



**I
N
A
O
E**

Impacto de los micro y nanoplásticos de polietileno en la microbiota intestinal: Evaluación de la interacción con *Bacillus clausii*

por

Andrea Elizabeth Rivera Patlán

Tesis sometida como requisito para obtener el grado de
Maestra en Ciencias y Tecnologías Biomédicas

En el:

**Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y
Electrónica**

Agosto, 2024

Tonantzintla, Puebla

Supervisada por:

Dra. Teresita Spezzia Mazzocco

© INAOE 2024

La autora otorga al INAOE el permiso de reproducir y distribuir copias en su totalidad o en partes de esta tesis



Contenido

Dedicatorias.....	5
Agradecimientos	6
Resumen.....	7
Abstract	8
Índice de figuras.....	9
Índice de tablas.....	11
Abreviaciones.....	12
Capítulo 1	13
Introducción	13
1.1 Antecedentes	13
1.2 Planteamiento del problema	15
1.3 Objetivo.....	16
1.4 Objetivos específicos	16
1.6 Pregunta de investigación.....	17
1.7 Hipótesis.....	17
Capítulo 2.....	18
Marco teórico	18
2.1 Nanoplásticos y microplásticos.....	18
2.2 Polietileno	20
2.3 Microbiota.....	23
2.3.1 <i>Bacillus clausii</i>	24
2.4 Viabilidad y cinética del crecimiento.....	25
2.5 Caracterización por Raman	27
2.6 Efectos adversos de los nano y microplásticos sobre la salud humana	27

2.7 Estado del arte	29
Capítulo 3	34
Metodología	34
3.1 Material biológico	34
3.2 Plásticos.....	34
3.2.1 Microplásticos de polietileno de baja densidad.....	34
3.2.2 Microplásticos de polietileno de alta densidad.....	35
3.2.3 Plásticos mixtos de polietileno alta densidad	35
3.2.4 Microplásticos fluorescentes de polietileno de alta densidad.....	35
3.2.5 Microplásticos de polietileno de baja densidad nuevos	35
3.2.4 Esterilización de microplásticos.....	35
3.2.5 Preparación de suspensiones de plásticos	36
3.3 Interacción plástico-bacteria	37
3.4 Parámetros evaluados.....	38
3.4.1 Densidad óptica.....	38
3.4.2 Unidades formadoras de colonias	38
3.4.3 Microscopía.....	39
3.4.4 Raman	39
3.4.5 SEM.....	41
3.4.6 Análisis estadístico.....	41
Capítulo 4.....	43
Resultados	43
4 .1 Cinética de crecimiento.....	43
4.2 Efecto del microplástico LDPE intemperizado sobre el crecimiento de <i>B. clausii</i>	43
4.3 HDPE intemperizado.....	46
4.4 MIXBEADS	49
4.5 MBPE.....	52

4.6 LDPE nuevo.....	55
4.7 Viabilidad celular.....	58
4.8 Efectos morfológicos de diferentes plásticos de PE sobre <i>B. clausii</i>	62
4.9 Comparación del efecto inhibitorio sobre <i>B. clausii</i> con diferentes plásticos de PE.....	64
4.10 Efecto de <i>B. clausii</i> sobre diferentes plásticos de PE.....	67
4.10.1 Caracterización de los plásticos de PE por técnica de RAMAN.....	67
4.10.2 Caracterización de los plásticos de PE por SEM.....	70
Capítulo 5.....	71
5.1 Discusión.....	71
Capítulo 6.....	77
6.1 Conclusiones.....	77
6.2 Trabajo a futuro.....	78
Referencias.....	79

Dedicatorias

A mis niñas Moka y Honey, todo lo que hago y lo que soy es por ustedes.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas las personas en instituciones que hicieron posible que esta investigación tuviera frutos.

A mi familia, mis padres que siempre han apoyado cada proyecto, cada idea y cada paso en mi carrera, a mi hermana que siempre logra hacerme reír y darme palabras de apoyo cuando más lo necesito. A mi amada Maria Elena, que no solo ha sido compañera, si no también inspiración, influencia y apoyo para el nacimiento y conclusión de esta investigación, sin tu ayuda, esto no hubiera sido posible.

A mi asesora la Dra. Teresita Spezzia Mazzocco por su constante orientación, paciencia y mostrarme que el trabajo duro lleva a grandes resultados. A Mayra Salazar por siempre recibirme en el laboratorio con paciencia y dispuesta a enseñarme y repetirme mil y una vez como realizar protocolos y la ayuda constante para resolver los problemas experimentales y de la vida.

Al INAOE y CONAHCYT por los apoyos brindados para poder llevar a cabo mi maestría y asistir a los congresos que me permitieron conocer más sobre los microplásticos, al comité por su tiempo y participación en la corrección de esta tesis. Al laboratorio de microelectrónica, que me permitieron realizar las pruebas necesarias e indispensables para la conclusión de esta investigación

A los amigos y compañeros del instituto al excelente grupo del laboratorio de terapia fotodinámica y grupo de biofotónica por siempre apoyarme y orientarme cuando parecía encontrarme en un callejón sin salida y alegrar cada día en el instituto, especialmente a Dora, Ricardo, Rebeca y Gloria. A mi gran amigo Jaime y a mis compañeros de generación Jenny y Hector que hicieron este camino más llevadero. A mi querido Andrés, que a pesar de estar tan lejos siempre me ha apoyado.

Y, por último, pero definitivamente no menos importante, a mi amada Moka que ha estado conmigo durante los últimos 7 años acompañándome en todas las noches de insomnio y relajándome con su ronroneo, y a mi querida Honey, que desde que llegó no ha hecho más que hacerme sonreír.

Resumen

Los micro y nanoplásticos son una preocupación ambiental en aumento, ya que se encuentran en alimentos, bacterias, suelos, cuerpos de agua e incluso en órganos humanos. La ingesta es la principal vía de exposición para los seres humanos, lo que permite que estos plásticos lleguen al estómago y a la microbiota intestinal, responsable de la homeostasis del cuerpo, así como de la protección de las paredes intestinales y absorción de nutrientes. Estos plásticos pueden afectar la microbiota, causando disbiosis. En esta investigación se decidió evaluar el efecto de nano y microplásticos de polietileno (PE) derivados de diferentes fuentes, sobre la proliferación, viabilidad celular y morfología microscópica de *Bacillus clausii*, una de las bacterias más importantes de la microbiota intestinal. Por otro lado, las partículas utilizadas para estos experimentos fueron sometidas a pruebas de RAMAN y SEM para observar los posibles efectos de *B. clausii* sobre los plásticos de PE. Los resultados mostraron que todos los plásticos de PE estudiados tuvieron un efecto inhibitorio sobre *B. clausii*, especialmente después de 72 horas de interacción. Además, se pudo confirmar que la viabilidad celular de la bacteria se vio afectada de diferente manera según la concentración, el tamaño y la edad del plástico, observándose especial toxicidad con el plástico intemperizado y las partículas más pequeñas. Finalmente se pudo observar que las partículas de PE mostraron cambios en su conformación química y estructural, presumiblemente por la degradación del material por parte de *B. clausii*.

