



Universidad de Oviedo

meta



TBR

Biodegradación y captación de MPs de polietileno en aguas con cultivos bacterianos específicos

Bess A. Newrick, David Valdés, Daniel Sol, Amanda Laca, Adriana Laca, Mario Díaz
Dpto. de Ingeniería Química y Tecnología del Medioambiente. Universidad de Oviedo.

Oviedo, 20 y 21 de julio, 2023

Índice

1. INTRODUCCIÓN
2. MATERIAL Y MÉTODOS
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
 1. Atrapamiento de MPs en reactores biológicos y por *Bacillus firmus*
 2. Biodegradación de MPs por *B. firmus*
 3. Biodegradación de MPs por *Comamonas testosteroni*
4. CONCLUSIONES



Índice

1. INTRODUCCIÓN

2. MATERIAL Y MÉTODOS

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Atrapamiento de MPs en reactores biológicos y por *Bacillus firmus*

2. Biodegradación de MPs por *B. firmus*

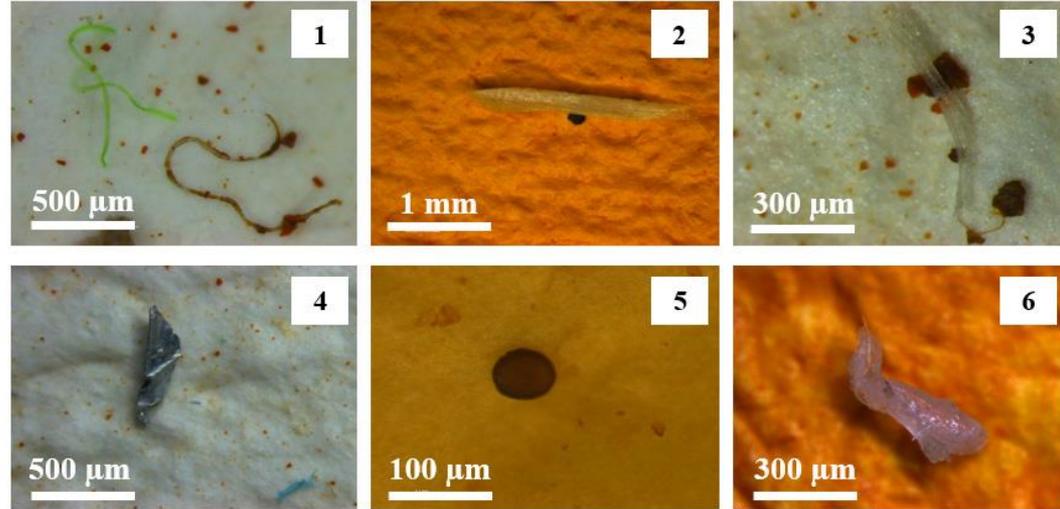
3. Biodegradación de MPs por *Comamonas testosteroni*

4. CONCLUSIONES



LOS MICROPLÁSTICOS: DEFINICIÓN, ORIGEN Y CLASIFICACIÓN

- Grupo heterogéneo de partículas poliméricas, que difieren en forma, tamaño, origen, tipo de material y composición química.
- Término empleado para toda partícula polimérica cuyo tamaño sea menor de 5 mm y mayor de 1 μm .



Los microplásticos presentan morfologías muy variadas

LOS MICROPLÁSTICOS; DEFINICIÓN, ORIGEN Y CLASIFICACIÓN

Según su origen se dividen en dos categorías

- ❑ **Primarios:** Se generan de manera directa y se adicionan a productos.
- ❑ **Secundarios:** Se originan por la degradación de plásticos de mayor tamaño mediante varios procesos.



Microplásticos primarios

Microperlas o microbeads

Pellets



Microplásticos secundarios

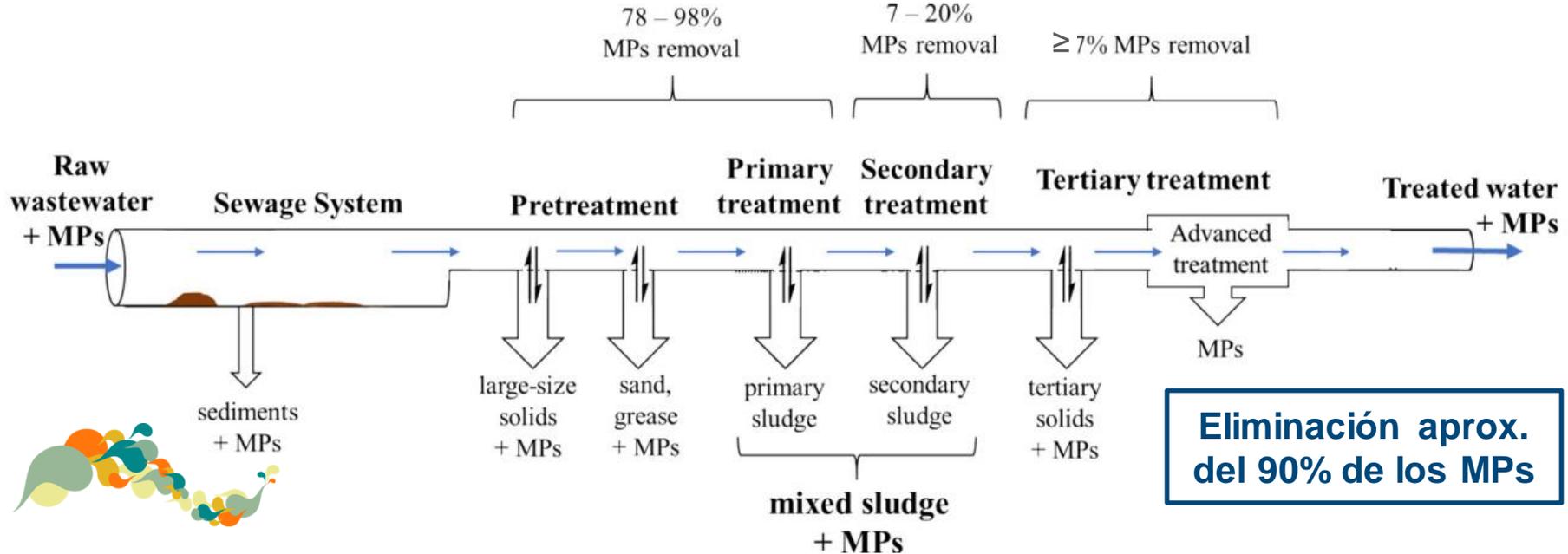
Fragmentos de envases, bolsas, juguetes y otros artículos de plástico



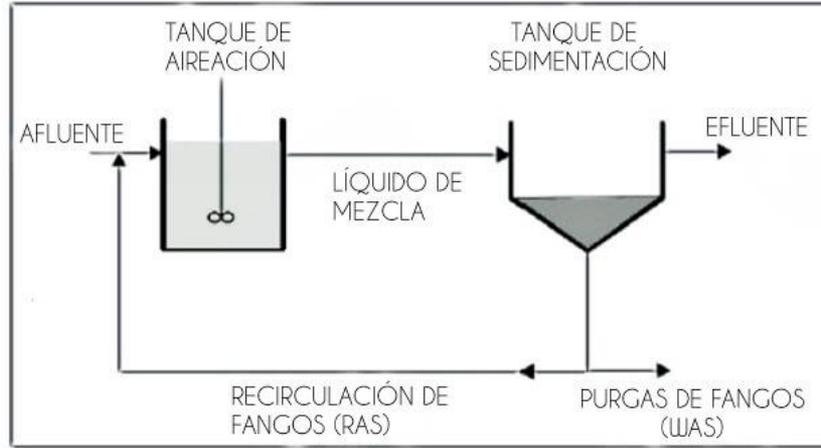
INTERACCIÓN ENTRE MICROORGANISMOS Y MPS

Preocupación por la contaminación por MPs y sus efectos sobre el medio ambiente/la salud.

