



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Riesgo microbiológico asociado a plásticos sumergidos en agua de mar.

Almudena Fernández Muñoz

Grado de Biología

Any acadèmic 2015-16

Treball tutelat per Balbina Nogales Fernández
Departament de Microbiologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
X		X	

Paraules clau del treball:

Plásticos, microplásticos, *Vibrio*, bacterias, biofilm, agua de mar.

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
Plásticos y microplásticos.....	5
Microbiota asociada	6
Riesgos.....	7
MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
Muestreos.....	8
Experimento de laboratorio	9
RESULTADOS.....	11
Muestreos.....	11
Experimento de laboratorio.....	17
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIÓN.....	23
REFERENCIAS.....	23

RESUMEN

Actualmente el plástico es el residuo marino más común y ampliamente distribuido, y representa un gran problema de contaminación global. La presencia de microorganismos en su superficie es habitual y son colonizados por un conjunto variado de microorganismos procariontes y eucariontes. El término "plastisfera" se utiliza para hacer referencia a estas comunidades. También sirven como medio de transporte para bacterias que forman los biofilms, entre las cuales se pueden encontrar patógenos. También es el caso del género *Vibrio*, que engloba especies patógenas y que habitualmente forma biofilms. Por tanto, el plástico puede servir como un vector de enfermedades infecciosas. Esto puede tener impactos ecológicos importantes, porque tanto los patógenos como otras especies invasoras, pueden viajar a otros entornos y cambiar el ecosistema original.

El objetivo de este trabajo es cuantificar la carga microbiana total asociada a diferentes tipos de plásticos sumergidos en agua de mar, y determinar la presencia de *Vibrio*. Para ello se llevó a cabo un estudio descriptivo de la microbiota de varios plásticos mediante una serie de muestreos en la Playa de Ca'n Pastilla, desde enero hasta mayo. También se realizó un experimento de laboratorio para estudiar la adherencia de las bacterias marinas y de *Vibrio* a dos tipos de plástico y al vidrio durante dos semanas.

Aunque el plástico es comúnmente considerado como un material inerte, después de la exposición al medio marino puede interactuar con microorganismos, algunos de los cuales pueden ser patógenos. Los plásticos pueden llegar a contener gran cantidad y diversidad de bacterias, y aunque *Vibrio* se presenta en baja proporción, en la actualidad hay poca información disponible para evaluar si la presencia de patógenos en los residuos de plástico representa un riesgo real para la salud humana.

ABSTRACT

Nowadays the plastic is the most common and widely distributed marine waste, and represents a major problem of global pollution. The presence of microorganisms on the surface is common and they are colonized by a diverse set of prokaryotic and eukaryotic microorganisms. The term "plastisphere" is used to make reference to these communities. They also serve as a transport medium for bacteria that form biofilms, including pathogens. It is also the case of the genus *Vibrio*, which includes pathogenic species and usually form biofilms. Therefore, the plastic may serve as a vector of infectious diseases. This may have significant ecological impacts, because both pathogens and invasive species can travel to other environment and change the original ecosystem.

The aim of this study is to quantify the total microbial load and the presence of *Vibrio* associated to different types of plastics submerged in seawater. A descriptive study of the microbial community of plastics was conducted through surveys on the Ca'n Pastilla beach, from January to May. A laboratory experiment was also performed to study the adhesion of marine bacteria and *Vibrio* to two types of plastic and to glass in a two week period.

Although plastic is commonly known to be an inert material, after the exposure to marine environment it can establish interact with microorganisms, some of which may be pathogenic. Plastics may contain large number and diversity of bacteria, and although the presence of *Vibrio* is low, there is little information available to assess whether the presence of pathogens in plastic waste involve a real risk to human health.

INTRODUCCIÓN

Plásticos y microplásticos

La palabra plástico es un término genérico que hace referencia a los polímeros fabricados por el hombre. La cadena principal molecular de un polímero plástico está formada por hidrocarburos a los que se les añaden aditivos para conferir propiedades concretas. Actualmente vivimos en un "mundo de plástico" en el que casi todo lo que nos rodea está hecho de este material, y es difícil imaginar un mundo sin él. A pesar de las muchas ventajas del plástico, también supone una grave amenaza para el medio ambiente (1,2).

Hoy en día el plástico es el residuo marino más común y representa un gran problema de contaminación global. Los desechos plásticos se encuentran ampliamente distribuidos, tanto en el agua como en el sedimento marino. Se sabe que la mayoría de los plásticos permanecen en el medio ambiente durante décadas y se ha estimado que entre el 60% y 80% de la basura del mundo se encuentra en forma de plástico (3).

Los plásticos en el mar están sometidos a fragmentación, lo que lleva a la formación de partículas de plástico más pequeñas, conocidas como microplásticos. La formación de microplásticos en el océano depende de la combinación de los factores ambientales y las propiedades del polímero. Se consideran microplásticos las partículas con un tamaño comprendido entre 1 nm a 5 mm (4). Por tanto, los microplásticos probablemente son la forma más abundante de desechos plásticos en el medio marino.

La fuente de algunos microplásticos es terrestre, pueden provenir de algunos puntos como fábricas o ser directamente introducidos a través del uso de cosméticos o de aguas residuales domésticas. Otros provienen de la fragmentación o degradación de plásticos más grandes (5, 6). La mayoría de los plásticos entran en los océanos como resultado de la eliminación inadecuada de los residuos terrestres (7).

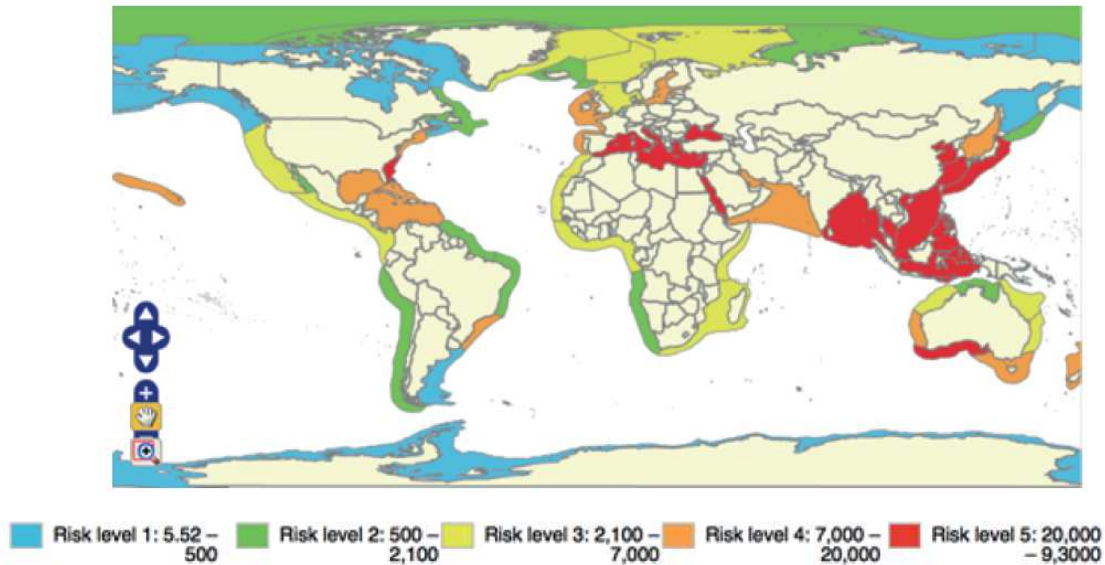
La distribución de los microplásticos depende de la localización de la fuente de entrada, además de procesos químicos, físicos y biológicos. También, como partículas que son, están sujetos a la mezcla por el viento y su distribución vertical es sensible al viento. Están muy extendidos y se han observado en zonas costeras, en océano abierto, en mares cerrados, y también en los lugares más remotos en concentraciones considerables, como resultado de haber sido transportados a larga distancia (4).

El Atlántico Norte, el Pacífico septentrional y el Mediterráneo son las regiones en las que se han realizado más estudios sobre la cantidad de plásticos en las aguas (4). Algunos datos procedentes de estos trabajos se resumen en la tabla 1. También, en la figura 1 está representada una estimación de la distribución de los microplásticos en las grandes masas de agua.

Tabla 1. Cuantificación de microplásticos en diferentes masas de agua. Fuente modificada: GESAMP (4).

Localización	Concentración	Referencia
Atlántico Noroeste	20,328 partículas/km ²	Law <i>et al.</i> 2010
Mar Mediterráneo	0.116 partículas/m ² 0.202 mg/m ²	Collignon <i>et al.</i> 2012
Mar Mediterráneo	0.94 partículas/m ³ 0.13 partículas/m ³	Fossi <i>et al.</i> 2012
Pacífico Noreste	156,800 piezas/km ²	Law <i>et al.</i> 2014
Australia	4256 piezas/km ²	Reisser <i>et al.</i> 2014

Figura 1. Estimación de la distribución de la abundancia relativa de microplásticos en grandes ecosistemas marinos. Fuente: GESAMP (4).



El mar Mediterráneo representa menos del 1% del área global de los océanos, pero tiene un gran valor ecológico y económico. Por esta razón, los impactos de la contaminación por plásticos son especialmente importantes (8). El Mar Mediterráneo es una zona con gran presencia de plásticos. Las mayores concentraciones de plásticos se encuentran en las zonas cercanas a los centros de población. Desde ahí, las corrientes transportan los plásticos flotantes, que se acumulan en zonas de convergencia en mar abierto. Pero en el caso del Mediterráneo, la variabilidad en la circulación impide la formación de zonas estables de acumulación (8).

La carga de plásticos se sitúa en entre 756 y 2,969 toneladas. Se ha determinado que la concentración de plástico en las aguas superficiales es de 423 g/km², lo que equivale a unos 243,853 artículos/km². Estos valores son comparables a las concentraciones de las zonas de acumulación de los giros oceánicos subtropicales. Por eso, la contaminación por plástico en el mar Mediterráneo es del mismo orden de magnitud que en giros subtropicales. Si se considera al Mediterráneo en el contexto global de la distribución de plásticos, se le reconoce como una región con una alta concentración de plásticos (8, 9).

Microbiota asociada

La presencia de microorganismos en los plásticos fue documentada por primera vez en 1972 (5). El *biofouling* de los plásticos flotantes es un proceso habitual que conduce a la formación de comunidades en su superficie. La superficie del plástico proporciona un sustrato para los microorganismos que dura mucho más tiempo que otros sustratos flotantes naturales. Funcionan como un arrecife microbiano artificial y pueden actuar como medio de transporte y de colonización, lo que permite que muchos organismos se dispersen ampliamente (10). Además, también pueden suministrar energía a la microbiota capaz de degradar estos polímeros (11). La formación de biofilms en la superficie es además importante en el proceso de degradación del plástico. Por un lado, algunos microorganismos pueden proteger al plástico de su degradación, aumentando su longevidad. Pero por otro lado, la presencia de microorganismos contribuye a la degradación física (si no química) de la superficie, además de la posibilidad de que algunos sean capaces de degradar el plástico, de manera que acelerarían el proceso (6).

