

## PRIMERA APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL REFERENTE A LA ACUMULACIÓN Y DEPOSICIÓN DE MICROPLÁSTICOS EN LÍQUENES

First experimental approach to the accumulation and deposition of microplastics in lichen

Jonatan GÓMEZ<sup>1\*</sup>, Andrés PIGHIN<sup>1</sup>, Maira GOLLO<sup>1</sup>, Ayelén NISTAL<sup>1,2</sup> y Elizabeth VILLAGRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Luján, Ruta 7 y Constitución, Luján, 6700, Provincia de Buenos Aires, República Argentina.

<sup>2</sup> Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Calle 526 entre 10 y 11, La Plata, B1900, Provincia de Buenos Aires, República Argentina.

\*Autor para correspondencia: [gomezjonatanjose@yahoo.com.ar](mailto:gomezjonatanjose@yahoo.com.ar)

(Recibido: junio de 2022; aceptado: marzo de 2023)

Palabras clave: hongos liquenizados, plástico, microesferas, bioacumulación, contaminación.

### RESUMEN

Uno de los problemas más importantes relacionados con los desechos plásticos es la producción de MP (MP), cuya acumulación en diferentes taxones ha sido registrada. Recientemente se ha demostrado, a través de muestreo de campo, que los líquenes son capaces de acumular MP. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar experimentalmente la acumulación y deposición de MP en tres especies de líquenes de los géneros *Usnea*, *Ramalina* y *Punctelia*. Medimos el peso, la absorción de agua y la dimensión fractal de cada talo. En condiciones de laboratorio, expusimos 12 talos de cada especie a tres diferentes dosis de MP en suspensión acuosa (3, 6 y 12 MP/mL) durante una semana. Se extrajeron y contabilizaron los MP acumulados y depositados. La acumulación fue despreciable. Modelamos la deposición con modelos lineales generales. La variable dimensión fractal fue la única que se relacionó significativamente con los MP depositados. Estos resultados sugieren que, en comunidades con complejidad estructural mayor, medidas en la dimensión fractal, se encontrarán niveles mayores de MP depositados.

Key words: lichenized fungi, plastics, microspheres, bioaccumulation, pollution.

### ABSTRACT

One of the most important problems related to plastic waste is the production of microplastics (MPs), whose accumulation in different taxa has been recorded. It was recently found through field sampling that lichens are able to accumulate MPs. The present work aims to experimentally study the accumulation and deposition of MPs in three lichen species of the genera *Usnea*, *Ramalina* and *Punctelia*. We measured the weight, water uptake and fractal dimension of each thallus. Under laboratory conditions, we exposed 12 thalli of each species to three different doses of MPs in aqueous suspension (3, 6, and  $\leq 12$  MP/mL) for one week. The accumulated and deposited MPs were extracted and counted. Accumulation was negligible. We modelled deposition with general linear models. The fractal dimension variable was the only one significantly related to deposited MPs. These results suggest that in communities with higher structural complexity, measured by fractal dimension, we will find higher levels of deposited MPs.

## INTRODUCCIÓN

La producción mundial de plásticos superó los 300 millones de toneladas en 2019 (PE 2019). Uno de los problemas más relevantes vinculados con la producción de plásticos es su eliminación final. Los plásticos expuestos al ambiente (desgaste mecánico, intemperie, radiación solar y microorganismos) generan MP (MP), es decir, partículas plásticas de tamaño  $< 5$  mm (Evangelio et al. 2020, Hale et al. 2020). Aunque la producción secundaria de MP es la más reconocida, la producción primaria de MP también es frecuente (Wang et al. 2019). La producción de aditivos cosméticos (como microesferas de metacrilato) es una de las fuentes primarias de MP más reconocidas en el mundo (Napper et al. 2015, Lei et al. 2017, Anagnosti et al. 2021). Los MP han sido registrados en todas sus formas en diversos taxones (Foley et al. 2018, Bai et al. 2021, Loppi et al. 2021, Mateos-Cárdenas et al. 2021) y se ha demostrado que generan problemas diversos a las comunidades biológicas (Cera y Scalici 2021, Matthews et al. 2021).

Los líquenes son ampliamente utilizados como bioindicadores de contaminación ambiental (Conti y Cecchetti 2001). Es reconocido el uso de las características de las comunidades líquénicas (El Mokni et al. 2015, Lopes et al. 2019) o sus rasgos funcionales (Degtjarenko et al. 2018, Koch et al. 2019) como indicadores del grado de contaminación o perturbación ambiental. Los MP como contaminantes emergentes relacionados con los líquenes no han sido explorados a profundidad. Loppi et al. (2021) registraron por primera vez la capacidad de los líquenes para acumular MP. Estos autores demostraron que la acumulación de MP en los talos foliosos de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale estaba directamente relacionada con la distancia a un vertedero de basura a cielo abierto. Este resultado sugiere que los líquenes pueden utilizarse como bioindicadores de la presencia de MP en el aire. Loppi et al. (2021) analizaron la acumulación total que resulta tanto de la deposición sobre el talo como de la acumulación dentro del mismo. Lamentablemente, los mecanismos de deposición o acumulación de MP en los talos líquénicos son desconocidos; sin embargo, a pesar de que no se han identificado dichos mecanismos, si es posible identificar las fuentes a partir de las cuales pueden provenir los MP acumulados y/o depositados en los talos líquénicos: aire, polvo y lluvia.

Dependiendo del sitio, el aporte global de MP será mayor en una fuente u otra. Por ejemplo, en las grandes ciudades, el aporte de MP proveniente de la lluvia es poco significativo, mientras que en áreas rurales es mayor (Zhang et al. 2020, Liao et al. 2021).

No existe una relación clara entre la deposición de MP y las precipitaciones (Allen et al. 2019), a pesar de lo cual la presencia de MP en el agua proveniente de la lluvia es un hecho. Esto es relevante para las comunidades líquénicas, ya que los talos líquénicos tienen la capacidad de absorber el agua de la atmósfera saturada (Kappen y Redon 1987), e incluso de almacenar hasta el 80 % del agua de lluvia en la fase inicial de las precipitaciones (Veneklaas et al. 1990, Fačkovcova et al. 2019). La capacidad de absorción y almacenamiento de agua por parte de los talos líquénicos está relacionada con su complejidad estructural. El aumento de la complejidad estructural en los líquenes es reconocido hace mucho tiempo como una adaptación que permite un almacenamiento mayor de agua en el talo (Green et al. 1985). Klamerus-Iwan et al. (2020) demostraron en varias especies de líquenes que la complejidad estructural del talo puede ser el factor más importante para explicar las diferencias entre especies respecto a la capacidad de almacenamiento de agua. Dicha complejidad estructural puede estimarse como un rasgo funcional.

