

ULL

Universidad
de La Laguna

Departamento de Microbiología



Facultad de Ciencias
Sección de Biología

Estudio preliminar de la biodegradación de plásticos
por bacterias marinas.

Preliminary study of plastic biodegradation by
marine bacteria.

Trabajo de Fin de Grado

Alejandra Martín Peraza

3de Julio 2017

Tutorizado por: Fernando Perestelo Rodríguez y Ana
Rodríguez Pérez

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
3. OBJETIVOS	7
4. MATERIAL Y MÉTODOS	7
4.1. Muestras y procedimiento de muestreo	7
4.2. Sustratos plásticos	7
4.3. Enriquecimiento selectivo de las poblaciones microbianas marinas.....	8
4.4. Evaluación de la susceptibilidad de los diferentes plásticos a la biodegradación.	9
4.5 Biodegradación de PETE por las poblaciones microbianas seleccionadas en el proceso de enriquecimiento.	10
4.6. Evaluación de la biodegradación de PETE mediante gravimetría, ftir y microscopía de fuerza atómica (AFM).....	10
4.7 Valoración de la formación de biopelículas sobre las láminas de PETE.	11
4.8 Caracterización de los aislados.....	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	13
5.1 Susceptibilidad de los plásticos al ataque microbiano en la etapa de enriquecimiento.	13
5.2 Biodegradación de pete por poblaciones de microorganismos marinos	14
4.7 Caracterización preliminar de cepas bacterianas utilizadas en el estudio	22
6. CONCLUSIONES.	25
7. BIBLIOGRAFÍA.	27

1. RESUMEN

Los plásticos son compuestos xenobióticos muy contaminantes en ambientes acuáticos, cuya resistencia al ataque microbiano y a otros factores ambientales hace que sean extremadamente persistentes. El objetivo de este trabajo, es el estudio de microorganismos potencialmente degradadores de polímeros plásticos, en muestras de agua procedentes del puerto de Santa Cruz de Tenerife. Para ello, se ha utilizado una técnica de enriquecimiento en medio de sales marinas, suplementado con plástico granulado y en láminas, y extracto de levadura a baja concentración. De los 5 plásticos utilizados en la etapa de enriquecimiento (Polietileno tereftalato, PETE; Polietileno de alta densidad, HDPE; Polietileno de baja densidad, LDPE; Poliestireno, PE; Polipropileno, PP), la mayor pérdida de peso, después de 32 días de incubación, fue observada en el PETE. La biodegradación de este plástico, estudiada en medios frescos inoculados a partir de los cultivos de enriquecimiento, no mostró, después de 45 días de incubación, diferencias significativas en la pérdida de peso de las láminas, ni se observaron alteraciones mediante espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR), y microscopía de fuerza atómica (AFM). Así mismo, se detectó una débil actividad biológica asociada a la formación de biopelículas en los cultivos, pero sin diferencias significativas respecto a los controles. Al final de la incubación, los cultivos presentaban una población mixta formada por bacilos Gram- y Gram + esporulados.

Palabras clave: bacteria, biodegradación, plásticos, ambientes marinos, PETE, FTIR, AFM.

ABSTRACT

Plastics are highly polluting xenobiotic compounds in aquatic environments whose resistance to microbial attack and other environmental factors makes them extremely persistent. The objective of this work is the study of microorganisms potentially degrading plastic polymers in water samples from the port of Santa Cruz de Tenerife. For this purpose, an enrichment technique has been used in marine salt medium, supplemented with granulated plastic and in sheets, and yeast extract at low concentration. Among the 5 plastics used in the enrichment stage (polyethylene terephthalate, PETE, high density polyethylene, HDPE, low density polyethylene, LDPE, polystyrene, PE, polypropylene, PP), the higher weight loss, after 32 days of incubation, was observed in PETE. The biodegradation of this plastic, studied in fresh media inoculated from the enrichment cultures, did not show significant differences in the weight loss of the sheet after 45 days of incubation. Furthermore, no alterations were observed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) or atomic force microscopy (AFM). Even though a weak biological activity was detected associated with the formation of biofilms in the cultures, it was not significantly different in comparison to the controls. At the end of the incubation, the cultures had a mixed population consisting of Gram- and sporulated Gram + bacilli.

Keyword: bacteria, biodegradation, plastic, marine environments, PETE, FTIR, AFM.

2. INTRODUCCIÓN

Los plásticos (del griego “plastikos”, que significa moldeable) son polímeros orgánicos sintéticos con alta masa molecular que, normalmente, se obtienen mediante la polimerización de monómeros derivados del petróleo, del gas o del carbón.

En la preparación de estos polímeros, a la resina o producto base se añade una amplia variedad de aditivos como rellenos, plastificantes, estabilizadores UV y térmicos, agentes antimicrobianos y colorantes. Todos estos elementos tienen como fin mejorar el rendimiento y la apariencia del plástico. El resultado final del proceso es la obtención de materiales versátiles, caracterizados por poseer una serie de propiedades muy deseables para su uso industrial: resistencia, durabilidad, peso ligero, aislamiento térmico y eléctrico, y un producto final capaz de tomar muchas formas (tales como adhesivos, espumas, fibras y sólidos) (Law *et al.*, 2017). Debido a ello, los plásticos son utilizados mundialmente en distintos ámbitos como la industria alimentaria, textil, farmacéutica, la construcción o el transporte (Dey *et al.*, 2012).

La producción anual de plásticos ha superado los 300 millones de toneladas a nivel mundial y el reciclaje no constituye una solución viable para la eliminación de los residuos que se generan. Las investigaciones más recientes proponen una solución a este problema basada en la biodegradación, utilizando para ello cepas microbianas seleccionadas. (Paço *et al.*, 2017).

En ambientes acuáticos y, concretamente, en ecosistemas marinos, es especialmente notable la contaminación producida por microplásticos, es decir, partículas de plástico menores de 5 mm de tamaño. La fuente primaria de estas partículas es la entrada directa a los ambientes marinos de microesferas de plástico, y la liberación de fragmentos de fibra de plástico a partir de restos textiles. La fuente secundaria son los desechos plásticos que eventualmente se rompen en el mar y en tierra debido a una serie de procesos físicos, biológicos y químicos. (Wu *et al.*, 2017).

El pequeño tamaño de los microplásticos permite su ingestión por organismos acuáticos de diferentes niveles tróficos y con diferentes estrategias de alimentación. Como consecuencia, los microplásticos pueden entrar en la cadena alimentaria y acumularse en niveles tróficos superiores. En particular, el impacto negativo de los desechos plásticos en los organismos vivos puede estar relacionado con el enorme

potencial de daño mecánico de los microplásticos en los tractos gastrointestinales de los organismos que los ingieren, así como con la liberación de monómeros y aditivos, algunos de los cuales han demostrado ser tóxicos, carcinógenos o disruptores endocrinos. (Ivleva *et al.*, 2017).

Los plásticos pueden permanecer en el medio ambiente marino durante décadas o incluso cientos de años cuando están en superficie; y probablemente mucho más tiempo en aguas profundas. La mayoría de los polímeros sintéticos (polietileno, polipropileno) flotan en las aguas, mientras que otros (polietileno de alta densidad, polietileno tereftalato) pueden hundirse. En concreto, se estima que en 2013 se produjeron en todo el mundo cerca de 56 millones de toneladas de polietileno tereftalato (Yoshida *et al.*, 2017).