Abstract

Micro and nanoplastics are an increasing environmental concern as they are found in food, bacteria, soils, bodies of water, and even human organs. Ingestion is the primary route of exposure for humans, allowing these plastics to reach the stomach and gut microbiota, which is responsible for the body's homeostasis, as well as the protection of intestinal walls and nutrient absorption. These plastics can affect the microbiota, causing dysbiosis. In this research, we decided to evaluate the effect of polyethylene (PE) nano and microplastics derived from diverse sources on the proliferation, cell viability, and microscopic morphology of *Bacillus clausii*, one of the most important bacteria in the gut microbiota. Additionally, the particles used for these experiments were subjected to RAMAN and SEM tests to observe the possible effects of *B. clausii* on PE plastics. The results showed that all the studied PE plastics had an inhibitory effect on *B. clausii*, especially after 72 hours of interaction. Furthermore, it was confirmed that the cell viability of the bacteria was affected differently depending on the concentration, size, and age of the plastic, with weathered plastic and smaller particles showing toxicity. Finally, it was observed that PE particles showed changes in their chemical and structural conformation, due to the degradation of the material by *B. clausii*.

Índice de figuras

Figura 1. Producción global de cada tipo de plástico en 2015. PPA: Poliftalamida, PUR: Poliuretano termoplástico. Recuperado de Cowan et al., (2022)[27].....	21
Figura 2. Representación gráfica de la diferencia estructural (empaquetado) entre HDPE y LDPE. Recuperado de Cowan et al., (2022) [27].....	22
Figura 3. Resumen de las propiedades fisiológicas, antimicrobianas e inmunomoduladoras de <i>B. clausii</i> . Recuperado de Ghelardi et al. (2022) [36].	25
Figura 4. Diagrama del proceso de esterilización de las micropartículas de plástico	36
Figura 5. Esterilización de la suspensión de MIXBEADS.....	36
Figura 6. Realización de las suspensiones de MIXBEADS.....	37
Figura 7. Incubación de las bacterias junto con las partículas de plástico.	38
Figura 8. Lectura de densidad óptica para la determinación del crecimiento bacteriano.....	38
Figura 9. Incubación de muestras en cajas Petri para obtener UFC.....	39
Figura 10. Arreglo de filtrado y recuperación de micropartículas	40
Figura 11. Porcentaje de crecimiento a las 24 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de LDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$...	44
Figura 12. Porcentaje de crecimiento a las 48 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de LDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$...	45
Figura 13. Porcentaje de crecimiento a las 72 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de LDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$..	46
Figura 14. Porcentaje de crecimiento a las 24 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de HDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$...	47
Figura 15. Porcentaje de crecimiento a las 48 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de HDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$...	48
Figura 16. Porcentaje de crecimiento a las 72 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de HDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$...	49
Figura 17. Porcentaje de crecimiento a las 24 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de MIXBEADS. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	50
Figura 18. Porcentaje de crecimiento a las 48 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de MIXBEADS. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	51
Figura 19. Porcentaje de crecimiento a las 72 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de MIXBEADS. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	52

Figura 20. Porcentaje de crecimiento a las 24 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de MBPE. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	53
Figura 21. Porcentaje de crecimiento a las 48 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de MBPE. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	54
Figura 22. Porcentaje de crecimiento a las 72 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de MBPE. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	55
Figura 23. Porcentaje de crecimiento a las 24 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de LDPE nuevo. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	56
Figura 24. Porcentaje de crecimiento a las 48 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de LDPE nuevo. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	57
Figura 25. Porcentaje de crecimiento a las 72 horas de <i>B. clausii</i> en contacto con diferentes concentraciones de LDPE nuevo. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	58
Figura 26 . UFC de <i>B. clausii</i> después de 24 horas de interacción con diferentes plásticos de PE a concentraciones de 200 y 1000 $\mu\text{g/ml}$	59
Figura 27. Comparación del porcentaje de viabilidad bacteriana al estar en contacto por 24 horas con una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de diferentes tipos de plástico. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	60
Figura 28. Comparación del porcentaje de viabilidad bacteriana al estar en contacto por 24 horas con una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de diferentes tipos de plástico. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$	61
Figura 29. Micrografías de <i>B. clausii</i> en presencia de diferentes tipos de PE a las 24 horas de contacto.	63
Figura 30. Comparación del porcentaje de crecimiento obtenido por D.O. entre los 5 tipos de PE a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de interacción.	66
Figura 31. Cambio en el espectro de RAMAN en los diferentes tipos de PE antes y después de estar 72 horas en contacto con <i>B. clausii</i>	69
Figura 32. Imágenes obtenidas por SEM de los fragmentos de LDPE nuevo a las 0, 24, 48 y 72 horas de contacto con <i>B. clausii</i> a una escala de 10 μm	70

Índice de tablas

Tabla 1. MPs encontrados en diferentes alimentos y bebidas recuperado de Sewwandi et al. [1]...	19
Tabla 2. Reportes de estudios de citotoxicidad por NPs y MPs en bacterias	30
Tabla 3. Microorganismos reconocidos como degradadores de plásticos. Recuperado de Thuy-Hanh et al.	32
Tabla 4. Ejemplo de resultados de análisis ANOVA y post hoc Tukey obtenidos con ORIGIN 2018 LABVIEW	41

Abreviaciones

D.O. Densidad óptica

HDPE Polietileno de alta densidad

LDPE Polietileno de baja densidad

MPs Microplásticos

NPs Nanoplásticos

PAM Poliacrilamida

PE Polietileno

PET Tereftalato de polietileno

PP Polipropileno

PPA Poliftalamida

PS Poliestireno

PUR Poliuretano

PVC Cloruro de polivinilo

UFC Unidades formadoras de colonia

Capítulo 1

Introducción

1.1 Antecedentes

En los últimos años los productos de plástico han invadido la industria, el área médica, el empaquetado de alimentos e incluso los productos de higiene personal [1]. Tan solo en 2016 se estimaba que la producción de plástico había aumentado a 335 millones de toneladas, un gran contraste comparado con las 1.5 toneladas que se producían en el año de 1950 y se cree que para 2050 esta cantidad aumentará a 33 mil millones de toneladas [2].