Los rasgos funcionales median la respuesta de las especies al ambiente y pueden definirse como las características de un organismo relevantes para esta respuesta y/o sus efectos sobre el funcionamiento del ecosistema (Díaz y Cabido 2001). Causa y efecto no siempre son claras y algunos rasgos evidencian de manera simultánea tanto la respuesta como el efecto (Ellis et al. 2021). Algunos ejemplos de rasgos funcionales son: forma de crecimiento, capacidad de almacenamiento de agua, tamaño, color del talo, etc. La geometría es una medida de complejidad del talo líquénico y, como tal, puede considerarse como un rasgo funcional. Se ha demostrado que la dimensión fractal, un índice derivado de la geometría fractal de los líquenes y de la complejidad de su forma, predice la distribución de las formas de crecimiento a lo largo de gradientes de niebla (Stanton y Horn 2013). Incluso se ha observado que el aumento de la ramificación medido por la dimensión fractal corresponde a una mayor capacidad de cosechar agua de niebla (Stanton y Horn 2013, Fodor y Háruta 2018). En este panorama de los hechos, la acumulación y/o deposición de MP en los talos líquénicos provenientes del agua ambiental (lluvia o niebla) podría estar relacionada con (i) el ambiente en que se desarrollan las comunidades líquénicas afectadas y (ii) la complejidad estructural de los líquenes. El objetivo del presente trabajo es explorar de manera experimental, por primera vez, la acumulación y deposición de MP en talos líquénicos de especies con diferente complejidad a través del contacto de los talos con lluvia simulada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo y diseño del experimento

En el presente trabajo expusimos talos de tres especies de líquenes a diferentes dosis de MP. Dos de las especies estudiadas fueron fruticosas: *Ramalina celastri* (Spreng.) Krog. y Swinsc., y *Usnea dasaea* Stirt. Mientras que la última correspondió al morfotipo folioso *Punctelia semansiana* (Culb. y C. Culb.) Krog., *R. celastri* tiene un talo erecto, rígido, de 1-5 cm de alto, de escasa a moderada ramificación desde una base ancha y abierta, numerosos apotecios laminares y/o marginales, y numerosas pseudocifelas cortas y lineales (Galloway 2007). Esta especie se encuentra fuertemente asociada a la presencia de abundantes precipitaciones y ausencia de déficit hídrico (Bannister et al. 2004). *U. dasaea* presenta un talo gris verdoso a amarillo verdoso, arbustivo a subpendiente de 10-15 cm de largo, ramificación mixta isotómica/anisotómica, ramas inferiores no constreñidas en el origen y ramificación principal corta no pigmentada (Bannister et al. 2020). Esta especie está asociada a zonas húmedas y con frecuente presencia de niebla (Fos y Clerc 2000). *P. semansiana* presenta un talo gris mineral folioso de hasta 6 cm de diámetro, lóbulos subirregulares de ápice redondeado hasta alargados y angostos, crenados a incisos, de 2-6 mm de ancho, frecuentemente laciniados (Estrabou y Adler 1999). Tal como las otras dos especies en estudio, está asociada a zonas con alta disponibilidad de humedad ambiental (Nash et al. 2004).

Recolectamos un total de 12 talos por especie de los campos experimentales de la Universidad Nacional de Luján, Luján, Buenos Aires, Argentina (34° 34' 41" S, 59° 05' 14" O). Cada uno de los talos fue secado bajo los rayos directos del sol a temperatura ambiente (~ 25 °C) durante 24 h. Posteriormente cada talo fue pesado utilizando una balanza analítica (precisión de 0.0001 g). Estas mediciones representaron el peso seco, (PS) en gramos de cada talo. Se procuró que el tamaño de los talos para cada especie fuese lo más homogéneo posible. Se tomaron fotos de cada talo en su posición natural (superficie expuesta a la lluvia artificial) y se estimaron (a) la superficie promedio observada en cada fotografía (en cm<sup>2</sup>) y (b) el desvío estándar correspondiente: 2.28 ± 1.01 (*U. dasaea*), 1.70 ± 0.56 (*P. semansiana*) y 14.82 ± 5.07 (*R. celastri*).

Por otro lado, utilizamos una estimación sencilla de absorción de agua (g) de los talos utilizados en el experimento. Los talos fueron rociados con agua desmineralizada a intervalos de 5 min hasta alcanzar un peso constante. Los talos húmedos fueron

pesados utilizando una balanza analítica (precisión de 0.0001 g). Obtuvimos una estimación del agua absorbida restando el peso de los talos humedecidos al peso de los talos secados bajo los rayos del sol. Los MP utilizados en el experimento fueron microesferas de polimetacrilato de metilo (PMMA), un tipo de MP común en usos cosméticos (Bashir et al. 2021) que puede encontrarse frecuentemente en la niebla y el agua de lluvia (Allen et al. 2020, Vivekanand et al. 2021, Morales et al. 2022). Se utilizaron en total 2100 microesferas de PMMA, las cuales se contabilizaron y midieron utilizando microscopio estereoscópico y el programa ImageJ. El rango de tamaño de las microesferas utilizado fue de 11-400 µm. Siguiendo a Carrera y Carreras (2011), cada uno de los talos recolectados se colocó individualmente en una cámara de vidrio. Estos autores pusieron dentro de cada cámara el mismo peso de material biológico; sin embargo, en nuestro experimento la acumulación/deposición de MP se estimó para cada talo, lo cual dificulta que los pesos de cada talo coincidan. No obstante, el dato del peso (y su variable correlacionada absorción de agua [véase la sección Análisis estadísticos]) fue incorporado en los modelos y a través suyo se determinó si el peso tuvo algún efecto significativo sobre la acumulación/deposición de MP.

