterianos mencionados anteriormente y también de hongos, por ejemplo, *Aspergillus spp.*, encontrándose unos porcentajes de eliminación de MPs de entre el 4 y el 100 %, según el caso (Li et al., 2023; Park & Kim, 2019; Tourova et al., 2020).

En concreto, este TFM analiza la biodegradación de microplásticos de PEAD procedentes de envases alimentarios mediante el empleo de *Paenibacillus macquarensis*. Esta bacteria Gram positiva perteneciente al género *Paenibacillus*, por ser psicotrofa y poder crecer a bajas temperaturas, es una de las especies presentes en algunos escenarios remotos de acumulación de microplásticos, como los glaciares (Hoshino et al., 2009; Marshall & Ohye, 1966). Esta especie es capaz de colonizar la superficie de partículas plásticas y puede formar consorcios con otras bacterias, lo que le permite resistir en condiciones de escasez de nutrientes, empleando para ello fuentes de carbono alternativas como los MPs (Park & Kim, 2019).

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Preparación de los microplásticos modelo

Para realizar los experimentos se seleccionó el polietileno de alta densidad (PEAD), ya que este es uno de los plásticos más empleados a nivel mundial para la fabricación de productos plásticos de un solo uso, como son los envases alimentarios (Sivan, 2011). Asimismo, aparece frecuentemente en aguas residuales urbanas, ya que por su densidad tiende a mantenerse flotando, dificultando su separación mediante los procesos de sedimentación habitualmente empleados en el tratamiento de dichas aguas (*Plastics Europe*, 2024).

Los microplásticos de PEAD se prepararon partiendo de tapones de botellas de batidos lácteos comerciales. Los tapones plásticos se introdujeron ya fragmentados en un molinillo triturador de alta velocidad (High-speed Multifunction Grinder, Homend™), en el que se procesaron a una velocidad de 28000 rpm, en intervalos de un minuto, dejando cinco minutos de reposo entre dichos intervalos para evitar así el sobrecalentamiento del equipo y de los MPs. El plástico triturado resultante se tamizó con el fin de separar la fracción de microplásticos con un tamaño adecuado para los experimentos a realizar, se utilizaron tamices de 500  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ . Se muestra en la Figura 6 el aspecto de los tapones de PEAD antes de ser triturados y del tamiz de 500  $\mu\text{m}$ .

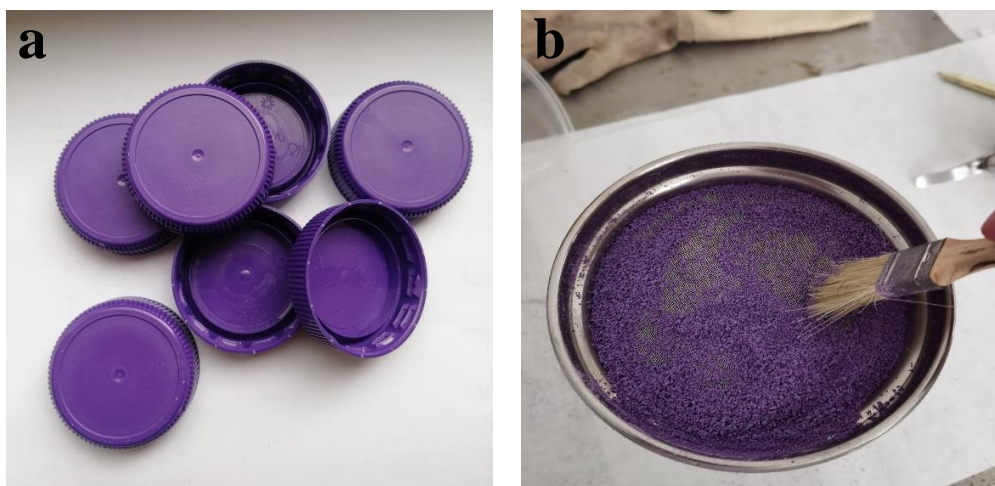


Figura 6. Tapones de PEAD de los que se obtuvieron los MPs (a) y tamiz para separar la fracción inicial de plástico triturado (b).

Se seleccionó la fracción de entre 100 y 250  $\mu\text{m}$  para hacer los experimentos, ya que diversos estudios indican que la mayor parte de los MPs que se detectan en muestras procedentes de diferentes medios naturales se encuentran en este rango de tamaños (Gurjar et al., 2021).

### 3.2. Cultivo y preparación del preinóculo de *Paenibacillus macquarensis*

Para la realización de los experimentos, se partió de un stock de la bacteria *Paenibacillus macquarensis* adquirido en la Colección Española de Cultivos Tipo (identificador CECT 24). Este mismo proveedor especifica las condiciones de crecimiento óptimas para esta especie, que son una temperatura de 20°C y un período de incubación de aproximadamente 48 horas para alcanzar la fase estacionaria. Para su cultivo se emplea el medio Nutrient Broth (NB), cuya composición es la siguiente: 5 g/L de extracto de carne (VWR®), 10 g/L de peptona (VWR®), 5 g/L de NaCl (VWR®). Para el cultivo en medio sólido se añadirán además 20 g/L de Agar (VWR®).

Trabajando en condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar vertical, se preparó un preinóculo, recogiendo con una punta estéril de micropipeta 1-2 colonias de esta bacteria, crecida previamente en una placa Petri con medio NB y agar al 2%, e introduciéndola en un matraz estéril de 250 mL con 50 mL de medio NB. Una vez inoculado, el medio se incubó con agitación orbital a 250 rpm y 30°C durante 48 horas a fin de obtener en el preinóculo la concentración de microorganismos adecuada para llevar a cabo los ensayos.

### 3.3. Ensayos de biodegradación

Para estudiar la posible degradación de los MPs por parte de *P. macquarensis* se prepararon varios matraces estériles de 1 L con 300 mL de medio líquido NB cada uno y se autoclavaron a 121 °C durante 20 minutos. Una vez fríos, estos se inocularon con 600  $\mu\text{L}$  del preinóculo de *P. macquarensis* crecido tal y como se indica en el apartado anterior.

Los microplásticos de PEAD obtenidos con anterioridad fueron esterilizados sumergiéndolos en etanol al 96% (Merck®) y posteriormente dejándolos secar en la cabina de flujo laminar. Una vez secos, cuando el alcohol se evaporó por completo, fueron añadidos en cada matraz en una concentración de 0,5 g/L, por lo que se pesaron 0,15 gramos de MPs para cada uno de los matraces.



Los matraces con el cultivo de *P. macquarensis* y los microplásticos añadidos se dividieron en tres grupos, para su incubación a distintas condiciones de temperatura. Los tres grupos de matraces fueron incubados con una agitación de 250 rpm durante 30 días y cada uno de los grupos fue incubado a diferente temperatura, 30, 20 y 10°C. En todos los casos, se tomaron muestras de manera periódica para llevar a cabo los diferentes análisis descritos en los siguientes apartados. Las muestras utilizadas para determinar carbohidratos totales, una vez centrifugadas, se congelaron hasta su análisis.

Todos los ensayos de biodegradación fueron llevados a cabo al menos por duplicado.

#### 3.4. Análisis gravimétrico

El análisis cuantitativo de la biodegradación de los microplásticos presentes en el medio se realizó de forma gravimétrica. Para ello, en tubos Falcon se añadieron a 20 mL de cada una de las muestras tomadas periódicamente el mismo volumen de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30% y la mezcla se calentó a 60°C en un baño de agua durante 45 minutos con el fin de eliminar las posibles biopelículas de microorganismos formadas sobre los MPs. Tras dejarlas enfriar a temperatura ambiente, las muestras se filtraron a través de un filtro de celulosa con un tamaño de poro de 11 µm (Whatman™ Grade 1 CAT No. 1001-110) empleando un equipo de filtración consistente en un matraz Kitasato conectado a una bomba de vacío (Weber et al., 2021). Tras esto, los filtros con los MPs depositados se dejaron secar sobre placas de Petri abiertas en una estufa a 60°C durante 24 horas (Figura 7). Una vez secos, los filtros se depositaron a temperatura ambiente en un desecador, conteniendo gel de sílice, durante unos 15 minutos, para después pesarlos en una balanza de precisión (Sartorius Analytical Balance) cuando estuvieran fríos. Por diferencia de pesada se determinó la cantidad de MPs presentes en las muestras.

Asimismo, para evitar posibles errores en el método gravimétrico empleado para cuantificar la biodegradación de los microplásticos, se prepararon tres tubos Falcon (triplicado) con el mismo medio de cultivo (NB) y una cantidad conocida de MPs (0,15 g), pero sin inocular *Paenibacillus macquarensis*. Posteriormente, estas muestras empleadas como control se procesaron siguiendo los mismos pasos de filtración y secado, descritos anteriormente y se pesaron para determinar el porcentaje de recuperación de los MPs añadidos inicialmente. En este experimento, llevado a cabo a modo de control, se recuperó el 99,2% de los microplásticos iniciales, lo que indica un error <1% en la

cuantificación de la pérdida de masa de los MPs por gravimetría. La disminución de la masa de los MPs expresada como porcentaje de degradación se calculó como se indica a continuación:

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = (\text{masa inicial} - \text{masa final} / \text{masa inicial}) \times 100$$

Los MPs filtrados procedentes de las muestras tomadas a distintos tiempos de experimento, se guardaron en placas Petri selladas para su posterior análisis morfológico y estructural mediante SEM y FTIR.

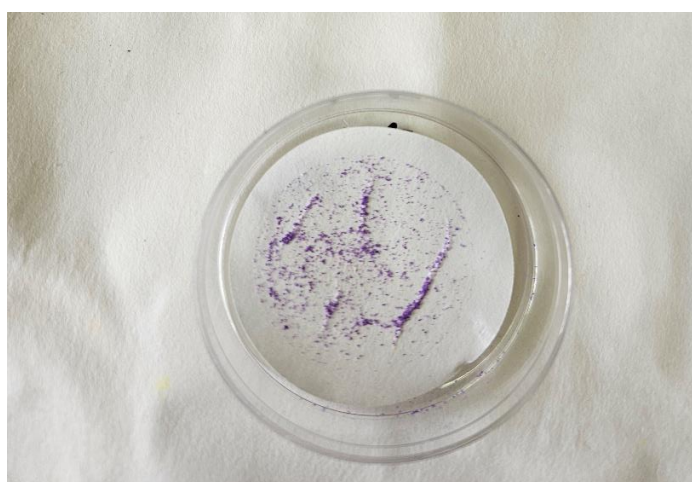


Figura 7. Aspecto del filtro con los MPs retenidos una vez secos.

### 3.5. Crecimiento de *Paenibacillus macquarensis*

El seguimiento del crecimiento de *Paenibacillus macquarensis*, tanto en ausencia como en presencia de microplásticos de PEAD, se llevó a cabo por recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) en placas Petri con medio NB sólido.

Para obtener las muestras del cultivo con MPs, en condiciones de esterilidad, se tomó 1 gramo del medio de cultivo de cada matraz a muestrear (Figura 8) y se mezcló en una bolsa (Biomaster 80, Stomacher® lab system) junto con 9 mL de NaCl al 0,7 % empleando un homogenizador (Stomacher® 80, VWR) a fin de liberar los microorganismos que pudiesen quedar adheridos a la superficie de los MPs. De esta manera se tiene la muestra diluida 10 veces, a partir de dicha muestra se prepararon diluciones seriadas hasta llegar a una dilución adecuada que permita el recuento de las colonias crecidas en las placas sembradas con 0,1 mL de la muestra diluida.

Las placas se incubaron en una estufa a 30°C durante aproximadamente 48 horas, comprobando tras este tiempo si habían crecido colonias. Se llevó a cabo su recuento y, teniendo en cuenta el factor de dilución y el volumen añadido, se calculó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).



Figura 8. Matracas incubados en un experimento de biodegradación de MPs.

Con el objetivo de estudiar los posibles efectos de los MPs de PEAD sobre el crecimiento de *P. macquarensis*, se realizaron las curvas de crecimiento de la bacteria en ausencia de MPs a 20 y 30°C empleando el mismo medio (NB). Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 mL, cada uno con un volumen de medio de cultivo de 100 mL, y se emplearon las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Para el recuento en placa se procedió de forma análoga que en el caso de los cultivos llevados a cabo en presencia de MPs.

A partir de los resultados obtenidos, se calcularon las tasas de crecimiento específicas máximas ( $\mu_{max}$ ) de la bacteria en el medio Nutrient Broth con y sin MPs añadidos. La  $\mu_{max}$  se obtuvo a partir de la fórmula:

$$dX/dt = \mu_{max} \cdot X$$

Y partiendo de la expresión previa, se obtuvo la siguiente ecuación empleada para la regresión lineal:

$$\ln (X/X_0) = \mu_{max} \cdot t$$

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

### 3.6. Cinética de biodegradación

En los diferentes experimentos de biodegradación, la velocidad con la que transcurrió la reacción se estimó a partir de los datos experimentales obtenidos. En este caso, se tuvo en cuenta la concentración de los microplásticos de PEAD, determinándose la cinética para la reacción de primer orden con respecto a tal concentración.

La cinética de primer orden de degradación de los MPs se obtuvo mediante la expresión:

$$-r_s = K \cdot S$$

A partir de la ecuación previa, teniendo en cuenta que  $r_s = dS/dt$ , e integrando con respecto al tiempo, se obtiene la expresión con la que, mediante su representación gráfica, se tiene una línea cuya pendiente es la constante cinética de degradación ( $K$ ). Si la cinética es de primer orden se emplea la expresión:

$$- \ln (S/S_0) = K \cdot t$$

Donde  $S$  y  $S_0$  son las concentraciones del PEAD, en un momento dado y a tiempo inicial, respectivamente, y  $t$  es el tiempo.

