

¿Son los microplásticos vehículos de contaminación microbiana?



Trabajo Fin de Máster

Alumno: Alberto García Rodríguez

Tutores: Jacob Lorenzo Morales y Cintia Hernández Sánchez

**Máster Universitario en Investigación y Diagnóstico de
Enfermedades Tropicales**

Curso académico 2020-2021

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción.....	3
1.1. Los microplásticos.....	3
1.2. Microbiota asociada.....	4
2. Objetivos.....	6
3. Material y Métodos	7
3.1. Trabajo de campo y área de estudio.....	7
3.2. Análisis de laboratorio.....	9
3.2.1. Detección de ARN de <i>SARS-Cov2</i> en muestras de microplásticos, arenas y aguas. .	10
3.2.2. Determinación de la presencia de <i>Escherichia coli</i> en muestra de microplásticos, arenas y aguas.	10
3.2.3. Identificación de otros patógenos gastrointestinales y cepas de <i>E.coli</i> mediante Film Array.....	11
3.2.4. Recuento y clasificación de microplásticos.....	11
4. Resultados y discusión	12
4.1. Presencia de <i>Escherichia coli</i>	12
4.2. Presencia de <i>SARS-Cov2</i>	14
4.3. Identificación de microorganismos.....	17
4.4. Recuento y clasificación de microplásticos	18
5. Conclusiones.....	20
6. Bibliografía.....	21

Resumen

En la actualidad los microplásticos son la basura marina más común y ampliamente distribuida en los mares y océanos del mundo, presentando un gran problema de contaminación. La colonización de su superficie por un conjunto variado de microorganismos procariotas y eucariotas es habitual. La formación de biofilms por parte de estos microorganismos da lugar a la formación de comunidades características a las cuales se les referencia con el término de ‘‘plastisfera’’. Estos microplásticos podrían actuar como medio de transporte de microorganismos, entre los cuales se pueden encontrar patógenos.

El objetivo de este trabajo es detectar la presencia de estos organismos en los microplásticos recogidos en la última línea de marea en Playa Grande. Para ello se ha llevado a cabo una serie de muestreos, de marzo hasta mayo de 2021. Se realizaron cultivos en laboratorio para estudiar la presencia de *Escherichia Coli* y PCR-RT para la presencia de *SARS-Cov2* en microplásticos, arena y agua. También se realizó la identificación de especies de microorganismos patógenos gastrointestinales a través del sistema Film Array, así como un recuento y clasificación por colores de los microplásticos para estimar el tiempo que llevan a la deriva.

Los resultados demuestran la presencia de estos dos microorganismos en microplásticos, aguas y arenas de Playa Grande. El desgaste de color que han mostrado los microplásticos indica que estos llevan mayor tiempo a la deriva, encontrándose de esta manera más expuestos a la colonización por microorganismos y pudiendo actuar como un posible vehículo de transmisión de contaminación microbiana.

Abstract

Nowadays microplastics are the most common and widely distributed marine waste and represents a major problem of global pollution. The colonization of their surface from a wide set of prokaryotic and eukaryotic microorganism is common. Biofilm formation by these microorganisms gives rise to the formation of characteristic communities which are referred as “plastisphere”. Therefore microplastics may serve as a transport medium for microorganism, including pathogens.

The aim of this study is to spot the presence of these microorganisms in the microplastics collected in the last tide line in Playa Grande. A laboratory experiment was also performed to spot the presence of *Escherichia Coli* and *SARS-Cov2* in microplastics, water and sand samples. In addition a the identification of gastrointestinal pathogens was carried out through a Film Array, as well as a count and color classification of the microplastics to determine how long they drifted in the sea.

The results show the presence of both microorganism in microplastics, water and sand samples in Playa Grande. The color degradation that microplastics have shown indicates that these have been drifting in the sea for a long time, increasing their exposure to colonization and acting as a means of transporting for microorganisms.

1. Introducción.

1.1. Los microplásticos.

El término plástico hace referencia a los polímeros fabricados por el hombre a partir de la polimerización de monómeros de petróleo, gas, carbón, celulosa o látex vegetal. En la actualidad vivimos en un “mundo de plástico” donde casi todo lo que nos rodea está fabricado a partir de este material¹.

Actualmente el plástico es la basura marina más común, representando un gran problema de contaminación global, algunos estudios demuestran que la mayoría de los plásticos son capaces de permanecer en el medio durante décadas. Se ha estimado que del total de la basura marina del mundo entre un 60% y un 80% se encuentran en forma de plástico². La mayoría de los plásticos encontrados en el medio marino provienen de un tratamiento inadecuado en la eliminación de residuos terrestres³.

La producción de plástico, se ha incrementado drásticamente a nivel global desde los años 60 y sigue creciendo en la actualidad, con una producción actual de aproximadamente 368 millones de toneladas al año en el 2019⁴.

Dentro de los plásticos, los microplásticos son la basura marina que se encuentra en mayor cantidad en el medio marino, encontrándose ampliamente distribuidos, tanto en superficie, en la columna de agua o incluso en los sedimentos². Debido a los diversos tamaños en los que este residuos se puede encontrar en el medio, Crawford et al en el 2017 propone la siguiente clasificación: macrolásticos (tamaño superior a 25 mm), mesoplásticos (tamaño en el rango 5-25 mm), microplásticos (1-5 mm), mini-microplásticos (1 mm-1 μ m) y nanoplásticos (tamaño <1 μ m)⁵. Por tanto, se consideran microplásticos las partículas con un tamaño comprendido entre 1 μ m a 5 mm.

