

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

**“ESTUDIO ACERCA DE LA CO-DEGRADACIÓN DE MICROPLÁSTICOS
SUPLEMENTADOS CON PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS POR
MEDIO DE BACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO BACILLUS”**

QUE PRESENTA
DENZEL JESÚS CARRILLO ORTIZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA APLICADA

MARZO 2026



**ESTUDIO ACERCA DE LA CO-DEGRADACIÓN DE MICROPLÁSTICOS
SUPLEMENTADOS CON PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS POR MEDIO
DE BACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO *BACILLUS***

Por:

QFB Denzel Jesús Carrillo Ortiz

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación
en Microbiología Aplicada**

DIRECTOR:

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

CO-DIRECTOR:

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado

Monterrey, Nuevo León

27 de marzo de 2026

**“ESTUDIO ACERCA DE LA CO-DEGRADACIÓN DE MICROPLÁSTICOS
SUPLEMENTADOS CON PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS POR MEDIO
DE BACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO *BACILLUS*”**

Aprobación de Tesis:

Presidente

Secretario

Vocal

Dr. Javier Rivera De la Rosa
Sub-Director De Posgrado

**“ESTUDIO ACERCA DE LA CO-DEGRADACIÓN DE MICROPLÁSTICOS
SUPLEMENTADOS CON PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS POR MEDIO
DE BACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO *BACILLUS*”**

Revisión de Tesis:

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu

Asesor

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado

Co-Asesora

Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó

Comité Tutorial

Dra. Gabriela Elizabeth Quintanilla Villanueva

Comité Tutorial

Dr. Julio Silva Mendoza

Comité Tutorial

Dr. Javier Rivera De la Rosa

Sub-Director de Posgrado

RESUMEN

Denzel Jesús Carrillo Ortiz

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: ESTUDIO ACERCA DE LA CO-DEGRADACIÓN DE MICROPLÁSTICOS SUPLEMENTADOS CON PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS POR MEDIO DE BACTERIAS PERTENECIENTES AL GÉNERO BACILLUS

Número de páginas:

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada.

Área de estudio: Microbiología Aplicada

La acumulación de microplásticos y su papel como vectores de contaminantes, como los pesticidas organofosforados, representan una problemática ambiental relevante, por lo que el uso de microorganismos con capacidad de degradación ha cobrado interés. En este trabajo se evaluó un consorcio bacteriano del género *Bacillus* en procesos de aclimatación, biodegradación y codegradación de micropartículas derivadas de exfoliantes faciales. La biodegradación se analizó mediante FTIR, SEM y observaciones macroscópicas, mientras que la codegradación se evaluó mediante la adición de glifosato y AMPA. Finalmente, se realizaron pruebas de toxicidad aguda con *Eisenia foetida*, evaluando la supervivencia y el peso. Los resultados indican que el consorcio se mantuvo activo y que los productos de codegradación presentaron una toxicidad menor que la de los controles, lo que evidencia su potencial como alternativa biotecnológica.

Firma del asesor: _____

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	12
Antecedentes	15
Hipótesis	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos	20
Metodología.....	21
Extracción y caracterización de microplásticos primarios de exfoliantes comerciales....	21
Reactivación, conservación y criopreservación del consorcio microbiano de trabajo.....	24
Ensayo de aclimatación y adaptación metabólica a la presencia de microplásticos como única fuente de carbono	25
Monitoreo fisiológico del consorcio de trabajo durante los ensayos de aclimatación	28
Confirmación de la actividad celulolítica del consorcio de trabajo involucrada en la biodegradación de polímeros naturales.....	30
Ensayos de biodegradación de microplásticos primarios por los consorcios de trabajo aclimatados	31
Ensayos de co-degradación de microplásticos primarios funcionalizados con pesticidas organofosforados.....	32
Bioensayos de toxicidad aguda en anélidos (<i>Eisenia foetida</i>)	35
Resultados y discusión	37
Evaluación morfológica y tinción de Gram del Consorcio C-Malatió	37
Extracción y caracterización de microplásticos primarios de exfoliantes comerciales....	37
Ensayo de aclimatación y adaptación metabólica a la presencia de microplásticos como única fuente de carbono	41
Monitoreo fisiológico del consorcio de trabajo durante los ensayos de aclimatación	50
Confirmación de la actividad celulolítica del consorcio de trabajo involucrada en la biodegradación de polímeros naturales.....	54
Ensayos de biodegradación de microplásticos primarios por los consorcios de trabajo aclimatados	55
<i>Monitoreo fisiológico de los consorcios de trabajo durante los ensayos de biodegradación de microplásticos</i>	55
<i>Análisis gravimétrico de los microplásticos sometidos a los ensayos de biodegradación</i>	60
<i>Análisis morfológico y de ultraestructura superficial de los microplásticos sometidos a los ensayos de biodegradación</i>	63

<i>Análisis de los grupos funcionales de los microplásticos sometidos a los ensayos de biodegradación por FTIR.....</i>	<i>69</i>
Ensayos de codegradación de microplásticos primarios funcionalizados con pesticidas organofosforados.....	75
<i>Monitoreo fisiológico de los consorcios de trabajo durante los ensayos de codegradación de microplásticos funcionalizados con pesticidas organofosforados..</i>	<i>75</i>
<i>Análisis gravimétrico de los microplásticos funcionalizados sometidos a los ensayos de co-degradación.....</i>	<i>79</i>
<i>Análisis morfológico y de ultraestructura superficial de los microplásticos sometidos a los ensayos de codegradación.....</i>	<i>83</i>
<i>Monitoreo fisiológico del consorcio de trabajo durante los ensayos de codegradación.....</i>	<i>85</i>
Bioensayos de toxicidad aguda en anélidos (<i>Eisenia foetida</i>)	92
Conclusiones.....	104
Perspectivas	107
Referencias	109

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. MICROORGANISMOS CAPACES DE BIODEGRADAR POLÍMEROS PLÁSTICOS.	15
TABLA 2. COMPOSICIÓN DE LOS REACTIVOS QUE CONFORMAN EL MEDIO M9 (G/500ML).....	26
TABLA 3. PROPORCIÓN DEL MEDIO LB CON MICROPLÁSTICOS Y MEDIO DE TRABAJO DURANTE LA ACLIMATACIÓN PARA LOS MICROPLÁSTICOS DE LA MARCA NEUTROGENA.	27
TABLA 4. PROPORCIÓN DEL MEDIO LB CON MICROPLÁSTICOS Y MEDIO DE TRABAJO DURANTE LA ACLIMATACIÓN PARA LOS MICROPLÁSTICOS DE LA MARCA NIVEA.	28
TABLA 5. COMPOSICIÓN DEL MEDIO AGAR-CMC.	31
TABLA 6. NOMENCLATURA EMPLEADA PARA LOS TRATAMIENTOS DE CODEGRADACIÓN.	33
TABLA 7. RESULTADOS CUANTITATIVOS Y CUALITATIVOS DEL MATERIAL RECUPERADO DURANTE LA EXTRACCIÓN.	38
TABLA 8. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE LOS DISTINTOS PORCENTAJES DE ACLIMATACIÓN.....	43
TABLA 9. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA DE LOS DISTINTOS PORCENTAJES DE ACLIMATACIÓN.....	46
TABLA 10. VARIACIÓN DE LA MASA POR EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN Y EL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN EN LA BIODEGRADACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE NIVEA.....	61
TABLA 11. VARIACIÓN DE LA MASA POR EL PROCESO DE ACLIMATACIÓN Y PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN EN LA BIODEGRADACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE NIVEA.....	62
TABLA 12. VARIACIÓN DE LA MASA POR EL PROCESO DE CO-DEGRADACIÓN Y EL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN EN LA BIODEGRADACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE NIVEA.....	80
TABLA 13. VARIACIÓN DE LA MASA POR EL PROCESO DE CODEGRADACIÓN Y EL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN EN LA BIODEGRADACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE NEUTROGENA.	82
TABLA 14. PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA EN LOMBRICES DE TIERRA (EISENIA FOETIDA), EVALUANDO LAS VARIACIONES DE PESO A LOS 0, 7, 14 Y 21 DÍAS PARA LA MARCA NIVEA.	93
TABLA 15. PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA EN LOMBRICES DE TIERRA (EISENIA FOETIDA), EVALUANDO LAS VARIACIONES DE PESO A LOS 0, 7, 14 Y 21 DÍAS PARA LA MARCA NEUTROGENA.....	94
TABLA 16. PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA EN LOMBRICES DE TIERRA (EISENIA FOETIDA), EVALUANDO LA SUPERVIVENCIA A LOS 0, 7, 14 Y 21 DÍAS EN LA MARCA NIVEA.	95
TABLA 17 PRUEBAS DE TOXICIDAD AGUDA EN LOMBRICES DE TIERRA (EISENIA FOETIDA), EVALUANDO LA SUPERVIVENCIA A LOS 0, 7, 14 Y 21 DÍAS EN LA MARCA NEUTROGENA.	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. TIPOS DE PLÁSTICOS RECICLABLES (LA CLASIFICACIÓN DE LOS PLÁSTICOS, 2020).	12
FIGURA 2. EXTRACCIÓN DE LOS MICROPLÁSTICOS CON BOMBA DE VACÍO.	22
FIGURA 3. OBSERVACIÓN DE COMO LUCE EL CRECIMIENTO DEL CONSORCIO C-MALATIÓN EN CALDO LB POR 48 HORAS, CON LA PRESENCIA DE UNA CAPA DE BIOMASA EN LA SUPERFICIE DEL MATRAZ.	24
FIGURA 4. IMÁGENES DEL PROCESO DE PREPARACIÓN DEL EXPERIMENTO DE TOXICIDAD AGUDA, DONDE DE IZQUIERDA A DERECHA SE PUEDE VER CÓMO SE SACAN DEL LUGAR DE CULTIVO DE LAS LOMBRICES, PARA SELECCIONAR 10, LAVARLAS PARA QUITAR TIERRA Y SER PESADAS PARA PODER PONERLAS EN EL SISTEMA CONTROLADO DEL CONTENEDOR DE TAPA ROJA QUE TIENE 150 G DE TIERRA CON ALIMENTO Y EL CONTAMINANTE.	36
FIGURA 5. OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO ÓPTICO DEL CONSORCIO C-MALATIÓN CON MAGNIFICACIÓN DE 100X.	37
FIGURA 6. ESPECTRO FTIR DE UNA MICROPARTÍCULA DE NIVEA ANTES DE LA EXPERIMENTACIÓN REALIZADA.	39
FIGURA 7. ESPECTRO FTIR DE UNA MICROPARTÍCULA DE NEUTROGENA ANTES DE LA EXPERIMENTACIÓN REALIZADA.	40
FIGURA 8. ESPECTROS FT-IR DE (A) LA CELULOSA MICROCRISTALINA, (B) LA CELULOSA REGENERADA Y (C) LA FIBRA COMPUESTA DE CELULOSA-SÍLICE (JIA ET AL., 2011).	41
FIGURA 9. ANÁLISIS FTIR DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD (VELANDIA CABRA, J. R. 2017).	41
FIGURA 10. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN POR FTIR DE LAS DOS MARCAS DE EXFOLIANTES COMERCIALES (NIVEA Y NEUTROGENA).	49
FIGURA 11. COMPOSICIÓN DEL CONSORCIO CULTIVADO EN DILUCIÓN EN SERIE, ANTES Y DESPUÉS DE LA ACLIMATACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS OBTENIDAS A PARTIR DE LOS EXFOLIANTES FACIALES.	52
FIGURA 12. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN SERRATIA MARCESCENS (IZQUIERDA) Y EL CONSORCIO DE TRABAJO (DERECHA).	55
FIGURA 13. IMÁGENES DE FROTIS (GRAM EN LA IZQUIERDA Y TINCIÓN DE VERDE DE MALAQUITA EN LA DERECHA) DEL CONSORCIO DE TRABAJO EN MICROPARTÍCULAS DE NIVEA.	56
FIGURA 14. IMÁGENES DE FROTIS (GRAM EN LA IZQUIERDA Y TINCIÓN DE VERDE DE MALAQUITA EN LA DERECHA) DEL CONSORCIO DE TRABAJO EN MICROPARTÍCULAS DE NEUTROGENA.	58
FIGURA 15. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS MICROPARTÍCULAS SOMETIDAS A ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN.	64
FIGURA 16. ANÁLISIS MICROSCÓPICO MEDIANTE SEM DE LAS MICROPARTÍCULAS DE NIVEA SOMETIDAS A ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN, LAS IMÁGENES SON PERTENECIENTES AL FINAL DE LA BIODEGRADACIÓN.	66
FIGURA 17. ANÁLISIS MICROSCÓPICO MEDIANTE SEM DE LAS MICROPARTÍCULAS DE NIVEA SOMETIDAS A ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN.	67
FIGURA 18. ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS FTIR DE LAS MICROPARTÍCULAS DE NIVEA DEL CONTROL SIN INÓCULO.	70
FIGURA 19. ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS FTIR DE LAS MICROPARTÍCULAS DE NIVEA CON INÓCULO.	70
FIGURA 20. ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS FTIR DE LAS MICROPARTÍCULAS DE NEUTROGENA SIN INÓCULO.	72
FIGURA 21. ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS FTIR DE LAS MICROPARTÍCULAS DE NEUTROGENA CON INÓCULO.	72
FIGURA 22. ANÁLISIS DE ESPECTROS FTIR DE (A) PELÍCULA DE PS NO DEGRADADA Y (B) PELÍCULA DE PS DESPUÉS DE 60 DÍAS DE TRATAMIENTO MICROBIANO (GANESH KUMAR ET AL. 2021).	73
FIGURA 23. RESULTADO DE LAS TINCIONES DE GRAM Y VERDE DE MALAQUITA DURANTE LOS EXPERIMENTOS DE CO-DEGRADACIÓN.	75

FIGURA 24. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LAS MICROPARTÍCULAS SOMETIDAS A LOS ENSAYOS DE CO-DEGRADACIÓN.	84
FIGURA 25. COMPOSICIÓN DEL CONSORCIO CULTIVADO EN DILUCIÓN EN SERIE TRAS LOS EXPERIMENTOS DE CO-DEGRADACIÓN.	86
FIGURA 26. LOMBRIZ DE COLOR VERDE DESPUÉS DE UNA EXPOSICIÓN AL MICROPLÁSTICO SUPLEMENTADO CON GLIFOSATO, NO TRATADO CON EL CONSORCIO.	98
FIGURA 27. PARTE DE UNA LOMBRIZ SEPARADA DURANTE EL PESAJE, DEBIDO AL AGOTAMIENTO FRENTE AL CONTAMINANTE.	99
FIGURA 28. MICROPLÁSTICOS DE NEUTROGENA EN UN SISTEMA DE TOXICIDAD AGUDA.	99
FIGURA 29. HUEVO DE LOMBRIZ GENERADO EN UNO DE LOS AMBIENTES DE EXPERIMENTACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA.	100
FIGURA 30. LOMBRIZ CON MICROPARTÍCULA DE NIVEA EN UN SISTEMA EXPERIMENTAL.	100
FIGURA 31. LOMBRIZ CON MICROPLÁSTICO DE NEUTROGENA EN UN SISTEMA DE EXPERIMENTACIÓN.	101
FIGURA 32. LOMBRIZ CON MICROPLÁSTICO PROCEDENTE DE NEUTROGENA PEGADO AL ORGANISMO, DENTRO DE LA EXPERIMENTACIÓN.	101
FIGURA 33. CRECIMIENTO DE BROTES DE PLANTAS EN LOS EXPERIMENTOS DE TOXICIDAD AGUDA.	102
FIGURA 34. EXPERIMENTACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON 2-CLOROACETAMIDA.	102
FIGURA 35. LIBERACIÓN DE LAS LOMBRICES DE TIERRA EN UN ÁREA VERDE, TERMINADA LA EXPERIMENTACIÓN.	103

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
mL	Mililitros
mg	Miligramos
g	Gramos
L	Litro
FTIR	Espectrometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier
h	Hora
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minuto
μl	Microlitros
UV	Ultravioleta
SEM	Microscopio electrónico de barrido, por sus siglas en ingles
Mps	Micropartículas
A	Neutrogena
C	Nivea
Na ₂ HPO ₃	fosfito disódico
AMPA	Ácido aminometilfosfónico

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

PHB	Polihidroxibutirato
PET	Polietileno Tereftalato
PE	Polietileno
AG	Neutrogena suplementado con glifosato
AA	Neutrogena suplementado con AMPA
AF	Neutrogena suplementado con Na_2HPO_3
CG	Nivea suplementado con glifosato
CA	Nivea suplementado con AMPA
CF	Nivea suplementado con Na_2HPO_3

Introducción

El plástico, producido y comercializado desde inicios del siglo XX, representó una innovación significativa para el desarrollo social de aquella época. Su aparición contribuyó a sustituir recursos naturales que comenzaban a escasear, como la cera, el caucho y el marfil, ofreciendo además una alternativa más accesible económicamente. El impacto de estos materiales en la tecnología y en el bienestar de la población ha sido tan relevante que, en la actualidad, constituyen un componente esencial de la infraestructura y de numerosos productos que sostienen el funcionamiento de la sociedad moderna (Vázquez, 2023; Connacher, 2008).

Hoy en día se reconocen diversos tipos de plásticos con propiedades específicas que oscilan desde una alta resistencia y capacidad de adhesión, hasta características que favorecen una mayor degradabilidad. No obstante, una vez que estos materiales cumplen su función en la vida cotidiana, suelen ser desechados o destinados a procesos de reciclaje (Hardin, 2021). Este último enfrenta una problemática considerable, ya que de las siete categorías de plásticos existentes (Figura 1), únicamente los tipos 1 y 2 se reciclan de manera sistemática. Aun dentro de estas categorías, se estima que menos del 40 % es efectivamente reciclado, mientras que el resto termina en sitios de disposición final (Gob. Mexico, 2018).



Figura 1. Tipos de plásticos reciclables (La clasificación de los plásticos, 2020).

Como consecuencia de esta gestión deficiente, los plásticos se han convertido en un serio problema de contaminación ambiental, lo cual, aunado a su bajo potencial de biodegradabilidad, favorece su sobreacumulación en los ecosistemas. Si bien inicialmente se consideraba que este residuo macroscópico era el principal desafío, en años recientes se ha observado que el deterioro mecánico que sufren los plásticos, especialmente durante su transporte y exposición ambiental, provoca su fragmentación en partículas diminutas denominadas microplásticos (Labarta, 2019). Estos se definen como piezas de material plástico, tales como fibras, partículas y películas, con tamaños que varían entre 0.1 y 100 μm . Al ser invisibles al ojo humano, estas partículas logran infiltrarse en todos los ecosistemas del planeta, encontrándose por cientos de toneladas en océanos, suelos, aire e incluso dentro del cuerpo humano, lo que representa un riesgo latente para la salud (Parker, 2022).

La toxicidad de los microplásticos es un tema de debate actual, considerándose si el polímero y sus macromoléculas inertes representan o no un riesgo directo para el ser humano. Sin embargo, diversos estudios señalan que los aditivos incorporados durante su fabricación para conferirles propiedades específicas, como la coloración, la resistencia a la radiación ultravioleta o una mayor estabilidad física y química del material, pueden tener un impacto negativo en la salud humana (Yanes, 2024; Castañeta et al., 2020). Adicionalmente, debido a su naturaleza química y a su elevada relación superficie–volumen, los microplásticos poseen una alta capacidad de adsorber contaminantes ambientales. Sustancias xenobióticas como pesticidas organofosforados, antibióticos e hidrocarburos pueden adherirse fuertemente a su superficie, permitiendo que estas micropartículas actúen como vectores que concentran y transportan contaminantes a lo largo de los ecosistemas, alcanzando finalmente al ser humano mediante la cadena trófica (Laforsch, 2022).

Ante esta amplia distribución ambiental, la eliminación de los microplásticos ha despertado un creciente interés científico. Aunque tradicionalmente se han empleado métodos físicos y químicos, recientemente se han comenzado a explorar alternativas biológicas en las que los microorganismos desempeñan un papel relevante. A través de sus actividades metabólicas, estos pueden fragmentar progresivamente los polímeros y favorecer su transformación en compuestos de

menor peso molecular, lo que puede incluso conducir a su mineralización en dióxido de carbono y agua (Castañeta et al., 2020). La eficiencia de este proceso depende de factores como la cinética del crecimiento microbiano, las condiciones ambientales y las propiedades estructurales del material (Laforsch, 2022).

En este contexto, la biodegradación bacteriana constituye una de las opciones más prometedoras, basada en la capacidad de los microorganismos para utilizar sustancias complejas como fuente de carbono y energía. Este fenómeno puede ocurrir mediante diversas estrategias, como el uso de consorcios microbianos, en los que la interacción coordinada de diferentes especies permite una división de funciones metabólicas que evita la acumulación de intermediarios tóxicos (Roberts et al., 2020). Asimismo, la formación de biofilms en la superficie del microplástico facilita la adhesión bacteriana mediante una matriz extracelular que optimiza la estabilidad del proceso (Gulizia et al., 2025; Fortin et al., 2025). A nivel molecular, este proceso se ve mediado por la secreción de enzimas extracelulares que fragmentan el polímero en moléculas pequeñas y solubles, que posteriormente son procesadas por enzimas intracelulares mediante rutas de hidrólisis, oxidación o reducción (Cau et al., 2024).

Los plásticos y los polímeros naturales, como la celulosa, comparten similitudes estructurales y químicas al ser macromoléculas formadas por la repetición de monómeros unidos entre sí por enlaces covalentes. Mientras que la celulosa está constituida por unidades de glucosa con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ glucosídicos, los polímeros sintéticos, como el polietileno, se originan a partir de monómeros como el etileno. Tanto la celulosa como los plásticos sintéticos presentan un alto peso molecular y cadenas largas, lo que determina sus propiedades físicas y mecánicas. En la celulosa, los grupos hidroxilo forman puentes de hidrógeno que dan origen a microfibrillas de alta resistencia, de manera análoga a como las interacciones entre cadenas en los polímeros sintéticos definen su cristalinidad, flexibilidad, resistencia y estabilidad térmica (Sophonrat & Yang, 2017). A pesar de sus orígenes tan distintos, ambos materiales comparten principios fundamentales de organización molecular que justifican su comparación y estudio conjunto en el contexto de la biodegradación.

Antecedentes

La preocupación científica por los microplásticos y su impacto ambiental adquirió una relevancia crítica a partir del estudio de Thompson et al. (2004), quienes alertaron sobre los riesgos persistentes que estos contaminantes representan para los ecosistemas acuáticos y terrestres. Este hallazgo impulsó una amplia línea de investigación orientada a la búsqueda de soluciones biológicas. En este sentido, Shah et al. (2008) realizaron una de las primeras recopilaciones exhaustivas de especies bacterianas con capacidad para degradar polímeros sintéticos (Tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos capaces de biodegradar polímeros plásticos.

Microorganismos y enzimas de estudio	Plástico degradado	Porcentaje de biodegradación	Origen del microorganismo	Autores
<i>Ideonella sakaiensis</i> (PETasa)	PET	90-100% en 6 semanas	Aislada de un basurero municipal de Japón	(Yoshida et al., 2016)
<i>Thermobifida fusca</i> (TfH)	PET	50 % en 3 semanas	Centro Alemán de Recursos para el Material Biológico	(Müller et al., 2005)
<i>Thermobifida cellulosilytica</i> (Thc_Cut1)	PET	37% en 3 semanas	Centro Alemán de Recursos para el Material Biológico	(Herrero Acero et al., 2011)
<i>Saccharomonospora viridis</i> (Cut190 S226P/R228S)	PET	27% en 3 días	Aislada de suelos	(Kawai et al., 2014)
<i>Bacillus subtilis</i> (BsEstB/ BHET)	PET	11% en 60 días	Aislada de suelos contaminados con petróleo	(Ribitsch et al., 2011)

Tabla 1 (continuación). Estudios reportados sobre microorganismos y enzimas involucrados en la biodegradación de polímeros plásticos, incluyendo el plástico degradado, porcentaje de biodegradación y origen del microorganismo.

Microorganismos y enzimas de estudio	Plástico degradado	Porcentaje de biodegradación	Origen del microorganismo	Autores
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Alcano hidroxilasa)	PP/PET	17.2% en 40 días	Aislada de suelos contaminados con petróleo	(Wang et al., 2022)
<i>Aneurinibacillus</i> sp. (Lipasa)	PP	44% en 140 días	Aislada de aguas residuales	(Skariyachan et al., 2018)
<i>Brevibacillus</i> sp. (Lipasa)	PP	44% en 140 días	Aislada de aguas residuales	(Skariyachan et al., 2018)
<i>Microbacterium paraoxydans</i> (Lac)	PE	61% en 2 meses	Aislado ambiental	(Rajandas et al., 2012)
<i>Klebsiella</i> EMBL-1 (Catalasa-peroxidasa)	PVC	19% en 3 meses	Microbiota intestinal de la larva de <i>Spodoptera frugiperda</i>	(Zhang et al., 2022)
<i>Rhodococcus equi</i> (Ureasa hidrolasa)	Poliuretano	70% en 10 días	Aislada de suelo en Japón	(Akutsu-Shigeno et al., 2006)
<i>Bacillus paralicheniformis</i> (Alcano monooxigenasa y citocromo p450)	PS	34% en 2 meses	Aislada del Mar Árabe	(Ganesh Kumar et al., 2021)
<i>Oleispira antarctica</i>	PET y PCL	18 % en 3 días	Aisladas de la Antártida	(Blázquez-Sánchez et al., 2022)

Tabla 1 (continuación). Estudios reportados sobre microorganismos y enzimas involucrados en la biodegradación de polímeros plásticos, incluyendo el plástico degradado, porcentaje de biodegradación y origen del microorganismo.

<i>Microorganismos y enzimas de estudio</i>	<i>Plástico degradado</i>	<i>Porcentaje de biodegradación</i>	<i>Origen del microorganismo</i>	<i>Autores</i>
<i>Moraxella</i> sp.	PET y PCL	18 % en 3 días	Aisladas de la Antártida	(Blázquez-Sánchez et al., 2022)
<i>Enterobacter</i> sp.	PHB	60% en 90 días	Aislada de agua tratada para césped	(Cazaudehore et al., 2023)
<i>Cupriavidus</i> sp.	PHB	60% en 90 días	Aislada de agua tratada para césped	(Cazaudehore et al., 2023)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (PpEst poliesterasa)	PBAT	5% en 72 horas	Cepa de colección	(Wallace et al., 2017)
<i>Enterobacter asburiae</i> (Hidrolasas)	PE	6% en 60 días	Aislada del microbioma de la mosca blanca de la India	(Yang et al., 2014)
Consorcio compuesto de <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> y <i>Bacillus</i>	PE	3% en 42 días	Aisladas de un basurero	(Rafiemanzel et al., 2015)

Posteriormente, las investigaciones evolucionaron del aislamiento de microorganismos a la caracterización de sus sistemas enzimáticos. Un hito en esta área fue el trabajo de Herrero Acero et al. (2011), centrado en la capacidad degradativa de las enzimas producidas por miembros del género *Thermobifida*. Sin embargo, el descubrimiento de *Idionella sakaiensis* por Yoshida et al. (2016) marcó un punto de inflexión, al demostrar la existencia de una enzima (PETasa) capaz de

degradar y asimilar el tereftalato de polietileno (PET) con una eficiencia cercana al 100% en condiciones controladas.

Esto ha motivado una tendencia creciente en la identificación de cepas con potencial biotecnológico para degradar diversos tipos de polímeros. Estudios realizados con géneros como *Saccharomonospora* y *Bacillus* han reportado tasas de biodegradación variables, que suelen verse influenciadas directamente por: 1) el origen del microorganismo, que suele ser aislado de sitios contaminados o de microbiotas de insectos; y 2) el tipo de plástico, incluyendo polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de vinilo (PVC) y poliestireno (PS). Por ejemplo, se ha documentado que bacterias como *Microbacterium paraoxydans* y *Rhodococcus equi* presentan una notable afinidad por el PE y el poliuretano, alcanzando niveles de degradación de hasta el 61% y el 70% respectivamente. (Rajandas et al., 2012; Akutsu-Shigeno et al., 2006).