Las cámaras tenían forma cilíndrica (2.5 cm de diámetro × 15 cm de altura). Utilizamos un testigo y tres tratamientos por especie. El testigo y los tratamientos contaron con tres réplicas. Expusimos cada talo durante una semana a tres dosis diferentes de MP suspendidos en agua desmineralizada: ~ 3, 6 y 12 MP/mL. Las concentraciones están basadas en lo registrado por Qian et al. (2017) en la ciudad de Yantai, China. Allí se registró un rango de deposición atmosférica de partículas de plástico de 0 a 600/m<sup>2</sup>/día. Esta ciudad presenta uno de los niveles de exposición a MP más altas del mundo y fue utilizada como modelo, ya que representó los extremos de deposición de MP, es decir, sin deposición (0 partículas/m<sup>2</sup>/día) y un nivel extremo de deposición (600 partículas/m<sup>2</sup>/día). Teniendo en cuenta el radio de las cámaras de vidrio (0.25 m) se estimó un valor máximo de deposición ambiental de MP de ~ 1 partícula/m<sup>2</sup>/día. La exposición anual a MP representaría entonces ~ 365 partículas/m<sup>2</sup>/año. Para lograr categorías más homogéneas redondeamos la máxima deposición ambiental a 400 partículas/m<sup>2</sup>/día. La dosis más alta (12 MP/mL) derivó del armado de una suspensión de 1200 partículas (microesferas) plásticas en 100 mL de agua desmineralizada, en tanto que la dosis media

(6 MP/mL) derivó del armado de una suspensión de 600 microesferas en 100 mL de agua desmineralizada y la más baja (3 MP/mL) del armado de una suspensión de 300 microesferas en 100 mL de agua desmineralizada. Los días lunes, miércoles y viernes de esa semana se aplicaron 10 mL de cada tratamiento. Los testigos sólo recibieron agua desmineralizada. La aplicación se realizó con pulverizador de boca ancha. El procedimiento consistió en: (i) retirar con cuidado, usando pinzas, cada talo fuera de su respectiva cámara, (ii) colocar cada talo en su posición natural y ángulo natural encontrados en el campo experimental, (iii) rociar con pulverizador 10 mL de suspensión de MP, (iv) colocar nuevamente el talo en su cámara de vidrio y (v) lavar todo el material cuidadosamente con agua desmineralizada. Como consecuencia de la densidad del PMMA ( $1.18 \text{ g/cm}^3$ ), la aplicación de la solución se realizó agitando previamente el pulverizador con el objetivo de evitar que las microesferas se acumulasen en el fondo del envase. La distribución de las 2100 partículas de MP entre las diferentes suspensiones fue realizada al azar.

Al finalizar la semana de exposición se extrajeron las microesferas depositadas y acumuladas mediante dos métodos diferentes. Las microesferas acumuladas fueron extraídas de cada talo líquénico mediante lavado intenso con agua bidestilada, en una cámara de flujo laminar (para evitar contaminación ambiental). Este lavado se realizó tomando cada talo con pinzas antimagnéticas y suspendiéndolo sobre un recipiente de vidrio de 3 L. Se realizaron siete lavados intensos por talo. La suspensión de microesferas obtenida en el recipiente de vidrio se pasó a través de filtros de papel de 8-10  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Whatman 1031220). Los papeles de filtro se almacenaron en cajas de Petri de vidrio cerradas hasta su posterior análisis. Las microesferas acumuladas se obtuvieron a través de la digestión del material biológico. Siguiendo a Loppi et al. (2021) utilizamos el método de oxidación por peróxido húmedo (Masura et al. 2015). En el laboratorio, las muestras de líquenes secadas al aire se colocaron en vasos de precipitado y se digirieron. Los papeles de filtro se transfirieron a cajas de Petri de vidrio para su almacenamiento y posterior análisis. Las microesferas se observaron y contabilizaron utilizando una lupa estereomicroscópica (Zeiss Stemi 508). Medimos la complejidad estructural de los talos líquénicos utilizando su dimensión fractal (D). La dimensión fractal fue medida utilizando método de multirresolución de conteo de caja (Loehle y Li 1996). Para la estimación de la dimensión fractal se tomaron fotografías individuales de cada talo, con

fondo blanco, en la posición y ángulo frontal que poseían en el campo experimental antes de la recolección. El fondo de cada foto fue sustraído y utilizando el plugin FracLac dentro del programa ImageJ procedimos a utilizar la función “Fractal box count”.

### Análisis estadísticos

Analizamos estadísticamente los datos obtenidos del experimento (**cuadro I**) utilizando Rstudio. Obtuvimos estadísticos representativos (media, desviación estándar, valor máximo y valor mínimo) de cada variable de interés agrupando los datos por especie. Con esta información y con el objetivo de explorar el efecto de las variables analizadas en el número de MP depositados y acumulados representamos gráficamente el número de MP por talo respecto a los siguientes factores: especie, dosis (MP/mL), dimensión fractal (D) y absorción de agua (g). No representamos gráficamente la variable peso ya que presentó una alta correlación con la variable absorción de agua ( $r = 0.98$ ) y, por ende, fue descartada de los análisis posteriores. Sin embargo, la información asociada con dicha variable se encuentra disponible en el **cuadro I**. Los gráficos se construyeron en el programa Rstudio utilizando los paquetes “ggpubr” y “ggplot2”. Además, exploramos las diferencias entre los MP agrupados por dosis y especie utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Por otro lado, utilizando los paquetes “MASS” y “gamlss” generamos un modelo lineal generalizado (MLG) con una distribución binomial negativa para la variable respuesta “MP”, con especie y dosis como variables independientes más las covariables dimensión fractal (D) y absorción (g) de cada talo. Utilizamos la función “stepGAICAll.A()” para generar modelos con distintas combinaciones de predictores y escogimos aquel que mostró un estimador AIC (Akaike information criterion) más bajo.