Los plásticos en el mar están sometidos a distintos procesos de degradación por factores ambientales, lo que lleva a su fragmentación. La formación de microplásticos en el océano depende de la combinación de los factores ambientales y las propiedades del polímero.

A su vez dentro del rango de los microplásticos podemos diferenciar entre:

- Microplásticos primarios: Son las partículas que han sido fabricadas a ese tamaño las cuales incluyen limpiadores industriales, microperlas utilizadas en productos de

cosmética, fibras de ropa y pellets de resina esféricos o cilíndricos utilizados como materia prima para la fabricación de productos plásticos^{6,7}.

- Microplásticos secundarios: Son las partículas de mayor tamaño que, debido a diversos procesos de degradación, se han fragmentado hasta alcanzar el tamaño de microplásticos^{7,8}.

Aunque los microplásticos son la basura marina más frecuente en los ecosistemas marinos, solo componen una pequeña porción de la masa total de plásticos en los océanos⁶. Esto significa que, aunque fuéramos capaces de parar el flujo de microplásticos hacia el mar, la degradación de los productos plásticos de mayor tamaño que ya se encuentran en el mar y las playas resultaría en un flujo constante de microplásticos durante muchos años⁴.

1.2. Microbiota asociada

En la actualidad existe preocupación por el impacto ecológico que estos residuos plásticos pueden producir. Los microplásticos representan un peligro físico directo para la vida marina, pero además otras propiedades como su prevalencia y ratio área-volumen han aumentado las preocupaciones sobre la capacidad de estos de actuar como vector de microorganismos patógenos para el ser humano⁹.

Los microplásticos pueden ser colonizados por un grupo heterogéneo de microorganismos, siendo las diatomeas y bacterias los microorganismos más frecuentes¹⁰. La presencia de estos microorganismos en la superficie de los microplásticos forman la recientemente denominada ‘‘plastisfera’’ término que se utiliza para describir a estos hábitats microbianos característicos que se forman alrededor de las partículas de plástico presentes en los ecosistemas acuáticos¹¹.

La superficie de los plásticos proporciona un sustrato para el crecimiento de estas comunidades de microorganismos, formando si las condiciones lo permiten, un biofilm o biopelícula. El biofilm es por sí mismo un ecosistema constituido a partir de una o varias especies de microorganismos, los cuales secretan una matriz extracelular que les permite aumentar la fijación a la superficie de los microplásticos. Esto conlleva un aumento de la resistencia a condiciones ambientales y a otros factores adversos¹¹.

La formación de este biofilm es un proceso dinámico que comienza cuando las bacterias se encuentran en condiciones medioambientales que desencadenan la transición a la vida en superficie. Estas señales medioambientales varían según el organismo, por ejemplo algunas cepas de *Escherichia coli* y de *Vibrio* no llegan a formar el biofilm a no ser que sean

suplementados con aminoácidos, por otro lado existen cepas de *E.coli* que son capaces de formar biofilm solamente cuando se encuentran en un medio con una baja concentración de nutrientes¹².

Existen diversos factores que determinan la fijación de los microorganismos al plástico como son el tipo de plásticos, la temperatura, la salinidad o la localización geográfica ¹³.

Dentro de estas comunidades microbianas, se han descrito microorganismos potencialmente patógenos. Se ha demostrado que el biofilm de los microplásticos se encuentra altamente colonizado por miembros del género *Vibrio*¹¹. También se han llevado a cabo estudios que demuestran la presencia de bacterias *Escherichia coli* formando parte del biofilm en pellets¹⁴.

Los microplásticos se han convertido en un vector de microorganismos más eficaz que otros sustratos naturales flotantes (como la madera) ya que pueden atravesar grandes distancias gracias a la durabilidad que posee este material. De esta manera, los organismos asociados a plásticos son capaces de llegar a introducirse en medios en los que habitualmente no se encuentran¹³. Es por esto que el potencial de los microplásticos para aumentar la supervivencia de microorganismos potencialmente patógenos y su capacidad para aumentar la exposición humana al proporcionar un vehículo de dispersión mucho más eficiente es un área de estudio que necesita de investigación urgente.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Estudiar la presencia de agentes patógenos en microplásticos (fragmentos y pellets) arena y aguas en Playa Grande.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar la presencia de *Escherichia coli* en muestras de microplásticos (fragmentos y pellets), arenas y aguas.
- Determinar la presencia de de *SARS-Cov 2* en muestras de microplásticos (fragmentos y pellets), arenas y aguas mediante PCR a tiempo real
- Identificar otros microorganismos patógenos gastrointestinales empleando un sistema de PCR múltiple Film Array.
- Estimar el tiempo que llevan a la deriva los microplásticos mediante un recuento y clasificación por colores de los fragmentos y pellets.

3. Material y Métodos

3.1. Trabajo de campo y área de estudio

Este estudio realiza un seguimiento en Playa Grande, ubicada en el municipio de Arico (Tenerife) situada en las coordenadas X: 359.438,20 Y: 3.114.911,95. Se trata de una playa de arena de una longitud total de 77 metros y con orientación NE.