A pesar de los avances en cultivos puros, investigaciones como la de Roberts et al. (2020) sugieren que el uso de consorcios microbianos ofrece ventajas competitivas frente al empleo de enzimas aisladas. Este enfoque aprovecha la sinergia metabólica entre diferentes especies, que pueden incluir hongos, bacterias y larvas, lo que se traduce en una mayor eficiencia en la fragmentación de las cadenas poliméricas, así como en una mayor estabilidad frente a las variaciones del entorno. Esta complejidad es fundamental al considerar la naturaleza química de los plásticos comerciales, que no son polímeros puros. Como señalan Choi et al. (2024), la presencia de aditivos, como plastificantes, estabilizantes UV, retardadores de llama y agentes antibacteriales, altera significativamente la cinética de degradación y la susceptibilidad del material al ataque microbiano (Eljarrat, 2019).

Un hallazgo de particular importancia es la versatilidad del género *Bacillus*. Estudios liderados por Salunkhe et al. (2013), Pickering et al. (2024) y Acosta-Cortés et al. (2019) demostraron que especies como *B. subtilis* y *B. cereus* poseen la capacidad de biodegradar compuestos organofosforados, entre ellos el glifosato y su principal producto de degradación, el ácido aminometilfosfónico (AMPA). Estos compuestos

xenobióticos suelen ser absorbidos por los microplásticos, convirtiéndolos en vectores de toxicidad ambiental (Bolívar, 2022). Por tanto, el estudio de *Bacillus* podría ser clave para la codegradación de los componentes químicos de los microplásticos y de los contaminantes que suelen adherirse con mayor facilidad a ellos, lo que permite proponer metodologías de biorremediación más realistas y robustas para abordar un problema tan importante para la salud ambiental.

Dado que a que aunado a lo anterior se ha descrito que *B. subtilis* puede inducir la expresión de celulasas con alta actividad específica para hidrolizar materiales celulósicos y otras enzimas degradadoras de polímeros sintéticos (Malik & Javed, 2021), este trabajo explora el uso de consorcios microbianos compuestos por especies del género *Bacillus* para co-degradar estos vectores de contaminación atmosférica compuestos de microplásticos funcionalizados con sustancias xenobióticas peligrosas como lo son, los pesticidas organofosforados.

Hipótesis

Las bacterias del género *Bacillus* poseen la capacidad de codegradar tanto los microplásticos como los compuestos tóxicos adheridos a ellos, incluido el pesticida organofosforado glifosato, lo que permitirá desarrollar estrategias biotecnológicas innovadoras para reducir simultáneamente la contaminación por microplásticos y contaminantes asociados.

Objetivo general

Evaluar la capacidad de las bacterias del género *Bacillus* para codegradar microplásticos y compuestos tóxicos adheridos, como el pesticida organofosforado glifosato.

Objetivos específicos

1. Reactivar y aclimatar un consorcio bacteriano de trabajo del género *Bacillus*.
2. Evaluar la capacidad del consorcio bacteriano para biodegradar micropartículas de plástico.
3. Analizar la codegradación de micropartículas suplementadas con pesticidas organofosforados
4. Evaluar la toxicidad aguda de los productos resultantes de la codegradación de micropartículas y pesticidas organofosforados.

Metodología

Extracción y caracterización de microplásticos primarios de exfoliantes comerciales

Los microplásticos empleados en esta investigación se obtuvieron a partir de dos productos comerciales de exfoliación facial de las marcas Nivea y Neutrogena, seleccionados por su elevada densidad de microesferas plásticas en su formulación. Para el proceso de extracción, se utilizó el volumen total de cada presentación (124 mL para Neutrogena y 150 mL para Nivea), el cual se suspendió en agua destilada bajo agitación mecánica suave. Este procedimiento facilitó la lixiviación de los componentes espesantes y la liberación de las micropartículas contenidas en el gel. Una vez homogeneizada la suspensión, se permitió reposar las muestras para lograr una separación por densidad. Las microesferas de Nivea tendieron a sedimentarse, mientras que las de Neutrogena se mantuvieron en suspensión coloidal.

Una vez precipitadas, las partículas se recuperaron mediante filtración al vacío sobre un papel filtro con porosidad adecuada de grado 1 marca Whatman, con el fin de concentrar los microplásticos y eliminar los líquidos remanentes. Las esferas retenidas fueron, a su vez, recolectadas cuidadosamente traspasándolas del papel filtro a un tubo eppendorf de tamaño de 1 mL y dispuestas a secar a temperatura ambiente durante 12 horas, para eliminar humedad superficial antes de su manipulación.



Figura 2. Extracción de los microplásticos con bomba de vacío.

Adicionalmente, para asegurar que los ensayos de biodegradación no se vieran afectados por la microbiota endógena que pudieran presentar los microplásticos de los productos comerciales, se implementó un protocolo de esterilización en dos fases. En la primera, las microesferas secas se sometieron a una desinfección química mediante inmersión en alcohol al 70% durante 12 horas. Posteriormente, se retiró el alcohol filtrándolas nuevamente y las micropartículas se expusieron a radiación ultravioleta como método de desinfección física complementaria. Para corroborar la eficacia de este protocolo, la esterilidad de las micropartículas de plástico se validó mediante controles de esterilidad mediante inoculación en placas de agar nutritivo. Tras un periodo de incubación de 24 horas a 30 °C, la ausencia de unidades formadoras de colonias confirmó que el material se encontraba en condiciones óptimas de asepsia para su integración en los ensayos de biodegradación con el consorcio bacteriano.

Todas las micropartículas de plástico se evaluaron morfológicamente mediante un microscopio estereoscópico modelo VE-S1 (Velab, México) antes y después de los bioensayos. Para ello, las muestras se colocaron directamente sobre la superficie de observación del equipo, sin requerir preparación previa, lo que permitió una visualización directa de las micropartículas. Mediante esta técnica fue posible analizar la forma, el tamaño y la apariencia superficial de las esferas presentes en ambos productos.

Adicionalmente, con la finalidad de evaluar los posibles cambios fisicoquímicos en las micropartículas a lo largo de los procesos de aclimatación, biodegradación y codegradación, se realizaron análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Las muestras destinadas a ambos análisis fueron secadas previamente a 50 °C durante 4 h.

El análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) fue realizado utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-7800F (JEOL, Japón), equipado con una lente Super Hybrid Lens (SHL) y cuatro detectores: detector de electrones superior (UED), detector de electrones secundarios superior (USD), detector de electrones retrodispersados (BED) y detector de electrones inferior (LED). Las muestras se analizaron sin recubrimiento y en modo de bajo vacío (Low Vacuum), condición adecuada para materiales no conductores. Las imágenes se obtuvieron utilizando un voltaje de aceleración de 1.0 kV mediante el detector LED. La distancia de trabajo (WD) varió entre imágenes y se registró individualmente en cada micrografía. Esta técnica permitió observar las características morfológicas y las posibles modificaciones superficiales de las micropartículas, identificando cambios como rugosidades, surcos o alteraciones estructurales asociadas a la interacción con el consorcio bacteriano.

Por su parte, la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se realizó empleando un equipo Cary 670 FTIR acoplado a un Cary 620 FTIR (Agilent Technologies, Estados Unidos). Los espectros fueron obtenidos en un rango espectral de 400 a 4000 cm^{-1} mediante la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR), utilizando 36 barridos por muestra. El sistema FTIR cuenta con un interferómetro Michelson dinámicamente alineado a 60° y una resolución espectral de 0.075 cm^{-1} . Esta técnica se utilizó para analizar los cambios en los grupos funcionales de las micropartículas mediante la evaluación de la evolución de sus picos característicos a lo largo del proceso experimental. Asimismo, permitió

contribuir a la identificación del tipo de material presente en las micropartículas. A partir de la comparación de los espectros obtenidos con reportes de la literatura, fue posible inferir la naturaleza de los materiales analizados, identificándose celulosa microcristalina en las partículas de Nivea y polímeros tipo polietileno en las partículas de Neutrogena.

Reactivación, conservación y criopreservación del consorcio microbiano de trabajo

Como fase de preparación del material biológico de experimentación, se procedió a reactivar el Consorcio C-Malatién, perteneciente al cepario del Laboratorio de Procesos Microbiológicos del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN) de la Facultad de Ciencias Químicas. Para ello, se inoculó 1 mL del consorcio en 20 mL de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) bajo condiciones de asepsia. La incubación se llevó a cabo a 30 °C con agitación constante a 100 rpm durante 48 h. Este procedimiento permitió incrementar la biomasa microbiana y obtener un cultivo viable y homogéneo para su posterior utilización en los ensayos experimentales.



Figura 3. Observación de como luce el crecimiento del Consorcio C-Malatién en caldo LB por 48 horas, con la presencia de una capa de biomasa en la superficie del matraz.

Con el fin de evaluar las características morfológicas del consorcio microbiano después de su reactivación, se realizó una tinción de Gram siguiendo el procedimiento convencional. A partir de un cultivo fresco, se preparó un frotis bacteriano sobre un portaobjetos, el cual se dejó secar al aire y posteriormente se fijó por calor. La preparación se tiñó con cristal violeta (Sigma-Aldrich) durante 1 min, seguido de lugol (Sigma-Aldrich) durante 1 min. Posteriormente, la muestra se

decoloró mediante un lavado con alcohol y se contratiñó con safranina (Sigma-Aldrich) durante 1 min. Entre cada etapa se realizaron lavados suaves con agua destilada para eliminar el exceso de reactivo. Finalmente, las preparaciones se observaron mediante microscopía óptica para determinar la morfología celular y la reacción tintorial de los microorganismos presentes. Las características observadas fueron contrastadas con las descritas previamente para el Consorcio C-Malati3n en estudios anteriores (Verdúzco-Suárez, 2024; Martínez-Ledezma, 2018; Acosta-Cort3ez, 2017).

Para garantizar la disponibilidad del consorcio en ensayos experimentales posteriores, se estandarizó un protocolo de conservaci3n que consistió en inocular un matraz con 20 mL de caldo LB estéril e incubarlo a 30 °C por 48 horas a 100 rpm, el cual, posterior a su incubaci3n se transfiri3 a tubos tipo Falcon de 15 mL para su centrifugaci3n a 5000 rpm durante 5 minutos, descartándose el sobrenadante y recuperando el pellet celular para su posterior uso experimental.

Una fracci3n de este cultivo se destin3 a la criopreservaci3n del consorcio. Para ello, se prepar3 una soluci3n de glicerol estéril al 50% (v/v) como agente crioprotector, cuya funci3n es prevenir el daño mecánico causado por la formaci3n de cristales de hielo en la membrana celular al alcanzar el punto de congelaci3n. En tubos Eppendorf de 1.5 mL, se mezclaron alícuotas de 400 µL del concentrado bacteriano con 600 µL de la soluci3n de glicerol estéril, agitando cuidadosamente la suspensi3n. Por último, las muestras se almacenaron a -80 °C, condiciones que permiten mantener la integridad fisiol3gica y la viabilidad del consorcio a largo plazo.

Ensayo de aclimataci3n y adaptaci3n metab3lica a la presencia de microplásticos como única fuente de carbono

Con la finalidad de adaptar progresivamente el consorcio bacteriano al crecimiento en condiciones nutricionales restrictivas y de promover el uso de microplásticos como fuente principal de carbono, este fue sometido a un ensayo de aclimataci3n. Para ello, se implement3 una estrategia de transferencia gradual de biomasa del caldo LB al medio mínimo M9, permitiendo mitigar el choque metab3lico derivado

de la transición directa de un medio complejo a uno mínimo. Durante este proceso, se estableció un sistema de nomenclatura específico para garantizar la trazabilidad de las muestras: se asignó la letra “A” a los microplásticos provenientes del exfoliante Neutrogena y la letra “C” a los obtenidos del exfoliante Nivea.

Como preparación previa al proceso de aclimatación del consorcio, se preparó el medio mínimo M9, que consiste en una solución basal comúnmente empleada para el cultivo de microorganismos bajo condiciones nutricionales estrictamente controladas. Al estar constituido únicamente por sales inorgánicas, nos permite la adición selectiva de los nutrientes principales, tales como C, N y P, lo que facilita la evaluación de la actividad microbiana frente a sustratos definidos.

Para el diseño de este medio se consideró la relación Redfield, que establece una proporción estequiométrica equilibrada entre carbono, nitrógeno y fósforo (106:16:1), lo que optimiza el metabolismo microbiano. La formulación de este medio se preparó utilizando las cantidades de reactivos descritas en la Tabla 2, empleando cloruro de amonio (NH_4Cl) como fuente de nitrógeno, fosfato disódico (Na_2HPO_3) como fuente de fósforo y como agente amortiguador.

Tabla 2. Composición de los reactivos que conforman el medio M9 (g/500mL).

Reactivo	Gramos
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	1 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_3)	6.6 g
Sulfato de magnesio monohidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.1 g
Sulfato de manganeso monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.011 g
Cloruro de calcio (CaCl_2)	0.0055 g
Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.0075 g

La preparación del medio M9 consistió en disolver secuencialmente los componentes en agua destilada, bajo agitación constante, hasta completar la solubilización. Posteriormente, el medio se esterilizó mediante calor húmedo en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Tras el proceso de esterilización y una vez alcanzada la temperatura ambiente, el medio se consideró apto para la adición de las fuentes de carbono objeto de estudio (microplásticos primarios extraídos de

exfoliantes faciales de las marcas Nivea o Neutrogena), de acuerdo con el diseño experimental establecido.

El proceso de aclimatación se llevó a cabo mediante una serie de etapas en las que se incrementó sistemáticamente la proporción del medio M9 respecto del medio rico. Inicialmente, los consorcios se mantuvieron en 100% de caldo LB durante 48 horas para asegurar una biomasa basal con suficiente densidad celular, evidenciada por la formación de una película superficial característica del consorcio, la cual es indicativa de crecimiento activo. Posteriormente como se puede ver en las tablas 3 y 4, se iniciaron fases de transición de 72 horas cada una, reduciendo la disponibilidad de nutrientes complejos mediante gradientes del 90, 80, 60 y 30% de caldo LB, complementados con sus respectivas proporciones de medio M9 y con la adición constante de microplásticos. Esta presión selectiva obligó a las comunidades microbianas a reconfigurar sus rutas metabólicas para subsistir en un entorno con recursos limitados.

Tabla 3. Proporción del medio LB con microplásticos y medio de trabajo durante la aclimatación para los microplásticos de la marca Neutrogena.

Proporción LB + M9	Cantidad de LB	Cantidad de M9	Cantidad de micropartículas en el medio acumuladas
100% LB	50 mL	0 mL	0 g
90 % LB + 10 % M9	45 mL	5 mL	0.035g
80 % LB + 20 % M9	40 mL	10 mL	0.070g
60 % LB + 40 % M9	30 mL	20 mL	0.140g
30 % LB + 70 % M9	15 mL	35 mL	0.245 g
100 % M9	0 mL	50 mL	0.35 g

Tabla 4. Proporción del medio LB con microplásticos y medio de trabajo durante la aclimatación para los microplásticos de la marca Nivea.

Proporción LB + M9	Cantidad de LB	Cantidad de M9	Cantidad de micropartículas en el medio acumuladas
100% LB	50 mL	0 mL	0 g
90 % LB + 10 % M9	45 mL	5 mL	0.00225g
80 % LB + 20 % M9	40 mL	10 mL	0.0045g
60 % LB + 40 % M9	30 mL	20 mL	0.009g
100% LB	50 mL	0 mL	0 g

Finalmente, los cultivos se transfirieron a un medio compuesto al 100% por el medio mínimo M9 y los microplásticos correspondientes. Antes de proceder con los bioensayos definitivos, el consorcio permaneció en estas condiciones durante cuatro semanas adicionales. Esta fase de estabilización fue crucial para garantizar una adaptación fisiológica completa y activar los sistemas enzimáticos necesarios para la interacción con la matriz polimérica de los microplásticos, y así favorecer su posible degradación.

Monitoreo fisiológico del consorcio de trabajo durante los ensayos de aclimatación

Con el objetivo de evaluar la dinámica poblacional y la diversidad morfológica del consorcio bacteriano durante los bioensayos, se realizaron diluciones seriadas a partir de los cultivos obtenidos en las distintas etapas de los experimentos.

Para ello, se prepararon diluciones en base 10 (1:10, 1:100 y 1:1000), tomando una alícuota del cultivo original y transfiriéndola a tubos con diluyente estéril, realizando mezclas homogéneas en cada paso. Posteriormente, se sembraron alícuotas de cada dilución en placas de agar nutritivo mediante la técnica de extensión superficial, las cuales fueron incubadas a 30 °C por 24 horas en condiciones controladas. Tras el periodo de incubación, se evaluó el crecimiento bacteriano, analizando la morfología de las colonias y la presencia de variaciones en su apariencia entre las distintas diluciones y tratamientos. Esta metodología permitió observar posibles cambios en la composición del consorcio bacteriano y en su dinámica poblacional como respuesta a la exposición a micropartículas.

Asimismo, con la finalidad de verificar la estabilidad fenotípica del consorcio microbiano y asegurar que las bacterias del género *Bacillus* conservaran sus características morfológicas a lo largo de los ensayos experimentales, se empleó la técnica de tinción de Gram como método de monitoreo. El procedimiento inició con la preparación de un frotis bacteriano sobre un portaobjetos desengrasado, el cual se dejó secar a temperatura ambiente antes de proceder a su fijación térmica. El protocolo de tinción se llevó a cabo siguiendo el procedimiento establecido por la casa comercial, que consiste en exponer la muestra al cristal violeta como colorante primario por un minuto. A continuación, se aplicó Lugol por un minuto como mordiente para facilitar la retención del complejo colorante-yodo. Posteriormente, se realizó una decoloración controlada con alcohol-acetona por un minuto y se aplicó safranina como colorante de contraste por 30 segundos para diferenciar las estructuras celulares. Entre cada etapa, se realizaron lavados suaves con agua destilada para eliminar los excedentes. Finalmente, tras el secado de las laminillas, las muestras se examinaron mediante microscopía óptica de campo claro.

Adicionalmente, se empleó la técnica de tinción con verde de malaquita como método de verificación del estado fisiológico de las bacterias. Dado que la esporulación en las bacterias del género *Bacillus* está relacionada con un mecanismo de supervivencia activado ante condiciones de estrés ambiental o de agotamiento de nutrientes, el monitoreo de esta esporulación resultó fundamental

para comprobar que los microorganismos se mantuvieron metabólicamente activos en respuesta a la asimilación de microplásticos.

Para llevar a cabo esta tinción, Se colocaron 10 μL de la muestra sobre un portaobjetos limpio y se distribuyeron para formar un frotis delgado. Posteriormente, se dejó secar al aire y se realizó la fijación térmica mediante flameado, pasando el portaobjetos brevemente a través de la llama para fijar la muestra a la superficie. Posteriormente, la muestra se cubrió con una solución de verde de malaquita de concentración al 5% (p/v) durante cinco minutos. Durante esta etapa, se empleó un trozo de papel filtro sobre el frotis para facilitar la retención y la penetración del colorante en las estructuras resistentes de la espora. Tras un lavado suave con agua destilada para eliminar el excedente, se aplicó safranina, 0.5% (p/v) de concentración, como colorante de contraste durante 2 minutos. Finalmente, las preparaciones se dejaron secando a temperatura ambiente toda la noche y se examinaron mediante microscopía óptica a un aumento de 100x. La interpretación de los resultados se basó en que las endosporas se visualizaron en verde, mientras que las células vegetativas presentaron una tonalidad rosada o rojiza derivada de la safranina.

Confirmación de la actividad celulolítica del consorcio de trabajo involucrada en la biodegradación de polímeros naturales

Con el propósito de evaluar el potencial del consorcio microbiano para generar enzimas celulolíticas capaces de degradar la celulosa, se realizó una prueba cualitativa en medio mínimo suplementado con carboximetilcelulosa (agar-CMC). El medio de cultivo se preparó por triplicado empleando agua destilada, carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono y agar bacteriológico como agente solidificante, según las concentraciones detalladas en la Tabla 5. Tras la homogeneización y esterilización del medio por calor húmedo, aparte del vaciado en placa, se depositaron 100 μL de la muestra sobre la superficie del medio sólido y se distribuyeron homogéneamente mediante un asa en L estéril (técnica de extensión en placa), trabajando bajo condiciones asépticas en proximidad a la llama

del mechero, con el fin de mantener un ambiente libre de contaminantes. y se incubaron durante 24 horas a 30 °C para promover la interacción metabólica con el sustrato celulósico.

Tabla 5. Composición del medio agar-CMC.

Reactivo	Cantidad
Agar bacteriológico	1.5 g
Carboximetilcelulosa (CMC)	1 g
Agua destilada	100 mL

Una vez finalizado el periodo de incubación, se procedió a la revelación de la actividad enzimática mediante la adición de 5 mL de rojo Congo. Este colorante actúa como indicador al ligarse específicamente a los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ glucosídicos de los polisacáridos de cadena larga que no hayan sido degradados. Tras el tiempo de contacto, la aparición de halos claros y traslúcidos alrededor de las colonias bacterianas confirma la hidrólisis del CMC por la acción de enzimas extracelulares de tipo celulasas, mientras que la ausencia de dichos halos indica la ausencia de dichas enzimas.

Ensayos de biodegradación de microplásticos primarios por los consorcios de trabajo aclimatados

Los ensayos de biodegradación de microplásticos primarios se llevaron a cabo por triplicado en matraces Erlenmeyer de 50 mL con un volumen de trabajo de 30 mL de medio mínimo M9 estéril. A cada matraz se le añadió 1 mL de inóculo bacteriano junto con 0.1 g de los microplásticos de las marca Nivea o Neutrogena previamente preparados. Cabe destacar que en estos bioensayos no se emplearon compuestos fosforados suplementarios, dado que la finalidad era evaluar la capacidad intrínseca del consorcio para utilizar el material plástico como única fuente de carbono, estableciendo una comparación directa con el comportamiento observado durante su reactivación en un medio rico.

Los matraces se mantuvieron bajo agitación constante a 100 rpm durante seis semanas a 30 °C. Esta dinámica aseguró la oxigenación del medio y promovió un

contacto continuo entre la biomasa bacteriana y la superficie de las micropartículas en suspensión. Durante el transcurso del experimento, se realizó un seguimiento microbiológico riguroso mediante tinciones de Gram y verde de malaquita. Estas técnicas permitieron verificar la estabilidad morfológica del consorcio, confirmar la ausencia de contaminantes externos y monitorear posibles procesos de esporulación como respuesta al estrés nutricional.

Finalmente, para obtener evidencia cuantitativa y cualitativa de la degradación de los microplásticos, las muestras fueron sometidas a un análisis gravimétrico mediante la determinación de la pérdida de masa, calculada a partir de la diferencia entre el peso inicial y final de las muestras, a una caracterización avanzada mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), utilizando un equipo Cary 670 FTIR acoplado a un Cary 620 FTIR (Agilent Technologies, Estados Unidos). Los espectros se obtuvieron mediante Reflectancia Total Atenuada (ATR) en un rango espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , con 36 barridos por muestra. Asimismo, se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) empleando un microscopio JSM-7800F (JEOL, Japón), operado en modo de bajo vacío (Low Vacuum), sin recubrimiento metálico y con un voltaje de aceleración de 1.0 kV. Previamente, las muestras fueron secadas a 50 °C durante 4 h. Ambos análisis se utilizaron para evaluar posibles modificaciones fisicoquímicas y estructurales en las micropartículas derivadas de la interacción con el consorcio microbiano.

Ensayos de co-degradación de microplásticos primarios funcionalizados con pesticidas organofosforados

Para evaluar la capacidad metabólica del consorcio para enfrentar matrices complejas de contaminación ambiental, se llevó a cabo un ensayo de codegradación en el que los microplásticos fungieron como matriz plástica acarreadora de compuestos organofosforados, simulando su papel como vectores de contaminantes ambientales. Para ello, las micropartículas se dividieron en grupos homogéneos y se suplementaron con 0.1 M tres compuestos fosfóricos distintos: glifosato (el herbicida organofosfonato más empleado en el mundo), ácido

aminometilfosfónico (AMPA, el principal metabolito de la biodegradación del glifosato) y fosfato disódico, siendo este último empleado como control fosforado no contaminante para contrastar la respuesta microbiana.

Con el fin de garantizar la trazabilidad y reducir errores en el manejo de un gran número de muestras, se estandarizó un sistema de nomenclatura alfanumérica basado en el origen del plástico y en el tipo de suplemento (Tabla 6). Se mantuvieron las siglas “A” para Neutrogena y “C” para Nivea, combinándolas con las letras “G” para glifosato, “A” para AMPA y “F” para fosfato. Así, por ejemplo, el tratamiento AG identificó los microplásticos de Neutrogena suplementados con glifosato, mientras que CF designó las partículas de Nivea con fosfato como control.

Tabla 6. Nomenclatura empleada para los tratamientos de codegradación.

Marca de origen	Compuesto suplementado	Nomenclatura
Neutrogena	Glifosato	AG
Neutrogena	AMPA	AA
Neutrogena	Na ₂ HPO ₃	AF
Nivea	Glifosato	CG
Nivea	AMPA	CA
Nivea	Na ₂ HPO ₃	CF

La funcionalización de los microplásticos con compuestos fosforados consistió en la inmersión de 0.05 g de micropartículas de Neutrogena y 0.1 g de micropartículas de Nivea en 15 mL de las soluciones acuosas correspondientes durante 24 h a temperatura ambiente, siguiendo la metodología descrita por Li et al. (2021). Las partículas permanecieron sumergidas en vasos de precipitados sin agitación, con el propósito de favorecer la interacción de los compuestos fosforados con la superficie de los materiales. Posteriormente, las micropartículas fueron recuperadas mediante filtración utilizando papel filtro

Whatman grado 1 y se dejaron secar en condiciones de asepsia durante toda la noche (overnight), con el fin de eliminar el exceso de solución remanente antes de su incorporación a los bioensayos.

Los bioensayos se montaron por triplicado en matraces Erlenmeyer con un volumen de trabajo de 30 mL, incluyendo además un control abiótico para cada tratamiento. El proceso de codegradación se llevó a cabo durante cuatro semanas a 30 °C con agitación constante de 100 rpm. Durante este periodo se realizó un monitoreo periódico del consorcio microbiano mediante tinciones de Gram y verde de malaquita, con el fin de verificar la presencia y las características morfológicas de los microorganismos a lo largo del ensayo. Al concluir el tiempo de exposición, las micropartículas fueron recuperadas para su análisis gravimétrico y su posterior caracterización mediante FTIR y SEM, como se describió anteriormente.

Bioensayos de toxicidad aguda en anélidos (*Eisenia foetida*)

Para evaluar el impacto ecotoxicológico de los subproductos derivados del proceso de codegradación, se realizaron pruebas de toxicidad aguda utilizando lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) como organismos indicadores. El ensayo tuvo como objetivo determinar el porcentaje de mortalidad y la variación en el peso de los organismos expuestos durante un periodo de 21 días. El diseño experimental buscó simular un escenario de exposición ambiental mediante la habilitación de unidades experimentales que replicaran su hábitat natural. En recipientes plásticos acondicionados, se colocaron 150 g de un estrato edáfico libre de residuos y con textura adecuada para el desplazamiento de los organismos. Se mantuvo un control riguroso de la humedad y la aireación del sustrato para asegurar condiciones adecuadas para la supervivencia de las lombrices durante todo el periodo experimental.

El sistema de mantenimiento y cría de los organismos permitió seleccionar ejemplares en etapa adulta y con un estado fisiológico saludable. Estos fueron aclimatados durante 21 días previos al ensayo, con monitoreos semanales y un régimen alimenticio basado en materia orgánica fresca de manzana y lechuga, suministrada en una proporción equivalente a tres veces el peso total de la biomasa de los anélidos (aproximadamente 5 a 15 g por unidad). Este protocolo aseguró la disponibilidad de nutrientes y previno la proliferación de microorganismos oportunistas mediante la sustitución frecuente de alimento.