Los plásticos más utilizados en el mercado actual son: el propileno (PP) con un 21.1%, el polietileno (PE), el cual se divide en polietileno de baja densidad (LDPE) con un 19.9% y polietileno de alta densidad (HDPE) con un 16.1%, el cloruro de polivinilo (PVC) con un 11.8%, el tereftalato de polietileno (PET) con un 10.2%, el poliuretano (PUR) con un 8.4% y, por último, el poliestireno (PS) con un 7.8%. Los demás tipos de plástico representan el resto del porcentaje [3].

Los productos de plástico se han convertido en parte fundamental de la vida diaria de la humanidad. Se utilizan tanto en productos de higiene, para la conservación de alimentos, así como herramientas de uso diario [4]. Estos productos pueden degradarse en microplásticos (MPs); primarios y secundarios. Siendo los primeros aquellos provenientes de productos de higiene personal como lo son las pastas de dientes, barniz de uñas, mascarillas, etc. Los secundarios son aquellos que se derivan de la degradación mecánica, térmica, o por fotodegradación. Este tipo de partículas tienen un tamaño menor a los 5 milímetros [1].

Los nanoplásticos (NPs) se derivan de los MPs y pueden presentarse en diferentes formas y tamaños, todos menores a 1 micra, e incluso estar cargados con sustancias químicas que pueden alterar a los diferentes microbios de manera superficial e interna. Al ser más pequeños que las bacterias y células estos NPs pueden llegar a penetrar membranas y causar reacciones estresantes e incluso causar afecciones en el RNA [5].

Estas partículas, de tamaño, tanto micro como nano, son liberadas al medio ambiente, en cuerpos de agua o por corrientes de aire haciendo que las rutas de exposición al humano sean 3; por inhalación, por ingesta o por contacto dérmico. Siendo esta última, resultado de las micro y nano partículas presentes en los productos de higiene personal [6].

El PE es altamente utilizado para el empaqueo de productos alimenticios, especialmente aquellos con un corto tiempo de vida útil, como lo son bolsas, botellas, vasos e incluso recipientes de almacenamiento de alimentos debido a su alta resistencia y bajo costo [3].

Al ser la ingesta la principal ruta de acceso al organismo, las partículas nanométricas derivadas de los productos de plástico de los contenedores de alimentos llegan al intestino y por lo tanto pueden afectar la microbiota intestinal y causar un cambio en la cantidad de bacterias benéficas y dañinas en el intestino, efecto conocido como disbiosis. Esta alteración afecta la homeostasis del cuerpo humano lo que puede derivar en padecimientos en el cuerpo humano [7].

El papel de la microbiota intestinal en relación con la salud humana ha sido estudiada a lo largo de los años y se ha concluido que la diversidad entre las especies, así como la cantidad de estas influye en el desarrollo o prevención de enfermedades. La obesidad, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedad del intestino inflamado, algunos tipos de cáncer, gota, artritis, e incluso trastornos neuronales como la depresión son influenciados por la disbiosis de la microbiota [8].

La microbiota variará entre individuos dependiendo de su zona geográfica, dieta y genética, sin embargo, la función será la misma; proporcionar una relación simbiótica entre huésped y hospedero. Se han identificado 2172 especies de microorganismos pertenecientes a la microbiota intestinal humana, las cuales se dividen principalmente en Proteobacterias, Actinobacterias, Bacteroides y Firmicutes. Siendo estas últimas de las que se derivan los *B. clausii* [9].

Con este trabajo se pretende aportar conocimientos sobre los efectos de las nano y micropartículas de plástico en bacterias específicas de la microbiota humana. Se han realizado trabajos que exponen los efectos en microorganismos provenientes de cuerpos de agua, suelos y animales [10]. Así como los efectos en las células intestinales [4], la translocación de las micro y nano partículas de plástico a otros órganos dentro de los modelos animales [11]. Sin embargo, el estudio en específico de las bacterias de la microbiota intestinal humana y como se ven afectadas por si solas deben ser estudiadas para comprender el papel y rol de los plásticos en la disbiosis de la microbiota intestinal. Chen et. Al (2023), demostraron que la viabilidad de diferentes especies de *Lactobacillus* se ve afectada por la adición de MPs.

En este trabajo se presenta por primera vez el estudio del efecto citotóxico de nano y micro plásticos de PE en bacterias de *B. clausii*, bacteria utilizada para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales debido a su capacidad de ayudar a restaurar la homeostasis bacteriana [12], ayudar a la absorción de nutrientes, promover y proteger la barrera intestinal [13] y capaz de sobrevivir

cambios en pH y antibióticos [14]. De igual forma, varios estudios han demostrado la capacidad de ciertas especies de *Bacillus*, para degradar plásticos. Estas bacterias forman un biofilm sobre la superficie del plástico, lo que les permite adherirse firmemente y utilizar el plástico como fuente de carbono [10], [15]. Durante este proceso, los microorganismos inician la degradación del material plástico, descomponiéndolo en compuestos más simples que pueden ser absorbidos y metabolizados. Este mecanismo no solo facilita la descomposición del plástico, sino que también destaca el potencial de *Bacillus sp.* en aplicaciones biotecnológicas para la gestión de residuos plásticos y la bioremediación ambiental [16].

A pesar de ser un tema de gran relevancia científica y ambiental, existen pocos trabajos de investigación que profundicen en los efectos de los NPs en la microbiota, especialmente de PE, por lo que el presente trabajo aporta conocimiento valioso sobre el efecto citotóxico de nano y micro plásticos de PE en *B. clausii*, no reportado anteriormente [17].

1.2 Planteamiento del problema

Se estima que en México tan sólo en el año 2022 se registró un consumo aparente de 5.9 millones de toneladas de productos de plástico [18]. Es importante comprender que gran parte de estos productos son de un solo uso, lo que significa que después de ser desechados, la mayoría terminará contaminando cuerpos de agua. Estos cuerpos de agua son utilizados como fuente de alimento por especies marinas o para el riego de cultivos, lo que resulta en la contaminación de las cadenas alimentarias y, en última instancia, afecta a los seres humanos.

Además, los plásticos se utilizan ampliamente en el empaque de alimentos y bebidas. Durante el transporte a los supermercados o al consumidor final, estos productos están expuestos a condiciones ambientales como la luz ultravioleta o el calor, lo que provoca su degradación y la liberación de micro y nano residuos que pueden contaminar los alimentos.

