



UNIVERSIDAD  
DE ALMERÍA



**UNIVERSIDAD DE ALMERÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**  
**Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria**

**TRABAJO FIN DE ESTUDIOS**

**Junio 2022**

**Búsqueda de soportes para la inoculación de  
bacterias degradadoras de plásticos en  
suelos**



**Autor: David Ferrer Zamora**

**Director: Macarena del Mar Jurado Rodríguez**

**Codirector: Francisca Suárez Estrella**

**Departamento de Biología y Geología**

**Área de Microbiología**



# Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer al profesor Joaquín Moreno el entusiasmo con el que inculcó nuestras mentes en primero que a día de hoy sigue presente. Gracias por tanto a cambio de nada. Siempre estarás presente.

A M.<sup>a</sup> José López, por permitirme seguir un año más formándome en mi pasión, la microbiología. Gracias por ser un referente y una persona digna de admirar.

A Macarena, mi directora, por ayudarme a mejorar y ser mejor micro-científico.

A mi compañero de viaje, Víctor. Gracias por tu apoyo incondicional, por guiarme, aconsejarme y estar siempre que te he necesitado. Sin ti no habría llegado tan lejos.

A Paqui , mi codirectora y Juan, por su eterna disponibilidad.

A todos los miembros del equipo BIO-175, María Rosa, Ana Toribio, Jesús, Rosario y Raúl por ayudar siempre que era necesario, y por generar tan buen ambiente en el laboratorio. Me gustaría hacer una mención especial a María Estrella, por estar siempre que se la necesita con una gran sonrisa, a pesar de que tenga mil cosas que hacer.

A todos los compañeros de TFG y TFM de este año, por la ayuda y el buen ambiente, en especial a Martín, durante todos los años de carrera y máster.

Y por supuesto, a mi familia y amigos por apoyarme en todo momento; muchas gracias.



Este trabajo ha sido financiado por la Empresa Común de Industrias de Base Biológica en el marco del programa de innovación e investigación de la Unión Europea H2020 RECOVER bajo el acuerdo de financiación RECOVER nº 887648. La Empresa Común recibe apoyo del programa de investigación e innovación Horizonte 2020 de la Unión Europea y del Consorcio de industrias de base biológica.

# Índice:

Resumen	1
Abstract	1
1.Introducción	2
1.1 Plásticos y problemática asociadas	2
1.1.1. Producción y acumulación de plástico	2
1.1.2. Efectos ambientales derivados del vertido de plásticos	3
1.1.3. Gestión de plásticos y degradabilidad	6
1.2 Degradación biológica de plástico	8
1.2.1. Enzimas relacionadas con la degradación de plásticos	10
1.3 <i>Carriers</i> o soportes para inoculantes microbianos	13
2. Objetivos	15
3. Material y métodos	16
3.1. Fases del estudio - esquema global	16
3.2. Microorganismos empleados	16
3.3. Soportes	17
3.3.1. Alginato	17
3.3.2. Vermicompost	18
3.3.3. Biochar	19
3.4. Estudio de viabilidad celular y enzimática	19
3.5. Validación de la eficacia de los soportes como inoculantes degradadores de plásticos: ensayo de mineralización	23
3.6. Análisis estadístico	23
4. Resultados y discusión	24
4.1 Evaluación del mantenimiento de la viabilidad celular	24
4.1.1. Alginato	24
4.1.2. Vermicompost	27
4.1.3. Biochar	28
4.1.4. Análisis estadístico comparativo	30
4.2 Evaluación del mantenimiento de la actividad enzimática	32
4.3 Validación de la actividad de las formulaciones: análisis de mineralización de plásticos	35
5. Conclusiones	36
6. Bibliografía	36

## Resumen

El elevado consumo y recalcitrancia de los plásticos están afectando de forma negativa a todos los ecosistemas, contaminándolos. Se requieren alternativas para la biorremediación de entornos contaminados con plásticos. Este trabajo se centra en la selección de soportes o carriers para el desarrollo de formulaciones microbianas degradadoras de plásticos que puedan aplicarse en suelos contaminados. Para ello se analizó el mantenimiento de la viabilidad celular y actividad de cultivos puros y co cultivos de dos bacterias degradadoras de plásticos en tres soportes: esferas de alginato, tanto con solución salina como con caldo nutritivo; vermicompost; y biochar. Se midió la supervivencia de los microorganismos, así como el mantenimiento de su actividad enzimática degradativa durante el periodo de almacenaje. Tras el análisis de los resultados, quedo patente que el vermicompost fue el soporte más adecuado debido a que permite la conservación o incluso incremento de la viabilidad celular y el mantenimiento de las actividades enzimáticas degradativas durante casi dos meses de almacenaje. No obstante, cabe resaltar que las formulaciones de bacterias tanto sobre soporte de biochar como de vermicompost permiten una elevada tasa de mineralización de plástico. Estas formulaciones resultan prometedoras para la biorremediación de suelos contaminados con plásticos.

**Palabras clave:** Alginato, vermicompost, biochar, co-cultivos, mineralización

## Abstract

The high consumption and recalcitrance of plastics are negatively affecting all ecosystems, polluting them. Alternatives are required for the bioremediation of environments contaminated with plastics. This work focuses on the selection of supports or carriers for the development of microbial formulations that degrade plastics and can be applied in contaminated soils. For this, the cell viability and activity of pure cultures and co-cultures of two plastic-degrading bacteria in three supports was analyzed: alginate spheres, both with saline solution and with nutrient broth; vermicompost; and biochar. The survival of the microorganisms was measured, as well as the maintenance of their degradative enzymatic activity during the storage period. After analyzing the results, it was clear that the vermicompost was the most suitable support because it allows the maintenance or even the increase of cell viability, as well as, keeping the degradative enzymatic activities during almost two months of storage. However, it should be noted that bacteria formulation on biochar and vermicompost allow a high rate of plastic mineralization. These formulations show promise for the bioremediation of soils contaminated with plastics.

**Keywords:** Alginate, vermicompost, biochar, co-culture, mineralization

# 1.Introducción

## 1.1 Plásticos y problemática asociadas

### 1.1.1. Producción y acumulación de plástico

Actualmente, un mundo sin plásticos parece estar fuera de alcance debido a la gran distribución y uso de este tipo de materiales a lo largo de todo el planeta. Sin embargo, su origen no es tan lejano. Los plásticos aparecieron a principios del siglo XX (Geyer et al., 2017), pero no se generalizó su uso hasta después de la Segunda Guerra Mundial. Desde ese momento hasta ahora, su producción y utilización han aumentado de forma exponencial, reemplazando casi en su totalidad a otro tipo de materiales. La expansión ha sido especialmente notable durante la pandemia de la COVID-19, ya que no solo ha aumentado la demanda de plásticos, sino que ha puesto en jaque los sistemas de gestión de sus residuos actuales y en evidencia la necesidad de transformar dichos residuos en nuevos recursos, lo que permitirá avanzar hacia una economía circular y combatir la acumulación de plásticos en los entornos naturales (Khoo et al., 2021).

La producción de plástico, excluyendo reciclados, se ha visto reducida en los últimos años en Europa, alcanzando un máximo de 64,4 millones de toneladas en el año 2017 (Figura 1). Los países líderes en demanda de plástico son Alemania, Italia, Francia, Polonia, España y Reino Unido, en orden descendente (Plasticseurope, 2022).

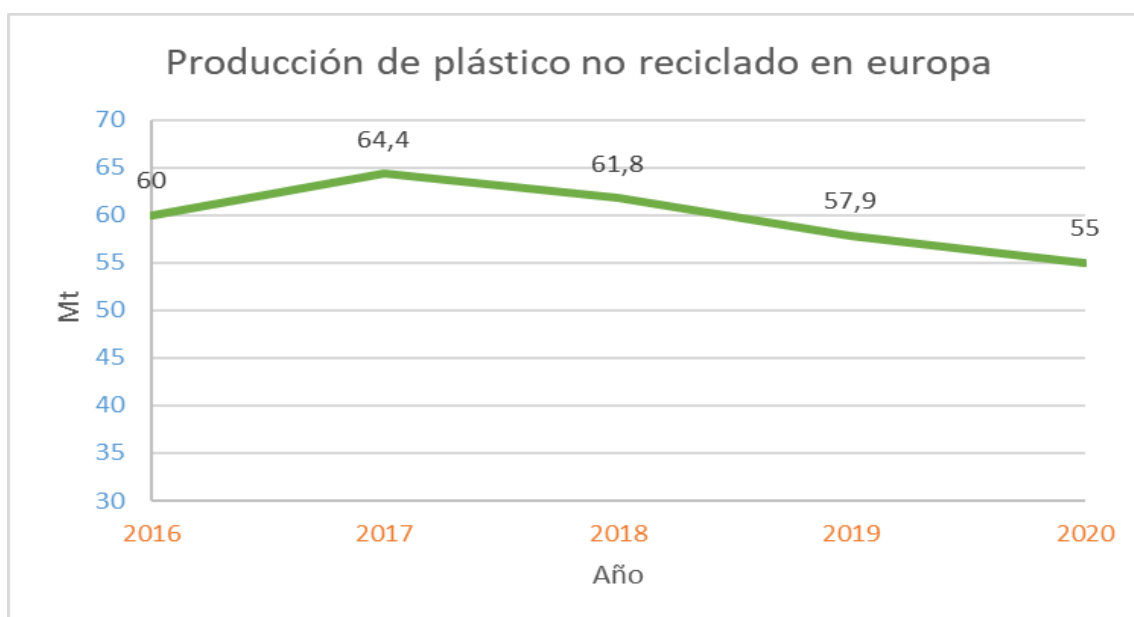


Figura 1. Producción de plástico no reciclado en Europa en Millones de toneladas (Mt) (Plasticseurope, 2022) .

Un 41% de la demanda de plásticos está destinada para la producción de embalajes, siendo el Polietileno de Baja Densidad Lineal (LLDPE) el polímero más utilizado, mientras que un 3,2%

se emplea en el sector agrícola (Figura 2) (Plasticseurope, 2022). Ambos sectores se encuentran entre los de mayor importancia económica en la provincia de Almería.

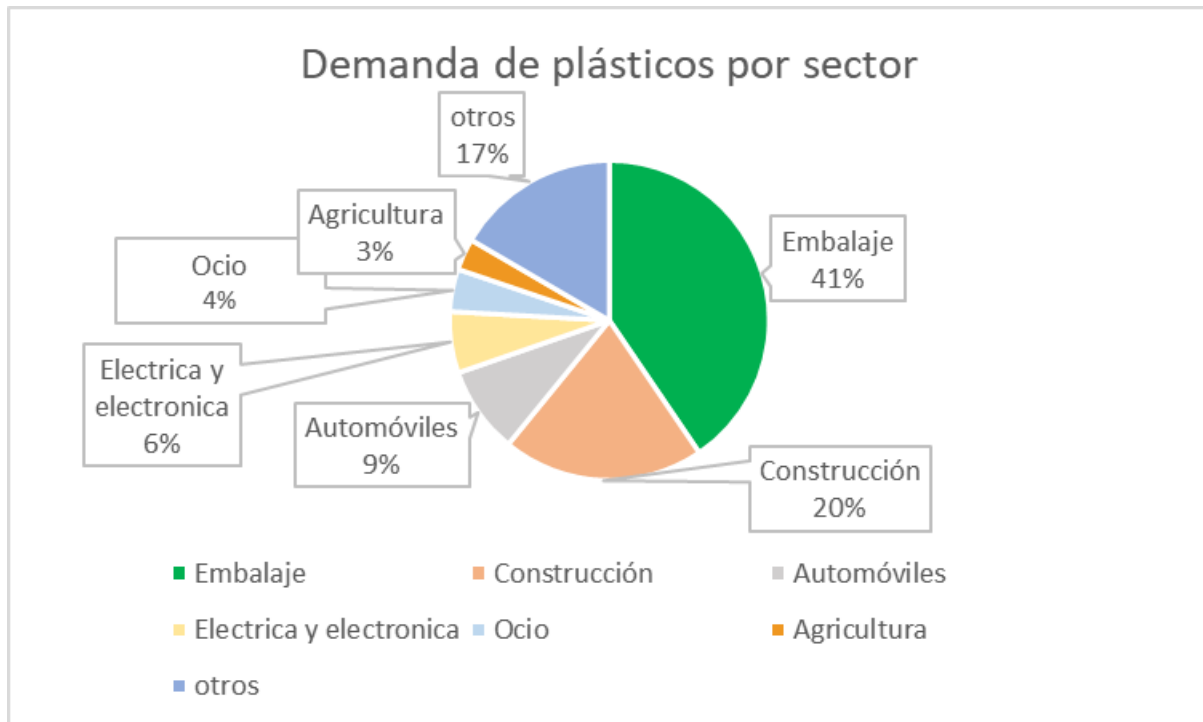


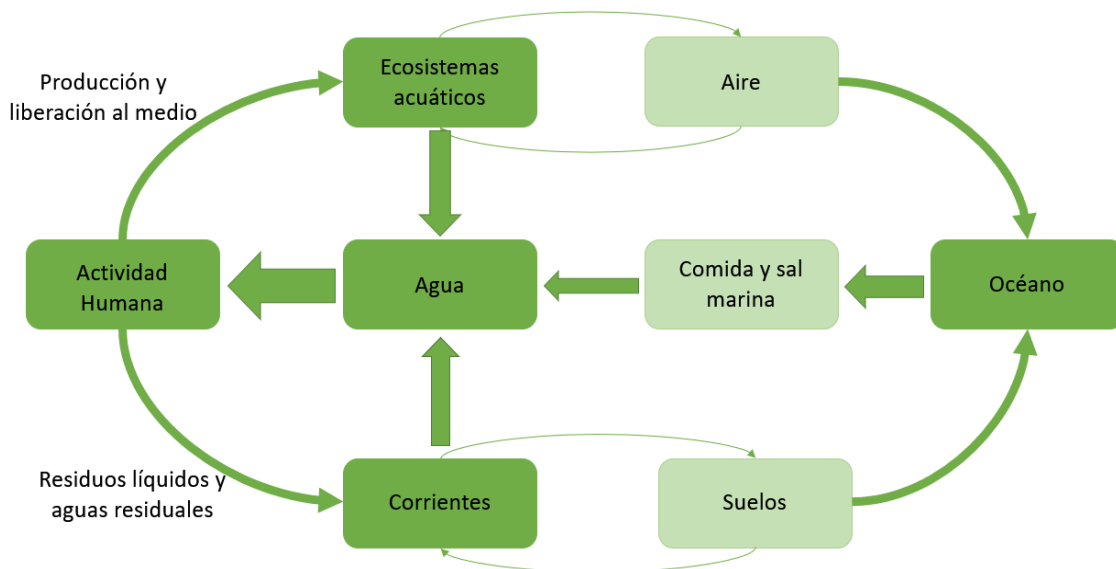
Figura 2. Demanda de plásticos por sector en Europa (Plasticseurope, 2022).

### 1.1.2. Efectos ambientales derivados del vertido de plásticos

El elevado nivel de producción y uso de materiales plásticos conlleva una masiva generación de residuos de difícil gestión y aprovechamiento que ocasionan importantes impactos negativos en diversos ecosistemas.

Los desechos plásticos acceden al entorno natural por múltiples vías, incluyendo las aguas residuales (domésticas e industriales); las fibras plásticas de la ropa, en especial las procedentes de los trajes de baño, ya que suponen un potencial vertido directo; las partículas arrastradas a través del viento; la agricultura intensiva y los vertidos ilegales de basura (Oliveira et al., 2019) (Figura 3). Además, la reciente pandemia ha aumentado también la acumulación de plásticos de uso sanitario tanto atribuido a profesionales (trajes de protección, material de un solo uso, etc.) como a particulares (guantes y mascarillas, principalmente). Estas prácticas aumentan la acumulación de residuos plásticos en vertederos, así como su liberación no intencionada en el ambiente (Khoo et al., 2021).