Las comunidades microbianas presentes en los plásticos son diferentes de las del agua circundante. Por lo tanto, se dice que los desechos marinos de plástico conforman un hábitat microbiano distinto. En 2013 se llevó a cabo la primera caracterización de las comunidades microbianas presentes en los

plásticos y se acuñó el término "plastisfera", para hacer referencia a este hábitat microbiano característico (10). Se observó la presencia de una rica microbiota bacteriana y eucariótica y se encontraron diferentes tipos morfológicos cubriendo la superficie del plástico. La mayoría de los colonizadores de plástico son las especies bacterianas conocidas como formadoras de biopelículas habituales o que viven en asociación con organismos marinos (12).

Las muestras de plástico son colonizadas por un conjunto mixto de microorganismos procariotas y eucariotas de diversas morfologías. Las diatomeas y bacterias son los microorganismos más frecuentemente observados, aunque también hay presencia de invertebrados. El análisis de los genes 16S rRNA identifican las bacterias como pertenecientes a tres filos: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Cyanobacteria* (11, 12).

La formación del biofilm es un proceso dinámico y la composición taxonómica cambia con el tiempo. Las *Alfa* o *Gammaproteobacteria* son características de la colonización primaria y de la formación inicial del biofilm, mientras que *Bacteroidetes* destaca como colonizador secundario (5).

Las comunidades microbianas pueden variar según el tipo de sustrato, debido a que las propiedades fisicoquímicas del plástico pueden afectar al anclaje de las bacterias, pero también están influidos por la estación y la localización geográfica y parámetros medioambientales como la temperatura o la salinidad. No sólo el medio ambiente acuático marino puede dar forma a la comunidad, sino también la historia del transporte del plástico (5).

Vibrio pertenece a la clase *Gammaproteobacteria*, y es un género que comprende especies heterotróficas principalmente acuáticas, que se encuentran en una amplia variedad de ambientes acuáticos. En los ambientes acuáticos, muchas bacterias no permanecen como células individuales en forma planctónica, sino que forman biofilms sobre superficies, tanto bióticas como abióticas (13). También es el caso de *Vibrio*, por lo que es habitual encontrarla en asociación con eucariotas y también es posible encontrarla los plásticos. La formación de estas estructuras sobre la superficie de organismos marinos constituye una estrategia de supervivencia ante factores de estrés ambientales. En los biofilms pueden utilizar nutrientes que hayan quedado atrapados, resistir a los antibióticos, y establecer asociaciones con otras bacterias (14).

Los vibrios son bacterias Gram negativas, de un tamaño comprendido entre 0.5 – 0.8 µm y 1.4 – 2.6 µm, con uno o varios flagelos polares contenidos en una vaina. Tiene un metabolismo anaerobio facultativo, capaz de fermentar la D-glucosa (13). Todos crecen a temperaturas entre 18 – 22°C y requieren Na⁺. La distribución de la especie es dependiente de Na⁺ y del contenido de nutrientes del agua, así como de la temperatura (15).

Muchos vibrios son patógenos de animales o de humanos. Los organismos afectados por vibriosis en el ambiente marino incluyen peces, moluscos, crustáceos y corales (13). 12 especies de la familia *Vibrionaceae* están implicadas en enfermedades humanas, como diarrea e infecciones extraintestinales, pero *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y son los más importantes. Estas tres especies causan enfermedades severas que se transmiten a través del agua y los alimentos. (13, 14).

Riesgos

Actualmente hay preocupación por el impacto ecológico que los residuos de plástico producen sobre los organismos marinos. Mientras que los impactos físicos son bien reconocidos, la rápida proliferación de los microplásticos en ambientes marinos está llevando a una reevaluación de otros posibles efectos perjudiciales (16).

Entre los principales impactos, están la ingestión accidental, el enredamiento y la asfixia. Además de las obstrucciones gastrointestinales, y otros daños derivados de la ingestión (déficit nutricional), los plásticos ingeridos pueden contener altos niveles de compuestos tóxicos añadidos durante la fabricación (aditivos) o absorbidos del agua de mar (8). Estos compuestos químicos considerados como contaminantes pueden ser transportados, y pueden quedar libres en el agua a través de la

exposición a la luz solar, de manera que los organismos puedan ingerirlos (4, 8). Los contaminantes asociados a los plásticos, como pueden ser los POPs (*persistent organic pollutants*) son susceptibles a la bioacumulación. La ingestión selectiva de microplásticos y la posterior bioacumulación se ha demostrado en invertebrados situados en la base de la cadena alimentaria marina, y hay ciertas evidencias del transporte de estos fragmentos a niveles tróficos superiores (2, 12).

Se conocen más de 267 especies marinas afectadas por este tipo de contaminación: el 43% de los mamíferos marinos, el 86% de las tortugas marinas y el 44% de las aves marinas (1). Además, pueden alterar la biota pelágica y a los habitantes de los sedimentos mediante la modificación de las propiedades físicas de sus hábitats. Debido a su pequeño tamaño se incorporan y cambian las propiedades de los sedimentos marinos (6, 11).

También tienen la capacidad de modificar la estructura de las poblaciones con impactos en la dinámica de la población. Debido a que los plásticos persisten más que otros sustratos flotantes naturales (como plumas o madera), pueden atravesar distancias significativas y proporcionan vehículos para gran cantidad de especies como algas, briozoos, insectos e incluso macrobentos, pudiendo introducir especies invasoras (4, 5, 10). También sirve como medio de transporte para bacterias, incluyendo patógenos, que están asociadas al biofilm, de manera que pueden ser transportadas a medios en los que habitualmente no se encuentran, cambiando así sus rangos naturales. Esto puede tener impactos ecológicos importantes, porque tanto los patógenos como las especies invasoras, pueden viajar a otros entornos y cambiar el ecosistema original (5).

Así, el plástico puede servir como un vector de enfermedades infecciosas. Zettler *et al.* (9) sugieren que los fragmentos de plástico pueden servir como vector para la dispersión de agentes patógenos como es el caso de *Vibrio* spp. que se observó en las partículas de polipropileno en el Atlántico Norte (12).

La capacidad de los microorganismos para persistir sobre los desechos de plástico en las playas de cadena y la posibilidad de que algunos sean patógenos, convierte este tema en asunto de seguridad pública en zonas de baño (7). Algunos estudios epidemiológicos han informado de la relación entre la calidad de las aguas de baño y la aparición de infecciones (gastrointestinales, respiratorias, etc.). Con el potencial que presenta el plástico para la dispersión de patógenos, la evaluación de los plásticos acumulados en las playas proporcionaría información sobre la calidad de las aguas de baño (7).

El objetivo de este trabajo es cuantificar la carga microbiana total asociada a diferentes tipos de plásticos sumergidos en agua de mar, y determinar la presencia de *Vibrio* en las muestras. La hipótesis del trabajo es que la presencia en los plásticos de bacterias patógenas o asociadas a aguas residuales es más probable en un punto cercano a una zona de contaminación como puede ser un puerto deportivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio descriptivo de la microbiota asociada a varios plásticos sumergidos en agua de mar mediante una serie de muestreos en una zona escogida. Además, se realizó un experimento de laboratorio para estudiar la adherencia de las bacterias marinas y de un aislado de *Vibrio* concreto, a diferentes superficies en unas condiciones controladas.

Muestreos

La parte ambiental del trabajo consistió en un seguimiento de la Playa de Ca'n Pastilla, en el punto más cercano al puerto (Club Marítimo San Antonio de la Playa), situado en las coordenadas 39°32'1.13" N latitud, 2°43'0.47" E longitud (Google Earth, © 2016 Google).

El periodo de muestreo estuvo comprendido desde enero hasta mayo. La recogida de plásticos fue siempre a las 09:00h. Los días de muestreo se recogieron con una red los plásticos que se encontraban en el agua o la orilla y se introdujeron en vasos de precipitados de vidrio estériles.

También se recogió una muestra de agua, en una botella también estéril. El número de muestreos totales fue de 7, y en cada uno se recogieron entre dos y tres plásticos, dando un total de 17 muestras de plástico.

En el momento del muestreo, se tomó nota de las condiciones meteorológicas y de la temperatura del agua. Además, en la página web de la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) están disponibles los datos de las estaciones meteorológicas de Es Píllarí (estación más cercana al punto de muestreo) y el Puerto de Palma, que incluyen temperatura del aire, velocidad y dirección del viento, precipitación, presión y humedad. En los casos en los que la información de la estación de Es Píllarí no estaban disponibles, se tomaron los datos de la estación del Puerto de Palma.

Una vez en el laboratorio las muestras de plástico se procesaron. Se les retiraron todos los posibles restos de *Posidonia oceanica* que pudiera llevar adherido, así como la arena. Cada plástico se pesó y fotografió, y posteriormente se introdujo en tubos estériles. A cada tubo se le añadió agua marina estéril (Sigma – Aldrich Sea Salts). La cantidad de agua necesaria variaba en función de las características de cada muestra. Para conseguir separar las células de la superficie del plástico se aplicó vórtex durante 10 minutos.

Una vez extraídas las células, se utilizó el método de siembra en placa con asa de Digrafsky para posteriormente poder hacer recuento de colonias. Para la cuantificación de bacterias totales se utilizó agar marino (Agar Laboratorios Microkit - Caldo Marino Cultimed), mientras que para la cuantificación de *Vibrio* se utilizó el medio selectivo TCBS (BD Difco). La siembra en TCBS se realizó directamente de la mezcla de agua marina y bacterias. En cambio, para la siembra en agar marino se realizaron diluciones 1/10.

Para las muestras de agua de mar se sembraron 5 réplicas de la muestra directa en TCBS y 3 de la dilución 10^{-1} en agar marino. Para las muestras de plástico, se sembraron 3 réplicas en TCBS directamente de la mezcla de agua marina estéril y bacterias, mientras que en agar marino se sembraron las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , cada una con dos réplicas.

Las placas fueron incubadas a la temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 19°C). La lectura de resultados de las placas de TCBS, se realizó a las 24 h y 48 h de la siembra. En cambio, la lectura de agar marino se realizó a los 6 días. Una vez obtenido el número de colonias, se calculó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo en el caso de los plásticos, y por litro en el caso de las muestras de agua.

Para determinar cuál era el método más adecuado de procesar de las muestras de plástico, en el primer muestreo, se llevó a cabo un experimento piloto. Por una parte se aplicó vórtex durante 10 minutos a cada plástico para conseguir separar las células de la superficie. Por otra parte se centrifugó 1,5 ml de esta mezcla de agua marina, durante 10 minutos a 13000 rpm (Centrífuga Biofuge 13 Heraeus Sepatech), para descartar el sobrenadante y utilizar el concentrado de bacterias. Debido a que los resultados del número de colonias en placa fueron similares al obtenido con el otro procedimiento, se decidió que en los siguientes muestreos se procedería de la manera descrita anteriormente.