Prevención → Actuar sobre los focos de emisión:
Las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR)

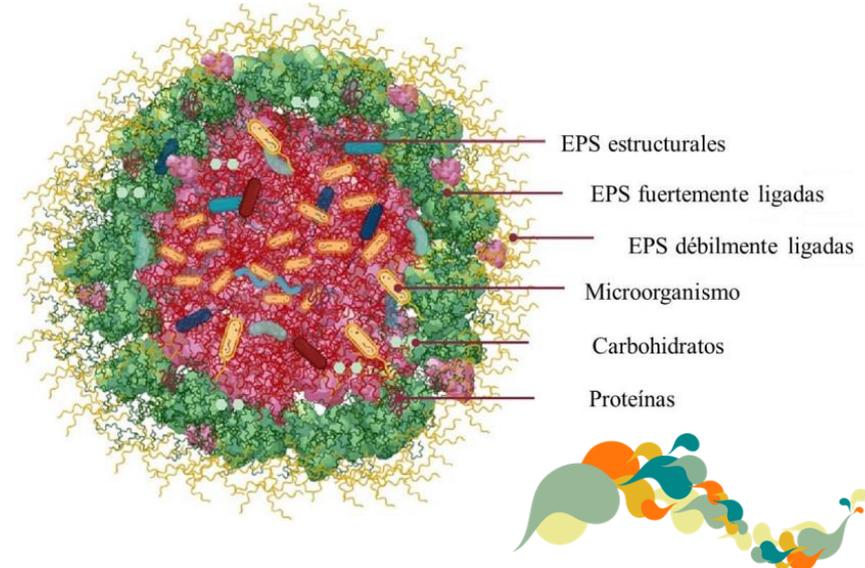


INTERACCIÓN ENTRE MICROORGANISMOS Y MPS



- El tratamiento biológico de aguas residuales por lodos activados puede eliminar MPs.

- La eficacia del tratamiento es afectada por la composición y la cantidad de EPS en el licor mezcla.
- Los MPs estimulan la producción de EPS.



LA BIODEGRADACIÓN DE LOS MPS

Inicialmente esta contaminación se consideró una amenaza irreversible.

Biodegradación: Eliminación de las micropartículas por procesos de degradación biológica por organismos.

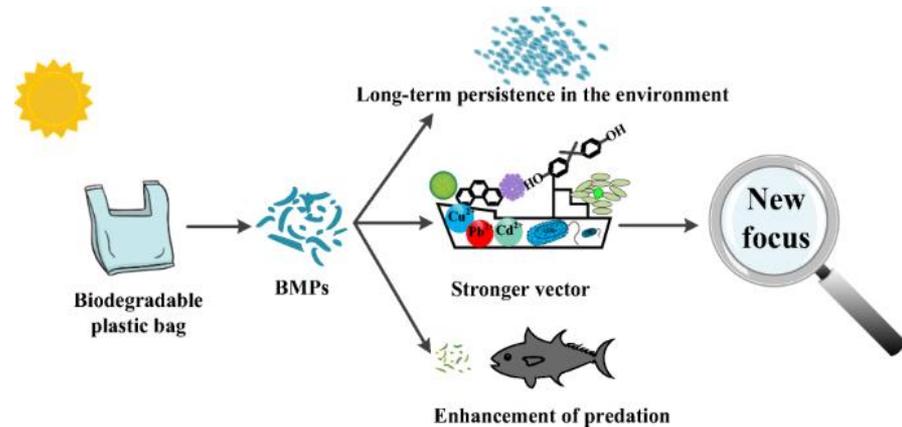
Degradación por organismos superiores:

- Larvas de insectos
- Escarabajos.

Degradación por microorganismos:

- Bacterias
- Hongos

Nuevas alternativas biotecnológicas

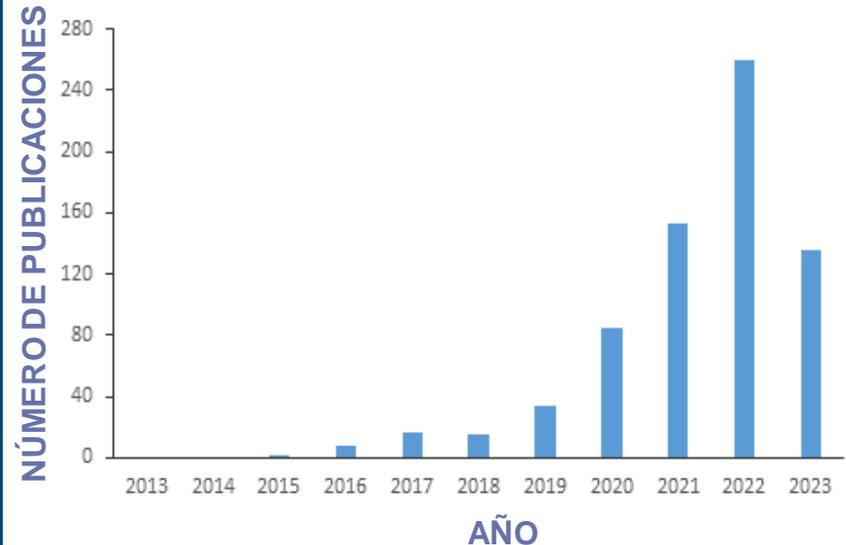


INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Investigación sobre la interacción entre microorganismos y los MPs en los procesos de atrapamiento y degradación.

Se plantean los siguientes objetivos:

- Análisis de la relación entre la secreción de EPS la retención de MPs
- Análisis de la capacidad de atrapamiento de *B. firmus*.
- Análisis de la biodegradación de los MPs con *C. testosteroni* y *B. firmus*



Índice

1. INTRODUCCIÓN

2. MATERIAL Y MÉTODOS

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Atrapamiento de MPs en reactores biológicos y por *Bacillus firmus*

2. Biodegradación de MPs por *B. firmus*

3. Biodegradación de MPs por *Comamonas testosteroni*

4. CONCLUSIONES





OBTENCIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS MODELO

Polietileno de alta densidad (HDPE)



- ❑ Uso extendido en la producción de envases
- ❑ Frecuente en aguas residuales urbanas

Tapones de botella de HDPE



- ❑ Triturados con un molinillo
- ❑ Se tamizaron y se recogió la fracción de **100-250 μm** .

Esterilización de los MPs:
Con etanol 70%



EXPERIMENTOS DE ATRAPAMIENTO

¿Formación de pellets con MPs retenidos?