**Figura 3.** Circulación de plásticos en los ecosistemas (adaptado de Oliveira et al., 2019).

Teniendo en cuenta la circulación de los desechos plásticos en los distintos ambientes y dado que los sistemas de gestión son ineficientes, es habitual que este tipo de materiales acaben acumulándose en los entornos naturales, con el peligro que ello conlleva.

### Ecosistemas terrestres

La acumulación de plástico en el suelo no se lleva a cabo solo en superficie, sino también a través de todas sus capas, pudiendo llegar incluso a transferirse a los acuíferos, lo que permite la circulación de estos materiales contaminantes hacia los sistemas acuáticos. Esto se debe a su presencia constante a lo largo de toda la cadena trófica y a su disgregación (Figura 4). Determinados factores ambientales como la radiación UV y la temperatura provocan la fragmentación del plástico hasta dar lugar a la aparición de pequeñas partículas denominadas microplásticos (MP), con un diámetro inferior a 5 mm, que son digeridos por las lombrices, organismos fundamentales en el suelo, transportándose así a capas más profundas y afectando, por ende, a la microbiota, la flora y fauna del suelo. En este último caso, se ven especialmente afectados insectos y otros organismos edáficos (Chae y An, 2018). También cabe destacar la acumulación de plásticos en suelos de uso agrícola, tales como restos de rafias y plásticos de acolchado, que contribuyen a reducir la fertilidad y calidad del suelo, principalmente por la disminución de su porosidad y la afectación de su biodiversidad (Hurley y Nizzetto, 2018; Sajjad et al., 2022).

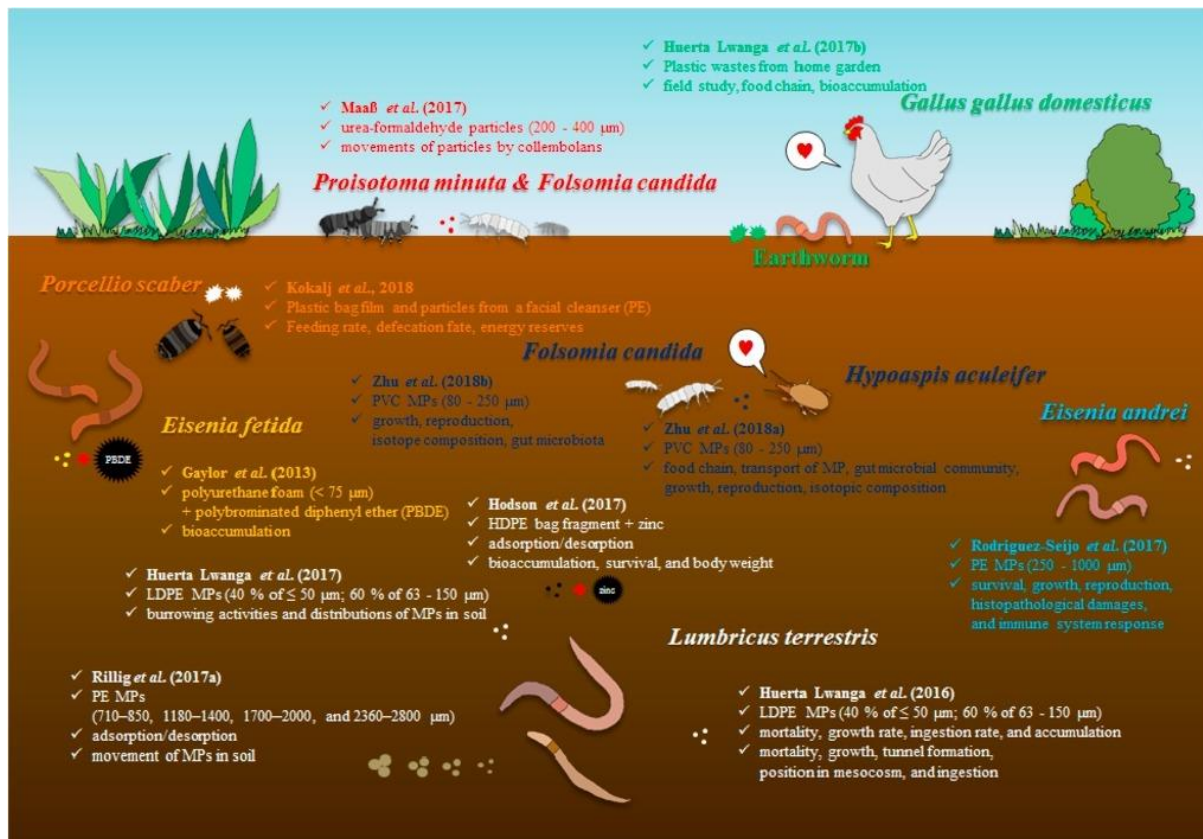


Figura 4. Transferencia de microplásticos a lo largo de la cadena trófica (Chae y An, 2018).

Precisamente, por su papel fundamental en los ecosistemas terrestres, las lombrices han sido empleadas como organismos modelo para el estudio de la ecotoxicidad de los plásticos en estos ambientes. Lwanga et al. (2016) estudiaron los efectos de la presencia de Polietileno (PE) a distintas concentraciones sobre las lombrices. Pasados 60 días de exposición a los plásticos, observaron que la mortalidad fue mayor en lombrices expuestas a elevadas concentraciones de plásticos, respecto al control sin plástico. Así mismo, debido a la enorme presencia de estos materiales xenobióticos en el suelo, especialmente patente durante las últimas décadas, en la actualidad se puede observar una distribución generalizada de bacterias potencialmente degradadoras de plásticos en suelos (Charnock, 2021), lo cual cambia las características de la composición microbiana de este tipo de ecosistema que se postula como una fuente de potenciales recursos microbianos con interés como herramientas biotecnológicas en tareas de biodescontaminación.

### Ecosistemas marinos

Dentro de los ecosistemas marinos, los oceánicos son los que mayor presión sufren en el momento presente. Reciben en última instancia todos los vertidos plásticos, a lo que se deben sumar los vertidos procedentes de las industrias pesquera y petrolífera (Deshpande et al., 2020). Por ello, el ecosistema se ve gravemente afectado por múltiples factores, siendo uno de ellos el propio efecto físico de los plásticos sobre la fauna y flora marinas, lo que puede llegar a desencadenar inmunomodulación, generación de especies reactivas de oxígeno,

afectación de neurotransmisores o apoptosis (Oliveira et al., 2019). Por otra parte, se debe tener en cuenta que la formación de biofilms sobre los plásticos depositados en los sistemas acuáticos, pueden llegar a estar conformados por especies en ocasiones virulentas, cuyo efecto negativo se ve aumentado por la capacidad de absorción y acumulación de metales pesados de determinadas biopelículas microbianas, así como por los aditivos tóxicos que los materiales plásticos presentan de por sí, incrementando enormemente la contaminación de los sistemas marinos (Xu et al., 2018; Yuan et al., 2022). La enorme presencia de estos residuos facilita su ingesta a lo largo de toda la cadena trófica, causando la muerte de muchas especies en los ecosistemas acuáticos y perjudicando seriamente la salud de las personas.

Además, cabe destacar que una vez los plásticos ingresan en el agua, se ven transportados por todo el planeta mediante las corrientes marinas, pudiendo aparecer, por ejemplo, plásticos de origen chino en zonas tales como Hawái o México (Sigler, 2014; Alvarez-Zeferino et al., 2020).

Dada la masiva presencia de residuos plásticos en el ambiente, así como las consecuencias perjudiciales asociadas a la interacción de estos con los organismos vivos, uno de los efectos más importantes es el atribuido a los perjuicios causados por los microplásticos en la salud humana. Su presencia, entre otras cosas, se asocia a daños oxidativos sobre las membranas celulares y el material genético, e incluso con la proliferación de distintos tipos de cáncer y de fibrosis (Vethaak y Legler, 2021). La presencia de microplásticos se atribuye a la ingesta de productos contaminados, especialmente pescados y mariscos (Wright y Kelly, 2017; Smith et al., 2018). Adicionalmente, los microplásticos pueden ser inhalados, en fábricas o ciudades muy contaminadas, causando disnea e inflamación grave de los tejidos (Prata, 2018), pudiendo penetrar a distintos niveles, llegándose a encontrar incluso en la placenta de algunas mujeres embarazadas (Ragusa et al., 2021). Esta problemática no solo afecta directamente a la salud, sino que, en gran medida, afecta indirectamente a las industrias turística, pecuaria y a la restauración, por lo que a estos efectos ambientales hay que sumar los económicos y sociales (Oliveira et al., 2019).

### 1.1.3. Gestión de plásticos y degradabilidad

En la Unión Europea (UE) se recolectaron en el año 2020 un total de 29,5 millones de toneladas de residuos plásticos. De estos, un 42% se empleó para la producción de energía; un 23,4% se desechó en vertedero; y solo un 34,6% se recicló (Plasticseurope, 2022). Estos datos son variables entre los distintos países de la UE, sobre todo respecto al porcentaje de acumulación en vertedero, en función a las restricciones autoimpuestas por cada Gobierno. En cualquier caso, debido al aumento paulatino de la población y, por ende, del consumo de productos plásticos, así como a la lenta implementación de sistemas de gestión circulares para los residuos plásticos, es necesaria la búsqueda de alternativas más sostenibles (Khoo et al, 2021) que permitan controlar la polución, en este momento considerada difícilmente reversible (MacLeod et al., 2021).

Una de las alternativas propuestas consiste en la sustitución de los plásticos tradicionales por plásticos biodegradables o, sin ser biodegradables, procedentes de fuentes renovables o de origen biológico (Tabla 1), como el Tereftalato de polietileno (PET) de origen biológico, producido parcialmente a partir de biomasa renovable (Havstad, 2020).

**Tabla 1.** Clasificación de plásticos según origen y potencial degradabilidad (adaptado de Havstad, 2020).

		DEGRADABILIDAD	
		No Biodegradable	Biodegradable
Origen	Biológico	PE, PET, PA, etc.	Mezcla de almidón, PLA, PHA
	Combustibles fósiles	PE,PET,PA, etc.	Poliésteres

De estos, los biodegradables de origen biológico son los conocidos o llamados “bioplásticos”, y son lo más cercano a la total sostenibilidad. Se trata de productos biocompatibles, no tóxicos, que tienen una amplia gama de aplicaciones y son generados mediante técnicas biotecnológicas. Los polihidroxialcanoatos (PHA) son compuestos lipídicos con función de reserva carbonada (en gránulos) para los microorganismos en condiciones específicas. Otros de estos denominados bioplásticos se obtienen mediante intermediarios o finales de rutas tales como la  $\beta$ -oxidación o la fermentación, como el ácido poliláctico (PLA) (Vroman y Tighzert, 2009). Estos metabolitos y gránulos de reserva se pueden obtener empleando como materia prima para el crecimiento microbiano residuos orgánicos de múltiples orígenes, lo que favorece en mayor medida la economía circular (cero residuos).

Sin embargo, a día de hoy se sigue sin garantizar la generación de bioplásticos con las mismas prestaciones de vida útil y fácil manejo que los plásticos tradicionales, intentando asegurar además una rápida degradación biológica posterior de los residuos remanentes, ya que esto último depende del tiempo de permanencia del plástico en el lugar de depósito, de las características del sitio, de la microbiota presente y de la influencia de otros factores ambientales. Es por esto por lo que no se puede asegurar una determinada degradación en cualquier situación y se propone avalar, al menos, la degradación bajo condiciones específicas y controladas; buscando una degradación óptima, cuyos co-productos o resultados de degradación sean, además, útiles para otras industrias (North y Halden, 2013). Para lograr

esto, se propone un cambio de estrategia basado en los sistemas de economía circular, el procesado en biorefinerías (Figura 5) (Roux y Varrone, 2021).

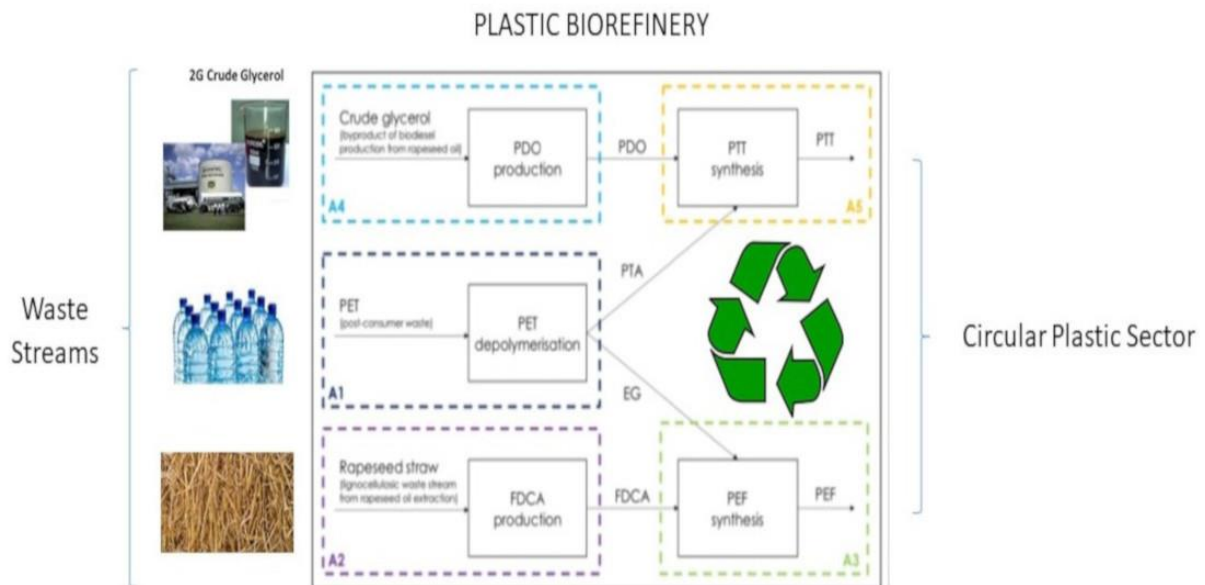


Figura 5. Biorefinería para plásticos en sistema circular (Roux y Varrone, 2021).

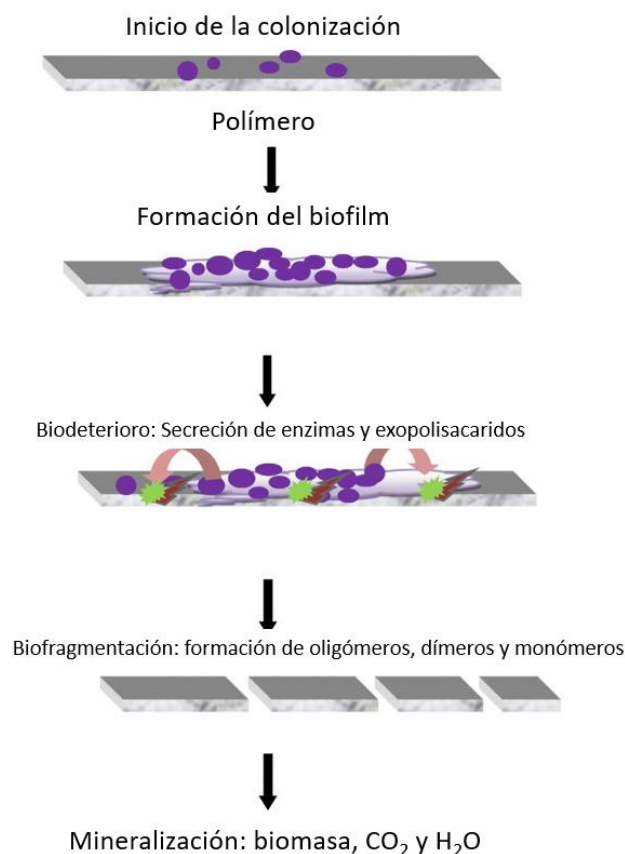
Dada la falta de opciones actuales sostenibles para el tratamiento de residuos plásticos, es de imperiosa importancia el estudio de la degradabilidad de materiales plásticos (a priori biodegradables o no), para buscar formas de integrarlos en los sistemas circulares de gestión, permitiendo su eliminación del medio ambiente y reduciendo así las repercusiones de los plásticos en los entornos naturales.