En la degradación de los plásticos, y en particular del polietileno, intervienen tres tipos de mecanismos: degradación química, fotodegradación y biodegradación. La degradación química ocurre cuando los prooxidantes catalizan la formación de radicales libres, los cuales reaccionan con las moléculas de oxígeno para atacar a la matriz del plástico, siendo el proceso acelerado por el calor y el oxígeno. La fotodegradación también se produce dentro de la matriz del plástico, donde la luz UV cataliza la autooxidación y la generación de radicales libres (Gnanavel *et al.*, 2012). En la degradación biológica o biodegradación intervienen diferentes microorganismos, entre los que existe una gran diversidad catabólica, que son capaces de degradar, transformar o acumular, de forma natural, un amplio rango de compuestos: desde ligninas, almidón, celulosa y hemicelulosa (Shalini y Sasikumar., 2015), hasta hidrocarburos, fármacos y metales (Kannahi y Sudha, 2013). Estos microorganismos, además, pueden asociarse para formar consorcios que degradan los compuestos poliméricos por cometabolismo (Skariyachan *et al.*, 2014). Dependiendo del tipo de proceso se generan diferentes productos finales. Así, en el caso de un ambiente aeróbico, sólo se registran como productos finales la formación de agua, CO₂ y masa microbiana, mientras que en condiciones anaeróbicas se registran, además de los productos señalados, otros como metano y ácido sulfhídrico, como resultado de metabolismos metanogénicos y sulfidogénicos (Shahnawaz *et al.*, 2016).

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el estudio de microorganismos marinos potencialmente degradadores de plásticos, en muestras de agua recogidas en el Puerto de Santa Cruz de Tenerife. La capacidad biodegradadora se estudiará inicialmente frente a distintos tipos de plásticos, profundizando posteriormente en el estudio de aquel que resulte más susceptible al ataque en el estudio preliminar.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

El presente estudio fue realizado utilizando como punto de muestreo el Muelle de Santa Cruz de Tenerife, en concreto la Dársena del Este. Esta ubicación fue escogida dada a las numerosas embarcaciones que entran y salen diariamente y la presencia de plataformas petrolíferas; factores que pueden acompañarse de la presencia de residuos, entre ellos plásticos. Las muestras de agua fueron tomadas del mismo punto, en botellas de vidrio de 1 litro, recogiendo en total 5 litros (1 litro para cada uno de los plásticos del estudio).

4.2. SUSTRATOS PLÁSTICOS

Para llevar a cabo este trabajo, se utilizaron como sustratos cinco tipos de plásticos: Polietileno Tereftalato (Polyethylene Terephthalate, PETE), Polietileno de alta densidad (High Density Polyethylene, HDPE), Polietileno de baja densidad (Low Density Polyethylene, LDPE), Poliestireno (Polystyrene, PS) y Polipropileno (Polypropylene, PP), obtenidos a partir de diferentes productos comercialmente disponibles: botellas de agua, envases opacos de productos químicos como el alcohol, bolsas de plástico, vasos de plástico transparente y vasos de plástico blanco, respectivamente.

4.2.1. Preparación de plástico granulado

Para la obtención de granulado de plástico, se procedió a cortar el envase de partida en pequeños trozos (0,5 x 0,5 cm) que, posteriormente, fueron triturados en un molinillo (Culatti, Bioblock Scientific), usando un tamiz de 0,5 mm de diámetro.

El triturado obtenido fue esterilizado utilizando alcohol. En primer lugar, se resuspendió el polvo plástico (aproximadamente 3 g) en 10 ml de alcohol etílico 96%, donde permaneció durante 30 minutos. Seguidamente, se procedió a evaporar el alcohol mediante tratamiento al calor en una estufa de corriente de aire a 60°C. Este mismo tratamiento fue repetido con alcohol etílico al 70%. El granulado obtenido se conservó en placas de Petri estériles hasta su posterior utilización.

4.2.2. Preparación de plástico en láminas

La preparación de las láminas de los diferentes plásticos (PETE, HDPE, LDPE, PS y PP) se llevó a cabo cortando el material de partida (botellas de agua, envases opacos de productos químicos como el alcohol, bolsas de plástico, vasos de plástico transparente y vasos de plástico blanco, respectivamente) en rectángulos de 6x2 cm.

Antes de su empleo en los estudios de biodegradación, las láminas así obtenidas fueron pesadas y esterilizadas. La esterilización se llevó a cabo sumergiendo las láminas en 20 ml de alcohol 96% durante 30 minutos, dándoles la vuelta cada 10 minutos. A continuación, las láminas fueron sumergidas en 20 ml de alcohol 70% durante otros 30 minutos. Finalmente, las láminas fueron lavadas con agua destilada estéril para eliminar el exceso de alcohol, se secaron con la ayuda de papel de filtro estéril y se añadieron a cada uno de los matraces de cultivo y sus respectivos controles.

4.3. ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS MARINAS.

Con el fin de seleccionar aquellas poblaciones de microorganismos marinos potencialmente degradadoras de plásticos, se realizaron dos cultivos de enriquecimiento sucesivos, utilizando como inóculo los microorganismos recogidos mediante filtración (filtros Millipore de nitrocelulosa de 0,45 μm) de la muestra de agua de mar (apartado 4.1). Este proceso se repitió 5 veces, filtrando alícuotas de 1 L para cada uno de los plásticos ensayados.

Los filtros conteniendo los microorganismos retenidos, se añadieron a matraces de 500 ml de capacidad conteniendo 200 ml de medio de cultivo de sales marinas (Sigma-Aldrich), suplementado con extracto de levadura (0,1%), plástico granulado (0,3%) y una lámina del mismo plástico (apartado 4.2). Como controles se utilizaron los mismos medios de cultivo sin inocular. Todos los matraces, cultivos y controles, fueron incubados en agitación (125 rpm) a 28 °C, durante 13 días. Transcurrido este periodo, se

procedió a transferir alícuotas de 20 ml de cada cultivo, así como las láminas de plástico de cada uno de ellos, a medios frescos, idénticos a los utilizados inicialmente. En este segundo periodo de enriquecimiento, la incubación se prolongó durante 19 días.

4.4. EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LOS DIFERENTES PLÁSTICOS A LA BIODEGRADACIÓN.

Tras las dos etapas de enriquecimiento, se retiraron las láminas de plástico de cada uno de los matraces y se trataron para eliminar la biomasa adherida. En primer lugar se sometieron a un tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS 2%) durante 4 horas en agitación (Kyaw *et al.*, 2012). A continuación, las láminas se lavaron con agua destilada durante 12 horas y finalmente, con alcohol etílico al 70% durante dos horas, también en agitación. Por último, se procedió a secar las láminas en una estufa de corriente de aire a 60°C. Las láminas recogidas de los matraces controles recibieron el mismo tratamiento que las provenientes de los cultivos.

4.4.1. Determinación de la pérdida de peso.

Una vez retiradas de la estufa, las láminas se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este periodo se procedió a pesar cada una de las láminas (tres mediciones) en una balanza AA-200DS (Denver Instrument Company) evaluándose la pérdida de peso con respecto a su peso inicial (Tribedi *et al.*, 2012; Ambika devi, *et al.*, 2014; Mukherjee y Chatterjee, 2014), mediante la fórmula:

$$\frac{\mathbf{Pf - Pi}}{\mathbf{Pi}} \times 100$$

Donde Pf es el peso final (después de la incubación) y Pi, el peso inicial.