Existe una necesidad urgente de comprender mejor los efectos de las micro y nanopartículas de plástico en la microbiota intestinal y su impacto en la salud humana. En este contexto, es crucial profundizar en el estudio de bacterias humanas específicas, como *B. clausii*, para entender cómo el plástico, particularmente el PE, influye en su dinámica de crecimiento, viabilidad y comportamiento, ya que esta información es fundamental para evaluar los riesgos potenciales de la exposición humana a estos materiales.

Además, es necesario investigar no solo cómo el plástico afecta a las bacterias, sino también el efecto de las bacterias sobre el plástico. Esto incluye estudiar si las bacterias tienen la capacidad de degradar

el PE o si la interacción provoca cambios químicos en el plástico. Entender estos procesos es esencial para evaluar el impacto ambiental y de salud de los MPs y NPs.

1.5 Justificación

Dado que la ingesta de nanopartículas de plástico resulta prácticamente inevitable en la actualidad, es necesario adquirir un conocimiento completo de sus efectos sobre la microbiota intestinal humana, sobre todo considerando que una gran proporción de la población consume alimentos envasados en plástico.

La microbiota humana desempeña un papel esencial en la regulación de procesos metabólicos, la promoción de respuestas inmunitarias y el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo. Por lo que, resulta crucial investigar cómo los NPs podrían influir en las bacterias beneficiosas, incluyendo posibles cambios en su viabilidad o morfología.

La investigación acerca de cómo los nano y micro plásticos impactan en la microbiota intestinal se entiende como una necesidad creciente para proteger la salud humana a largo plazo. Dada la función crítica que desempeña la microbiota en el sistema inmunológico y la absorción de nutrientes, comprender su respuesta ante los contaminantes plásticos podría ser vital para entender los riesgos del uso indiscriminado de productos de plástico.

El estudio de los efectos de diferentes tipos de nano y micro plásticos de PE en *B. clausii* no solo contribuirá al conocimiento científico sobre su citotoxicidad en la microbiota intestinal, sino que también proporcionará datos cruciales para identificar las dosis y tipos de PE más perjudiciales para este tipo de bacteria. Contribuyendo de manera significativa al conocimiento científico en un campo en constante desarrollo.

1.3 Objetivo

Estudiar los efectos de las nano y micro partículas de PE en *B. clausii*, bacteria presente en la microbiota intestinal.

1.4 Objetivos específicos

- Optimizar un protocolo para la evaluación del efecto de nano y micro plásticos de PE sobre *B. clausii*.
- Obtener MPs de PE de baja y alta densidad a partir de materiales de desecho.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de micro y nano plásticos sobre la viabilidad y crecimiento celular de *B. clausii*.

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de nano y micro plásticos sobre la morfología celular *B. clausii*
- Determinar si los MPs y NPs de PE sufren algún cambio químico o morfológico por la interacción con *B. clausii*.

1.6 Pregunta de investigación

¿Cuáles son los efectos de la interacción de distintos tipos y concentraciones de PE con *B. clausii*?

1.7 Hipótesis

Las micro y nanopartículas de PE causan efectos adversos sobre la cinética de crecimiento y viabilidad de *B. clausii*.

Capítulo 2

Marco teórico

En este capítulo se abordan conceptos importantes para comprender la metodología y resultados de los experimentos realizados. A su vez, se describen los antecedentes y bases teóricas y experimentales que apoyaron el desarrollo de esta tesis.

2.1 Nanoplásticos y microplásticos

Los MPs y NPs se pueden dividir en primarios y secundarios. Los primarios son aquellos productos producidos con un tamaño en el orden de micras o nanómetros con una función específica (Ex: las “nanoperlas” presentes en pastas de dientes o cremas exfoliantes). Los micro y nano plásticos secundarios son aquellos fragmentos derivados de productos de plástico de mayor tamaño [7].

De acuerdo con la literatura se ha definido que los MPs varían en un rango de 1 μm a 5 mm en tamaño [6]. Estas partículas se derivan del uso constante de productos de plástico, como botellas (PET), bolsas (PE), recipientes (PS), ropa (PL) etc. Estos productos son en su mayoría desechables, por lo que rápidamente se acumulan y terminan contaminando tanto cuerpos de agua como ecosistemas terrestres quedando a la intemperie, es decir el plástico se comienza a ver degradado por fuerzas externas, como la luz UV del sol, la temperatura, entre otros factores ambientales [1].

Los MPs son un tema de investigación relativamente reciente, en 2004 se propone por primera vez el concepto de micropartículas plásticas generadas por desecho y a lo largo de los años se han detectado desde en sal de mesa (2015), placentas humanas (2020) y más recientemente en sangre humana (2022) [19].

Los NPs son aquellas partículas menores a 1 μm que se derivan de los MPs este tipo de partículas se encuentra en el ambiente a una mayor concentración que los propios MPs y por su pequeño tamaño se les considera aún más peligrosos para la salud humana [20].

Hay múltiples variables que deben ser consideradas al estudiar las interacciones entre los nano y micro plásticos y los organismos vivos. El comportamiento puede variar dependiendo del tipo de plástico, su tamaño, forma, carga, edad y método de degradación [21].

Existen 3 vías principales de exposición de nano y micro partículas de plástico en humanos; ingesta, inhalación y contacto dérmico. Investigadores han descubierto MPs y NPs en los alimentos siendo esta la principal vía de exposición hacia los humanos. Se han descubierto micro y nanopartículas de

plástico en agua embotellada, agua corriente, leche comercial, vino, manzanas, cerveza, etc. Esta contaminación puede provenir desde los materiales utilizados para la producción de los alimentos como el empaquetado de estos. En la tabla 1 se resumen algunos alimentos y concentraciones de micropartículas encontradas en ellos [1].

Tabla 1. MPs encontrados en diferentes alimentos y bebidas recuperado de Sewwandi et al., (2023). [1]

Alimento/ bebida	Tipo de MPs	Tamaño de partícula (μm)	Concentración de partículas por L o Kg
Manzana	NR	2.17 (1.56–3.19)	195.50 \pm 128.69
Sal	PE, PP, PET, PS, Nylon	1-4	1400-1900 (sal de mar refinada) 1900- 2300 (sal de mar sin refinar)
Miel	PET	NR	32-108 (fibras)
Cerveza	PA, PEA, PET	100-3000	0-28 \pm 5.29
Vino	PET	0.1	2563–5857
Agua mineral	PET, PP, PE, poliolefinas	3	14
Agua embotellada	PET	NR	2689 \pm 4371 (Botellas nuevas) 8339 \pm 7043 (Botellas viejas)
Agua corriente	PS	NR	0.161 μg
Leche	HDPE/LDPE, PP y PAM	Fibras y fragmentos 1300– 6700	40
Té	PET, Nylon	>1	11.6 mil millones de MPs y 3.1 mil millones de NPs por una sola taza de té

*NR= No reportado

La exposición por la vía respiratoria de estas partículas se deriva principalmente de la re-suspensión en el aire, de fibras sintéticas de la ropa, por ejemplo, fibras que son expulsadas al ambiente por lavadoras que puede ser mayor a 1900 fibras por lavada [19].