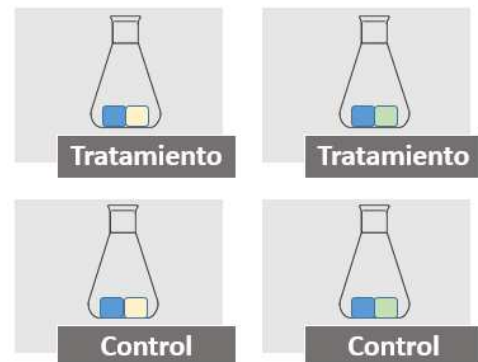
Experimento de laboratorio

Para observar la adherencia de las bacterias marinas y de *Vibrio* al plástico, en unas condiciones controladas de tiempo de permanencia en el agua, tipo de plástico y temperatura ambiente, se llevó a cabo un experimento de laboratorio. En él se evaluaron dos tipos de plástico y como referencia un cubreobjetos de vidrio. Los plásticos utilizados fueron una bolsa de polietileno de alta densidad (HDPE), y un vaso de polipropileno (PP).

Este experimento se diseñó en base al estudio de Lobelle y Cunliffe (17). Consistía en 8 Erlenmeyers en agitación ligera (110 rpm), cada uno con 250 ml de agua de mar. El agua utilizada se recogió el día en que se inició el experimento (28.04.16) y se filtró a través de un filtro de 5 μm para eliminar materia particulada y eucariotas de mayor tamaño. En todos los recipientes se pusieron 2

ubreobjetos y 2 cuadrados de plástico (del mismo tamaño y forma que los cubreobjetos). Para cada plástico hubo un tratamiento y un control, y de cada uno había dos réplicas. Los controles contenían únicamente el agua de mar filtrada, mientras que el tratamiento consistía en la adición de 10^2 UFC/L de *Vibrio* sp. I26. En la figura 2 se representa la disposición de los Erlenmeyers.

Figura 2. Distribución de tratamientos y plásticos del experimento. El cuadrado verde representa el vaso de polipropileno (PP). El cuadrado blanco representa la bolsa de polietileno de alta densidad (HDPE). El cuadrado azul representa el cubreobjetos de vidrio.



El tratamiento se estableció de esta manera en base a lo observado en los muestreos. Los resultados de la cuantificación del agua de mar indicaban que el número de bacterias viables totales era del orden de 10^4 y el número de viables de *Vibrio* era del orden de 10^2 . Por tanto, se decidió que hubiera un número igual de *Vibrio* que de viables totales.

Para determinar qué volumen de un cultivo de *Vibrio* sp. I26 era necesario añadir a cada recipiente de tratamiento a fin de conseguir el número de bacterias deseado, se realizó una curva de crecimiento. *Vibrio* sp. I26 es un aislado que forma parte de la colección del Laboratorio de Microbiología de la UIB. La cepa tipo más cercana es *Vibrio natriegens*^T, con la que comparte un 99,9% de similitud en el gen 16S RNA ribosómico. *Vibrio natriegens*^T pertenece al clado de *Vibrio harveyi* (18).

La curva de crecimiento de este aislado se realizó en caldo marino. A partir de un cultivo puro en placa (agar marino) se hizo una suspensión. El inóculo fue 7/400 a partir de la suspensión. Se tomó la densidad óptica a 600nm a tiempo inicial y se incubó a 30°C. Cada media hora se tomó la densidad óptica. Cuando el cultivo alcanzó a una densidad óptica de 0,2, las medidas se realizaron cada 15 minutos. Se sembraron en agar marino, mediante el uso del asa de Digralsky, las siguientes diluciones 1/10:

- Directa, 10^{-1} y 10^{-2} a densidad óptica 0,2.
- 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} a densidad óptica 0,6.
- 10^{-2} , 10^{-3} , y 10^{-4} a densidad óptica 0,8.

Las placas se incubaron a 30°C durante 24 horas. Según los resultados se determinó que a una densidad óptica de 0,2 en el cultivo había entre $1,6 \times 10^5 - 2 \times 10^5$ UFC/ml. Para conseguir añadir 10^2 células a cada Erlenmeyer de tratamiento, el día del inicio del experimento se preparó un cultivo en caldo marino de las mismas características que el que se utilizó para la curva de crecimiento. Una vez que alcanzó una densidad óptica de 0,2 se realizó un banco de diluciones 1/10 hasta la dilución 10^{-3} . De esta manera se obtuvo una concentración de 10^2 bacterias. Se añadieron 250 μ l de esta dilución a cada Erlenmeyer de tratamiento.

Una vez llenados los recipientes con el tipo de agua correspondiente, se hizo una siembra en agar marino y TCBS del agua de cada Erlenmeyer, también con asa de Digralsky, para tener los valores de bacterias totales y *Vibrio* a tiempo inicial. Al igual que en los muestreos, la siembra en TCBS fue de la muestra directa de agua y para agar marino se realizó una dilución 1/10. Se sembraron dos réplicas de cada recipiente y para cada medio de cultivo.

Los plásticos utilizados se recortaron de un tamaño similar a los cubreobjetos (2 cm x 2 cm). Todas las muestras fueron pesadas en una balanza analítica. El rango de pesos de los cubreobjetos fue de 0.143 g – 0.147 g; el de polipropileno fue de 0.056 g – 0.072 g y el peso de los fragmentos de polietileno de alta densidad fue alrededor de 0.007 g. Todos ellos, una vez pesados, se esterilizaron

en etanol 70% durante 20 minutos, seguido de dos pasos de inmersión en agua MilliQ de 30 minutos cada uno.

Después de 7 días se extrajo un plástico y un cubreobjetos y se tomó una muestra del agua (T_7). A la semana siguiente (14 días) se repitió el proceso (T_{14}), de manera que hubo dos tiempos de muestreo, además del inicial (T_0).

El procedimiento de separación de células de las superficies fue el mismo utilizado en los muestreos. Se introdujo el cubreobjetos o plástico en un tubo estéril y se le añadió 2 ml de agua marina estéril (siempre el mismo volumen, para todas las muestras). A continuación, se aplicó vórtex durante 5 minutos a cada superficie y la solución de agua marina y bacterias fue la que se utilizó para las siembras. La siembra en placa fue de la misma manera en el tiempo y después de 7 días. En cambio, en la segunda semana, hubo modificaciones en las diluciones en base al resultado obtenido en la primera. De todas las siembras en agar marino, se hizo una dilución más respecto a la anterior (dilución 10^{-2}), y en el caso del polipropileno se hizo una dilución 1/10 para sembrar en TCBS.

De la misma manera que en los muestreos, las placas fueron incubadas a la temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 19°C). El recuento del número de colonias de las placas de TCBS, se realizó a las 24 h y 48 h, y en las de agar marino se realizó a los 6 días. Se calculó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por 250 ml de agua y por superficie (4 cm^2 en ambas caras) en el caso de los cubreobjetos y los plásticos.

RESULTADOS

En este trabajo no se ha realizado ningún análisis estadístico debido al reducido número de réplicas, de manera que no se ha podido comprobar si los resultados son significativos.

Muestreos

Desde el inicio de los muestreos en febrero, hasta el final, en abril, transcurrieron 55 días. En la tabla 2 están recogidas las fechas de los muestreos, así como los datos meteorológicos. El paso del tiempo va acompañado de una subida de la temperatura del mar. Se aprecian dos bloques de temperatura, el de temperaturas más frías ($14 - 15^{\circ}\text{C}$) y el de temperaturas más cálidas ($16 - 17^{\circ}\text{C}$). El primer bloque está comprendido entre el 2 de febrero y el 2 de marzo (primer muestreo), mientras que el segundo bloque empieza el 12 de abril. En el periodo entre principios de marzo y principios de abril no se realizaron muestreos. Es posible que en ese espacio de tiempo las temperaturas hubieran sido intermedias, de manera que los datos de la temperatura del mar serían más graduales.

Tabla 2. Resumen datos meteorológicos. Temperatura del agua a la hora del muestreo ($^{\circ}\text{C}$). Temperatura del aire a la hora del muestreo ($^{\circ}\text{C}$). Esta temperatura pertenece a la estación del Puerto de Palma (estación del Pilarí no disponible). Precipitación promedio de los tres días anteriores al muestreo (mm). Dirección del viento a la hora del muestreo. Intensidad del viento a la hora del muestreo (km/h). Fuente de los datos: © AEMET.

Fecha	Tiempo (días)	T agua $^{\circ}\text{C}$	T aire $^{\circ}\text{C}$	Precipitación promedio (mm)	Dirección viento	Intensidad viento (km/h)
02.02.16	0	15,5	10,7	0	Sudeste	5
11.02.16	9	15,1	14,0	0	Noroeste	2
23.02.16	21	14,0	13,0	0,1	Sudoeste	7
02.03.16	29	14,5	14,7	0,3	Sudoeste	5
12.04.16	41	17,0	15,5	0,03	Calma	0
19.04.16	48	16,0	15,8	0,06	Nordeste	13
26.04.16	55	17,5	16,7	0,1	Noroeste	3

Un factor a tener en cuenta es que el método de siembra en placa utilizado conlleva una cierta limitación ya que la muestra debe tener un número mínimo de bacterias. Si el número está por debajo de ese mínimo, no se pueden detectar. Además, probablemente se subestima la población total debido a las células viables no cultivables. El caso de *Vibrio*, el medio selectivo (TCBS) se ha utilizado ampliamente y proporciona un enfoque estándar para la comparación con otros estudios. (19).

El valor que se obtiene a partir de los cálculos de unidades formadoras de colonias es el de bacterias viables. De aquí en adelante, cuando se haga referencia a bacterias totales y *Vibrio*, se tratará del número de viables. Debido a que hay varios órdenes de magnitud de diferencia entre los resultados de *Vibrio* y de bacterias totales, se han utilizado los logaritmos de esos valores para las representaciones gráficas. En las figuras 3 y 4 está representada la progresión del número de UFC/L en el agua a lo largo del tiempo y en relación a la temperatura, respectivamente.

Figura 3: Número de viables totales y vibrios del agua (promedio de las réplicas) con el paso del tiempo (en días) desde el inicio de los muestreos.