Los bioensayos se clasificaron según las fracciones provenientes del término de la codegradación, siendo una fracción procedente de la fase sólida del bioensayo, consistente en microplásticos filtrados, los cuales se distribuyeron sobre la superficie del sustrato orgánico para evaluar el contacto directo con las lombrices. Y la segunda fracción, proveniente de la fase líquida del bioensayo, correspondiente al residuo del medio M9 exhausto, utilizado para humedecer el sustrato y evaluar la toxicidad de los compuestos disueltos.

Asimismo, se establecieron grupos de control para la evaluación ecotoxicológica, incluyendo 0.1 g de microplásticos primarios extraídos directamente de los

exfoliantes sin tratamiento biológico, así como soluciones de glifosato, ácido aminometilfosfónico (AMPA) y 2-cloroacetamida a una concentración de 0.1 M. Todos los controles fueron evaluados bajo las mismas condiciones experimentales que los tratamientos correspondientes.

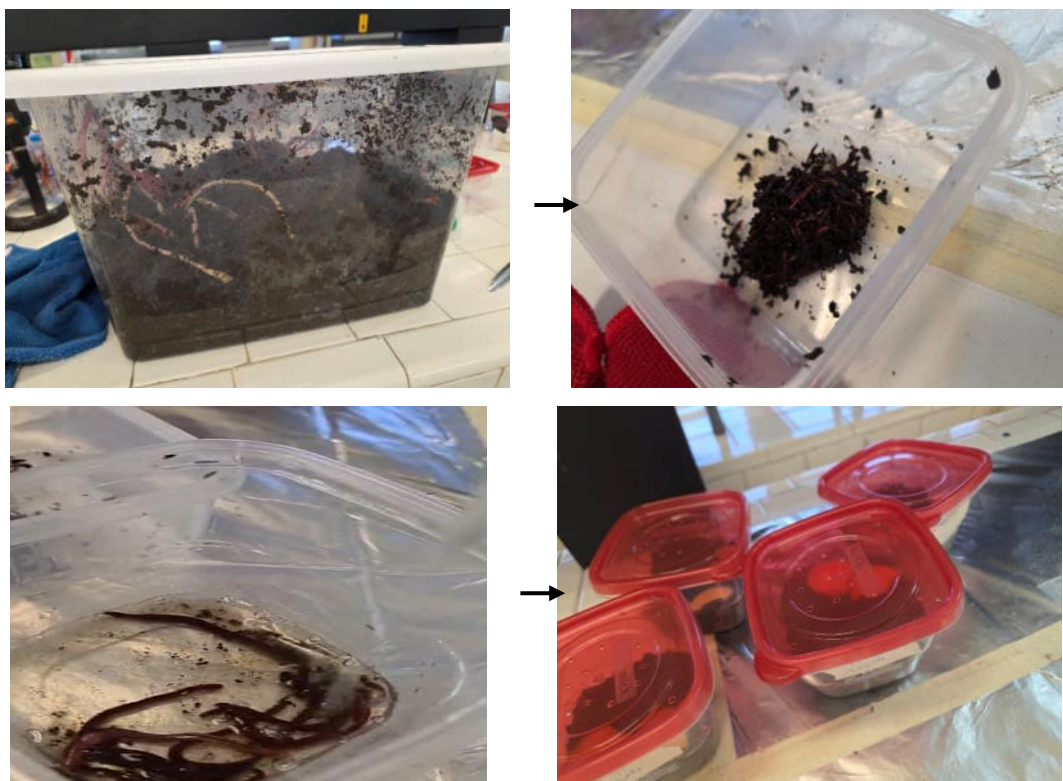


Figura 4. Imágenes del proceso de preparación del experimento de toxicidad aguda, donde de izquierda a derecha se puede ver cómo se sacan del lugar de cultivo de las lombrices, para seleccionar 10, lavarlas para quitar tierra y ser pesadas para poder ponerlas en el sistema controlado del contenedor de tapa roja que tiene 150 g de tierra con alimento y el contaminante.

Resultados y discusión

Evaluación morfológica y tinción de Gram del Consorcio C-Malati3n

La caracterizaci3n morfol3gica del cultivo reactivado revel3 una predominancia de morfologías bacilares. Asimismo, la tinci3n de Gram mostr3 que la comunidad microbiana estaba integrada mayoritariamente por bacterias Grampositivas (Figura 4).

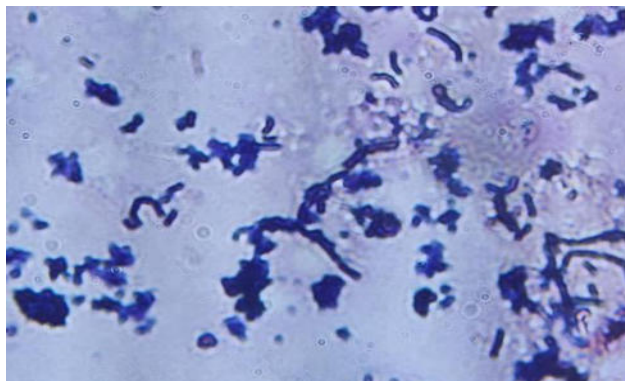


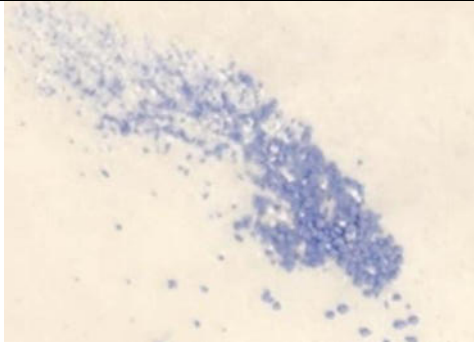
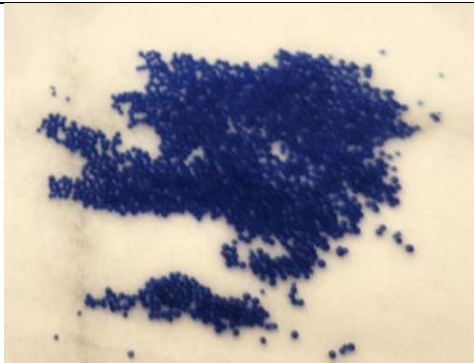
Figura 5. Observaci3n en microscopio 3ptico del Consorcio C-Malati3n con magnificaci3n de 100X.

Los resultados obtenidos fueron consistentes con los reportados previamente para el Consorcio C-Malati3n (Verdúzco-Suárez, 2024; Martínez-Ledezma, 2018; Acosta-Cort3z, 2017), lo que sugiere que el proceso de reactivaci3n no modific3 significativamente las características fenotípicas predominantes de la comunidad microbiana.

Extracci3n y caracterizaci3n de microplásticos primarios de exfoliantes comerciales

El proceso de separaci3n y extracci3n de las micropartículas se llev3 a cabo con éxito mediante el sistema de filtraci3n asistida por vacío. Este procedimiento permiti3 la lixiviaci3n eficaz de la matriz del producto cosmético, lo que facilit3 la recuperaci3n de los agentes exfoliantes sin comprometer su integridad estructural. Los resultados cuantitativos y las características cualitativas del material recuperado se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados cuantitativos y cualitativos del material recuperado durante la extracción.

Marca	Peso recuperado / Porcentaje en masa	Apariencia	Ingrediente reportado en la formulación
Nivea	0.0225 g (0.015% del producto)		Esferas celestes de celulosa
Neutrogena	0.35 g (0.28% del producto)		Esferas azules de acrilatos/c10-30 alquil acrilato polímero cruzado

Por otro lado, el fabricante identifica las micropartículas extraídas del exfoliante facial de la marca Neutrogena como un polímero sintético denominado Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer. Estas micropartículas presentaron una morfología esférica y una coloración azul similar a la observada en las partículas de Nivea; sin embargo, mostraron una superficie visualmente más homogénea y un brillo más intenso. De igual manera, se determinó la masa recuperada y su porcentaje respecto a la masa total del producto.

La principal diferencia entre ambos materiales correspondió a la naturaleza de las micropartículas empleadas como agente exfoliante, ya que el producto de Nivea contenía celulosa, un polímero de origen natural, mientras que el producto de Neutrogena empleaba Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer, un polímero sintético.

Con el propósito de identificar la composición química de las micropartículas extraídas de los exfoliantes comerciales antes de su exposición a los procesos de aclimatación, biodegradación y codegradación, se realizó una caracterización inicial mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Los espectros obtenidos para las micropartículas de Nivea y Neutrogena se presentan en la Figura 6 y Figura 7. Las bandas observadas fueron analizadas y comparadas con espectros de referencia reportados en la literatura para determinar la naturaleza química de los materiales empleados en este estudio.

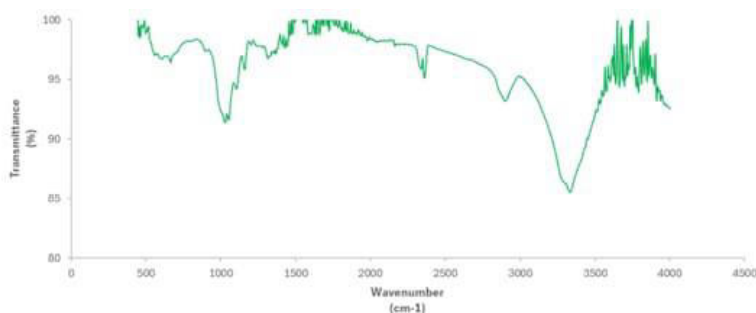


Figura 6. Espectro FTIR de una micropartícula de Nivea antes de la experimentación realizada.

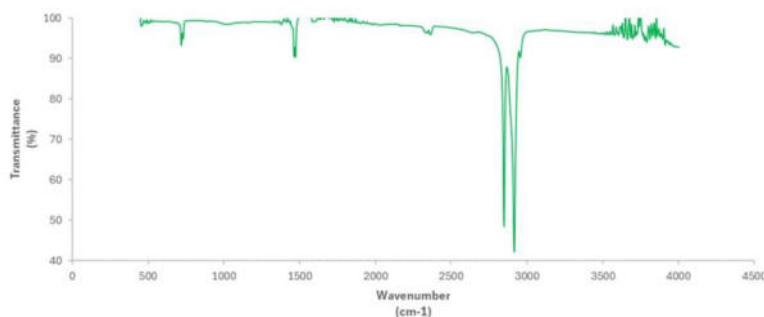


Figura 7. Espectro FTIR de una micropartícula de Neutrogena antes de la experimentación realizada.

La identificación molecular por FTIR fue fundamental para determinar la composición química de los sustratos antes de iniciar los procesos de aclimatación y biodegradación. Al contrastar los espectros obtenidos con la literatura científica, se logró una correlación precisa entre la composición declarada en el etiquetado de los exfoliantes y la estructura polimérica real de las micropartículas.

En el caso de las micropartículas de Nivea, el espectro mostró bandas características de un polisacárido natural (Figura 8). La banda ancha y de gran intensidad en la región de $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ es atribuible a las vibraciones de tensión de los grupos hidroxilo (--OH), que forman la red de puentes de hidrógeno esencial en la estructura de la celulosa. Asimismo, la señal en 2900 cm^{-1} corresponde a los estiramientos de los enlaces C--H , mientras que el pico intenso cerca de 1050 cm^{-1} se asocia a las vibraciones de flexión y tensión de los enlaces C--O del anillo de glucopiranososa. La coincidencia casi absoluta con los espectros reportados para la celulosa microcristalina (Jia et al., 2011) confirma que el sustrato de Nivea es un polímero altamente susceptible a la hidrólisis enzimática por las celulasas del consorcio compuesto por bacterias del género *Bacillus*.

Por otra parte, para la marca Neutrogena, el espectro reveló una naturaleza química distinta, propia de un polímero sintético de alta estabilidad (Figura 9). Las señales identificadas en 2900 , 1460 y $720\text{--}760\text{ cm}^{-1}$ son propias del polietileno (Velandia Cabra, J. R. 2017). Esta estructura alifática, compuesta por largas cadenas de carbonos saturados, explica la mayor recalcitrancia observada en las etapas de aclimatación y biodegradación.

De esta manera, el análisis por FTIR permitió clasificar los microplásticos de estudio en dos categorías contrastantes: un biopolímero (celulosa, empleada durante la experimentación como control positivo de biodegradación) y un polímero sintético (polietileno).

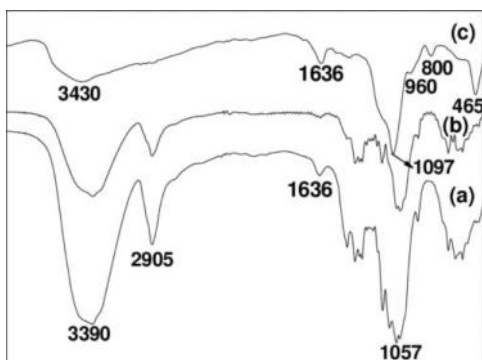


Figura 8. Espectros FT-IR de (a) la celulosa microcristalina, (b) la celulosa regenerada y (c) la fibra compuesta de celulosa-sílice (Jia et al., 2011).

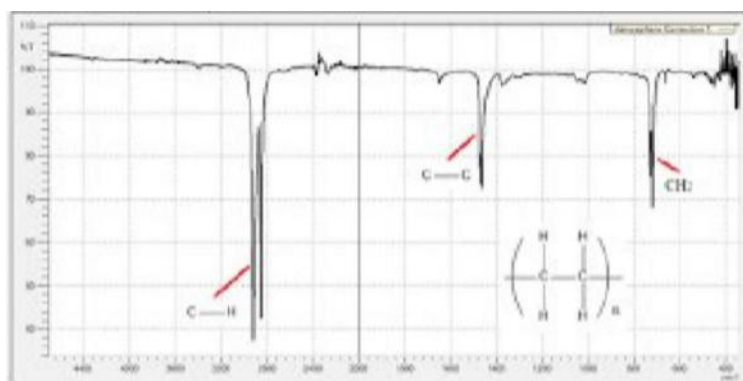


Figura 9. Análisis FTIR de polietileno de baja densidad (Velandia Cabra, J. R. 2017).

Ensayo de aclimatación y adaptación metabólica a la presencia de microplásticos como única fuente de carbono

Los procesos de aclimatación realizados permitieron evaluar la capacidad de adaptación de los microorganismos ante una disminución de la disponibilidad de nutrientes complejos hasta alcanzar condiciones de estrés nutricional severas, forzándolos a adaptar su metabolismo para la asimilación de polímeros.

Para la aclimatación del consorcio al biopolímero de la marca Nivea, los resultados del monitoreo demostraron que, a nivel morfológico, la comunidad microbiana

mostró una notable estabilidad. Mediante una evaluación cualitativa realizada por tinción de Gram, se observó de manera consistente la presencia de bacilos Grampositivos durante todas las etapas de la transición nutricional llevada a cabo desde el 100 % de caldo LB hasta el 100 % de medio mínimo M9. La ausencia de variaciones morfológicas evidentes sugiere que la composición predominante del consorcio no se modificó de forma apreciable bajo la presión selectiva del medio mínimo, manteniendo características fenotípicas similares a lo largo de las semanas de estudio.

Por su parte, la tinción de verde de malaquita proporcionó información valiosa sobre los cambios fisiológicos que experimentó la comunidad bacteriana a lo largo del proceso de aclimatación. Conforme aumentó la proporción de medio M9, se detectó la formación de endosporas, observadas por su coloración verde (Tabla 6), lo que sugiere una respuesta adaptativa de las especies bacterianas al estrés nutricional. No obstante, es relevante destacar que en ninguna etapa desaparecieron por completo las células vegetativas teñidas con safranina. No obstante, es relevante destacar que en ninguna etapa desaparecieron por completo las células vegetativas teñidas con safranina. La observación simultánea de esporas y células vegetativas durante todo el proceso de aclimatación indica que la población bacteriana no se encontró exclusivamente en estado de latencia bajo las condiciones evaluadas.

La observación macroscópica de los matraces respaldó estos hallazgos microscópicos, dado que en cada una de las proporciones evaluadas La observación macroscópica de los matraces respaldó estos hallazgos microscópicos, dado que en cada una de las proporciones evaluadas se observó la presencia de crecimiento microbiano, manifestado por la turbidez del medio y la formación de agregados celulares en la superficie y en las paredes del matraz (Tablas 8 y 9), incluida la etapa final correspondiente al 100 % de medio M9, lo que validó el potencial de este consorcio para ensayos posteriores de biodegradación.

Tabla 8. Observación microscópica y macroscópica de los distintos porcentajes de aclimatación.

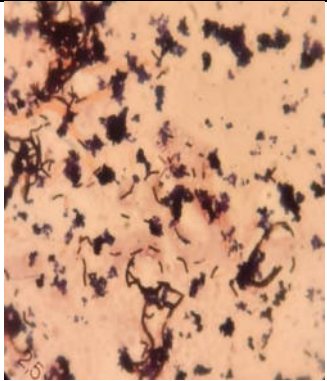
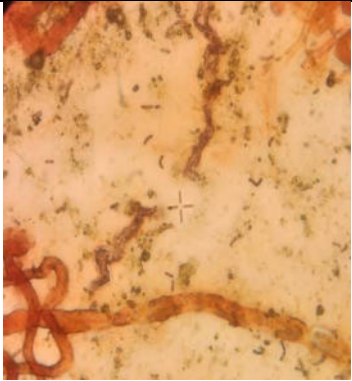
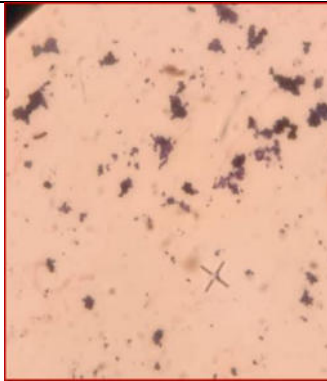
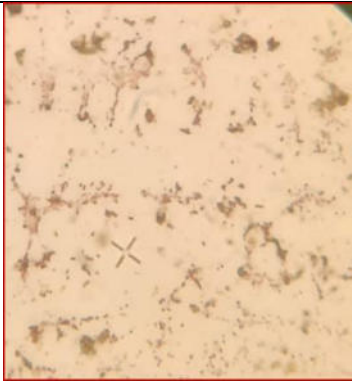
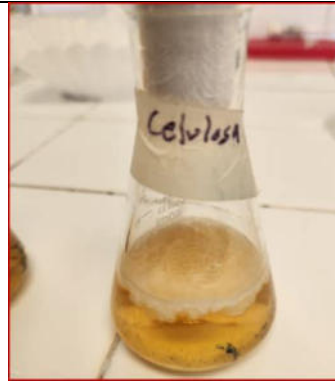
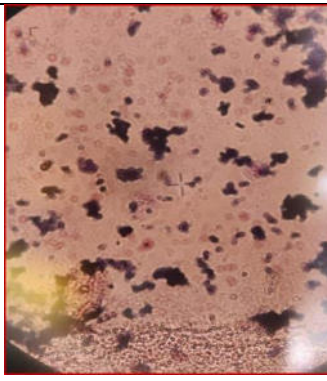
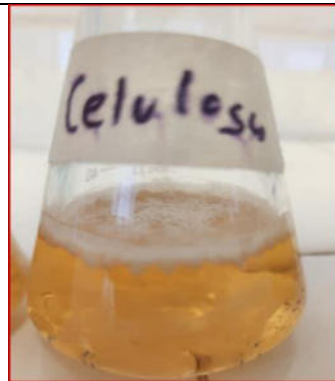
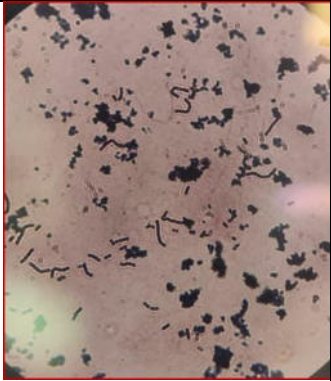
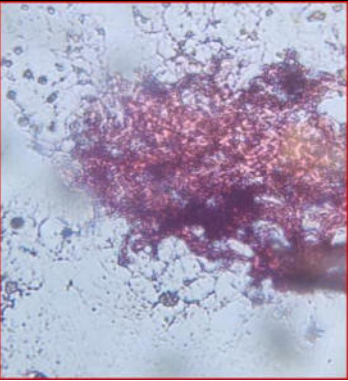
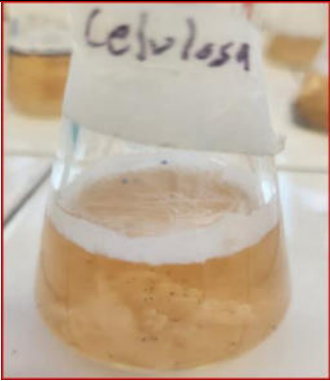
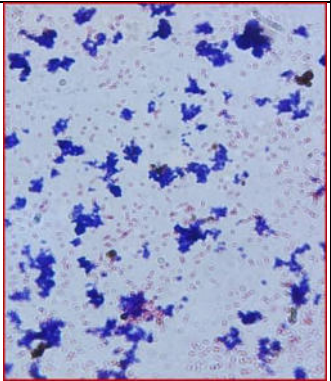
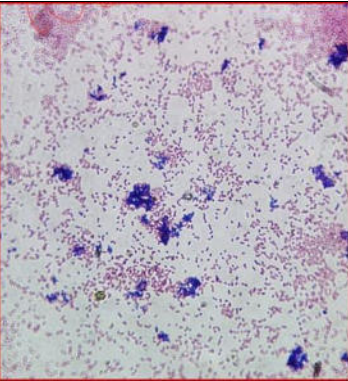
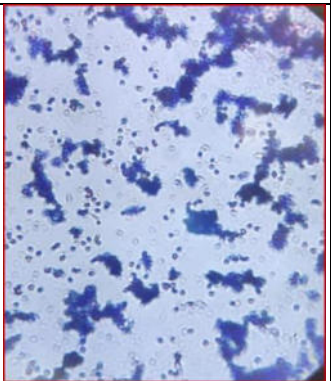
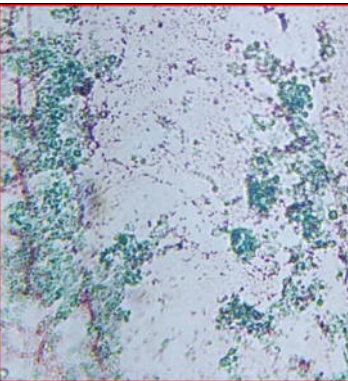
Porcentaje del medio	Tinción de Gram	Tinción de verde malaquita	Observación macroscópica
100% de caldo LB			
90% de caldo LB + 10% de M9 + microplásticos			
80% de caldo LB + 20% de M9 + microplásticos			

Tabla 8 (continuación). Observación microscópica y macroscópica de los distintos porcentajes de aclimatación.

Porcentaje del medio	Tinción de Gram	Tinción de verde malaquita	Observación macroscópica
60% de caldo LB + 40% de M9 + microplásticos			
30% de caldo LB + 70% de M9 + microplásticos			
100% de M9 + microplásticos			

Por su parte, de manera similar, el proceso de aclimatación del consorcio asociado a las micropartículas de la marca Neutrogena confirmó la presencia de una población microbiana homogénea, compuesta por bacilos Gram positivos que

mantuvieron su morfología característica en todas las etapas del gradiente nutricional. La estabilidad morfológica observada sugiere que el consorcio bacteriano no presentó alteraciones poblacionales significativas al exponerse a la presión selectiva del medio mínimo suplementado con microplásticos de acrilato.

De igual manera, la tinción de verde de malaquita reveló una respuesta fisiológica análoga a la del consorcio de Nivea. Con el incremento de la concentración del medio M9, aumentó la formación de endosporas. Sin embargo, la detección simultánea de células vegetativas confirmó que una fracción considerable de la población se mantuvo metabólicamente activa. La formación de endosporas observada durante el proceso de aclimatación coincide con lo reportado para bacterias esporuladas sometidas a condiciones de estrés nutricional, donde la esporulación representa una estrategia de supervivencia ampliamente documentada (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2014), lo que demuestra la gran robustez de nuestro modelo biológico para afrontar la degradación de polímeros naturales o sintéticos.

La aclimatación microbiana frente a condiciones de estrés ambiental no ocurre de manera inmediata, sino que implica una fase inicial de desorganización de la biomasa, seguida por un proceso de reestructuración comunitaria (Buenaño-Vargas et al., 2024).

Tabla 9. Observación microscópica y macroscópica de los distintos porcentajes de aclimatación.

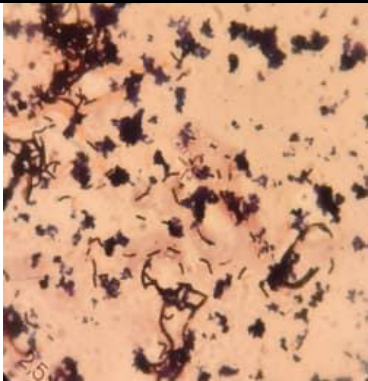
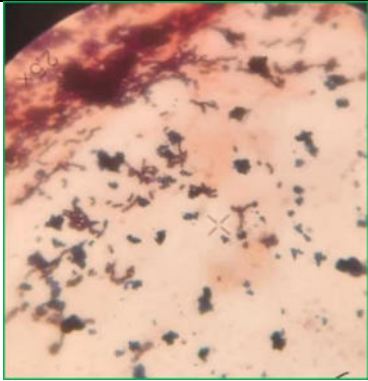
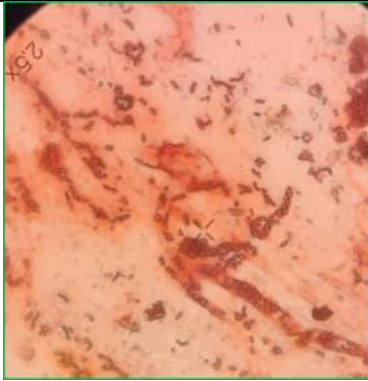
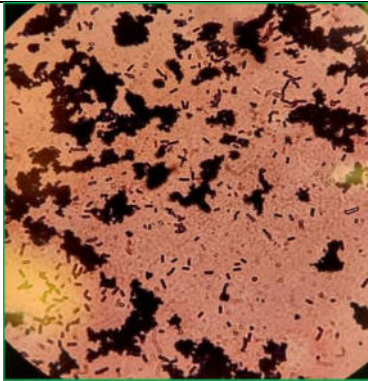
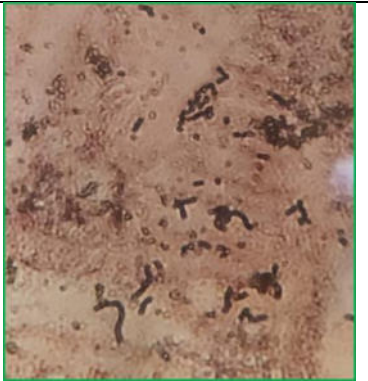
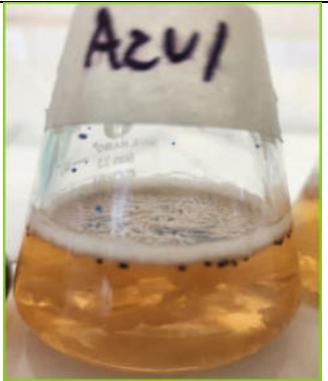
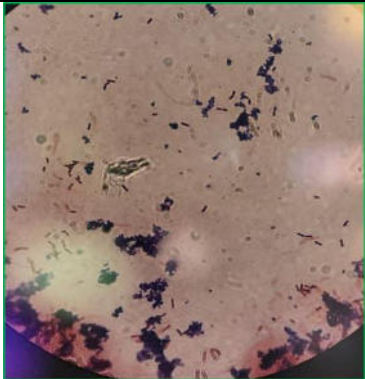
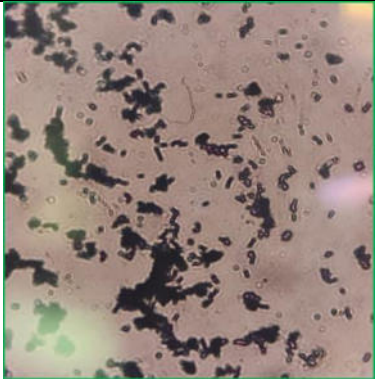
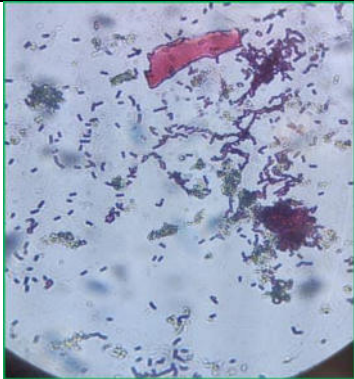
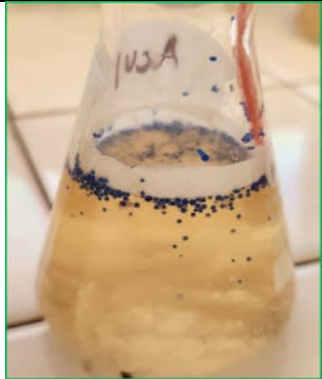
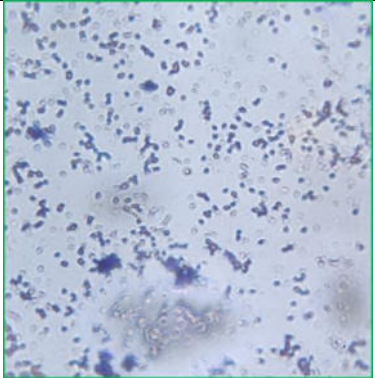
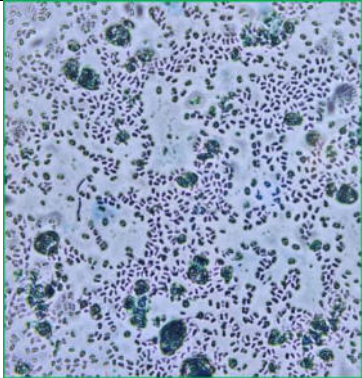
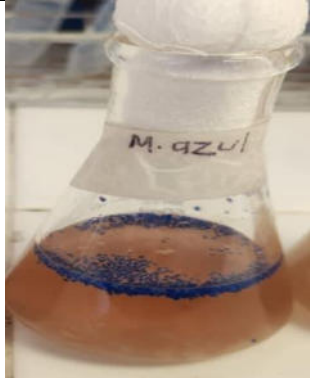
Porcentaje del medio	Tinción de Gram	Tinción de Verde malaquita	Matraz
100% de caldo LB			
90% de caldo LB + 10% de M9 + microplásticos			
80% de caldo LB + 20% de M9 + microplásticos			

Tabla 9 (continuación). Observación microscópica y macroscópica de los distintos porcentajes de aclimatación.