4.4.2. Espectroscopía FTIR.

Para evaluar los cambios ocurridos en la estructura de los diferentes sustratos plásticos tras ser sometidos al ataque microbiano, se procedió a su análisis espectral mediante Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR) empleando la técnica de reflectancia difusa (Thermo NICOLET Avatar 360 FT-IR; Software de control EZ OMNIC, Version 6.0; Rango espectral 4000-400 cm⁻¹; resolución de 2 cm-

1). Los análisis fueron realizados por el Dr. Pedro Martín Zarza (Departamento de Química, Área de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Sección de Química).

4.5 BIODEGRADACIÓN DE PETE POR LAS POBLACIONES MICROBIANAS SELECCIONADAS EN EL PROCESO DE ENRIQUECIMIENTO.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en el proceso de enriquecimiento, se seleccionó el polietileno tereftalato (PETE) para un estudio más detallado del proceso de biodegradación. Para ello se diseñó un experimento utilizando el medio de cultivo y las condiciones de incubación descritas en el apartado 4.3., conteniendo en este caso únicamente láminas del plástico antes señalado (sin granulado de plástico). Los nuevos cultivos (200 ml) fueron inoculados con 20 ml del cultivo de enriquecimiento realizado con PETE. La densidad de población al inicio y al final del periodo de incubación (45 días) fue cuantificada mediante la técnica de dilución en placa, utilizando agar de triptona y soja (TSA, Panreac, AppliChem).

Al objeto de realizar una valoración final de la degradación mediante gravimetría, espectroscopía infrarroja (FTIR), microscopía de fuerza atómica (AFM), así como una evaluación de la formación de biopelículas sobre las láminas de plástico, se preparó una batería de cultivos con sus respectivos controles no inoculados (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de cultivos y controles, con indicación de la finalidad a la que fue destinada cada réplica.	
Replicas de cultivos y controles	Finalidad
3 cultivos (R1,R2,R3) / 3 controles (C7,C8,C9)	Gravimetría, FTIR
3 cultivos (R4, R5, R6) / 3 controles (C10,C11,C12)	Gravimetría, AFM
3 cultivos (R13,R14,R15) / 3 controles (C16,C17,C18)	Formación de biopelícula

4.6. EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE PETE MEDIANTE GRAVIMETRÍA, FTIR Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM).

Tras 45 días de incubación en presencia de PETE, se procedió a retirar las láminas de plástico de los cultivos y controles con el fin de evaluar el ataque

microbiano. En todos los casos, las muestras fueron tratadas como se describe en el apartado 4.4. La determinación gravimétrica y el análisis espectrocópico mediante FTIR fueron realizadas siguiendo la metodología descrita en los apartados 4.4.1 y 4.4.2, respectivamente.

Con el fin de poner de manifiesto las posibles alteraciones producidas como consecuencia del ataque microbiano sobre la superficie de las láminas de PETE, se realizó un estudio mediante microscopía de fuerza atómica. Los análisis fueron llevados a cabo por el Dr. Alberto Hernández Creus y Miriam Rodríguez González (Departamento de Química, Área de Química Física, Facultad de Ciencias, Sección de Química).

En este caso, las alteraciones observadas en las láminas de plástico recogidas de los cultivos, fueron comparadas tanto frente a los controles como a muestras de plástico original. Dada la sensibilidad de la técnica, los plásticos fueron sometidos a un tratamiento adicional (lavado con alcohol étílico al 96% durante 1 hora en agitación), para eliminar cualquier resto adherido.

4.7 VALORACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS SOBRE LAS LÁMINAS DE PETE.

La formación de biopelículas se determinó transfiriendo las láminas de plástico directamente, sin lavar, a matraces de 250 ml de capacidad (una lámina por matraz) conteniendo 20 ml de tampón fosfato sódico pH 7,6 (60 mM). A estos matraces se les añadió previamente diacetato de fluoresceína (DAF) para obtener una concentración final 10 mg DAF/ml (100 µl de solución de DAF, 2 mg/ml acetona). A continuación, los matraces se incubaron a 28°C con agitación (125 rpm) durante dos horas y media, en las que la biomasa microbiana con metabolismo activo hidroliza el DAF a fluoresceína (Schnurer y Rosswall, 1982). Transcurrido este periodo, se añadieron 20 ml de acetona a cada matraz para detener la reacción, se centrifugó una alícuota de 1,5 ml a 13.000 rpm (Biofuge pico, Heraeus) durante 5 minutos, y se procedió a leer la absorbancia del sobrenadante a 490 nm (espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro, UV/Visible Spectrophotometer), máximo de absorbancia de la fluoresceína.

La concentración de DAF hidrolizado se calculó utilizando una recta patrón elaborada a partir de una solución stock de DAF (10 mg DAF/ml), en la que todo el

compuesto fue hidrolizado a fluoresceína calentado al baño maría durante 1 hora (Schnurer y Rosswall, 1982).

4.8 CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLADOS

Las cepas bacterianas obtenidas tras los procesos de selección descritos en las secciones previas, fueron sometidas a una caracterización morfológica y bioquímica preliminar. Para ello, a partir de las placas de TSA utilizadas en los recuentos, se seleccionaron las colonias que mostraban una morfología diferente para ser sometidas a distintas pruebas tintoriales (tinción de Gram y tinción de endosporas).

Aquellas bacterias que aparecían como bacilos gran negativos fueron sometidas a pruebas adicionales. Así, se llevó a cabo la prueba de la catalasa, agregando una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre una colonia aislada de la bacteria a ensayar dispuesta en un portaobjetos. La producción de efervescencia indica la rotura del peróxido de hidrógeno y la liberación de oxígeno como consecuencia de la actividad enzimática, considerando a la bacteria catalasa positiva. Por su parte, se realizó la prueba de la oxidasa empleando una tira comercial (Panreac), siguiendo las indicaciones del fabricante, es decir, depositando una colonia de la bacteria en el extremo de la tira y esperando la aparición de un cambio, casi inmediato, en la tonalidad de la tira reactiva, a azul o morado oscuro. Si esto es así, la prueba resulta positiva y revelaría la presencia de la enzima citocromo oxidasa.

Con objeto de determinar la capacidad de los microorganismos para utilizar los hidratos de carbono por vía oxidativa o fermentativa, se realizó la prueba de oxidación/fermentación, inoculando dos tubos conteniendo el medio semisólido Hugh-Leifson (Cultimed). Tras 24 h de incubación (uno en aerobiosis y otro en anaerobiosis) a 28°C, el viraje en el color del indicador revela el proceso metabólico ocurrido. Las cepas fueron sembradas también en dos medios indicados para el aislamiento y diferenciación *Pseudomonas*, basándose en la formación de pioverdina y/o piocianina: medio King B (Cultimed) y un medio selectivo para el aislamiento de *Pseudomonas* (*Pseudomonas Isolation Agar*, P.I.A), preparado con agar base para *Pseudomonas* (Oxoid) suplementado con ceftrimida (10 µg/ml), fucidina, (10 µg/ml) y cefalosporina (50 µg/ml), (suplemento CFC, Oxoid). Después de 24 horas de incubación, las cepas que mostraron crecimiento en estos medios, fueron observadas bajo luz UV (260 nm) para comprobar la producción de pigmentos fluorescentes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 SUSCEPTIBILIDAD DE LOS PLÁSTICOS AL ATAQUE MICROBIANO EN LA ETAPA DE ENRIQUECIMIENTO.