Figura 1. Ubicación de Playa Grande en Tenerife. Fuente: Elaboración propia a partir de GRAFCAN.

La orientación y situación de esta playa junto a la exposición de fuertes vientos predominantes en dirección NNE (Figura 2) hacen que esta playa de forma continua reciba basuras marinas y entre ellos, microplásticos. Algunos estudios consideran esta playa un punto negro de llegada masiva de microplásticos en las Islas Canarias, llegando incluso a recibir 2971.5 partículas/m² ¹⁵.

Rosa de Velocidad Media (m/s) para Viento - Punto SIMAR 4025011
 Periodo: Primavera (2021 - 2021) - Eficacia: 100.00%

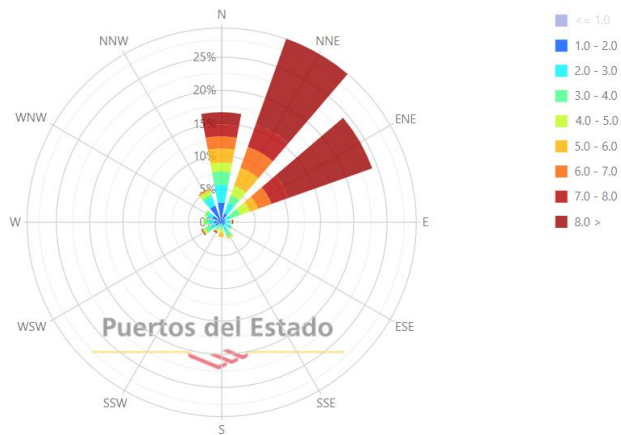


Figura 2. Rosa de velocidad media para viento en el punto más cercano a playa Grande durante la estación de primavera.

Fuente: Elaboración propia a partir de Puertos del Estado

El periodo de muestreo estuvo comprendido desde marzo hasta mayo de 2021. La recogida de plásticos se realizó sobre las 10:00h. En la siguiente tabla se muestran las fechas de los muestreos junto a la distribución de las mareas, especificando la hora de la pleamar/bajamar más cercana al comienzo del muestreo (tabla 2).

Fecha muestreo	Estado de la marea durante el muestreo		
16/03/21	Bajamar 8:54h	↓	Pleamar 14:08h
22/03/21	Pleamar a 7:44h	↑	Bajamar 13:56h
24/03/21	Pleamar a 10:33h	↑	Bajamar 16:45h
07/04/21	Bajamar a 5:40h	↓	Pleamar 11:52h
14/04/21	Bajamar a 9:20h	↓	Pleamar 15:32h
21/04/21	Pleamar a 9:46h	↑	Bajamar 15:58h
28/04/21	Bajamar a 8:53h	↓	Pleamar 15:05
05/05/21	Pleamar a 10:23h	↑	Bajamar 16:35h
12/05/21	Bajamar a 8:23h	↓	Pleamar 14:35h
19/05/21	Pleamar a 7:38h	↑	Bajamar 13:50h
26/05/21	Bajamar a 7:49h	↓	Pleamar 15:01h

Tabla 2. Fechas de muestreo y mareas.

Para la realización de estos muestreos se dividió la playa en 3 zonas (Figura 3). En cada zona se recogieron microplásticos (fragmentos y pellets), arena y agua.



Figura 3. Playa de Arico, zonas de muestreo. Fuente: Elaboración propia a partir de GRAFCAN.

Para la toma de muestras (fragmentos y pellets) se utilizaron pinzas estériles, tomando siempre las partículas plásticas presentes en la última línea de marea, a continuación eran depositados en tubos Falcon de 35 ml. Se recogieron siempre la misma cantidad de fragmentos mientras que los pellets al encontrarse en menor cantidad eran recogidos todos los disponibles.

Las muestras de arena fueron recogidas en tubos Falcon de 35 ml y para las muestras de agua se hizo uso de botellas estériles de vidrio de 1 L. Estas muestras de agua se tomaron realizando una única inmersión.

3.2. Análisis de laboratorio

Una vez en el laboratorio se prepararon las muestras para su posterior análisis. Las muestras de microplásticos y arenas fueron pesadas en una báscula electrónica de 4 décimas y posteriormente, llevadas a una cabina de seguridad biológica donde se les añadieron 5 ml de agua peptonada a cada una.

Para la detección de agentes patógenos este trabajo se enfocó en la presencia de *SARS-Cov2* y de *Escherichia coli*. Para ello se llevaron a cabo distintos métodos.

3.2.1. Detección de ARN de SARS-Cov2 en muestras de microplásticos, arenas y aguas.

Una vez preparadas las muestras de fragmentos, pellets y arenas con el agua peptonada se extrajeron 500 µl e introducidos en un tubo Eppendorf de 1 ml.

Para la detección del ARN de *SARS-Cov2* en agua se realizó un protocolo de concentración de virus en aguas marinas.

Tras este proceso se obtuvieron 12 tubos Eppendorf (4 por cada zona de muestreo; fragmentos, pellets, arena y agua) a los que les realizó una extracción de ARN Viral empleando el sistema automatizado Maxwell y el kit ‘‘Maxwell 16 viral Total Nucleic Acid Purification’’ y una RT-PCR múltiplex con el kit TaqPathCOVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit, para detectar la presencia del ARN de *SARS-Cov2*.