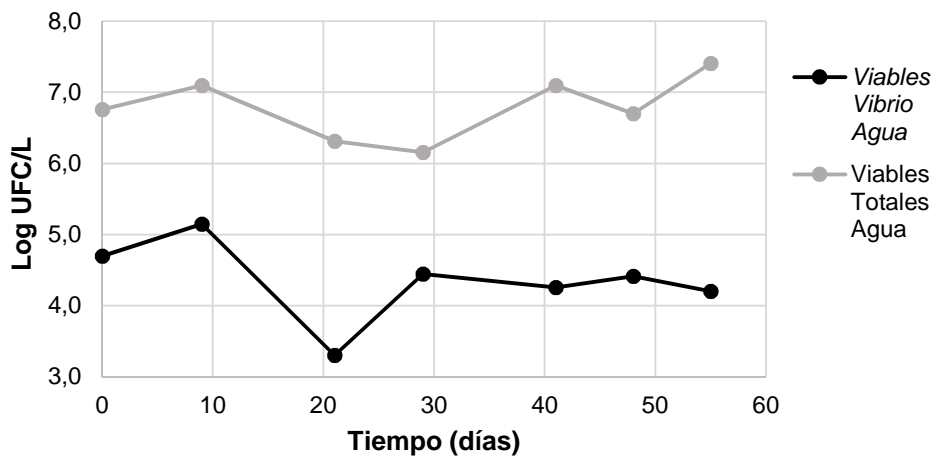
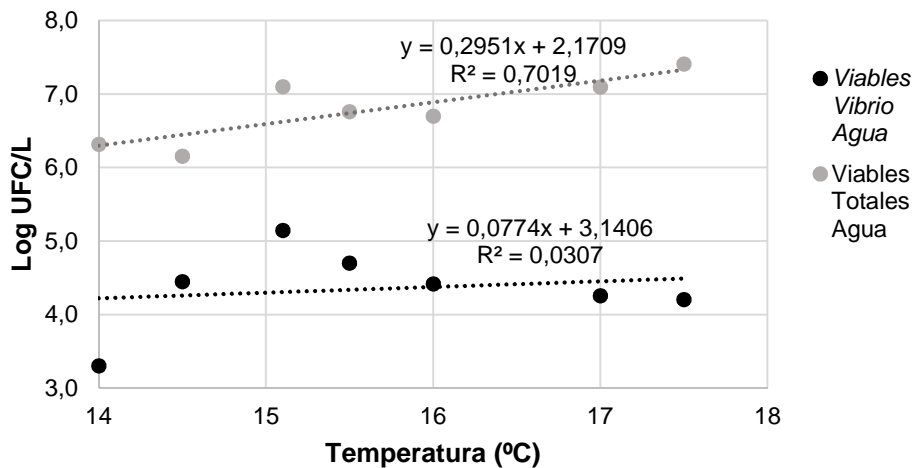


Figura 4. Número de viables totales y vibrios del agua (promedio de las réplicas) en relación al aumento de temperatura ocurrido desde el inicio de los muestreos.



Los resultados obtenidos a partir de las muestras de agua de mar y de los plásticos a lo largo de todos los muestreos, están recogidos en la tabla 3. En el agua, la mediana de viables de *Vibrio* es $2,6 \times 10^4$ UFC/L ($1,6 \times 10^4$ - $1,4 \times 10^5$ UFC/L) y la de viables totales es $5,75 \times 10^6$ UFC/L ($1,43 \times 10^6$ - $2,56 \times 10^7$ UFC/L). En los plásticos, la mediana de viables de *Vibrio* es $2,4 \times 10^2$ UFC/g ($6,54 \times 10^1$ - $7,12 \times 10^3$ UFC/g) y la de viables totales es $4,93 \times 10^5$ UFC/g ($1,34 \times 10^4$ - $3,08 \times 10^6$ UFC/g). También se incluyen en la tabla los porcentajes calculados para determinar la presencia de *Vibrio* entre las

bacterias totales y la cantidad de bacterias que retienen los plásticos respecto a la cantidad presente en el agua de mar.

En determinados casos no se obtuvo el valor de *Vibrio* (número en la muestra inferior al detectable). Los datos de bacterias totales de los plásticos pertenecientes al experimento piloto no están disponibles debido a que se sembró la dilución incorrecta. Como consecuencia, algunas proporciones no se han podido calcular. Todos estos resultados se encuentran representados juntos en la figura 5. En las figuras 6 y 7 se encuentran separados, las muestras de agua y las de plástico, respectivamente.

Figura 5: Cantidad de viables de *Vibrio* y viables totales presentes en las muestras de agua y de plástico. Se utilizan los promedios de las réplicas para representar las medianas. Los valores de UFC/L y UFC/g se presentan en forma de logaritmos.

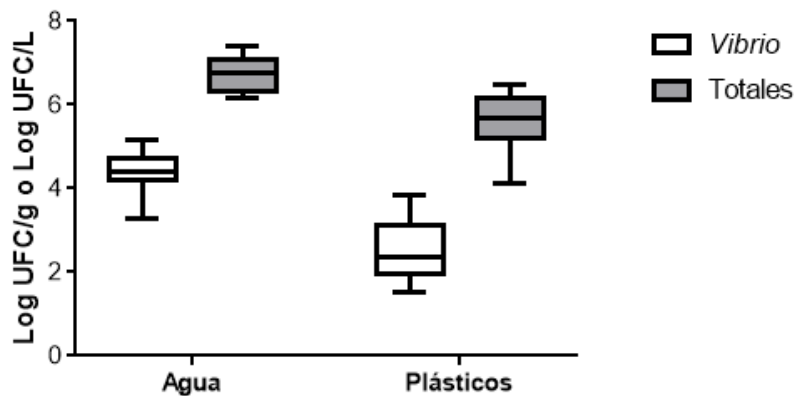


Figura 6. Cantidad de bacterias totales y vibrios presentes en el agua de mar. Se utilizan los valores de las réplicas para representar los promedios y la desviación estándar. Los valores de UFC/L se presentan en forma de logaritmos.

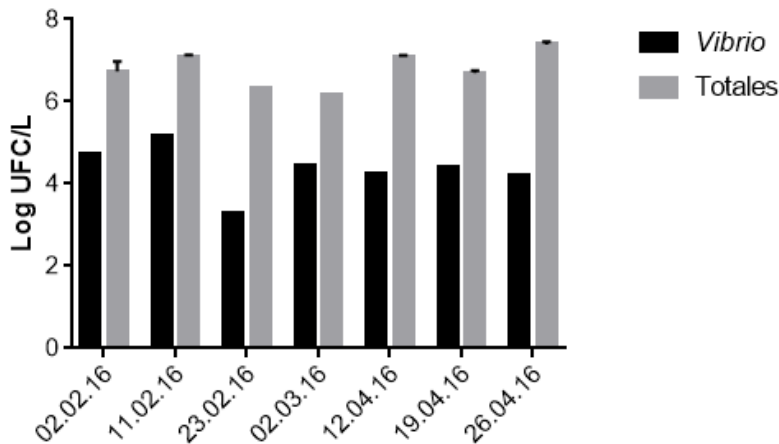


Tabla 3: Resumen de los valores promedio de UFC/L de agua, UFC/g de plástico, porcentajes de presencia de *Vibrio* y porcentajes de bacterias en los plásticos. Se indica la composición del plástico en la segunda columna: polietileno tereftalato (PET), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS). Los resultados de *Vibrio* solo tienen una réplica (se sumaron el número de colonias por placa y los volúmenes sembrados de las réplicas cuando el resultado fue menor de 30 colonias).

Muestreo	Número y tipo de plástico	<i>Vibrio</i> UFC/L agua	<i>Vibrio</i> UFC/g plástico	Promedio Totales agua UFC/L	SD Totales agua UFC/L	Promedio Totales UFC/g plástico	SD Totales UFC/g plástico	% <i>Vibrio</i> (agua)	% <i>Vibrio</i> (plástico)	% Totales (plástico respecto a agua)	% <i>Vibrio</i> (plástico respecto a agua)
02.02.16	1 (PS)	5 x 10 ⁴		5,75 x 10 ⁶	3,04 x 10 ⁶	1,34 x 10 ⁴ ^c	4,77 x 10 ³	0,87	N.D.	0,23	N.D.
02.02.16	2 (N.I.)	5 x 10 ⁴	1,52 x 10 ³	5,75 x 10 ⁶	3,04 x 10 ⁶	N.D.	N.D.	0,87	N.D.	N.D.	3,04
02.02.16	3 (PP)	5 x 10 ⁴	1,2 x 10 ²	5,75 x 10 ⁶	3,04 x 10 ⁶	N.D.	N.D.	0,87	N.D.	N.D.	0,24
11.02.16	4 (PE)	1,4 x 10 ⁵ ^a	N.D.	1,26 x 10 ⁷	7,78 x 10 ⁵	3,08 x 10 ⁶	1,01 x 10 ⁵	1,12	N.D.	24,58	N.D.
11.02.16	5 (PET)	1,4 x 10 ⁵ ^a	N.D.	1,26 x 10 ⁷	7,78 x 10 ⁵	1,61 x 10 ⁵	2,75 x 10 ⁴	1,12	N.D.	1,28	N.D.
23.02.16	6 (PE)	2 x 10 ³	1,3 x 10 ²	2,07 x 10 ⁶	N.D.	4,93 x 10 ⁵	1,59 x 10 ⁵	0,10	0,026	23,84	6,50
23.02.16	7 (PE)	2 x 10 ³	2,4 x 10 ²	2,07 x 10 ⁶	N.D.	1,97 x 10 ⁶	9,33 x 10 ⁴	0,10	0,012	95,52	12,00
02.03.16	8 (PET)	2,8 x 10 ⁴	N.D.	1,43 x 10 ⁶	N.D.	3 x 10 ⁴	2,43 x 10 ⁴	1,95	N.D.	2,09	N.D.
02.03.16	9 (PE)	2,8 x 10 ⁴	N.D.	1,43 x 10 ⁶	N.D.	1,54 x 10 ⁵	1,06 x 10 ⁵	1,95	N.D.	10,73	N.D.
02.03.16	10 (N.I.)	2,8 x 10 ⁴	N.D.	1,43 x 10 ⁶	N.D.	1,74 x 10 ⁵	2,09 x 10 ⁴	1,95	N.D.	12,12	N.D.
12.04.16	11 (N.I.)	1,8 x 10 ⁴	1,21 x 10 ³	1,25 x 10 ⁷	9,17 x 10 ⁵	1,47 x 10 ⁶	9,67 x 10 ⁵	0,14	0,083	11,73	6,75
12.04.16	12 (N.I.)	1,8 x 10 ⁴	6,75 x 10 ²	1,25 x 10 ⁷	9,17 x 10 ⁵	1,25 x 10 ⁶	1,91 x 10 ⁵	0,14	0,054	9,96	3,75
12.04.16	13 (PE)	1,8 x 10 ⁴	N.D.	1,25 x 10 ⁷	9,17 x 10 ⁵	1,13 x 10 ⁶	4,60 x 10 ⁵	0,14	N.D.	9,05	N.D.
19.04.16	14 (N.I.)	2,6 x 10 ⁴	6,54 x 10 ¹	5 x 10 ⁶	6,24 x 10 ⁵	1,31 x 10 ⁶	0	0,52	0,005	26,27	0,25
19.04.16	15 (N.I.)	2,6 x 10 ⁴	N.D.	5 x 10 ⁶	6,24 x 10 ⁵	4,35 x 10 ⁴	4,95 x 10 ³	0,52	N.D.	0,87	N.D.
26.04.16	16 (N.I.)	1,6 x 10 ⁴	3,33 x 10 ¹ ^a	2,56 x 10 ⁷	1,35 x 10 ⁶	2,70 x 10 ⁵	4,70 x 10 ⁴	0,06	0,012	1,05	0,21
26.04.16	17 (N.I.)	1,6 x 10 ⁴	7,12 x 10 ³ ^{a, b}	2,56 x 10 ⁷	1,35 x 10 ⁶	3,08 x 10 ⁶	2,04 x 10 ⁴	0,06	0,231	12,04	44,47

^a El recuento de colonias se realizó a las 72 h, no a las 48 h.