### 3.7. Cuantificación de carbohidratos totales

Con el fin de analizar el consumo de los azúcares que componen el medio y su relación con el posible proceso de biodegradación de los MPs, se determinó la cantidad de carbohidratos totales presentes en las muestras recogidas periódicamente durante los 30 días de experimento.

Para cuantificar los carbohidratos totales se siguió el método del fenol-sulfúrico (Nielsen, 2017). Para ello, se tomó 1 mL de las muestras, previamente almacenadas a  $-4^{\circ}\text{C}$ , y se añadieron 0,5 mL de fenol al 5% y 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 96%, la mezcla se homogeniza y se deja reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se mide la absorbancia con un espectrofotómetro (HACH DR/2400) a una longitud de onda de 492 nm. Asimismo, se preparó un blanco con 1 mL de agua destilada en vez de muestra.

Para estimar la relación entre las absorbancias medidas con la concentración de carbohidratos totales se realizó una recta de calibrado que se muestra en la Figura 9, empleando para ello patrones de glucosa (VWR®) a concentraciones entre 20 y 100 ppm. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

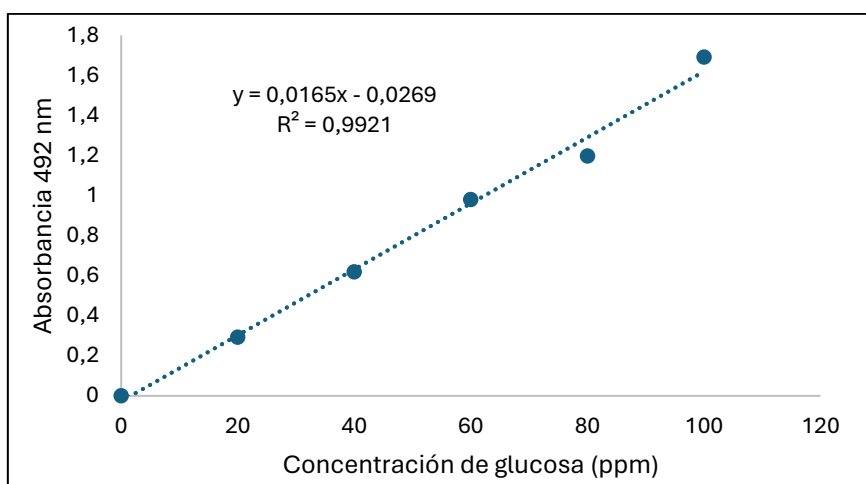


Figura 9. Recta de calibrado del método del fenol-sulfúrico representando la concentración de los patrones de glucosa (mg/L) frente a su absorbancia medida a 492 nm.

### 3.8. Medida de pH

De manera paralela a la toma periódica de las muestras, se midió el valor del pH de los matraces, por duplicado, con el objetivo de seguir la evolución de este parámetro según iba transcurriendo el experimento de biodegradación, para ello, se empleó un pHmetro digital (sensION+ pH3, Hach®, Estados Unidos).

### 3.9. Análisis de los microplásticos por estereomicroscopía, FTIR y SEM

El análisis morfológico de los microplásticos utilizados como modelo se llevó a cabo mediante un estereomicroscopio Leica M205FA de la unidad de Microscopía Fotónica y Proceso de Imágenes de la Universidad de Oviedo. El análisis con este

estereomicroscopio semiautomático se realizó con un objetivo 5x, empleando una luz de reflexión generada por un anillo de LED con iluminación completa.

Se empleó la espectroscopía de infrarrojos de transformada de Fourier (FTIR) para la caracterización de los microplásticos en función de su composición química. Esta técnica permite identificar grupos funcionales en relación con las señales espectrales que emiten los materiales al incidir la radiación IR sobre ellos. El análisis se llevó a cabo utilizando un espectrómetro FTIR Spotlight 200i de Perkin Elmer (Figura 10), trabajando en el rango del infrarrojo medio entre 4000 y 450  $\text{cm}^{-1}$ .

Los análisis fueron realizados en la Unidad de Espectroscopía Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Los MPs analizados se muestrearon por duplicado al inicio (día 0) y al final del experimento (día 30). Estos se obtuvieron tras la eliminación de los microorganismos adheridos mediante el proceso previamente descrito en el apartado 3.4.

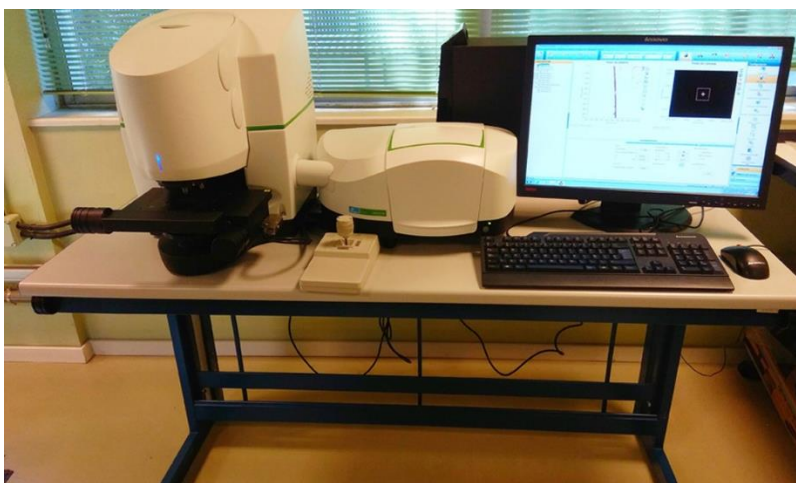


Figura 10. Espectrómetro FTIR Spotlight 200i de Perkin Elmer.

Por otra parte, los microplásticos fueron observados en el microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL-6610LV (Figura 11), antes y después del experimento de degradación (día 0 y día 30), para comparar la morfología de las muestras y evaluar los posibles cambios en su estructura superficial. El SEM se empleó juntamente con la espectroscopía de rayos x de dispersión de energía (EDS) para el análisis de la composición y la estimación de la relación entre las moléculas de oxígeno y de carbono

presentes en los microplásticos (ratio O/C), ya que puede ser indicativa de cambios en los grupos funcionales presentes en las muestras (Nakatani, 2022). Para el análisis por SEM, fue necesario preparar previamente los microplásticos, que, tras ser tratados como se indica en el apartado 3.4, fueron sumergidos en una disolución de etanol al 70% durante 20 minutos, para eliminar cualquier resto de agua o suciedad que pudiese haber quedado sobre la superficie. A continuación, se secaron en una estufa a 50°C durante 24 horas, se montaron en los portamuestras y se sometieron a un proceso de metalización mediante pulverización de oro (Sputtering Balzers SCD 004) para, finalmente, ser analizadas.



Figura 11. Microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL-6610LV.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Caracterización del crecimiento de *Paenibacillus macquarensis*

De cara a analizar el efecto de la presencia de los microplásticos sobre el crecimiento de *Paenibacillus macquarensis*, se estudió su crecimiento en ausencia de MPs, empleando el mismo medio de cultivo durante 54 horas, tanto a 20°C como a 30°C. Las curvas de crecimiento se muestran en la Figura 12.

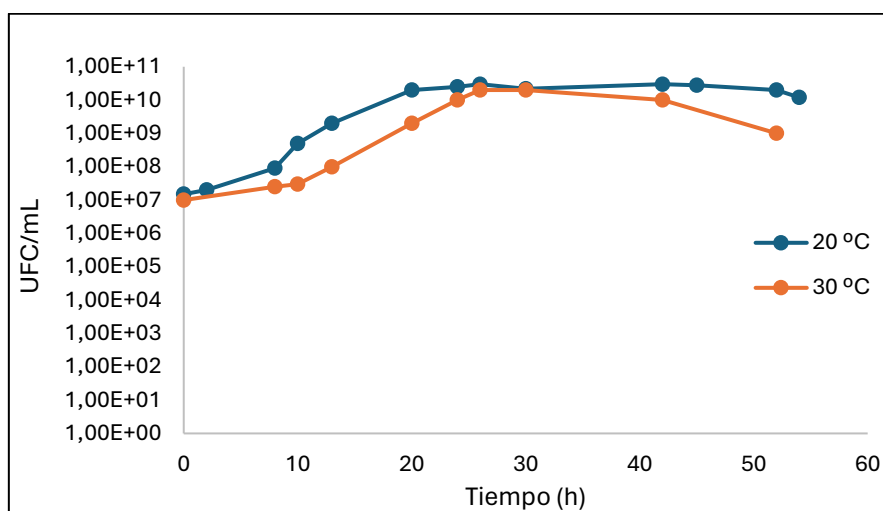


Figura 12. Crecimiento de *Paenibacillus macquarensis* en ausencia de MPs a 20 °C y 30 °C.

Como se observa en el gráfico para el crecimiento a la temperatura de 20°C, tras una fase de latencia de unas 8 horas la bacteria comienza un crecimiento exponencial hasta las 20 horas, aumentando desde el orden de  $10^7$  UFC/mL hasta  $10^{10}$  UFC/mL. A partir de este punto permanece en fase estacionaria hasta pasadas las 50 horas, momento a partir del cual comienza a reducirse la viabilidad. En el caso de la curva de crecimiento realizada a 30°C, la fase de latencia fue ligeramente más larga, no comenzando el crecimiento exponencial hasta las 10 horas. A partir de este momento, la concentración de microorganismos aumenta de forma sostenida en el tiempo, también desde el orden inicial de  $10^7$  UFC/mL hasta  $10^{10}$  UFC/mL, que en este caso se atenúa a las 24 horas, cuando entra en fase estacionaria. En este momento, el recuento de colonias se mantiene estable hasta las 42 horas, cuando comienzan a decrecer, tendencia que se mantiene hasta la finalización del ensayo.



Al comparar ambas curvas se aprecia que *P. macquarensis* crece más rápido a 20°C, lo que se evaluó al determinar las tasas de crecimiento específicas máximas de los microorganismos ( $\mu_{max}$ ) para ambas condiciones. Se muestran en la Figura 13 la representación gráfica de los datos durante las fases de crecimiento exponencial empleando la ecuación:  $\ln(X/X_0) = \mu_{max} \cdot (t - t_0)$ . Como se puede observar a partir de la pendiente de las rectas obtenidas, la tasa de crecimiento específica es mayor en el experimento a 20°C (Figura 13 a) que en el realizado a 30°C (Figura 13 b), siendo  $\mu_{max} = 0,4258 \text{ h}^{-1}$  y  $\mu_{max} = 0,4112 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Lo que concuerda con la información sobre sus condiciones de crecimiento según la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 24), donde se indica que su crecimiento óptimo es esta temperatura, comprobando que *P. macquarensis* crece mejor a 20 °C (en ausencia de MPs) pese a que pueda adaptarse a hacerlo a una temperatura superior. Además, en el ensayo a 30°C la bacteria entra en fase de muerte antes, lo que también resulta lógico al tratarse de un microorganismo psicotrofo.

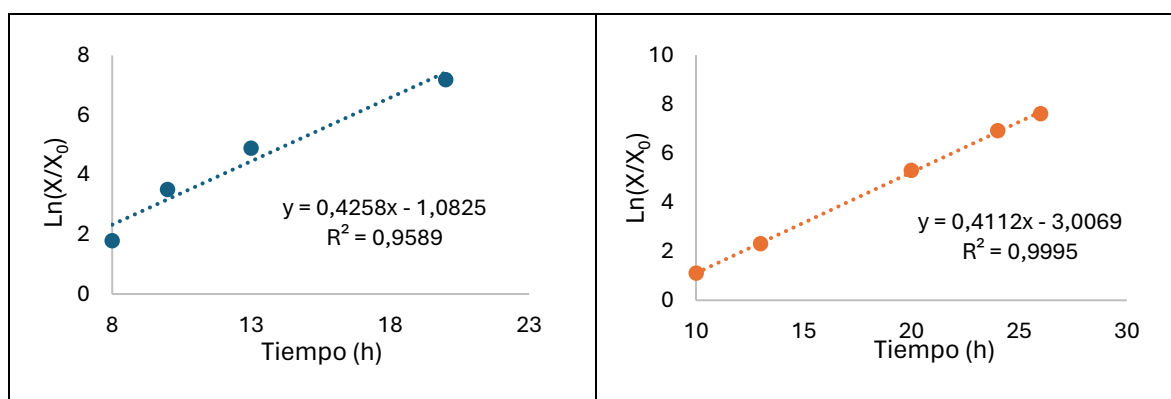


Figura 13. Representación gráfica de las tasas de crecimiento específicas máximas de *P. macquarensis* sin MPs a a) 20 °C y b) 30 °C.

#### 4.2. Mecanismo de biodegradación de los MPs con *Paenibacillus macquarensis*

Con el fin de analizar el posible proceso de biodegradación de los MPs de PEAD objeto de estudio por parte de *P. macquarensis*, se incubaron durante 30 días tomando 10 muestras de los matraces incubados (dos para cada tiempo muestreado) a tres temperaturas diferentes (30°C, 20°C y 10°C) y se determinó la pérdida de masa de PEAD a lo largo del tiempo que duraron los experimentos.