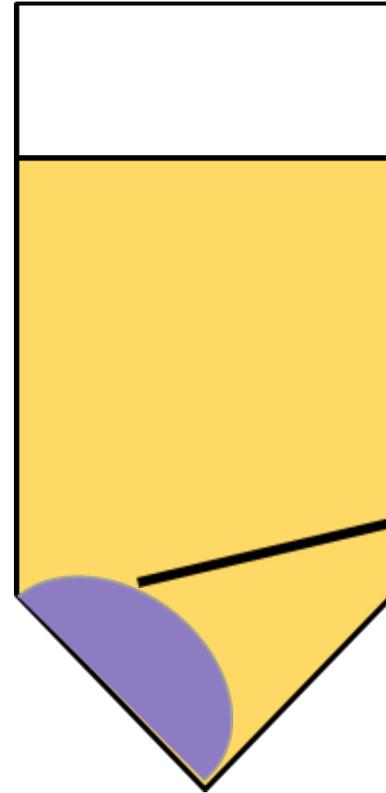
-Medio de cultivo + MPs + inóculo

2 ensayos:

-53 mg/L de *B. firmus* y centrifugación 10 min a 7500 x g.

-530 mg/L de *B. firmus* y centrifugación 10 min a 10000 x g.

Empleando la bacteria *Bacillus firmus*



¿MPs?



ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN

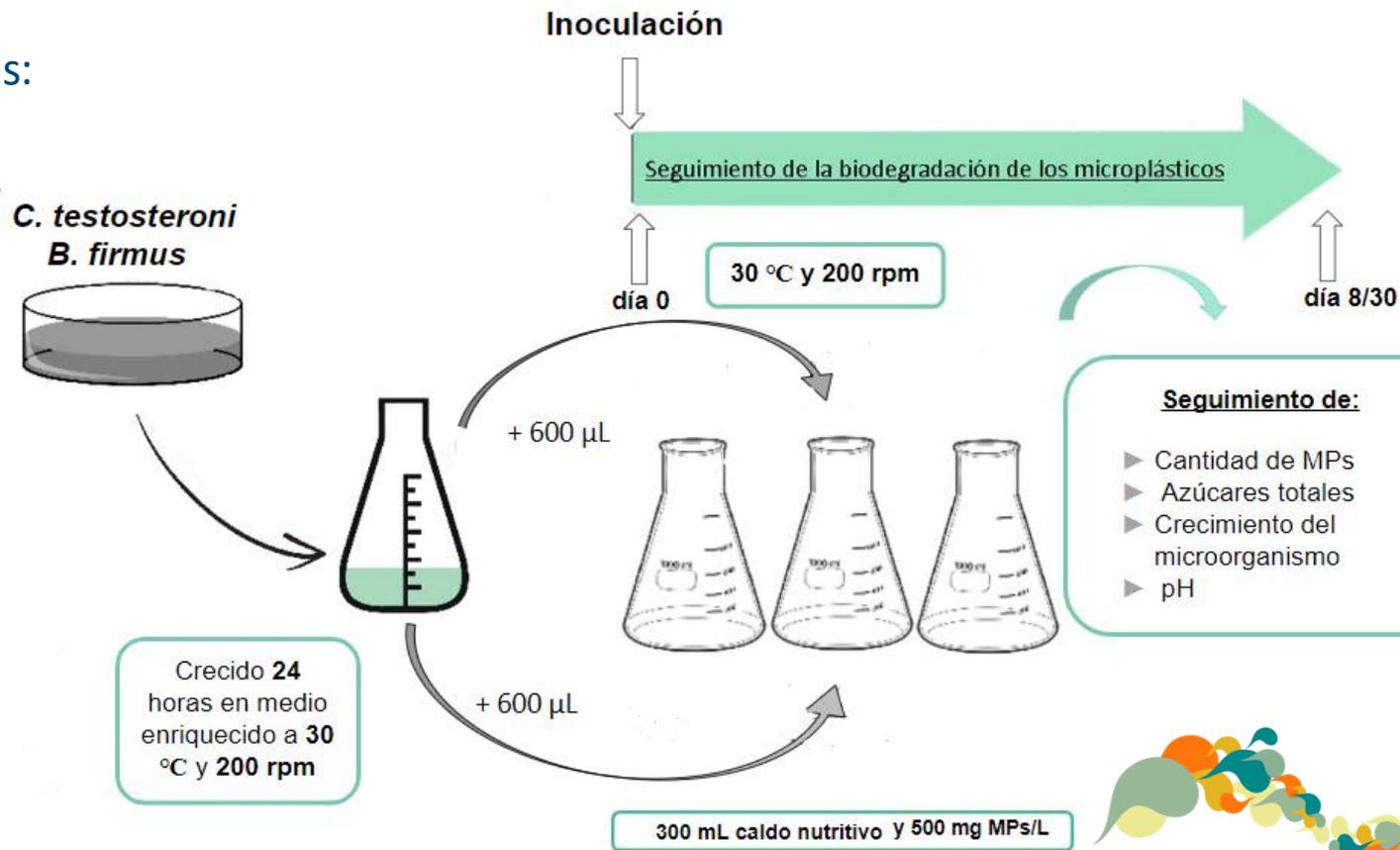
Bacterias empleadas:

- *Comamonas testosteroni* NCIMB 8955 (CECT)
- *Bacillus firmus* (CECT 14)

Concentración de MPs: 500 mg/L

Duración con *C. testosteroni*: 8 días

Duración con *B. firmus*: 30 días



ANÁLISIS GRAVIMÉTRICO



TOMA DE
MUESTRAS

1

20 mL (duplicado)

ELIMINACIÓN DE
BIOMASA Y LAVADO

2

Añadir H_2O_2 30%

FILTRACIÓN Y
SECADO

3

Filtrar y dejar secar sobre
placas Petri abierta

DETERMINACIÓN DE
LA PÉRDIDA DE MASA

4

Por diferencia de
pesada

ANÁLISIS
CINÉTICO

5

Ajuste de datos a
modelos cinéticos

CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS CON MPS

- ❑ Se determinaron las UFC/mL por recuento en placa



Para obtener muestras representativas de las bacterias adheridas a los MPs y en suspensión, se empleó un homogeneizador de laboratorio.



Se realizó una curva de crecimiento de la bacteria sin MPs midiendo la DO a 600nm por espectrofotometría UV visible.



DETERMINACIÓN DE LOS AZÚCARES TOTALES

Para el seguimiento de los azúcares totales se empleó el método **fenol-sulfúrico**.

1. Calibración usando muestras patrón con concentraciones conocidas de glucosa.
2. Se determinaron los azúcares totales durante el experimento con muestras duplicadas de 5 mL.



ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA

Visualización de
modificaciones superficiales
y biopelículas: Microscopio
electrónico de barrido

(Figura b: SEM JEOL, JSM5600)



Análisis de la
morfología:
Estereomicroscopio

(Figura a: Estereomicroscopio Leica M205FA)



Análisis de la
composición química:
Espectrofotómetro
FTIR

(Figura c: Espectrofotómetro Spotlight 200i de
Perkin Elmer)

Índice

1. INTRODUCCIÓN

2. MATERIAL Y MÉTODOS

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Atrapamiento de MPs en reactores biológicos y por *Bacillus firmus*

2. Biodegradación de MPs por *B. firmus*

3. Biodegradación de MPs por *Comamonas testosteroni*

4. CONCLUSIONES

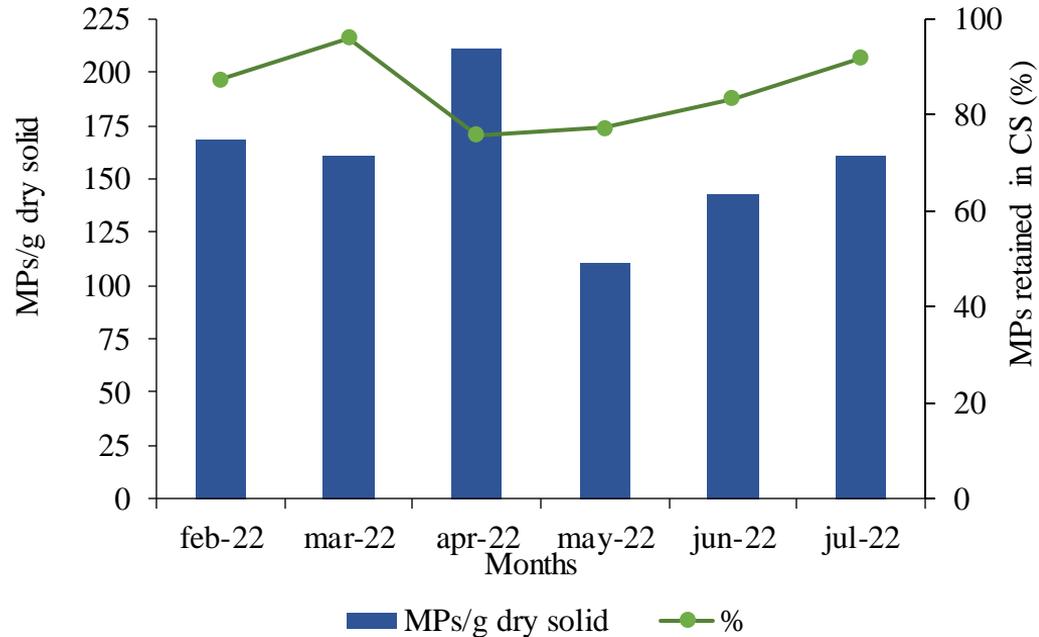
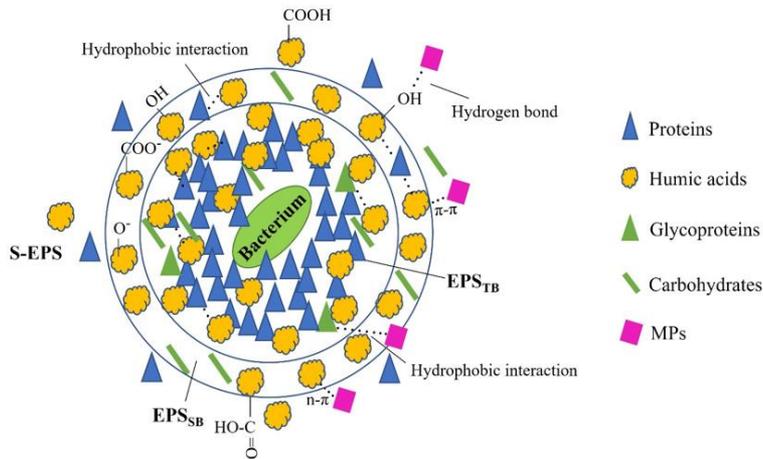




ATRAPAMIENTO DE MPS POR LODOS ACTIVOS

- Análisis de la retención de MPs en la fracción sólida tras centrifugar licor mezcla de biorreactores de membrana (MBR).

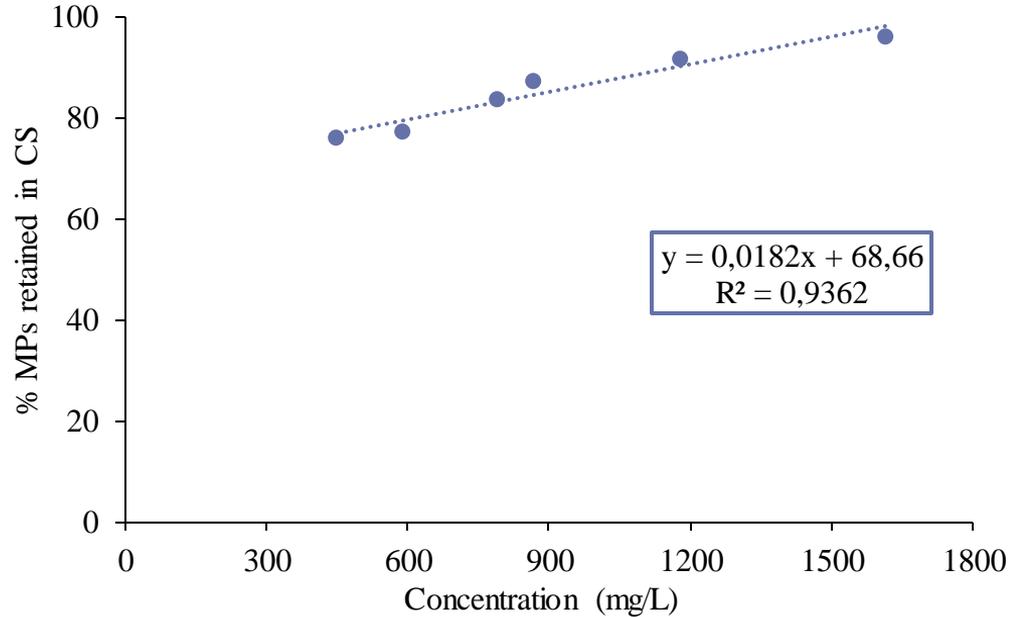
Los EPS constituyen la mayor parte de los lodos activos, formados por **Proteínas, carbohidratos y ácidos húmicos**



- **MPs en la fracción sólida (CS):**
159.19 ± 32.82 MPs/g sólido seco
- **Porcentaje de retención: 85 ± 8%.**

ATRAPAMIENTO DE MPS POR LODOS ACTIVOS

- Relación entre la concentración de **proteínas, carbohidratos, ácidos húmicos** y el **% de retención de MPs**:



- **Ninguna correlación significativa para proteínas y carbohidratos.**
- **Buena correlación para los ácidos húmicos.**



EXPERIMENTOS DE ATRAPAMIENTO POR *BACILLUS FIRMUS*

Muestra	Peso MPs recuperados (g)	% MPs del total
Control sobrenadante	0,02	100
Precipitado 1	0,0035	16,5
Precipitado 2	0,0027	13,5
Valor medio	0,0031 ± 0,0006	15 ± 2,12

Experimento I:

- 7500 g x 10 min
- 2.1 mg *B.firmus* (SST)

Muestra	Peso MPs recuperados (g)	% MPs del total
Control sobrenadante	0,02	100
Precipitado 1	0,0056	28
Precipitado 2	0,0052	26
Precipitado 3	0,0042	21
Valor medio	0,0050 ± 0,0007	25 ± 3,6