Como se describe en Materiales y Métodos (apartado 4.3), tras un periodo total de enriquecimiento de 32 días en presencia de diferentes tipos de plásticos, las láminas fueron retiradas de los cultivos y de sus respectivos controles, lavadas y sometidas a análisis gravimétrico y espectroscópico (FTIR). Como se muestra en la tabla 2, el plástico que experimentó una mayor pérdida de peso fue el PETE, si bien el análisis espectroscópico no mostró alteraciones sustanciales en las bandas de absorción de energía sobre ninguno de los plásticos (datos no mostrados).

Tabla 2: Pérdida de peso de las láminas de plástico en la etapa de enriquecimiento.		
Ensayos	Plásticos	Pérdida de peso (%)
Cultivos	PETE	-0,187
	HDPE	-0,033
	LDPE	0,2997
	PS	0,092
	PP	0
Controles	PETE	0,0698
	HDPE	0,025
	LDPE	0,116
	PS	0,11
	PP	0,066

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó el PETE para continuar profundizando en el estudio de su potencial biodegradación por parte de las poblaciones microbianas de origen marino, obtenidas durante la fase de enriquecimiento. Como indican Yoshida et al. (2016), hasta ahora, la capacidad para biodegradar PETE se ha

documentado principalmente en hongos, siendo escasas las referencias a bacterias que presentan esta actividad. No obstante, los citados autores describen el aislamiento de una nueva bacteria, *Ideonella sakaiensis*, capaz de degradar y asimilar este polímero en un corto periodo de tiempo (6 semanas). Conviene señalar que dicho aislamiento es producto de un extenso programa de screening en el que se realizaron 250 muestreos en distintos ambientes, incluyendo sedimentos, tierra, aguas residuales y lodos activados de un punto de reciclado de botellas de PETE.

5.2 BIODEGRADACIÓN DE PETE POR POBLACIONES DE MICROORGANISMOS MARINOS

El estudio de la biodegradación de PETE por parte de poblaciones microbianas de origen marino se llevó a cabo en cultivos que fueron incubados durante 45 días, tal y como se describe en el apartado 4.5 La población inicial en estos cultivos se determinó inmediatamente después de su inoculación, y la población final, una vez transcurrido el periodo de incubación. En la tabla 3 se muestran los correspondientes datos expresados como unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. Como puede observarse, los cultivos se iniciaron con $\approx 3,63 \cdot 10^5$ UFC/ml, incrementándose esta población en dos órdenes de magnitud al final del periodo de incubación ($\approx 7,02 \cdot 10^7$ UFC/ml).

Tabla 3: Concentración inicial de los cultivos realizados en presencia de láminas de PETE, y densidad de población alcanzada al final del periodo de incubación.		
Réplica	Día 0 (UFC/ml)	Día 45 (UFC/ml)
1	$3,4 \cdot 10^5$	$6,8 \cdot 10^7$
2	$3,6 \cdot 10^5$	$3,85 \cdot 10^7$
3	$3,9 \cdot 10^5$	$1,04 \cdot 10^8$

5.2.1 Valoración gravimétrica de la degradación de PETE.

Como señalan Czichos *et al.* (2011), la determinación de la pérdida de peso, junto con el análisis estructural del material residual y los intermediarios de bajo peso molecular, permiten obtener una visión detallada de la evolución del proceso de

biodegradación de polímeros plásticos. De hecho, dada su sencillez y adaptabilidad, la evaluación gravimétrica es un método ampliamente utilizado en los ensayos de degradación de polímeros, si bien no proporciona una prueba directa de su biodegradación (Sangale *et al.*, 2012; Troiano *et al.*, 2014).

Con la idea de poner de manifiesto la capacidad de las poblaciones microbianas marinas seleccionadas para atacar PETE, se llevó a cabo una determinación de la pérdida de peso producida sobre éste, tras 45 días de incubación en presencia de los microorganismos (Tabla 4).

Tabla 4: Pérdida de peso de láminas de PETE tras 45 días de incubación con poblaciones microbianas marinas.				
Ensayos	Réplicas	Peso inicial	Peso final	Pérdida de peso (%)
Cultivos	R1	0,3735	0,3727	-0,2142
	R2	0,3485	0,3486	0,0287
	R3	0,3343	0,3341	-0,0598
	R4	0,3446	0,3442	-0,116
	R5	0,3422	0,3421	-0,029
	R6	0,3277	0,3245	-0,9765
	Media±SE	--	--	-0,2278±0,1535
Controles	C7	0,3392	0,3387	-0,147
	C8	0,3279	0,3274	-0,152
	C9	0,3382	0,3374	-0,2365
	C10	0,3631	0,3627	-0,11
	C11	0,3070	0,3069	-0,033
	C12	0,3139	0,3136	-0,096
	Media±SE	--	--	-0,1291±0,0277

SE: Error estándar.

El análisis estadístico de los datos mediante una T de Student (programa Statistix, versión 9, Analytical Software) indica que no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la pérdida de peso observada en los cultivos (-0,2278 %) y en los correspondientes controles no inoculados (-0,1291 %).

Sharon y Sharon (2012), describen porcentajes muy limitados de pérdida de peso de PETE (2%) después de 200 días de incubación con una cepa de *Nocardia*, observándose también cambios sobre la estructura del polímero, detectados mediante análisis de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). Sin embargo, en una reciente revisión, Krueger et al. (2015) señalan la dificultad que presenta dicho polímero al ataque microbioano y la escasez de estudios que demuestren una biodegradación significativa del mismo. En consecuencia, la reciente descripción de una nueva bacteria (*Ideonella sakaiensis*) capaz de degradar extensamente PETE, puede resultar muy atractiva desde el punto de vista medioambiental (Yoshida et al., 2016). Por otra parte, la susceptibilidad de otros plásticos derivados del polietileno, como LDPE y HDPE, a la biodegradación en ambientes marinos ha sido puesta de manifiesto en diferentes estudios, tanto por bacterias (Ambika et al., 2014) como por hongos (Paço et al., 2017).

5.2.2. Análisis espectroscópico de PETE mediante FTIR

La espectroscopía FTIR es una técnica muy útil para evaluar los cambios químicos producidos sobre polímeros plásticos como consecuencia de la actividad microbiana, poniendo de relieve alteraciones sobre enlaces de hidrógeno y grupos funcionales terminales, así como otras reacciones de degradación (Milstein *et al.*, 1994; Mohamed *et al.*, 2007; Singh and Sharma, 2008; Elashmawi *et al.*, 2008). Como se indicó en el apartado 4.4.2, las muestras fueron analizadas en nuestro caso mediante la técnica de reflectancia difusa. Esta técnica se basa en medir la diferencia existente entre la luz irradiada a una determinada longitud de onda hacia la muestra, y la luz devuelta por ésta (la muestra absorberá parte de la luz, por lo tanto la devuelta siempre será menor). Esta luz devuelta o “rebotada” es recogida por una esfera integradora.

El análisis espectroscópico de las láminas de PETE recogidas de nuestros cultivos y controles (Figura 2) indica que no existen diferencias cualitativas apreciables entre ellos, es decir, no se observa la aparición y/o desaparición de bandas de absorción de energía. Estos resultados sugieren la ausencia de un ataque microbioano relevante.