El contacto dérmico se produce principalmente por el contenido de partículas de plástico en productos de higiene personal, estos son agregados con la función de exfoliar o ajustar la viscosidad del producto. Normalmente se pueden encontrar partículas en el rango de 24 μm hasta 2 mm. De acuerdo con estudios realizados no se ha demostrado que las nanopartículas de estos productos traspasen la

piel. Sin embargo, esto es posible de acuerdo con las reacciones toxicológicas que se han observado [19].

A pesar de ser un tema reciente, ya han sido reportados los posibles efectos dañinos de las nano y micropartículas de plástico, desde presentar una acumulación dentro de los organismos, traslocación hacia diferentes órganos del cuerpo, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células y alterar su viabilidad, inflamación al desencadenar procesos inmunológicos, hasta traducirse en enfermedades neurológicas [6].

En modelos animales con ratones se observaron cambios en la microbiota intestinal, acumulación en órganos como el riñón, hígado e intestino, reducción de la secreción del moco intestinal, reducción del nivel de los triglicéridos y colesterol en el hígado, disminución en el conteo y morfología alterada de espermatozoides, la disminución de niveles de ARN mensajero de ciertos genes clave asociados con la adipogénesis y la síntesis de triglicéridos e incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno. De igual modo se observó un comportamiento ansioso y depresivo en ratones estudiados [6], [11], [19], [22], [23].

Otro grupo de investigadores demostró que el consumo directo de micropartículas de plástico de poliestireno provocó un desorden testicular en ratones. Así mismo, la microbiota alterada de estos ratones fue trasplantada a ratones sanos, los cuales presentaron el mismo padecimiento [24].

De manera más específica, Wang et al. (2023) han realizado una revisión de las interacciones entre los MNPs y las comunidades bacterianas. A pesar de las numerosas variables que pueden afectar la respuesta bacteriana, se han llegado a conclusiones significativas. Por ejemplo, se ha observado que las partículas plásticas pueden favorecer la formación de biofilms, lo que promueve la interacción bacteriana y potencialmente conduce a mutaciones. Además, los estudios revisados han demostrado que la exposición a plásticos puede afectar el crecimiento de las comunidades bacterianas, así como la integridad de la membrana celular, con el grado de afectación dependiendo del tamaño de la partícula. Las partículas plásticas pueden acumularse dentro de los organismos, afectando la permeabilidad de la membrana celular y causando estrés celular al alterar la cadena transportadora de electrones [25].

2.2 Polietileno

El PE es uno de los plásticos más utilizados en la actualidad, se estima una producción anual de 80 millones de toneladas y es utilizado en botellas, envases de alta dureza, bolsas, empaques, etc. El PE

es normalmente manufacturado en forma de pellets para después convertirse en películas o pipas y, por lo general, son productos de un solo uso [26].

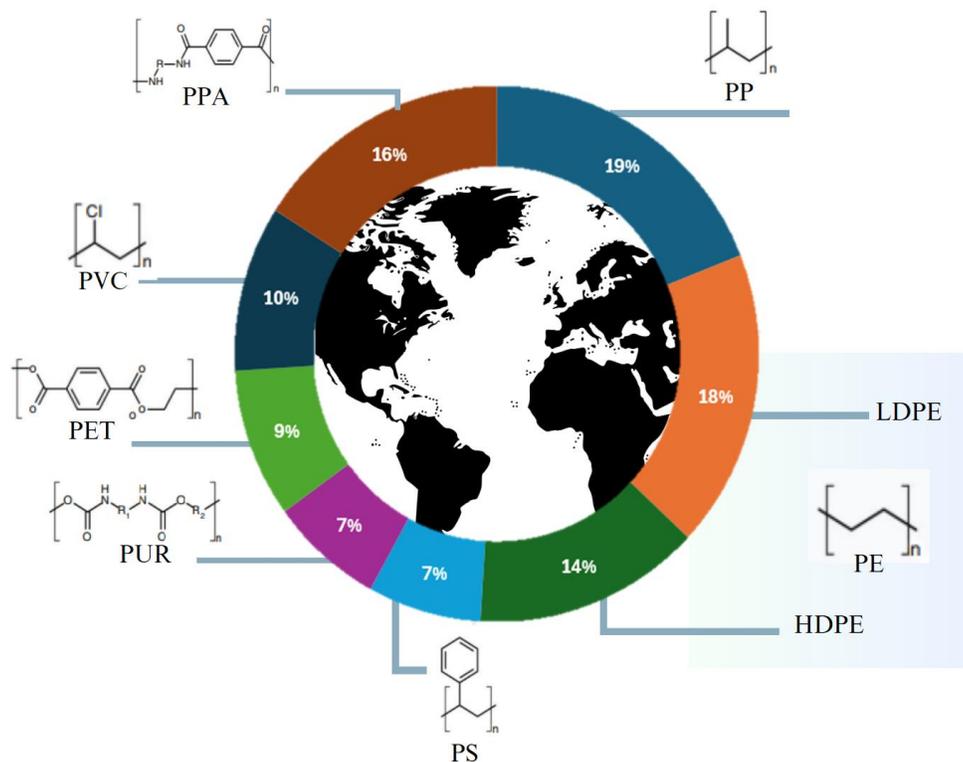


Figura 1. Producción global de cada tipo de plástico en 2015. PPA: Poliftalamida, PUR: Poliuretano termoplástico. Recuperado de Cowan et al., (2022)[27]

La figura 1 muestra la producción de plástico por tipo de polímero, se puede observar que, en 2015, el 32% de la producción mundial de plástico fue el PE, esto se debe principalmente a que por sus propiedades es principalmente utilizado en el empaquetado de productos [27].

El PE fue descubierto por los científicos Reginald Gibson y Eric Fawcett en 1933, y la primera variante fue el PE de baja densidad (LDPE). A lo largo de los años se desarrollaron técnicas de producción que permitieron agregar al material aditivos o modificar sus características. Existen diferentes grados de PE, baja, media y alta densidad y dependiendo de esta clasificación se derivan los usos del plástico [28].