## 1.2 Degradación biológica de plástico

La biodegradación es el proceso biológico de eliminación total o modificación de los materiales a través de la acción microbiana. La exposición de los polímeros a factores abióticos tales como luz, calor, humedad, etc., provoca fragmentación y cambios químicos, lo que facilita la degradación de dichos materiales por parte de los microorganismos. Dicha degradación, que ocurre naturalmente en los nichos ecológicos de los microorganismos, puede convertirse en una oportunidad para la gestión y eliminación de residuos plásticos, separados o no de otro tipo de restos de naturaleza orgánica (Mueller, 2006; Sivan, 2011), permitiendo no solo la eliminación precoz de estos residuos, sino una gestión que favorece su valorización (Khoo et al., 2021).

Previamente a la biodegradación, la fragmentación abiótica, causada por distintos factores, principalmente químicos (oxígeno, aire, agua u otros productos de síntesis) o mecánicos (compresión, torsión o cizalla), permite la obtención de polímeros de menor tamaño. (Briassoulis, 2005; Jakubowicz et al., 2006; Du et al., 2022). De entre estos factores, los fotodegradativos son los más importantes, ya que alteran rápidamente la composición química de la superficie plástica. Por su parte, los térmicos permiten una mayor accesibilidad a los polímeros por parte de los microorganismos, pero dan resultados menos estables (Tsuji y Nisimura, 2006).

Como se muestra en la Figura 6, para una completa desintegración y eliminación del plástico se deben suceder las siguientes cuatro fases fundamentales: biodeterioro, biofragmentación, asimilación y mineralización (Anjana et al., 2020).



**Figura 6.** Fases de desintegración y mineralización de plásticos. (Adaptada de Anjana et al., 2020)

1.- Biodeterioro: la acción de los factores abióticos con la actividad de los microorganismos y otros seres vivos inicia la rotura del material, propiciando la generación de biofilms bacterianos sobre la superficie de plástico (formada ésta por una comunidad microbiana muy compleja). Esto modifica todas las propiedades físicas, químicas y mecánicas del compuesto a degradar, reduciendo así la durabilidad y resistencia de este (Du et al., 2022).

2.- Biofragmentación: los radicales libres generados anteriormente junto con las enzimas excretadas (extracelulares), realizan esta acción. Esto genera una despolimerización, que da

como resultado la obtención de fragmentos (monómeros, dímeros y oligómeros) que pueden llegar al interior de la célula, atravesando la membrana plasmática y la pared celular (Jenkins et al., 2019).

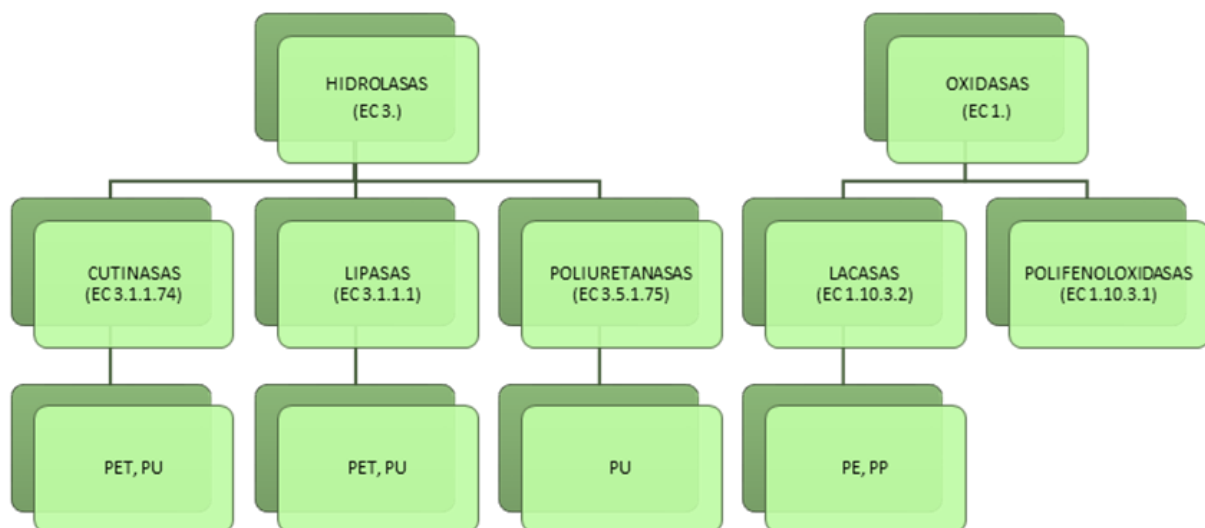
3.- Asimilación: todas las moléculas son entonces reducidas a fragmentos menores, para su entrada a las células en forma de polímeros de entre 10 y 15 carbonos y se emplean enzimas para poder proceder a su uso, incorporándose estos materiales a las rutas metabólicas y de aprovechamiento energético y como fuente de nutrientes, principalmente aportando carbono, fósforo, oxígeno o sulfuros (Lugauskas et al., 2003; Bhardwaj et al., 2013).

4.- Mineralización: toda la cadena de reacciones anteriores da lugar a la mineralización completa hacia productos tales como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> y sales (Alshehrei, 2017).

Todos estos procesos necesitan de las enzimas microbianas, especialmente durante la fase de degradación de los polímeros. Entre estas destacan las hidrolasas (cutinasa, poliuretanasas y lipasas) y las oxidasas (polifenoloxidasas y lacasas) (Restrepo-Flórez et al., 2014).

### 1.2.1. Enzimas relacionadas con la degradación de plásticos

En la Figura 7 se muestran algunas enzimas asociadas a la degradación de plásticos y los polímeros sobre los que actúan.



**Figura 7.** Enzimas que actúan sobre la degradación de algunos de los plásticos más usados en la actualidad. PET: Tereftalato de polietileno; PU: Poliuretano; PE: Polietileno; PP: Polipropileno (Mohan et al., 2020).

Algunas de las enzimas que destacan en este ámbito son las esterasas (EC 3.1.1). Se trata de enzimas capaces de romper enlaces éster (oxo ésteres o tioésteres) como los que se

encuentran en los poliésteres. Entre estas, las enzimas más estudiadas para la biodegradación de plásticos son lipasas y cutinasas (Premraj y Doble, 2005).

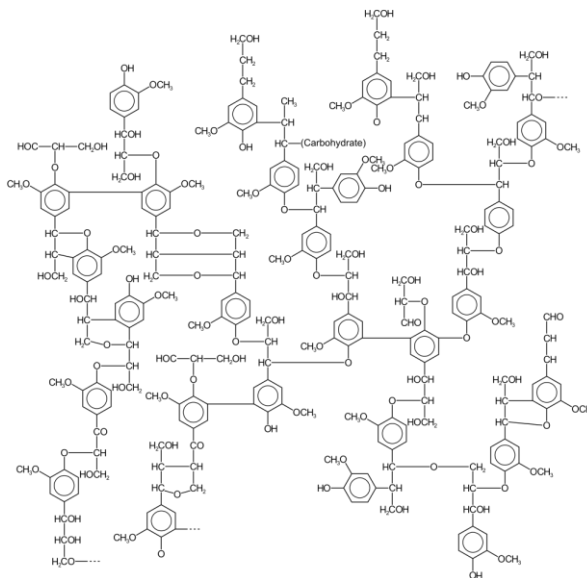
Las lipasas (EC 3.1.1.1.) son enzimas de la familia  $\alpha/\beta$  hidrolasas, poseen el trío catalítico Ser-His-Asp y son capaces de hidrolizar ciertos poliésteres, como la policaprolactona (PLC) o el PET, así como ácidos grasos de cadena larga (Brady et al., 1990; Herzog et al., 2006). En algunos polímeros, como el PET, su actividad está restringida, posiblemente debido a la dificultad para el acceso del sustrato al centro catalítico (hidrofóbico) de la enzima (Guebitz y Cavaco-Paulo, 2008; Eberl et al., 2009).

Las cutinasas (EC 3.1.1.74) son relevantes debido a su capacidad para hidrolizar poliésteres de elevada masa, y otros compuestos como la cutina que recubre la cutícula de las plantas (Chen et al., 2013). Además, son capaces de actuar sobre PLC y PET, aunque lo hacen mejor a altas temperaturas (más de 55 °C) (Danso et al., 2019; Mohanan et al., 2020). Poseen también la triada catalítica Ser-His-Asp y su centro activo está expuesto a disolventes hidrófobos. Fueron extraídas por primera vez de hongos fitopatógenos, como algunas cepas de la especie *Fusarium solani pisi* (Kolattukudy, 2001; Heredia, 2003), a los que les permite eliminar la cutina de las hojas, favoreciendo así su entrada al hospedador vegetal. También se han encontrado en actinobacterias termófilas, por lo que se dividen según su origen bacteriano o fúngico. Se ha observado que cuando se encuentran presentes, el microorganismo muestra capacidad degradadora de plásticos poliésteres (Ronkvist et al., 2009; Baker et al., 2012).

A pesar de la importancia de las enzimas anteriormente mencionadas, según las características del material en cuestión existen otro tipo de enzimas de interés. Es el caso del poliuretano, necesita de la enzima poliuretanasa (EC 3.5.1.75). Esta se encuentra de forma extracelular y asociada a la membrana de los microorganismos, y ve su actividad estimulada a temperaturas altas, puesto que en esas condiciones se facilita el acceso al polímero a degradar (Howard et al., 1999).

Otra estrategia a tener en cuenta en la búsqueda de enzimas de interés en la biodegradación de plásticos se basa en el estudio de aquellas capaces de actuar sobre materiales recalcitrantes presentes en la naturaleza. Este es el caso de la lignina, uno de los biopolímeros naturales más recalcitrantes conocidos, parte fundamental de la pared celular para su fortalecimiento, forma además una red o matriz que protege a la celulosa y la hemicelulosa del ataque microbiano (Figura 8). Se forma a partir de derivados de fenilalcoholes tales como coniferílicos, cumarílicos y sinapílicos. Su compleja estructura, debida a una gran cantidad de enlaces de difícil rotura, así como a una repolimerización sencilla, lo transforman en un compuesto de difícil degradación. Por esto, se piensa que los microorganismos que presentan las herramientas para transformar este tipo de material podrían extrapolar dicha capacidad para la degradación de compuestos sintéticos (xenobióticos), por lo que se postulan como candidatos ideales en tareas de biorremediación (Buswell et al., 1987).





**Figura 8.** Estructura de la lignina (Glazer et al., 1996).

La degradación de esta intrincada matriz se lleva a cabo por un complejo de enzimas que incluyen oxidorreductasas (Bugg et al, 2011; Cheng et al., 2016); lignina peroxidasas, manganeso peroxidasa, tirosinasas, polifenoloxidasas y lacasas.

Las lacasas (EC 1.10.3.2), pueden actuar sobre fenoles, polifenoles y aminas mediante el uso de oxígeno, liberando agua. Tienen un centro activo de cobre, y se clasifican en función de su potencial (bajo, medio o alto) redox en dichos centros. De dichos centros, el 1 presenta una coloración azul debida a una acusada absorción a 660 nm en el lugar de la oxidación. En el 2 y el 3 es el sitio de reducción del O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Presentan un gran potencial de biorremediación de plásticos e hidrocarburos, entre otros xenobióticos (Gianfreda et al., 1999; Pannu y Kapoor, 2014; Zarinkamar et al., 2014). Hay que destacar por ejemplo la degradación de polietileno en ácido carboxílico mediante oxidación.

Por último, la polifenoloxidasa (EC 1.10.3.1.) es capaz de hidrolizar taninos y otros compuestos fenólicos (Powell y Stradling, 1986). Estos taninos reducen el crecimiento y actividad de los hongos (siendo la forma quinona la de mayor efecto), por lo que los microorganismos resistentes generan polifenoloxidasas para oxidar las quinonas a formas menos reactivas (Cherrett et al., 1989). Por tanto, la eficacia depende de la concentración y tipo de taninos presentes. Estas enzimas participan en reacciones redox de compuestos fenólicos o flavonoides (pardeamiento enzimático), en base a lo cual se realiza la caracterización enzimática de los microorganismos.

También degradan PE, pero la energía requerida para esto es mucho mayor que la necesaria para la degradación de lignina (degradación poco eficiente) (Krueger et al., 2015).

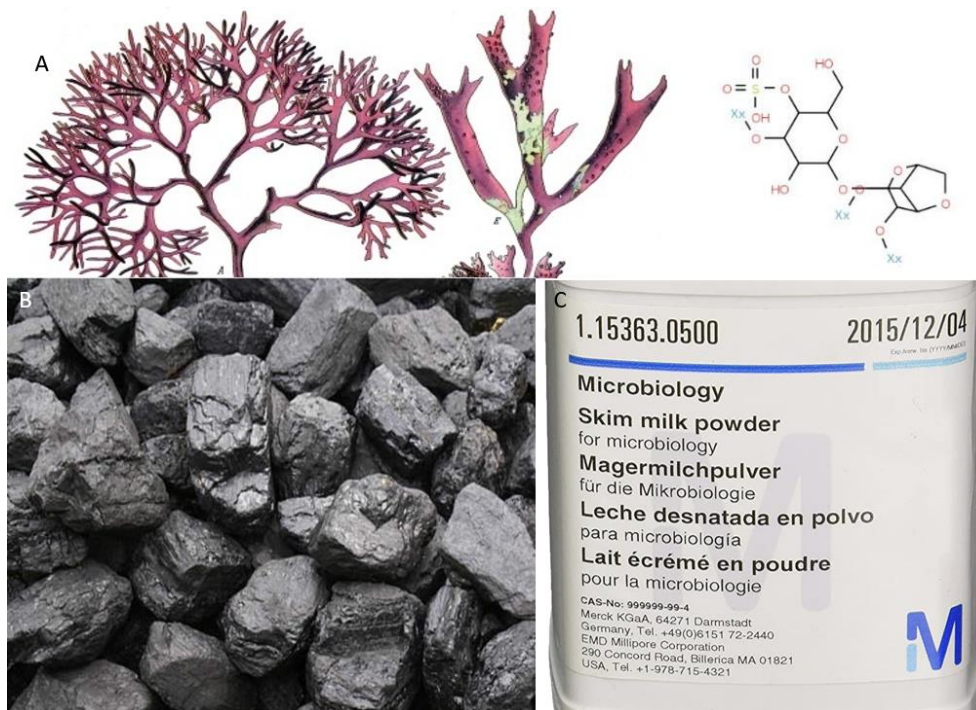
### 1.3 *Carriers* o soportes para inoculantes microbianos

La búsqueda de formas adecuadas para el mantenimiento y conservación de cepas microbianas, así como para la inoculación de dichos microorganismos en ambientes diversos, es una tarea de largo recorrido en el campo de la microbiología industrial y en su análoga y más reciente materia de estudio, la biotecnología microbiana. Los sistemas idóneos para el almacenamiento y distribución de formulaciones microbianas buscan una baja o nula actividad metabólica, de modo que se asegure una vida útil prolongada (Ravensberg, 2011).

Las aplicaciones asociadas a estas bioformulaciones tienen múltiples funciones, desde el empleo de los microorganismos como agentes biofertilizantes o bioprotectores en agricultura hasta su uso como inóculos iniciadores de procesos de obtención de alimentos o en tareas de biorremediación en ambientes contaminados (Bashan, 1998; Bastiaens et al., 2000; Theresa y Radhakrishnan, 2021; Ravensberg, 2011).