## RESULTADOS

Sólo dos talos (pertenecientes a la especie *U. dasaea* y a la dosis 6 MP/mL) registraron microesferas acumuladas (una microesfera por talo). El resto de las microesferas contabilizadas se encontraron en los filtros de papel correspondientes a la fracción de MP depositados. No se registraron microesferas en los testigos experimentales. A partir de este punto todos los resultados estuvieron relacionados sólo con la fracción de MP depositados. Gráficamente (**Fig. 1**) no se observa un claro efecto de la dosis sobre el número de MP depositados, lo cual coincide con

**CUADRO I.** DATOS OBTENIDOS DE CADA UNO DE LOS TALOS UTILIZADOS EL EXPERIMENTO.

Género*	Dosis**	MP depositados	Dimensión fractal (D)	Peso seco (g)	Absorción (g)
<i>Usnea</i>	Testigo	0.000	1.777	0.048	0.115
<i>Usnea</i>	Testigo	0.000	1.709	0.205	0.470
<i>Usnea</i>	Testigo	0.000	1.564	0.023	0.126
<i>Usnea</i>	Baja	88.000	1.797	0.106	0.431
<i>Usnea</i>	Baja	70.000	1.784	0.087	0.371
<i>Usnea</i>	Baja	9.000	1.589	0.032	0.119
<i>Usnea</i>	Media	77.000	1.788	0.144	0.393
<i>Usnea</i>	Media	33.000	1.694	0.045	0.133
<i>Usnea</i>	Media	33.000	1.722	0.043	0.223
<i>Usnea</i>	Alta	8.000	1.518	0.034	0.082
<i>Usnea</i>	Alta	21.000	1.645	0.037	0.071
<i>Usnea</i>	Alta	11.000	1.585	0.042	0.279
<i>Punctelia</i>	Testigo	0.000	1.286	0.040	0.406
<i>Punctelia</i>	Testigo	0.000	1.637	0.048	0.315
<i>Punctelia</i>	Testigo	0.000	1.512	0.051	0.406
<i>Punctelia</i>	Baja	8.000	1.547	0.035	0.183
<i>Punctelia</i>	Baja	19.000	1.681	0.058	0.277
<i>Punctelia</i>	Baja	18.000	1.664	0.096	0.365
<i>Punctelia</i>	Media	4.000	1.348	0.034	0.220
<i>Punctelia</i>	Media	10.000	1.470	0.042	0.196
<i>Punctelia</i>	Media	11.000	1.392	0.033	0.224
<i>Punctelia</i>	Alta	13.000	1.589	0.023	0.126
<i>Punctelia</i>	Alta	14.000	1.467	0.058	0.422
<i>Punctelia</i>	Alta	16.000	1.599	0.008	0.046
<i>Ramalina</i>	Testigo	0.000	1.690	0.532	0.967
<i>Ramalina</i>	Testigo	0.000	1.584	0.252	0.398
<i>Ramalina</i>	Testigo	0.000	1.737	2.242	3.816
<i>Ramalina</i>	Baja	40.000	1.769	1.348	2.101
<i>Ramalina</i>	Baja	41.000	1.709	0.832	1.491
<i>Ramalina</i>	Baja	15.000	1.624	0.202	0.593
<i>Ramalina</i>	Media	60.000	1.731	0.273	0.498
<i>Ramalina</i>	Media	50.000	1.723	0.425	0.856
<i>Ramalina</i>	Media	10.000	1.501	0.356	0.735
<i>Ramalina</i>	Alta	36.000	1.709	0.490	0.815
<i>Ramalina</i>	Alta	44.000	1.702	0.274	0.533
<i>Ramalina</i>	Alta	24.000	1.680	0.550	0.738

\*Para reducir el tamaño de la tabla sólo se indica el género.

\*\*Correspondiente a 3 MP/mL (dosis baja), 6 MP/mL (dosis media) y 12 MP/mL (dosis alta).

la falta de significancia estadística (chi-cuadrado de Kruskal-Wallis = 0.53593,  $gl = 2$ ,  $p = 0.7649$ ). La especie parece estar relacionada con el número de MP depositados (**Fig. 1**, chi-cuadrado de Kruskal-Wallis = 7.3608,  $gl = 2$ ,  $p = 0.02521$ ). Por otro lado, la **figura 3**, sugiere una relación positiva entre la dimensión fractal y el número de MP depositados. No observamos una relación clara entre la absorción de agua y el número de MP (**Fig. 1**).

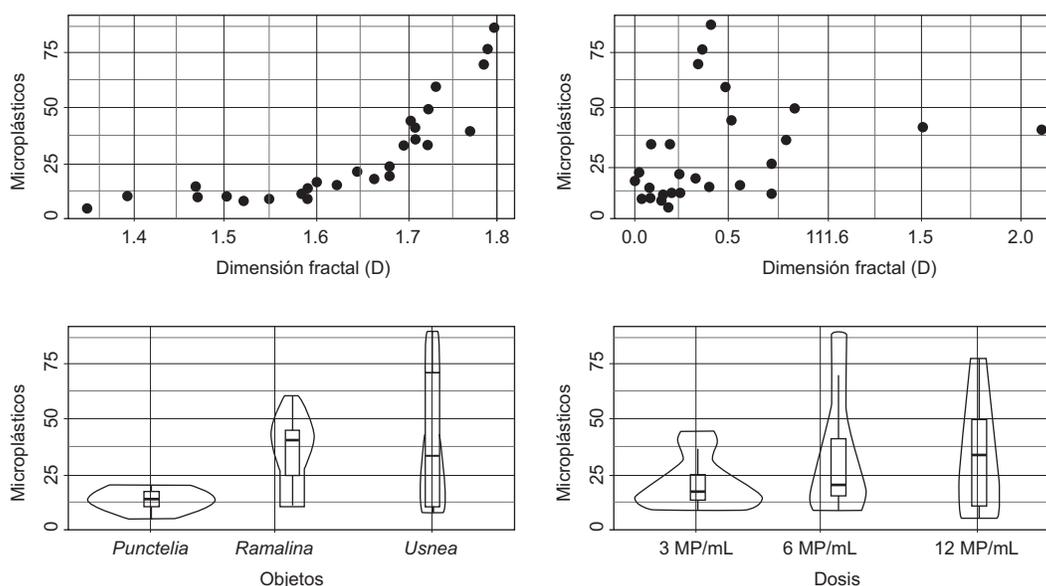
El modelo que mejor se ajusta a los datos de entrada incluyó un solo predictor: dimensión fractal (**cuadro II**). Observamos que al aumentar la

dimensión fractal (independientemente de la dosis) aumentó la cantidad de MP depositados (**Fig. 2**). Por otro lado, la cantidad máxima de MP depositados en los talos disminuyó con la dosis aplicada (**Fig. 2**).