##### 4.2.1. Experimento de biodegradación a 10°C

Mediante la representación de los valores de concentración de los MPs con respecto al tiempo, se puede observar cómo esta va evolucionando. Así, como se representa en el

gráfico de la Figura 14, estos van comienzan a disminuir a partir de aproximadamente los 10 días de experimento. La concentración inicial de MPs era de 0,500 g/L, y a los 17 días de ensayo, su valor descendió a  $0,4625 \pm 0,0107$  g/L. Así, después de 27 días, la disminución en la concentración fue de un 7,00%.

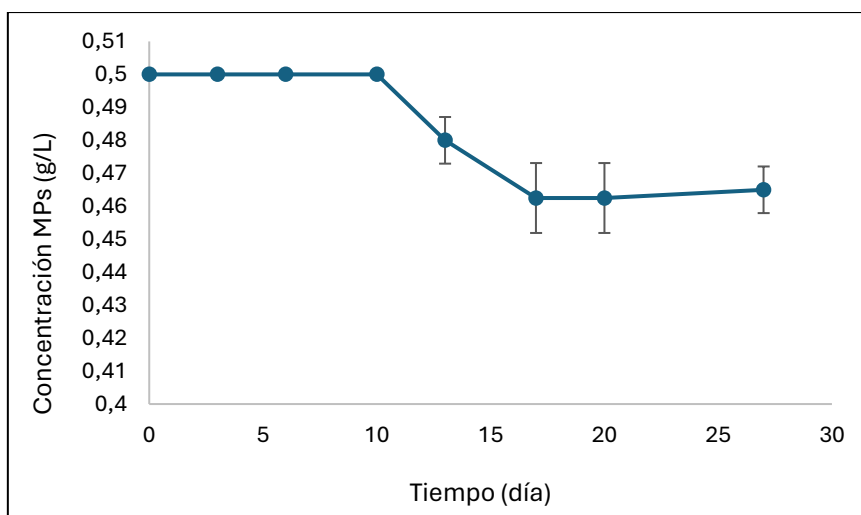


Figura 14. Evolución de la concentración de MPs, en g/L, durante el ensayo de biodegradación a 10 °C.

Algunos trabajos publicados sobre este tema indican la capacidad de ciertos microorganismos, entre los que se encuentra el género *Paenibacillus*, para degradar mediante la secreción de enzimas los polímeros de polietileno y otros plásticos sintéticos bajo condiciones de limitación de nutrientes y metabolizarlos posteriormente (Bonhomme et al., 2003; Shah et al., 2008). Posiblemente, el tiempo que tarda en comenzar la degradación sea el tiempo que necesitan los microorganismos para activar su sistema enzimático y liberar las enzimas suficientes para degradar el PEAD y comenzar a utilizarlo como fuente de carbono.

Con los datos del análisis gravimétrico también se determinó la constante de velocidad de la degradación de los MPs siguiendo una cinética de primer orden, se emplearon los datos comprendidos entre los días 10 y 17 del experimento, ya que fue cuando se observó la degradación de los MPs; así, se obtuvo la recta mostrada en la Figura 15, y se estimó una constante cinética para la biodegradación de los MPs:  $K = 11,0 \times 10^{-3} \text{ día}^{-1}$ .

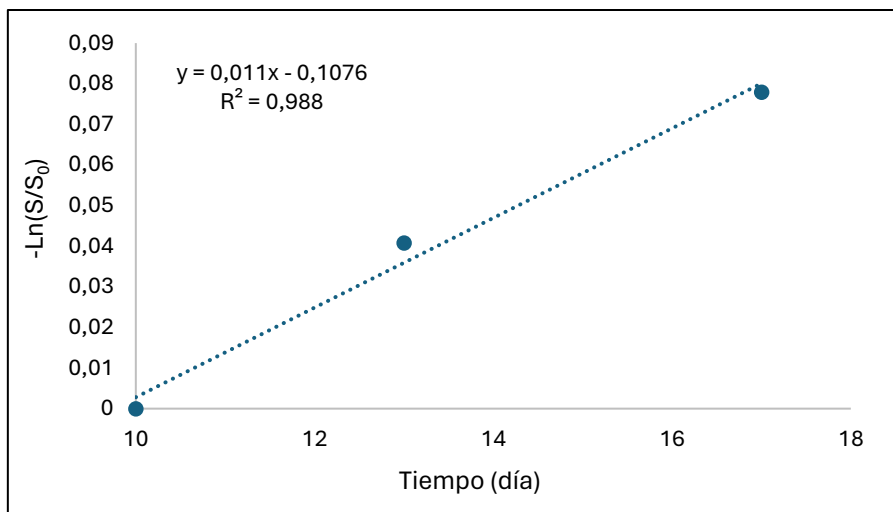


Figura 15. Cinética de degradación de primer orden de los MPs a 10°C.

Por otro lado, el crecimiento mostrado por *Paenibacillus macquarensis* frente al tiempo de experimento en el medio con microplásticos a 10°C se representa en base logarítmica en la Figura 16. Se observa que se produjo crecimiento durante los primeros días, aumentando la viabilidad desde  $10^7$  hasta  $10^9$  UFC/mL. A partir de aproximadamente este momento la bacteria entra en fase estacionaria hasta aproximadamente el día 20, y a continuación, la concentración de bacterias comienza a disminuir progresivamente hasta la finalización del experimento. El consumo de MPs tuvo lugar durante la fase estacionaria de crecimiento, momento en el cual la viabilidad es máxima y posiblemente una buena parte de las bacterias se encontraron formando una biopelícula en la superficie de los MPs, lo que les permite una mayor resistencia a las condiciones externas. Este proceso en el que se desarrolla la biopelícula puede llegar a tardar hasta varios días, lo que podría explicar lo que se ha observado en los experimentos de biodegradación durante los primeros días (Gaylarde et al., 2023).

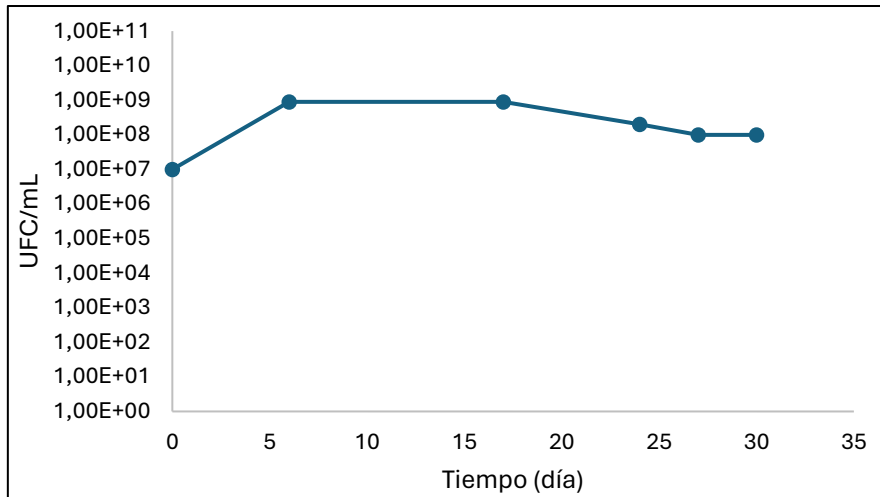


Figura 16. Crecimiento de *Paenibacillus macquarensis* durante el ensayo de degradación a 10 °C.

A su vez, se analizó la evolución de los azúcares totales presentes en el medio de cultivo según se han ido consumiendo por parte de *P. macquarensis*, como se muestra en la Figura 17. Se observa una reducción sostenida en la concentración de los azúcares presentes en el medio a partir de los primeros días del experimento, desde su valor inicial de unas 330 ppm, hasta aproximadamente el día 17, cuando llega a 200 ppm. Es destacable el hecho de que los azúcares continúan siendo consumidos, cuando ya se está produciendo la degradación de los MPs. En los últimos días se observó que la concentración de azúcares volvió a disminuir de manera más marcada, lo que puede ser atribuible a una contaminación fúngica observada en el medio de cultivo a partir del día 20.

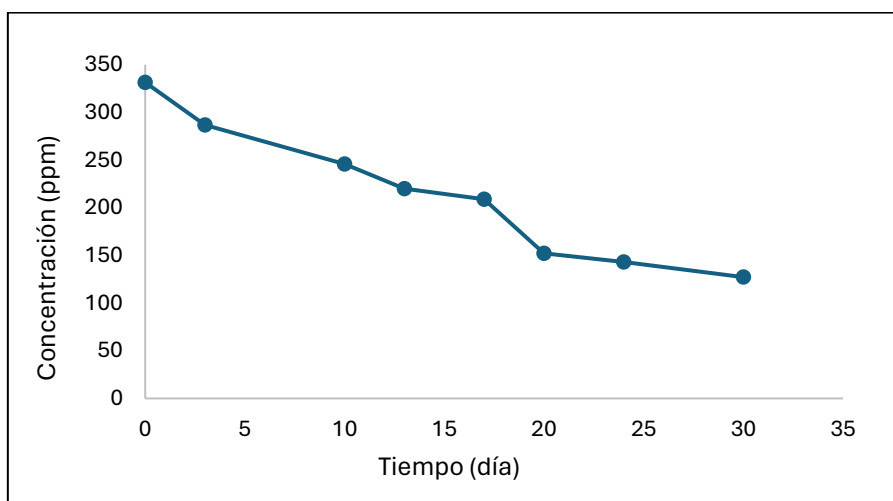


Figura 17. Evolución de la concentración de azúcares, en ppm, durante el experimento de biodegradación a 10 °C.

Los valores de pH también se siguieron a lo largo de los 30 días del experimento a 10°C, como se muestra en la Figura 18. Se observa que el pH del medio de cultivo aumentó progresivamente desde un valor inicial de 6,53 a un valor de 8,03 el día 17. A partir de ese punto, y hasta la finalización del experimento, los valores de pH del medio tienden a disminuir, midiéndose para el día 30 un pH de 7,07. Este resultado sugiere que los valores de pH aumentan debido a la acumulación de metabolitos liberados por *P. macquarensis* durante la degradación de los MPs. El mantenimiento de estas condiciones básicas durante varios días podría haber sido una de las causas que provoca el decrecimiento de los microorganismos observado al final del experimento. El pH óptimo de la cepa de *P. macquarensis* con la que se trabajó es próximo a la neutralidad, indicándose en la Colección Española de Cultivos Tipo, dónde se obtuvo, que el pH del medio se ha de ajustar a 7,2 (CECT 24).

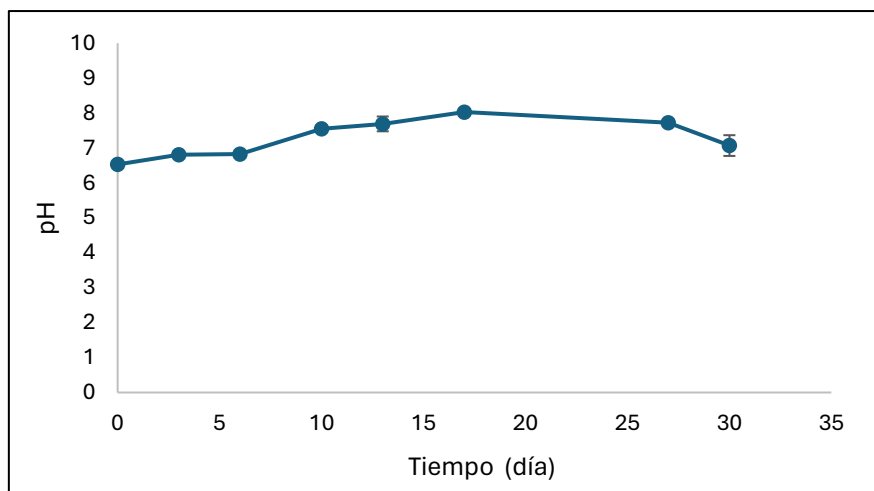


Figura 18. Evolución del pH durante el experimento de biodegradación a 10 °C.

#### 4.2.2. Experimento de biodegradación a 20 °C

De la misma manera, para analizar el proceso de biodegradación de los MPs a la temperatura de 20°C se determinó la disminución en la concentración de PEAD en el medio a lo largo del experimento. En la Figura 19 se muestra la evolución de los MPs frente al tiempo expresado en días. Se puede observar que a esta temperatura la concentración de MPs comienza a disminuir a partir del quinto día de experimento, aproximadamente. Partiendo de nuevo de una concentración inicial de MPs de 0,500 g/L, en 25 días se redujo hasta  $0,445 \pm 0,008$  g/L, momento a partir del cual permaneció constante. En cuanto a la eficiencia de degradación de los MPs, se estimó en un 11,00%.

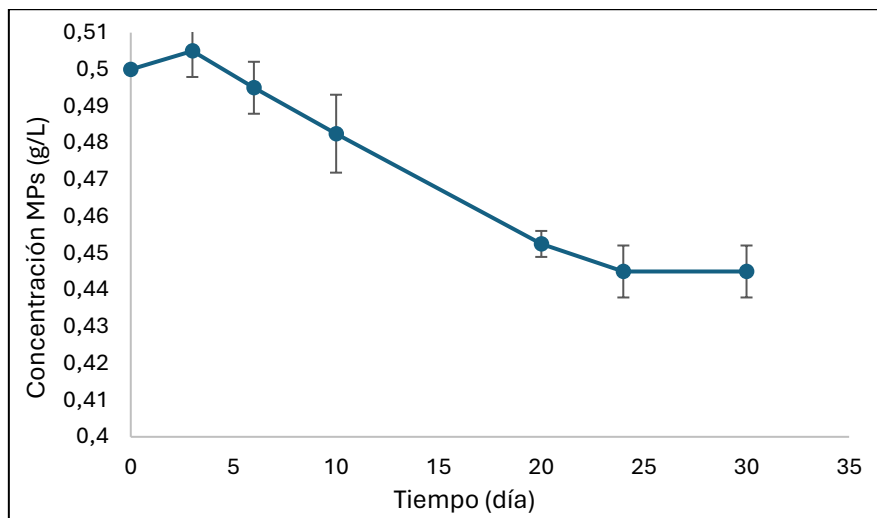


Figura 19. Evolución de la concentración de MPs, en g/L, durante el ensayo de biodegradación a 20 °C.