El PE “crudo” se obtiene de la compresión a presiones muy altas de un monómero de etileno, lo que provoca el inicio de la polimerización por radicales libres utilizando un peróxido. Añadiendo

catalizadores de óxido de cromo soportado con sílice/alúmina, Hogan y Banks en 1951 fueron capaces de sintetizar el PE de baja densidad en PE de alta densidad [10].

La fórmula química del material puede describirse como $(C_2H_4)_n$ donde “n” representa la infinidad de posibles moléculas que se pueden unir a una cadena [29]. Este puede dividirse generalmente en PE de baja o de alta densidad, los cuales se diferencian entre sí por su grado de ramificación o empaquetamiento molecular (Figura 2), lo que afecta su densidad y, por lo tanto, su cristalinidad. Los productos con mayor cristalinidad serán más rígidos al tener fuerzas moleculares más fuertes asociadas al empaquetamiento cercano de las cadenas [27].

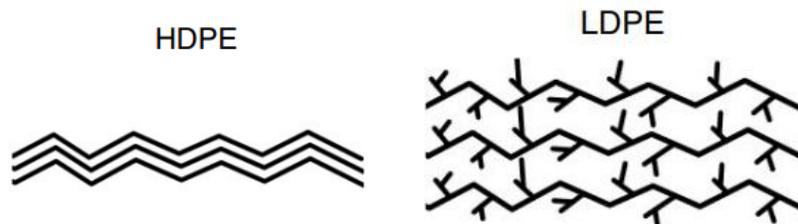


Figura 2. Representación gráfica de la diferencia estructural (empaquetado) entre HDPE y LDPE.

Recuperado de Cowan et al., (2022) [27].

El LDPE se emplea principalmente en la fabricación de bolsas, láminas protectoras, bandejas, etc. Por otro lado, el PE de alta densidad se utiliza para la producción de botellas, tapas y bolsas para productos frescos. Comparados entre sí, el HDPE tiene una mayor cristalinidad ya que posee una cadena molecular lineal [29]. Ambos tipos ofrecen una buena barrera contra el vapor y la humedad, y se consideran químicamente inertes [30].

Existe, además, el PE modificado, que es aquel al que se le han agregado grupos polares para mejorar su resistencia, propiedades de barrera, adherencia, etc. Este es modificado normalmente al agregarse monómeros funcionales con etileno o con la introducción de grupos funcionales [31].

El PE llega a contaminar las diferentes rutas alimentarias por los usos que se le dan, además de que, al igual que otros plásticos, puede contener aditivos que cambian su estructura y propiedades químicas, y, por lo tanto, llevar esos químicos contaminantes a los organismos con los que tiene contacto [32].

Al igual que los otros plásticos el PE puede verse afectado por factores ambientales que causan su degradación. La degradación biológica, realizada por microorganismos y enzimas específicas, es un proceso lento que necesita ser cuidadosamente controlado y aislado. Este tipo de degradación implica la acción de bacterias, hongos y otros microorganismos que metabolizan el plástico, descomponiéndolo en compuestos más simples. Aunque es una forma más natural y menos agresiva de degradación, su lentitud puede resultar en la acumulación de residuos plásticos en el medio ambiente antes de su completa biodegradación. La degradación física se deriva de efectos térmicos y oxidativos. Exposición a altas temperaturas y a la radiación ultravioleta del sol puede causar la fragmentación del plástico en partículas más pequeñas, conocidas como MPs. Sin embargo, este proceso también puede desencadenar la emisión de gases tóxicos. La degradación fisicoquímica puede llevarse a cabo por procesos como la oxidación, la hidrólisis o la fotodegradación. La fotodegradación, inducida por la luz solar, descompone el plástico en presencia de la radiación ultravioleta. Estos procesos pueden llevar a que el plástico libere los químicos adicionales para mejorar su durabilidad, como estabilizantes, plastificantes y otros aditivos, que pueden ser perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana [10].

2.3 Microbiota

El cuerpo humano alberga una enorme cantidad de bacterias, tan sólo en el tracto intestinal se han identificado alrededor de 10^{14} microorganismos. Cada familia tiene funciones específicas, como lo pueden ser la fermentación y degradación de nutrientes, influencia en el sistema inmune y la producción de mucosa intestinal, protección de la barrera intestinal, entre otros [8].

La microbiota es influenciada por diversos factores ambientales; como la forma de nacimiento, aquellos bebés nacidos por canal vaginal tienen una composición alta en *Lactobacillus* a diferencia de los nacidos por cesárea, que presentan una colonización de bacterias facultativas como el género *Clostridium*. La composición también cambia dependiendo del lugar geográfico de nacimiento y puede ser afectada por elementos internos o externos [8].

La microbiota desempeña múltiples roles cruciales para la salud del hospedero, actuando como una barrera protectora, facilitando la digestión, regulando el metabolismo e influyendo en la comunicación entre el intestino y el cerebro. En términos de protección, la microbiota compite con patógenos por nutrientes y espacio, produce sustancias antimicrobianas y modula el sistema inmunológico, ayudando a mantener la integridad de la barrera intestinal y evitando la translocación de bacterias y toxinas al torrente sanguíneo. En cuanto a la digestión, los microorganismos intestinales descomponen compuestos alimentarios complejos, como ciertos carbohidratos y fibras dietéticas,

produciendo ácidos grasos de cadena corta que sirven como fuente de energía para las células del colon y ofrecen beneficios metabólicos y antiinflamatorios. La regulación del metabolismo es otra función clave, donde la microbiota influye en la absorción de vitaminas y minerales, la síntesis de vitaminas y la modulación de vías metabólicas relacionadas con el almacenamiento de grasas y la sensibilidad a la insulina [33].

La colonización por bacterias patógenas por el consumo de antibióticos puede derivar en infecciones diarreicas, ya que se produce una disbiosis o alteración del equilibrio entre especies. Existe evidencia de que las interacciones entre bacterias y la mucosa intestinal tienen un rol importante en el desarrollo y regulación del sistema inmune [34].

Se han asociado ciertas rutas metabólicas con bacterias en específico y, por lo tanto, con enfermedades. En pacientes con autismo, obesidad, diabetes, artritis, cáncer, enfermedades gastrointestinales o cardiovasculares se han identificado niveles alterados en la cantidad y diversidad de las bacterias en la microbiota [11].