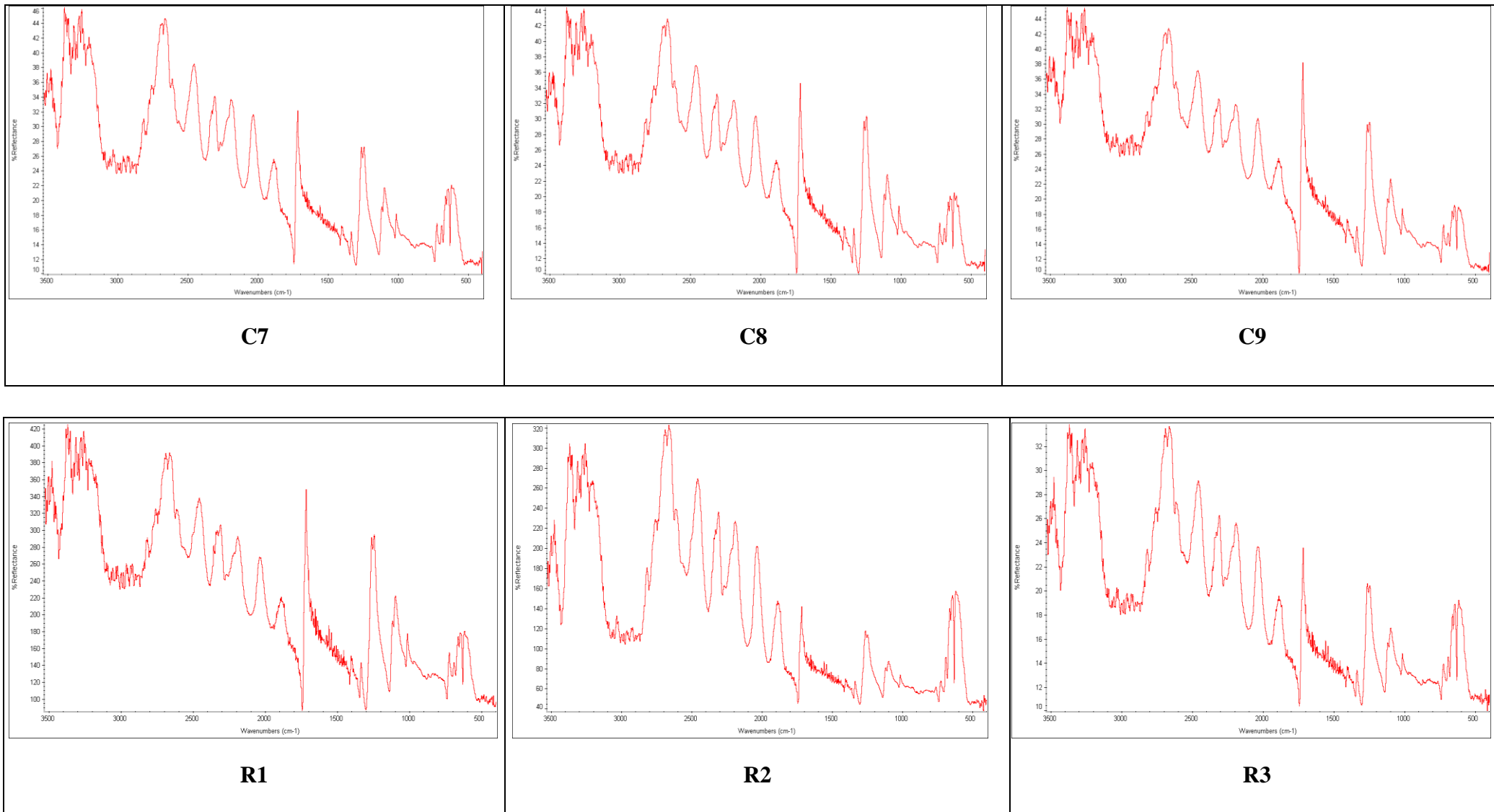


Figura 2: Espectros FTIR de láminas de PETE de los controles (C7, C8, C9) y cultivos (R1, R2, R3), después de 45 días de incubación.

Ioakeimidis et al. (2016) estudiaron la degradación de PETE (restos de botellas) en ambientes marinos, poniendo de relieve el carácter recalcitrante de este polímero. De acuerdo con estos autores, se necesita que el PETE permanezca más de 15 años en los fondos marinos para que se produzcan cambios significativos en los espectros ATR-FTIR. Según Gewert *et al.* 2015, en ambientes marinos las rutas más importantes que actúan sobre la degradación de PETE son la foto-oxidación y la degradación hidrolítica. Así, mientras la fotodegradación conduce a la rotura de enlaces éster, dando lugar a la formación de grupos carboxílico y vinilo, la degradación hidrolítica origina grupos carboxílico y alcohol, si bien en este último caso las reacciones son extramente lentas.

5.2.3. Análisis de PETE mediante microscopía de fuerza atómica.

La microscopía de fuerza atómica se utiliza para caracterizar la superficie de muestras sólidas y semisólidas, relativamente planas. La técnica proporciona información morfológica en 3D a escala nanométrica, a partir de imágenes topográficas de las mismas, así como parámetros superficiales tales como rugosidad, distribución (homogeneidad) de partículas sobre diversos materiales, como por ejemplo, láminas de plástico (comunicación personal, Dr. Hernandez Creus, ULL).

La aplicación de esta técnica sobre nuestras muestras, indica que la superficie del plástico en estudio (PETE) es muy homogénea, es decir, presenta una baja rugosidad (entendida como la distribución estándar de las altitudes de la muestra) (Figura 4).

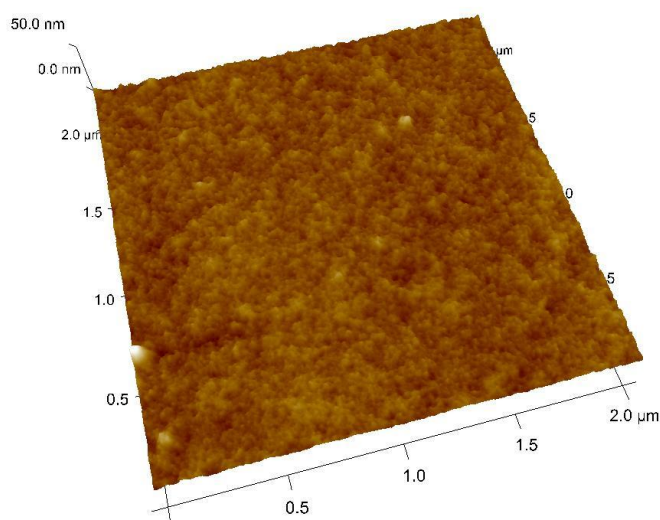


Figura 4: Superficie de PETE original en 3D. Escala 10x10 micras.

El análisis microscópico de las superficies de PETE antes y después de su incubación en presencia de las poblaciones microbianas, mostró una elevada similitud entre ellas (Figura 5). Este resultado revela la ausencia un ataque microbiano, al menos detectable mediante la aplicación de esta técnica.