Además, se trataron los datos obtenidos en el análisis gravimétrico para estimar la constante de velocidad de la degradación de los MPs siguiendo una cinética de primer orden. Para esta determinación se tomaron los datos comprendidos entre los días 3 y 24 del experimento, ya que fue cuando se observó la degradación de los MPs. Se obtuvo la rectas mostrada en la Figura 20, a partir de la cual se determinó una constante de velocidad de degradación:  $K = 6,1 \times 10^{-3} \text{ día}^{-1}$ . Los resultados obtenidos en el ensayo de biodegradación parece que se ajustan al modelo cinético de primer orden, lo que coincide con lo observado en otros estudios sobre la cinética de degradación microbiana de plástico (Farzi et al., 2017; Mohanan et al., 2020).

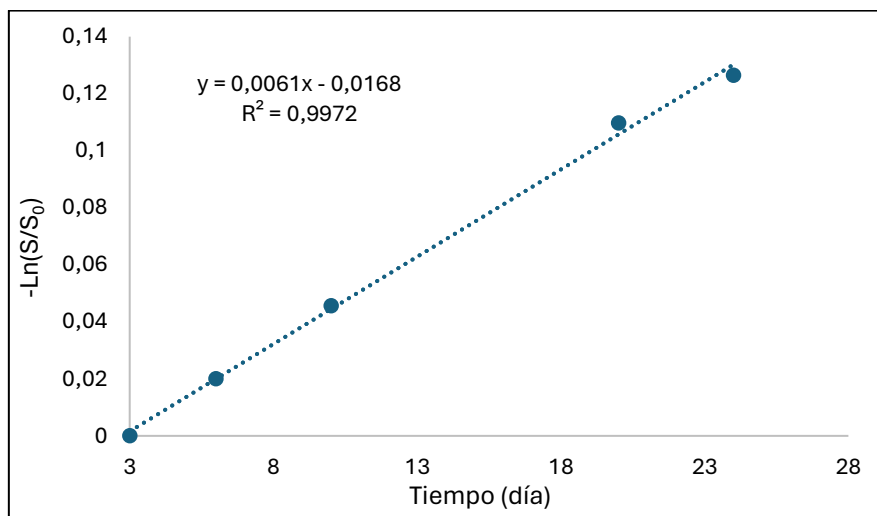


Figura 20. Cinética de degradación de primer orden de los MPs a 20 °C.

En cuanto al crecimiento mostrado por *Paenibacillus macquarensis* a 20°C en presencia de MPs, en la Figura 21 se muestra representada su curva de crecimiento. En estas condiciones se produjo crecimiento exponencial desde prácticamente el comienzo del ensayo hasta el día 6, aumentando la viabilidad desde  $10^7$  hasta  $10^9$  UFC/mL. A continuación sigue una fase estacionaria, en la que el crecimiento de los microorganismos se ve compensado por la muerte de estos. Finalmente, desde el día 24 la concentración de bacterias comienza a disminuir lentamente, manteniéndose la tendencia hasta que finaliza el experimento, el día 30. Esto podría indicar, como apuntan algunos estudios, que la acumulación de los productos formados al descomponerse los plásticos en el medio puede influir en el cese del crecimiento de los microorganismos (Gong et al., 2018).

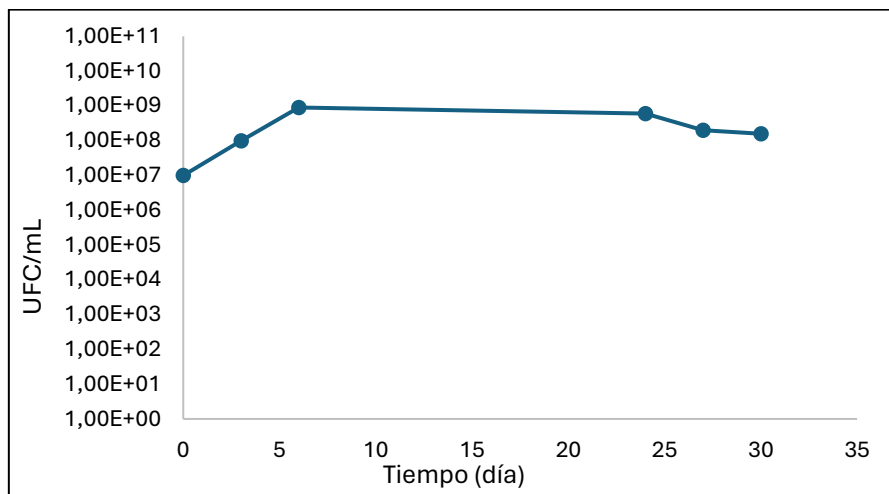


Figura 21. Crecimiento de *Paenibacillus macquarensis* durante el ensayo de degradación a 20 °C.

También se determinó la tasa de crecimiento específica máxima ( $\mu_{max}$ ) de *Paenibacillus macquarensis* para la temperatura de 20°C en presencia de MPs durante el experimento de biodegradación. Como se muestra en la Figura 22, de la representación gráfica de los datos durante la fase de crecimiento exponencial se estima una  $\mu_{max} = 0,0314 \text{ h}^{-1}$ . Al comparar este resultado con el del medio sin MPs (Figura 13), se observa que la tasa de crecimiento es mucho menor en este caso, lo que concuerda con numerosas investigaciones que apuntan a que en el proceso de degradación del plástico se producen sustancias tóxicas que provocan la muerte de los microorganismos y/o la inhibición de su crecimiento al ser liberadas en el medio, ya que pueden actuar como inhibidores de la

síntesis de enzimas necesarias para su actividad metabólica (Li et al., 2023; Yuan et al., 2020).

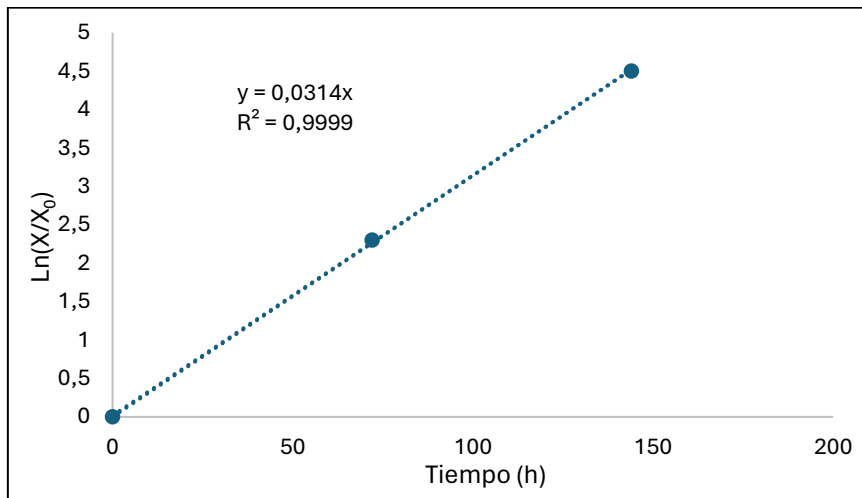


Figura 22. Tasa de crecimiento específica máxima para *P. macquarensis* a 20 °C en presencia de MPs.

La evolución de los azúcares totales del medio a 20°C se representa en la Figura 23. En el gráfico se puede observar como la concentración de azúcares totales disminuye rápidamente desde su valor a tiempo inicial (día 0), de 330 ppm, hasta aproximadamente el día 6. A partir de ese momento, la concentración de azúcares se continúa reduciendo de forma más lenta. Al comparar la evolución de la cantidad de azúcares con la biodegradación de los MPs, se observa que el consumo de los carbohidratos empieza a ralentizarse aproximadamente en el momento en que comienzan a degradarse los microplásticos. Parece lógico pensar que al inicio de la degradación de los MPs, sean liberadas sustancias tóxicas al medio que inhiben la actividad de los microorganismos y por ello disminuya la velocidad a la que se consumen los azúcares, pese a estar todavía presentes en el medio en alta concentración.



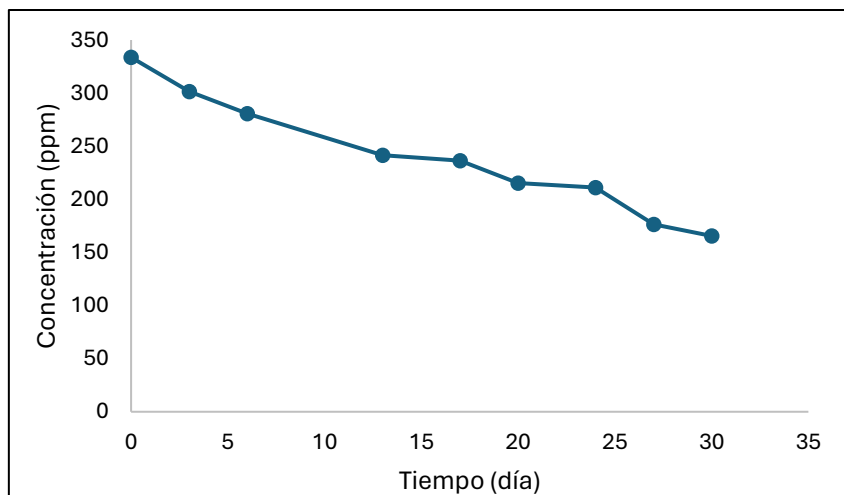


Figura 23. Evolución de la concentración de azúcares, en ppm, durante el experimento de biodegradación a 20 °C.

Los valores de pH a lo largo de los 30 días que duró el experimento se midieron tal y como se muestra en la Figura 24. El pH del medio aumentó de forma progresiva desde un valor al inicio del experimento de 6,67, próximo a la neutralidad, hasta un valor de 9,07 el día 13. Desde ese momento, el pH se mantuvo aproximadamente estable, en valores próximos a 9, hasta la finalización del experimento de biodegradación el día 30. Los valores de pH aumentan coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial de la bacteria y la degradación de los MPs, lo que indica la liberación de algún metabolito básico. El mantenimiento de estas condiciones alcalinas en el medio de cultivo también podría haber provocado el decrecimiento de los microorganismos al final del experimento por superar el rango de valores óptimos para su incubación (CECT 24).

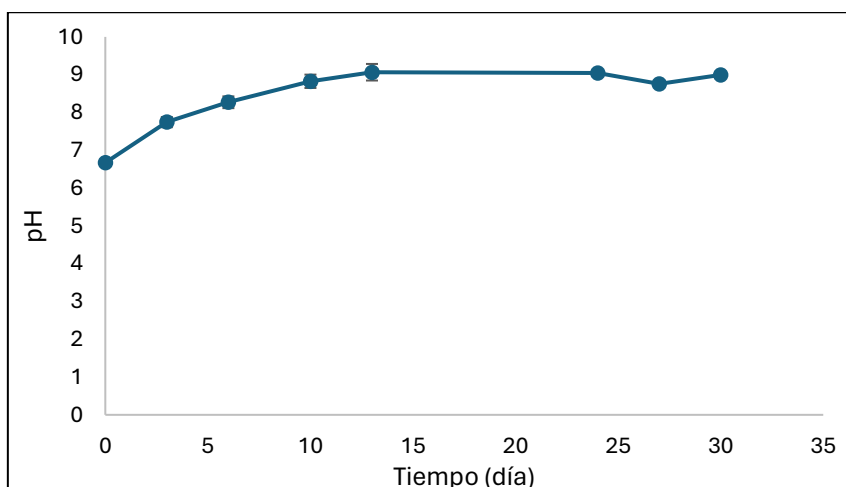


Figura 24. Evolución del pH durante el experimento de biodegradación a 20 °C.

#### 4.2.3. Experimento de biodegradación a 30°C

De igual forma que para los experimentos de biodegradación de MPs comentados con anterioridad, se ensayó el mismo proceso pero a la temperatura de 30°C. Así, como se muestra en la Figura 25, al representar los valores de concentración de los MPs con respecto al tiempo, estos van disminuyendo desde el tiempo inicial, manteniéndose la tendencia hasta el día 24, cuando su valor descendió de 0,500 g/L (día 0) a  $0,43 \pm 0,01$  g/L. Tras el experimento, se estimó que la reducción en la concentración de los MPs fue del 13,00%.