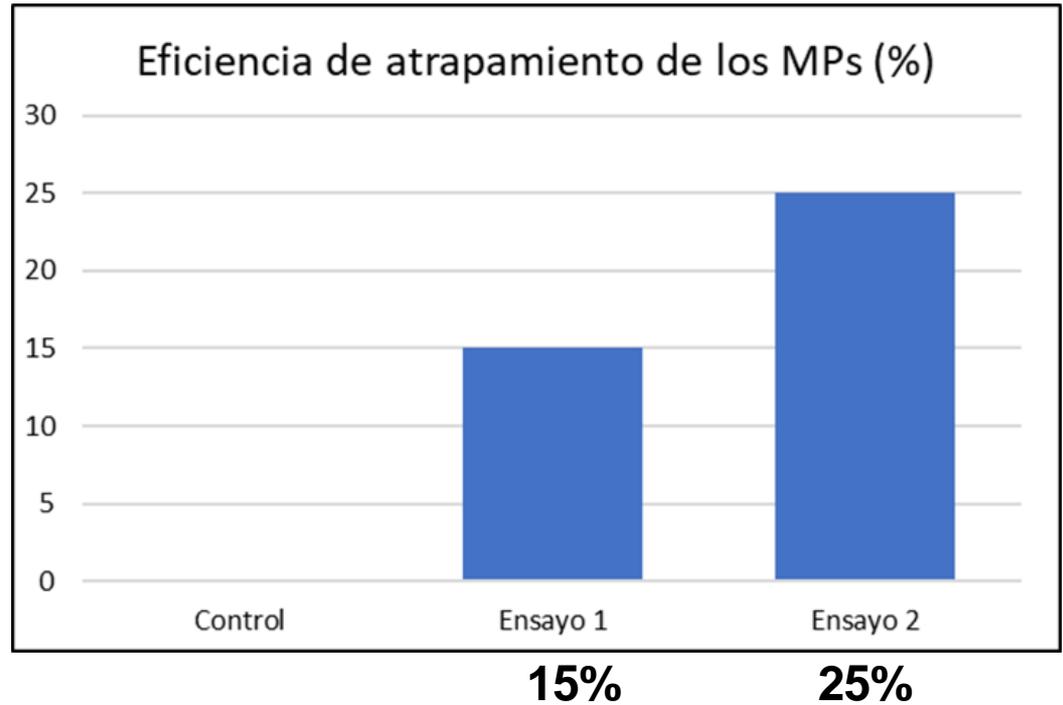
Experimento II:

- 10000 g x 10 min
- 21 mg *B.firmus* (SST)



EXPERIMENTOS DE ATRAPAMIENTO POR *BACILLUS FIRMUS*

- **Aumenta la capacidad de atrapamiento con el número de microorganismos y velocidad de centrifugación, aunque no proporcionalmente.**
- **Eficacias similares al tratamiento secundario de EDAR ($7 \leq 20\%$).**



Índice

1. INTRODUCCIÓN
2. MATERIAL Y MÉTODOS
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
 1. Atrapamiento de MPs en reactores biológicos y por *Bacillus firmus*
 2. Biodegradación de MPs por *B. firmus*
 3. Biodegradación de MPs por *Comamonas testosteroni*
4. CONCLUSIONES



BIODEGRADACIÓN DE MPS CON *BACILLUS FIRMUS*

- La concentración de MPs comenzó a disminuir el día 8.
- Se observó una reducción de la masa final: del 15.5 ± 2.6 %.
- La biodegradación seguía una cinética de orden 0.

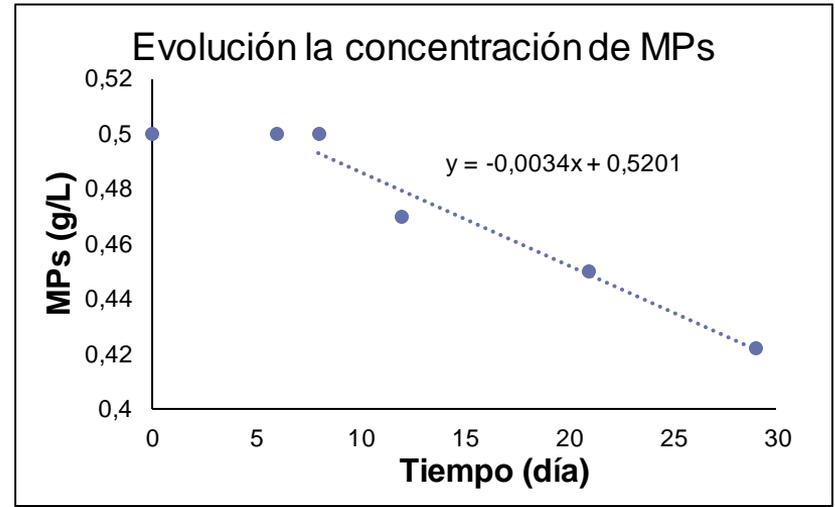
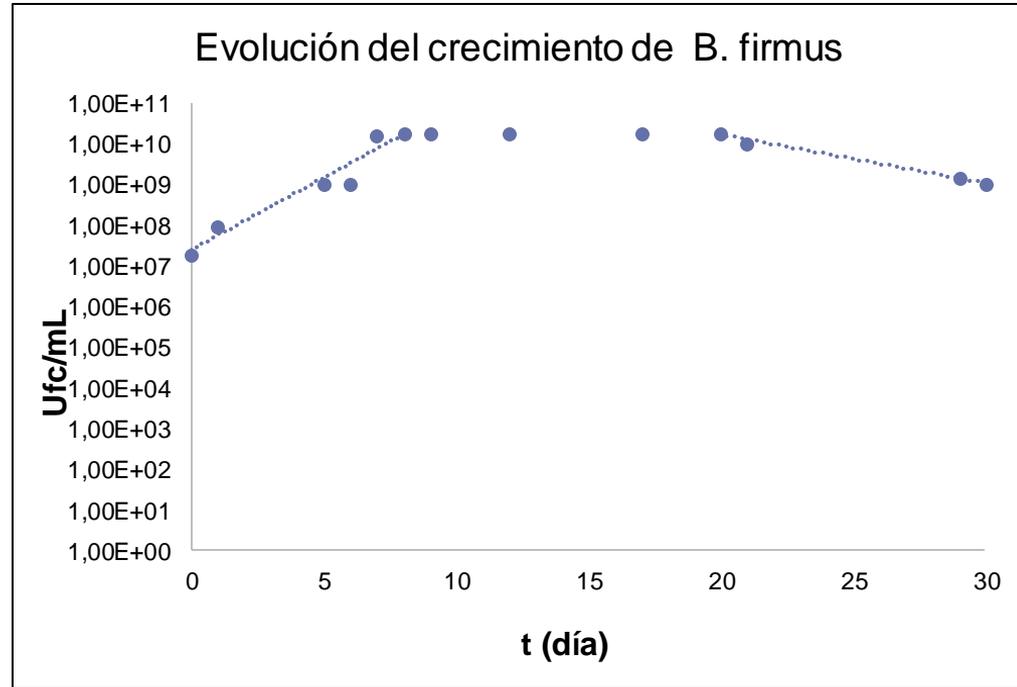


Tabla 3. Concentración media de los MPs por día.