## DISCUSIÓN

### Relevancia

Este es el primer estudio que investiga de forma experimental la deposición de MP en los líquenes en función de su tipo morfológico y características



**Fig. 1.** Representación gráfica del número de microplásticos (MP) respecto de los siguientes factores: especie (representada por su género por cuestiones de espacio en la figura), dosis (MP/mL), dimensión fractal y absorción de agua.

**CUADRO II.** INFORMACIÓN RELACIONADA CON EL MODELO LINEAL GENERALIZADO QUE MEJOR SE AJUSTÓ A LOS DATOS DE ENTRADA.

	Estimación	Error estándar	Valor z	p
Intercepción	-7.750	1.019	-7.608	7.59E-08
Dimensión fractal	6.647	0.607	10.952	8.08E-11
AIC	188.339			

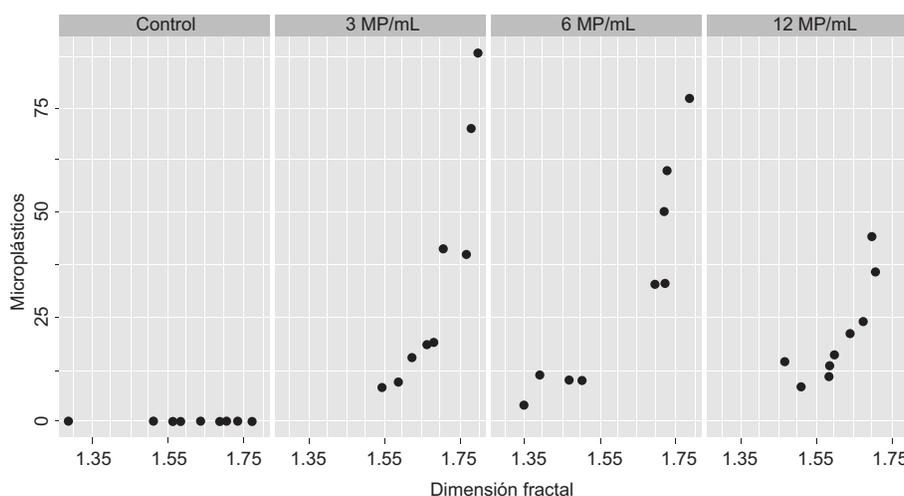
AIC: criterio de información de Akaike (por su sigla en inglés).

asociadas, tales como dimensión fractal y absorción de agua. Aunque el experimento es simple en términos de tiempo de exposición, los resultados son relevantes en varios sentidos. En primer lugar, aunque son cada vez más frecuentes los experimentos de exposición a MP a diferentes grupos taxonómicos (e.g., macrofitas: van Weert et al. [2019]; plantas: Liu et al. [2022]; peces: Avio et al. [2015]), hasta la fecha no existían experimentos de este tipo relacionados con líquenes. La única referencia asociada con líquenes y MP es un trabajo de campo no experimental (Loppi et al. 2021).

En segundo lugar, aunque la acumulación de microesferas de PMMA en los talos líquenicos no es significativa en el intervalo de tiempo de exposición (una semana), es interesante destacar que, si bien

sólo se acumularon dos microesferas, este hecho es llamativo y sugiere que no son necesarios tiempos de exposición muy altos para que los líquenes acumulen MP. Estudios posteriores deberán profundizar en este hecho y en los mecanismos que permiten la incorporación de las microesferas dentro de los talos.

En tercer lugar, la dimensión fractal de los talos líquenicos es el factor más relevante para la deposición de microesferas de PMMA. Las estimaciones del mejor modelo (**cuadro II**) muestran que el efecto de la dimensión fractal es mayor que el resto de los predictores, incluida la dosis. Es posible que la reducción del efecto de la dosis esté relacionada con el efecto de agregación de las microesferas (véase la sección Limitaciones metodológicas). La dimensión fractal de los líquenes afecta muchas de sus características biológicas y ecológicas (Shorrocks et al. 1991, Marchi y Cassi 1993). En el presente trabajo demostramos que la dimensión fractal de los líquenes también afecta la deposición de microesferas plásticas. El aumento en la dimensión fractal de los líquenes aumenta el número de microesferas depositados en sus talos. Este efecto de la dimensión fractal transforma a la misma en un rasgo funcional. Como se ha demostrado con anterioridad, el aumento en la complejidad de la estructura de los líquenes (en este caso medida a través de la dimensión fractal) se puede asociar con ciertas funciones fisioecológicas como retención de agua, reducción del efecto de fotoinhibición, acumulación



**Fig. 2.** Número de microplásticos (MP) depositados en los talos en función de la dimensión fractal y agrupados según la dosis aplicada.

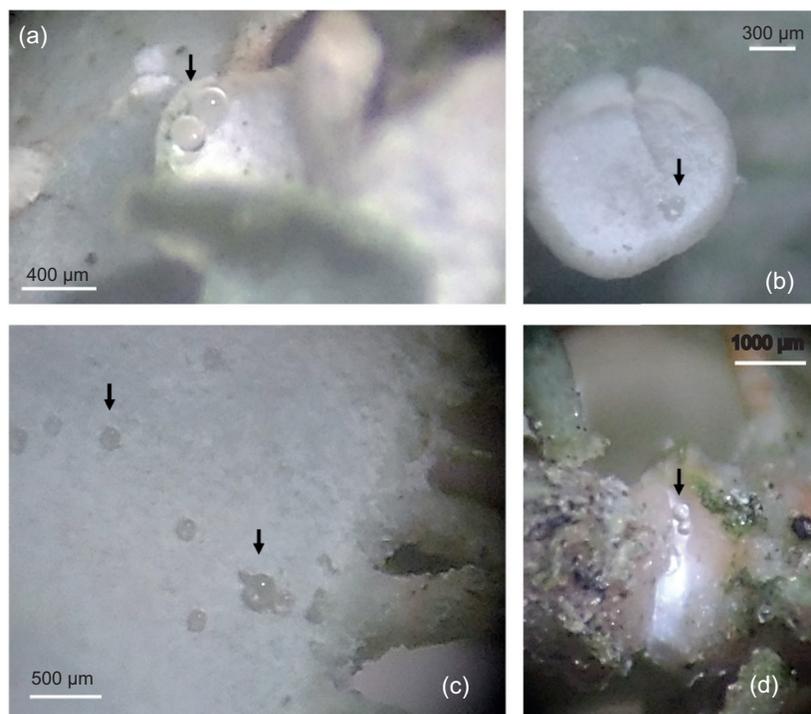
de nutrientes y distribución del agua a lo largo del talo, entre otras (Phinney 2019). Para la deposición de MP, la dimensión fractal funcionaría como un rasgo que aumenta la retención de las microesferas mediado por varios de los efectos ya mencionados (relacionados principalmente con retención de agua) y otros nuevos como retención física de las microesferas en las estructuras y complejidades de los talos (tal como los apotecios, rugosidades, pseudocifelas, etc.). Sin embargo, deben realizarse análisis microscópicos más profundos para apoyar estas afirmaciones.