El empleo de inóculos microbianos tradicionalmente se ha realizado en soportes líquidos (Gangaraddi y Brahmprakash, 2018; Prakash y Arora, 2020), es decir, llevando a cabo suspensiones de los microorganismos sobre medios líquidos muy ricos en nutrientes que permitan el mantenimiento de su viabilidad. También se han empleado soportes sólidos como el lignito (un tipo de carbón) (Gangaraddi y Brahmprakash, 2018) (Figura 9), o sustratos como el compost que permiten la colonización de los microorganismos y su supervivencia, pero que, en ocasiones, pueden resultar limitantes del crecimiento microbiano por falta de nutrientes. Otra opción tradicionalmente empleada para la conservación y posterior utilización de los microorganismos ha sido la liofilización. En este caso, previo al proceso de congelado a vacío de las cepas, se requiere de un pretratamiento empleando un crioprotector que permita mantener la viabilidad de los microorganismos sin que se vean alteradas sus funciones (Vassilev et al., 2020), como la leche descremada (Figura 9) o el glicerol, lo que, por otra parte, podría limitar su aplicabilidad, además de dar como resultado un producto relativamente caro para ciertos usos.

Por otra parte, se está experimentando con nuevos materiales que permitan generar formulaciones más eficientes o aptas para alimentación como puede ser la encapsulación por alginato o carragenano (Figura 9) (Bashan, 1986; Vassilev et al., 2020; Theresa y Radhakrishnan, 2021); o soluciones de cloruro de amonio (Hindersah et al., 2020), entre otros, muchos de los cuales se encuentran protegidos por patentes en este momento.



**Figura 9.**-Materiales empleados en la conservación de microorganismos: A.- Fórmula molecular del carragenano y tipo de alga de la cual se extrae perteneciente al género *Chondrus*; B.- Lignito; C.- Leche descremada.

Toda formulación, además de reducir la actividad metabólica, debe buscar proteger frente a contaminaciones el inóculo, aumentar la persistencia del microorganismo, ser estable y fácil de usar y aplicar, y no debe dar como resultado una sustancia tóxica. Así mismo, debe ser capaz de superar todas las pruebas y legislaciones presentes en el país de aplicación (Ravensberg, 2011). En definitiva, el objetivo principal de una fórmula microbiana óptima es una liberación lenta y prolongada del microorganismo o microorganismos, permitiendo así la colonización del material o ambiente de destino por parte de los organismos deseados.

Un buen ejemplo de esto fue aportado por Bashan (1986), quien empleó *Azospirillum* y *Pseudomonas*, considerados agentes fitoestimulantes, imbuidos en un sistema compuesto de alginato y leche descremada. El autor demostró cómo dicha combinación permitió la liberación lenta y constante de las bacterias ensayadas, además de la nulidad de residuos obtenidos tras su uso. Para el control de la capacidad de liberación, así como el tiempo de residencia en el ambiente, se modificaron distintos parámetros tales como la cantidad de alginato, la cantidad de leche descremada o el empleo de distintos tratamientos, como la desecación, la fragmentación o la liofilización. Además, quedó patente que la capacidad promotora del crecimiento vegetal no se vio alterada.

Otros autores han empleado talco para formulaciones secas o la aplicación de aceites para prolongar la vida útil de los microorganismos (Theresa y Radhakrishnan, 2021). Otros trabajos refieren el uso de residuos orgánicos para generar las formulaciones microbianas, algo especialmente útil cuando se desean productos de muy bajo coste. Algunos ejemplos de estos

soportes son los posos de café o las aguas residuales y sus fangos (Maheshwari et al., 2015). Esto puede ser útil, además, para aplicar no sólo microorganismos, sino productos de interés, como es el caso reflejado en el trabajo de Hindersah et al. (2020), donde aplicando este tipo de formulación consiguen adicionar urea en suelos tropicales.

Finalmente es necesario indicar que, en ocasiones, solo el soporte en sí puede no ser suficiente para garantizar la supervivencia del microorganismo o para evitar que se pierda la actividad esperada por este. Para intentar eludir este efecto, podría requerirse el uso de aditivos tales como leche descremada, ácidos húmicos, sales minerales, quitina o glicerol, entre otros (Vassilev et al., 2020).

## 2. Objetivos

El empleo de inoculantes microbianos especializados en tareas de biorremediación de ambientes contaminados está adquiriendo un nivel de importancia muy alto en los últimos años, especialmente cuando se trata de eliminar residuos xenobióticos de difícil biodegradación. Las perspectivas de futuro respecto al uso de microorganismos como herramientas necesarias en biotecnología ambiental son aún mayores debido a un cambio de rumbo por parte de las instituciones hacia nuevas estrategias de sostenibilidad ambiental y económica propuestas desde los sistemas de Economía Circular. En este contexto, se hace necesaria la búsqueda de soportes adecuados que permitan una conservación de la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos de interés, con objeto de alargar la vida útil de las formulaciones microbianas sin perder eficiencia en su posterior aplicación.

Para ello, se planteó como **Objetivo General** del presente Trabajo Fin de Máster la “evaluación de distintos soportes para la inoculación de bacterias degradadoras de plásticos en suelos contaminados.”

Para la consecución de dicho objetivo principal, se propusieron los siguientes **Objetivos Específicos**:

- 1- Seleccionar el soporte más idóneo para la formulación de microorganismos degradadores de plásticos para suelos de acuerdo a su viabilidad celular a lo largo del tiempo de almacenamiento.
- 2- Determinar la actividad enzimática degradadora de plásticos de soportes inoculados con bacterias degradadoras de plásticos en cultivos puros y co-cultivos.
- 3- Validar la eficiencia degradadora de plásticos de las formulaciones desarrolladas con diferentes soportes inoculados con bacterias degradadoras de plásticos en cultivos puros y co-cultivos.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Fases del estudio - esquema global

Para la realización de este trabajo se emplearon dos bacterias pertenecientes a la colección del grupo de investigación BIO-175 de la Universidad de Almería, seleccionadas en base a su capacidad enzimática de interés para la transformación de materiales plásticos (Ortíz, 2021). Así mismo, se seleccionaron los distintos soportes a ensayar: alginato, vermicompost y biochar, que fueron posteriormente inoculados y analizados a lo largo del tiempo propuesto para su conservación, tanto desde el punto de vista del mantenimiento de la viabilidad como de la capacidad enzimática de los microorganismos (Figura 10).

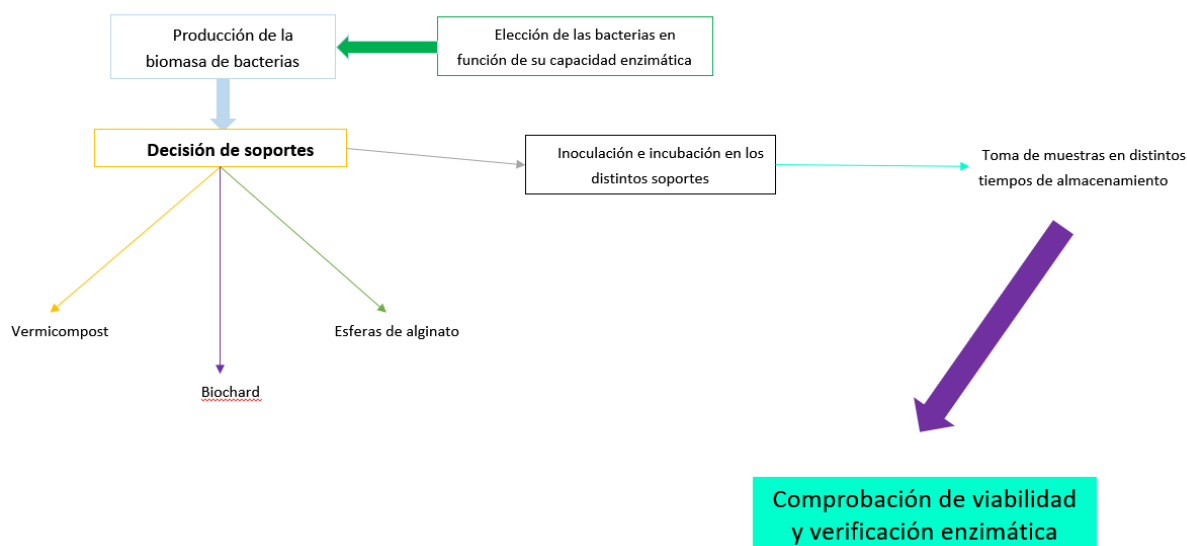


Figura 10.- Fases del estudio.

#### 3.2. Microorganismos empleados

Los microorganismos seleccionados fueron *Pseudomonas putida* E7 y *Bacillus subtilis* RBM2, debido a su perfil enzimático compatible con una degradación significativa de materiales plásticos. Ambos microorganismos se emplearon en cultivo puro y en co-cultivo.

Para el uso de estos microorganismos, se realizó una siembra de las cepas, a partir de viales que estaban conservados a -80 °C, sobre placa (90x90 mm) de APHA (Oxoid), para comprobar la pureza y viabilidad de los cultivos. Posteriormente, a partir de la biomasa recuperada en medio sólido, se realizó una siembra en medio líquido Caldo Nutritivo (CN) (Cultimed) que, tras el periodo de incubación correspondiente (48 h, 30 °C), sirvió para la producción masiva de biomasa empleando nuevamente placas de APHA, pero de mayor tamaño (120x120 mm). Pasado el tiempo de incubación, se recogió la biomasa bacteriana con la ayuda de una

espátula en frascos, en condiciones de esterilidad, siendo resuspendida en solución salina estéril (SS) al 0,9% (Figura 11). El contenido de los botes se mantuvo congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

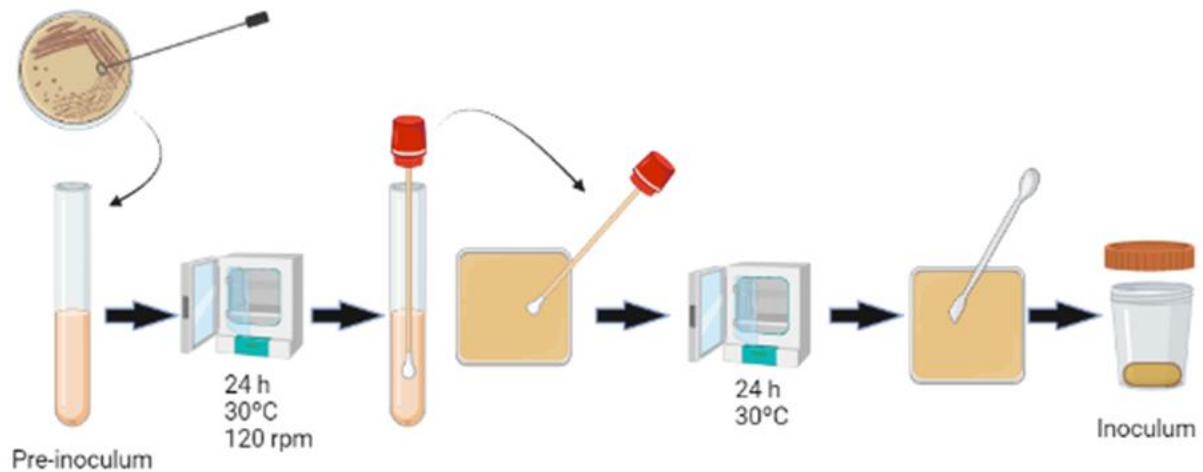
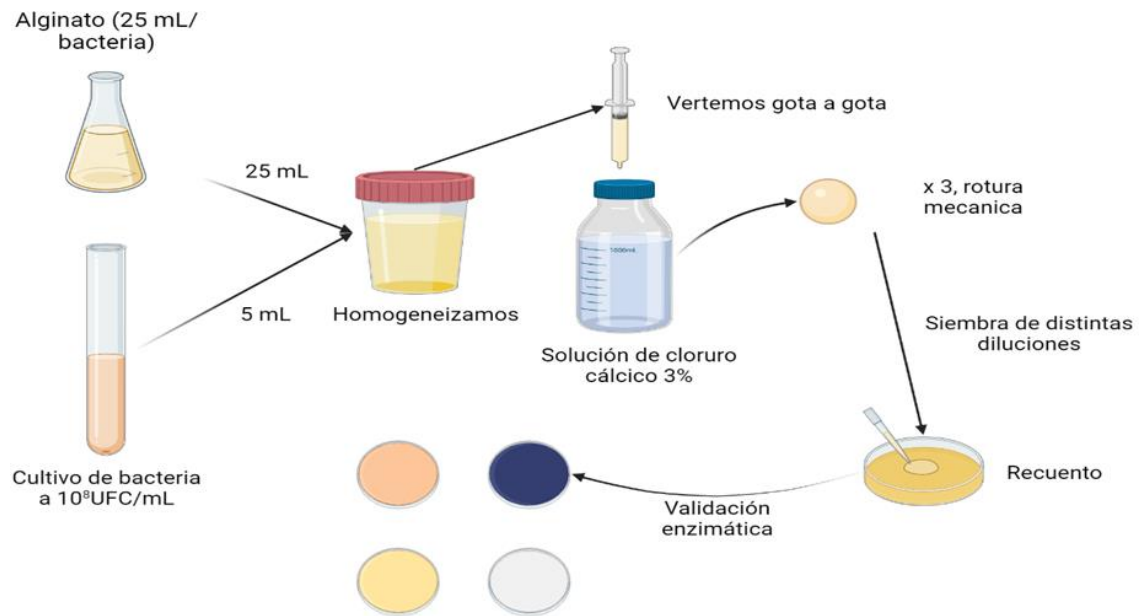


Figura 11.- Producción de biomasa para su empleo en los experimentos programados.

### 3.3. Soportes

#### 3.3.1. Alginato

Para el empleo de Alginato sódico (PanReac Applichem) como soporte, se tomaron 25 mL de una solución de Alginato al (0,2%) y se combinó con una alícuota bacteriana, obteniendo una carga microbiana final de  $10^8$  UFC/mL. Esto se llevó a cabo por duplicado para cada formulación (*P. putida*, *B. subtilis* y co-cultivo), empleando una alícuota proveniente de una suspensión en caldo nutritivo (CN) o en solución salina estéril (SS), respectivamente. Las diferentes suspensiones microbianas preparadas a base de alginato se tomaron con una jeringa estéril para incorporarlas gota a gota sobre sobre una solución de cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ) al 2% (p/v). Esto permitió formar las esferas de alginato cálcico conteniendo las bacterias en su interior. Las esferas se mantuvieron en un volumen de la propia solución de  $\text{CaCl}_2$  a temperatura ambiente 3 meses, llevando a cabo muestreos mensuales para el estudio de la viabilidad celular y mantenimiento de la actividad enzimática de las bacterias (Figura 12).



**Figura 12.** Preparación, conservación y validación de bacterias contenidas en esferas de alginato.

### 3.3.2. Vermicompost

Para el empleo de vermicompost como soporte microbiano se utilizó un sustrato comercial (Suelofértil) humectado hasta alcanzar un 35% de humedad para llevar a cabo la inoculación con las dos bacterias empleadas (cepas E7 y RBM2) y el co-cultivo de ambas, empleando a razón de 30 g por tratamiento microbiano y esto llevado a cabo por triplicado (Figura 13). Cada contenedor de vermicompost se inoculó con una carga microbiana de  $10^6$  UFC/g. Los contenedores, manipulados en condiciones de asepsia, se mantuvieron cerrados durante el periodo de almacenamiento.