3.2.2. Determinación de la presencia de *Escherichia coli* en muestra de microplásticos, arenas y aguas.

La detección de la presencia de esta bacteria se llevó a cabo por diferentes métodos dependiendo del tipo de muestra.

Las muestras de fragmentos, pellets y arenas que se encontraban ya previamente preparadas con agua peptonada fueron incubadas durante 24 horas a 37°. Tras este tiempo se sembraron 100 µl de cada muestra en medios de cultivo Chromocult Agar y se incubaron las placas durante 24h a 37°. Tras este tiempo se procedió al recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Las muestras de agua se trataron el mismo día del muestreo. Se realizó una filtración por membrana para análisis microbiológico de aguas con filtros de 0.45µM. Posteriormente el filtro era depositado en un medio de cultivo Chromocult Agar e incubado a 37° durante 24h.

Tras esto se procedió al recuento de UFC. La utilización del medio Chromocult Agar permitió diferenciar las colonias de *E.coli* del resto de colonias de bacterias coliformes ya que las primeras desarrollaron color azul.

3.2.3. Identificación de otros patógenos gastrointestinales y cepas de *E.coli* mediante Film Array.

Para esta identificación se empleó el panel gastrointestinal de Film Array, esta prueba diagnóstica cualitativa está diseñada para detectar simultáneamente secuencias específicas de ácidos nucleicos de microorganismos.

Este sistema permite una detección automatizada, rápida y precisa para los patógenos gastrointestinales más comunes, incluyendo:

- Virus: Adenovirus, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus, Sapovirus.
- Bacterias: *Campylobacter*, *Clostridium*, *Plesiomonas*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersenia*, *E.coli* (EAEC), *E.coli* (EPEC), *E.coli* (ETEC), *E.coli* (STEC), *Shigella/EnteroinvasivaE.coli* (EIEC)
- Parásitos: *Cryptosporidium spp.*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*

3.2.4. Recuento y clasificación de microplásticos

La clasificación por colores se llevó a cabo siguiendo la paleta de colores

		HUES											
		Transparent	Black	Dark			Medium			Light		White	
		TR	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
COLOURS	Grey			G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	
	Green			E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	
	Turquoise			T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
	Cyan			C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	
	Sky			S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	
	Blue			B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	
	Violet			V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	
	Magenta			M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	
	Pink			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	
	Red			R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	
	Orange			O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	
	Brown			W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	
	Yellow			Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	

Figura 4. Paleta de 120 colores¹⁶.

Esta paleta se corresponde con una matriz de 120 colores y con una variable de 6 tonalidades (transparente, negro, oscuro, medio, claro y blanco). Los microplásticos se identificaron individualmente dándoles un valor dentro de esta matriz¹⁶.

4. Resultados y discusión

4.1. Presencia de *Escherichia coli*

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de bacterias *Escherichia coli* en un 26,51% con respecto al total de las muestras.

Fecha	Zona	Tipo de muestra	UFC/100 ml <i>E.coli</i>
16/03/2021	A	Fragmentos	84
16/03/2021	B	Agua	4
22/03/2021	A	Fragmentos	Incontables
22/03/2021	B	Agua	2
22/03/2021	C	Fragmentos	Incontables
22/03/2021	C	Agua	2
24/03/2021	A	Fragmentos	Incontables
24/03/2021	B	Agua	2
24/03/2021	C	Fragmentos	Incontables
24/03/2021	C	Agua	2
07/04/2021	A	Fragmentos	Incontables
07/04/2021	A	Agua	1
07/04/2021	B	Arena	1
07/04/2021	C	Arena	19
07/04/2021	C	Agua	2
28/04/2021	A	Agua	2
28/04/2021	C	Agua	14
28/04/2021	C	Agua	4
05/05/2021	A	Agua	26
05/05/2021	B	Pellet	Incontables

Tabla 5. Recuento de UFC de *E.coli* en Playa Grande en el periodo: 16/03/2021-26/05/2021

Para este trabajo se consideran incontables las placas atendiendo a dos criterios:

- Las placas en las que no era posible llevar a cabo el recuento debido a que se trataba de una superficie homogénea en la que no era posible distinguir colonias (Figura 6).

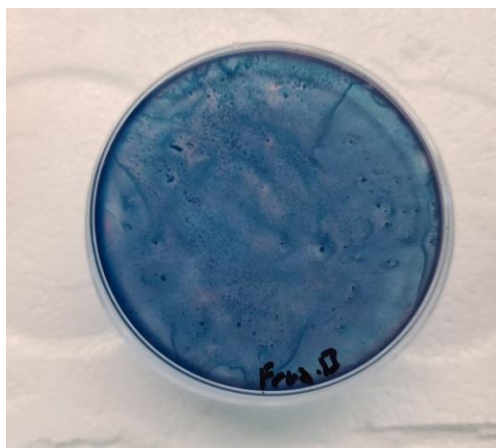


Figura 6. Placa de colonia homogénea de *E.coli* en medio Chromocult Agar. Fuente: Elaboración propia

- Las placas que superaron las 300 UFC (Figura 7).