En cuarto lugar los resultados aquí presentados nos permiten generar una hipótesis de trabajo nueva e interesante: las comunidades líquénicas en ambientes con bajos niveles de perturbación de origen humano presentarán niveles de MP depositados similares a los encontrados en las comunidades líquénicas que se desarrollan en ambientes con altos niveles de perturbación humana. Se ha demostrado que la dimensión fractal puede aumentar en comunidades líquénicas alejadas de los asentamientos humanos (Stanton y Horn 2013). A pesar de que el morfotipo (especies) no estuvo relacionado con el número de microesferas depositadas dentro del modelo lineal generalizado, se observó algún tipo de relación entre la especie y el número de MP depositados (**Fig. 1**). Por otro lado, históricamente se ha vinculado a las comunidades alejadas de las perturbaciones humanas con mayor frecuencia y abundancia de morfotipos más complejos, como el fruticoso (Hawksworth 1970, Varela et al. 2018). En definitiva, proponemos el desarrollo de nuevos trabajos que exploren la abundancia de MP (esferas, fibras, fragmentos) acumulados y depositados

en comunidades líquénicas que se encuentren en áreas con diferentes niveles de perturbación humana.

### Cuestiones metodológicas

El volumen y la frecuencia de rocío con agua desmineralizada, así como la posición de los talos dentro de cada cámara de cristal, tuvo como objetivo que las microesferas no se acumulasen sobre los talos, simulando el arrastre generado por el flujo natural de agua de lluvia en condiciones naturales. Sin embargo, las microesferas de PMMA mostraron un comportamiento de agregación cuando entraron en contacto (**Fig. 3a, c, d**). Este comportamiento de agregación ya ha sido registrado en MP (Alimi et al. 2018, Liu et al. 2021, Wang et al. 2021). La agregación de las microesferas es un comportamiento hidrofóbico común entre los MP (Grause et al. 2022). Los MP presentes en la suspensión utilizada para rociar los talos, así como los MP depositados sobre éstos, se encontraban en un medio acuoso (por lo menos temporalmente). La agregación es uno de los comportamientos ambientales más importantes de los MP, especialmente en ambientes acuáticos, ya que este fenómeno determina su movilidad, distribución y biodisponibilidad (Wang et al. 2021). A partir de los resultados encontrados en el presente experimento, hipotetizamos que la agregación de las microesferas podría ser la causa de la reducción en el número de MP depositados en los talos expuestos a la dosis más alta (12 MP/mL). La agregación de las microesferas podría generar una fuerza de “arrastre”, aumentando el peso y volumen del material plástico en dichas agregaciones y facilitando, en última instancia, el



**Fig. 3.** Microplásticos (MP) depositados (a, b) en el talo de *Punctelia semansiana*, (c) en un apotecio de *Ramalina celastri* y (d) en una apertura del talo de *Usnea dasaea*. Las fotografías fueron obtenidas a posteriori de la primera aplicación de la dosis de 12 MP/mL.

arrastré de los agregados como consecuencia del paso del agua sobre la superficie del talo. Este fenómeno de agregación debe estudiarse con mayor profundidad, ya que puede afectar significativamente los resultados de los experimentos de exposición a microesferas.

Por otro lado, en el presente trabajo se han explorado las microesferas como morfotipo principal, el cual constituye un modelo frecuentemente utilizado en los experimentos de exposición. Sin embargo, los MP más frecuentes encontrados en talos liquénicos han sido las fibras (Loppi et al. 2021), por lo que será necesario, explorar la aplicación de suspensiones con otros morfotipos (fibras, fragmentos). Es importante mencionar que, como consecuencia de los tiempos de exposición, no fue posible registrar efectivamente el fenómeno de acumulación de MP. Es necesario aumentar el tiempo de exposición y el diseño de experimentos que sean representativos de la acumulación y deposición al mismo tiempo. Finalmente, la acumulación y deposición de microesferas dependerá de la disponibilidad de este morfotipo en el ambiente. Trabajos preliminares realizados en el campo experimental donde se recolectaron los talos para este ensayo, no encontraron microesferas en

los talos liquénicos. Esta ausencia permitió ignorar a priori la posibilidad de acumulación y deposición de microesferas que tengan su origen en el campo experimental y que puedan, por lo tanto, interferir con el experimento.

## CONCLUSIONES

El presente trabajo, por primera vez, realiza una exploración experimental de la deposición y acumulación de MP en talos liquénicos. El trabajo pionero de Loppi et al. (2021) demostró de que los líquenes podían acumular MP, mientras que aquí demostramos que las microesferas plásticas pueden ser depositadas e incluso acumuladas en los talos dentro de periodos de tiempo relativamente cortos. La complejidad estructural de los talos liquénicos, representados por su dimensión fractal, demostró ser el factor que determina la cantidad de MP depositados en los talos. Estos resultados generan una nueva hipótesis de trabajo relacionada con la capacidad de acumulación y deposición de MP en comunidades que habitan áreas con diferentes niveles de perturbación humana.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los evaluadores del presente trabajo por sus aportes y correcciones que han mejorado sustancialmente el contenido del mismo. Por otro lado, agradecemos a la Universidad Nacional de Luján por proveernos la infraestructura para llevar a cabo las actividades experimentales.