**Figura 13.** Contenedores con el soporte sólido empleado como inoculante microbiano: vermicompost

### 3.3.3. Biochar

Para el empleo de biochar como soporte microbiano se utilizó un material comercial (HYDROPLANETE) troceado y molido en un molino (IKA MF 10 basic Microfine grinder drive) hasta formar un polvo fino. En cada recipiente se incorporaron 30 g del material pretratado, humectados con 60 mL de SS (proporción 1:2) para llevar a cabo la inoculación con las dos bacterias empleadas (cepas E7 y RBM2) y el co-cultivo de ambas. Esto se llevó a cabo por triplicado (Figura 14). Cada contenedor de biochar se inoculó con una carga microbiana de  $10^6$  UFC/g. Los contenedores, manipulados en condiciones de asepsia, se mantuvieron cerrados durante el periodo de almacenamiento.



**Figura 14.** Contenedore con el soporte sólido empleado como inoculante microbiano: biochar.

### 3.4. Estudio de viabilidad celular y enzimática

Para llevar a cabo el estudio de viabilidad bacteriana tras la formulación con los distintos soportes se realizaron siembras en medio APHA y Agar Cetrimida (solo para *Pseudomonas*). En el caso de las esferas de alginato, se procedió a una rotura mecánica de estas empleando pinzas estériles y este material fue empleado para hacer una suspensión en solución salina a partir del cual se realizaron diluciones decimales seriadas para llevar a cabo las posteriores siembras en placa, tal como se explica a continuación para los soportes sólidos. Para los muestreos a partir de los contenedores de vermicompost y biochar inoculados, se tomaron 2 g de cada bote que se resuspendieron en 18 mL de SS, obteniendo de este modo la dilución  $10^{-1}$ , a partir de la cual se realizaron sucesivas diluciones decimales seriadas hasta  $10^{-8}$ . A partir de las distintas diluciones se llevaron a cabo siembras en placa de medio general APHA y en Agar Cetrimida (específico para diferenciar a especies pertenecientes al Género *Pseudomonas*), con objeto de obtener recuentos microbianos de cada formulación mediante la técnica de Miles y Misra (1938). La duración de los ensayos de viabilidad fue de 3 meses, en el caso de las esferas de alginato, con muestreos mensuales; y 55 días, para los soportes vermicompost y biochar, con muestreos quincenales.



Además de comprobar la permanencia o pérdida de viabilidad por parte de las bacterias ensayadas, se realizó un seguimiento de las siguientes actividades enzimáticas: ligninasa, lacasas, cutinasas, polifenol oxidasa y lipasa.

Todas las verificaciones se llevaron a cabo empleando medios sólidos específicos para cada actividad. Las placas fueron sembradas mediante gota de 10 µL e incubadas durante 10 días a 30 °C. Tras la incubación, se procedió a la lectura e interpretación de los resultados.

A continuación, se detallan los componentes de cada medio de cultivo empleado y la lectura oportuna para cada una de las actividades enzimáticas ensayadas:

**Ligninasa:** medio Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (Tablas 2 y 3). La estructura química del colorante RBBR le otorga a este compuesto una coloración azul y, tras el periodo de incubación en el medio que contenga este colorante, en aquellos microorganismos que posean actividad ligninolítica se observa un halo de aclaramiento alrededor del morfotipo colonial, indicando la degradación de sus anillos aromáticos (Kiiskinen et al., 2004).

**Tabla 2.** Composición del medio de cultivo sólido con RBBR (Sigma).

Componente	g/L
Glucosa	10
Peptona bacteriológica	5
Extracto de levadura	2
Solución de Elementos Traza (SET)*	70 mL
Solución de RBBR	200 mL
Agar	20

**Tabla 3.** Composición de la Solución de Elementos Traza (Kirk et al., 1986).

Componente	g/L
Ácido nitriloacético	1,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,5
NaCl	1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
CoSO <sub>4</sub>	0,1
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,1
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,01
AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0,01
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01

**Lacasas:** Para determinar esta actividad se siguió el protocolo de Rayner y Boddy (1988), en el cual se indica que mediante el uso de dos reactivos diferentes ( $\alpha$ -naftol y guaiacol) (Tabla 4) se puede revelar la presencia de estas actividades partiendo de bacterias sembradas en medio general APHA. Para la lectura, se añaden unas gotas del reactivo en cuestión sobre la colonia y se observa si aparece un cambio de coloración.

**Tabla 4.** Reactivos y lectura de actividades Lacasa1 y Lacasa 2.

ACTIVIDAD	REACTIVO	LECTURA	
		Tiempo	Colonia +
LACASA 1	1,44 g de $\alpha$ -naftol / 100 ml de etanol (96%)	4-24 horas	Púrpura
LACASA 2	1,24 g de guaiacol / 100 ml de etanol (96%)	4-24 horas	Púrpura

**Cutinasas:** se utilizaron dos protocolos distintos, y los compuestos cutina (CUT 1) y policaprolactona (CUT 2).

Para CUT1, se empleó el protocolo de Dickman y Patil (1986), en el cual se usa cutina como sustrato y rojo fenol como indicador del pH (Tablas 5 y 6). Como sustituto de la cutina se usa el monoestearato de glicerol al 1% (Alfa Aesar Chemicals), y Tween 80 (Sigma Aldrich) para permitir su disolución. Se aplicó calor para conseguir una completa disolución y se ajustó el pH a 8,1. El cambio de color rojo a amarillo tras el periodo de incubación es indicativo de la presencia de esta actividad Cutinasa (disminución de pH por hidrólisis).

**Tabla 5.** Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad cutinasa CUT1 empleando monoestearato de glicerol como sustrato.

Componente	Cantidad
Cutina (monoestearato de glicerol)	10 g
Rojo fenol	0,0250 mg
Tween 80	1 mL
Medio mínimo de sales*, volumen de cada sal	100 mL
Agua	700 mL
Agar bacteriológico	20 g

**Tabla 6.** Composición del Medio mínimo de sales (Janshekar et al., 1982).

Solución A:		Solución B:		Solución C:	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
$K_2HPO_4$	16 g	NaCl	2,5 g	$(NH_4)_2SO_4$	12,5 g
$KH_2PO_4$	5 g	$MgSO_4 \cdot 7 \cdot H_2O$	5,8 g	$(NH_4)NO_3$	10 g
Agua Destilada	1000 mL	$CaCl_2 \cdot 2 \cdot H_2O$	0,13 g	$FeCl_3 \cdot 6 \cdot H_2O$	0,025 g
		Agua Destilada	1000 mL	Agua Destilada	1000 mL

Para CUT2, se empleó el protocolo de Jarret et al. (1984) y Sekiguchi et al. (2011); usando policaprolactona (PCL) como sustrato (Tabla 7). Para la solución de PCL, se disolvieron 0,5 g de PCL (pellet) sobre 10 mL de acetona a 55 °C. Esto se añadió a 90 mL de agua destilada y la solución se esterilizó mediante filtración con filtro estéril de tamaño de poro 0,45 µm (Nalgene). La lectura del medio se considera positiva si se aprecia un halo de aclaramiento en el medio alrededor de la colonia.

**Tabla 7.** Composición del medio de cultivo sólido con policaprolactona como sustrato para la detección de actividad cutinasa (CUT2).

Componente	Cantidad
Disolución PCL	100 mL
Medio mínimo de sales*, volumen de cada sal	100 mL
Agar	20 g
Agua destilada	600 mL

**Polifenol oxidasa:** se siguió el método de López et al. (2006), empleando placas de medio general APHA adicionado con ácido tánico (Tabla 8). En los microorganismos que presentan esta actividad se observa un cambio de coloración a marrón, debido a la oxidación del ácido tánico.

**Tabla 8.** Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad polifenol oxidasa.

Componente	g/L
APHA (bacterias) PDA (hongos)	Según instrucciones
Ácido tánico	5
Agar	5

**Lipasa:** se utilizó el protocolo de Carrasco et al. (2012) donde se emplea la tributirina (Sigma) como fuente lipídica (Tabla 9). Las colonias positivas muestran halo de aclaramiento tras el periodo de incubación (hidrólisis de la tributirina).

**Tabla 9.** Composición del medio de cultivo sólido para la detección de actividad lipolítica.

Componente	g/L
Peptona	5
Extracto de levadura	3
Tributirina	10
Agar bacteriológico	20

### 3.5. Validación de la eficacia de los soportes como inoculantes degradadores de plásticos: ensayo de mineralización

Una vez comprobada la permanencia, en mayor o menor medida, de la viabilidad celular y funcional de las formulaciones microbianas establecidas con los distintos soportes ensayados se llevó a cabo un análisis de la eficacia del proceso de degradación de plásticos por parte de las comunidades microbianas establecidas en cada soporte.

Para ello, se usó suelo de jardín tamizado para la eliminación de restos vegetales y minerales grandes, artificialmente contaminado con plásticos. En un recipiente cerrado, se colocaron 100 g de suelo, previamente esterilizado, estableciendo las siguientes variaciones:

- Suelo contaminado con plástico: 100 g de suelo + 10 g de plástico LLDPE estéril en polvo + 20 g de cada soporte.
- Suelo blanco : 100 g de suelo + 20 g de soporte.
- Suelo blanco sin inóculo: 100 g de suelo + 10 g de plástico LLDPE estéril en polvo + 20 g soporte no inoculado.

Para la realización de este ensayo se siguió el protocolo de mineralización de Guerrero-Ortiz, 2012. Para ello, se preparó una disolución de NaOH (1N). Se añadieron 10 mL de esta solución a un vaso de precipitado estéril que se introdujo en el interior del recipiente cerrado. Pasados 30 días, se tomó el vaso de precipitado con la solución de NaOH, y se realizó una valoración ácido-base (mediante una solución de HCl 1N), estimándose así la mineralización en función de la siguiente fórmula:

$$R = (B-M) \cdot N \cdot E$$

Donde:

R: Respiración microbiana en mg CO<sub>2</sub>

B: Volumen de ácido necesario para titular el NaOH del promedio de los blancos (mL)

M: Cantidad de ácido necesaria para titular el NaOH de la muestra (mL)

N: Normalidad del ácido

E: Peso equivalente del CO<sub>2</sub>

### 3.6. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos fueron procesados en Microsoft Office Excel 365, para Windows, para la obtención y representación de las figuras y tablas presentadas.

Por otra parte, con el programa Statgraphics Centurion XVIII se hizo un Análisis Factorial de Varianza (ANOVA Simple) para comparar los grupos de homogeneidad y diferencias significativas entre las medias mediante el Test de Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD), utilizando un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Además, algunas representaciones gráficas se elaboraron con el programa BioRender.

## 4. Resultados y discusión

A continuación, se muestran los resultados recopilados durante el desarrollo del presente trabajo en el que se seleccionaron como soportes o *carriers* para la conservación y aplicación de bacterias degradadoras de plásticos los siguientes materiales: alginato, vermicompost y biochar.

El alginato fue escogido debido a que este compuesto gelatinoso y biodegradable permite una encapsulación y protección idónea para los microorganismos, como revelan múltiples estudios anteriores (Bashan, 1986; De-Bashan et al., 2002).

El vermicompost, que es el producto resultante de la transformación de materia orgánica por parte de microorganismos y lombrices y que presenta un alto poder fertilizante y una elevada cantidad de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y fito-protectoras (Adhikary, 2012; Lim et al, 2015), se considera un material capaz de mantener y mejorar la aireación y por tanto la retención de agua en el suelo, lo que lo convierte en un vehículo muy interesante para la inoculación de microorganismos.

El biochar, como producto de tipo hidrofóbico, altamente inmisible, producido por la combustión bajo condiciones controladas de calor y oxígeno que da como resultado una materia orgánica estabilizada (Weber y Quicker, 2018; Wang y Wang, 2019) y con capacidad fertilizante, es un producto interesante y novedoso respecto a su empleo como inoculante.

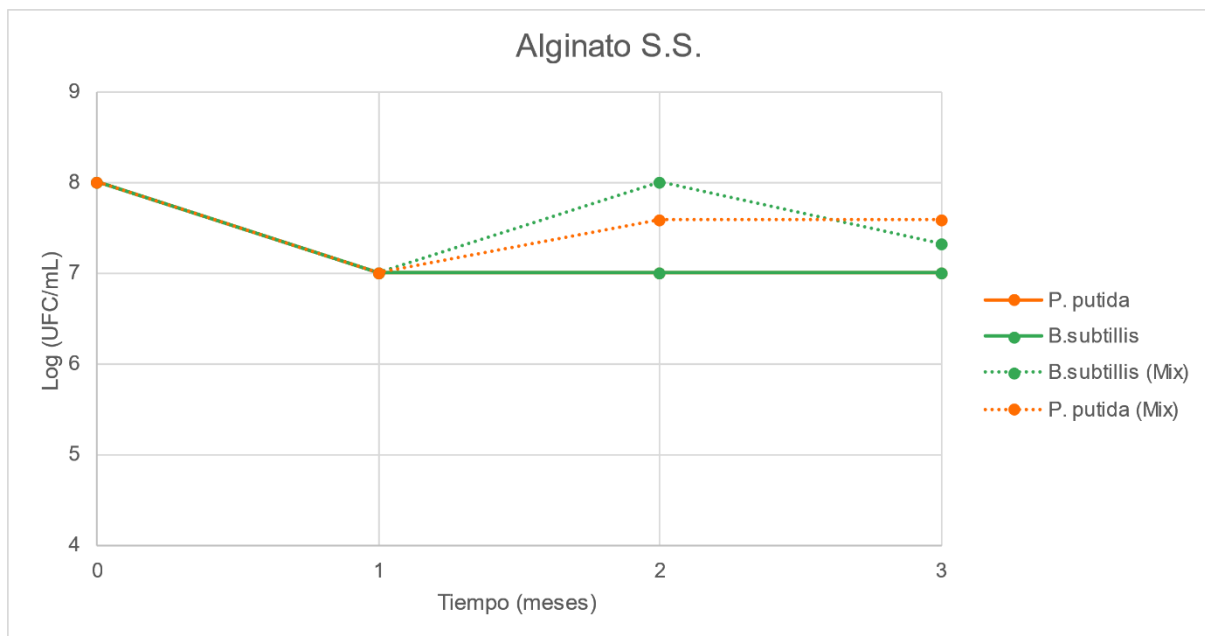
### 4.1 Evaluación del mantenimiento de la viabilidad celular

#### 4.1.1. Alginato

En las Figuras 15 y 16 se muestran los resultados de viabilidad de las bacterias conservadas mediante la esferificación en alginato procedentes de una suspensión en solución salina y en caldo nutritivo, respectivamente. En la Figura 17 se muestra el aspecto de estas esferas.

Para el soporte de alginato generado con suspensiones bacterianas procedentes de solución salina (Figura 15), se observa una bajada de una unidad logarítmica en el primer mes muestreado, recuperándose parcialmente en las bacterias cuando se encontraban en el

consorcio, manteniendo una tendencia estable para el caso de los microorganismos inoculados de manera independiente, estableciéndose así una unidad logarítmica de 7 UFC/mL. Según el análisis estadístico realizado (Tabla 10), los microorganismos se comportaron como un único grupo homogéneo en función de estar en consorcio o individual, sin diferencias significativas entre ellos. Algo similar a lo que ocurre en el experimento de Bashan (1986).