t (día)	Concentración media de MPs (g/L)
0	0,500
6	0,500 ± 0,003
8	0,500 ± 0,002
12	0,470 ± 0,014
21	0,450 ± 0,005
29	0,423 ± 0,013

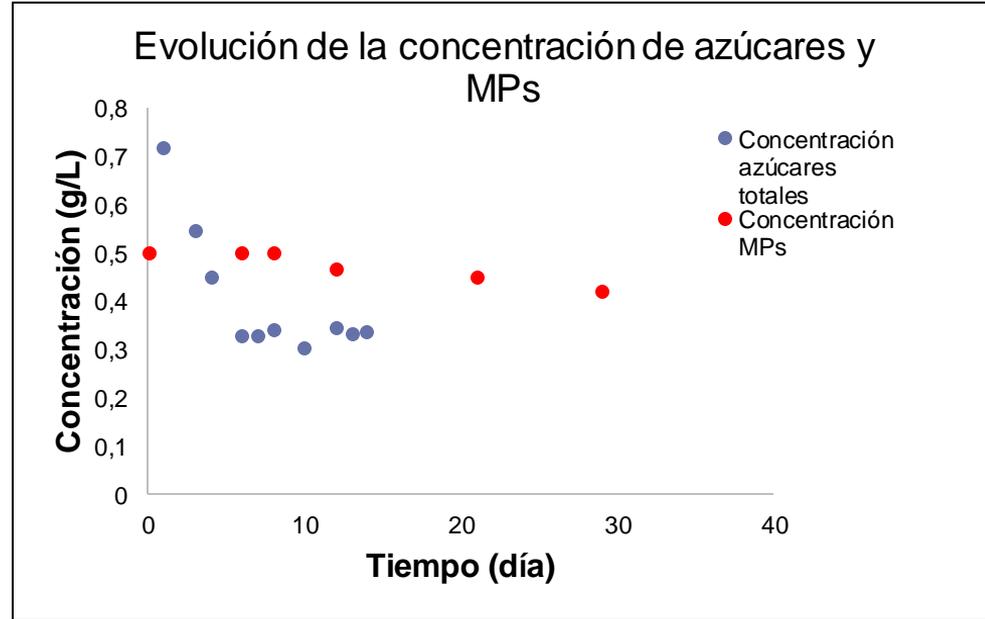
CRECIMIENTO DE *BACILLUS FIRMUS*

- Crecimiento exponencial hasta el día 7 del ensayo.
- Fase de muerte celular final a partir del día 20.



CONSUMO DE AZÚCARES POR *BACILLUS FIRMUS*

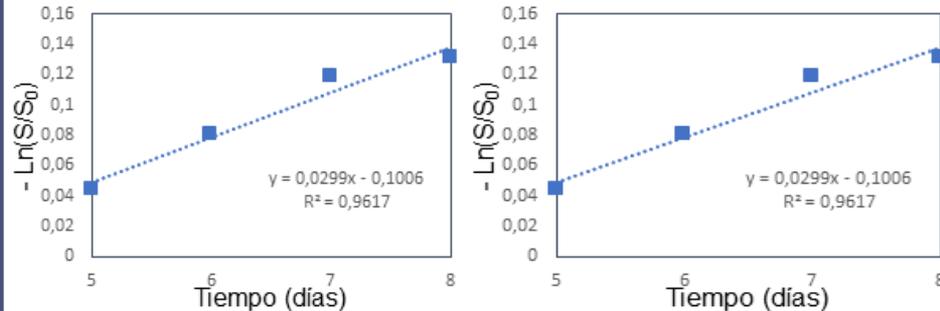
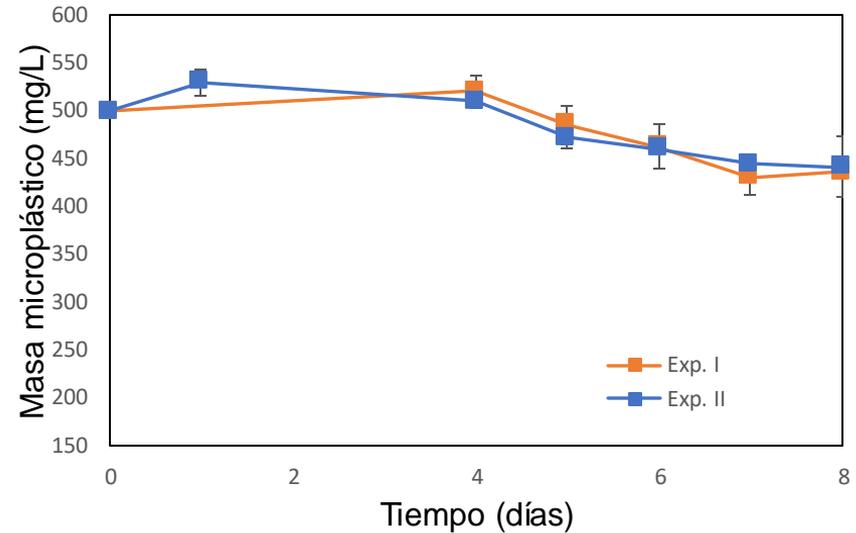
- Los azúcares totales disminuyen sostenidamente hasta el día 8.
- La concentración de MPs empieza a disminuir cuando se dejan de consumir azúcares.



BIODEGRADACIÓN DE MPS CON *COMAMONAS TESTOSTERONI*

Pérdida de masa de HDPE con el tiempo.

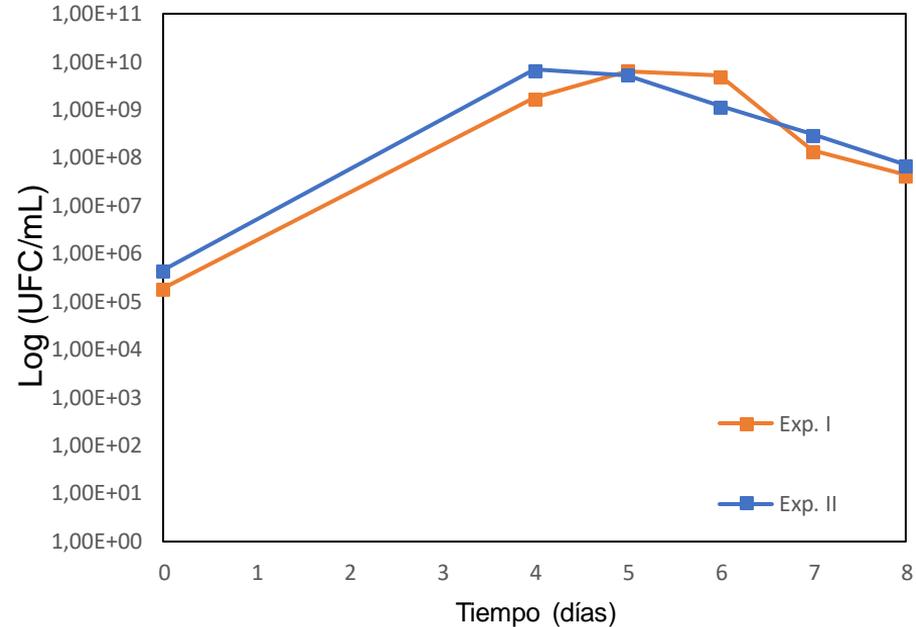
- ❑ Inicialmente la concentración de MPs aumentó, error experimental por la densidad del HDPE.
- ❑ Tras la formación de la biopelícula, comenzó a disminuir (día 4).
- ❑ Reducción de la masa final de un **$12.30 \pm 0.82\%$**



Los datos experimentales se ajustan a un modelo cinético de primer orden

CRECIMIENTO DE *COMAMONAS TESTOSTERONI*

- Crecimiento hasta el día 4, seguido de una fase estacionaria, y disminución de bacterias viables a partir del día 6.
- La degradación del plástico produce la liberación de sustancias tóxicas que impiden el crecimiento.