## REFERENCIAS

- Alimi O.S., Farner Budarz J., Hernández L.M. y Tufenkji N. (2018). Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: Aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. *Environmental Science and Technology* 52 (4), 1704-1724. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05559>
- Allen S., Allen D., Phoenix V.R., Le Roux G., Durántez Jiménez P., Simonneau A. y Galop D. (2019). Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nature Geoscience* 12 (5), 339-344. <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0335-5>
- Allen S., Allen D., Moss K., Le Roux G., Phoenix V.R. y Sonke, J.E. (2020). Examination of the ocean as a source for atmospheric microplastics. *PloS One* 15 (5), e0232746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232746>
- Anagnosti L., Varvaresou A., Pavlou P., Protopapa E. y Carayanni V. (2021). Worldwide actions against plastic pollution from microbeads and microplastics in cosmetics focusing on European policies. Has the issue been handled effectively? *Marine Pollution Bulletin* 162, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111883>
- Avio C.G., Gorbi S. y Regoli F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Marine Environmental Research* 111, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.014>
- Bai Z., Wang N. y Wang M. (2021). Effects of microplastics on marine copepods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 217, 112-243. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112243>
- Bannister P., Bannister J. M. y Blanchon D.J. (2004). Distribution, habitat, and relation to climatic factors of the lichen genus *Ramalina* in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 42 (1), 121-138. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2004.9512894>
- Bannister J., Harrold P. y Blanchon D. (2020). Registros adicionales de líquenes de Nueva Zelanda 51. *Usnea dasaea* Stirt. *Liquenología de Australasia* 86, 114-117.
- Bashir S.M., Kimiko S., Mak, C.W., Fang J. K. H. y Gonçalves D. (2021). Personal care and cosmetic products as a potential source of environmental contamination by microplastics in a densely populated Asian city. *Frontiers in Marine Science* 8, 604. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.683482>
- Carrera M.F. y Carreras H.A. (2011). Efectos de la aplicación de glifosato sobre parámetros químico-fisiológicos en *Usnea amblyoclada* (Müll. Arg.) Zahlbr. *Ecología Austral* 21 (3), 353-361.
- Cera A. y Scalici M. (2021). Freshwater wild biota exposure to microplastics: A global perspective. *Ecology and Evolution* 11 (15), 9904-9916. <https://doi.org/10.1002/ece3.7844>
- Conti M.E. y Cecchetti G. (2001). Biological monitoring: Lichens as bioindicators of air pollution assessment—A review. *Environmental Pollution* 114 (3), 471-492. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00224-4)
- Degtjarenko P., Matos P., Marmor L., Branquinho C. y Randlane T. (2018). Functional traits of epiphytic lichens respond to alkaline dust pollution. *Fungal Ecology* 36, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.08.006>
- Díaz S. y Cabido M. (2001). Vive la difference: Plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 646-655. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02283-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02283-2)
- El Mokni R., Boutabia L., Sebei H. y El-Aouni, M.H. (2015). Species richness, distribution, bioindication and ecology of lichens in oak forests of Kroumiria, North West of Tunisia. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 7 (2), 32-60.
- Ellis C.J., Asplund J., Benesperi R., Branquinho C., Di Nuzzo L., Hurtado P. y Giordani P. (2021). Functional traits in lichen ecology: A review of challenge and opportunity. *Microorganisms* 9 (4), 766. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040766>
- Estrabou C. y Adler M.T. (1999). Novedades sobre Parmeliaceae sensu stricto (Ascomycota liquenizados) de la Provincia de Córdoba, República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 34 (1-2), 63-75.
- Evangeliou N., Grythe H., Klimont Z., Heyes C., Eckhardt S., Lopez-Aparicio S. y Stohl A. (2020). Atmospheric transport is a major pathway of microplastics to remote regions. *Nature Communications* 11 (1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17201-9>
- Fačkovcová Z., Guttová A., Benesperi R., Loppi S., Bellini E., Sanità di Toppi L. y Paoli L. (2019). Retaining unlogged patches in Mediterranean oak forests may preserve threatened forest macrolichens. *iForest-Biogeosciences and Forestry* 12 (2), 187. <https://doi.org/10.3832/ifor2917-012>