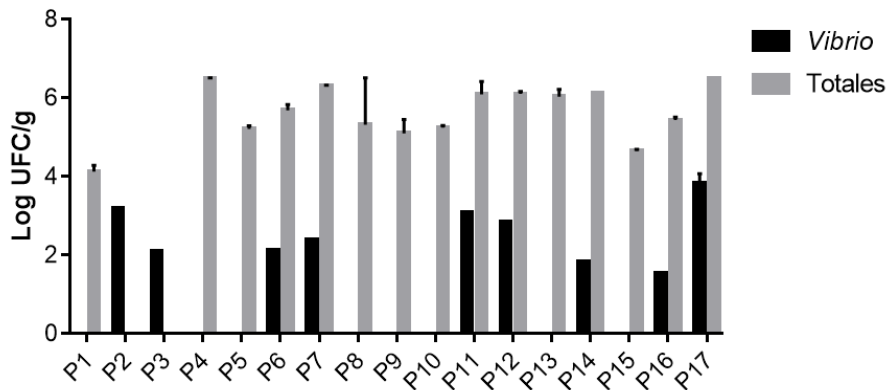
^b Promedio de las réplicas (SD 3,38 x 10³).

^c Error metodológico.

N.D.: No determinado.

N.I.: No identificado.

Figura 7. Representación de la cantidad de viables totales y de *Vibrio* presentes en los plásticos. Se utilizan los valores de las réplicas para representar los promedios y la desviación estándar. Los valores de UFC/g se presentan en forma de logaritmos.



En las figuras se 8 y 9 están representados los vibrios y las bacterias totales, tanto de las muestras de agua como las de plástico, para determinar la existencia de relaciones lineales entre los resultados. Se observa la relación lineal en las muestras de plástico pero no en las de agua.

Figura 8. Número de vibrios respecto al número total de bacterias de las muestras de agua. Se han utilizado los promedios de las réplicas. Se ha descartado el segundo muestreo (11.02.16) debido a que el valor de *Vibrio* era elevado y la lectura de las placas se realizó fuera del tiempo acordado (72 h en lugar de 48 h).

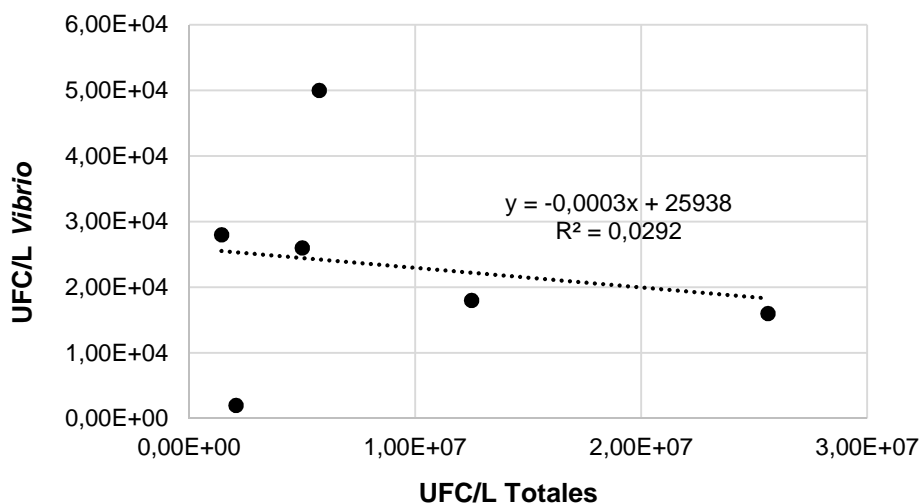
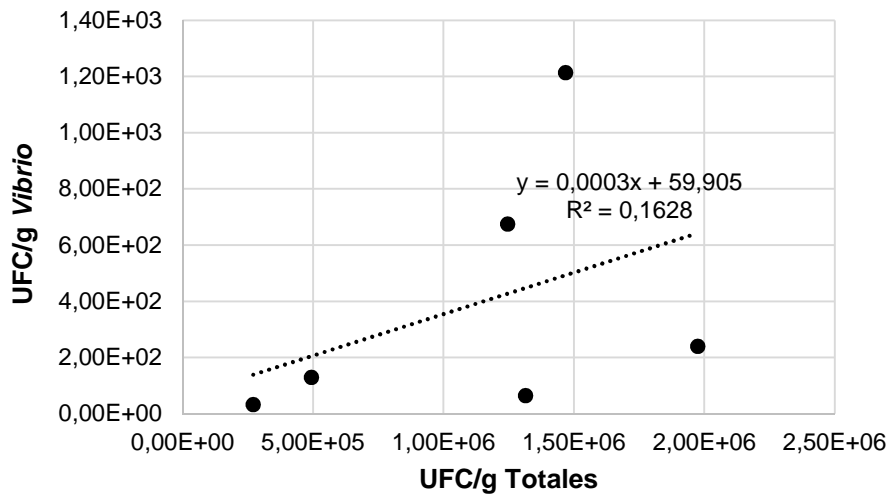


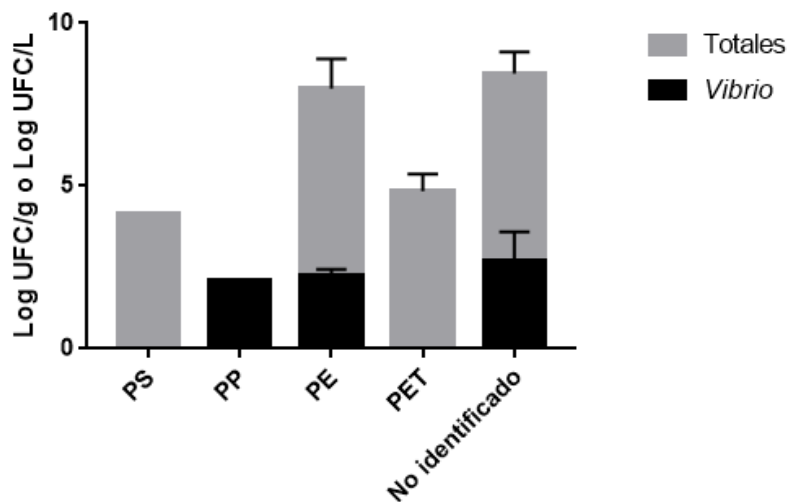
Figura 9. Número de vibrios respecto al número total de bacterias de las muestras de plástico. Se han utilizado los promedios de las réplicas. Se incluyen los plásticos de los que se obtuvieron resultados de *Vibrio*. Se ha descartado el plástico 17 (26.04.16) debido a que el valor de *Vibrio* era elevado y la lectura de las placas se realizó fuera del tiempo acordado (72 h en lugar de 48 h).



Gracias al código SPI se ha podido averiguar la composición de algunos de los plásticos encontrados. La mayoría de los envases de plástico se fabrican con una de las seis resinas: polietileno tereftalato (PET); polietileno de alta densidad (HDPE); cloruro de polivinilo (PVC o vinilo); polietileno de baja densidad (LDPE); polipropileno (PP); o poliestireno (PS). El código de identificación de resina asigna cada una de estas resinas un número, del 1 al 6 (Society of the Plastics Industry). También hay un séptimo código identificado como "otros".

De los 17 plásticos recogidos a lo largo del trabajo, uno era de poliestireno, uno de polipropileno, 5 de polietileno y 2 de polietileno tereftalato. Los 8 restantes no pudieron ser identificados. En la figura 11 se representan los resultados obtenidos de cada tipo de plástico.

Figura 11: Representación de la cantidad de viables totales y de *Vibrio* en cada tipo de plástico. Se utiliza los promedios de las réplicas y se representan las medias de los plásticos del mismo tipo. No se obtuvieron datos de *Vibrio* en PS y PET, y de totales en PP.



Experimento de laboratorio

En las tablas 4 y 5 se recogen los resultados del experimento en los diferentes tiempos, y en la figura 12 están representados. También se incluyen en las tablas los porcentajes calculados para determinar la presencia de *Vibrio* entre las bacterias totales.

Tabla 4. Resumen de los valores promedio de UFC/250 ml de agua, UFC/cm² de polipropileno (PP), UFC/cm² de vidrio (teniendo en cuenta las dos caras de cada superficie) y porcentaje de vibrios respecto a bacterias totales.

		Agua		PP		Vidrio	
		T ₇	T ₁₄	T ₇	T ₁₄	T ₇	T ₁₄
Control	Vibrio UFC/250 ml o UFC/cm ²	7,38 x 10 ⁴	2,5 x 10 ³	1,32 x 10 ⁴	N.D.	7,32 x 10 ³	4,8 x 10 ²
	SD	4,16 x 10 ⁴	N.D.	5,43 x 10 ³	N.D.	5,06 x 10 ³	3,86 x 10 ²
	Totales UFC/250 ml o UFC/cm ²	5,46 x 10 ⁶	3,44 x 10 ⁶	1,93 x 10 ⁵	1,84 x 10 ⁵	1,11 x 10 ⁵	6,2 x 10 ⁴
	SD	2,07 x 10 ⁶	7,47 x 10 ⁵	5,66 x 10 ²	2,26 x 10 ⁴	2,43 x 10 ⁴	5,36 x 10 ⁴
	% <i>Vibrio</i>	1,35	0,07	6,83	N.D.	6,58	0,77
Tratamiento	Vibrio UFC/250 ml o UFC/cm ²	5,67 x 10 ⁴	N.D.	3,46 x 10 ⁴	N.D.	1,05 x 10 ⁴	1,72 x 10 ³
	SD	3,25 x 10 ⁴	N.D.	1,92 x 10 ⁴	N.D.	5,78 x 10 ³	2,83 x 10 ²
	Totales UFC/250 ml o UFC/cm ²	7,44 x 10 ⁶	2,19 x 10 ⁷	2,01 x 10 ⁵	6,98 x 10 ⁵	1,72 x 10 ⁵	3,24 x 10 ⁵
	SD	4,62 x 10 ⁶	1,85 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁴	6,87 x 10 ⁵	3,57 x 10 ⁴	2,71 x 10 ⁵
	% <i>Vibrio</i>	0,76	N.D.	17,23	N.D.	6,08	0,53

N.D.: No determinado.