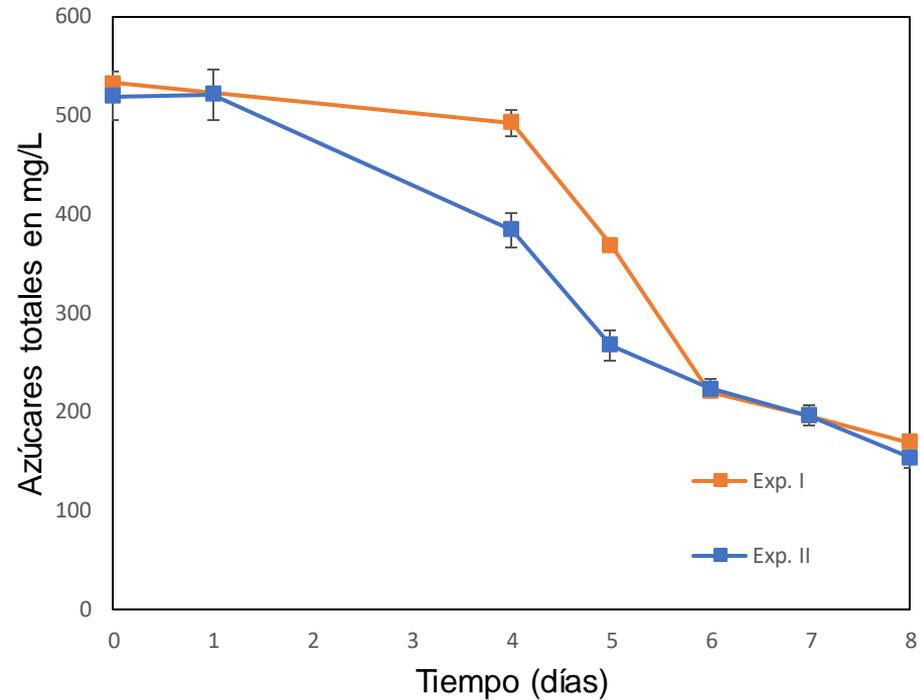
CONSUMO DE AZÚCARES POR *COMAMONAS TESTOSTERONI*

Rápida reducción inicial de azúcares (hasta día 5), donde comienza a disminuir lentamente, coincidiendo con el inicio de la degradación de MPs.

Posibles explicaciones de lo observado

A partir del día 5 se agotan los azúcares fácilmente empleados por *C. testosteroni*, que comience a degradar el HDPE

La degradación de MPs libera sustancias tóxicas que inhiben la actividad microbiana

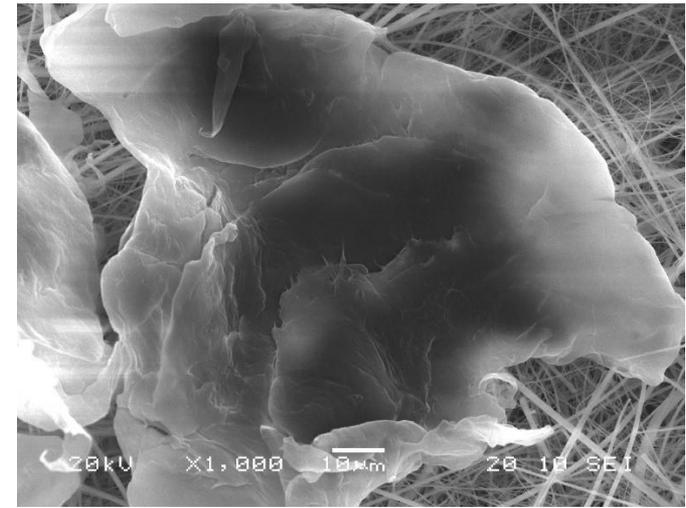


ANÁLISIS POR SEM

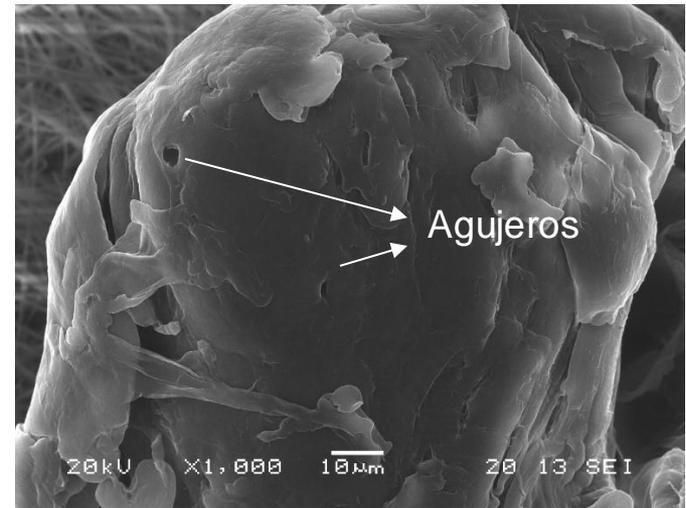
El análisis SEM mostró los cambios estructurales de los MPs por la degradación.

- ❑ El plástico sin tratar tiene una superficie más lisa.
- ❑ A lo largo del ensayo, aparece una deteriorización localizada en la superficie de los MPs, generando una mayor rugosidad, y la aparición de imperfecciones.