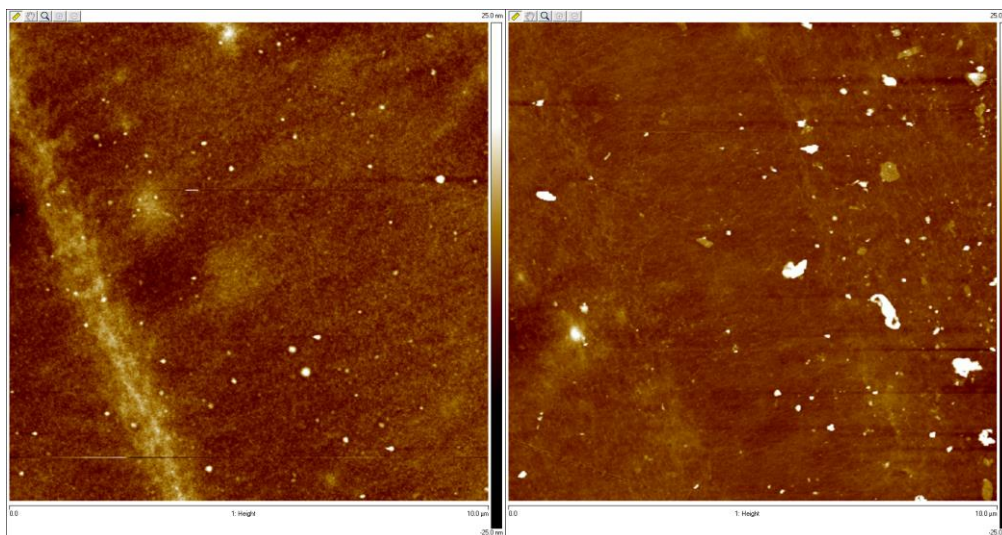


Figura 5: Microscopía de fuerza atómica de láminas de PETE incubadas durante 45 días. A la izquierda se muestra el plástico original, y a la derecha, la lámina recogida del cultivo. En las imágenes 2D las partes que presentan más altitud son representadas con colores claros (más claro cuanto mayor es la altitud) mientras que las partes oscuras serán las más bajas.

Como señalan Gewert et al. (2015), la resistencia a la biodegradación del PETE puede estar relacionada, al menos en parte, con la escasa rugosidad de este plástico, que puede dificultar la colonización y consolidación de biopelículas por parte de los microorganismos.

5.3. Formación de biopelículas sobre láminas de PETE

La hidrólisis de DAF es una técnica utilizada para valorar la actividad biológica en muestras ambientales, como por ejemplo, suelos (Schnurer y Rosswall, 1982). Básicamente, la técnica pone de manifiesto la hidrólisis del sustrato DAF en fluoresceína, actividad que es realizada por células metabólicamente activas. Esta técnica se ha utilizado también para valorar la formación de biopelículas sobre la superficie de láminas plásticas durante su biodegradación (Gilan et al., 2004).

Para cuantificar la actividad biológica asociada a la formación de biopelículas sobre las láminas de PETE, la concentración de DAF hidrolizado por ml se determinó utilizando la recta patrón que se muestra en la Figura 6.

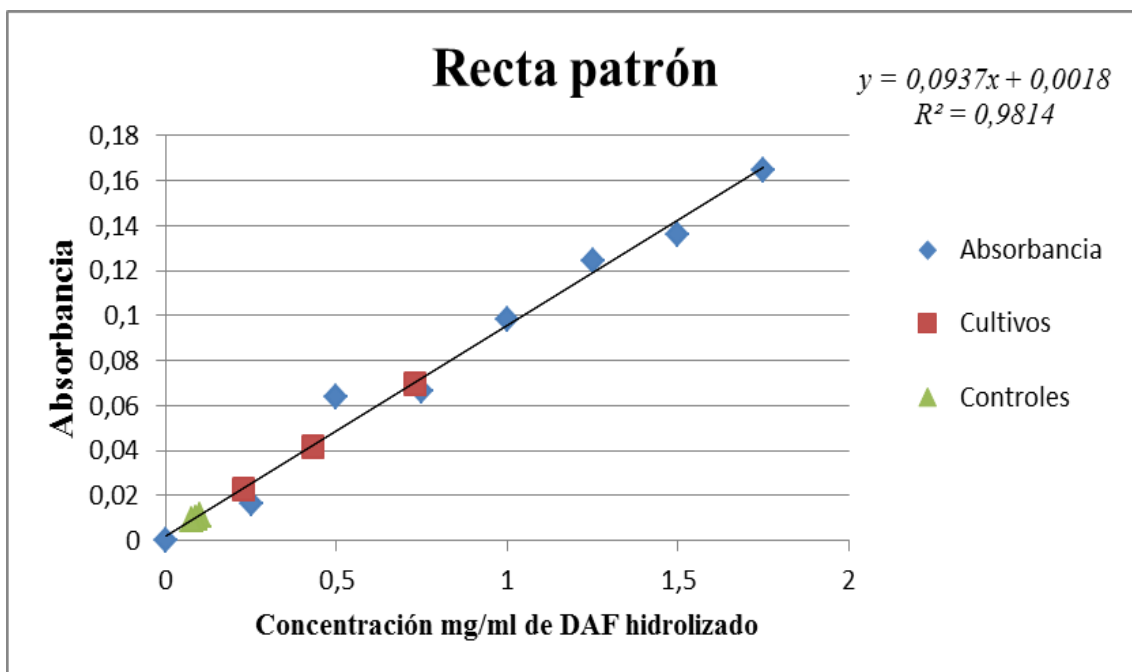


Figura 6: Recta patrón, en la que se representa la relación entre la concentración de DAF hidrolizado y la absorbancia del producto formado a 490nm. En la recta se sitúan los datos correspondientes a los cultivos y sus controles.

En la tabla 5 se muestran los datos de actividad biológica, calculados teniendo en cuenta la superficie de la lámina de plástico (12 cm^2), y el volumen (20 ml) y tiempo de reacción (2,5 horas). Aunque el análisis estadístico mediante T de Student de los valores encontrados en los cultivos y los controles no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$), el examen visual al final del tiempo de reacción, sí que manifestaba una diferencia apreciable en la intensidad del color característico de la fluoresceína (amarillo intenso). Probablemente, la falta de significación estadística se debe a la alta variabilidad existente entre los cultivos.

Tabla 5: Actividad biológica asociada a la formación de biopelículas sobre láminas de PETE después de 45 días de incubación.

Muestra	Réplica	Absorbancia (490 nm)	Actividad biológica (mg DAF hidrolizados/hora·cm ²)
Cultivos	R13	0,023	0,1508
	R14	0,042	0,2860
	R15	0,07	0,4852
	Media± SE	--	0,3073 ± 0,0971
Controles	C16	0,011	0,0654
	C17	0,010	0,0583
	C18	0,009	0,0512
	Media± SE	--	0,0583 ± 0,004

SE: Error estándar.

A pesar de los pobres resultados obtenidos en nuestro ensayo, Gilan *et al.* (2004) describen la validez de la técnica para comprobar la capacidad de una cepa de *Rhodococcus* para formar biopelículas sobre láminas de polietileno. En este mismo estudio se puso de manifiesto que, cuando los medios de cultivo eran suplementados con aceite mineral, se producía una correlación directa entre el incremento en la formación y viabilidad de estas biopelículas (entre las 48 y las 72 horas) y la capacidad de la cepa para degradar el polietileno (hasta un 50%). La hidrofobicidad del polietileno puede interferir con la adhesión bacteriana a su superficie, ya que la mayoría de las superficies bacterianas son hidrófilas. Este hecho puede explicar que no se haya formado una biopelícula suficientemente densa en nuestro caso.

4.7 CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

En las placas utilizadas para los recuentos finales, se observó la presencia de, al menos, 5 tipos de colonias diferentes, que fueron sometidas a una caracterización preliminar.