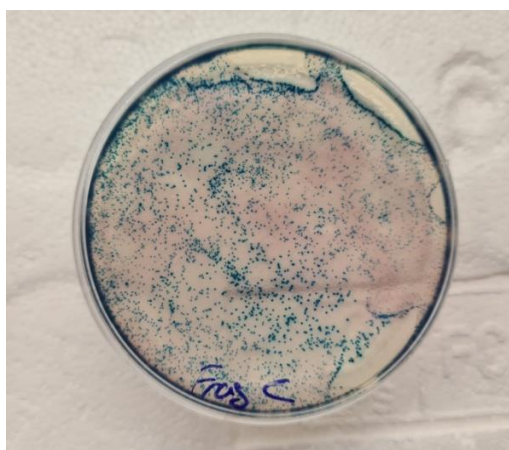


Foto 7. Placa con un $n > 300$ UFC de *E.coli* en medio Chromocult Agar. Fuente: Elaboración propia

Se observa del total de muestras positivas para *E.coli*, de las cuales un 62,85% se corresponden con muestras de aguas, un 25,71% con fragmentos, un 5,71% con arena y un 2,85% con pellets.

Cabe destacar que aunque *E.coli* se encuentre en un mayor porcentaje en muestras de agua, la cantidad de UFC que aparecen en el recuento es menor que en el resto de muestras positivas para esta bacteria. Los análisis de aguas cumplen los valores paramétricos del Real Decreto 1341/2007, de 11 de octubre, sobre la gestión de la calidad de aguas de baño para aguas costeras y de transición, el cual presenta los siguientes valores paramétricos:

	Calidad			Unidad
	Suficiente	Buena	Excelente	
<i>Escherichia coli</i>	500	500	250	UFC o NMP/100 ml

Tabla 6. Tabla de calidad de aguas. Fuente: Elaboración propia a partir del Real Decreto 1341/2007

Atendiendo a estos valores y los resultados obtenidos de los nuestros se puede situar la calidad del agua en Playa Grande en ‘‘Excelente’’ ya que ninguna de las muestras supera las 250 UFC/100ml.

La presencia de *E.coli* en microplásticos es más predominante en muestras de fragmentos frente a pellets. La superficie irregular (grietas, poros) de éstos podría suponer un reservorio con mayor resistencia a las condiciones ambientales fuera del medio marino y ayudar a la supervivencia de estos microorganismos. La colonización de los microplásticos por *E.coli* puede haber ocurrido durante el tiempo transcurrido en el mar o por el contacto directo en la playa, por ejemplo con heces de perros u otros animales¹⁷ o por el contacto directo con agua contaminada de material fecal¹⁸.

Otra variable que afecta a la colonización de *E.coli* es el tiempo que han pasado los microplásticos en el medio ambiente, ya que aquellos que hayan pasado más tiempo en el medio tienen mayores posibilidades de entrar en contacto con un diverso rango de microorganismos¹¹⁹

4.2. Presencia de SARS-Cov2

Los resultados obtenidos de las RT-PCR se han volcado en la tabla 3, en la que se muestran la fecha, la zona y el tipo de muestra en la que se ha detectado la presencia de SARS-Cov2:

Fecha	Zona	Muestra
16/03/2021	B	Fragmentos
22/03/2021	B	Fragmentos
22/03/2021	B	Pellets
07/04/2021	A	Fragmentos
07/04/2021	A	Pellets
07/04/2021	B	Fragmentos
07/04/2021	B	Pellets
07/04/2021	B	Arena
07/04/2021	C	Fragmentos
26/05/2021	B	Agua

Tabla 3. Información de las muestras positivas para SARS-Cov2 de Playa Grande

La presencia de ARN de *SARS-Cov2* es baja con respecto al total de las muestras (8,3%) aunque es notable destacar que la mayoría de muestras positivas se encontraban en la zona B (63,63%). Esto puede ser debido a la dinámica de la playa existiendo una dinámica acumulativa en la zona central.

La mayoría de muestras positivas para *SARS-Cov2* (80%) se corresponden con muestras de microplásticos (fragmentos y pellets). Estos resultados podrían indicar que los microplásticos pueden actuar como medio de soporte para biofilms, por lo que además de bacterias y protozoos también pueden acumular virus.