Porcentaje del medio	Tinción de Gram	Tinción de Verde malaquita	Matraz
60% de caldo LB + 40% de M9 + microplásticos			
30% de caldo LB + 70% de M9 + microplásticos			
100% de M9 + microplásticos			

Para determinar las posibles modificaciones estructurales de los microplásticos sometidos a los ensayos de aclimatación, se realizaron análisis por FTIR (las cuales

pueden verse en la tabla 12). Los espectros obtenidos permitieron identificar los grupos funcionales predominantes y comparar la estabilidad del material antes y después del contacto prolongado con el consorcio bacteriano bajo estrés nutricional.

En las muestras de Nivea, los espectros confirmaron la identidad del material como microcelulosa, debido a la presencia de bandas de absorción intensas y anchas en la región de $3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, características de las vibraciones de tensión de los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$). Asimismo, se registraron señales correspondientes a los enlaces C–H alifáticos y vibraciones de tensión del enlace C–O propias del anillo de piranosa. Al contrastar el espectro inicial con el final del proceso de aclimatación, se observaron variaciones en la intensidad relativa de algunas bandas. Sin embargo, la estructura del espectro se mantuvo consistente, lo que indica que el sustrato celulósico conservó su identidad química fundamental frente a la actividad enzimática inicial.

Por su parte, las micropartículas de Neutrogena exhibieron espectros consistentes con polímeros de cadena hidrocarbonada, específicamente del tipo polietileno. Esto se corroboró mediante la identificación de señales agudas y prominentes asociadas a vibraciones de flexión y de tensión de los enlaces C–H alifáticos, así como de bandas características del esqueleto hidrocarbonado. Al comparar los estados inicial y final de la aclimatación (Figura 10), se detectaron ligeras fluctuaciones en la definición de ciertas bandas, aunque el patrón general del polímero permaneció inalterado, lo que sugiere que este mantuvo su composición química.

Estos resultados sugieren que, durante la fase de aclimatación, el Consorcio C-Malatió comenzó a interactuar con la superficie de los microplásticos sin generar aún una degradación masiva ni una ruptura extensiva de las cadenas principales, más si se observaron disminuciones en las intensidades de las bandas, sugiriendo que la adaptación metabólica de esta etapa logró afectar a los microplásticos.

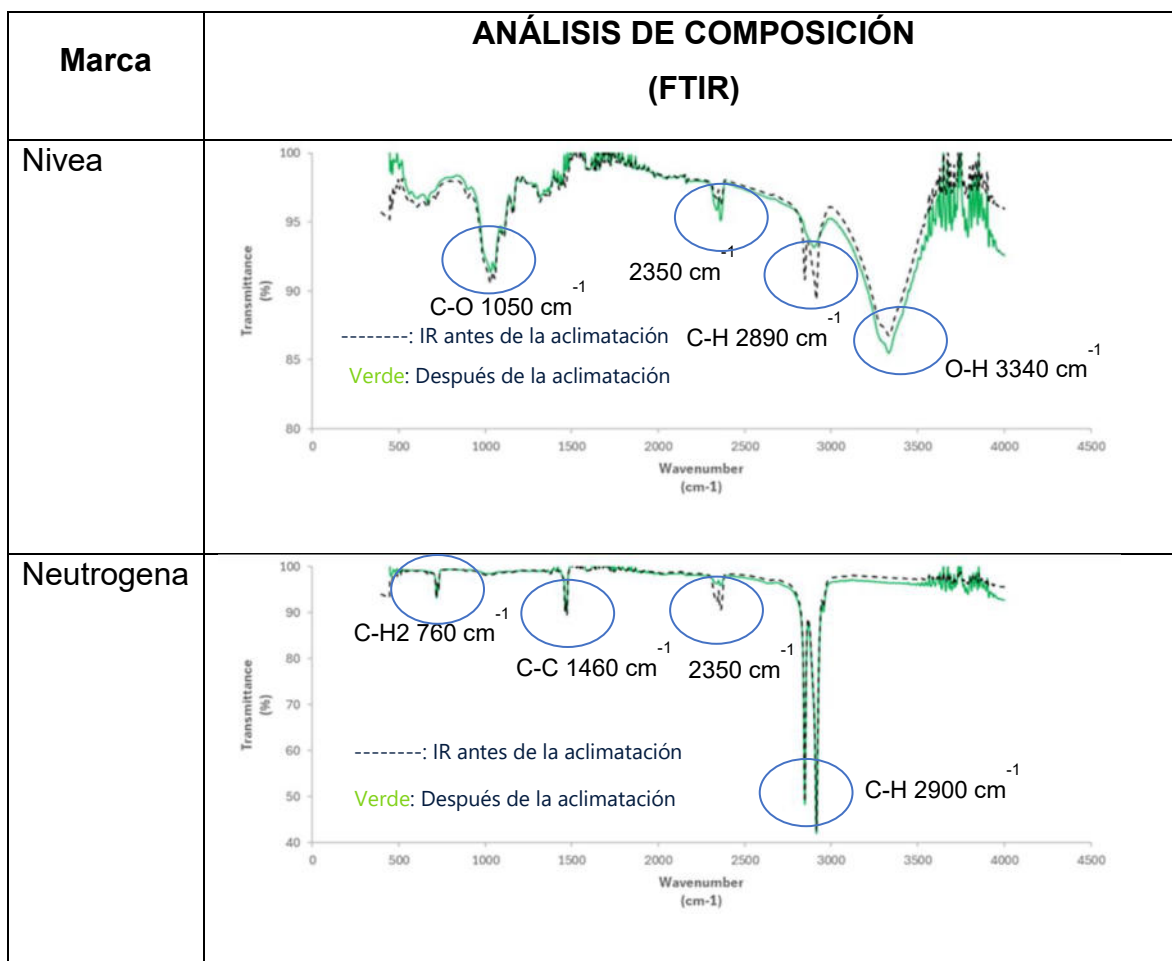


Figura 10. Análisis de composición por FTIR de las dos marcas de exfoliantes comerciales (Nivea y Neutrogena).

La transición de un medio enriquecido y nutricionalmente denso, como el caldo LB, a un entorno restrictivo, como el medio mínimo M9, representó una condición de estrés nutricional para los miembros de los consorcios bacterianos aclimatados a microplásticos. Este cambio redujo la disponibilidad inmediata de fuentes fácilmente asimilables de carbono, nitrógeno y fósforo, favoreciendo procesos de adaptación fisiológica que permitieran la supervivencia y el crecimiento bajo condiciones más limitantes (Shah et al., 2008; Madigan et al., 2021). En este contexto, la estrategia de aclimatación gradual pudo contribuir a minimizar el impacto del cambio de medio, permitiendo una transición progresiva hacia condiciones de mayor restricción nutricional.

Un indicador relevante de la estabilidad de los consorcios durante el proceso de aclimatación fue la persistencia de bacilos Grampositivos observada mediante tinción de Gram. La ausencia de cambios morfológicos evidentes a lo largo de las diferentes etapas sugiere que la población microbiana mantuvo características fenotípicas similares durante la transición nutricional. Considerando que las bacterias Grampositivas poseen una pared celular rica en peptidoglicano, esta

estructura les confiere resistencia frente a diversas condiciones ambientales adversas y contribuye a su supervivencia bajo situaciones de estrés (Madigan et al., 2021; Willey et al., 2020).

La formación de endosporas observada mediante tinción de verde de malaquita es consistente con las respuestas descritas para bacterias del género *Bacillus* sometidas a condiciones de limitación nutricional, donde la esporulación constituye un mecanismo de supervivencia ampliamente documentado (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2014). En el consorcio asociado a Neutrogena se observó una menor presencia aparente de endosporas en comparación con el sistema de Nivea. Aunque este comportamiento no fue cuantificado, podría reflejar diferencias en la respuesta fisiológica de los consorcios frente a los sustratos evaluados. De manera similar, la mayor presencia de esporas observada en el sistema de Nivea podría estar asociada a condiciones que favorecieron la activación de mecanismos de resistencia en una fracción de la población bacteriana.

Finalmente, la persistencia de turbidez y de agregados celulares en los matraces hasta la etapa final de aclimatación sugiere que ambos consorcios fueron capaces de mantenerse bajo las condiciones de estrés nutricional impuestas durante el experimento. Asimismo, la observación simultánea de esporas y células vegetativas indica la coexistencia de estrategias de supervivencia y crecimiento dentro de la comunidad microbiana, fenómeno ampliamente descrito en poblaciones bacterianas expuestas a condiciones ambientales limitantes (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2014). Esto valida el éxito del protocolo de aclimatación, garantizando que los microorganismos no solo sobrevivieron al cambio de medio, sino que también desarrollaron la robustez necesaria para iniciar el ataque enzimático contra las micropartículas de los exfoliantes faciales en las fases posteriores del estudio.

Monitoreo fisiológico del consorcio de trabajo durante los ensayos de aclimatación

Para evaluar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana derivados de la presión selectiva, se comparó la composición del consorcio entre el inicio y el final del proceso de aclimatación. Mediante la técnica de diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) y la posterior siembra en medio LB sólido, se determinó la viabilidad y la diversidad morfológica de las poblaciones asociadas a ambos tipos de micropartículas.

En el consorcio C-Malatién original, se observó crecimiento microbiano en todas las diluciones evaluadas. El análisis macroscópico de las placas reveló una población heterogénea, caracterizada por una notable diversidad en la morfología de las colonias, con variedades rugosas y lisas, que presentaban bordes y elevaciones

distintos (Figura 11). Esta variabilidad fenotípica es representativa de este consorcio, previamente depositado en la Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CM-CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Verdúzco-Suárez, 2024; Martínez-Ledezma, 2018; Acosta-Cortéz, 2017).

Al concluir el periodo de aclimatación del Consorcio C-Malatión con las micropartículas de Nivea, se observó la formación de colonias en todas las diluciones evaluadas, indicando la presencia de microorganismos cultivables al final del proceso. Asimismo, se registró un cambio en las características macroscópicas de las colonias obtenidas en comparación con el consorcio original, lo que podría estar asociado a procesos de selección y adaptación de los microorganismos capaces de crecer bajo las condiciones impuestas durante la aclimatación y en presencia del sustrato celulósico (Dobrzyński et al., 2023 , Lynd et al., 2002). Debido a las diferencias observadas respecto al consorcio de partida, esta población fue designada como Consorcio C-Nivea.

De manera similar, el consorcio resultante asociado a la aclimatación con micropartículas del exfoliante facial de la marca Neutrogena promovió la dominancia de cepas específicas, alterando la composición original del consorcio en favor de los microorganismos con mayor capacidad de adaptación a polímeros sintéticos. Dando así origen a la población denominada Consorcio C-Neutrogena.

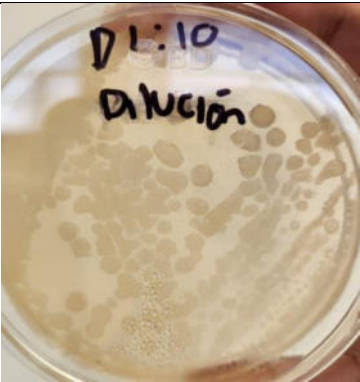
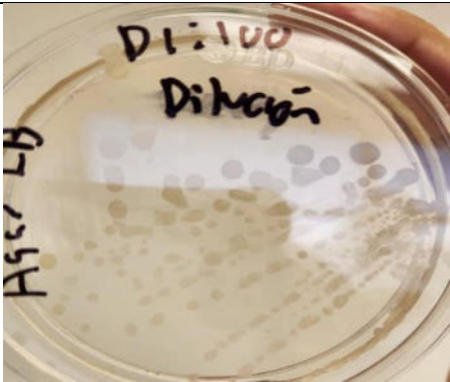
Composición del consorcio cultivado en caldo LB al 100%		
Dilución 1:10	Dilución 1:100	Dilución 1:1000
		

Figura 11. Composición del consorcio cultivado en dilución en serie, antes y después de la aclimatación de las micropartículas obtenidas a partir de los exfoliantes faciales.

Figura 11 (continuación). Composición del consorcio cultivado en dilución en serie, antes y después de la aclimatación de las micropartículas obtenidas a partir de los exfoliantes faciales.

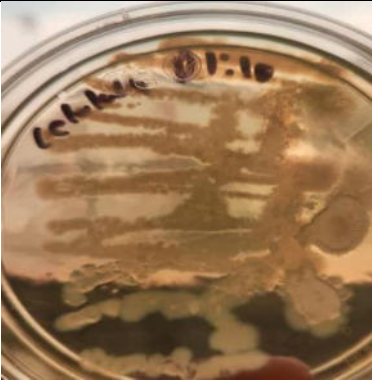
Composición del consorcio Nivea en caldo M9 al 100%		
Dilución 1:10	Dilución 1:100	Dilución 1:1000
		

Figura 11 (continuación). Composición del consorcio cultivado en dilución en serie, antes y después de la aclimatación de las micropartículas obtenidas a partir de los exfoliantes faciales.

Composición del consorcio Neutrogena en caldo M9 al 100%		
Dilución 1:10	Dilución 1:100	Dilución 1:1000
		

El análisis de las diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) mostró la presencia de microorganismos cultivables tanto en el consorcio original como en los consorcios obtenidos tras el proceso de aclimatación con las micropartículas de Nivea y Neutrogena. Asimismo, se registraron cambios en las características macroscópicas de las colonias observadas, lo que sugiere modificaciones en la composición o predominancia de los microorganismos cultivables dentro de los consorcios. Inicialmente, el consorcio C-Malati3n exhibió un perfil fenotípico heterogéneo, caracterizado por la coexistencia de colonias con texturas lisas y rugosas. Esta diversidad coincide con las características previamente descritas para este consorcio en estudios anteriores (Acosta-Cort3ez, 2017; Mart3nez-Ledezma, 2018; Verd3zco-Su3rez, 2024). Sin embargo, al concluir el periodo de aclimataci3n, se observaron cambios notorios en la morfolog3a colonial, los cuales podr3an estar asociados a procesos de selecci3n microbiana favorecidos por las condiciones impuestas por el medio m3nimo M9 y los sustratos empleados como fuente principal de carbono (Lynd et al., 2002; Korpysa-Dzirba et al., 2023).

Esta posible reorganizaci3n de la comunidad microbiana guarda relaci3n con los patrones de esporulaci3n observados durante el proceso de aclimataci3n. En el

caso del consorcio C-Nivea, la aparición de morfologías coloniales distintas, junto con una mayor presencia de endosporas, sugiere una respuesta fisiológica asociada a las condiciones nutricionales del sistema. Dado que la esporulación constituye una estrategia de supervivencia ampliamente documentada en bacterias del género *Bacillus* frente a condiciones de estrés ambiental o limitación de nutrientes, estos resultados son consistentes con la activación de mecanismos de resistencia en una fracción de la población bacteriana (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2014).

Por otra parte, el consorcio aclimatado a las micropartículas de Neutrogena presentó una menor presencia aparente de endosporas, así como cambios en el patrón de crecimiento colonial respecto al consorcio original. Aunque estas observaciones no permiten establecer cambios en la composición taxonómica de la comunidad, sí sugieren una respuesta fisiológica diferente a la observada en el sistema de Nivea. La persistencia de células vegetativas durante el proceso podría indicar que una parte de la población microbiana permaneció activa bajo las condiciones evaluadas, lo que evidencia la capacidad del consorcio para mantenerse en presencia del sustrato sintético durante el periodo de aclimatación.

Confirmación de la actividad celulolítica del consorcio de trabajo involucrada en la biodegradación de polímeros naturales

Para confirmar, a modo de control, la capacidad de degradación de polímeros naturales del Consorcio C-Nivea, se realizó un ensayo de actividad de celulasa en medio sólido suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) (figura 12), demostrándose que este consorcio posee una capacidad robusta para metabolizar el sustrato. Tras la incubación y su posterior revelado con el colorante Rojo Congo, se observaron halos de aclaramiento nítidos y transparentes alrededor de sus colonias. Estas zonas de hidrólisis son evidencia directa de la secreción de celulasas extracelulares responsables de la ruptura de los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ del CMC, impidiendo que el colorante se pudiera ligarse al polímero en esas áreas específicas (Niranjane et al., 2007; Lisdiyanti et al., 2012).

Por el contrario, la cepa empleada como control negativo para la actividad de celulasa, *Serratia marcescens*, aunque presentó crecimiento colonial en el agar, no generó halos de aclaramiento tras el tratamiento con el indicador. Esta ausencia de la zona de hidrólisis confirmó que, bajo las mismas condiciones experimentales, este microorganismo carece de la maquinaria enzimática necesaria para degradar la celulosa (Niranjane et al., 2007; Lisdiyanti et al., 2012). La clara diferenciación entre el consorcio y el control negativo valida la especialización metabólica alcanzada por el Consorcio C-Nivea durante el proceso de aclimatación.

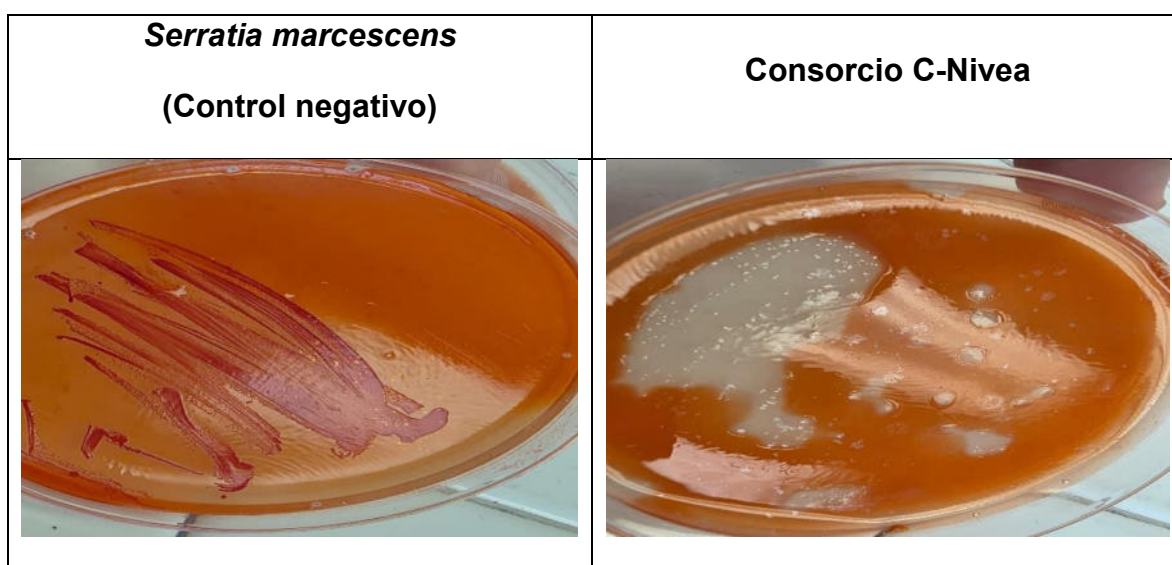


Figura 12. Comparación de los resultados del ensayo de actividad celulolítica en *Serratia marcescens* (izquierda) y el consorcio de trabajo (derecha)

Ensayos de biodegradación de microplásticos primarios por los consorcios de trabajo aclimatados

Monitoreo fisiológico de los consorcios de trabajo durante los ensayos de biodegradación de microplásticos

A lo largo de los ensayos de biodegradación de micropartículas de celulosa llevados a cabo por el Consorcio C-Nivea, se confirmó la persistencia de una población homogénea de bacilos Gram positivos, caracterizados por su morfología bacilar típica y una intensa coloración violeta. La persistencia de una morfología dominada por bacilos Gram positivos durante los ensayos de biodegradación sugiere la estabilidad fenotípica del consorcio bajo las condiciones evaluadas. Este

comportamiento es consistente con lo observado durante el proceso de aclimatación, donde también se mantuvo una morfología predominante sin variaciones evidentes en la tinción de Gram.

Por el contrario, la tinción de verde de malaquita proporcionó evidencia fundamental del predominio de células vegetativas, sin detectarse estructuras verdes representativas de endosporas. La ausencia de estructuras compatibles con endosporas observadas mediante la tinción de verde de malaquita sugiere que una proporción importante de la población bacteriana se mantuvo en estado vegetativo durante el periodo experimental. Este comportamiento es consistente con lo reportado para bacterias del género *Bacillus**, donde la formación de endosporas constituye una respuesta a condiciones de estrés nutricional o limitación de recursos (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2014). En este contexto, la predominancia de células vegetativas podría indicar que las condiciones del sistema permitieron el mantenimiento de actividad fisiológica en una fracción de la población.

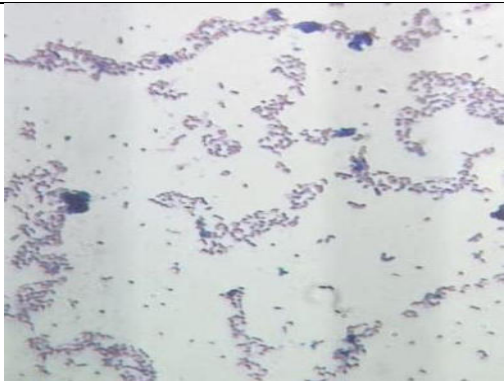
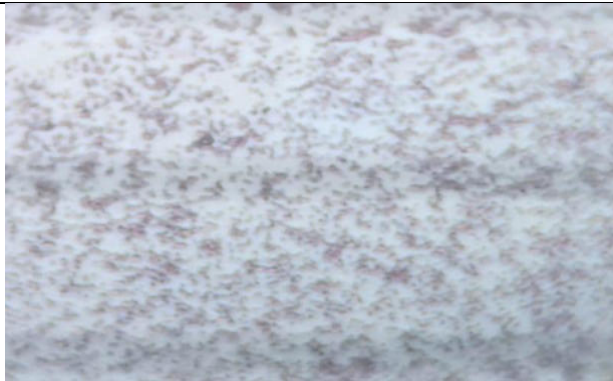
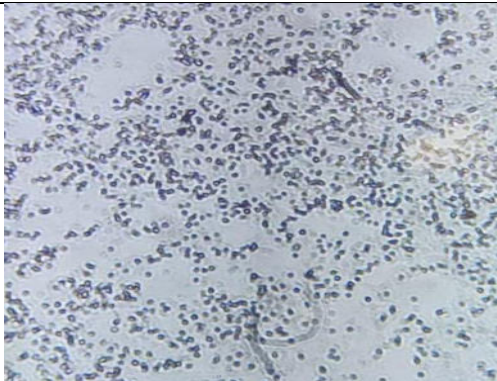
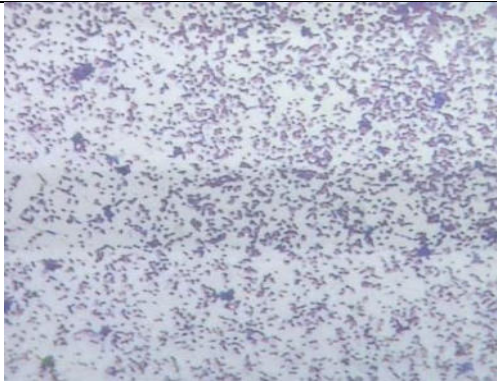
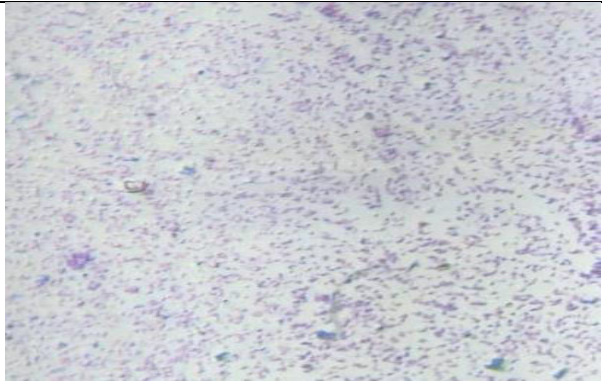
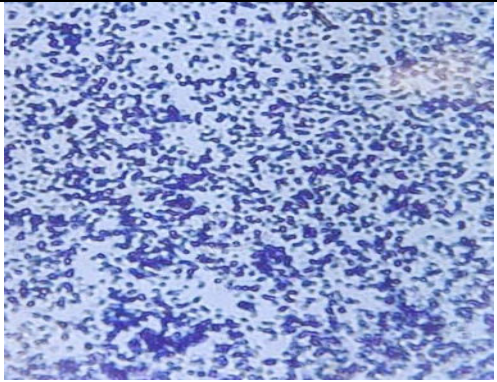
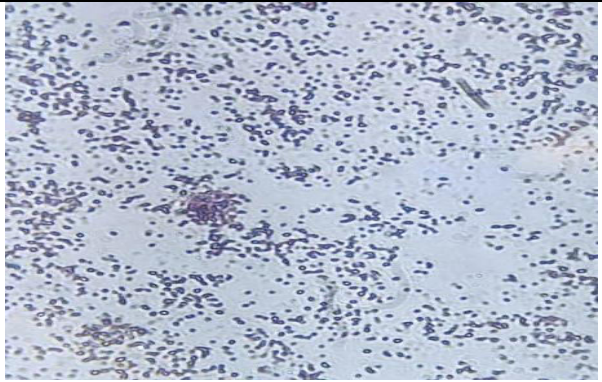
Semana	Tinción de Gram	Tinción de verde de Malaquita
1		

Figura 13. Imágenes de frotis (Gram en la izquierda y Tinción de verde de Malaquita en la derecha) del consorcio de trabajo en micropartículas de Nivea.