Tabla 5. Resumen de los valores promedio de UFC/250 ml de agua, UFC/cm² de polietileno de alta densidad (HDPE), UFC/cm² de vidrio (teniendo en cuenta las dos caras de cada superficie) y porcentaje de vibrios respecto a bacterias totales.

		Agua		HDPE		Vidrio	
		T ₇	T ₁₄	T ₇	T ₁₄	T ₇	T ₁₄
Control	Vibrio UFC/250 ml o UFC/cm ²	2,25 x 10 ⁴	1,06 x 10 ⁴	8,2 x 10 ²	2,88 x 10 ³	5,74 x 10 ³	9,2 x 10 ²
	SD	1,93 x 10 ⁴	1,93 x 10 ⁴	1,11 x 10 ³	3,18 x 10 ³	3,65 x 10 ³	6,87 x 10 ²
	Totales UFC/250 ml o UFC/cm ²	3,92 x 10 ⁶	1 x 10 ⁷	1,66 x 10 ⁵	5,48 x 10 ⁵	5,64 x 10 ⁴	3,26 x 10 ⁵
	SD	1,9 x 10 ⁶	2,35 x 10 ⁶	4,63 x 10 ⁴	5,25 x 10 ⁵	1,58 x 10 ⁵	1,16 x 10 ⁵
	% <i>Vibrio</i>	0,57	0,11	0,49	0,53	10,18	0,28
Tratamiento	Vibrio UFC/250 ml o UFC/cm ²	3,69 x 10 ⁴	4,75 x 10 ⁴	3,73 x 10 ²	7,2 x 10 ²	1,18 x 10 ³	9,6 x 10 ²
	SD	2,86 x 10 ⁴	5,73 x 10 ⁴	1,67 x 10 ²	7,42 x 10 ²	1,28 x 10 ³	5,66 x 10 ²
	Totales UFC/250 ml o UFC/cm ²	6,07 x 10 ⁶	3,35 x 10 ⁷	1,91 x 10 ⁵	7,14 x 10 ⁵	7,84 x 10 ⁴	6,1 x 10 ⁵
	SD	6,95 x 10 ⁵	5,37 x 10 ⁶	2,37 x 10 ⁴	5,21 x 10 ⁵	2,42 x 10 ⁴	2,79 x 10 ⁵
	% <i>Vibrio</i>	0,61	0,14	0,2	0,1	1,51	0,16

En el tiempo inicial (n = 8) el número de bacterias totales del agua fue de $7,33 \times 10^5$ UFC/250 ml (SD $1,18 \times 10^5$ UFC/250 ml), el de *Vibrio* fue de $6,56 \times 10^3$ UFC/250 ml (SD $3,09 \times 10^3$ UFC/250 ml), y un 0,9% de las bacterias totales eran vibrios. Debido a un error experimental, solo hubo una réplica del control de polipropileno, y en algunos casos faltan datos debido a la ausencia de colonias en placa.

Un factor a tener en cuenta en este experimento es que además de las dos superficies utilizadas, las bacterias también pueden adherirse al Erlenmeyer, que tiene una superficie de 170,43 cm² disponible (área calculada con la fórmula de un cono truncado).

Una manera de determinar si los vibrios observados en los plásticos se corresponden con el aislado utilizado en el experimento sería el uso de técnicas moleculares (PCR). Se aislaron diferentes colonias de las placas TCBS, pero a cause de la falta de tiempo no se ha pudo realizar la identificación. Sin embargo, se puede suponer que algunas de las colonias eran *Vibrio* sp. I26, según su aspecto.

El medio de cultivo TCBS es utilizado ampliamente para el aislamiento selectivo de los vibrios. Las bacterias Gram positivas se ven inhibidas por la presencia de sales biliares. Además, el pH del medio es alcalino, lo que favorece este género. El tiosulfato de sodio sirve como una fuente de azufre y, en combinación con citrato férrico, detecta la producción de sulfuro de hidrógeno. La sacarosa se incluye como un hidrato de carbono fermentable. El azul de timol y azul de bromotimol se incluyen como indicadores de los cambios de pH. Cuando se forma ácido, el medio cambia de color verde a amarillo y los vibrios que son capaces de utilizar sacarosa forman colonias de color amarillo, mientras que los otros aparecen de color verde (20). Las colonias del *Vibrio* sp. I26 eran amarillas y acidificaban el medio (figura 12), y muchas de las colonias observadas en las superficies utilizadas en el experimento, eran también de estas características.

Figura 12. Comparación cultivos de *Vibrio*. a: cultivo de *Vibrio* sp. I26. b: cultivo de una colonia aislada de un cubreobjetos utilizado en el experimento.

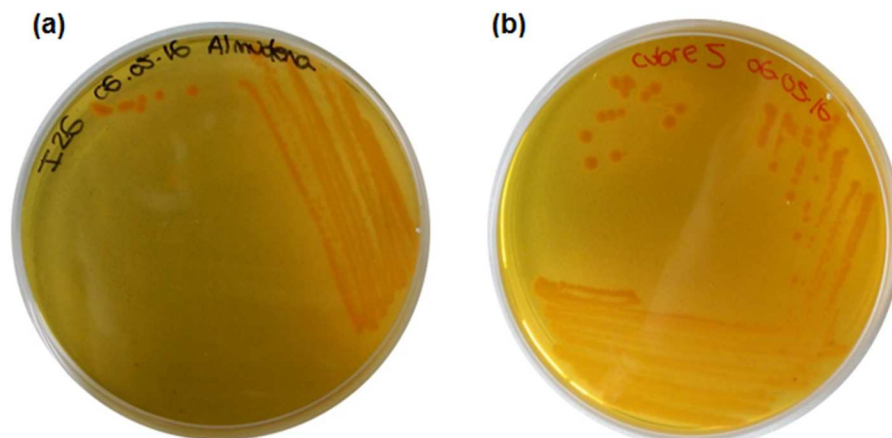
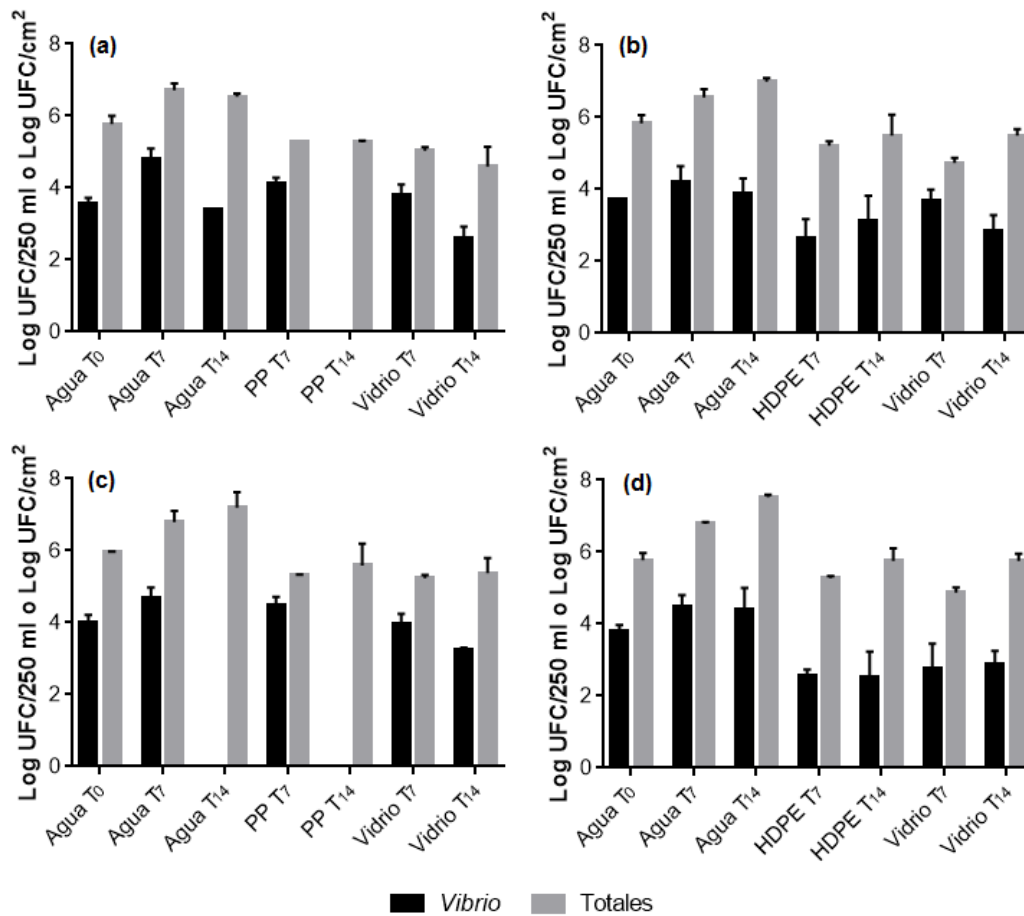


Figura 13. Viables totales y de *Vibrio* en T_0 (inicial), T_7 (una semana), T_{14} (dos semanas). Se representan los logaritmos de UFC/250 ml de agua, UFC/cm² de PP o HDPE, y UFC/cm² de vidrio (promedios de las réplicas). a: control PP. b: control HDPE. c: tratamiento PP. d: tratamiento HDPE.



DISCUSIÓN

A lo largo de los muestreos, el número de bacterias totales y de vibrios del agua ha ido variando (figura 3). El paso del tiempo va acompañado del aumento de la temperatura del mar. La temperatura es un factor de crecimiento bacteriano (21), a medida que se incrementa, se aceleran las reacciones químicas y enzimáticas, de manera que el crecimiento es más rápido. Por eso, el aumento de la temperatura del mar supone un incremento en el número de bacterias.

Al igual que el resto de bacterias marinas, la abundancia *Vibrio* está relacionada con la temperatura, la salinidad y la concentración de materia orgánica (22), pero las dos variables que a menudo explican la mayor variación de su abundancia en la columna de agua son las dos primeras. En comparación con estos dos factores, otras medidas ambientales como la cantidad de fosfato, el nivel pH o la turbidez explican menos variación. Unos pocos estudios han modelado la relación de las dos variables principales, encontrando que el total de *Vibrio* aumenta a medida que lo hace la temperatura y la salinidad (23).