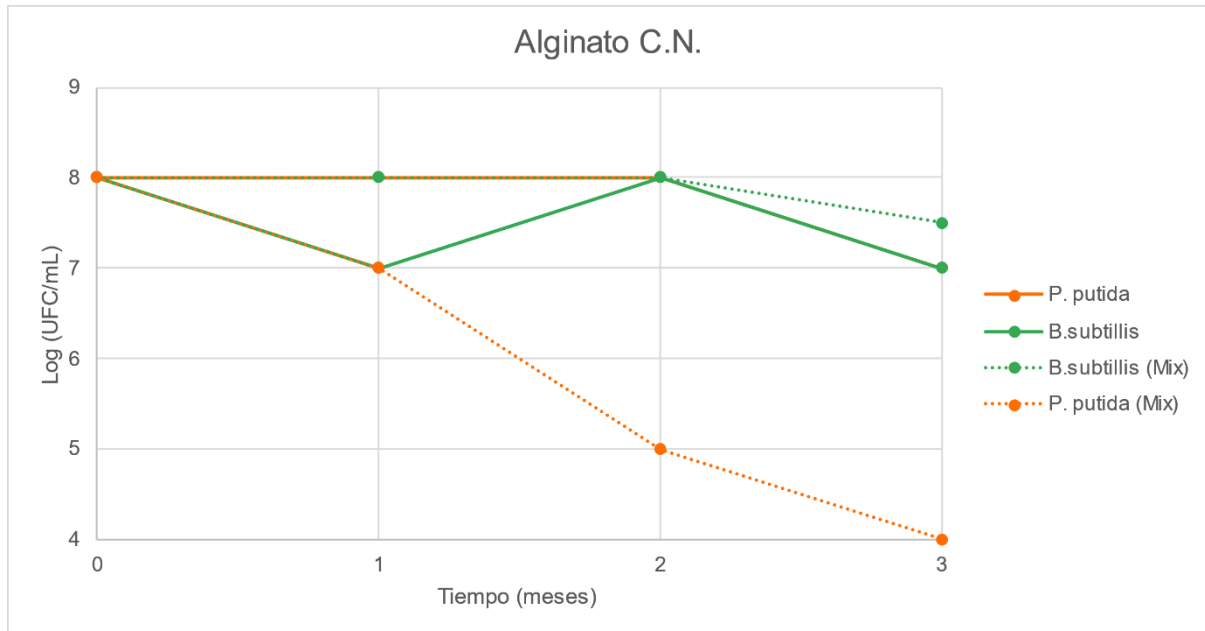
**Figura 15.** Resultados de viabilidad expresados en Log UFC/mL para las esferas de alginato elaboradas a partir de las suspensiones bacterianas procedentes de solución salina (SS) a lo largo del tiempo de estudio (3 meses). Las líneas punteadas indican la evolución de las dos bacterias estudiadas cuando se encontraban en co-cultivo.

**Tabla 10.-** Análisis de grupos homogéneos para alginato con solución salina. A cada grupo de homogeneidad se le asigna una letra. Se realizan dos análisis, uno para el tiempo y un segundo para el microorganismo.

Tiempo/microorganismo	Grupo Homogéneo
1	A
2	B
3	B
<i>P. putida</i>	A
<i>B. subtilis</i>	A
<i>P. putida</i> (Mix)	B
<i>B. subtilis</i> (Mix)	B

Por otra parte, en el caso de las esferas de alginato elaboradas a partir de las suspensiones bacterianas en caldo nutritivo (Figura 16), se observa como la viabilidad se mantiene estable,

en general, con resultados similares a los obtenidos en el caso anterior, de Alginato+SS, a excepción de la carga bacteriana asociada a la cepa *P. putida* cuando se encontraba en consorcio, que muestra una caída continuada, indicando alguna incompatibilidad o incapacidad de adaptación. En este caso, el análisis de grupos homogéneos (Tabla 11) revela que *P. putida* en consorcio se comporta como un grupo distinto al resto de microorganismos, como cabía esperar.



**Figura 16.** Resultados de viabilidad expresados en Log UFC/mL para las esferas de alginato elaboradas a partir de las suspensiones bacterianas procedentes de caldo nutritivo (CN) a lo largo del tiempo de estudio (3 meses). Las líneas punteadas indican la evolución de las dos bacterias estudiadas cuando se encontraban en co-cultivo.

**Tabla 11.-** Análisis de grupos homogéneos para alginato con caldo nutritivo. A cada grupo de homogeneidad se le asigna una letra. Se realizan dos análisis, uno para el tiempo y un segundo para el microorganismo.

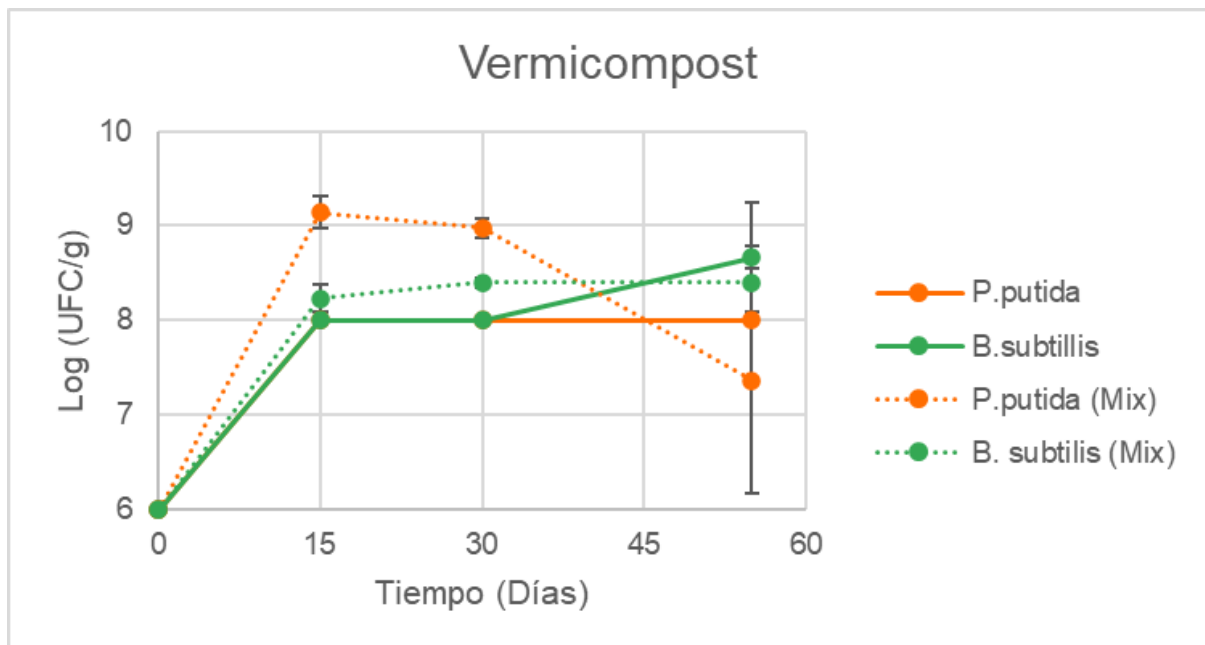
Tiempo/microorganismo	Grupo Homogéneo
1	B
2	B
3	A
<i>P. putida</i>	B
<i>B. subtilis</i>	B
<i>P. putida</i> (Mix)	A
<i>B. subtilis</i> (Mix)	B



**Figura 17.-** Esferas de alginato en los botes de conservación.

#### 4.1.2. Vermicompost

En la Figura 18 se muestran los resultados de viabilidad de las bacterias inoculadas en vermicompost, tanto de forma individual como en consorcio a lo largo del tiempo que duró el experimento, 55 días. Los muestreos analizados cada 15 días representan la carga bacteriana, en cada caso, expresada en Log de UFC/mL.



**Figura 18.** Resultados de viabilidad expresados en Log UFC/mL para el soporte vermicompost inoculado con las suspensiones bacterianas a lo largo del tiempo de estudio (55 días). Las líneas punteadas indican la evolución de las dos bacterias estudiadas cuando se encontraban en co-cultivo.



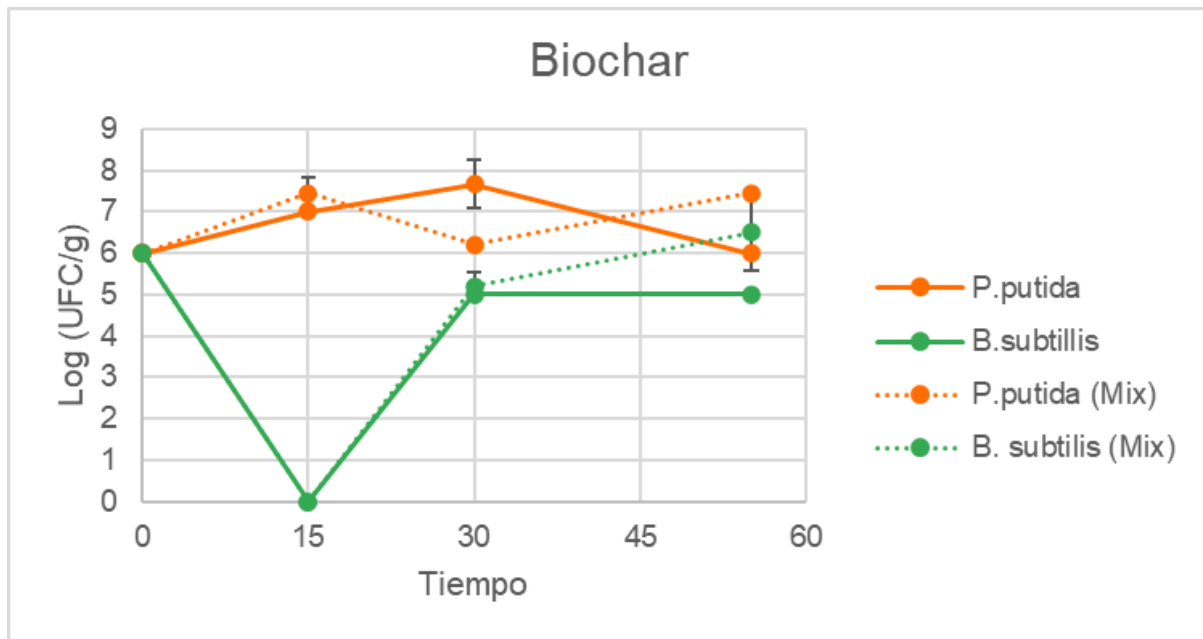
En la Figura 18 se observa un gran aumento sobre la carga inicialmente inoculada, aumentando los recuentos a partir del primer muestreo llevado a cabo a los 15 días de la inoculación del vermicompost entre 2 y 3 unidades logarítmicas. Esto se mantuvo durante al menos 30 días, pero al alcanzar el final del experimento, a los 55 días, solo los microorganismos por separado fueron capaces de mantener la carga bacteriana anteriormente alcanzada. El consorcio, que a los 15 y 30 días superó los valores encontrados en las bacterias analizadas por separado, comenzó a descender, perdiendo, por tanto, viabilidad, aunque manteniendo niveles por encima de la inoculada carga inicialmente inoculada. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kumar y Singh (2001). El análisis de grupos homogéneos (Tabla 12) indicó que en las formulaciones empleando vermicompost como soporte ni el tiempo ni el tipo de microorganismo/s presentaron diferencias significativas.

**Tabla 12.-** Análisis de grupos homogéneos para vermicompost. A cada grupo de homogeneidad se le asigna una letra. Se realizan dos análisis, uno para el tiempo y un segundo para el microorganismo.

Tiempo/microorganismo	Grupo Homogéneo
1	A
2	A
3	A
P. putida	A
B. subtilis	A
P. putida (Mix)	A
B. subtilis (Mix)	A

#### 4.1.3. Biochar

En la Figura 19 se muestran los resultados de viabilidad de las bacterias inoculadas en biochar, tanto de forma individual como en consorcio a lo largo del tiempo que duró el experimento, 55 días. Los muestreos analizados cada 15 días representan la carga bacteriana, en cada caso, expresada en Log de UFC/mL.



**Figura 19.** Resultados de viabilidad expresados en Log UFC/mL para el soporte biochar inoculado con las suspensiones bacterianas a lo largo del tiempo de estudio (55 días). Las líneas punteadas indican la evolución de las dos bacterias estudiadas cuando se encontraban en co-cultivo.

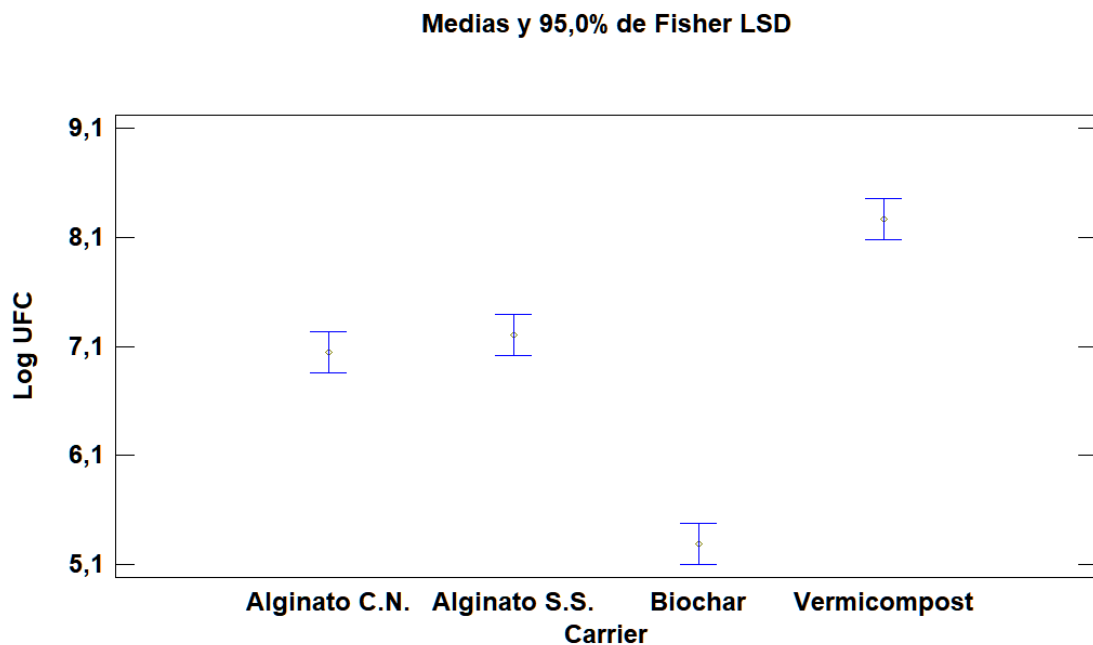
En los resultados mostrados para el soporte biochar (Figura 19), se observa una tendencia relativamente estable para el caso de *P. putida*, es decir, esta bacteria no presentó grandes cambios a lo largo de los 55 días de estudio ni cuando se analizó por separado ni estando en consorcio con la cepa de *B. subtilis* ensayada. Estos resultados coinciden con lo expuesto por Sun et al. (2016), en el que los valores iniciales de  $10^4$  UFC/mL se mantuvieron durante todo el ensayo (con *Pseudomonas*). Sin embargo, *B. subtilis*, tanto analizado de forma independiente como en el co-inóculo, llega a ser indetectable mediante la técnica de recuento empleada en el muestreo realizado a los 15 días. No obstante, en los muestreos llevados a cabo a los 30, 45 y 55 días se pudo contabilizar esta bacteria, también en las dos condiciones analizadas, alcanzando niveles en torno a 5 unidades logarítmicas, una por debajo de la carga inoculada inicialmente. Incluso la cepa de *Bacillus* empleada en co-cultivo llegó a equiparar los valores iniciales en el muestreo realizado al final del experimento. Por su parte, el análisis de grupos homogéneos (Tabla 13) mostró que mientras que *P. putida* tiene el mismo comportamiento sola y en consorcio, *B. subtilis* tiene un comportamiento distinto tanto frente a *P. putida* como en función de si se analiza en cultivo puro o consorcio.

**Tabla 13.-** Análisis de grupos homogéneos para Biochar. A cada grupo de homogeneidad se le asigna una letra. Se realizan dos análisis, uno para el tiempo y un segundo para el microorganismo.