Figura 13 (continuación). Imágenes de frotis (Gram en la izquierda y Tinción de verde de Malaquita en la derecha) del consorcio de trabajo en micropartículas de Nivea.

Semana	Tinción de Gram	Tinción de verde de Malaquita
2		
3		
4		

De manera similar, el monitoreo microbiológico del proceso de biodegradación de micropartículas de la marca Neutrogena reveló una respuesta consistente con los hallazgos del Consorcio C-Nivea, en la que los microorganismos conservaron su morfología bacilar y su afinidad por el cristal violeta de manera uniforme durante

todo el ensayo, sin presentar alteraciones estructurales, pleomorfismo ni lisis celular evidentes. Lo mismo ocurrió con los resultados de la tinción de verde de malaquita, que mostraron la ausencia de estructuras correspondientes a endosporas, lo que indica una prevalencia de células vegetativas. Esto sugiere que, a pesar de la naturaleza recalcitrante del plástico sintético, las bacterias no activaron sus mecanismos de latencia por estrés. Este comportamiento sugiere que ambos consorcios mantuvieron una actividad metabólica constante y lograron subsistir en el medio mínimo M9 utilizando micropartículas de polietileno y celulosa como sustratos.

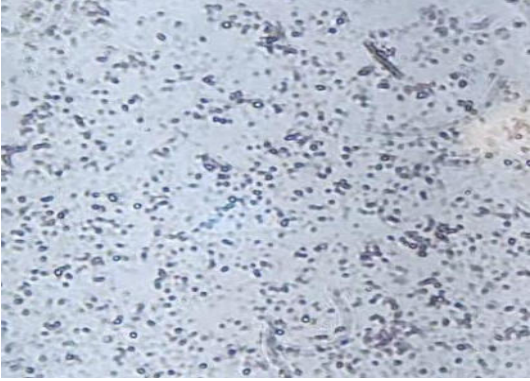
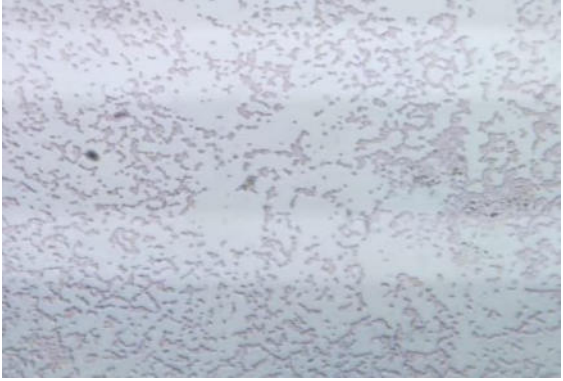
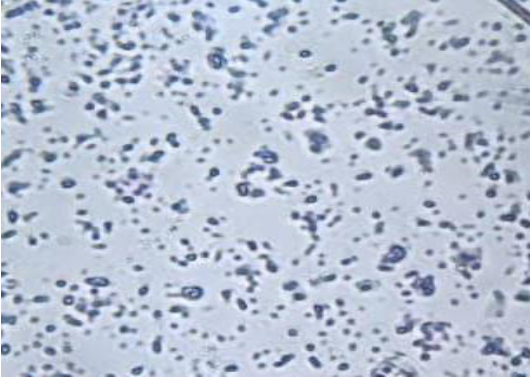
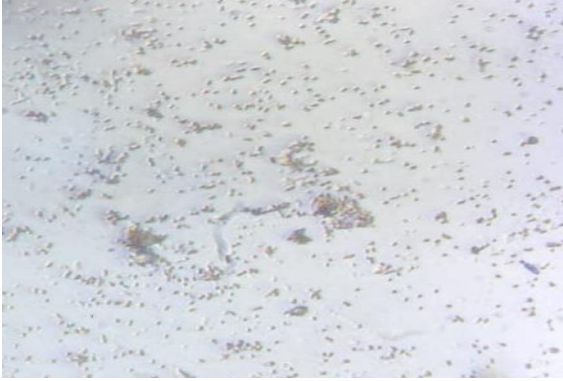
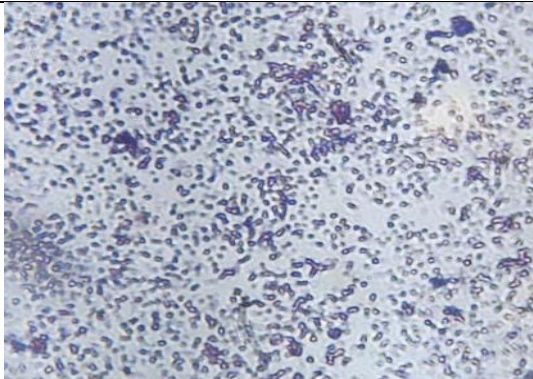
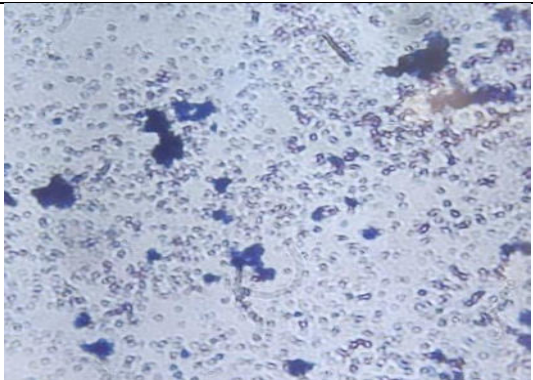
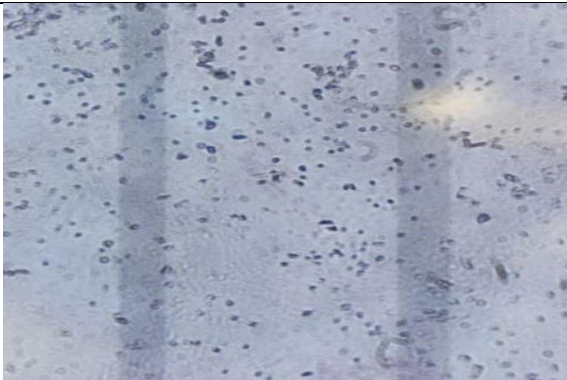
Semana	Tinción de Gram	Tinción de verde de Malaquita
1		
2		

Figura 14. Imágenes de frotis (Gram en la izquierda y Tinción de verde de Malaquita en la derecha) del consorcio de trabajo en micropartículas de Neutrogena

figura 14 (continuación). Imágenes de frotis (Gram en la izquierda y Tinción de verde de Malaquita en la derecha) del consorcio de trabajo en micropartículas de Neutrogena.

Semana	Tinción de Gram	Tinción de verde de Malaquita
3		
4		

El monitoreo microbiológico mediante tinciones diferenciales permitió evaluar las características morfológicas del consorcio durante la fase de biodegradación en presencia de micropartículas de celulosa y polietileno. En ambos tratamientos se observó la persistencia de bacilos Gram positivos, sin evidencias de variaciones morfológicas relevantes a nivel microscópico, lo que sugiere una estabilidad fenotípica del consorcio bajo las condiciones experimentales evaluadas. Este comportamiento es consistente con las características estructurales descritas para bacterias Gram positivas, particularmente del género *Bacillus**, cuya pared celular rica en peptidoglicano contribuye a su resistencia y conservación morfológica en

distintos ambientes (Prescott's Microbiology; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology).

También, por otra parte, la tinción con verde de malaquita permitió observar la ausencia de estructuras compatibles con endosporas en la mayoría de las muestras analizadas, lo que sugiere una predominancia de células en estado vegetativo durante el periodo experimental. Considerando que la esporulación en bacterias del género *Bacillus* se asocia principalmente a condiciones de estrés nutricional o limitación de recursos, estos resultados podrían indicar que las condiciones del sistema no favorecieron de manera generalizada la activación de este mecanismo de supervivencia (Nicholson et al., 2000; Setlow, 2014). En conjunto, las observaciones obtenidas en ambos tratamientos muestran un comportamiento morfológico comparable del consorcio frente a los distintos sustratos evaluados.

Análisis gravimétrico de los microplásticos sometidos a los ensayos de biodegradación

Para determinar el grado de degradación biológica observado en las micropartículas sometidas a los distintos ensayos de biodegradación, se realizó un análisis gravimétrico que permitió comparar la pérdida de masa entre el tratamiento inoculado y un control abiótico, bajo condiciones experimentales idénticas. Los datos obtenidos se resumen en las Tablas 10 y 11.

En las muestras de microplásticos de celulosa sometidas a la actividad del consorcio bacteriano, se registró una disminución de la masa neta cercana al 22.47%. Esta disminución de masa puede considerarse un indicador del cambio en la integridad del material celulósico bajo condiciones biológicas, en comparación con el control abiótico. La diferencia observada sugiere una alteración del sustrato en presencia del consorcio microbiano, lo cual refleja una modificación del material respecto a su estado inicial. Esto sugeriría que las bacterias fueron capaces de utilizar el polímero como fuente de carbono y energía.

Tabla 10. Variación de la masa por el proceso de biodegradación y el porcentaje de degradación en la biodegradación de micropartículas de Nivea.

Tratamiento	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Variación de la masa por el proceso de aclimatación (Δg) / Porcentaje de degradación
Control abiótico	0.0958	0.0958	0 (0%)
Consorcio C + MPs Nivea	0.0930 $\pm$ 0.0022	0.0721 $\pm$ 0.0082	0.0209 (22.47%)

En el caso de los microplásticos obtenidos del exfoliante de la marca Neutrogena, el tratamiento de biodegradación registró una variación entre la masa inicial y final del 3.39 %. Dado que los polímeros sintéticos poseen una estructura química más compleja y recalcitrante que la celulosa, la disminución de masa observada en este proceso de biodegradación sugiere un cambio en la integridad del material bajo las condiciones experimentales evaluadas, en comparación con el control abiótico, en una medida mucho menor que con las micropartículas de celulosa.

Tomando en cuenta todos los resultados, la comparación directa de la pérdida de masa entre los tratamientos con los consorcios de trabajo y los controles sin inóculo revela una diferencia favorable al tratamiento biótico. Esta divergencia permite inferir que, más allá de la degradación física, existe una contribución biológica activa a la reducción de la masa de las micropartículas, lo que sugiere que nuestros consorcios poseen la capacidad biológica para atacar incluso polímeros sintéticos de alta resistencia, como el polietileno.

Tabla 11. Variación de la masa por el proceso de aclimatación y porcentaje de degradación en la biodegradación de micropartículas de Nivea.

Tratamiento	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Diferencia de masa por el proceso de aclimatación (Δg) / Porcentaje de degradación
Control abiótico	0.0979	0.0979	0 (0%)
Consorcio C + MPs Neutrogena	0.1063 $\pm$ 0.0006	0.1027 $\pm$ 0.0032	0.0036 (3.39%)

El porcentaje de reducción de masa obtenido en las muestras de microplásticos de celulosa (22.47 %) puede contextualizarse dentro de los rangos reportados en la literatura para sistemas microbianos degradadores de sustratos celulósicos. En estudios previos, se ha reportado una degradación del 17.2 % en celulosa de pasto switchgrass en 14 días utilizando *Geobacillus thermodenitrificans** (Ma et al., 2020), así como un 39.6 % de degradación de celulosa proveniente de excremento de gusano de seda en 6 días por *Bacillus subtilis** (Li et al., 2023). De manera similar, un consorcio conformado por *Thermoanaerobacterium**, *Bacillus** y *Tepidiphilus** logró una degradación del 14.7 % en celulosa microcristalina en 15 días (Xia et al., 2011). En conjunto, estos valores sugieren que el comportamiento observado en el presente estudio se encuentra dentro del rango reportado para sistemas bacterianos con capacidad celulolítica, considerando además las diferencias en tiempo de incubación, tipo de sustrato y composición microbiana.

En el caso de los microplásticos obtenidos del exfoliante de la marca Neutrogena, la reducción de masa (3.39 %) puede compararse con reportes de biodegradación de polímeros sintéticos por diferentes microorganismos. Por ejemplo, *Bacillus paralicheniformis** ha mostrado degradación de poliestireno del 34 % en 2 meses (Ganesh Kumar et al., 2021), mientras que especies de *Brevibacillus** han alcanzado un 44 % de degradación de polipropileno en 140 días (Skariyachan et al., 2018). En contraste, valores cercanos al 3 % han sido reportados para *Bacillus** spp. en polietileno tras 42 días (Rafiemanzelat et al., 2015), lo que resulta más

comparable con el comportamiento observado en este estudio. Estas diferencias reflejan la alta variabilidad en la biodegradación de polímeros sintéticos, influenciada por la naturaleza química del material, el tiempo de exposición y el tipo de microorganismo empleado.

Análisis morfológico y de ultraestructura superficial de los microplásticos sometidos a los ensayos de biodegradación.

La evaluación macroscópica de las micropartículas, realizada mediante microscopía estereoscópica, permitió documentar las alteraciones físicas iniciales derivadas del proceso de aclimatación.

El estado inicial de las micropartículas de Nivea se caracterizó por estructuras esféricas, de superficie uniforme y de aspecto liso. Sin embargo, tras el proceso de biodegradación, el material exhibió una transición morfológica notable, observándose que las esferas adoptaron una apariencia contraída aunada a una pérdida de uniformidad superficial, asemejándose a una estructura deshidratada. Esta contracción sugiere una posible degradación de los componentes más externos de la matriz celulósica o una pérdida en la integridad estructural por la acción enzimática del consorcio.

Por su parte, las micropartículas de Neutrogena mostraron un comportamiento distintivo, ya que, antes del ensayo, las esferas presentaban una morfología definida, con una superficie continua y regular. Tras la interacción de los microplásticos con el consorcio, se detectaron deformaciones evidentes en su contorno, manifestadas como una apariencia “abollada” o deprimida, con irregularidades visibles en la curvatura de las partículas. Estas depresiones en la superficie del polímero sintético pueden ser indicativas de un ataque localizado o, incluso, de una erosión mecánico-biológica durante la fase de adaptación metabólica.

En ambos casos, las evidencias visuales confirman que los consorcios bacterianos no solo sobrevivieron en presencia de estos materiales, sino que también generaron

modificaciones físicas tangibles en la superficie de los microplásticos, lo que evidencia que los procesos de biodegradación tuvieron cierto grado de éxito.

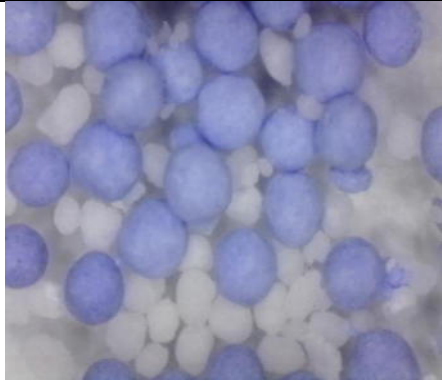
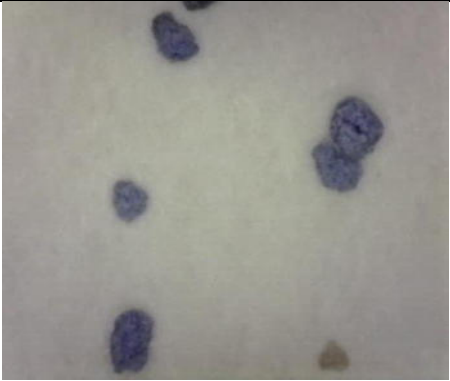
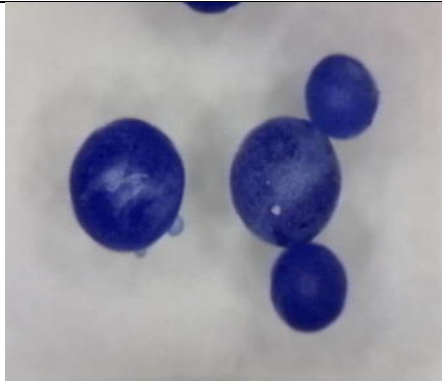
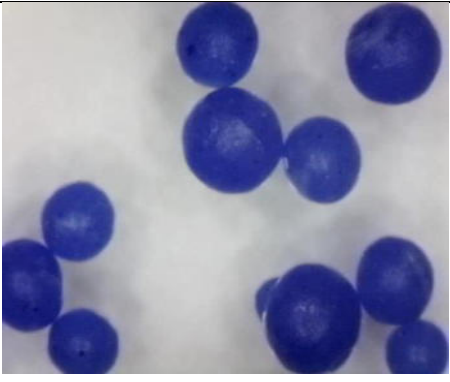
Marca	Análisis macroscópico	
	Inicial	final
Nivea		
Neutrogena		

Figura 15. Análisis morfológico de las micropartículas sometidas a ensayos de biodegradación.

El análisis SEM permitió examinar con mayor resolución las modificaciones topográficas sufridas por las micropartículas tras los procesos de biodegradación. Las micrografías obtenidas a distintos niveles de magnificación (75x, 100x, 1000x y 1500x) confirmaron una interacción física directa entre el consorcio bacteriano y la matriz polimérica. Por ejemplo, en el caso de las micropartículas de celulosa, a bajas magnificaciones (75x y 100x) se observó que la morfología macroestructural de las partículas presentó una marcada heterogeneidad, con estructuras de geometrías irregulares y superficies rugosas, lo que evidencia variaciones en tamaño y forma que se alejan de la uniformidad previa al proceso de biodegradación. La presencia

de bordes no uniformes y de zonas de relieve accidentado sugiere un proceso de erosión mecánica y biológica significativo (Ganesh Kumar et al., 2021).

Al incrementar la resolución (1000x y 1500x), las irregularidades se observaron más pronunciadas, destacándose la aparición de cierta porosidad superficial y de áreas con signos de erosión enzimática. Una observación importante en estas micrografías fue la detección de estructuras bacilares adheridas a la superficie del material, lo cual presumiblemente está relacionado con la formación temprana de biopelículas. Estas observaciones confirman que las bacterias del consorcio C-Nivea no solo se encontraban en suspensión, sino que también pueden favorecer procesos de adsorción y anclaje a la celulosa, utilizando las irregularidades y los poros del material como nichos para su actividad enzimática.

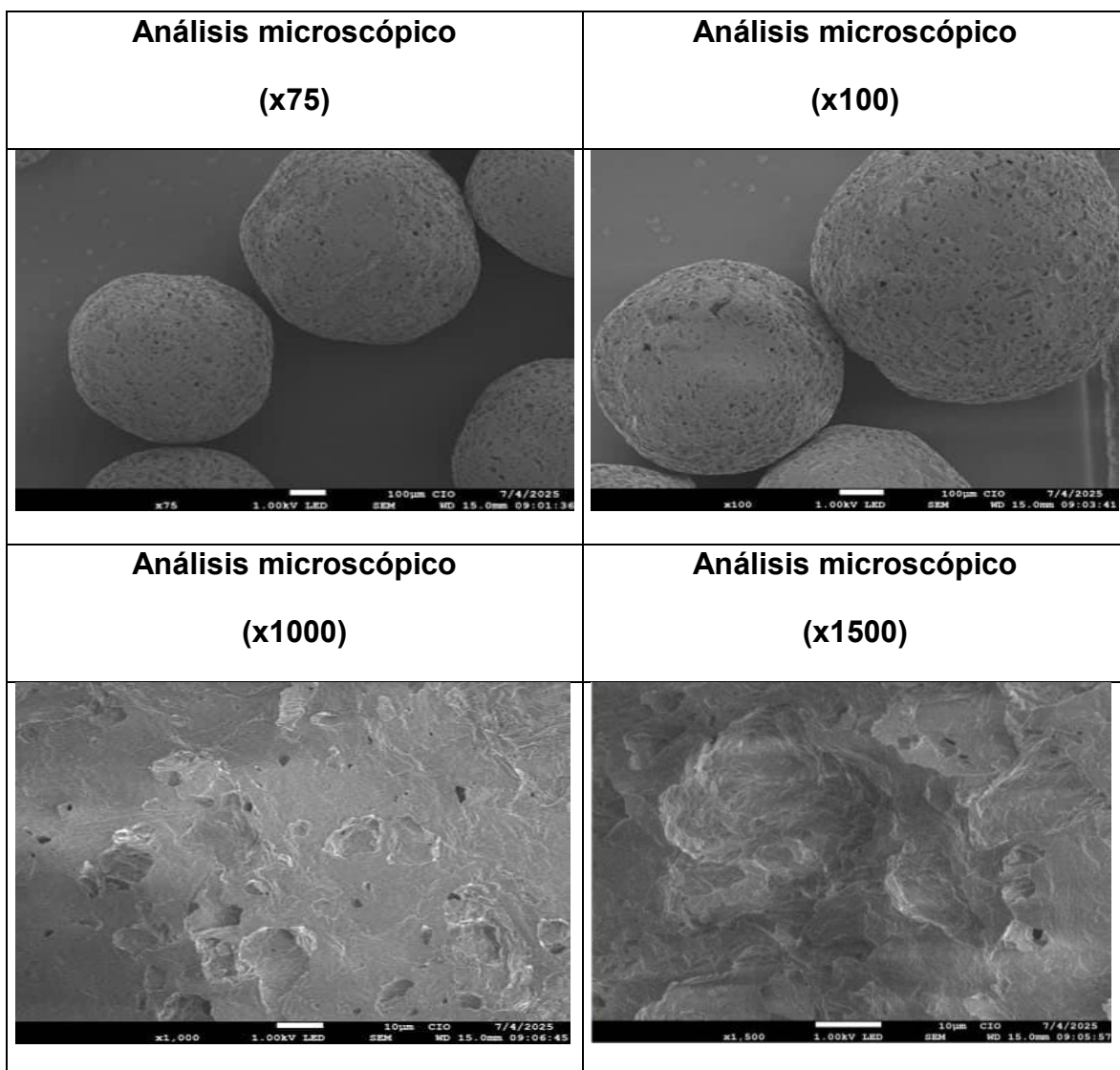


Figura 16. Análisis microscópico mediante SEM de las micropartículas de Nivea sometidas a ensayos de biodegradación, las imágenes son pertenecientes al final de la biodegradación.

Por su parte, las partículas de Neutrógena presentaron una morfología irregular y una textura rugosa, inherentes al proceso de fabricación del exfoliante. Al incrementar la resolución a 1000x y 1500x, se identificaron relieves no uniformes, distribuidos aleatoriamente a lo largo de la superficie, aunque con una continuidad estructural definida. Tras el proceso de biodegradación, si bien la apariencia general de las partículas a baja magnificación se mantuvo constante, el análisis de alta resolución reveló cambios significativos en la topografía superficial. A 1000x y 1500x, las irregularidades previamente observadas al inicio del bioensayo se tornaron más marcadas y profundas. Además, se documentó la aparición de surcos

definidos y una acentuación de la rugosidad del material, lo que sugiere un proceso de erosión superficial.

Estas evidencias micrográficas demuestran que, aunque los polímeros sintéticos de Neutrogena presentan una mayor recalcitrancia que la celulosa, el consorcio bacteriano logró inducir una alteración física observable en los microplásticos. La transición de una rugosidad simple a una textura con surcos y relieves pronunciados es un claro indicador de la biodeterioración química y mecánica que precede a la fragmentación del microplástico.

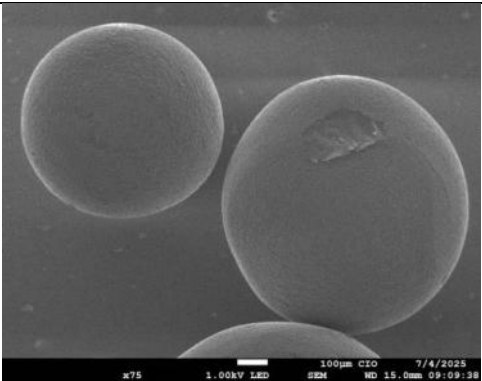
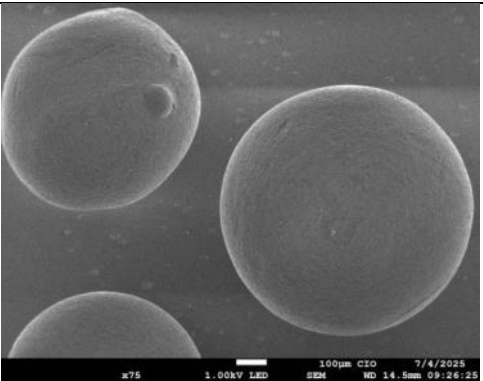
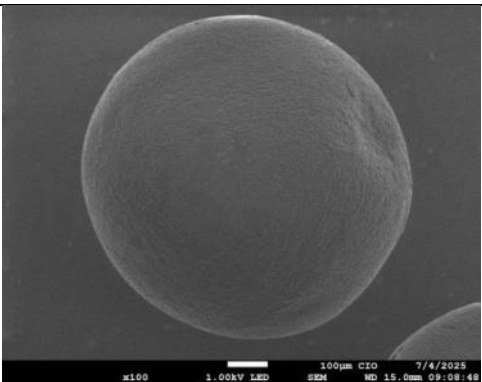
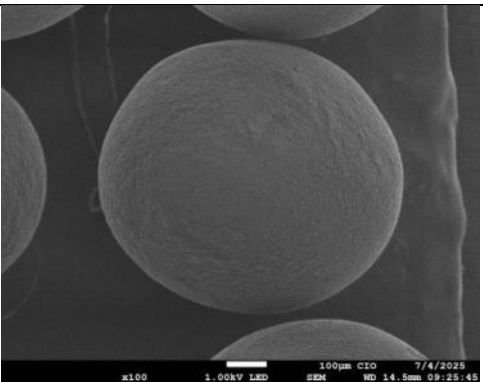
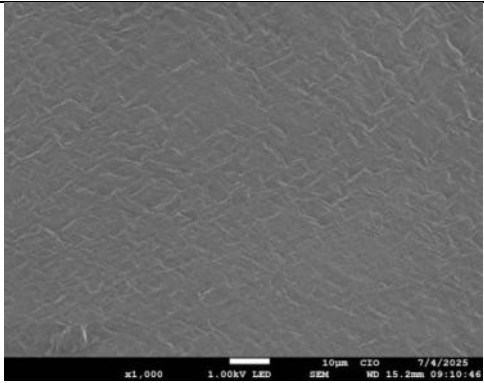
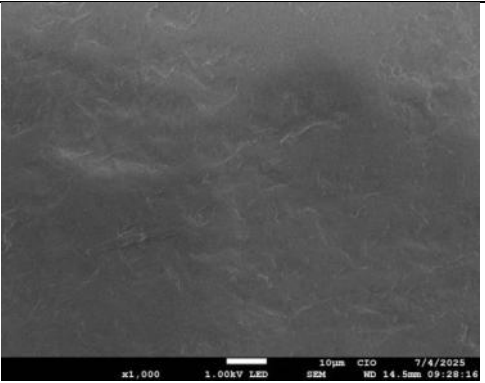
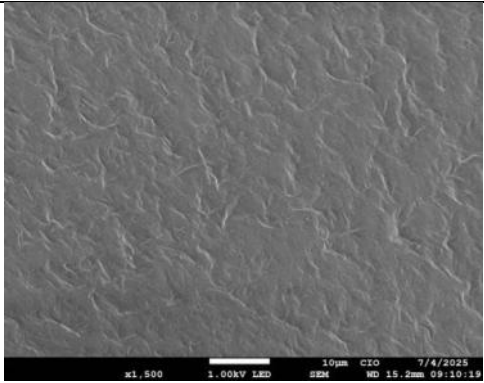
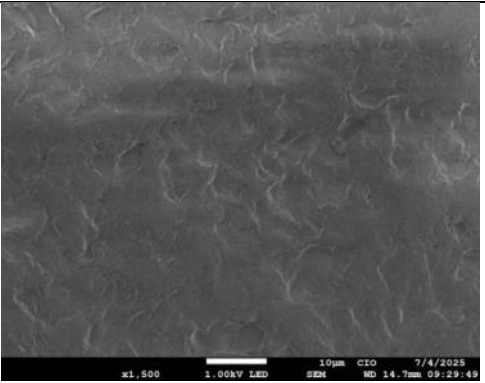
Aumento	Antes de la aclimatación	Después de la aclimatación
Análisis microscópico (x75)		
Análisis microscópico (x100)		

Figura 17. Análisis microscópico mediante SEM de las micropartículas de Nivea sometidas a ensayos de biodegradación.