Según la biología de *Vibrio*, el requerimiento de temperatura para un crecimiento óptimo es de 18 – 22°C (15). Por tanto, se esperaba observar una relación lineal con la temperatura (figura 4), lo que indicaría que el número de bacterias ha aumentado a la vez que ha subido la temperatura del mar. Sin embargo, esta progresión solo ocurre con las bacterias totales. Es probable que en los muestreos

siguientes, a partir de mayo, cuando la temperatura del mar se haya elevado hasta el rango de temperaturas anterior, hubiéramos llegado a ver esta relación lineal también en *Vibrio*.

La abundancia de *Vibrio* observada en las muestras de agua se sitúa en torno a $2,6 \times 10^4$ UFC/L, mientras que la de bacterias totales está alrededor de $5,75 \times 10^6$ UFC/L (tabla 3). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios. Por ejemplo, en el trabajo de Vezzulli *et al.* (22), el número de UFC/L de *Vibrio* spp. en la columna de agua variaba entre 1×10^1 y $3,4 \times 10^4$ (resultados basados en la técnica del número más probable combinada con PCR). También se ha determinado que la abundancia de *Vibrio* está por lo general alrededor de $10^3 - 10^4$ células/ml (23). Respecto a la abundancia de bacterias totales, según Siokou-Frangou *et al.* en el mar que rodea las Islas Baleares, es del orden de 10^8 cél/L (24).

El porcentaje que representa *Vibrio* del total de bacterias es muy bajo, no alcanza el 2% (tabla 3). Los miembros de este género están globalmente distribuidos en los ambientes marinos pero conforman una pequeña porción de la comunidad de bacterioplancton de la superficie del mar, alrededor del 1% (10, 25). No se observa relación lineal entre la cantidad de vibrios y de bacterias totales (figura 8), aunque sería lo esperado. Es decir, el número de *Vibrio* no aumenta a la vez que lo hace el número de bacterias totales. Esto es probablemente debido a la temperatura, ya que, todavía no se ha alcanzado el rango de crecimiento óptimo para este género. En el estudio de Vezzulli *et al.* mencionado anteriormente (22) se observó que la ocurrencia de *Vibrio* spp. presentaba un marcado descenso cuando la temperatura era inferior a 18°C.

El número de *Vibrio* en aguas costeras está fuertemente asociado con las variaciones estacionales de temperatura. Sufren fuertes oscilaciones temporales con mayores abundancias en general, durante la estación más cálida del año, que es cuando la temperatura del agua normalmente excede los 20°C (26). También son capaces de proliferar en la columna de agua en respuesta a la adición puntual de nutrientes. En esa situación pueden llegar a ser los miembros predominantes del conjunto total de bacterias. (23). Aunque estos *blooms* son de corta duración (24 – 48 h), se ha descrito un aumento de su abundancia en la comunidad desde un 1% a un 20% (25).

En los plásticos muestreados a lo largo de este trabajo se ha determinado la presencia de bacterias totales alrededor de $4,93 \times 10^5$ UFC/g, de los cuales $2,4 \times 10^2$ UFC/g eran vibrios. Esto supone que el porcentaje que representa *Vibrio* respecto al total es de 0,005 - 0,23% (tabla 3). Los valores de UFC son menores que los observados en el agua y la presencia de *Vibrio* en los plásticos también es mucho menor. Los resultados de estos cálculos varían según las características del plástico, si era más grande o más grueso. Sin embargo, Zettler *et al.* encontraron que *Vibrio* spp. constituía hasta el 24% de la diversidad bacteriana en una muestra de polipropileno del Océano Atlántico Norte (10), un resultado muy superior al obtenido en los muestreos.

Los vibrios tienen habilidad para adherirse a un considerable número de sustratos poliméricos (23), además de que tienen tasas de crecimiento muy rápidas. Esto, unido a la utilización de los métodos moleculares, que son más precisos que el recuento de viables en placa, podría ser la razón por la que se han encontrado en mayor proporción, llegando en algunas ocasiones a dominar la plastisfera.

En las muestras de plástico se observa una relación lineal (figura 9) entre los vibrios y las bacterias totales. Por tanto, podemos decir que a medida que aumenta el número de bacterias totales en las muestras, también lo hace el número de *Vibrio*. En este caso la temperatura no es el factor determinante, sino que lo es el tiempo. El tiempo de permanencia en el agua del mar determina el estado de progresión del biofilm asociado a su superficie. En este estudio fue imposible saber cuánto tiempo llevaban en el agua los plásticos que se recogieron, aunque según el aspecto de algunos, se pudo deducir que habían estado más o menos tiempo. Algunos de los plásticos recogidos parecían deteriorados, presentaban organismos fijados y en un caso, el color fue amarillento, lo que indica fotooxidación. En el caso concreto del este plástico, los resultados no fueron muy superiores al resto de muestras.

La cantidad de bacterias que pueden acumular los plásticos fue muy variable, desde un 0.23% hasta un 95,52% (tabla 3). Es posible que este valor sea erróneo, aunque no se haya anotado como error metodológico, ya que los siguientes valores más altos están alrededor de un 24%. También puede

deberse a que ese día (23.02.16), la abundancia de bacterias en el agua de mar fuera menor, aunque estuviera dentro de la media. La cantidad de vibrios que pueden contener, puede ser desde un 0,21% hasta un 12%. Un caso excepcional es el del último plástico recogido, que presentaba un 44,47%. Pero esto sí se debe a un error experimental, ya que la lectura de placas se realizó pasado el tiempo establecido.

Esta estimación se ha realizado para dar una idea sobre la cantidad de bacterias que pueden llegar a acumular los plásticos, ya que la comunidad que contienen no procede necesariamente del agua del punto de muestreo. Como se ha mencionado anteriormente, no fue posible saber cuánto tiempo llevaba el plástico en el mar y hace cuánto tiempo que llegó a la zona de muestreo. De esta manera, queda reflejada la gran capacidad de los plásticos para conformar un sustrato sobre el que las bacterias marinas pueden adherirse.

En varios estudios se ha determinado que la composición de polímero no sólo tiene una influencia sobre la abundancia de microorganismos unidos al plástico, sino que también da forma a la estructura de la comunidad del biofilm (12). Las características de la superficie, como la rugosidad o hidrofobicidad, también se relacionan con abundancia de bacterias (6, 27). En este trabajo se identificaron 4 tipos de plástico, los más ampliamente producidos: polietileno tereftalato (PET), polietileno (PE), polipropileno (PP) y poliestireno (PS). Sin embargo, la mitad de las muestras no pudieron ser identificadas.

Según los resultados se observa que de los identificados, el tipo de plástico que acumula mayor cantidad de bacterias es PE, seguido de PET y PS, aunque se desconoce la abundancia de bacterias en PP por falta de datos (figura 11). Los plásticos no identificados presentan un número de bacterias ligeramente mayor que PE. Respecto a la cantidad de vibrios, es similar en todos los tipos de plástico de los que se tiene este valor.

Las diferencias entre los resultados de este trabajo y otros estudios puede deberse al reducido número de muestras y el método utilizado, ya que los métodos moleculares son más precisos que los cultivos en placa. También, muchas investigaciones se centran en la caracterización de la diversidad bacteriana asociada a los plásticos.

Amaral-Zettler *et al.* (28) determinaron que la geografía y el origen terrestre del plástico influye más en las comunidades que el tipo de polímero, con la excepción del poliestireno. Ellos observaron diferencias significativas entre el poliestireno y el polietileno o entre poliestireno y polipropileno. También describieron diferencias entre estos tres tipos de plástico Carson *et al.* (6). En su estudio los fragmentos de poliestireno albergaron significativamente más bacterias que los de polietileno o polipropileno, que presentaron una abundancia similar entre ellos.

En este trabajo no se puede comparar la abundancia de polietileno y polipropileno debido a la falta de datos, pero al contrario que en el de Carson *et al.* (6), el polietileno albergó más bacterias que el poliestireno. Es posible que la estructura de las muestras expliquen estos resultados, ya que la estructura del poliestireno expandido (espumado) puede ser más favorable para el crecimiento bacteriano que los polímeros no expandidos (6) y la muestra de PS recogida no era de tipo espumado.

Además de la textura, otras propiedades fisicoquímicas de la superficie del plástico, como la hidrofobicidad y la energía superficial, también se han propuesto como factores que afectan al mecanismo de unión al plástico (29).

El número total de bacterias viables aumenta a la vez que la energía superficial, de manera que un elevado número de bacterias se une sobre el sustrato de alta energía, y un menor número se une a un sustrato de baja energía. Una elevada energía superficial indica una menor hidrofobicidad, que a su vez resulta en una mayor adhesión. La rugosidad de la superficie también aumenta la adhesión celular (27).

Gross *et al.* (29) determinaron la energía superficial de una serie de superficies, entre las cuales se encuentran los tipos de plástico muestreados. Según la energía superficial, los plásticos quedarían ordenados de mayor atracción a menor de la siguiente manera: PET, PE, PS y PP. Los resultados de este trabajo no muestran este orden (figura 11). Como indican Amaral-Zettler *et al.* (28), a pesar de la naturaleza hidrófoba de plástico, está bien establecido que los microorganismos marinos han superado este obstáculo.

Además de la cantidad de bacterias que pueda llevar un plástico, también es importante de qué tipo se trata. Las comunidades bacterianas que colonizan los plásticos son notablemente diferentes de las del agua de mar y los sedimentos y los taxones dominantes son muy variables y diversos (10, 28).

En general, las superficies ofrecen una mayor estabilidad y protección para los procariontes, por eso, la formación de biofilms es un fenómeno muy común, tanto en superficies bióticas como abióticas, y en diferentes ambientes (12). En el experimento de laboratorio realizado se estudiaron tres superficies, que fueron vidrio y dos tipos de plástico (PP y HDPE), para determinar por qué tipo de sustrato muestran preferencia las bacterias. Se han llevado a cabo estudios similares anteriormente. Por ejemplo, el trabajo de Lobelle y Cunliffe (17), que se tomó como referencia y que trabajó con polietileno. Oberbeckmann *et al.* (12) investigaron también la adherencia al vidrio y al plástico. Sin embargo, el plástico utilizado es PET y su intención era la del estudio de la composición taxonómica.

De acuerdo con lo observado por Lobelle y Cunliffe (17) la formación del biofilm en un plástico es visible después de una semana sumergido en agua, y aumenta durante el experimento. En su estudio, el número de bacterias aumenta de manera significativa en tres semanas. Coincidiendo con la formación del biofilm, la superficie del plástico se hace menos hidrófobo durante el experimento. El carácter hidrofílico de la superficie aumenta significativamente después de 2 semanas (17). Si el aumento observado en los resultados de este trabajo fue significativo no se ha podido determinar a causa del reducido número de réplicas.