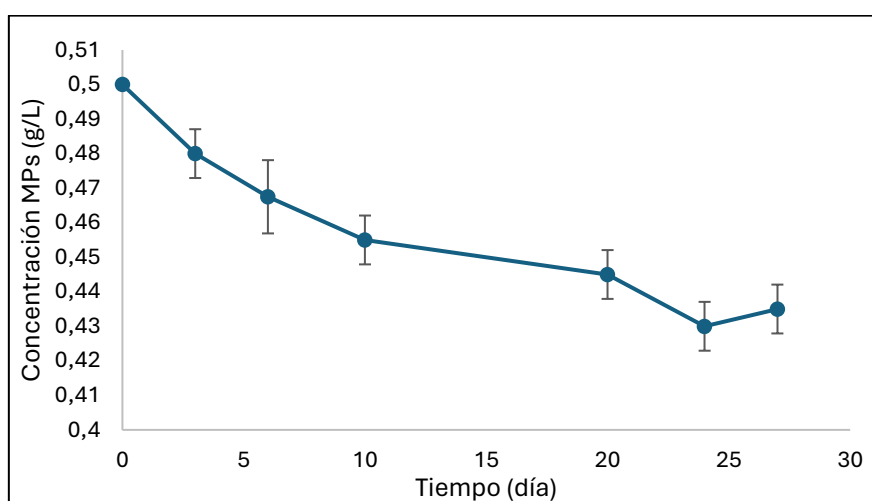


Figura 25. Evolución de la concentración de MPs, en g/L, durante el ensayo de biodegradación a 30 °C.

Para el proceso estudiado en estas condiciones se estimó la constante de velocidad de degradación de los MPs siguiendo una cinética de primer orden con los datos obtenidos en el experimento entre los días 0 y 24, ya que fue cuando se observó la degradación de los MPs; así, se obtuvo la recta mostrada en la Figura 26, a partir de la cual se determinó la constante de velocidad. En este caso, al predecir el comportamiento de biodegradación pueden estimarse la constante cinética de primer orden:  $K = 6,6 \times 10^{-3} \text{ día}^{-1}$ .

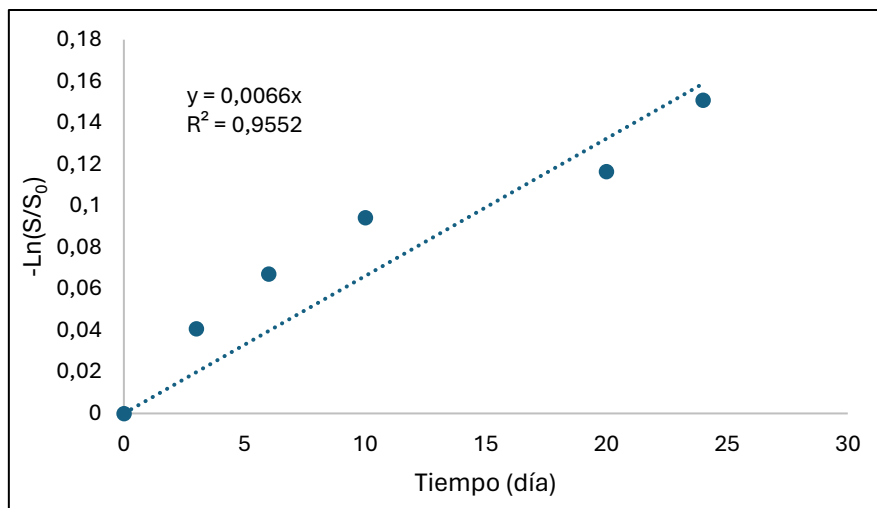


Figura 26. Cinéticas de degradación de los MPs a 30 °C

Por otro lado, a 30°C se estudió la evolución en el crecimiento de *Paenibacillus macquarensis* (Figura 27). Se observa como crece exponencialmente desde que comienza el ensayo hasta el día 13, cuando llega a su máximo de crecimiento, con un recuento de  $2,0 \times 10^9$  UFC/mL ese día. Después, la viabilidad celular comenzó a decrecer a partir del día 24, manteniéndose esta tendencia hasta el final del experimento. Este descenso fue probablemente debido a la presencia de metabolitos inhibitorios del crecimiento en el medio de cultivo, atribuibles a la degradación y metabolización de los MPs.

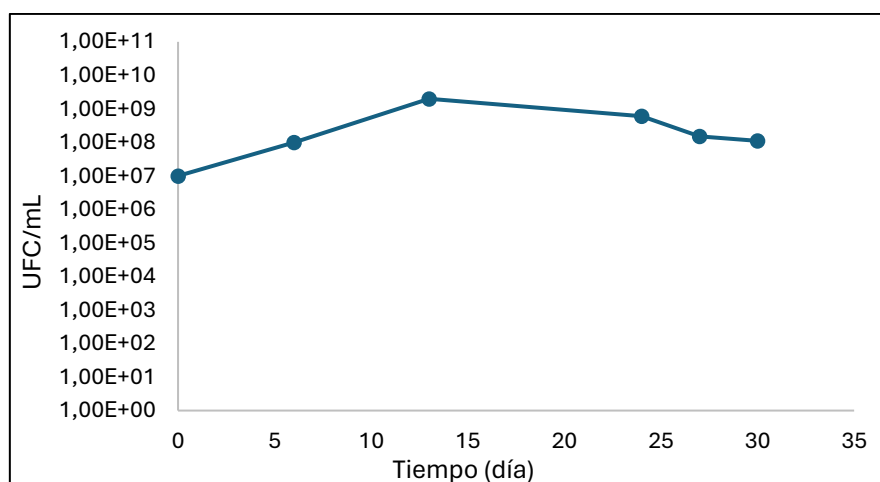


Figura 27. Crecimiento de *Paenibacillus macquarensis* durante el ensayo de degradación a 30 °C.

A su vez, se estimó la tasa de crecimiento específica máxima ( $\mu_{max}$ ) a 30°C de *Paenibacillus macquarensis*. La Figura 28 representa gráficamente los datos entre los días 0 y 13, cuando la bacteria crece exponencialmente. A partir de la pendiente de las

recta obtenida se estima una  $\mu_{\max} = 0,0168 \text{ h}^{-1}$ . Se observa que la tasa de crecimiento es mucho menor en el medio con MPs que en ausencia de ellos (Figura 13), al igual que sucede a  $20^{\circ}\text{C}$ .

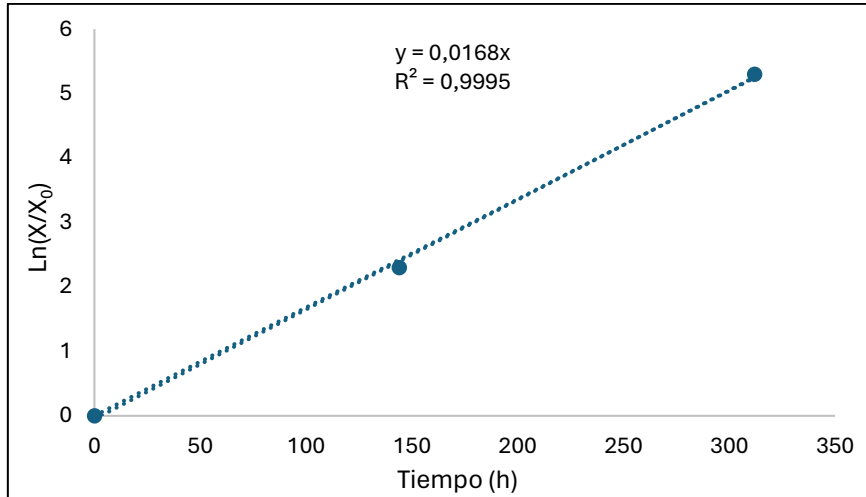


Figura 28. Tasa de crecimiento específica máxima para *P. macquarensis* a  $30^{\circ}\text{C}$  en presencia de MPs.

En la Figura 29 se muestra cómo evolucionan los azúcares totales presentes en el medio de cultivo en función del tiempo. Como se observa en el gráfico, los azúcares muestran una rápida reducción durante los primeros 3 días del experimento, momento a partir del cual comienzan a disminuir de forma mucho más lenta. Se puede observar que la cantidad de azúcares residuales que están presentes en el medio al final del experimento es relativamente elevada, ya que permanecen sin consumirse aproximadamente la mitad de los azúcares iniciales, lo que refuerza la hipótesis de que la muerte celular se deba a la presencia de especies inhibitorias y no a la escasez de nutrientes.

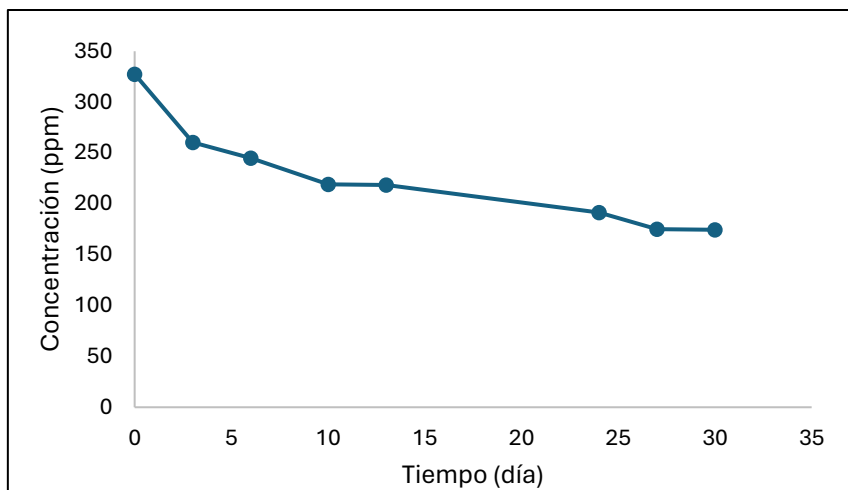


Figura 29. Evolución de la concentración de azúcares, en ppm, durante el experimento de biodegradación a 30 °C.

La Figura 30 representa como cambia el pH del medio según transcurre el proceso biológico estudiado. Durante el ensayo a 30°C este parámetro ascendió desde un valor inicial promedio de 6,70 hasta un valor de 9,47 para el décimo día experimento. Tras esto, se observa que el pH del medio se mantiene en un valor próximo a 9 hasta el fin del ensayo. La basicidad en el medio podría ser uno de los factores que provocan el decrecimiento de los microorganismos al final del experimento (Figura 27), al desviarse del valor de pH neutro indicado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 24) como óptimo para el cultivo de *Paenibacillus macquarensis*.

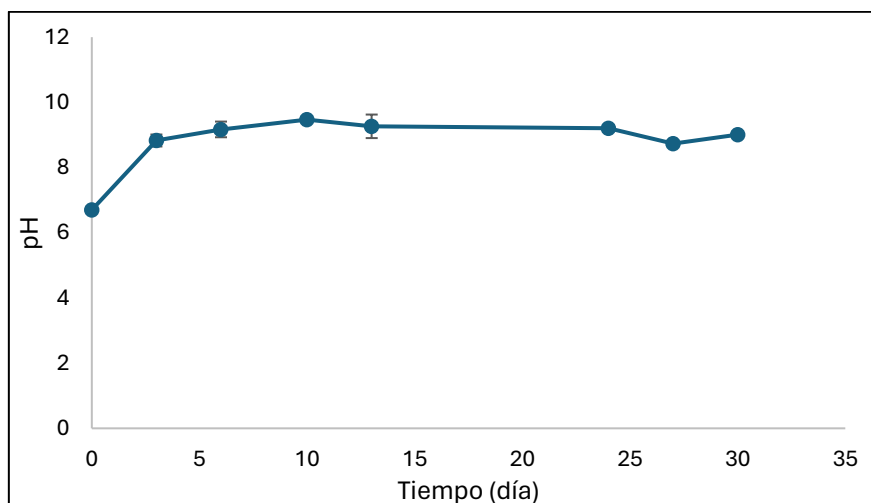


Figura 30. Evolución del pH durante el experimento de biodegradación a 30 °C.

#### 4.2.4. Comparación de los distintos ensayos de biodegradación

Los resultados del experimento de biodegradación variaron en función de las condiciones ensayadas. Se observó como influyeron los cambios en la temperatura en los resultados obtenidos para los procesos estudiados como la degradación de los MPs, el crecimiento de los microorganismos o el consumo de los azúcares presentes en el medio.

Por un lado, la concentración de MPs en el medio de cultivo disminuyó de forma diferente en los tres ensayos realizados a diferentes temperaturas. En la Figura 31, se muestra en conjunto la evolución de los tres experimentos. Como se observa, los MPs comenzaron a disminuir prácticamente desde el inicio del experimento a 30°C, mientras que a 20°C y 10°C empezaron a bajar en concentración a partir del quinto y del décimo día, respectivamente.

Por otro lado, el ensayo a 30°C fue el que mostró una mayor reducción en la concentración de los MPs, estimándose una eficiencia de degradación de estos de un 13%, seguido del realizado a 20°C, en el que se redujeron un 11%, mientras que a 10°C se observó la menor disminución en la cantidad de MPs, que fue de un 7%. Estos resultados sobre el descenso en la cantidad de MPs, achacable al metabolismo microbiano, van en la línea de algunos estudios donde la tasas de degradación bacteriana calculadas para los polímeros de polietileno se sitúan entre el 4% y el 15%, pudiendo incluso llegar a eficacias superiores en algunas investigaciones tras tiempos más largos de incubación (Li et al., 2023; Park & Kim, 2019). La eficiencia de degradación observada a 30 °C es comparable a la de los estudios llevados a cabo sobre los cultivos mixtos de *Bacillus sp.* y *Paenibacillus sp.* aisladas de zonas contaminadas por plásticos, que mostraron una eficiencia de degradación máxima de aproximadamente el 15% del peso seco de los MPs tras 20 días en condiciones análogas a las ensayadas (Nowak et al., 2011).