Figura 17 (continuación). Análisis microscópico mediante SEM de las micropartículas de Nivea sometidas a ensayos de biodegradación.

Aumento	Antes de la aclimatación	Después de la aclimatación
Análisis microscópico (x1000)		
Análisis microscópico (x1500)		

La evaluación mediante microscopía estereoscópica reveló que ambos tipos de micropartículas presentaron modificaciones físicas tras los ensayos de biodegradación, aunque con patrones diferenciados. Estas variaciones morfológicas sugieren que las propiedades intrínsecas de cada polímero influyeron en la forma en que el material respondió a las condiciones de exposición biológica.

En el caso de las micropartículas de Nivea, se observó una pérdida de la morfología esférica y una apariencia más contraída. Este cambio podría estar asociado a alteraciones en la estructura del material celulósico, el cual, debido a su naturaleza hidrofílica y estructura porosa, es susceptible a modificaciones en su integridad física bajo condiciones biológicas. La reducción de la esfericidad sugiere una interacción entre el consorcio microbiano y la superficie del material.

Por otro lado, las micropartículas de Neutrogena mostraron deformaciones superficiales caracterizadas por irregularidades y zonas de depresión. Dado que los

polímeros sintéticos presentan una estructura más densa e hidrofóbica, estas alteraciones podrían reflejar un proceso de modificación superficial localizado asociado a la interacción entre el consorcio y el material. La pérdida de la geometría original indica cambios en la estabilidad física de las partículas tras el periodo experimental.

El análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió observar con mayor resolución los cambios en la topografía superficial de las micropartículas tras los ensayos. En el caso de Neutrogena, se identificaron superficies con mayor rugosidad y presencia de surcos en comparación con el material inicial, lo que indica modificaciones en la estructura superficial tras la exposición al consorcio microbiano. Para las micropartículas de Nivea, también se observaron superficies heterogéneas con texturas irregulares y presencia de microestructuras superficiales. Estas características fueron consistentes con los cambios topográficos observados en ambos materiales, aunque con variaciones en su intensidad y patrón.

Análisis de los grupos funcionales de los microplásticos sometidos a los ensayos de biodegradación por FTIR

El análisis de la biodegradación de las micropartículas mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se enfocó en identificar cambios en los grupos funcionales presentes en los materiales analizados y evaluar posibles variaciones asociadas a la exposición a los consorcios bacterianos bajo condiciones experimentales controladas.

En el caso de las micropartículas provenientes del exfoliante facial de Nivea (figura 10 y figura 11), se observaron variaciones en distintos picos característicos del espectro tanto en las muestras inoculadas como en el control sin inóculo. Este comportamiento sugiere que una parte de las modificaciones espectrales puede estar asociada a factores del medio experimental, particularmente a la interacción prolongada con el medio líquido M9, el cual posee una naturaleza altamente acuosa. En este sentido, la banda cercana a 1640 cm^{-1} ha sido previamente relacionada con cambios en el contenido de agua adsorbida dentro de la matriz de celulosa, fenómeno descrito en la literatura como sensible a condiciones de hidratación del material (Łojewska et al., 2005). De manera similar, las variaciones observadas en las regiones cercanas a 3300 , 2900 y 1050 cm^{-1} pueden asociarse a modificaciones

en la intensidad de los grupos funcionales característicos de la celulosa, aunque la presencia de estos cambios tanto en el control como en el tratamiento inoculado sugiere una contribución relevante de efectos fisicoquímicos propios del sistema experimental.

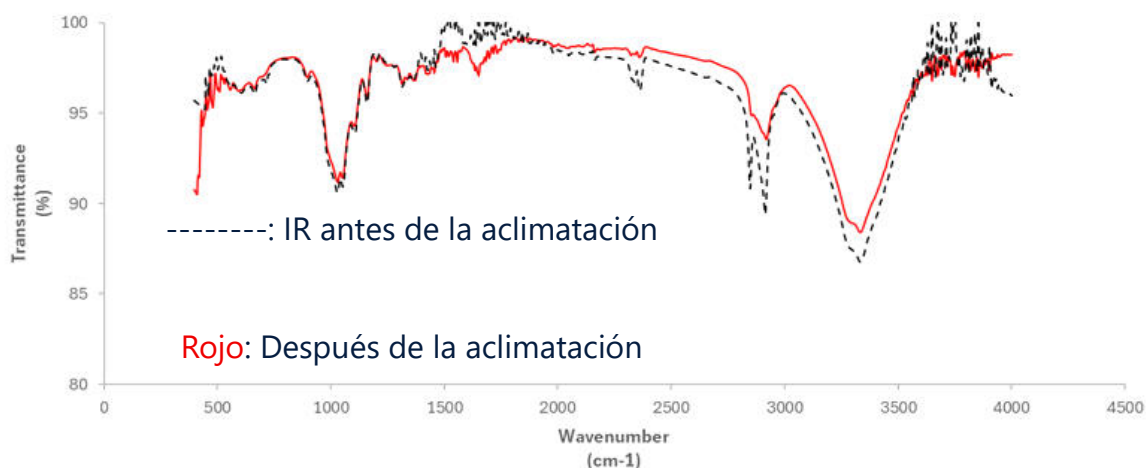


Figura 18. Análisis de los espectros FTIR de las micropartículas de Nivea del control sin inóculo.

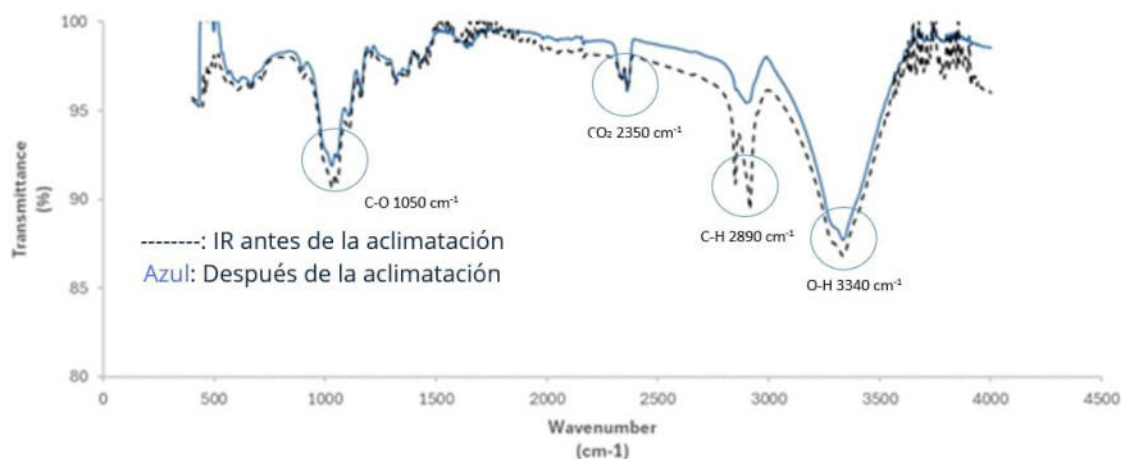


Figura 19. Análisis de los espectros FTIR de las micropartículas de Nivea con inóculo.

A pesar de ello, se observó que algunas bandas presentaron cambios diferenciales entre tratamientos. En particular, las bandas cercanas a 3300 cm^{-1} y 2900 cm^{-1} mostraron una disminución más pronunciada en las muestras inoculadas en comparación con el control. La banda alrededor de 3300 cm^{-1} , asociada a

vibraciones de estiramiento de grupos hidroxilo (O–H), ha sido descrita como sensible a modificaciones estructurales en la celulosa, incluyendo procesos de oxidación o envejecimiento del material (Abi Munajad et al., 2018). Por otro lado, la banda cercana a 1050 cm^{-1} , asociada a vibraciones de enlaces C–O, mostró una disminución más marcada en las muestras inoculadas, mientras que en el control se mantuvo relativamente estable, lo cual coincide con reportes donde variaciones en esta región se asocian a alteraciones en polisacáridos estructurales (Brunšek et al., 2023). Estas diferencias permiten distinguir entre cambios atribuibles al sistema experimental y aquellos potencialmente relacionados con la presencia del consorcio.

Por otra parte, el análisis de FTIR del tratamiento de las micropartículas de Neutrogena (figura 12 y figura 13) por incubación durante seis semanas permitió identificar alteraciones específicas en la estructura polimérica que diferencian la degradación biológica del desgaste fisicoquímico observado en el control.

En las muestras inoculadas se registró una disminución en la región cercana a 2900 cm^{-1} , correspondiente a vibraciones de estiramiento de enlaces C–H, así como en las bandas alrededor de 1460 cm^{-1} y 760 cm^{-1} , asociadas a vibraciones de enlaces C–C y deformaciones del grupo CH_2 , respectivamente. En contraste, el control sin inóculo mantuvo un patrón espectral similar al inicial, lo que indica que estas variaciones no se presentaron en ausencia de actividad biológica.

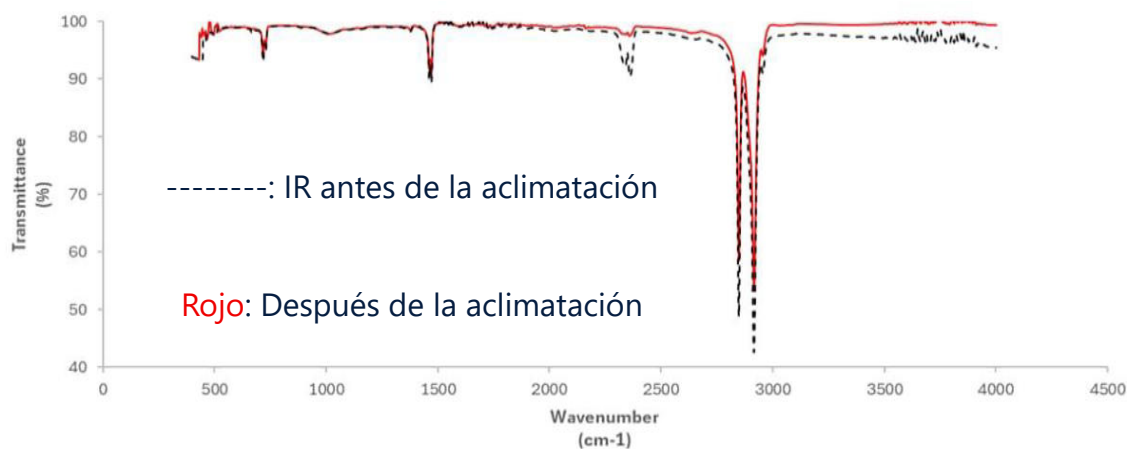


Figura 20. Análisis de los espectros FTIR de las micropartículas de Neutrogena sin inóculo.

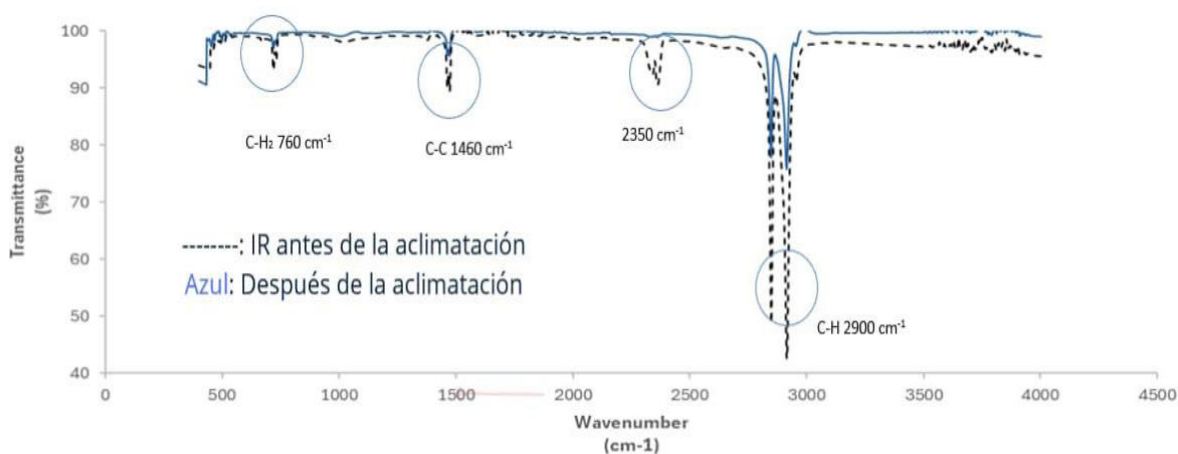


Figura 21. Análisis de los espectros FTIR de las micropartículas de Neutrogena con inóculo.

Hablando del pico cercano a 2350 cm^{-1} y su disminución tras los ensayos, un comportamiento similar ha sido reportado en estudios de biodegradación de polímeros aromáticos. Por ejemplo, en el estudio titulado Ganesh Kumar et al. (2021) se reporta la desaparición de picos en torno a 2300 y 1700 cm^{-1} durante el proceso de degradación del poliestireno, fenómeno que los autores asocian a procesos de oxidación del polímero derivados de su descomposición. Aunque el material analizado en dicho estudio no corresponde exactamente al mismo tipo de micropartícula evaluada en este trabajo, la similitud en el comportamiento espectral

observado permite considerar este reporte como un punto de referencia para interpretar las modificaciones detectadas en los espectros obtenidos en el presente estudio.

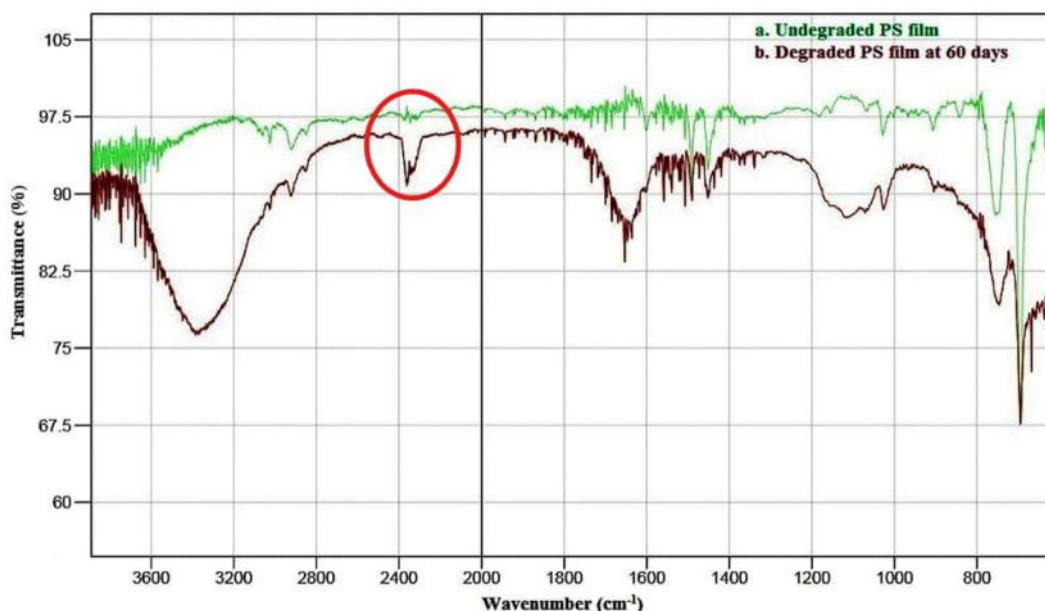


Figura 22. Análisis de espectros FTIR de (a) película de PS no degradada y (b) película de PS después de 60 días de tratamiento microbiano (Ganesh Kumar et al. 2021).

En particular, en las muestras evaluadas se observó la desaparición del pico en torno a 2350 cm^{-1} . Sin embargo, a diferencia de los demás cambios registrados en el espectro, este fenómeno también se observó en el control sin inóculo. Debido a ello, este pico no puede atribuirse directamente a la actividad bacteriana en el sistema experimental, lo que sugiere que su desaparición podría estar asociada a otros factores externos o a condiciones fisicoquímicas del medio experimental. A pesar de ello, la disminución generalizada de la intensidad de otros picos característicos del material, observada únicamente en las muestras inoculadas, constituye un indicio de que el consorcio bacteriano pudo haber interactuado con las micropartículas durante el proceso experimental, generando modificaciones detectables en su estructura química. Estos resultados sugieren que la presencia

del consorcio bacteriano pudo haber contribuido a la alteración de algunos grupos funcionales presentes en las micropartículas analizadas, lo cual es consistente con procesos iniciales de transformación o degradación de materiales poliméricos reportados en la literatura para bacterias del género *Bacillus*.

Finalmente, la comparación entre ambos materiales muestra que las modificaciones espectrales en la celulosa presentan una mayor influencia de factores relacionados con hidratación y cambios en grupos funcionales hidrofílicos, mientras que en el material sintético las variaciones se concentran principalmente en bandas asociadas a cadenas hidrocarbonadas. Estas diferencias reflejan el comportamiento distinto de ambos polímeros bajo condiciones biológicas similares.

Ensayos de codegradación de microplásticos primarios funcionalizados con pesticidas organofosforados

Monitoreo fisiológico de los consorcios de trabajo durante los ensayos de codegradación de microplásticos funcionalizados con pesticidas organofosforados

Durante los ensayos de codegradación de microplásticos suplementados con pesticidas organofosforados, se llevó a cabo el monitoreo fisiológico del consorcio bacteriano mediante tinciones de Gram y de verde de malaquita. El objetivo fue dar seguimiento a sus características morfológicas y a su estado fisiológico a lo largo del experimento.

En ambos tipos de micropartículas se observó un comportamiento similar, las tinciones de Gram mostraron la presencia de bacterias con morfología de bacilos, mientras que en las tinciones de verde de malaquita no se detectó coloración verde en ninguna de las muestras analizadas. Esto indica, de manera consistente con lo observado en los experimentos de biodegradación, que el proceso de esporulación no se reactivó en las bacterias del consorcio, lo que sugiere un estado metabólico activo frente a los distintos contaminantes.

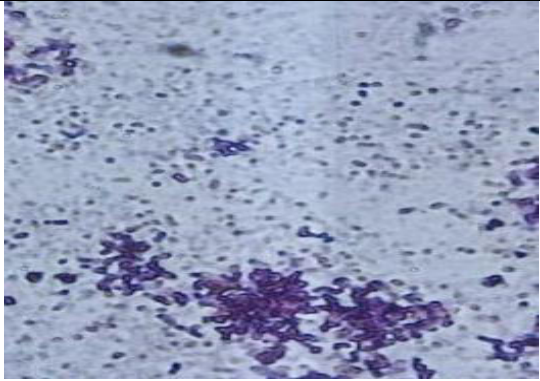
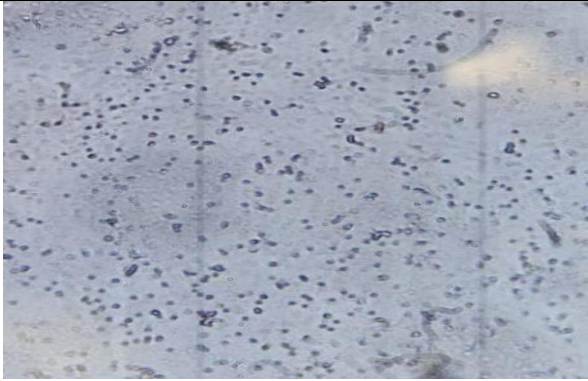
Resultado de tinciones de los microplásticos: Celulosa Nivea		
Semana	Tinción de Gram	Tinción de verde de Malaquita
1		

Figura 23. Resultado de las tinciones de Gram y verde de malaquita durante los experimentos de co-degradación.

Figura 23 (continuación). Resultado de las tinciones de Gram y verde de malaquita durante los experimentos de co-degradación.

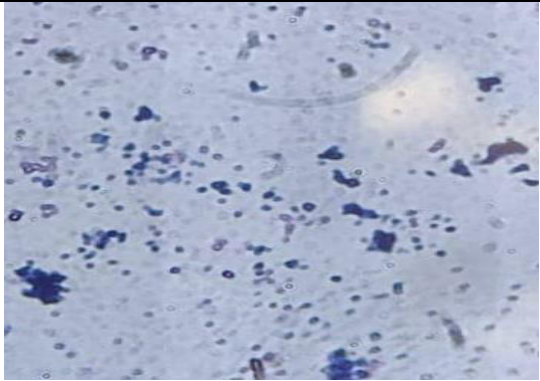
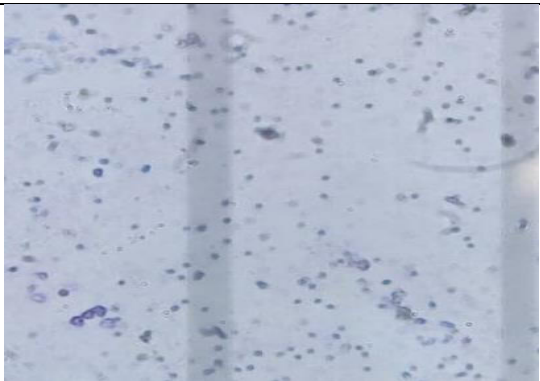
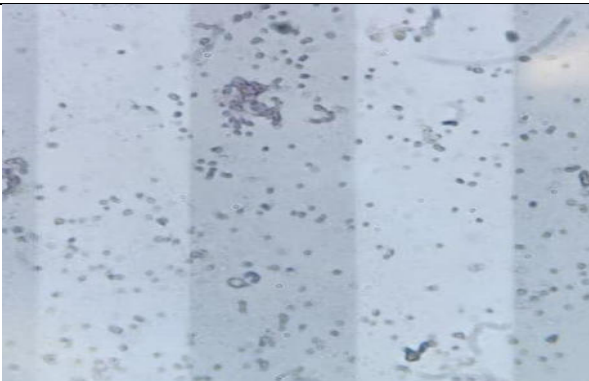
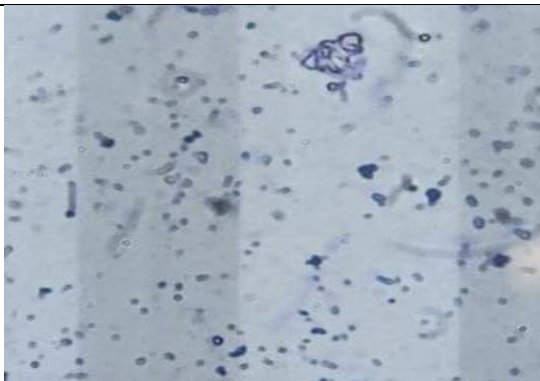
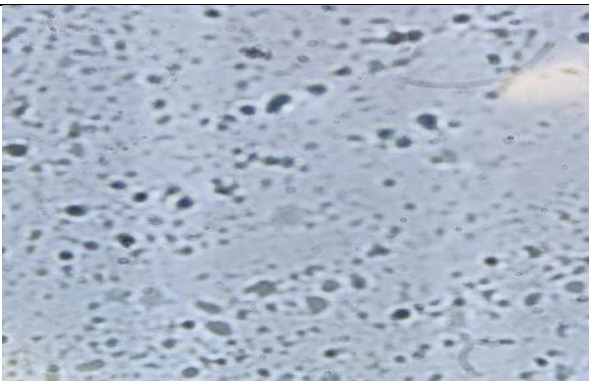
Semana	Tinción de Gram	Tinción de verde de Malaquita
2		
3		
4		

Figura 23 (continuación). Resultado de las tinciones de Gram y verde de malaquita durante los experimentos de co-degradación.

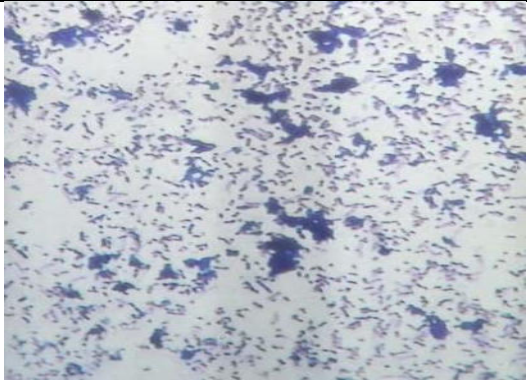
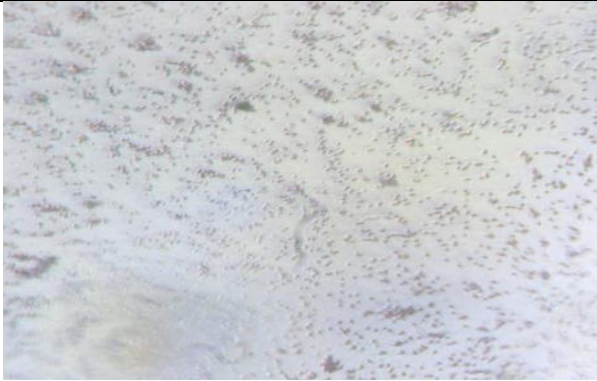
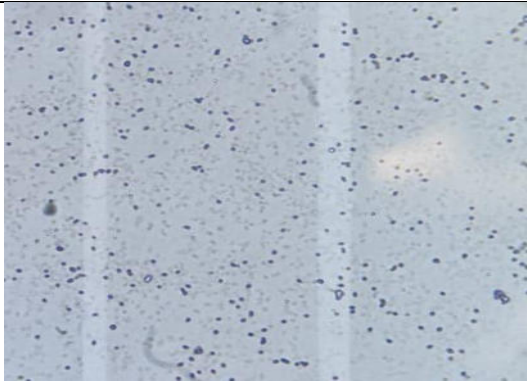
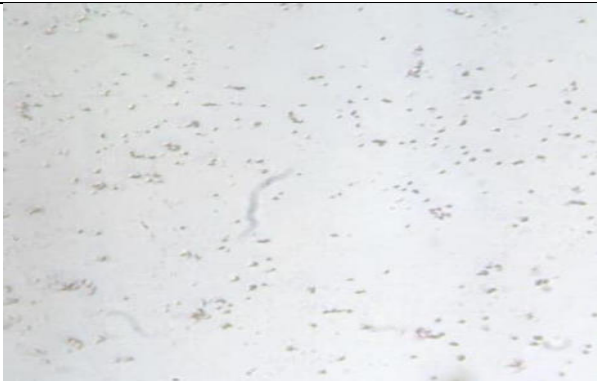
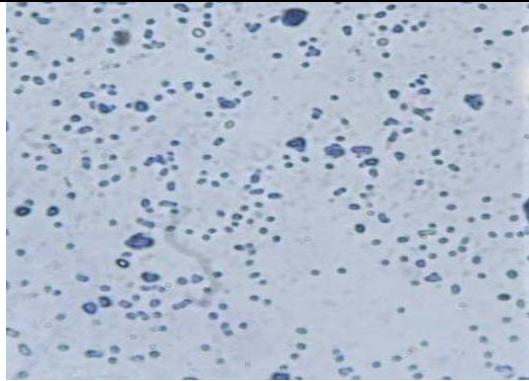
Resultado de tinciones de los microplásticos: Acrilatos Neutrogena		
Semana	Tinción de Gram	Tinción de verde de Malaquita
1		
2		
3		

Figura 23 (continuación). Resultado de las tinciones de Gram y verde de malaquita durante los experimentos de co-degradación.

Semana	Tinción de Gram	Tinción de verde de Malaquita
4		

A lo largo de los ensayos de codegradación de microplásticos suplementados con pesticidas organofosforados, el monitoreo microbiológico mediante tinción de Gram y verde de malaquita mostró un comportamiento consistente durante todo el periodo experimental. Las observaciones microscópicas revelaron la persistencia de células con morfología bacilar y reacción Gram positiva, sin evidenciar cambios morfológicos notorios, pleomorfismo o lisis celular. De manera similar a lo observado durante los ensayos previos de biodegradación, las tinciones con verde de malaquita no mostraron estructuras compatibles con endosporas en ninguno de los tiempos de muestreo, lo que indica que la población permaneció predominantemente en estado vegetativo durante el desarrollo del experimento.