Los resultados muestran que después de una semana (T_7) el plástico sobre el que hay más bacterias es PP, pero una semana más tarde (T_{14}), el que presenta mayor número de bacterias es HDPE (tablas 5 y 6). De acuerdo a las características de los plásticos explicadas anteriormente, de los plásticos utilizados, el que tiene mayor energía de superficie y que por tanto es más susceptible a la adhesión de bacterias, es PE. Es posible que la colonización de HDPE sea más lenta, pero que el resultado final, sea un mayor número de bacterias.

En el caso de los vibrios, después de los primeros 7 días, la cantidad también fue mayor en PP. Sin embargo, una semana más tarde, los procedentes de la muestra de PP no se detectaron en placa. Esto puede ser debido a varias razones. La primera es un error experimental ya que se modificaron las diluciones y pudo no ser un acierto. Otra posibilidad es que los vibrios tenían otras superficies disponibles, como el interior del Erlenmeyer o el zooplancton que pudiera contener el agua de mar. Los vibrios tienen una alta afinidad para la colonización de las superficies de quitina y organismos quitinosos, especialmente organismos del zooplancton, que se pueden considerar el principal reservorio ambiental de estas bacterias en el medio acuático (26).

El efecto del tratamiento solo se aprecia en HDPL, donde se observa un mayor número de vibrios respecto al control. Los vibrios unidos a las superficies no se pudieron identificar, pero, en base al aspecto de las colonias en el medio de cultivo TCBS (figura 12) se deduce que algunos sí eran el aislado utilizado. También se intuye que *Vibrio* sp. I26 tiene afinidad por los plásticos, a partir de los resultados que obtuvieron Zettler *et al.* (10) en cuya investigación encontraron que en una muestra de polipropileno del Océano Atlántico Norte un 24% de la diversidad bacteriana era *Vibrio natriegens*, con la que *Vibrio* sp. I26 comparte gran similitud.

En cuanto a las bacterias presentes en el agua, se observa la proliferación (figura 13). Esto puede ser debido a la disponibilidad de nutrientes del agua y al efecto de estimulación que supone la introducción de la muestra de agua en un recipiente. La proliferación de los vibrios no es tan clara, sino que hay más variabilidad de resultados.

En comparación con el vidrio, PP presentó ligeramente más bacterias que el vidrio, tanto totales como vibrios. En cambio, en HDPE los resultados son más variables. Por tanto, no se puede determinar con claridad cuál es la superficie preferente. Sí que se ha observado en el estudio de Oberbeckmann *et al.* (12), diferencias notables (57% de divergencia) entre la estructura y composición taxonómica de las comunidades de PET con el vidrio y las comunidades del agua de mar (basado en 16S rRNA).

CONCLUSIÓN

El plástico se ha convertido en el mayor residuo marino y el más distribuido. Esta contaminación tiene múltiples impactos, que van más allá de los problemas físicos que suponen a los organismos marinos. Aunque el plástico es comúnmente considerado como un material inerte, se ha demostrado que después de su exposición a las condiciones ambientales marinas puede establecer diferentes relaciones con contaminantes y con microorganismos, algunos de los cuales pueden ser patógenos.

Gracias a su larga duración y su amplia capacidad de dispersión en el medio marino, la superficie del plástico ofrece un ambiente ideal para los microorganismos formadores de biofilms. Esta comunidad que se establece sobre la superficie, que ha sido recientemente caracterizada y que ha ido tomando importancia, se conoce con el nombre de “plastisfera”.

Los plásticos pueden llegar a contener gran cantidad y diversidad de bacterias. El tipo y las características del plástico pueden determinar la colonización. Aunque en el presente estudio no se ha podido determinar con claridad qué tipo es más favorable para la acumulación de bacterias, lo que sí queda claro es que los biofilms se forman de manera muy rápida.

Estos residuos pueden representar un vehículo para el transporte de organismos, algunos de los cuales son causantes de enfermedades. Varias especies de *Vibrio* son reconocidas como patógenas de humanos. Este género tiene la habilidad de adherirse a múltiples superficies, sin embargo, la representatividad de este patógeno con respecto a las comunidades de la plastisfera sigue siendo desconocida. Por eso, su potencial para colonizar residuos de plástico representa una vía aún sin explorar para su dispersión.

Teniendo en cuenta los bajos porcentajes que representa *Vibrio* en la comunidad, es poco probable la presencia de alguno que sea patógeno. Aunque no se puede afirmar con certeza ya que hay pocos trabajos llevados a cabo en el Mediterráneo y muchos de los estudios se han realizado en los grandes océanos. El Mediterráneo es menos oligotrófico y la abundancia de bacterias puede ser más elevada que en otras zonas como el Atlántico Norte o el Pacífico. Además, los resultados pueden estar subestimados, debido a la técnica utilizada. Los estudios que utilicen métodos moleculares obtendrán unos resultados serán más precisos y darán una idea más aproximadas a la realidad. También hay que tener en cuenta que en la temporada cálida como es el verano, la presencia de *Vibrio* puede ser más elevada.

En la actualidad existe poca información disponible para evaluar si la presencia de patógenos en los residuos de plástico representa un riesgo real para la salud humana. Pero la posibilidad de que los plásticos transporten patógenos introduce la necesidad de futuras investigaciones que determinen si esta relación afecta significativamente la salud pública.

REFERENCIAS

1. Nerland I. L., Halsband C., Allan I., Thomas K. V. (2014). Microplastics in marine environments: Occurrence, distribution and effects. Norwegian Institute for Water Research Report No. 6754-2014. 71 pp.
2. Harrison, J. P., Sapp, M., Schratzberger, M. and Osborn, A. M. (2011). Interactions Between Microorganisms and Marine Microplastics: A Call for Research. Marine Technology Society Journal, 45 (2): 12-20.

3. Derraik, J. G. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 842–852.
4. Kershaw, P. J., ed. (2015). Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: a global assessment. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. Rep. Stud. GESAMP No. 90, 96 pp.
5. De Tender, C. A., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., and Dawyndt, P. (2015). Bacterial community profiling of plastic litter in the belgian part of the north sea. *Environmental Science and Technology*, 49 (16): 9629-9638.
6. Carson, H. S., Nerheim, M. S., Carroll, K. A. and Eriksen, M. (2013). The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. *Marine Pollution Bulletin*, 75 (1-2): 126-132.
7. Keswani, A., Oliver, D. M., Gutiérrez, T., and Quilliam, R. S. (2016). Microbial hitchhikers on marine plastic debris: Human exposure risks at bathing waters and beach environments. *Marine Environmental Research*, 118: 10-19.
8. Cózar, A., Sanz-Martín, M., Martí, E., González-Gordillo, J. I., Úbeda, B., Á. Gálvez, J., and Duarte, C. M. (2015). Plastic accumulation in the mediterranean sea. *PLoS ONE*, 10 (4).
9. Faure, F., Saini, C., Potter, G., Galgani, F., de Alencastro, L. F., and Hagmann, P. (2015). An evaluation of surface micro and mesoplastic pollution in pelagic ecosystems of the western mediterranean sea. *Environmental Science and Pollution Research*, 22 (16): 12190-12197.
10. Zettler, E. R., Mincer, T. J., and Amaral-Zettler, L. A. (2013). Life in the "plastisphere": Microbial communities on plastic marine debris. *Environmental Science and Technology*, 47 (13): 7137-7146.
11. Reisser, J., Shaw, J., Hallegraeff, G., Proietti, M., Barnes, D. K. A., Thums, M., Wilcox, C., Hardesty, B. D. and Pattiaratchi, C. (2014). Millimeter-Sized Marine Plastics: A New Pelagic Habitat for Microorganisms and Invertebrates. *PLoS ONE*, 9 (6): e100289.
12. Oberbeckmann, S., Loeder, M. G. J., Gerds, G., and Osborn, A. M. (2014). Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in northern European waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 90 (2): 478-492.
13. Rosenberg, E. *et al.* (eds.) (2014). The prokaryotes: *Gammaproteobacteria*. The Family *Vibrionaceae*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1-768 pp).
14. Thompson, F. L., Iida, T., and Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (3): 403-431.
15. Garrity, G. M. (ed.) (2004). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. 2ª edición. Volume 2 The *Proteobacteria*. Part B The *Gammaproteobacteria*. Family I. *Vibrionaceae* (494-546 pp).
16. Harrison, J. P., Schratzberger, M., Sapp, M., and Osborn, A. M. (2014). Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC Microbiology*, 14 (1).
17. Lobelle, D., and Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine Pollution Bulletin*, 62 (1): 197-200.
18. Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Rohul Amin, A. K. M., Mino, S., and Hayashi, T. (2013). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: Proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in Microbiology* (4).

19. Turner, J. W., Good, B., Cole, D., and Lipp, E. K. (2009). Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *ISME Journal*, 3 (9): 1082-1092.
20. Zimbardo, M. J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson, G. E., and Johnson, J. A. eds. (2009) Difco™ & BBL™ Manual. Manual of Microbiological Culture Media. Second Edition.
21. Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (2003). Brock Biología de los Microorganismos. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid.
22. Vezzulli, L., Pezzati, E., Moreno, M., Fabiano, M., Pane, L., and Pruzzo, C. (2009). Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal mediterranean environment (La Spezia gulf, Italy). *Microbial Ecology*, 58 (4): 808-818.
23. Takemura, A. F., Chien, D. M., and Polz, M. F. (2014). Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level. *Frontiers in Microbiology* (5).
24. Siokou-Frangou, I., Christaki, U., Mazzocchi, M. G., Montresor, M., Ribera d'Alcalá, M., Vaqué D., and Zingone A. (2010). Plankton in the open Mediterranean Sea: a review. *Biogeosciences*, 7: 1543–1586.
25. Westrich, J. R., Ebling A. M., Landing, W. L., Joyner J. L., Kemp, K. M., Griffin D. W., and Lipp E. K. (2016). Saharan dust nutrients promote *Vibrio* bloom formation in marine surface waters. *PNAS* 113 (21): 5964–5969.
26. Vezzulli, L., Colwell, R. R., and Pruzzo, C. (2013). Ocean Warming and Spread of Pathogenic vibrios in the Aquatic Environment. *Microb Ecol* 65: 817–825.
27. Lakshmi, K., Muthukumar, T., Doble, M., Vedaprakash, L., Kruparathnam, Dineshram, R., and Venkatesan, R. (2012). Influence of surface characteristics on biofouling formed on polymers exposed to coastal sea waters of India. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 91 (1): 205-211.
28. Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., Slikas, B., Boyd, G. D., Melvin, D. W., Morrall, C. E., and Mincer, T. J. (2015). The biogeography of the plastisphere: Implications for policy. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 13 (10): 541-546.
29. Gross, M., Zhao, X., Mascarenhas, V., and Wen, Z. (2016). Effects of the surface physico-chemical properties and the surface textures on the initial colonization and the attached growth in algal biofilm. *Biotechnology for Biofuels*, 9 (1).