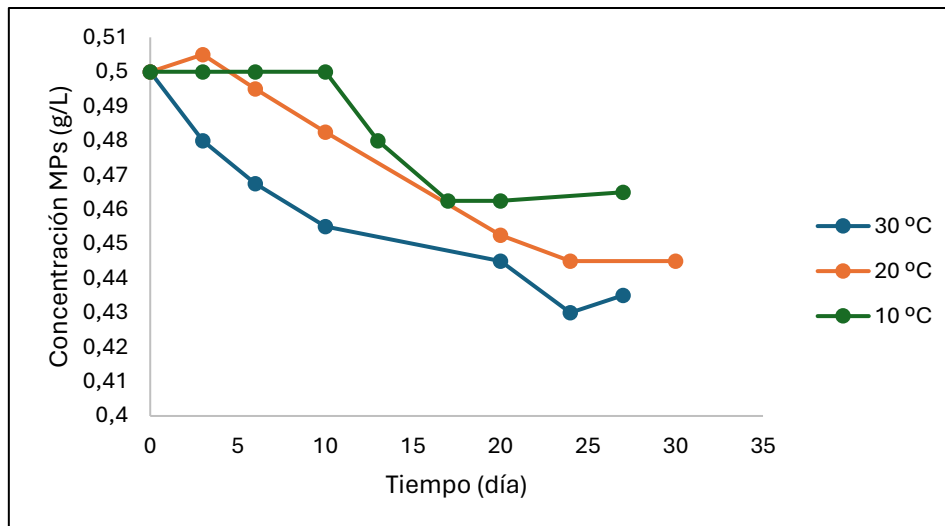


Figura 31. Evolución de la concentración de MPs, en g/L, para los experimentos de biodegradación realizados a diferentes temperaturas.

El crecimiento mostrado por *Paenibacillus macquarensis* también varió en función de la temperatura. Como se muestra en la Figura 32, partiendo del orden de  $10^7$  UFC/mL, en todos los experimentos se llegó al orden de  $10^9$  UFC/mL. Sin embargo, en los ensayos a 10°C y 20°C la bacteria parece crecer más rápido, llegando en ambos casos a la fase estacionaria el sexto día de incubación, mientras que a 30°C llega a su máximo de crecimiento el día 13. Esto podría deberse a que *P. macquarensis* es una bacteria psicotrofa, con preferencia por las temperaturas entre los 15 °C y los 20 °C (Marshall & Ohye, 1966).

Además, la tasa de crecimiento específica máxima ( $\mu_{max}$ ) de *P. macquarensis* fue mayor en el experimento a 20°C que en el de 30°C, siendo  $0,0314 \text{ h}^{-1}$  y  $0,0168 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Resulta destacable el hecho, de que a pesar de que el crecimiento bacteriano fue más lento a 30°C que a 20°C, el consumo de MPs fue mayor a la temperatura más alta.

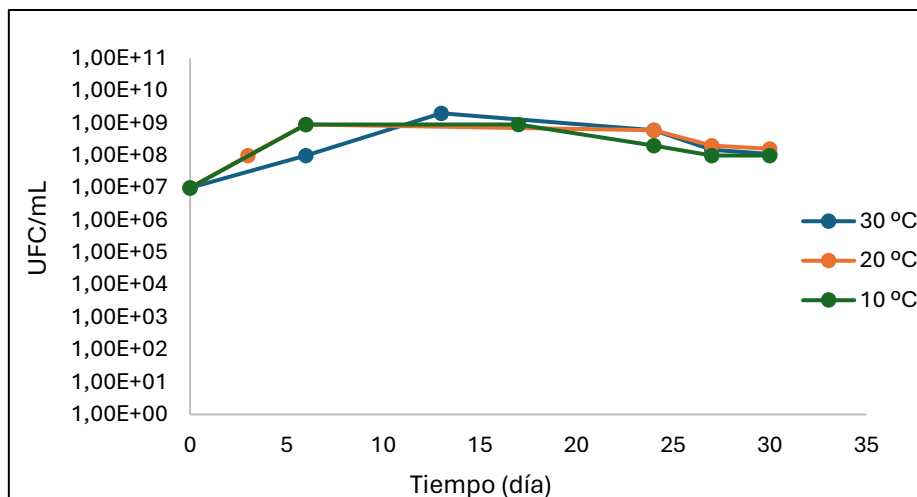


Figura 32. Crecimiento de *Paenibacillus macquarensis* durante los ensayos de biodegradación realizados a diferentes temperaturas.

En cuanto a la evolución de los azúcares presentes en el medio (Figura 33), fue muy similar a las tres temperaturas. La única excepción es el mayor consumo observado a 10°C a partir del día 20, lo que posiblemente fue debido a la contaminación por hongos previamente comentada.

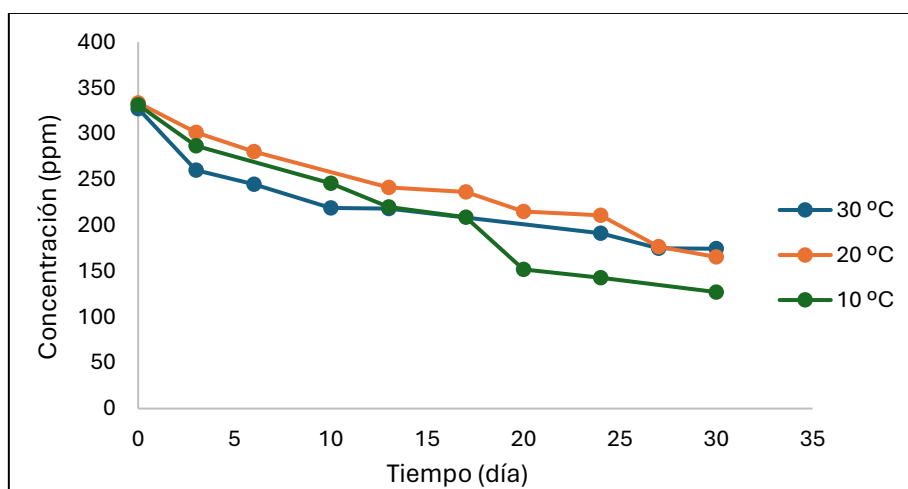


Figura 33. Evolución de la concentración de azúcares, en ppm, durante los experimentos de biodegradación realizados a diferentes temperaturas.

#### 4.3. Cambios en la composición de los MPs

Es de esperar que, durante el proceso de biodegradación, los MPs sufran alteraciones químicas en su superficie. Para evaluar estos cambios, MPs muestreados a tiempo inicial y final del proceso de biodegradación, se analizaron mediante espectroscopía de



infrarrojos FTIR. La Figura 34 muestra los espectros de los MPs antes del proceso de biodegradación. Se observa como la señal espectral es similar en el triplicado de los controles. Además, se aprecia como los MPs analizados presentan los picos característicos del PEAD a longitudes de onda próximas a  $2916\text{ cm}^{-1}$ ,  $2849\text{ cm}^{-1}$ ,  $1471\text{ cm}^{-1}$  y  $718\text{ cm}^{-1}$  (Chen et al., 2021).

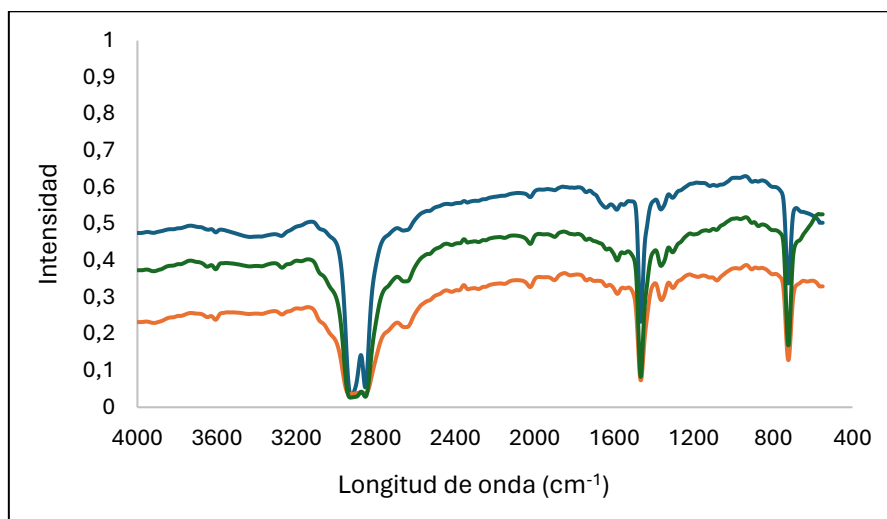


Figura 34. Espectro FTIR de los MPs control.

Para obtener información sobre las modificaciones estructurales ocurridas por acción de *P. macquarensis* en la superficie de los MPs, se analizaron los cambios en la absorción de los grupos carbonilo, alrededor de  $1715\text{ cm}^{-1}$ , y en los grupos vinilo, en torno a  $909\text{ cm}^{-1}$  (Martínez et al., 2021). Estas zonas permiten observar cambios en los grupos funcionales de los plásticos, que se determinan mediante la relación entre el “pico” asociado con el enlace carbonílico o vinílico y un pico de referencia (entre  $1420\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ ). El incremento en estas relaciones se asocia con la degradación oxidativa del plástico, y ha sido empleado en diversos estudios para evaluar el grado de biodegradación de MPs recogidos en medios contaminados (Celik et al., 2023; Chen et al., 2021).

Con el fin de poder realizar la comparación de una manera cuantitativa, se han calculado el índice carbonílico (IC) y el índice vinílico (IV), dividiendo el área de ambos “picos” por un área de referencia; en este caso se toma el pico a  $1465\text{ cm}^{-1}$  como referencia. La Tabla 2 muestra los valores de los índices de carbonilo y vinilo para un control (sin tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), la muestra inicial (día 0) y las muestras finales (día 30) de los experimentos de biodegradación ensayados a  $20^\circ\text{C}$  y  $30^\circ\text{C}$ .

Tabla 2. Índices carbonílicos y vinílicos calculados para los MPs muestreados.

<b>Muestra</b>	<b>Índice carbonílico</b>	<b>Índice vinílico</b>
Control	0,36 ± 0,05	0,33 ± 0,05
Inicial	0,32 ± 0,05	0,30 ± 0,08
Final 20°C	0,62 ± 0,11	0,58 ± 0,15
Final 30°C	0,62 ± 0,02	0,48 ± 0,08

Como se observa, el tratamiento con peróxido de hidrógeno empleado para eliminar la materia orgánica de las muestras no tiene ningún efecto en la composición de la superficie de los MPs, ya que los índices carbonílico y vinílico del control y la muestra inicial son muy próximos entre sí. Por otra parte, se observa un incremento importante de ambos índices tras los ensayos a 20°C y 30°C. Los índices obtenidos tras el tratamiento con el microorganismo son claramente superiores a los obtenidos a tiempo inicial, aunque muy similares entre sí. Este hecho indica una mayor presencia de grupos funcionales carbonilo y vinilo en los MPs muestreados tras el proceso de biodegradación, lo que corrobora la oxidación que están sufriendo los MPs a medida que van siendo degradados por la acción microbiana. Esto coincide con la acumulación gradual sobre la superficie de los MPs de grupos funcionales carbonilo observada en otros estudios de biodegradación de MPs (Celik et al., 2023; Ojha et al., 2017).

Además, las alteraciones en la composición de los microplásticos fueron también evaluadas mediante el análisis elemental EDS. En la Tabla 3 se representan los datos obtenidos tras el análisis elemental llevado a cabo sobre la superficie de los MPs mediante el microscopio electrónico de barrido, donde carbono (C) y oxígeno (O) fueron los elementos mayoritarios detectados. Se calculó la relación molar O/C para evaluar cómo varía la composición química de los MPs. Al comparar las muestras iniciales tratadas con peróxido de hidrógeno y las muestras sin tratamiento (control) no se encontró ninguna diferencia significativa en la composición en carbono y oxígeno. Con respecto a las muestras de MPs tomadas tras finalizar los experimentos, aumentó la proporción de oxígeno frente al carbono, respecto a la muestra tomada a tiempo inicial, en todos ellos, indicando que los MPs han sufrido una oxidación superficial, lo que coincide con los resultados de otros estudios sobre la biodegradación de microplásticos de polietileno por

parte de consorcios de bacterias, donde se observó el aumento de la relación O/C como consecuencia del proceso de biodegradación de los MPs (Liu et al., 2022; Skariyachan et al., 2017).

Tabla 3. Análisis elemental normalizado de la composición en carbono y oxígeno de los MPs.

Muestra	Carbono (%)	Oxígeno (%)	Relación molar O/C
Control	92,11	7,67	0,06
Inicial	92,37	7,06	0,06
Final 10°C	92,07	8,84	0,08
Final 20°C	89,17	9,88	0,08
Final 30°C	91,78	8,91	0,07

#### 4.4. Observación de la estructura de los MPs

La Figura 35 muestra las imágenes tomadas al estereomicroscopio de los microplásticos de PEAD antes y después del experimento de biodegradación. Se puede observar que los MPs presentan entre sí formas y tamaños muy heterogéneos, tanto al inicio (Figura 35 a) como al final del experimento a 30 °C (Figura 35 b). En cuanto a su morfología, los MPs empleados eran mayoritariamente fragmentos con formas irregulares. En este caso, el color morado de los MPs se debe al colorante utilizado en la fabricación del envase alimentario del que se partió para obtenerlos. Cabe destacar que, al realizar la comparación entre las muestras de los microplásticos antes y después del tratamiento, no se observaron diferencias notables en el estereomicroscopio.