Estos resultados sugieren que la presencia de los compuestos organofosforados evaluados no produjo cambios evidentes en la morfología general de la comunidad bacteriana bajo las condiciones experimentales empleadas. Asimismo, la persistencia de células vegetativas a lo largo del ensayo es consistente con la estabilidad observada previamente durante los procesos de aclimatación y biodegradación, indicando que el consorcio mantuvo una población viable durante todo el periodo de exposición.

Análisis gravimétrico de los microplásticos funcionalizados sometidos a los ensayos de co-degradación

Para evaluar el grado de degradación biológica observado en las micropartículas sometidas a los distintos ensayos de co-degradación, se realizó un análisis gravimétrico que permitió comparar la pérdida de masa entre el tratamiento inoculado y un control abiótico bajo condiciones experimentales idénticas. Los datos obtenidos se resumen en las Tablas 12 y 13.

En los ensayos de co-degradación de las micropartículas de Nivea suplementadas con compuestos fosforados, se observó una variación en el porcentaje de pérdida de masa dependiendo del tratamiento aplicado. El mayor valor se registró en presencia de glifosato (24.12 %), seguido por AMPA (17.22 %) y Na_2HPO_3 (17.96 %). Estas diferencias reflejan una variación en la respuesta del sistema bajo las distintas condiciones de suplementación evaluadas.

Al comparar estos resultados con el ensayo previo de biodegradación sin suplementación, se observa una diferencia en los porcentajes de pérdida de masa obtenidos. En este sentido, el tratamiento con glifosato presentó los valores más altos en comparación con el ensayo base, lo que sugiere que la presencia de este compuesto pudo modificar las condiciones del sistema de interacción entre el consorcio microbiano y las micropartículas, generando variaciones en el comportamiento observado.

Tabla 12. Variación de la masa por el proceso de co-degradación y el porcentaje de degradación en la biodegradación de micropartículas de Nivea.

Tratamiento	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Diferencia en masa por el proceso de aclimatación (Δg) Porcentaje de degradación
Control MPs Nivea + Glifosato	0.0754	0.0754	0.0000 (0%)
Control MPs Nivea + AMPA	0.0894	0.0894	0.0000 (0%)
Control MPs Nivea + Na_2HPO_3	0.0873	0.0873	0.0000 (0%)
Consorcio C + MPs Nivea + Glifosato	0.0713 ± 0.0018	0.0541 ± 0.0079	0.0172 (24.12%)
Consorcio C + MPs Nivea + AMPA	0.0970 ± 0.0020	0.0803 ± 0.0019	0.0166 (17.22%)
Consorcio C + MPs Nivea + Na_2HPO_3	0.0902 ± 0.0074	0.0740 ± 0.0093	0.0160 (17.96%)

En el caso de los microplásticos obtenidos del exfoliante de la marca Neutrogena, los ensayos de codegradación registraron porcentajes de pérdida de masa de 2.17 % en Neutrogena con glifosato, 2.94 % en Neutrogena con AMPA y 5.04 % en el experimento con Na_2HPO_3 . Estos valores reflejan una disminución limitada en comparación con los otros materiales evaluados, lo cual es consistente con los resultados obtenidos para microplásticos sintéticos en condiciones similares, considerando la mayor estabilidad estructural de este tipo de polímeros.

La reducción de masa observada sugiere cambios en la integridad del material bajo las condiciones experimentales, aunque de menor magnitud en comparación con los sustratos de origen natural. Este comportamiento indica la existencia de

interacción entre el sistema microbiano y el material, posiblemente influenciada por las características estructurales del polímero y por la presencia de los compuestos suplementados en el medio.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en los ensayos previos y con los controles abióticos, se observa una tendencia general de mayor pérdida de masa en los tratamientos con inóculo respecto a las condiciones sin inoculación. Esta diferencia sugiere que las condiciones biológicas del sistema pueden estar asociadas a modificaciones adicionales en el material, en comparación con los procesos observados en ausencia de actividad microbiana. Por lo que, los resultados reflejan variaciones en la respuesta del material sintético bajo las distintas condiciones de co-degradación evaluadas.

Tabla 13. Variación de la masa por el proceso de codegradación y el porcentaje de degradación en la biodegradación de micropartículas de Neutrogena.

Tratamiento	Masa inicial (g)	Masa final (g)	Diferencia en masa por el proceso de aclimatación (Δg) / Porcentaje de degradación
Control MPs Neutrogena + Glifosato	0.0612	0.0612	0.0000 (0%)
Control MPs Neutrogena + AMPA	0.0580	0.0580	0.0000 (0%)
Control MPs Neutrogena + Na_2HPO_3	0.0586	0.0586	0.0000 (0%)
Consorcio C + MPs Neutrogena + Glifosato	0.0600 ± 0.0107	0.0587 ± 0.0106	0.0012 (2.17%)
Consorcio C + MPs Neutrogena + AMPA	0.0579 ± 0.0048	0.0562 ± 0.0052	0.0017 (2.94%)
Consorcio C + MPs Neutrogena + Na_2HPO_3	0.0556 ± 0.0030	0.0528 ± 0.0036	0.0028 (5.04%)

Los resultados sugieren que el efecto de los compuestos fosforados no es uniforme, sino que depende tanto del tipo de sustrato como de la forma química del fósforo presente. En el caso de la celulosa, compuestos como el glifosato podrían actuar como cosustratos o estimulantes metabólicos, incrementando la actividad enzimática del consorcio. En contraste, en el polietileno, donde la limitación principal es la accesibilidad al carbono, la disponibilidad de fósforo fácilmente asimilable podría desempeñar un papel más relevante en el sostenimiento de la actividad

microbiana que en la degradación directa del polímero, aunque se aclara que el Na_2HPO_3 se utilizó como compuesto de control al que las bacterias pudieran acceder con mayor facilidad. Finalmente, dado que no existen antecedentes directos sobre la codegradación de microplásticos en presencia de estos compuestos fosforados, los resultados obtenidos en este estudio aportan evidencia preliminar sobre la interacción entre contaminantes orgánicos y materiales poliméricos en sistemas biológicos. Esto resalta la complejidad de los procesos de degradación en ambientes reales, donde múltiples factores pueden influir simultáneamente en la dinámica microbiana y en la transformación de los contaminantes.

La comparación directa entre ambas marcas evidencia una diferencia sustancial en los porcentajes de degradación en todas las condiciones evaluadas. Mientras que las micropartículas de celulosa mostraron una degradación consistente y relativamente elevada ($\approx 17\text{--}24\%$), las de polietileno presentaron valores significativamente menores ($\approx 2\text{--}5\%$). Esta diferencia confirma la influencia determinante de la naturaleza química del polímero en los procesos de biodegradación y codegradación, y muestra que los materiales celulósicos son mucho más susceptibles al ataque microbiano que los polímeros sintéticos.

Análisis morfológico y de ultraestructura superficial de los microplásticos sometidos a los ensayos de codegradación

En el caso de las micropartículas de Nivea, correspondientes a una matriz de naturaleza celulósica, se observaron alteraciones significativas en su morfología respecto a su estado inicial. Las esferas presentaron una apariencia contraída y visiblemente deshidratada, con pérdida de su forma definida e integridad estructural. En diversos campos de observación, el material mostró una reducción notable de su volumen aparente, lo que sugiere una degradación avanzada de la matriz. Asimismo, se identificaron partículas blancas aparentemente inalteradas, que podrían corresponder a componentes inorgánicos del producto, como arcillas, que no mostraron cambios evidentes durante el proceso experimental.

Por otro lado, las micropartículas de Neutrogena mostraron un comportamiento distinto. Si bien se observaron algunas esferas con signos de desgaste superficial y

deformaciones leves, el cambio más notable fue una variación en la coloración del material, que adquirió una tonalidad grisácea en comparación con su apariencia original. Este cambio visual fue observado de manera consistente en las partículas sometidas al tratamiento experimental, aunque con la metodología empleada no fue posible determinar el origen específico de dicha modificación. No obstante, no se evidenció una degradación estructural tan marcada como la observada en las micropartículas de Nivea.

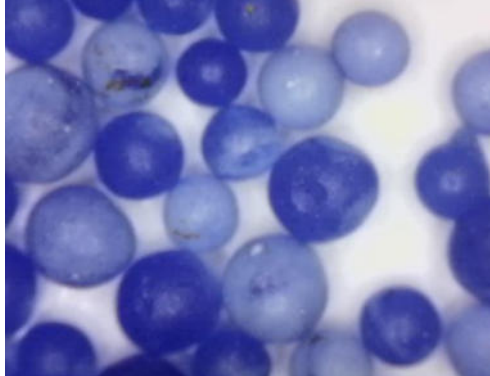
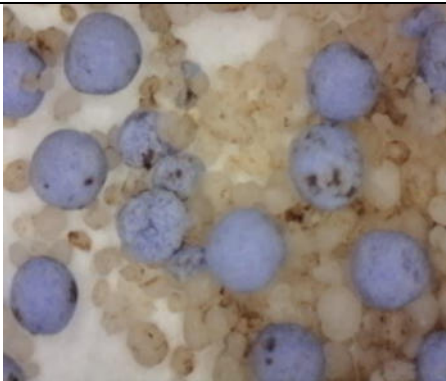
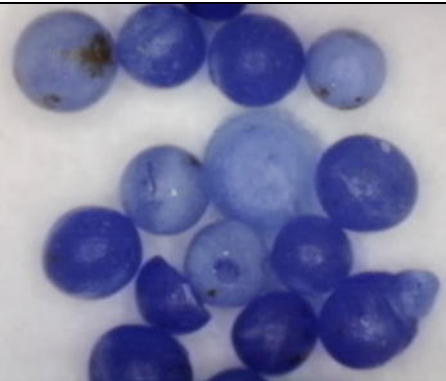
Análisis macroscópico o final de los ensayos	Nivea	Neutrogena
Consorcio C + MPs + AMPA		
Consorcio C + MPs + Glifosato		

Figura 24. Análisis morfológico de las micropartículas sometidas a los ensayos de co-degradación.

Figura 24 (continuación). Análisis morfológico de las micropartículas sometidas a los ensayos de co-degradación.

Análisis macroscópico o final de los ensayos	Nivea	Neutrogena
Consorcio C + MPs + Na_2HPO_3		

Monitoreo fisiológico del consorcio de trabajo durante los ensayos de codegradación

En los ensayos de codegradación con micropartículas de Nivea, se observó crecimiento bacteriano en todas las diluciones evaluadas, lo que confirma la viabilidad del consorcio en estas condiciones. No obstante, en comparación con el consorcio previamente aclimatado, se detectaron cambios en la morfología de las colonias. Estas variaciones sugieren que la combinación de micropartículas celulósicas y compuestos organofosforados pudo influir en la composición poblacional observada al final del experimento.

De manera similar, en los ensayos con micropartículas de Neutrogena se registró crecimiento en las distintas diluciones, confirmando la persistencia del consorcio en presencia de polímeros sintéticos y compuestos organofosforados. Sin embargo, las características macroscópicas de las colonias presentaron variaciones respecto a las etapas previas, acompañadas de una aparente reducción de la heterogeneidad poblacional. La predominancia de ciertos tipos de colonias y los cambios observados en su morfología indican que la composición de la comunidad microbiana al finalizar los ensayos fue distinta a la observada en etapas anteriores del proceso.

Composición del consorcio en los ensayos de codegradación en micropartículas de Nivea suplementadas con compuestos con fósforo		
Ensayo	Dilución	Imagen
Consortio C + MPs Nivea + AMPA	1:10	
Consortio C + MPs Nivea + AMPA	1:100	
Consortio C + MPs Nivea + AMPA	1:1000	

Figura 25. Composición del consorcio cultivado en dilución en serie tras los experimentos de co-degradación.

Figura 25 (Continuación). Composición del consorcio cultivado en dilución en serie tras los experimentos de co-degradación.

Composición del consorcio en los ensayos de codegradación en micropartículas de Nivea suplementadas con compuestos con fósforo		
Ensayo	Dilución	Imagen
Consortio C + MPs Nivea + Glifosato	1:10	
Consortio C + MPs Nivea + Glifosato	1:100	
Consortio C + MPs Nivea + Glifosato	1:1000	

Figura 25 (Continuación). Composición del consorcio cultivado en dilución en serie tras los experimentos de co-degradación.

Composición del consorcio en los ensayos de codegradación en micropartículas de Nivea suplementadas con compuestos con fósforo		
Ensayo	Dilución	Imagen
Consortio C + MPs Nivea + Na ₂ HPO ₃	1:10	
Consortio C + MPs Nivea + Na ₂ HPO ₃	1:100	
Consortio C + MPs Nivea + Na ₂ HPO ₃	1:1000	

Figura 25 (Continuación). Composición del consorcio cultivado en dilución en serie tras los experimentos de co-degradación.

Composición del consorcio en los ensayos de codegradación en microplásticos de Neutrogena suplementadas con compuestos con fósforo		
Ensayo	Dilución	Imagen
Consortio C + MPs Neutrogena + AMPA	1:10	
Consortio C + MPs Neutrogena + AMPA	1:100	
Consortio C + MPs Neutrogena + AMPA	1:1000	

Figura 25 (Continuación). Composición del consorcio cultivado en dilución en serie tras los experimentos de co-degradación.

Composición del consorcio en los ensayos de codegradación en micropartículas de Neutrogena suplementadas con compuestos con fósforo		
Ensayo	Dilución	Imagen
Consortio C + MPs Neutrogena + Glifosato	1:10	
Consortio C + MPs Neutrogena + Glifosato	1:100	
Consortio C + MPs Neutrogena + Glifosato	1:1000	

Figura 25 (Continuación). Composición del consorcio cultivado en dilución en serie tras los experimentos de co-degradación.

Composición del consorcio en los ensayos de codegradación en micropartículas de Neutrogena suplementadas con compuestos con fósforo		
Ensayo	Dilución	Imagen
Consortio C + MPs Neutrogena + Na ₂ HPO ₃	1:10	
Consortio C + MPs Neutrogena + Na ₂ HPO ₃	1:100	
Consortio C + MPs Neutrogena + Na ₂ HPO ₃	1:1000	

Bioensayos de toxicidad aguda en anélidos (*Eisenia foetida*)

Con el objetivo de evaluar la seguridad ambiental de los subproductos derivados del proceso de codegradación de microplásticos funcionalizados con pesticidas organofosforados, se realizaron pruebas de toxicidad aguda empleando lombrices de tierra adultas como indicadores biológicos. Este ensayo permitió determinar si la incorporación de los residuos tratados en el ecosistema terrestre simulado genera efectos adversos en la biosfera, midiendo tanto la pérdida de peso (como parámetro de la afectación en la alimentación y metabolismo del organismo) como el porcentaje de supervivencia (como parámetro de la viabilidad de la población frente a la exposición al contaminante). Como se puede observar en las Tablas 14, 15, 16 y 17.

Tabla 14. Pruebas de toxicidad aguda en lombrices de tierra (*Eisenia foetida*), evaluando las variaciones de peso a los 0, 7, 14 y 21 días para la marca Nivea.

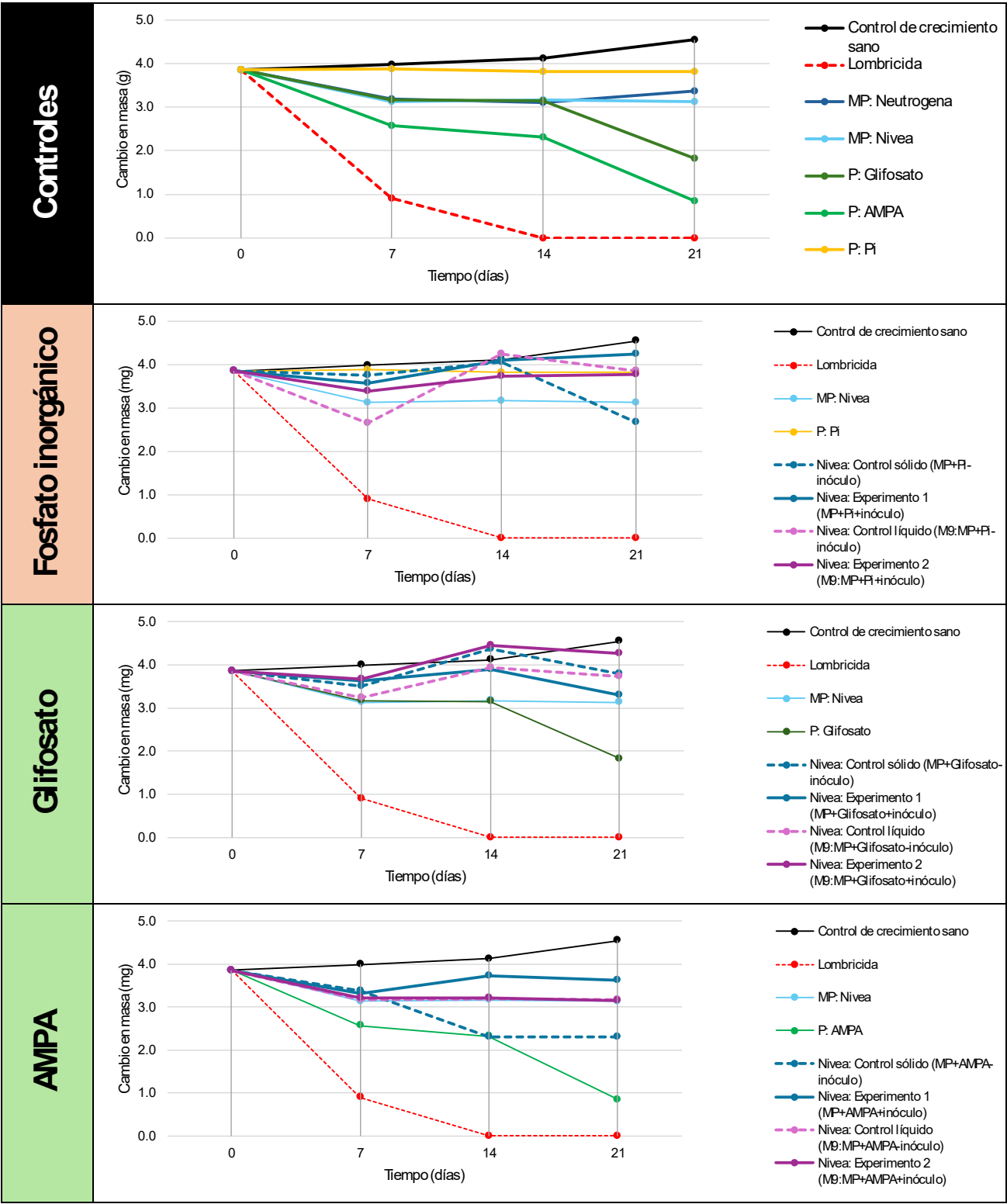


Tabla 15. Pruebas de toxicidad aguda en lombrices de tierra (*Eisenia foetida*), evaluando las variaciones de peso a los 0, 7, 14 y 21 días para la marca Neutrogena.

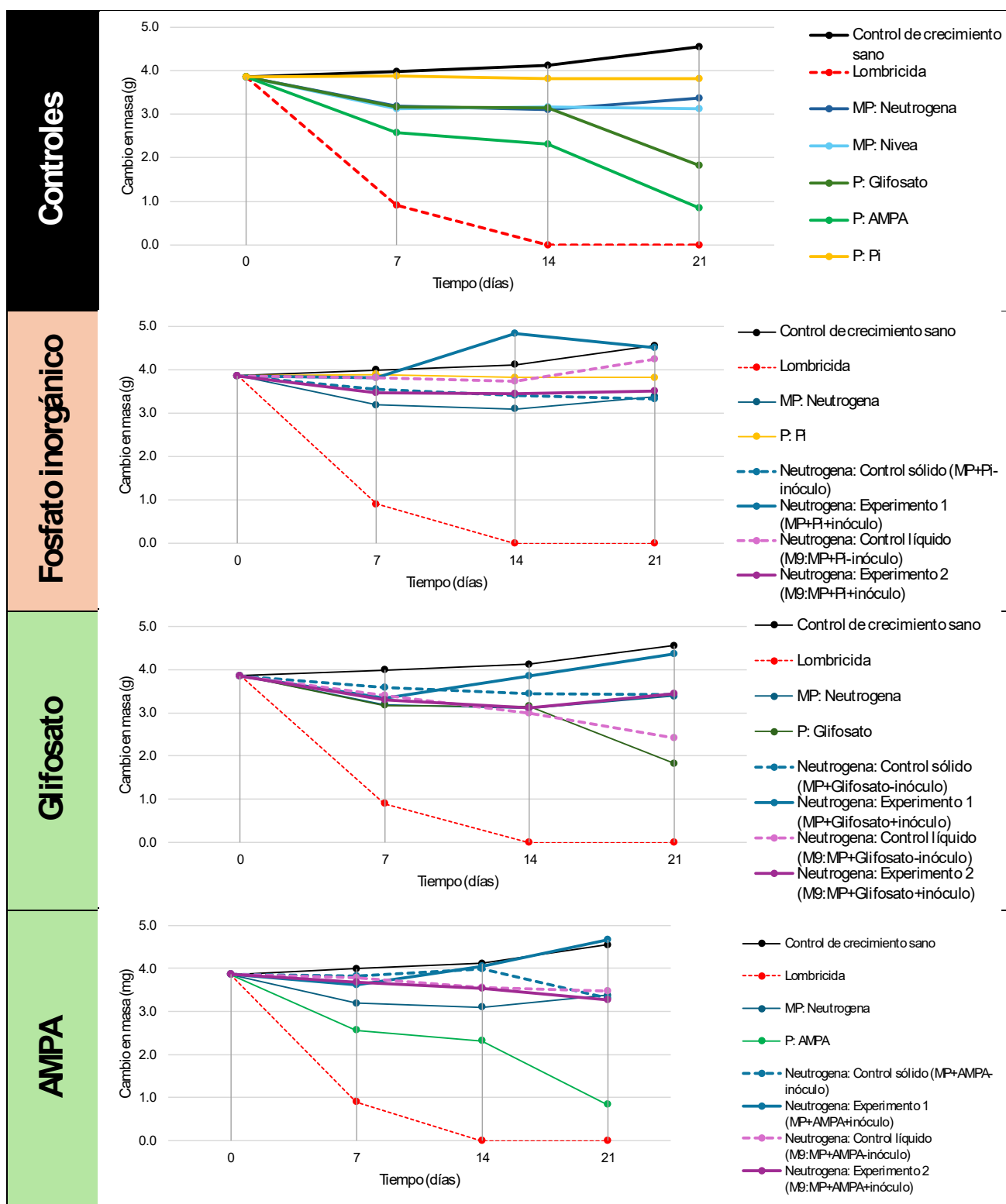


Tabla 16. Pruebas de toxicidad aguda en lombrices de tierra (*Eisenia foetida*), evaluando la supervivencia a los 0, 7, 14 y 21 días en la marca Nivea.

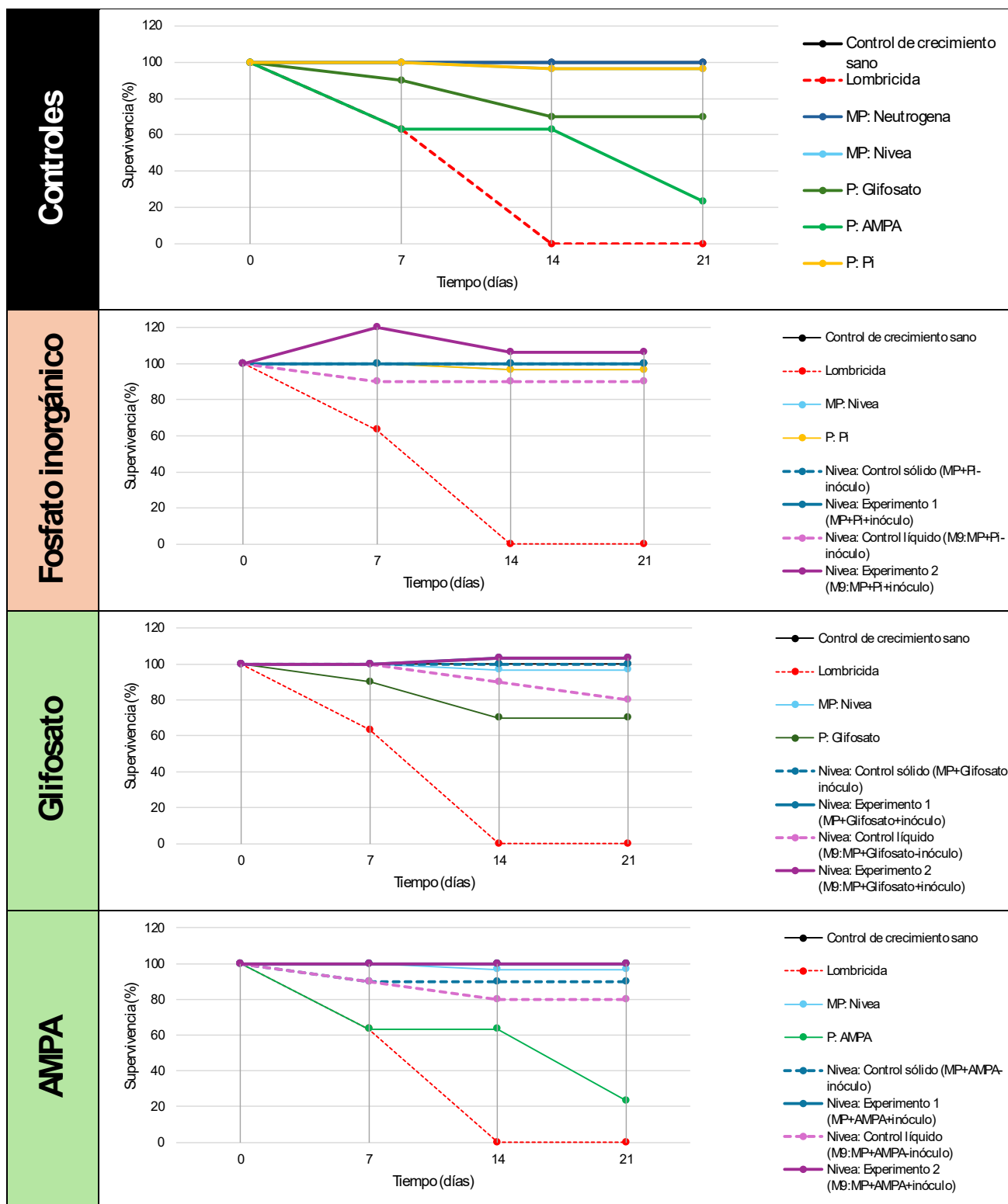
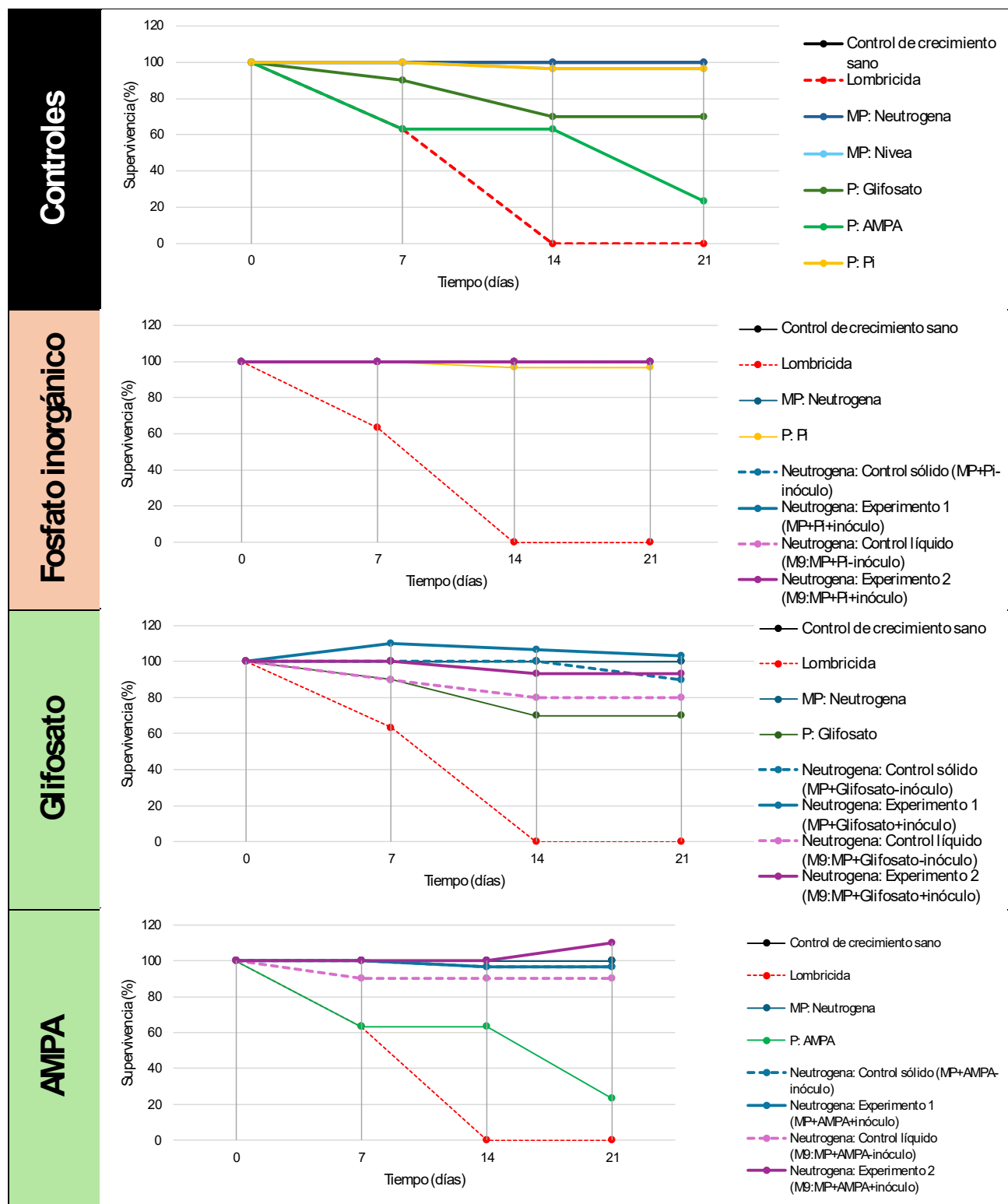


Tabla 17 Pruebas de toxicidad aguda en lombrices de tierra (*Eisenia foetida*), evaluando la supervivencia a los 0, 7, 14 y 21 días en la marca Neutrogena.