Dos de estas cepas (C1 y C2) presentaban colonias semejantes, de forma circular, borde entero y superficie cremosa, con la diferencia de que las colonias de la cepa C1 eran crateriformes, mientras que las de la cepa C2 eran elevadas. Tras ser sometidas a tinción de Gram y de endosporas, ambas bacterias se revelaron como bacilos Gram + formadores de endosporas (Tabla 6, Figura 9) por lo que, presuntamente, se trata de bacterias del género *Bacillus*.

Tabla 6: Morfología y resultados de las tinciones realizadas.			
Cepa	Morfología	Tinción Gram	Tinción endosporas
C1	Bacilos	+	+
C2	Bacilos	+	+
C3	Bacilos	-	N.R
C4	Bacilos	-	N.R
C5	Bacilos	-	N.R

N.R: No realizado.

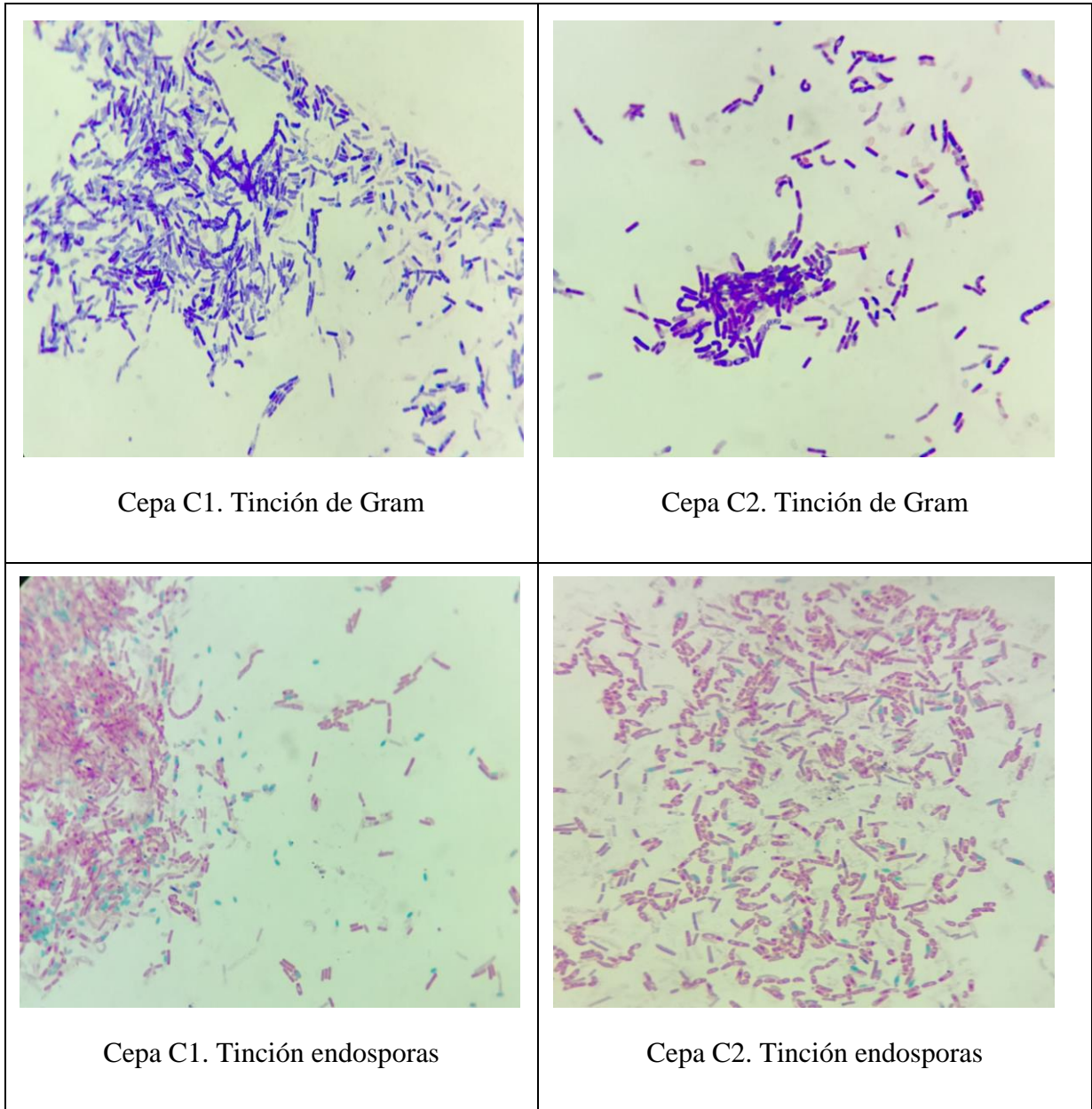


Figura 9: Tinciones de Gram y endosporas de las cepas C1 y C2.

El resto de las cepas (C3, C4, C5) eran bacilos Gram – (Tabla 6, Figura 10). Las dos primeras presentaban colonias de forma irregular, con borde ondulado, planas, con un ligero color amarillento y de superficie brillante; mientras que la cepa C5 desarrolló colonias de pequeño tamaño de forma circular, borde ondulado y convexas. Las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas C3 y C4 mostraron resultados positivos en las pruebas de la catalasa y la oxidasa, metabolismo oxidativo en la prueba de

oxidación/fermentación, y crecimiento en el medio P.I.A selectivo para *Pseudomonas*, si bien no se observó la producción de pigmentos fluorescentes en este medio, ni en King B (Tabla 7). Por otra parte, la cepa C5 mostró un resultado positivo en la prueba de la catalasa, negativo en la prueba de la oxidasa y de acuerdo con los resultados de la prueba de oxidación/fermentación no metabolizó la glucosa. Tampoco creció en el medio P.I.A.

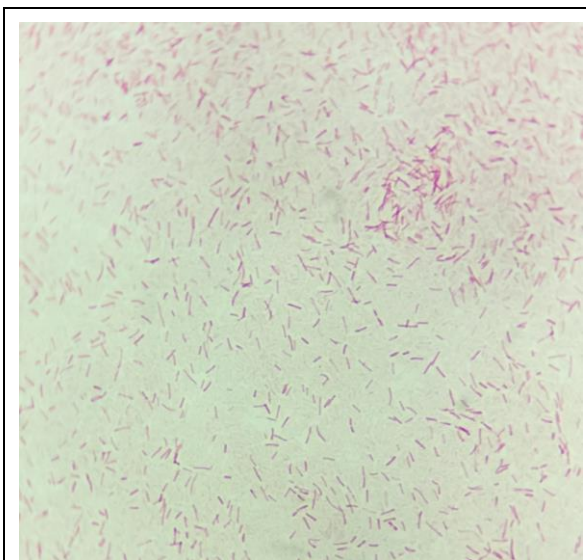


Figura 10: Tinción de Gram cepa C3.