INICIAL



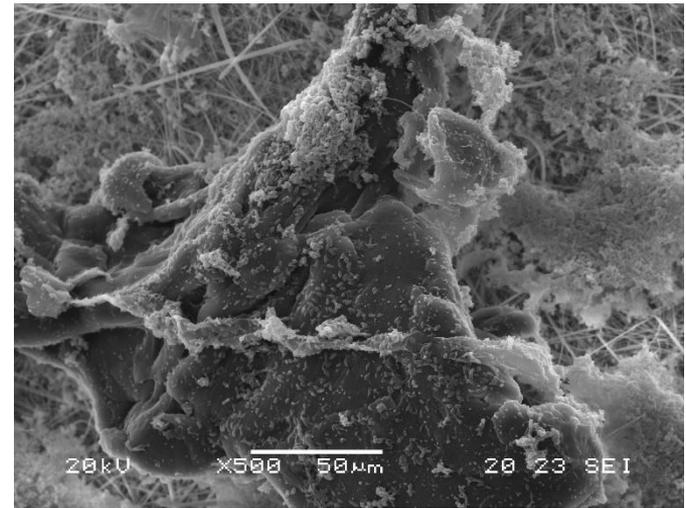
FINAL



ANÁLISIS POR SEM

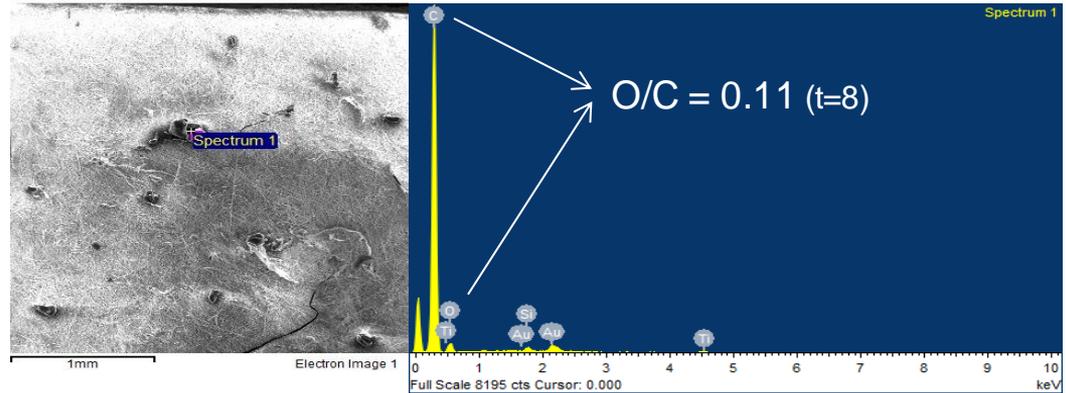
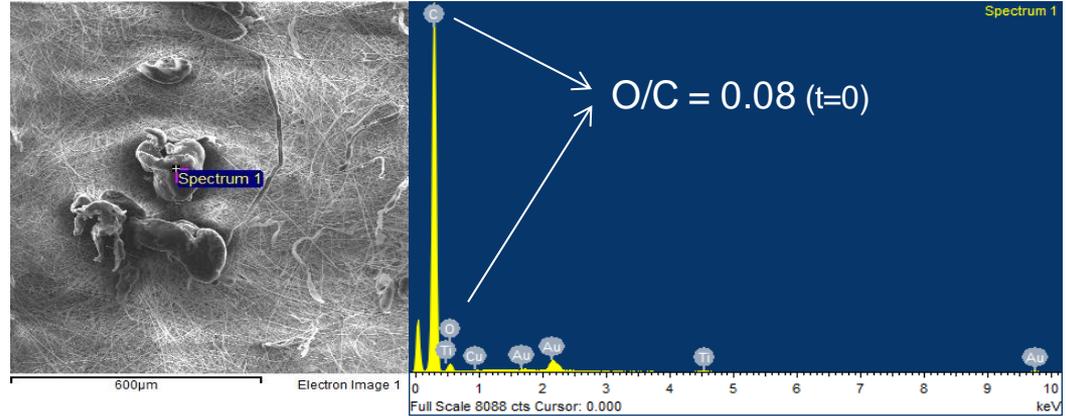
El análisis SEM mostró los cambios estructurales de los MPs por la degradación.

- ❑ Revelaron la formación de biopelículas superficiales, un paso esencial en la degradación de los MPs.
- ❑ Mayor colonización de la superficie de los MPs al final del experimento frente al día cinco.



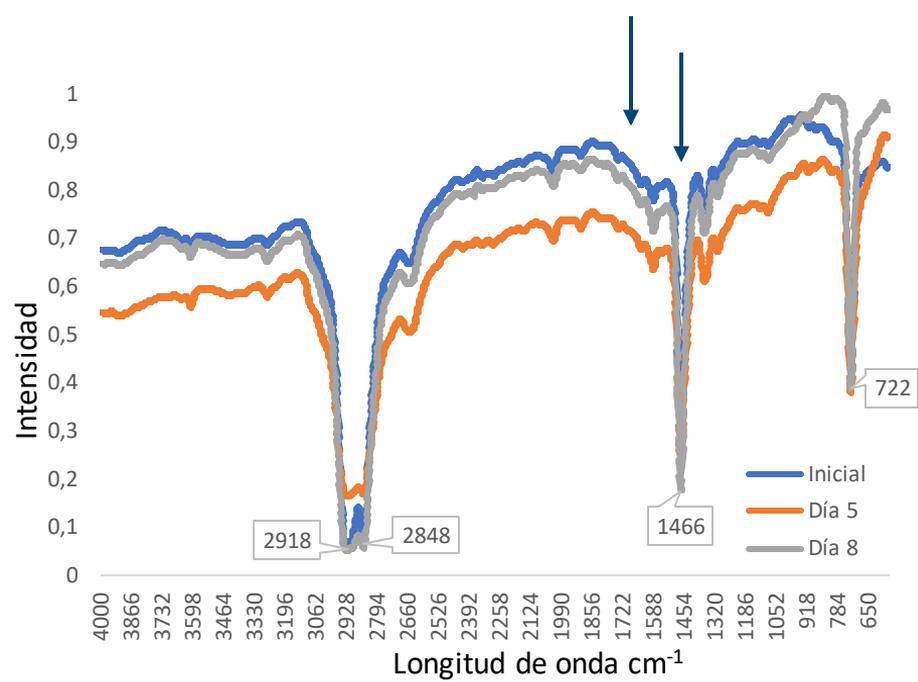
CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN (SEM-EDX)

- Los espectros obtenidos muestran un pico fuerte de C y un pico más bajo de O.
- Se calculó la relación O/C, que mostró una tendencia a incrementarse de forma gradual, indicando la oxidación superficial de los MPs.



CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN

- El análisis mediante espectroscopía de infrarrojos FTIR reveló los picos característicos del polietileno.
- Se observó un incremento del IC tras el ensayo, sugiriendo una acumulación gradual de grupos carbonilo sobre la superficie de los MPs.



Muestra		IC
Tiempo = 0	Sin trat.	0.12 ± 0.03
	Con trat.	0.12 ± 0.03
<i>C. testosteroni</i>	Tiempo = 5	0.34 ± 0.08
	Tiempo = 8	0.27 ± 0.04
<i>B. firmus</i>	Tiempo = 15	0.18 ± 0.01
	Tiempo = 30	0.19 ± 0.08

Índice

1. INTRODUCCIÓN
2. MATERIAL Y MÉTODOS
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN
 1. Atrapamiento de MPs en reactores biológicos y por *Bacillus firmus*
 2. Biodegradación de MPs por *B. firmus*
 3. Biodegradación de MPs por *Comamonas testosteroni*

4. CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

- ❑ La eliminación de MPs de aguas residuales se ve afectada por la cantidad y la composición de los EPS, y muestran mayor afinidad por los ácidos húmicos.
- ❑ En el ensayo de atrapamiento con un cultivo específico, se capturó un 25 % de los MPs con *B. firmus*.
- ❑ Para los ensayos de biodegradación, se observó una reducción de la masa de MPs de un 12.30 % (*C. testosteroni*) y un 15.5 % (*B. Firmus*).
- ❑ El análisis con el SEM mostró deterioro sobre la superficie de los MPs y la formación de biopelículas.
- ❑ El análisis elemental de los MPs mostró una tendencia hacia el aumento del O/C y el índice de carbonilo, mostrando la oxidación superficial por la actividad bacteriana.



Universidad de Oviedo

meta



Muchas gracias por su atención