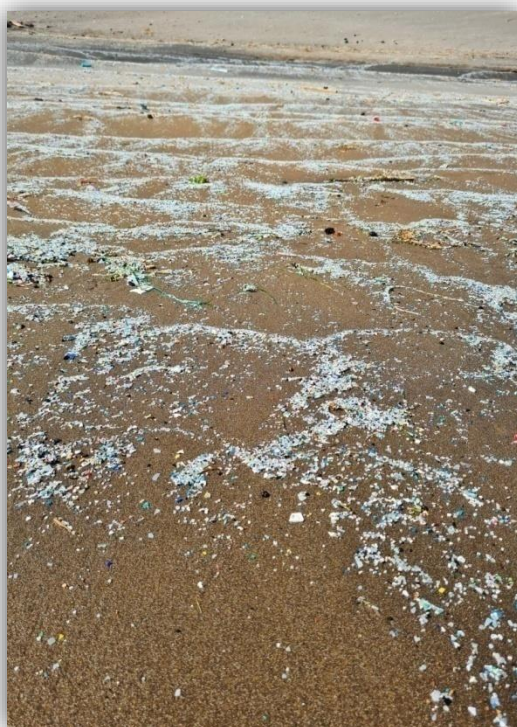
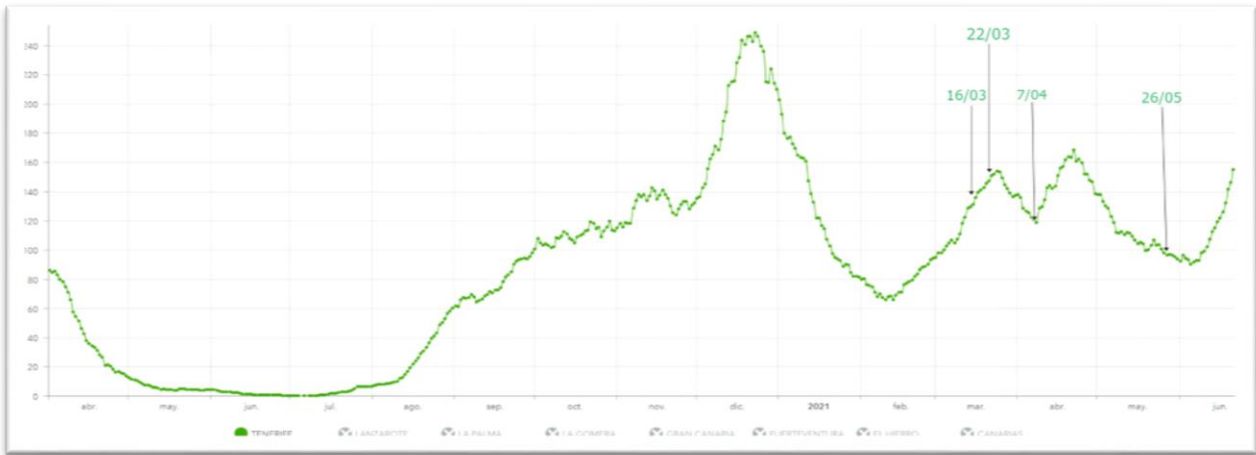


Figura 5. Microplásticos en la zona B de Playa Grande, 26/05/2021. Fuente

Se ha realizado una comparación de las fechas de los muestreos para los que se ha detectado *SARS-Cov2* con la incidencia diaria de la COVID en Canarias²⁰. Se ha observado que las fechas en las que se ha detectado la presencia de este patógeno coinciden con un aumento de la incidencia en los días/semanas posteriores al muestreo. Esto concuerda con estudios que demuestran que la presencia de *SARS-Cov2* es detectable en aguas residuales días antes de un aumento de casos de COVID en la población²¹.



Gráfica 1. Incidencia de la COVID en la isla de Tenerife. Fuente: Servicio Canario de salud.

Se realizó una comparación de la presencia de *E.coli* y *SARS-Cov2*. En la siguiente tabla se reflejan las fechas de los muestreos en los que se ha obtenido resultado positivo para alguno de estos microorganismos:

Fecha	Microplásticos (E.coli)	Arena(E.coli)	Agua(E.coli)	Microplásticos(SARS-Cov2)	Arena (SARS-Cov2)	Agua(SARS-Cov2)
16/03/2021	Presente (84 ufc)	Ausente	Presente (4 ufc)	Presente	Ausente	Ausente
22/03/2021	Presente (ufc incontables)	Ausente	Presente (4 ufc)	Presente	Ausente	Ausente
24/03/2021	Presente (ufc incontables)	Ausente	Presente (4 ufc)	Presente	Presente	Ausente
07/04/2021	Presente (ufc incontables)	Presente (20 ufc)	Presente (3 ufc)	Ausente	Ausente	Ausente
28/04/2021	Ausente	Ausente	Presente (20 ufc)	Ausente	Ausente	Ausente
05/05/2021	Presente (ufc incontables)	Ausente	Presente (43 ufc)	Ausente	Ausente	Ausente
12/05/2021	Presente (ufc incontables)	Ausente	Presente (46 ufc)	Ausente	Ausente	Ausente
19/05/2021	Ausente	Presente (ufc incontables)	Presente (25 ufc)	Ausente	Ausente	Ausente
26/05/2021	Presente (ufc incontables)	Ausente	Presente (14 ufc)	Ausente	Ausente	Presente

Tabla 7. Comparación de resultados de *E.coli* y *SARS-Cov2*. Fuente: Elaboración propia.

Según estos datos no se encontró patrón claro entre la aparición de *E.coli* y de *SARS-Cov2* en estas muestras ya que 4 de las 7 muestras positivas para *E.coli* resultaron negativas para *SARS-Cov2*.

La presencia de estos microorganismos en las muestras de esta localización puede ser debida a la cercanía a emisarios. Existen 5 emisarios próximos a Playa Grande, todos ellos ubicados en la localidad de El Porís (Figura 6).



Figura 6. Localización de los emisarios próximos a Playa Grande. Todos se encuentran activos y según el color poseen distintos tipos de autorización :verde (autorizado), amarillo (en trámite), rojo (no autorizado) Fuente: Elaboración propia a partir de GRAFCAN.