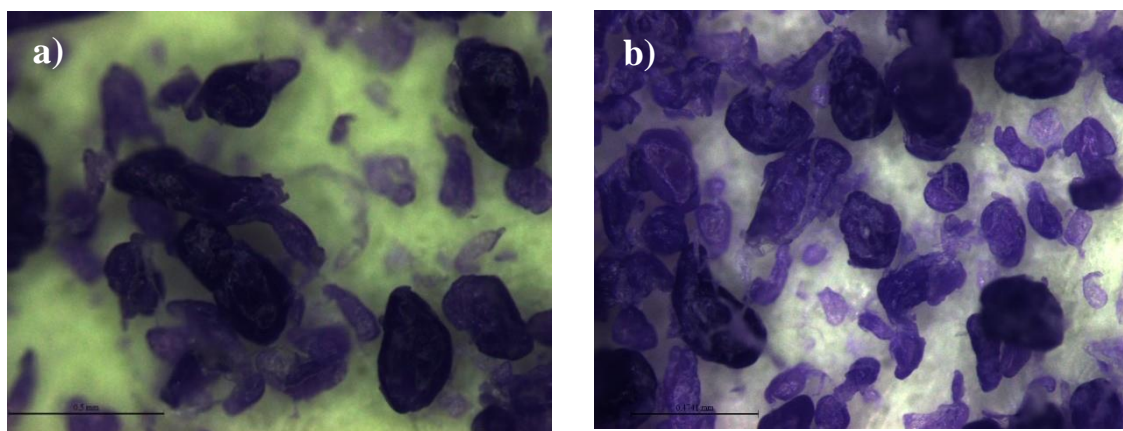


Figura 35. Imágenes al estereomicroscopio de los MPs de PEAD antes (a) y después (b) del ensayo de biodegradación a 30 °C.

Por el contrario, sí que se observaron cambios en la morfología superficial de los MPs iniciales y finales al analizarlos mediante microscopía SEM. En la Figura 36 se muestran las micrografías electrónicas de barrido de las muestras de MPs iniciales (día 0) y finales (día 30) de los experimentos de biodegradación ensayados a 10°C, 20°C y 30°C.

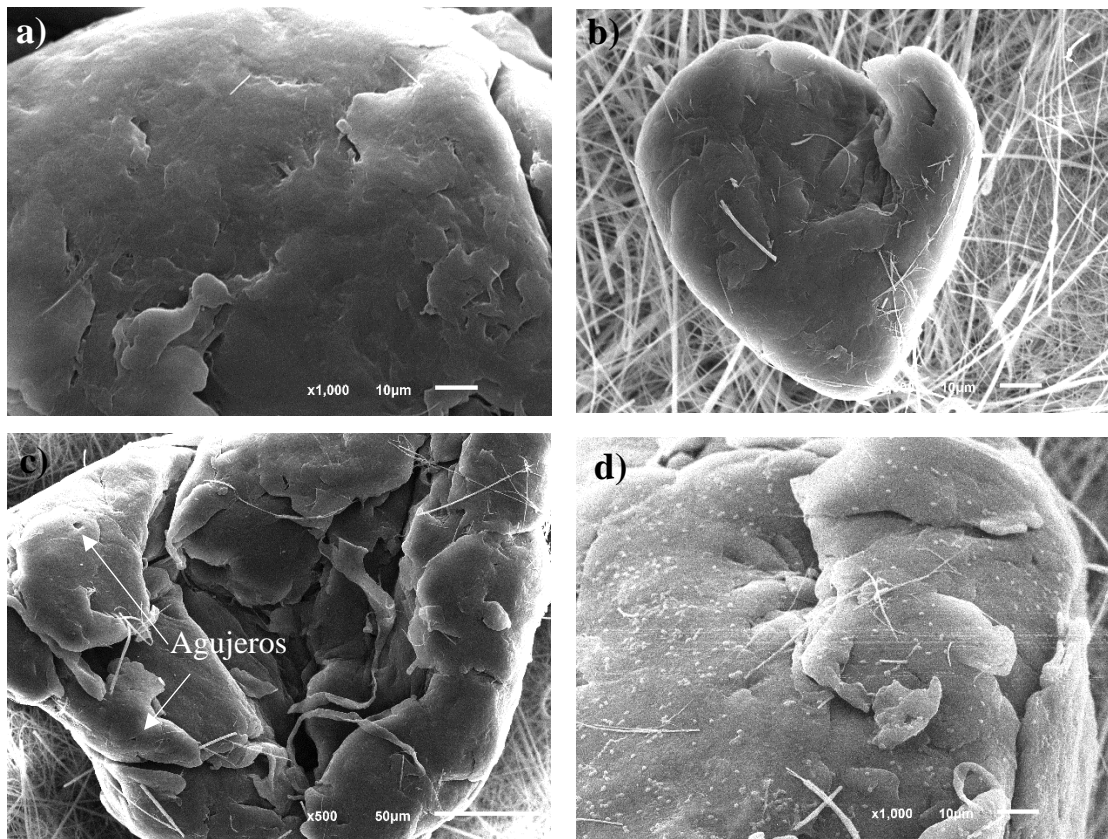


Figura 36. Micrografías electrónicas de barrido de los MPs de PEAD tomados al inicio (a) y al final de los ensayos de biodegradación a 10°C (b), 20°C (c) y 30°C (d).

Las imágenes tomadas al SEM muestran que los MPs antes de los ensayos tienen una superficie más lisa (Figura 36 a), mientras que en las imágenes de los MPs tras los ensayos de biodegradación se observaron varias fisuras e irregularidades en su superficie. Además, en la imagen de los MPs tras el experimento a 20°C se puede apreciar la aparición de agujeros (Figura 36 c). Por otro lado, en la micrografía a 1000x de la muestra final del ensayo a 30°C (Figura 36 d) se aprecian bacterias sobre la superficie de los MPs, estas permanecieron adheridas pese al proceso de lavado llevado a cabo en los MPs para la preparación para el microscopio. Esto corrobora el hecho de que a medida que avanza el proceso de degradación se produce la colonización de la superficie de los MPs por las bacterias, formando biopelículas en su superficie. De hecho, en varios estudios

encontrados en los que se emplea la microscopía electrónica de barrido para el análisis de la biodegradación de polímeros plásticos, se observa, tras retirar los microorganismos adheridos, que su superficie ha sido erosionada y se han formado varios agujeros y cavidades, lo que informa de la forma en que las bacterias colonizan los MPs (Bonhomme et al., 2003; Syranidou et al., 2017).

## 5. Conclusiones

- Se observó que la presencia de los MPs ejerció un efecto significativo sobre el crecimiento de *Paenibacillus macquarensis*, lo que pudiera deberse a la liberación de compuestos tóxicos durante la degradación, siendo las máximas velocidades específicas de crecimiento mucho menores que en los cultivos realizados con el mismo medio en ausencia de MPs.
- El crecimiento de *P. macquarensis* en presencia de MPs varió en función de la temperatura, aunque la concentración máxima fue similar. La máxima velocidad específica de crecimiento de *P. macquarensis* fue mayor en el experimento a 20°C que en el de 30 °C, siendo 0,0314 h<sup>-1</sup> y 0,0168 h<sup>-1</sup>, respectivamente.
- Los ensayos de biodegradación de MPs con *P. macquarensis* mostraron una mayor eficacia a las mayores temperaturas ensayadas, siendo la eficacia de degradación del 13 % a 30 °C, 11 % a 20 °C y 7 % a 10 °C.
- La concentración de azúcares totales disminuyó desde el comienzo de la incubación en los tres ensayos realizados con MPs, ralentizándose la velocidad con la que eran consumidos coincidiendo con el inicio de la degradación de los MPs.
- El pH del medio aumentó durante los experimentos de degradación desde valores iniciales, próximos a la neutralidad, hasta valores próximos a 9. El mantenimiento de estas condiciones alcalinas en el medio de cultivo también podría contribuir al decrecimiento de la viabilidad al final del experimento.
- El análisis por espectrofotometría FTIR de los MPs mostró que sus índices carbonílico y vinílico se incrementaron tras el ensayo, en comparación con las muestras iniciales, lo que muestra la oxidación que están sufriendo los MPs a medida que van siendo degradados por la acción microbiana. Esto se corroboró con el aumento de la relación O/C, observada por análisis elemental EDS.
- Mediante el análisis por SEM se pudo observar el deterioro en la superficie de los MPs y la aparición de cavidades o agujeros al finalizar los experimentos, indicadores del proceso de biodegradación.
- Los resultados obtenidos muestran el potencial de *Paenibacillus macquarensis* para la eliminación de MPs en medios contaminados y la influencia de las condiciones ambientales en los procesos de biodegradación.

## 6. Abreviaturas y símbolos

- EDAR = Estación depuradora de aguas residuales.
- FTIR = Espectrofotometría de Transformada de Fourier.
- IC = Índice carbonílico.
- IV = Índice vinílico.
- MPs = Microplásticos
- NB = Nutrient Broth
- PEAD = Polietileno de alta densidad.
- PEBD = Polietileno de baja densidad.
- PET = Tereftalato de polietileno.
- PP = Polipropileno.
- PS = Poliestireno.
- PVC = Policloruro de vinilo.
- SEM = Microscopio electrónico de barrido.
- UFC = Unidades formadoras de colonias.

## 7. Bibliografia

Akdogan, Z., & Guven, B. (2019). Microplastics in the environment: A critical review of current understanding and identification of future research needs. *Environmental Pollution*, 254, 113011. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113011>

Arpia, A. A., Chen, W.-H., Ubando, A. T., Naqvi, S. R., & Culaba, A. B. (2021). 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*, 418, 126381. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126381>

Auta, H. S., Abioye, O. P., Aransiola, S. A., Bala, J. D., Chukwuemeka, V. I., Hassan, A., Aziz, A., & Fauziah, S. H. (2022). Enhanced microbial degradation of PET and PS microplastics under natural conditions in mangrove environment. *Journal of Environmental Management*, 304, 114273. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114273>

Auta, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 231(Pt 2), 1552-1559. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.043>

Auta, H. S., Emenike, C. U., Jayanthi, B., & Fauziah, S. H. (2018). Growth kinetics and biodeterioration of polypropylene microplastics by *Bacillus* sp. And *Rhodococcus* sp. Isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 127, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.036>

Bacha, A.-U.-R., Nabi, I., Zaheer, M., Jin, W., & Yang, L. (2023). Biodegradation of macro- and micro-plastics in environment: A review on mechanism, toxicity, and future perspectives. *Science of The Total Environment*, 858, 160108. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160108>

Balasubramanian, V., Natarajan, K., Hemambika, B., Ramesh, N., Sumathi, C. S., Kottaimuthu, R., & Rajesh Kannan, V. (2010). High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2), 205-211. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02883.x>

Behera, S., & Das, S. (2023). Environmental impacts of microplastic and role of plastisphere microbes in the biodegradation and upcycling of microplastic. *Chemosphere*, 334, 138928. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138928>



- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A.-M., Lemaire, J., Sancelme, M., & Scott, G. (2003). Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 81(3), 441-452. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(03\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00129-0)
- Celik, M., Nakano, H., Uchida, K., Isobe, A., & Arakawa, H. (2023). Comparative evaluation of the carbonyl index of microplastics around the Japan coast. *Marine Pollution Bulletin*, 190, 114818. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114818>
- Chaukura, N., Kefeni, K. K., Chikurunhe, I., Nyambiya, I., Gwenzi, W., Moyo, W., Nkambule, T. T. I., Mamba, B. B., & Abulude, F. O. (2021). Microplastics in the Aquatic Environment—The Occurrence, Sources, Ecological Impacts, Fate, and Remediation Challenges. *Pollutants*, 1(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/pollutants1020009>
- Chen, X., Xu, M., Yuan, L., Huang, G., Chen, X., & Shi, W. (2021). Degradation degree analysis of environmental microplastics by micro FT-IR imaging technology. *Chemosphere*, 274, 129779. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129779>
- Cox, K. D., Covernton, G. A., Davies, H. L., Dower, J. F., Juanes, F., & Dudas, S. E. (2020). Correction to Human Consumption of Microplastics. *Environmental Science & Technology*, 54(17), 10974-10974. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04032>
- Dörnyei, K. R., Uysal-Unalan, I., Krauter, V., Weinrich, R., Incarnato, L., Karlovits, I., Colelli, G., Chrysochou, P., Fenech, M. C., Pettersen, M. K., Arranz, E., Marcos, B., Frigerio, V., Apicella, A., Yildirim, S., Poças, F., Dekker, M., Johanna, L., Coma, V., & Corredig, M. (2023). Sustainable food packaging: An updated definition following a holistic approach. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1119052>
- Enyoh, C. E., Shafea, L., Verla, A. W., Verla, E. N., Qingyue, W., Chowdhury, T., & Paredes, M. (2020). Microplastics Exposure Routes and Toxicity Studies to Ecosystems: An Overview. *Environmental Analysis, Health and Toxicology*, 35(1), e2020004. <https://doi.org/10.5620/eaht.e2020004>
- Farzi, A., Dehnad, A., Shirzad, N., & Norouzifard, F. (2017). Biodegradation of high density polyethylene using *Streptomyces* species. *Journal of Coastal Life Medicine*, 5, 474-479. <https://doi.org/10.12980/jclm.5.2017J7-94>
- Gaylarde, C. C., de Almeida, M. P., Neves, C. V., Neto, J. A. B., & da Fonseca, E. M. (2023). The Importance of Biofilms on Microplastic Particles in Their Sinking Behavior and the Transfer of Invasive Organisms between Ecosystems. *Micro*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/micro3010022>