Tabla 7: Pruebas bioquímicas y resultados de las siembras en medios utilizados para el aislamiento y diferenciación de <i>Pseudomonas</i>.						
Cepas	Catalasa	Oxidasa	Oxidación/ fermentación	Medio King B (fluorescencia)	Medio P.I.A	
					Crecimiento	Fluorescencia
C3	+	+	Metabolismo oxidativo	-	+	-
C4	+	+	Metabolismo oxidativo	-	+	-
C5	+	-	No metaboliza la glucosa	-	-	-

6. CONCLUSIONES.

1. Para estudiar el potencial biodegradador de poblaciones marinas, se llevaron a cabo cultivos de enriquecimiento con diferentes tipos de plástico, de los que el PETE fue el que experimentó una mayor pérdida de peso (-0,187%).
2. El estudio posterior de la biodegradación de PETE en cultivos incubados durante 45 días, no reveló pérdidas de peso significativas entre los cultivos (-0,2278 %) y sus respectivos controles no inoculados (-0,1291 %). Los análisis cualitativos mediante técnicas espectroscópicas (FTIR) y microscópicas (AFM), tampoco mostraron evidencias de un ataque microbiano relevante.
3. La formación de biopelículas sobre la superficie de PETE se valoró mediante hidrólisis de DAF, poniéndose de manifiesto una baja actividad biológica (0,3073 mg DAF hidrolizado/cm².h), que no mostró diferencias significativas con respecto a los controles.
4. Después del periodo de incubación de los cultivos en presencia de PETE, iniciados con una concentración celular del orden de 10⁵ UFC/ml, la población microbiana se incrementó en dos órdenes de magnitud, mostrando estar formada por una población mixta de bacilos Gram – y Gram + esporulados.

CONCLUSIONS

1. In order to study the biodegradable potential of marine populations, enrichment cultures were carried out with different types of plastic, of which PETE was the one that experienced the greatest weight loss (-0.187%).
2. The subsequent study of the biodegradation of PETE in cultures incubated for 45 days showed no significant weight losses between the cultures (-0.2228%) and their respective uninoculated controls (-0.1291%). In the same way, qualitative analyzes using spectroscopic (FTIR) and microscopic (AFM) techniques did not show evidence of a relevant microbial attack.
3. Biofilm formation on the PETE surface was evaluated by DAF hydrolysis, showing a low biological activity (0.3073 mg DAF hydrolyzed /cm² h), which did not show significant differences with respect to the controls.
4. After the incubation period in the presence of PETE, the cultures initiated with a cell concentration of the order of 10⁵ CFU / ml, increased their microbial population by two orders of magnitude, showing to be formed by a mixed population of Gram - and sporulated Gram + bacilli.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Ambika K.D, P.V.Ratnasri.V, Lakshmi B.K.M, Hemalatha K.P.J, 2014.Isolation of polythene degrading bacteria from marine waters of Viskhapatnam, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2: 269-283.
- Czichos, H., Saito, T. Smith, L., (Eds.). 2011. Biogenic Impact on Material. In: Springer Handbook of Metrology and Testing. 2nd Ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 770-838.
- Dey, U., Mondal, NK., Kousik, D. and Shampa, D. 2012. An approach to polymer degradation through microbes. *Journal of Pharmacy*, 2: 385-388.
- Elashmawi, I. S., Hakeem N.A, and Abdelrazek E.M. 2008. Spectroscopic and thermal studies of PS/PVAc blends. *Physica. B.* 403: 3547– 3552.
- Ioakeimidis C., Fotopoulou K.N, Karapanagiotti H.K, Geraga, M., Zeri C., et al. 2016. The degradation potential of PET bottles in the marine environment: An ATR-FTIR based approach. *Scientific Reports* 6: 23501.
- Gewert B., Plassmann M.M, MacLeod M., 2015. “Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment”. *Environ. Sci.: Processes Impacts*: 17, 1513.
- Gilan, I., Hadar, Y. y Sivan, A., 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a train of *Rhodococcus ruber*. *Applied microbial and cell physiology*, 65: 97-104.
- Gnanavel, G., Mahana Jeya Valli, VP., Thirumarimurugan y M., Kannadasan, T., 2012. Degradation of plastics using microorganisms. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 1: 1040-1043.
- Kannahi, M. y Sudha, P., 2013. Screening of polythene and plastic degrading microbes from Muthupet mangrove soil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5: 122-127.
- Law K.L., 2017. Plastics in Marine Environment. *The Annual Review of Marine Science* 9: 205-29.
- Krueger, Martín C, 2015. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 8857 -8874.
- Kyaw, B.M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M.K., Lim, C.S., Sakharkar, R., 2012. Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* species. *Indian J Microbiol*, 52: 411-419.
- Mahalakshmi, V., 2014. Evaluation of Biodegradation of Plastics. *International Journal of Innovative Research & Development*. 3: 185-190.

- Milstein, O., R. Gersonde, A. Huttermann, R. Frund, H. J. Feine, H. D. Ludermann, M. J. Chen, and J. J. Meister. 1994. Infrared and nuclear magnetic resonance evidence of degradation in thermoplastics based on forest products. *J. Environ. Polym. Degrad.* 2: 137-152.
- Mukherjee, S. y Chatterjee, S., 2014. A comparative study of commercially available plastic carry bag biodegradation by microorganisms isolated from hydrocarbon effluent enriched soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3: 318-325.
- Mohamed, A., Gordon S.H, and Biresaw G. 2007. Polycaprolactone/polystyrene bioblends characterized by thermogravimetry, modulated differential scanning calorimetry and infrared photoacoustic spectroscopy. *Polym. Degrad. Stab.* 92:1177-1185.
- Ivleva, N.P, Wiesheu A.C, Niessner R., 2017. Microplastics in Aquatic Ecosystems. *Angewandte Chemie International Edition* 56: 1720-1239.
- Paço A., Duarte K., Da Costa J.P., Santos P.S.M, Pereira R., et al. 2017. Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Science of the Total Environment* 586: 10-15.
- Sangale, M.K., Shahnawaz, M., y Ade, A.B., 2012. A Review on Biodegradation of Polythene: The Microbial Approach. *J. Bioremed Biodeg.*, 3: 164.
- Schnürer J., Rosswall T., 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl Environ Microbiol* 43: 1256-61.
- Shahnawaz, M., Sangale, M.K. y Ade, A.B., 2016. Bacteria-based polythene degradation products: GC-MS analysis and toxicity testing. *Environmental Science Pollution Research* 23: 10733-10741.
- Shalini, R., y Sasikumar, C., 2015. Biodegradation of Low Density Polythene materials using microbial consortium – An overview. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4: 507- 514.
- Sharon C. y Sharon, M., 2012. Studies on Biodegradation of Polyethylene terephthalate: A synthetic polymer. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 2: 248-257.
- Singh, B., and N. Sharma. 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym. Degrad. Stab.* 93:561-584.
- Skariyachan, S., Megha, M., Kini, M.N., Mukund, K.M., Rizvi, A., Vasist, K. 2015. Selection and screening of microbial consortia for efficient and ecofriendly degradation of plastic garbage collected from urban and rural areas of Bangalore, India. *Environ Monit Assess*, 187:4174
- Tribedi, P., Sarkar, S., Mukherjee, K. y Sil, A.K., 2012. Isolation of a novel *Pseudomonas sp.* from soil that can efficiently degrade polyethylene succinate. *Environ Sci Pollut Res*, 19: 2115-2124.

Troiano, F., Vicini, S., Gioventu, E., Lorenzi, P.F., Improta, C.M. y Cappitelli, F., 2014. A methodology to select bacteria able to remove synthetic polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 107: 321-327.

Wei-Min Wu, Jun Yang, Craig S. Criddle. 2017. Microplastics pollution and reduction strategies. *Front. Environ. Sci. Eng* 11: 6.

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., Oda, Y. 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351: 1196- 1199.