4.3. Identificación de microorganismos

Los resultados de la Film Array GI demuestran la presencia de *E.coli* O157 en una muestra del día 16/03/2021. Esta cepa es un importante enteropatógeno que posee la capacidad de causar brotes de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico debido a la producción de la toxina Shiga. *E.coli* O157 es considerada más virulenta que otras *E.coli* productoras de esta toxina²².

En todas las muestras (microplásticos, agua y arena) a las que se realizó esta prueba dieron positivas en presencia de *Vibrio*. Este género es ubicuo en el medio marino y la alta tasa de colonización sugiere que estos pueden formar una parte de las comunidades de biofilm en la mayoría de los microplásticos que se encuentran en las playas²³.

Otro patógeno encontrado ha sido *Plesiomonas shigelloides* en la muestra de fragmentos de la zona B del día 7/04/2021. Esta bacteria produce la Shigelosis, enfermedad aguda que presenta diarrea hemorrágica con dolor abdominal y fiebre. Su transmisión es fecal-oral causada por el

consumo de comida o agua contaminada o por productos cultivados en lugares en los que se usan aguas residuales como abono²⁴.

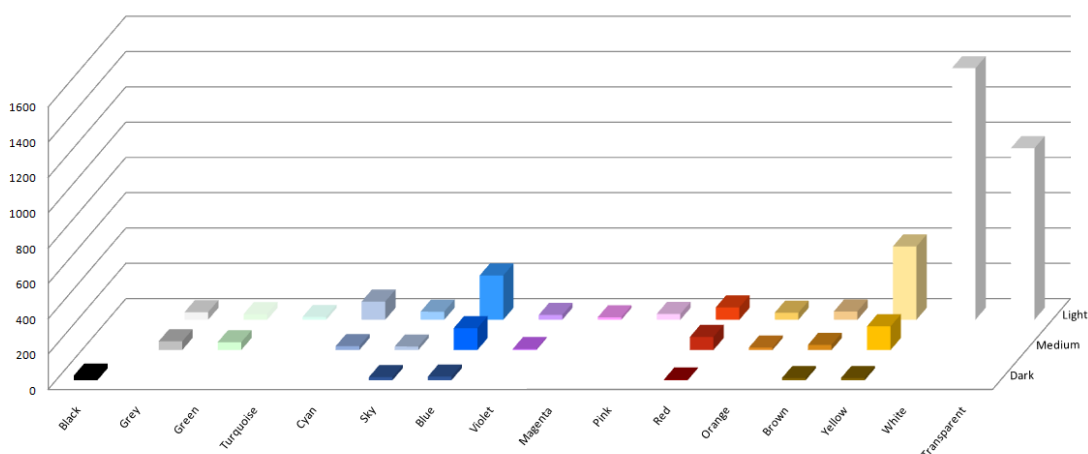
Por último, también se encontró *Norovirus GI/GII* en la muestra de fragmentos de la zona A del día 07/04/2021. El *Norovirus* es un virus extremadamente contagioso responsable de hasta 1/5 parte de los casos de gastroenteritis en el mundo. Su transmisión se produce de manera fecal-oral normalmente producida por el contacto con comida o agua contaminada²⁴.

4.4. Recuento y clasificación de microplásticos

El resultado del recuento de microplásticos fue de 4.879 (74,8%) fragmentos y de 1.643 (25,2%) pellets. En cuanto a la clasificación por colores se observó que existe una proporción mucho más alta de colores claros, predominando los blancos y translúcidos. El azul (agrupando las tonalidades Cyan, Sky y Blue), el amarillo (tonalidad Yellow) y el verde (agrupando las tonalidades Green y Turquoise) fueron los colores más comunes (Gráfica 2).

En lo referente al espectro de matices la gran mayoría de fragmentos se encontraban en la zona clara (Light) seguidos de las tonalidades medias (Medium) y con muy pocas muestras en las tonalidades oscuras (Dark) (Gráfica 2).

Estos resultados se reúnen en la siguiente gráfica:



Gráfica 2. Distribución de colores y tonalidades de los microplásticos recogidos en playa grande durante el periodo de muestreo utilizando como referencia la paleta de colores establecida por E.Martin et al en 2020. Fuente: Elaboración propia.

El desgaste de color de los fragmentos puede ser debido a la fotooxidación aportada por las condiciones ambientales que hacen que pierdan los colorantes añadidos. Se ha demostrado que existe una relación entre el color del plástico y el tiempo que este ha pasado en el medio, indicando que los materiales opacos se vuelven translúcidos debido a la degradación abiótica²⁵.

Esta decoloración de los microplásticos indica que estos han pasado un mayor tiempo a la deriva en el medio marino. Esta información ayuda a entender la colonización de estos por diferentes microorganismos ya que la posibilidad de que los microplásticos se encuentren colonizados por microorganismos patógenos aumenta directamente con el tiempo que estos han estado en el medio¹⁶.