- Fodor E. y Hâruta O. (2018). Is the study of fungal shape still useful? *Journal of Bacteriology and Mycology* 6 (2), 77-82. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00180>
- Foley C.J., Feiner Z.S., Malinich T.D. y Höök T.O. (2018). A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. *Science of The Total Environment* 631, 550-559. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.046>
- Fos S. y Clerc P. (2000). The lichen genus *Usnea* on *Quercus suber* in Iberian cork-oak forests. *The Lichenologist* 32 (1), 67-88. <https://doi.org/10.1006/lich.1999.0242>
- Galloway D.J. (2007) *Flora of New Zealand: Lichens, including lichen-forming and lichenicolous fungi*. 2a ed. Manaaki Whenua Press, Lincoln, 2261 pp.
- Grause G., Kuniyasu Y., Chien M.F. y Inoue C. (2022). Separation of microplastic from soil by centrifugation and its application to agricultural soil. *Chemosphere* 288, 132654. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132654>
- Green T.G.A., Snelgar W.P. y Wilkins A.L. (1985). Photosynthesis, water relations and thallus structure of *Stictaceae* lichens. En: *Lichen physiology and cell biology* (Brown D.H., Ed.). Springer, Boston, EUA, 57-75. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2527-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2527-7_5)
- Hale R.C., Seeley M.E., La Guardia M.J., Mai L. y Zeng E.Y. (2020). A global perspective on microplastics. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 125 (1), e2018JC014719. <https://doi.org/10.1029/2018JC014719>
- Hawksworth D.L. (1971). Lichens as litmus for air pollution: A historical review. *International Journal of Environmental Studies* 1 (1-4), 281-296. <https://doi.org/10.1080/00207237108709429>
- Kappen L. y Redon J. (1987). Photosynthesis and water relations of three maritime Antarctic lichen species. *Flora* 179 (3), 215-229. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)30240-2](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)30240-2)
- Klamerus-Iwan A., Kozłowski R., Przybylska J., Solarz W. y Sikora W. (2020). Variability of water storage capacity in three lichen species. *Biologia* 75 (6), 899-906. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00437-7>
- Koch N.M., Matos P., Branquinho C., Pinho P., Lucheta F., de Azevedo Martins S.M. y Vargas V.M.F. (2019). Selecting lichen functional traits as ecological indicators of the effects of urban environment. *Science of the Total Environment* 654, 705-713. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.107>
- Lei K., Qiao F., Liu Q., Wei Z., Qi H., Cui S. y An L. (2017). Microplastics releasing from personal care and cosmetic products in China. *Marine Pollution Bulletin* 123 (1-2), 122-126. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.09.016>
- Liao Z., Ji X., Ma Y., Lv B., Huang W., Zhu X. y Shang X. (2021). Airborne microplastics in indoor and outdoor environments of a coastal city in Eastern China. *Journal of Hazardous Materials* 417, 126007. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126007>
- Liu Y., Liu W., Yang X., Wang J., Lin H. y Yang Y. (2021). Microplastics are a hotspot for antibiotic resistance genes: Progress and perspective. *Science of the Total Environment* 773, 145643. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145643>
- Liu Y., Guo R., Zhang S., Sun Y. y Wang F. (2022). Uptake and translocation of nano/microplastics by rice seedlings: Evidence from a hydroponic experiment. *Journal of Hazardous Materials* 421, 126700. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126700>
- Loehle C. y Li B.L. (1996). Statistical properties of ecological and geologic fractals. *Ecological Modelling* 85 (2-3), 271-284. [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(94\)00177-4](https://doi.org/10.1016/0304-3800(94)00177-4)
- Lopes R.D.S., Pires M., Lima R. y Periard F. (2019). Monitoring air pollution with living organisms. Case study use of lichens as bioindicators in the Miguel Pereira City, Rio De Janeiro, Brazil. *Chemical Engineering Transactions* 74, 253-258. <https://doi.org/10.3303/CET1974043>
- Loppi S., Roblin B., Paoli L. y Aherne J. (2021). Accumulation of airborne microplastics in lichens from a landfill dumping site (Italy). *Scientific Reports* 11 (1), 1-5. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84251-4>
- Marchi A.D. y Cassi D. (1993). Fractal geometry and ecology of lichens. *Fractals* 1 (3), 346-353. <https://doi.org/10.1142/S0218348X9300037X>
- Masura J., Baker J., Foster G. y Arthur C. (2015). Laboratory methods for the analysis of microplastics in the marine environment: Recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments. 1a ed. Silver Spring, Washington, EUA, 31 pp.
- Mateos-Cárdenas A., van Pelt F.N., O'Halloran J. y Jansen M.A. (2021). Adsorption, uptake and toxicity of micro- and nanoplastics: Effects on terrestrial plants and aquatic macrophytes. *Environmental Pollution* 284, 117-183. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117183>
- Matthews S., Mai L., Jeong C.B., Lee J.S., Zeng E.Y. y Xu E.G. (2021). Key mechanisms of micro- and nanoplastic (MNP) toxicity across taxonomic groups. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 247, 109056. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109056>
- Morales A.C., Tomlin J.M., West C.P., Rivera-Adorno F.A., Peterson B.N., Sharpe S. A. y Laskin A. (2022). Atmospheric emission of nanoplastics from sewer pipe repairs. *Nature Nanotechnology* 17 (11), 1171-1177. <https://doi.org/10.1038/s41565-022-01219-9>

- Napper I.E., Bakir A., Rowland S.J. y ThomPon R.C. (2015). Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine Pollution Bulletin* 99 (1-2), 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.07.029>
- Nash T.H., Ryan B.D., Gries C., y Bungartz F. (2004). Lichen flora of the greater Sonoran Desert region. Vol 2. 1a ed. Unlimited, Arizona, EUA, 742 pp.
- Phinney N.H. (2019). 3D modelling of thallus topography of *Lobaria pulmonaria* facilitates understanding of water storage pools. *The Lichenologist* 51 (1), 89-95. <https://doi.org/10.1017/S0024282918000531>
- PE (2019). Plastics—The facts 2019. An analysis of European plastics production, demand and waste data. Plastics Europe [en línea]. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/1804-plastics-facts-2019-06/03/2021>
- Qian Z.H.O.U., ChongGuo T.I.A.N y YongMing L.U.O. (2017). Various forms and deposition fluxes of microplastics identified in the coastal urban atmosphere. *Chinese Science Bulletin* 62 (33), 3902-3909. <https://doi.org/10.1006/lich.1999.0242>
- Shorrocks B., Marsters J., Ward I. y Evnnett P.J. (1991). The fractal dimension of lichens and the distribution of arthropod body lengths. *Functional Ecology* 457-460. <https://doi.org/10.2307/2389627>
- Stanton D.E. y Horn H.S. (2013). Epiphytes as “filter-drinkers”: Life-form changes across a fog gradient. *The Bryologist* 116 (1), 34-42. <https://doi.org/10.1639/0007-2745-116.1.034>
- Van Weert S., Redondo-Hasselerharm P.E., Diepens N.J. y Koelmans A.A. (2019). Effects of nanoplastics and microplastics on the growth of sediment-rooted macrophytes. *Science of the Total Environment* 654, 1040-1047. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.183>
- Varela Z., López-Sánchez G., Yáñez M., Pérez C., Fernández J.A., Matos P. y Aboal J. R. (2018). Changes in epiphytic lichen diversity are associated with air particulate matter levels: The case study of urban areas in Chile. *Ecological Indicators* 91, 307-314. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.023>
- Veneklaas E.J., Zagt R.J., Van Leerdam A., Van Ek R., Broekhoven A.J. y van Genderen M. (1990). Hydrological properties of the epiphyte mass of a montane tropical rain forest, Colombia. *Vegetatio* 89 (2), 183-192. <https://doi.org/10.1007/BF00032170>
- Vivekanand A.C., Mohapatra S. y Tyagi V.K. (2021). Microplastics in aquatic environment: Challenges and perspectives. *Chemosphere* 282, 131151. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131151>
- Wang T., Li B., Zou X., Wang Y., Li Y., Xu Y. y Yu W. (2019). Emission of primary microplastics in mainland China: Invisible but not negligible. *Water Research* 162, 214-224. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.042>
- Wang X., Bolan N., Tsang D.C., Sarkar B., Bradney L. y Li Y. (2021). A review of microplastics aggregation in aquatic environment: Influence factors, analytical methods, and environmental implications. *Journal of Hazardous Materials* 402, 123496. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123496>
- Zhang Y., Kang S., Allen S., Allen D., Gao T. y Sillanpää M. (2020). Atmospheric microplastics: A review on current status and perspectives. *Earth-Science Reviews* 203, 103118. <https://doi.org/10.1016/j.earsci-rev.2020.103118>