Geijer, T. (s. f.). Six ways to tackle the plastic puzzle in food packaging. ING Think. Recuperado 25 de mayo de 2024, de <https://think.ing.com/articles/six-ways-to-tackle-the-plastic-puzzle-in-food-packaging/>

Gong, J., Kong, T., Li, Y., Li, Q., Li, Z., & Zhang, J. (2018). Biodegradation of Microplastic Derived from Poly(ethylene terephthalate) with Bacterial Whole-Cell Biocatalysts. *Polymers*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/polym10121326>

González-López, M. E., Calva-Estrada, S. de J., Gradilla-Hernández, M. S., & Barajas-Álvarez, P. (2023). Current trends in biopolymers for food packaging: A review. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1225371>

Gurjar, U. R., Xavier, M., Nayak, B. B., Ramteke, K., Deshmukhe, G., Jaiswar, A. K., & Shukla, S. P. (2021). Microplastics in shrimps: A study from the trawling grounds of north eastern part of Arabian Sea. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(35), 48494-48504. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14121-z>

Hopewell, J., Dvorak, R., & Kosior, E. (2009). Plastics recycling: Challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1526), 2115-2126. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0311>

Hoshino, T., Nakabayashi, T., Hirota, K., Matsuno, T., Koiwa, R., Fujiu, S., Saito, I., Tkachenko, O. B., Matsuyama, H., & Yumoto, I. (2009). *Paenibacillus macquariensis* subsp. *Defensor* subsp. *Nov.*, isolated from boreal soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 2074-2079. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.006304-0>

Hossain, S., Manan, H., Shukri, Z. N. A., Othman, R., Kamaruzzan, A. S., Rahim, A. I. A., Khatoon, H., Minhaz, T. M., Islam, Z., & Kasan, N. A. (2023). Microplastics biodegradation by biofloc-producing bacteria: An inventive biofloc technology approach. *Microbiological Research*, 266, 127239. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127239>

Huang, W., Song, B., Liang, J., Niu, Q., Zeng, G., Shen, M., Deng, J., Luo, Y., Wen, X., & Zhang, Y. (2021). 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*, 405, 124187. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124187>

Infografía: El mundo está inundado de residuos plásticos. (2024, junio 5). Statista Daily Data. <https://es.statista.com/grafico/30051/produccion-mundial-de-residuos-plasticos-por-tipo>

- Jadhav, E. B., Sankhla, M. S., Bhat, R. A., & Bhagat, D. S. (2021). Microplastics from food packaging: An overview of human consumption, health threats, and alternative solutions. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16, 100608. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100608>
- Jeon, J.-M., Park, S.-J., Choi, T.-R., Park, J.-H., Yang, Y.-H., & Yoon, J.-J. (2021). Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JJY0216 isolated from soil grove. *Polymer Degradation and Stability*, 191, 109662. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109662>
- Joo, S. H., Liang, Y., Kim, M., Byun, J., & Choi, H. (2021). Microplastics with adsorbed contaminants: Mechanisms and Treatment. *Environmental Challenges*, 3, 100042. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100042>
- L, E., Wilfred, N., S, K., Halder, G., Haldar, D., Patel, A. K., Singhanian, R. R., & Pandey, A. (2024). Biodegradation of microplastics: Advancement in the strategic approaches towards prevention of its accumulation and harmful effects. *Chemosphere*, 346, 140661. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140661>
- Lambert, S., & Wagner, M. (2018). Microplastics Are Contaminants of Emerging Concern in Freshwater Environments: An Overview. In M. Wagner & S. Lambert (Eds.), *Freshwater Microplastics: Emerging Environmental Contaminants?* (pp. 1-23). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-61615-5_1)
- Landrigan, P. J., Raps, H., Cropper, M., Bald, C., Brunner, M., Canonizado, E. M., Charles, D., Chiles, T. C., Donohue, M. J., Enck, J., Fenichel, P., Fleming, L. E., Ferrier-Pages, C., Fordham, R., Gozt, A., Griffin, C., Hahn, M. E., Haryanto, B., Hixson, R., ... Dunlop, S. (2023). The Minderoo-Monaco Commission on Plastics and Human Health. *Annals of Global Health*, 89(1), 23. <https://doi.org/10.5334/aogh.4056>
- Li, Q., Ma, C., Zhang, Q., & Shi, H. (2021). Microplastics in shellfish and implications for food safety. *Current Opinion in Food Science*, 40, 192-197. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.04.017>
- Li, S., Yang, Y., Yang, S., Zheng, H., Zheng, Y., M, J., Nagarajan, D., Varjani, S., & Chang, J.-S. (2023). Recent advances in biodegradation of emerging contaminants - microplastics (MPs): Feasibility, mechanism, and future prospects. *Chemosphere*, 331, 138776. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138776>

- Liu, B., Jiang, Q., Qiu, Z., Liu, L., Wei, R., Zhang, X., & Xu, H. (2022). Process analysis of microplastic degradation using activated PMS and Fenton reagents. *Chemosphere*, 298, 134220. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134220>
- Liu, H., Wen, X., Sun, Y., Zhang, H., Wang, H., & Wei, J. (2023). Identification, quantification and biodegradation of microplastics from personal care products and detergents by microorganism. *Journal of Water Process Engineering*, 53, 103754. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2023.103754>
- Marshall, B. J., & Ohye, D. F. (1966). *Bacillus macquariensis* n.sp., a Psychrotrophic Bacterium from Sub-Antarctic Soil. *Microbiology*, 44(1), 41-46. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-1-41>
- Martínez, K. I., González, R., Soto, J. J., & Rosales, I. (2021). Characterization by FTIR spectroscopy of degradation of polyethylene films exposed to CO<sub>2</sub> laser radiation and domestic composting. *Journal of Physics: Conference Series*, 1723(1), 012038. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1723/1/012038>
- Masiá, P., Sol, D., Ardura, A., Laca, A., Borrell, Y. J., Dopico, E., Laca, A., Machado-Schiaffino, G., Díaz, M., & Garcia-Vazquez, E. (2020). Bioremediation as a promising strategy for microplastics removal in wastewater treatment plants. *Marine Pollution Bulletin*, 156, 111252. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111252>
- Mohanani, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., & Levin, D. B. (2020). Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709>
- Muenmee, S., Chiemchaisri, W., & Chiemchaisri, C. (2016). Enhancement of biodegradation of plastic wastes via methane oxidation in semi-aerobic landfill. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 113, 244-255. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.03.016>
- Nakatani, H. (2022, agosto 23). Preparation method of marine microplastic model in a short degradation time. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1976856/v1>
- Newrick, B. A., Laca, A., & Laca, A. (2024). Mitigación mediante bacterias, hongos y organismos superiores de los impactos ambientales ocasionados por microplásticos en ecosistemas acuáticos. *Revista de la Ingeniería del agua*, 28.
- Nielsen, S. S. (2017). Total Carbohydrate by Phenol-Sulfuric Acid Method. En S. S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis Laboratory Manual* (pp. 137-141). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_14)

- Nowak, B., Pająk, J., Drozd-Bratkowicz, M., & Rymarz, G. (2011). Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(6), 757-767. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.007>
- Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Shrivastava, A., Khatua, P., Rai, V., & Bose, S. (2017). Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports*, 7(1), 39515. <https://doi.org/10.1038/srep39515>
- Osman, A. I., Hosny, M., Eltaweil, A. S., Omar, S., Elgarahy, A. M., Farghali, M., Yap, P.-S., Wu, Y.-S., Nagandran, S., Batumalaie, K., Gopinath, S. C. B., John, O. D., Sekar, M., Saikia, T., Karunanithi, P., Hatta, M. H. M., & Akinyede, K. A. (2023). Microplastic sources, formation, toxicity and remediation: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 21(4), 2129-2169. <https://doi.org/10.1007/s10311-023-01593-3>
- Pan, Z., Liu, Q., Xu, J., Li, W., & Lin, H. (2022). Microplastic contamination in seafood from Dongshan Bay in southeastern China and its health risk implication for human consumption. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 303, 119163. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119163>
- Park, S. Y., & Kim, C. G. (2019). Biodegradation of micro-polyethylene particles by bacterial colonization of a mixed microbial consortium isolated from a landfill site. *Chemosphere*, 222, 527-533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.159>
- Pathak, V. M. & Navneet. (2023). Exploitation of bacterial strains for microplastics (LDPE) biodegradation. *Chemosphere*, 316, 137845. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.137845>
- Polyolefins • Plastics Europe. (s. f.). Plastics Europe. Recuperado 8 de junio de 2024, de <https://plasticseurope.org/plastics-explained/a-large-family/polyolefins/>
- Rahman, A., Sarkar, A., Yadav, O. P., Achari, G., & Slobodnik, J. (2021). Potential human health risks due to environmental exposure to nano- and microplastics and knowledge gaps: A scoping review. *Science of The Total Environment*, 757, 143872. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143872>
- Ramkumar, Mu., Balasubramani, K., Santosh, M., & Nagarajan, R. (2022). The plastisphere: A morphometric genetic classification of plastic pollutants in the natural environment. *Gondwana Research*, 108, 4-12. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2021.07.004>

Schweitzer, J.-P., Gionfra, S., Pantzar, M., Mottershead, D., Watkins, E., & Petsinaris, F. (s. f.). UNWRAPPED: HOW THROWAWAY PLASTIC IS FAILING TO SOLVE EUROPE'S FOOD WASTE PROBLEM (AND WHAT WE NEED TO DO INSTEAD).

Semcesen, P. O., & Wells, M. G. (2021). Biofilm growth on buoyant microplastics leads to changes in settling rates: Implications for microplastic retention in the Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*, 170, 112573. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112573>

Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246-265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.005>

Sharma, S., Basu, S., Shetti, N. P., Nadagouda, M. N., & Aminabhavi, T. M. (2021). Microplastics in the environment: Occurrence, perils, and eradication. *Chemical Engineering Journal*, 408, 127317. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127317>

Singh, L., & Wahid, Z. A. (2015). Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.05.035>

Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 422-426. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.01.013>

Skariyachan, S., Setlur, A. S., Naik, S. Y., Naik, A. A., Usharani, M., & Vasist, K. S. (2017). Enhanced biodegradation of low and high-density polyethylene by novel bacterial consortia formulated from plastic-contaminated cow dung under thermophilic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9), 8443-8457. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8537-0>

Sol, D., Laca, A., Laca, A., & Díaz, M. (2020). Approaching the environmental problem of microplastics: Importance of WWTP treatments. *Science of The Total Environment*, 740, 140016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140016>

Sol Sánchez, D., Laca Pérez, A., Díaz Fernández, M., Simón Andreu, P., Abellán, M., Pérez Sánchez, P., & Rancaño Pérez, A. (2020). Microplásticos en estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas. *Industria química*, 76, 50-56.

Syranidou, E., Karkanorachaki, K., Amorotti, F., Repouskou, E., Kroll, K., Kolvenbach, B., Corvini, P. F.-X., Fava, F., & Kalogerakis, N. (2017). Development of tailored indigenous marine consortia for the degradation of naturally weathered polyethylene films. *PloS One*, 12(8), e0183984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183984>

- Tian, L., Jinjin, C., Ji, R., Ma, Y., & Yu, X. (2022). Microplastics in agricultural soils: Sources, effects, and their fate. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 25, 100311. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100311>
- Tourova, T. P., Sokolova, D. Sh., Nazina, T. N., Gruzdev, D. S., & Laptev, A. B. (2020). Phylogenetic Diversity of Microbial Communities from the Surface of Polyethylene Terephthalate Materials Exposed to Different Water Environments. *Microbiology*, 89(1), 96-106. <https://doi.org/10.1134/S0026261720010154>
- Vethaak, A. D., & Legler, J. (2021). Microplastics and human health. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6530), 672-674. <https://doi.org/10.1126/science.abe5041>
- Wahl, A., Le Juge, C., Davranche, M., El Hadri, H., Grassl, B., Reynaud, S., & Gigault, J. (2021). Nanoplastic occurrence in a soil amended with plastic debris. *Chemosphere*, 262, 127784. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127784>
- Weber, F., Kerpen, J., Wolff, S., Langer, R., & Eschweiler, V. (2021). Investigation of microplastics contamination in drinking water of a German city. *Science of The Total Environment*, 755, 143421. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143421>
- Wei, X.-F., Bohlén, M., Lindblad, C., Hedenqvist, M., & Hakonen, A. (2021). Microplastics generated from a biodegradable plastic in freshwater and seawater. *Water Research*, 198, 117123. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117123>
- Xu, S., Ma, J., Ji, R., Pan, K., & Miao, A.-J. (2020). Microplastics in aquatic environments: Occurrence, accumulation, and biological effects. *Science of The Total Environment*, 703, 134699. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134699>
- Yates, J., Deeney, M., White, H., Joy, E., Kalamatianou, S., & Kadiyala, S. (2019). PROTOCOL: Plastics in the food system: Human health, economic and environmental impacts. A scoping review. *Campbell Systematic Reviews*, 15(1-2), e1033. <https://doi.org/10.1002/cl2.1033>
- Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y., & Yu, F. (2020). Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. *The Science of the Total Environment*, 715, 136968. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136968>
- Zhang, Y., Kang, S., Allen, S., Allen, D., Gao, T., & Sillanpää, M. (2020). Atmospheric microplastics: A review on current status and perspectives. *Earth-Science Reviews*, 203, 103118. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2020.103118>