Como lo menciona Grodzick en su artículo de 2021, existe una relación entre la microbiota y el sistema nervioso, la alteración de esta puede afectar de manera significativa los procesos metabólicos y reacciones neuronales [32].

Un estudio realizado en 2021 destaca la relación entre la composición de la microbiota y las enfermedades neuronales, como el Alzheimer. Este vínculo se debe a que la disbiosis de la microbiota puede desencadenar procesos inflamatorios. En estos procesos, las citocinas juegan un papel crucial al provocar una neuroinflamación, que eventualmente conduce a la neurodegeneración. En pacientes con Alzheimer, se han registrado alteraciones significativas en la microbiota, lo que sugiere una conexión directa entre estos cambios microbianos y la progresión de la enfermedad [35].

A pesar de que en los últimos años ha crecido el interés por comprender el papel y el mecanismo de funcionamiento de la microbiota, fue desde 1885 que *Escherichia coli* fue aislada, y desde entonces se ha buscado entender para qué o cómo funciona la simbiosis entre huésped y hospedero. No hay manera de estandarizar una microbiota saludable, ya que esta depende de muchos factores ambientales en el hospedero. Sin embargo, es posible entender la función de las bacterias que la conforman y, así, mejorar la comprensión de su papel en la salud [36].

2.3.1 *Bacillus clausii*

B. clausii es una bacteria Gram positiva generadora de esporas, resistente a cambios de temperatura pH y sales [12]. Se caracteriza por tener una resistencia a antibióticos, probiótica y fácil de obtener

[37]. Entre sus características destacan su capacidad para sintetizar vitaminas, incrementar la secreción de mucina en las paredes intestinales [13] y mantener la homeostasis del sistema inmune del intestino [34], utilizada como tratamiento para el síndrome de colon irritable, diarrea e incluso se ha demostrado que es capaz de inhibir el crecimiento de patógenos. [13].

En la Figura 3 se resumen algunas de las propiedades fisiológicas, así como la actividad antimicrobiana e inmunomoduladora de *B. clausii*.

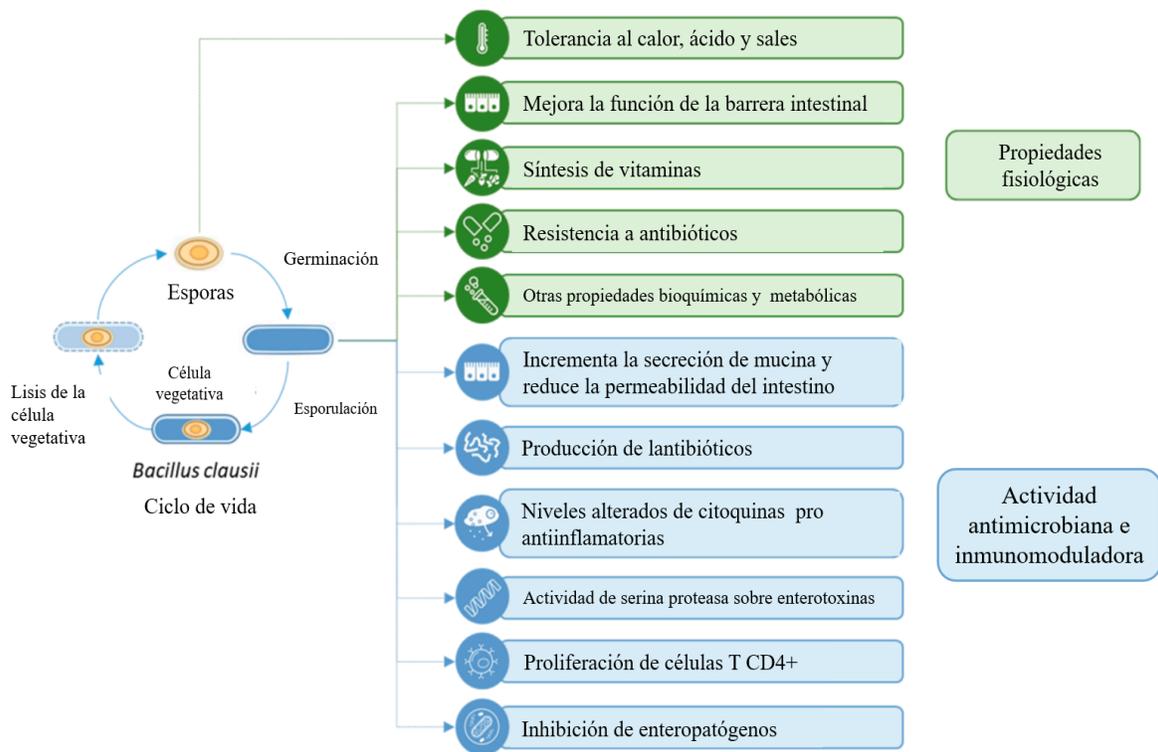


Figura 3. Resumen de las propiedades fisiológicas, antimicrobianas e inmunomoduladoras de *B. clausii*.

Recuperado de Ghelardi et al. (2022) [36].

B. clausii fue, además, estudiado por Gian et al., (2022) por su capacidad de estabilizar la respuesta inmune en niños y así prevenir las infecciones respiratorias recurrentes[14].

2.4 Viabilidad y cinética del crecimiento

El término "viable" puede referirse a la capacidad de las bacterias para vivir. En el ámbito de la microbiología, una bacteria viable es aquella capaz de formar una colonia macroscópica en un medio sólido o causar que el medio líquido donde es sembrada se perciba turbio [38].

Existen múltiples procesos para estudiar la viabilidad y velocidad de crecimiento de los cultivos bacterianos, sin embargo, la capacidad de crecimiento y multiplicación celular es ampliamente aceptado como un signo de viabilidad bacteriana [39].

El estudio de viabilidad basado en la capacidad de la bacteria para ser cultivada ha sido considerado confiable desde hace más de 100 años y puede llevarse a cabo en medios sólidos o líquidos, donde las bacterias viables formarán colonias, mientras las que no son viables, no lo harán [39].

Este proceso demanda que las bacterias se ubiquen en un medio enriquecido y sigan protocolos de temperatura específicos. Idealmente, deben estar aisladas, ya que la competencia por nutrientes entre dos o más especies puede inhibir su crecimiento. Estos métodos implican ensayo y error, y requieren más tiempo y habilidades técnicas para interpretar y contar las colonias formadas [40].

Una de las técnicas más utilizadas son las unidades formadoras de colonias (UFC), donde las colonias macroscópicas formadas en el medio pueden ser fácilmente contadas a las 24 o 48 horas después de ser sembradas [38].