Las pruebas de toxicidad aguda realizadas con lombrices de tierra permitieron evaluar el posible efecto de los subproductos derivados del proceso de codegradación de microplásticos funcionalizados con pesticidas organofosforados. Durante el periodo de evaluación de 21 días se registraron cambios en la supervivencia, el peso corporal y el comportamiento de los organismos, permitiendo identificar distintos niveles de afectación fisiológica entre los tratamientos. Para interpretar adecuadamente estos resultados, se analizaron inicialmente los controles experimentales, observándose que el control sano mantuvo una elevada supervivencia, mientras que el control positivo de toxicidad (lombricida) provocó la mortalidad total de los organismos antes del día 14. Asimismo, los contaminantes evaluados de manera individual mostraron distintos grados de toxicidad, mientras que los microplásticos por sí solos no produjeron efectos importantes sobre la supervivencia de la población.

En términos generales, las lombrices expuestas a los controles con contaminantes sin tratamiento presentaron una mayor pérdida de peso y una disminución más marcada de la supervivencia en comparación con aquellas expuestas a los productos derivados de la codegradación. Este comportamiento fue particularmente evidente en tratamientos como los microplásticos de Neutrogena suplementados con glifosato, donde las muestras sometidas previamente a la actividad de los consorcios bacterianos mostraron menores efectos tóxicos que sus respectivos controles sin tratamiento. De manera similar, los tratamientos suplementados con Na_2HPO_3 presentaron niveles reducidos de afectación, comportándose de forma cercana a los grupos con menor toxicidad observada durante el experimento.

Además de las curvas de supervivencia, el seguimiento del peso corporal permitió detectar efectos subletales que no siempre eran evidentes a nivel poblacional. A partir de estas observaciones fue posible clasificar la respuesta de los organismos como resistente, susceptible o inhibida. En este sentido, el tratamiento con 2-cloroacetamida destacó por ser el único que presentó una respuesta inhibida, caracterizada por una afectación severa tanto en supervivencia como en peso corporal. Por el contrario, la mayoría de los tratamientos derivados de la codegradación se agruparon dentro de las categorías resistente o susceptible,

diferenciándose claramente de los controles contaminados sin tratamiento. Los resultados sugieren que la actividad microbiana desarrollada durante los procesos de codegradación estuvo asociada con una reducción de la toxicidad de varios de los contaminantes evaluados. Asimismo, los resultados se presentan siguiendo el orden de toxicidad reportado para los compuestos estudiados, comenzando con Na_2HPO_4 , seguido por glifosato y finalmente AMPA, que mostró los efectos más marcados sobre los organismos de prueba.

Además de los parámetros cuantitativos analizados, durante este experimento se documentaron diferentes fenómenos visibles en los organismos, tales como cambios en la coloración, como se presentó en la variable de Neutrogena suplementado con glifosato sólido (AGs) en la cual como se observa en la figura 19, se observa como una de las lombrices de experimentación cambio a una tonalidad verde, en la cual aparte tenía una presencia más débil frente a las demás y la cual no sobrevivió a los 21 días, solo llegando a los 14. También otro fenómeno físico directo mostrado en varias variables como Neutrogena suplementado con AMPA sólido (AAs), Neutrogena suplementado con glifosato sólido (AGs), Control de Nivea y Neutrogena suplementado con AMPA líquido (AAI), se observó la pérdida de un extremo de la lombriz (cola) por una debilidad notoria dentro del experimento.



Figura 26. Lombriz de color verde después de una exposición al microplástico suplementado con glifosato, no tratado con el consorcio.



Figura 27. Parte de una lombriz separada durante el pesaje, debido al agotamiento frente al contaminante.

También otro punto importante es el comportamiento de los organismos en la alteración del entorno en su estado general ante la presencia del contaminante (Figura 25).



Figura 28. Microplásticos de Neutrogena en un sistema de toxicidad aguda.



Figura 29. Huevo de lombriz generado en uno de los ambientes de experimentación de toxicidad aguda.

Como se puede observar en las siguientes imágenes la presencia de los microplásticos, pese a formar parte de los contaminantes de la tierra, no impidió a las lombrices el movilizarse y cumplir su rol diario, incluso llegando a poder reproducirse en algunos casos, como en el de Nivea suplementado con Na_2HPO_3 sólido y líquido (CFs y CFI) Nivea suplementado con glifosato líquido (CGI) y Neutrogena suplementado con Na_2HPO_3 sólido y líquido (AFs y AFI), Neutrogena suplementado con glifosato sólido y líquido (AGs y AGI). Aunque esto curioso y puede dar pie a un tema de análisis más centrado, también en el cómo se les pegaban a la piel en algunos casos, como en las Figuras 27, 28 y 29



Figura 30. Lombriz con micropartícula de Nivea en un sistema experimental.



Figura 31. Lombriz con microplástico de Neutrogena en un sistema de experimentación.



Figura 32. Lombriz con microplástico procedente de Neutrogena pegado al organismo, dentro de la experimentación.

Durante los ensayos con los productos de la codegradación también aparte de observarse la presencia de cápsulas de huevos de lombriz, se presencié el crecimiento de pequeños brotes vegetales en el sustrato como se puede ver en la Figura 30



Figura 33. Crecimiento de brotes de plantas en los experimentos de toxicidad aguda.

Estos fenómenos no se registraron en los tratamientos con controles tóxicos. La aparición de ambos procesos biológicos sugiere que las condiciones generadas por los productos de la codegradación no inhibieron la actividad biológica del suelo, ya que favorecieron (o no intervinieron) procesos como la reproducción de lombrices y la germinación de plantas.

En contraposición a las características cualitativas observadas en las lombrices expuestas a los subproductos de la codegradación, en el tratamiento de control positivo con 2-cloroacetamida, utilizado como lombricida y considerado el de mayor toxicidad dentro del experimento, se observaron respuestas adversas inmediatas por parte de los organismos. Incluso ante un contacto mínimo con el compuesto, las lombrices mostraron signos evidentes de afectación, manifestados principalmente en movimientos bruscos y en un claro intento de alejarse del área donde se encontraba el contaminante. Este comportamiento puede interpretarse como una respuesta de evasión ante un estímulo químico altamente tóxico para el organismo.



Figura 34. Experimentación de toxicidad aguda con 2-cloroacetamida.

Al finalizar cada uno de los ensayos de toxicidad aguda, y una vez concluido el periodo experimental de 21 días, las lombrices utilizadas como organismos de prueba fueron retiradas de los sistemas de evaluación y trasladadas a un área verde con condiciones de suelo adecuadas para su desarrollo. Este procedimiento se realizó con el fin de asegurar su reintegración a un ambiente natural que permitiera su recuperación y continuidad dentro del ecosistema, procurando así un manejo responsable y ético de los organismos empleados durante la experimentación.



Figura 35. Liberación de las lombrices de tierra en un área verde, terminada la experimentación.

Todas estas observaciones macroscópicas complementaron los resultados obtenidos a partir de las mediciones registradas y permitieron una visión más completa del impacto que los distintos tratamientos pudieron tener en los organismos (lombrices) utilizados como modelo biológico.

Conclusiones

La presente investigación se desarrolló con base en la hipótesis de que las bacterias del género *Bacillus* poseen la capacidad de participar en procesos de biodegradación y codegradación de microplásticos y contaminantes asociados, contribuyendo al desarrollo de estrategias biotecnológicas para la mitigación simultánea de distintos tipos de contaminación ambiental. Todos los resultados obtenidos a lo largo de las distintas etapas del trabajo respaldan este planteamiento.

En el proceso de aclimatación, el consorcio bacteriano demostró una adecuada capacidad de adaptación al transitar de un medio rico en nutrientes (caldo LB) a un medio mínimo M9 suplementado con micropartículas como única fuente de carbono. La persistencia de la morfología bacilar Gram positiva y la formación de biomasa en todas las condiciones evaluadas evidenciaron la estabilidad estructural y funcional del consorcio. La presencia de endosporas en ciertas etapas indicó una respuesta fisiológica al estrés, mientras que la persistencia de células vegetativas confirmó la capacidad de adaptación progresiva. Asimismo, las diferencias observadas entre las micropartículas de Nivea y Neutrogena sugieren que la naturaleza del sustrato influye en la respuesta metabólica del consorcio.

Durante los ensayos de biodegradación, tanto los análisis fisicoquímicos (FTIR) como las observaciones macroscópicas evidenciaron modificaciones en la estructura de las micropartículas. En el caso de la celulosa (Nivea), se observaron cambios más notorios asociados a la pérdida de integridad estructural, mientras que en los polímeros sintéticos (Neutrogena) las alteraciones fueron más sutiles, manifestándose principalmente como deformaciones superficiales. Estos resultados sugieren una mayor susceptibilidad de los materiales de origen natural frente a la acción microbiana.

En los procesos de codegradación, la combinación de microplásticos y compuestos organofosforados generó una presión selectiva más compleja, lo que se reflejó en una reorganización del consorcio bacteriano. La disminución de la diversidad morfológica observada en las diluciones seriadas indica la selección de microorganismos con mayor tolerancia a contaminantes y mejor aprovechamiento

de los recursos disponibles. En este contexto, es probable que las bacterias predominantes hayan sido aquellas capaces de utilizar tanto la fuente de carbono de las micropartículas como el fósforo proveniente de los compuestos organofosforados, posiblemente mediante procesos de cometabolismo. A nivel morfológico, se observaron diferencias claras entre ambos materiales, siendo más evidente la degradación en las micropartículas celulósicas, mientras que en los polímeros sintéticos los cambios fueron más limitados y se asociaron principalmente a modificaciones superficiales y de coloración.

Finalmente, las pruebas de toxicidad aguda con *Eisenia foetida* permitieron evaluar el impacto biológico de los productos derivados de la codegradación. Los resultados mostraron una menor pérdida de peso y una mayor supervivencia en comparación con los controles con contaminantes, lo que sugiere una reducción de la toxicidad del sistema. Además, la presencia de indicios de actividad biológica, como la formación de huevos y el crecimiento de brotes vegetales en algunos tratamientos, refuerza la idea de que los productos generados presentan un menor impacto ambiental.

A partir de los resultados obtenidos, se sugiere que la industria cosmética considere sustituir los microplásticos sintéticos por alternativas de origen natural, como la microcelulosa cristalina, en la formulación de exfoliantes faciales. Los hallazgos de este estudio evidencian que las micropartículas de naturaleza celulósica presentan una mayor susceptibilidad a la degradación microbiana que los polímeros sintéticos, lo que favorece su transformación en periodos más cortos y reduce su persistencia en el ambiente. La implementación de este tipo de materiales biodegradables no solo contribuiría a disminuir la acumulación de microplásticos en los ecosistemas, sino que también representaría una estrategia viable para mitigar los efectos asociados a la contaminación por partículas plásticas y los compuestos que estas pueden transportar. De esta manera, el uso de microcelulosa cristalina se posiciona como una alternativa sustentable que podría integrarse en el desarrollo de productos comerciales con un menor impacto ambiental.

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de la presente investigación, es posible aceptar la hipótesis planteada, ya que se evidenció que las bacterias del género *Bacillus* poseen la capacidad de participar en procesos de biodegradación y codegradación de microplásticos y compuestos organofosforados. La adaptación del consorcio a condiciones de limitación nutricional, su persistencia metabólica, las modificaciones observadas en la estructura de las micropartículas y la disminución del impacto biológico de los productos resultantes constituyen evidencia integral del potencial funcional de este sistema microbiano. De esta manera, se confirma que la interacción entre estos microorganismos y contaminantes complejos puede utilizarse como base para el desarrollo de estrategias biotecnológicas orientadas a la mitigación simultánea de distintos tipos de contaminación ambiental.

Perspectivas

En el presente trabajo de tesis, se establece una base experimental para el estudio de procesos no solo de biodegradación, sino también de codegradación de microplásticos en presencia de contaminantes asociados a estos. A partir de los resultados obtenidos, se abre la posibilidad de ampliar esta línea de investigación hacia la evaluación de otros compuestos químicos (contaminantes) que con frecuencia se encuentran adsorbidos en las superficies de los microplásticos en ambientes naturales. En este sentido, la metodología desarrollada a lo largo de esta tesis puede utilizarse como punto de partida para realizar pruebas de codegradación con otros pesticidas o compuestos organofosforados distintos de los empleados, explorando así el comportamiento del consorcio bacteriano frente a una mayor diversidad de contaminantes. Y generando también un punto de partida de posibles alternativas bacterianas para poder codegradar los microplásticos, quizá no solo enfocándose en el alcance que pueda tener el consorcio con el que trabajé, sino también en la metodología que empleé para lograrlo, como someter a otro tipo de bacterias a una aclimatación para que sean capaces de biodegradar.

De igual manera, las pruebas de toxicidad aguda realizadas con lombrices constituyen un primer acercamiento para evaluar el posible impacto de los productos derivados de procesos de biodegradación. Sin embargo, futuras investigaciones podrían ampliar este enfoque a sistemas más complejos que permitan simular con mayor precisión las condiciones de un ecosistema. Por ejemplo, la incorporación de plantas junto con el suelo y las lombrices permitiría evaluar interacciones tróficas y procesos ecológicos adicionales, generando un modelo experimental más completo para estudiar los efectos de los subproductos generados durante la degradación de microplásticos y de contaminantes asociados. También dejando la posibilidad, si en este proyecto se trabajó con un enfoque en suelos, de implementar una fase acuosa con peces y algas.

Una consideración importante para futuros estudios radica en la composición de las micropartículas utilizadas, particularmente en el caso de la marca Nivea. Durante el desarrollo experimental, se identificó la presencia de partículas que, aunque forman

parte del producto comercial, no corresponden propiamente a microplásticos, como es el caso de las arcillas representadas por esferas blancas. La inclusión de estos componentes pudo haber influido en la cuantificación del porcentaje de degradación, al introducir variabilidad en la masa total que no necesariamente está asociada a la fracción polimérica susceptible de biodegradación. En este sentido, una posible mejora metodológica para trabajos futuros sería la separación y selección exclusiva de las esferas plásticas, lo que permitiría obtener mediciones más precisas y representativas del proceso de degradación del polímero. No obstante, es importante destacar que, al tratarse de uno de los primeros acercamientos experimentales a este tipo de sistemas de co-degradación, el uso de muestras en condiciones más cercanas a su forma comercial no invalida los resultados obtenidos, sino que aporta una perspectiva más realista. Por ello, esta observación se plantea como una recomendación para el perfeccionamiento metodológico en investigaciones posteriores.

Por otro lado, los resultados obtenidos no solo pueden interpretarse en el contexto de la degradación de microplásticos y compuestos orgánicos (mediante los pesticidas), sino también como el establecimiento de un sistema experimental que podría adaptarse para evaluar otros tipos de contaminantes. En este sentido, una posible línea de investigación futura sería el estudio de los procesos de codegradación en presencia de contaminantes inorgánicos, como los metales pesados, utilizando bases metodológicas similares a las planteadas en esta tesis. Esto permitiría explorar la capacidad del consorcio microbiano de trabajar, o de bacterias y algas, para interactuar con distintos tipos de contaminantes presentes en el ambiente y ampliar el alcance de las estrategias biotecnológicas orientadas a la remediación ambiental.

De esta forma, el trabajo desarrollado no solo aporta información sobre la interacción entre microplásticos, compuestos organofosforados y bacterias del género *Bacillus*, sino que también establece fundamentos experimentales que pueden servir como base para el desarrollo de nuevas investigaciones enfocadas en la remediación de estos contaminantes, que, aunque no son emergentes, cada día se habla y escucha más de ellos en distintos sistemas ambientales.

Referencias

- Microplásticos, una amenaza silenciosa | Iº. Origen y contexto histórico. (s/f). Recuperado el 1 de octubre de 2024, de <https://es.linkedin.com/pulse/microp%C3%A1sticos-una-amenaza-silenciosa-i%C2%BA-origen-y-laura-v%C3%A1zquez-juiz>
- Connacher, I. (Director). (2008). Addicted to plastic: The rise and demise of a modern miracle [Documental; Película; Video online]. Films Transit. <https://www.youtube.com/watch?v=LMEysKUjXKs>
- Laforch, C. (Director). (2022). How dangerous are microplastics? [Documental; Película; Video online]. DW Documentary. <https://www.dw.com/es/primer-plano-el-peligro-del-microp%C3%A1stico-en-busca-de-part%C3%ADculas-invisibles/video-63609645>
- Gob. Mexico, C. N. de Á. N. (s/f). Con-su-mismo plástico. gob.mx. Recuperado el 2 de octubre de 2024, de <http://www.gob.mx/conanp/es/articulos/con-su-mismo-plastico?idiom=es>
- Sophonrat, N., & Yang, W. (2017). Effect of mixing methods of polyethylene and cellulose on volatile products from its co-pyrolysis. Energy Procedia, Proceedings of the 9th International Conference on Applied Energy, 142, 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.12.050>
- Microplásticos, todo lo que deberías saber de ellos. (2022, junio 14). DKV Seguros. <https://dkv.es/corporativo/blog-360/medioambiente/contaminacion/microplasticos>
- Hardin. (2021, febrero 23). Los 7 tipos más comunes de plástico | PlasticOceans.org. Plastic Oceans International. <https://plasticoceans.org/7-tipos-de-plastico-mas-comunes/>
- Thompson, R. C., Olson, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., McGonigle, D., & Russell, A. E. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic? Science, 304(5672). <https://doi.org/10.1126/science.1094559>
- Admin. (2021, febrero 23). Los 7 tipos más comunes de plástico | PlasticOceans.org. Plastic Oceans International. <https://plasticoceans.org/7-tipos-de-plastico-mas-comunes/>
- Castañeta, G., Gutiérrez, A. F., Nacaratte, F., & Manzano, C. A. (2020). Microplásticos: Un Contaminante Que Crece En Todas Las Esferas Ambientales, Sus Características Y Posibles Riesgos Para La Salud Pública Por Exposición. Revista Boliviana de Química, 37(3), 160–175.
- Labarta, U. (2019, septiembre 5). 40 años entre microplásticos. La Voz de Galicia. https://www.lavozdegalicia.es/noticia/opinion/2019/09/05/40-anos-microplasticos/0003_201909G5P17991.htm
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 66(3), 506–577, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- Herrero Acero, E., Ribitsch, D., Steinkellner, G., Gruber, K., Greimel, K., Eiteljoerg, I., Trotscha, E., Wei, R., Zimmermann, W., Zinn, M., Cavaco-Paulo, A., Freddi, G., Schwab, H., & Guebitz, G. (2011). Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties

- of Cutinases from Thermobifida. *Macromolecules*, 44(12), 4632–4640. <https://doi.org/10.1021/ma200949p>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278). <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>
- Zhang, Z., Peng, H., Yang, D., Zhang, G., Zhang, J., & Ju, F. (2022). Polyvinyl chloride degradation by a bacterium isolated from the gut of insect larvae. *Nature Communications*, 13(1), 5360. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32903-y>
- Ganesh Kumar, A., Hinduja, M., Sujitha, K., Nivedha Rajan, N., & Dharani, G. (2021). Biodegradation of polystyrene by deep-sea *Bacillus paralicheniformis* G1 and genome analysis. *Science of the Total Environment*, 774. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145002>
- Roberts, C., Edwards, S., Vague, M., León-Zayas, R., Scheffer, H., Chan, G., Swartz, N. A., & Mellies, J. L. (2020). Environmental Consortium Containing *Pseudomonas* and *Bacillus* Species Synergistically Degrades Polyethylene Terephthalate Plastic. *mSphere*, 5(6), 10.1128/msphere.01151-20. <https://doi.org/10.1128/msphere.01151-20>
- Choi, J., Kim, H., Ahn, Y. R., Kim, M., Yu, S., Kim, N., Lim, S. Y., Park, J. A., Ha, S. J., Lim, K. S., & Kim, H. O. (2024). Recent advances in microbial and enzymatic engineering for the biodegradation of micro- and nanoplastics. *RSC Advances*, 14(14), 9943–9966. <https://doi.org/10.1039/D4RA00844H>
- Niranjane, A., Madhou, P., & Stevenson, T. (2007). The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. *Enzyme and Microbial Technology - ENZYME MICROB TECHNOL*, 40, 1464–1468. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.041>
- Lisdiyanti, P., Suyanto, E., Gusmawati, N., & Rahayu, W. (2012). Isolation and characterization of cellulose produced by cellulolytic bacteria from peat soil of Ogan Komering Ilir, South Sumatera. *Int J Environ Bioener*, 3, 145–153.
- Li, H., Wang, F., Li, J., Deng, S., & Zhang, S. (2021). Adsorption of three pesticides on polyethylene microplastics in aqueous solutions: Kinetics, isotherms, thermodynamics, and molecular dynamics simulation. *Chemosphere*, 264, 128556. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128556>
- Dao, T. T., Truong, D. D., Duong, L. N., Nguyen, N. N., & Nguyen, H. D. (2023). Preparation of *Bacillus Subtilis* Cell Samples and Generation of an SDS-PAGE. *BioTechniques*, 74(3), 123–129. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0083>
- Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428–471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x>
- Lyu, B., Manna, B., Zhou, X., Leung, I. K. H., & Singhal, N. (2025). Microbial metabolic enzymes, pathways and microbial hosts for co-metabolic degradation of organic micropollutants in wastewater. *Water Research*, 276, 123229. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2025.123229>

- Vital-Grappin, A. D., Ariza-Tarazona, M. C., Luna-Hernández, V. M., Villarreal-Chiu, J. F., Hernández-López, J. M., Siligardi, C., & Cedillo-González, E. I. (2021). The Role of the Reactive Species Involved in the Photocatalytic Degradation of HDPE Microplastics Using C,N-TiO₂ Powders. *Polymers*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/polym13070999>
- Acosta-Cortés, A. G., Martínez-Ledezma, C., López-Chuken, U. J., Kaushik, G., Nimesh, S., & Villarreal-Chiu, J. F. (2019). Polyphosphate recovery by a native *Bacillus cereus* strain as a direct effect of glyphosate uptake. *The ISME Journal*, 13(6), 1497–1505. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0366-3>
- Ayala Zepeda, M., Valenzuela Ruiz, V., Parra Cota, F. I., Chinchilla-Soto, C., de la Cruz Torres, E., Ibba, M. I., Estrada Alvarado, M. I., & de los Santos Villalobos, S. (2024). Genomic insights of a native bacterial consortium for wheat production sustainability. *Current Research in Microbial Sciences*, 6, 100230. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100230>
- Setlow, P. (2014). Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. *Journal of Bacteriology*, 196(7), 1297–1305. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-13>
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>
- Ma, L., Zhao, Y., Meng, L., Wang, X., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., & Lü, X. (2020). Isolation of Thermostable Lignocellulosic Bacteria From Chicken Manure Compost and a M42 Family Endocellulase Cloning From *Geobacillus thermodenitrificans* Y7. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00281>
- Yang Wang. (2023). A Review of Degradation and Life Prediction of Polyethylene. (2026). ResearchGate. <https://doi.org/10.3390/app13053045>
- Li, H., Zhang, M., Zhang, Y., Xu, X., Zhao, Y., Jiang, X., Zhang, R., & Gui, Z. (2023). Characterization of Cellulose-Degrading Bacteria Isolated from Silkworm Excrement and Optimization of Its Cellulase Production. *Polymers*, 15(20). <https://doi.org/10.3390/polym15204142>
- Lü, Y., Li, N., Gong, D., Wang, X., & Cui, Z. (2012). The Effect of Temperature on the Structure and Function of a Cellulose-Degrading Microbial Community. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(2), 219–233. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9731-7>
- Łojewska, J., Miśkowiec, P., Łojewski, T., & Proniewicz, L. M. (2005). Cellulose oxidative and hydrolytic degradation: In situ FTIR approach. *Polymer Degradation and Stability*, 88(3), 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.012>
- Ma, L., Zhao, Y., Meng, L., Wang, X., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., & Lü, X. (2020). Isolation of Thermostable Lignocellulosic Bacteria From Chicken Manure Compost and a M42 Family Endocellulase Cloning From *Geobacillus thermodenitrificans* Y7. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00281>

- Yin, X., Bi, Y., Niu, J., Shao, W., Liang, G., Lin, W., & Xu, C. (2024). Metabolic pathway analysis of the biodegradation of cellulose by *Bacillus velezensis*. *Heliyon*, 10(19), e38375. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38375>
- Dobrzyński, J., Wróbel, B., & Górská, E. B. (2023). Taxonomy, Ecology, and Cellulolytic Properties of the Genus *Bacillus* and Related Genera. *Agriculture*, 13(10), 1979. <https://doi.org/10.3390/agriculture13101979>
- Munajad, A., Subroto, C., & Suwarno. (2018). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy Analysis of Transformer Paper in Mineral Oil-Paper Composite Insulation under Accelerated Thermal Aging. *Energies*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/en11020364>
- Robert, C., & Bernalier-Donadille, A. (2003). The cellulolytic microflora of the human colon: Evidence of microcrystalline cellulose-degrading bacteria in methane-excreting subjects. *FEMS Microbiology Ecology*, 46(1), 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00207-1](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00207-1)
- Brunšek, R., Kopitar, D., Schwarz, I., & Marasović, P. (2023). Biodegradation Properties of Cellulose Fibers and PLA Biopolymer. *Polymers*, 15(17), 3532. <https://doi.org/10.3390/polym15173532>