5. Conclusiones

1. Se evidenció la presencia de *E.coli* en un 26,51% con respecto al total de las muestras. Correspondiéndose del total de muestras positivas para este microorganismo un 25,71% a muestras de fragmentos, un 2,85% a muestras de pellets, un 62,85% a muestras de aguas y un 5,71% a muestras de arena.
2. Se determinó la presencia de *SARS-Cov2* en un 8,3% de las muestras totales. Correspondiéndose del total de muestras positivas para este microorganismo un 50% a muestras de fragmentos, un 30% a muestras de pellets, un 10% a muestras de aguas y un 10% a muestras de arena.
3. Se demostró la presencia de otros microorganismos patógenos en muestras de microplásticos como *Plesiomonas shigelloides* y *Norovirus GI/GII* formando parte del biofilm de los microplásticos.
4. El recuento y clasificación de los microplásticos (fragmentos y pellets) demuestra un alto grado de blanqueamiento lo cual indica que estos podrían llevar un largo período de tiempo en el medio marino.
5. Tras la realización de este trabajo, se puede afirmar que los microplásticos pueden actuar como vehículo de microorganismos patógenos, pudiendo suponer un posible riesgo para la salud pública. Tras este estudio, se considera necesario monitorizar este riesgo en aquellas playas a las que llegan microplásticos masivamente.

6. Bibliografía

1. Lise Nerland, I., Halsband, C., Allan, I., Thomas, K. V & Thomas Kristoffer Naes, K. *Norwegian Institute for Water Research Negative environmental impact*. (2014).
2. Derraik, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris: A review. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 842–852 (2002).
3. Keswani, A., Oliver, D. M., Gutierrez, T. & Quilliam, R. S. Microbial hitchhikers on marine plastic debris: Human exposure risks at bathing waters and beach environments. *Mar. Environ. Res.* **118**, 10–19 (2016).
4. Plastics Europe, 2020. Plastics- the Facts 2020. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Recovery for 2018. Plastics Europe Association of Plastics Manufacturers. Brussels.
5. Crawford, C. B., & Quinn, B. 5-Microplastics, standardisation and spatial distribution. *Microplast*, 101–130 (2017).
6. Browne, M. A., Galloway, T. S. & Thompson, R. C. Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 3404–3409 (2010).
7. Kershaw, P. J., & Rochman, C. M. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. *Reports Stud. Jt. Gr. Expert. Sci. Asp. Mar. Environ. Prot.* **Eng No. 93**, (2015).
8. Andrady, A. L. *Plastics and the Environment*. John Wiley & Sons. (2003).
9. Harrison, J. P., Sapp, M., Schratzberger, M. & Mark Osborn, A. Interactions between Microorganisms and marine micro plastics: A call for research. *Mar. Technol. Soc. J.* **45**, 12–20 (2011).
10. Carpenter, E. J. & Smith, K. L. Plastics on the Sargasso sea surface. *Science (80-)*. **175**, 1240–1241 (1972).
11. Zettler, E. R., Mincer, T. J. & Amaral-Zettler, L. A. Life in the ‘plastisphere’: Microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 7137–7146 (2013).
12. O’Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. B f m d. 49–79 (2000).
13. De Tender, C. A. *et al.* Bacterial Community Profiling of Plastic Litter in the Belgian Part of the North Sea. (2015) doi:10.1021/acs.est.5b01093.
14. Rodrigues, A., Oliver, D. M., McCarron, A. & Quilliam, R. S. Colonisation of plastic pellets (nurdles) by *E. coli* at public bathing beaches. *Mar. Pollut. Bull.* **139**, 376–380 (2019).
15. González-Hernández, M., Hernández-Sánchez, C., González-Sálamo, J., López-Darias, J. & Hernández-Borges, J. Monitoring of meso and microplastic debris in Playa Grande beach (Tenerife, Canary Islands, Spain) during a moon cycle. *Mar. Pollut. Bull.* **150**, 110757 (2020).
16. Martí, E. *et al.* The Colors of the Ocean Plastics. *Environ. Sci. Technol.* **54**, 6594–6601 (2020).
17. Amaral-Zettler, L. A. *et al.* The biogeography of the Plastisphere: Implications for

- policy. *Front. Ecol. Environ.* **13**, 541–546 (2015).
18. Rodrigues, A., Oliver, D. M., McCarron, A. & Quilliam, R. S. Colonisation of plastic pellets (nurdles) by *E. coli* at public bathing beaches. *Mar. Pollut. Bull.* **139**, 376–380 (2019).
 19. Kirstein, I. V., Wichels, A., Krohne, G. & Gerdts, G. Mature biofilm communities on synthetic polymers in seawater - Specific or general? *Mar. Environ. Res.* **142**, 147–154 (2018).
 20. Dong, E., Du, H. & Gardner, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet Infectious Diseases* vol. 20 533–534 (2020).
 21. Randazzo, W. *et al.* SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Res.* **181**, (2020).
 22. Law, D. A REVIEW Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology* vol. 88 (2000).
 23. Vezzulli, L., Colwell, R. R. & Pruzzo, C. Ocean Warming and Spread of Pathogenic Vibrios in the Aquatic Environment. *Microb. Ecol.* **65**, 817–825 (2013).
 24. Kloss, B., & Bruce, T. (2018). *Graphic Guide to Infectious Disease E-Book*. Elsevier Health Sciences. (2018).
 25. Fanini, L. & Bozzeda, F. Dynamics of plastic resin pellets deposition on a microtidal sandy beach: Informative variables and potential integration into sandy beach studies. *Ecol. Indic.* **89**, 309–316 (2018).