Tiempo/microorganismo	Grupo Homogéneo
1	A
2	B
3	B
<i>P. putida</i>	C
<i>B. subtilis</i>	A
<i>P. putida</i> (Mix)	C
<i>B. subtilis</i> (Mix)	B

#### 4.1.4. Análisis estadístico comparativo

A continuación, se muestra una comparativa del comportamiento global mostrado por los distintos soportes estudiados como potenciales vehículos para el mantenimiento y aplicación microbiana en ambientes contaminados (Figuras 20 y 21).



**Figura 20.** Diagramas de Fisher (a un intervalo de confianza del 95%) donde se analizan los valores promedio alcanzados (Log UFC/mL) por los distintos soportes estudiados.

En la Figura 20 se muestra como los mayores valores de recuento medio de microorganismos, de forma global, se observaron en el caso del vermicompost y los menores en el caso del empleo de biochar como soporte. Por su parte, el alginato no mostró una gran variación

respecto al inóculo inicial, tal como se describe en otros trabajos (Bashan, 1986). Esto podría explicarse debido a que el vermicompost, por las propias características físico-químicas y biológicas que presenta, es un sustrato idóneo para el establecimiento microbiano, actuando, además, como un potencial soporte para la inoculación de microorganismos en ambientes naturales, ya que es capaz de salvaguardar la viabilidad de la microbiota. El biochar, por su parte, podría considerarse un material más inhóspito para el establecimiento y crecimiento microbianos, a pesar de la adecuación de algunos factores como el tamaño de partícula y la humedad con objeto de intentar favorecer a la microbiota inoculada, por lo que solo determinadas especies podrían emplearlo como soporte para llevar a cabo formulaciones que permiten una posterior aplicación con éxito. Por último, las esferas de alginato, aunque no son el ambiente óptimo para el crecimiento y replicación microbiana, en rasgos generales actúan como adecuados soportes para la conservación de los microorganismos empleados, lo cual coincide con la literatura consultada respecto al empleo de este polisacárido en tareas de conservación de cepas de microorganismos empleados como inoculantes (Schoebitz et al., 2013).

Según el análisis de los grupos de homogeneidad (Tabla 14), cada soporte muestra un comportamiento independiente por lo que el empleo de cada fórmula microbiana ensayada se puede considerar significativamente diferente desde el punto de vista estadístico.

**Tabla 14.-** Análisis de grupos homogéneos para comparativa entre soportes.

Soporte	Grupo Homogéneo
Alginato SS	B
Alginato CN	B
Vermicompost	C
Biochar	A

En la Figura 21 se muestran las interacciones entre los soportes estudiados y en función de tres tiempos de muestreo analizados, respecto a los valores promedios de carga microbiana (Log UFC/mL). Se puede observar que no hay gran diferencia dentro de las formulaciones llevadas a cabo con alginato y vermicompost, por lo que se pueden considerar materiales estables para el mantenimiento de los microorganismos. Mientras que en el caso del biochar, se observa un cambio drástico entre el primer tiempo de muestreo y el resto, coincidiendo con la incapacidad para detectar *Bacillus subtilis* (ver apartado 4.1.3.), probablemente debido a las características del material que impiden una óptima utilización y, por ende, colonización del material de forma rápida.

Gráfico de Interacciones

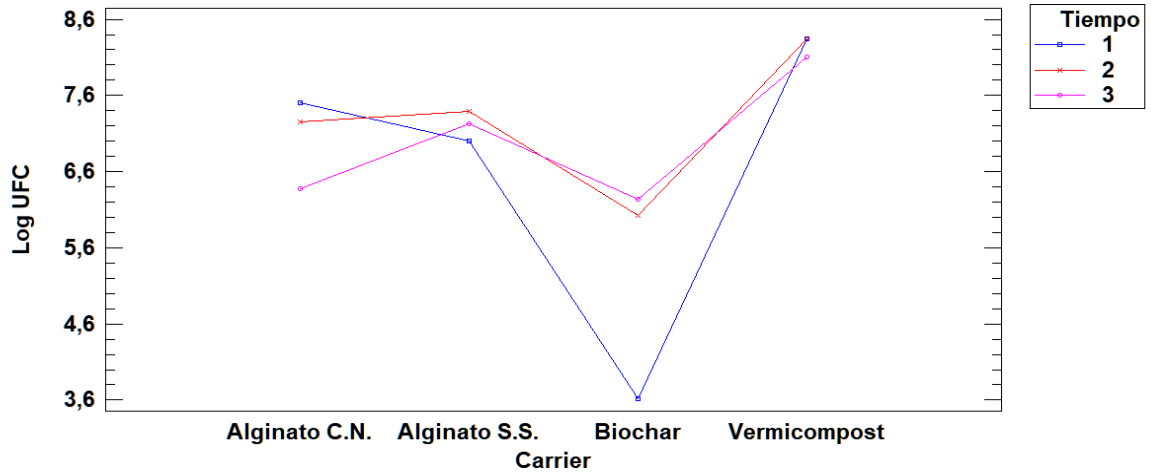


Figura 21. Gráficas de interacción entre los distintos soportes estudiados, según los recuentos promedio globales alcanzados en cada caso.

## 4.2 Evaluación del mantenimiento de la actividad enzimática

En este apartado se recogen los resultados relativos a la persistencia de las capacidades enzimáticas previamente presentadas por las cepas bacterianas estudiadas en relación con su interés como potenciales agentes degradadores de plástico, tanto empleadas en los soportes de manera independiente como en co-cultivo (Tablas 15, 16, 17 y 19).

Tabla 15. Número de actividades enzimáticas presentadas por las cepas estudiadas por separado y en consorcio para cada tipo de soporte estudiado, dos muestreos en el caso de vermicompost y biochar y un muestreo en el caso de las esferas de alginato, y respecto a los valores teóricos previamente analizados.

	<i>B. subtilis</i> E7	<i>P. putida</i> RBM2	Consorcio
Teórico	5	4	7
Alginato S.S.	2	2	4
Alginato C.N.	2	1	3
Vermicompost 15 días	3	2	4
Vermicompost 55 días	4	2	5
Biochar 15 días	1	1	2
Biochar 55 días	5	3	6

Para la interpretación de los resultados mostrados en la Tabla 15, se debe tener en cuenta que el valor total (teórico) posible respecto al número de actividades analizadas es de 5 para

la cepa de *B. subtilis* y de 4 para para la cepa de *P. putida* cuando se rastrearon las actividades enzimáticas en trabajos anteriores, partiendo de cultivos puros en medios generales de crecimiento (Ortiz, 2021), siendo, por su parte, el total de actividades estudiadas 7: ligninasa, lacasa 1, lacasa2, cutinasa 1, cutinasa 2, polifenol oxidasa y lipasa.

En todos los soportes, a todos los tiempos de incubación analizados, se pierde la actividad de polifenol oxidasa (Tablas 16, 17, 18).

**Tabla 16.-** Actividades enzimáticas para alginato. Resaltado en azul todas las actividades perdidas respecto al teórico.

Actividad	Teórico			Conservación 3 meses alginato S:S.			Conservación 3 meses alginato C.N.		
	B.s	P.p	B.s+P.p	B.s	P.p	B.s+P.p	B.s	P.p	B.s+P.p
RBBR	0	1	1	0	1	1	0	1	0
Lipasa	1	0	1	0	0	1	1	0	1
lacasa 1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
lacasa 2	1	0	1	1	1	1	0	0	1
Cut 1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
Cut 2	1	1	1	0	0	0	0	0	1
PO	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	5	4	7	2	2	4	2	1	5

**Tabla 17.-** Actividades enzimáticas en Vermicompost. Resaltado en azul todas las actividades perdidas respecto al teórico.

Actividad	Teórico			Conservación 15 días vermicompost			Conservación 55 días vermicompost		
	B.s	P.p	B.s+P.p	B.s	P.p	B.s+P.p	B.s	P.p	B.s+P.p
RBBR	0	1	1	0	1	1	0	1	1
Lipasa	1	0	1	1	0	1	1	0	1
lacasa 1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
lacasa 2	1	0	1	0	0	0	1	0	1
Cut 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cut 2	1	1	1	1	0	1	0	0	0
PO	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	5	4	7	3	2	4	4	2	5

**Tabla 18.-** Actividades enzimáticas en Biochar. Resaltado en azul todas las actividades perdidas respecto al teórico.

Actividad	Teórico			Conservación 15 días Biochar			Conservación 55 días Biochar		
	B.s	P.p	B.s+P.p	B.s	P.p	B.s+P.p	B.s	P.p	B.s+P.p
RBBR	0	1	1	0	1	1	0	1	1
Lipasa	1	0	1	1	0	1	1	0	1
lacasa 1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
lacasa 2	1	0	1	0	0	0	1	0	1
Cut 1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
Cut 2	1	1	1	0	0	0	1	1	1
PO	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	5	4	7	1	1	2	5	3	6

Para el alginato, tanto para las esferas de solución salina como para las de caldo nutritivo, se pierden la mayor parte de las actividades enzimáticas, salvo aquellas relacionadas con la actividad ligninolítica (RBBR y lacasa; que en el caso de SS si se pierden) y lipasa.

En vermicompost, tras la estabilización de la población, se observa un aumento de las actividades enzimáticas (ligninasas, lipasa y cutinasa 1), indicando así que parte de esas actividades solo se expresan bajo condiciones específicas y no de forma constitutiva probablemente.

En cuanto al biochar, probablemente debido a la pérdida de *Bacillus subtilis* en el primer muestreo, se observa una gran pérdida de la potencial actividad enzimática que se recupera a los 55 días, mostrando al final del ensayo todas las actividades atribuidas inicialmente, excepto la correspondiente a la polifenol oxidasa.

Para la determinación de actividad ligninasa, se usa el medio RBBR, debido a que el colorante Remazol Brilliant Blue R, presenta una alta semejanza a la lignina (compuesto aromático policíclico), como se puede ver en la Figura 22 (Hatakka, 1994; Mester y Tien, 2000; Mechichi et al., 2006). Se usa en múltiples industrias (alimentaria, farmacéutica, etc) debido a su gran estabilidad fotolítica, solubilidad y resistencia a degradación microbiana (Spadaro et al., 1992). La pérdida del color azul debido a la degradación de los anillos es lo que marca como positivo el resultado.

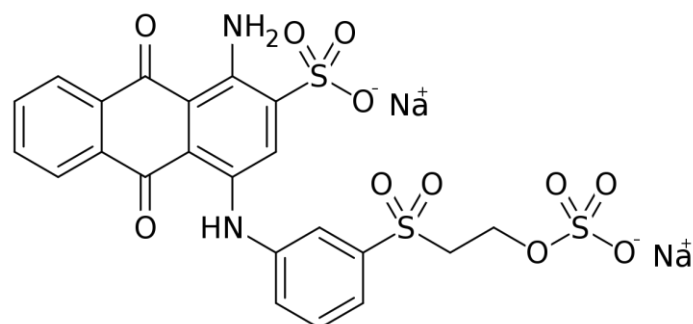


Figura 22. Estructura del colorante RBBR. (Lai, 2021)

Finalmente, a pesar del alto número de actividades enzimáticas mostradas, la menor tasa de supervivencia y colonización; así como sus parámetros físico-químicos que dificultan su aplicación a suelo, hacen que el mejor candidato desde el punto de vista enzimático sea el vermicompost.

### 4.3 Validación de la actividad de las formulaciones: análisis de mineralización de plásticos

Para el experimento de mineralización mostrado en la Figura 23, los resultados aparecen organizados en función del soporte, de modo que los valores sean comparables entre estos, teniendo en cuenta también los valores mostrados por los distintos tratamientos control analizados, siendo C+ sin plástico, pero con glucosa; y C- aquel sin plástico ni glucosa. Los valores se expresan en función de los mg de CO<sub>2</sub> generados en cada tratamiento analizado.

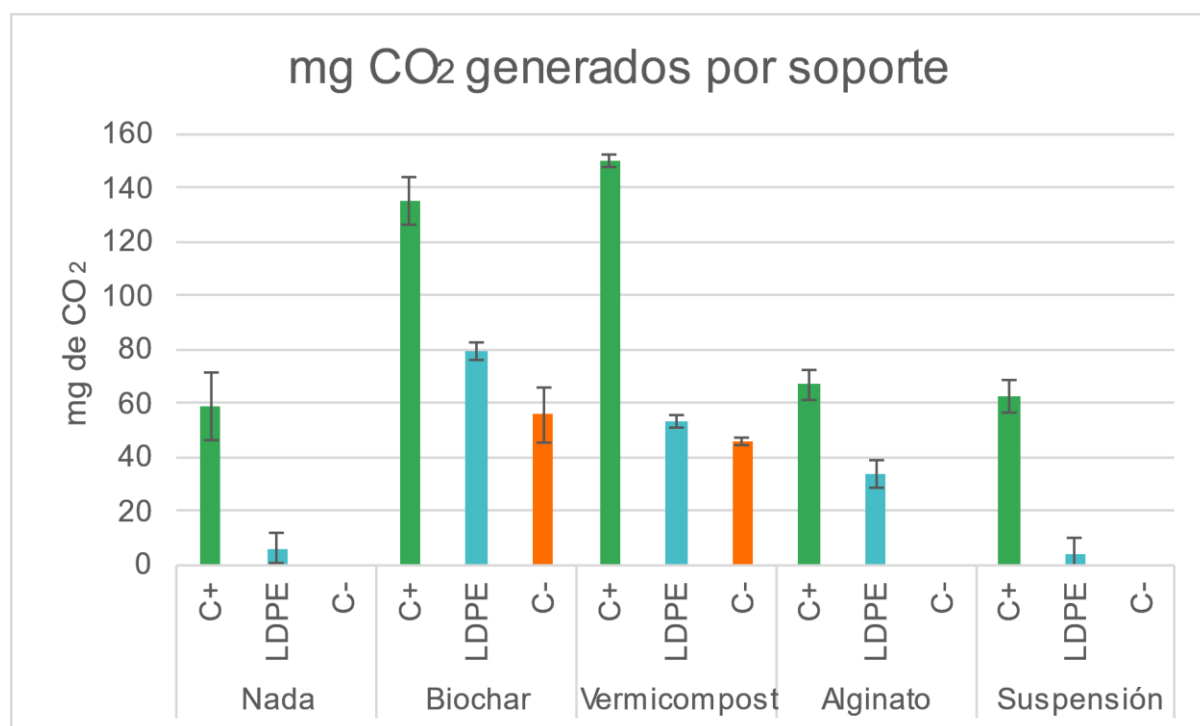


Figura 23. Resultados de mineralización para los distintos soportes desarrollados, respecto a los controles positivo (glucosa) y negativo (no plástico ni glucosa), expresado en mg de CO<sub>2</sub>.

El control positivo (C+) mostró los valores más altos, como era de esperar, debido a la facilidad de los microorganismos para utilizar la glucosa como nutriente (Lerch et al., 1992; Guerrero-Ortiz et al., 2012). En el caso de los tratamientos con el plástico (LDPE), los valores de mineralización variaron notablemente, siendo los más altos detectados en el soporte Biochar y mostrando una muy baja mineralización en la suspensión, posiblemente debido a una incapacidad de adaptación de los organismos, especialmente debido a la recalcitrancia de la fuente de C disponible (LDPE). El control negativo muestra respiración en biochar y vermicompost, lo cual puede indicar una inadecuada esterilización del soporte, envase de experimentación o un mal sellado el cual ha permitido la entrada de CO<sub>2</sub>. El análisis estadístico de grupos homogéneos (Tabla 19) permite observar cómo cada soporte tiene una tendencia diferenciada del resto, formando así un grupo de homogeneidad distinto, excepto nada y suspensión, que forman un único grupo debido a la similitud de resultados obtenidos. El



análisis estadístico también nos permite identificar que la repetición no ha influenciado los resultados del experimento.

Tabla 19.- Análisis de grupos homogéneos para mineralización.

Soporte	Grupo Homogéneo
Nada	A
Biochar	D
Vermicompost	C
Alginato	B
Suspensión	A

## 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron extraer las siguientes conclusiones:

1. La presencia de caldo nutritivo en las esferas de alginato tiene un efecto negativo en el mantenimiento de la viabilidad celular. En solución salina, aunque se mantiene con el tiempo la viabilidad de los microorganismos, se reducen sus actividades enzimáticas degradadoras de plástico.
2. El biochar permite mantener la viabilidad celular tras dos meses de almacenaje, pero debido al engrudo que forma se dificulta la preparación de formulaciones con dicho soporte.
3. El mejor soporte para formular bacterias degradadoras de plásticos es el vermicompost debido a que permite la conservación o incluso incremento de la viabilidad celular y el mantenimiento de las actividades enzimáticas degradativas durante casi dos meses de almacenaje.
4. Las formulaciones de bacterias sobre soporte de biochar o vermicompost permiten una elevada tasa de mineralización de plástico.

## 6. Bibliografía

Adhikary, S. (2012). Vermicompost, the story of organic gold: A review. *Agricultural Sciences*, 3(7), 24396.

- Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of low-density polyethylene by fungi isolated from Red Sea water. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 1703-9.
- Alvarez-Zeferino, J. C., Ojeda-Benítez, S., Cruz-Salas, A. A., Martínez-Salvador, C., & Vázquez-Morillas, A. (2020). Microplastics in Mexican beaches. *Resources, Conservation and Recycling*, 155, 104633.
- Anjana, K., Hinduja, M., Sujitha, K., & Dharani, G. (2020). Review on plastic wastes in marine environment–Biodegradation and biotechnological solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110733.
- Baker, P. J., Poultney, C., Liu, Z., Gross, R., & Montclare, J. K. (2012). Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 229-240.
- Bashan, Y. (1986). Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), 1089-1098.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729-770.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert, H., & Diels, L. (2000). Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1834-1843.
- Bhardwaj, H., Gupta, R., & Tiwari, A. (2013). Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. *Journal of Polymers and the Environment* 21(2), 575–579.
- Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, H., Hauge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., & Menge, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*, 343(6260), 767-770.
- Briassoulis, D. (2005). The effects of tensile stress and the agrochemical Vapam on the ageing of low-density polyethylene (LDPE) agricultural films. Part I, Mechanical behaviour. *Polymer Degradation and Stability*, 88(3), 489–503.
- Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M., & Rahmanpour, R. (2011). Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Reports*, 28(12), 1883-1896.

- Buswell, J. A., Odier, E., & Kirk, T. K. (1987). Lignin biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 6(1), 1-60.
- Carrasco, M., Rozas, J.M., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2012). Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology* 12, 251.
- Chae, Y. & An, Y. J. (2018). Current research trends on plastic pollution and ecological impacts on the soil ecosystem. A review. *Environmental Pollution*, 240, 387-395
- Charnock, C. (2021). Norwegian soils and waters contain mesophilic, plastic-degrading bacteria. *Microorganisms*, 9(1), 94.
- Chen, S., Su, L., Chen, J., & Wu, J. (2013). Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances* 31(8), 1754–1767.
- Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Xu, P., Zhang, C., & Liu, Y. (2016). Hydroxyl radicals based advanced oxidation processes (AOPs) for remediation of soils contaminated with organic compounds: a review. *Chemical Engineering Journal*, 284, 582-598.
- Cherrett, J. M., Powell, R. J., & Stradling, D. J. (1989). The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus. *Insect-Fungus Interactions*, 93-120.
- Danso, D., Chow, J., & Streit, W. R. (2019). Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(19), E01095-19.
- De-Bashan, L. E.; Moreno, M., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, 36(12), 2941-2948.
- Deshpande, P. C., Skaar, C., Brattebø, H., & Fet, A. M. (2020). Multi-criteria decision analysis (MCDA) method for assessing the sustainability of end-of-life alternatives for waste plastics: A case study of Norway. *Science of the Total Environment*, 719, 137353.
- Dickman, M.B., & Patil, S.S. (1986). A rapid and sensitive plate assay for the detection of cutinase produced by plant pathogenic fungi. *The American Phytopathological Society*, 76, 473-475
- Du, Y., Liu, X., Dong, X., & Yin, Z. (2022). A review on marine plastisphere: biodiversity, formation, and role in degradation. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 975-988.

- Eberl, A., Heumann, S., Brückner, T., Araujo, R., Cavaco-Paulo, A., Kaufmann, F., Wolfgang, K., & Guebitz, G. M. (2009). Enzymatic surface hydrolysis of poly (ethylene terephthalate) and bis (benzyloxymethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. *Journal of Biotechnology*, 143(3), 207-212.
- Gangaraddi, V., & Brahma Prakash, G. P. (2018). Comparative evaluation of selected formulations of a microbial consortium. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 52(2), 255-262.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782.
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J. M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3(1), 1-26.
- Glazer, A. N., Nikaido, H., & Brown, A. J. (1996). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. *Trends in Biotechnology*, 14(6), 215-215.
- Guebitz, G. M., & Cavaco-Paulo, A. (2008). Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalization of synthetic polymers. *Trends in Biotechnology*, 26(1), 32-38.
- Guerrero-Ortiz, P. L., Quintero-Lizaola, R., Espinoza-Hernández, V., Benedicto-Valdés, G. S., & Sánchez-Colín, M. D. J. (2012). Respiración de CO<sub>2</sub> como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de *Lupinus*. *Terra Latinoamericana*, 30(4), 355-362.
- Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2-3), 125-135.
- Havstad, M. R. (2020). Biodegradable plastics. In *Plastic Waste and Recycling*, 97-129.
- Heredia, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1620(1-3), 1-7.
- Herzog, K., Müller, R. J., & Deckwer, W. D. (2006). Mechanism and kinetics of the enzymatic hydrolysis of polyester nanoparticles by lipases. *Polymer Degradation and Stability*, 91(10), 2486-2498.
- Hindersah, R., Setiawati, M. R., Asmiran, P., & Fitriatin, B. N. (2020). Formulation of *Bacillus* and *Azotobacter* consortia in liquid cultures: preliminary research on microbes-coated urea. *International Journal of Agriculture System*, 8(1), 1-10.

- Howard, G. T., Ruiz, C., & Hilliard, N. P. (1999). Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43, 7–12.
- Hurley, R. R., & Nizzetto, L. (2018). Fate and occurrence of micro (nano) plastics in soils: Knowledge gaps and possible risks. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 6-11.
- Jakubowicz, I., Yarahmadi, N., & Petersen, H. (2006). Evaluation of the rate of abiotic degradation of biodegradable polyethylene in various environments. *Polymer Degradation and Stability*, 91(7), 1556–1562.
- Janshekar, H., Haltmeier, T., & Brown, C. (1982). Fungal degradation of pine and straw alkali lignins. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 14, 174-181.
- Jarrett, P., Benedict, C. V., Bell, J. P., Cameron, J. A., & Huang, S. J. (1984). Mechanism of the biodegradation of polycaprolactone. *Polymers as Biomaterials*, 181-192.
- Jenkins, S., Quer, A.M.I., Fonseca, C., & Varrone, C. (2019). Microbial degradation of plastics: new plastic degraders, mixed cultures and engineering strategies. *Soil Microenvironment for Bioremediation and Polymer Production*, 213–238.
- Khoo, K. S., Ho, L. Y., Lim, H. R., Leong, H. Y., & Chew, K. W. (2021). Plastic waste associated with the COVID-19 pandemic: crisis or opportunity?. *Journal of Hazardous Materials*, 417, 126108.
- Kiiskinen, L. L., Ratto, M., & Kruus, K. (2004). Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 640–646.
- Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. E., & Farrell, R. L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(1), 27-32.
- Kolattukudy, P. E. (2001). Polyesters in higher plants. *Biopolyesters*, 1-49.
- Krueger, M. C., Harms, H., & Schlosser, D. (2015). Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(21), 8857-8874.
- Kumar, V., & Singh, K. P. (2001). Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Bioresource Technology*, 76(2), 173-175.

- Lai, H. J. (2021). Adsorption of remazol brilliant violet 5R (RBV-5R) and remazol brilliant blue R (RBBR) from aqueous solution by using agriculture waste. *Tropical Aquatic and Soil Pollution*, 1(1), 11-23.
- Lerch, R. N., Barbarick, K. A., Sommers, L. E., & Westfall, D. G. (1992). Sewage sludge proteins as labile carbon and nitrogen sources. *Soil Science Society of America Journal*, 56(5), 1470-1476.
- Lim, S. L., Wu, T. Y., Lim, P. N., & Shak, K. P. Y. (2015). The use of vermicompost in organic farming: overview, effects on soil and economics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), 1143-1156.
- López, M. J., Guisado, G., Vargas-García, M. C., Suárez-Estrella, F., Moreno, J. (2006). Decolorization of industrial dyes by ligninolytic microorganisms isolated from composting environment. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 42-45.
- Lugauskas, A., Levinskaite, L., & Pečiulyte, D. (2003). Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52(4), 233–242.
- Lwanga, E. H., Gertsen, H., Gooren, H., Peters, P., Salánki, T., Van Der Ploeg, M., & Geissen, V. (2016). Microplastics in the terrestrial ecosystem: implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Environmental Science & Technology*, 50, 2685-2691.
- MacLeod, M., Arp, H. P. H., Tekman, M. B., & Jahnke, A. (2021). The global threat from plastic pollution. *Science*, 373(6550), 61-65.
- Maheshwari, D. K., Dubey, R. C., Agarwal, M., Dheeman, S., Aeron, A., & Bajpai, V. K. (2015). Carrier based formulations of biocoenotic consortia of disease suppressive *Pseudomonas aeruginosa* KRP1 and *Bacillus licheniformis* KRB1. *Ecological Engineering*, 81, 272-277.
- Mechichi, T., Mhiri, N., & Sayadi, S. (2006). Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. *Chemosphere*, 64(6), 998–1005.
- Mester, T., & Tien, M. (2000). Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46(1), 51–59.
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732-749.

- Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., & Levin, D. B. (2020). Microbial and enzymatic degradation of synthetic plastics. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2837.
- Mueller, R. J. (2006). Biological degradation of synthetic polyesters-Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry*, 41(10), 2124–2128.
- North, E. J., & Halden, R. U. (2013). Plastics and environmental health: the road ahead. *Reviews on Environmental Health*, 28(1), 1-8.
- Oliveira, M., Almeida, M., & Miguel, I. (2019). A micro (nano) plastic boomerang tale: A never ending story?. *Trends in Analytical Chemistry*, 112, 196-200.
- Ortíz, M. (2021). Selección de cepas microbianas para la degradación de plásticos convencionales. Trabajo Fin de Grado. Grado en Biotecnología. Universidad de Almería. Almería, España.
- Pannu, J. S., & Kapoor, R. K. (2014). Microbial laccases: a mini-review on their production, purification and applications. *International Journal of Pharmaceutical Archive*, 3(12), 528-536.
- PlasticsEurope. (2022). Plastics - the Facts 2021. [Plasticseurope.org](https://plasticseurope.org). Consultado 14 de mayo de 2022, de [https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/12/AF-Plastics-the-facts-2021\\_250122.pdf](https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/12/AF-Plastics-the-facts-2021_250122.pdf)
- Powell, R. J., & Stradling, D. J. (1986). Factors influencing the growth of *Attamyces bromatificus*, a symbiont of *attine ants*. *Transactions of the British Mycological Society*, 87(2), 205-213.
- Prakash, J., & Arora, N. K. (2020). Development of *Bacillus safensis*-based liquid bioformulation to augment growth, stevioside content, and nutrient uptake in *Stevia rebaudiana*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 1-13.
- Prata, J. C. (2018). Airborne microplastics: consequences to human health?. *Environmental Pollution*, 234, 115-126.
- Premraj R. & Doble M. (2005). Biodegradation of polymers. *Indian Journal of Biotechnology* 4, 186– 193.
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, 146, 106274.

- Ravensberg, W. J. (2011). A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods (Vol. 10). Springer, Dordrecht, Holanda.
- Rayner, A. D. M., & Boddy, L. (1988). Fungal decomposition of wood. Its Biology and Ecology. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Sussex, Reino Unido.
- Restrepo-Flórez, J. M., Bassi, A., & Thompson, M. R. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 88, 83–90.
- Ronkvist, Å. M., Xie, W., Lu, W., & Gross, R. A. (2009). Cutinase-catalyzed hydrolysis of poly (ethylene terephthalate). *Macromolecules*, 42(14), 5128-5138.
- Roux, M., & Varrone, C. (2021). Assessing the Economic Viability of the Plastic Biorefinery Concept and Its Contribution to a More Circular Plastic Sector. *Polymers*, 13(22), 3883.
- Sajjad, M., Huang, Q., Khan, S., Khan, M. A., Yin, L., Wang, J., Guo, G. (2022). Microplastics in the soil environment: A critical review. *Environmental Technology & Innovation*, 102408.
- Schoebitz, M., López, M. D., Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(4), 751-765.
- Sekiguchi, T., Sato, T., Enoki, M., Kanehiro, H., Uematsu, K., & Kato, C. (2011). Isolation and characterization of biodegradable plastic degrading bacteria from deep-sea environments. *JAMSTEC Report of Research and Development*, 11, 33-41.
- Sigler, M. (2014). The effects of plastic pollution on aquatic wildlife: current situations and future solutions. *Water, Air, & Soil Pollution*. 225, 1-9.
- Sivan, A. (2011). New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 422–426.
- Smith, M., Love, D. C., Rochman, C. M., & Neff, R. A. (2018). Microplastics in seafood and the implications for human health. *Current Environmental Health Reports*, 5(3), 375-386.
- Spadaro, J. T., Gold, M. H., & Renganathan, V. (1992). Degradation of Azo Dyes by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2397-2401.



- Sun, D., Hale, L., & Crowley, D. (2016). Nutrient supplementation of pinewood biochar for use as a bacterial inoculum carrier. *Biology and Fertility of Soils*, 52(4), 515-522.
- Theresa, M., & Radhakrishnan, E. K. (2021). Microbial biocontrol formulations for commercial applications. En: J. White, A. Kumar, S. Droby (Eds.) *Microbiome Stimulants for Crops* (pp. 179-192). Woodhead Publishing, Sawston, Reino Unido.
- Tsuji, H., Echizen, Y., & Nishimura, Y. (2006). Photodegradation of biodegradable polyesters: A comprehensive study on poly(l-lactide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Polymer Degradation and Stability*, 91(5), 1128–1137.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Martos, V., García del Moral, L. F., Kowalska, J., Tylkowski, B., & Malusá, E. (2020). Formulation of microbial inoculants by encapsulation in natural polysaccharides: focus on beneficial properties of carrier additives and derivatives. *Frontiers in Plant Science*, 11, 270.
- Vethaak, A. D., & Legler, J. (2021). Microplastics and human health. *Science*, 371(6530), 672-674.
- Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307-344.
- Wang, J., & Wang, S. (2019). Preparation, modification and environmental application of biochar: a review. *Journal of Cleaner Production*, 227, 1002-1022.
- Weber, K., & Quicker, P. (2018). Properties of biochar. *Fuel*, 217, 240-261.
- Wright, S. L., & Kelly, F. J. (2017). Plastic and human health: a micro issue?. *Environmental Science & Technology*.51, 6634-6647.
- Xu, P., Peng, G., Su, L., Gao, Y., Gao, L., & Li, D. (2018). Microplastic risk assessment in surface waters: A case study in the Changjiang Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 647-654.
- Yuan, Z., Nag, R., & Cummins, E. (2022). Ranking of potential hazards from microplastics polymers in the marine environment. *Journal of Hazardous Materials*, 429, 128399.
- Zarinkamar, F., Reypour, F., & Khajeh, K. (2014). A study of the changes in laccase activity of *Festuca's* vegetative organs under petroleum pollution conditions. *Modares Journal of Biotechnology*, 5(2), 1-5.