La cinética de crecimiento, por otro lado, se define como la relación entre el crecimiento bacteriano y la concentración de sustrato [41].

Bajo este principio múltiples estudios han basado sus investigaciones entre el cambio en la densidad óptica (D.O.) y el crecimiento bacteriano. Chen et al., (2022) utiliza esta relación para demostrar como distintos tipos y tamaños de plástico afectan el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus*. Midiendo la D.O. en una microplaca de 96 pozos cada 10 minutos asumió que a mayor D.O. mayor cantidad de bacterias, es decir el sustrato con mayor absorbancia contenía bacterias que crecían a mayor velocidad [42].

De manera similar Kim et al., (2022) basan sus conclusiones en el cambio de la D.O. con la relación del crecimiento de *Bacillus* sp. y *E. coli* en el transcurso del tiempo. Ambas investigaciones utilizaron una longitud de onda de 600 nm para la realización de sus experimentos [43].

Al combinar ambas técnicas experimentales como lo son UFC y D.O. es posible garantizar la evaluación del efecto de inhibición o promoción del crecimiento de las bacterias cuando están en contacto con agentes contaminantes como el plástico.

Pueden, además, realizarse estudios de microscopía, donde se puede observar de manera cualitativa la morfología de los microorganismos, así como comportamiento respecto a los contaminantes agregados [44]. Debido al tamaño de las bacterias es necesario agregar tinciones que permitan observar el agrupamiento o cambios notables en su morfología, como el daño en la membrana. Se

pueden utilizar tinciones fluorescentes o para diferenciar un tipo de bacterias de otras, la tinción Gram [38], [45].

2.5 Caracterización por Raman

La espectroscopía de Raman permite analizar la estructura molecular y niveles energía vibracionales de los materiales de manera no invasiva. Puede definirse, de igual manera, como una representación de la intensidad de la luz dispersada en función del número de onda, y cada material tiene asociado un espectro específico [46]. Los picos observados en el espectro representan información acerca de la composición y cristalinidad del material estudiado [47].

Esta técnica se basa en el principio del efecto de Raman, el efecto Raman se puede definir como el cambio en la longitud de onda de la luz que ocurre cuando la luz es esparcida por distintas moléculas. Si la luz incidente es considerada está formada por partículas o fotones, que chocan con las moléculas de la muestra [48]. La mayoría de estos encuentros se consideran elásticos y las partículas se dispersan sin cambios en su frecuencia. En algunas ocasiones la molécula absorbe o cede energía a los fotones que se dispersan con menor o mayor energía, y por lo tanto hay un cambio en su frecuencia. Los cambios de frecuencia son, por tanto, medidas de la cantidad de energía implicada en la transición entre los estados inicial y final de la molécula dispersada. Los cambios de frecuencia son, por tanto, medidas de la cantidad de energía implicada en la transición entre los estados inicial y final de la molécula dispersada. Las energías que corresponden a los desplazamientos de la frecuencia Raman son energías asociadas a las transiciones entre los distintos estados rotacionales y vibracionales de la molécula dispersada. Los desplazamientos rotacionales puros son pequeños y difíciles de observar, excepto en el caso de las moléculas gaseosas simples. En los líquidos, los movimientos rotacionales se ven obstaculizados y no se encuentran líneas Raman rotacionales discretas [49].

La espectroscopía de Raman ha permitido detectar contaminantes plásticos en cuerpos de agua[50], vegetales [51] e incluso en leche materna[52], debido a su tamaño, esta técnica permite cuantificar los tipos de MPs en las muestras. Además, su capacidad para distinguir entre diferentes tipos de polímeros es crucial para estudios ambientales y de salud pública, facilitando la identificación precisa de contaminantes en diversas matrices[50].

2.6 Efectos adversos de los nano y microplásticos sobre la salud humana

En 2014 el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP, por sus siglas en inglés), destacó la importancia de resolver o detener la contaminación por plásticos y fue parte del top 10 de problemas urgentes a resolver, sin embargo, la producción de materiales de un solo uso no

se ha visto disminuida y se ha estimado que los fragmentos de plástico abarcan de un 60% a un 80% del debris marino [6].

Recientemente, en 2023, el equipo de investigación liderado por el investigador Sewwandi publicó un artículo que resume las vías de exposición a micro y nanopartículas de plástico, así como las concentraciones de estas presentes en alimentos y bebidas. Se destaca que la ruta de exposición por ingesta es la principal mediante la cual dichas partículas ingresan al organismo [1].

Bajo este principio, diversos grupos de investigación se han enfocado en estudiar los efectos de los MPs en la salud humana. Correia Prata (2020) ha expuesto los riesgos asociados, entre los cuales se incluyen la inflamación, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la citotoxicidad y la alteración de la homeostasis en las células humanas. Además, se ha observado la posibilidad de traslocación de nano fragmentos de plástico a lo largo de todo el cuerpo humano, lo que podría dar lugar a enfermedades en órganos como los riñones, el corazón, los testículos, los ovarios e incluso el cerebro [6].

Varios autores han coincidido en la teoría de que el tamaño, la forma y el material de cada plástico tienen un efecto particular en microorganismos específicos. Se han investigado las interacciones entre hongos [2], bacterias [42] y células humanas [53] con los MPs, y se ha llegado a la conclusión de que cada tipo de material tiene un impacto distinto en cada tipo de célula estudiada. Además, los investigadores han mostrado un interés creciente en estudiar los efectos de partículas cada vez más pequeñas, como los NPs, en los organismos. Esto se debe a que la cantidad de los NPs supera significativamente la cantidad de MPs presentes en el medio ambiente [20].

Los NPs han demostrado tener la capacidad de penetrar con mayor facilidad las capas epiteliales de los tejidos y las membranas celulares, lo que puede provocar cambios morfológicos en la membrana celular. Además, algunos autores han recurrido al desarrollo de simulaciones por computadora para analizar las interacciones células-partículas [54].

Para investigar los efectos específicos sobre organismos vivos, se han realizado estudios *in vivo* en ratones que han consumido agua contaminada con micro partículas de poliestireno. Estos estudios han revelado que dichas partículas tienen un impacto negativo en la salud intestinal [23], causando cambios en la producción de espermatozoides [24], disminución del moco intestinal y aumento en la secreción de citoquinas, entre otros efectos adversos [53].

En el año 2021, un grupo de investigadores en Polonia, publicaron un review sobre los efectos de varios tipos de NPs en el eje intestino-cerebro. Este eje se define como la red compleja existente entre el sistema nervioso central y el intestino, ya que este último no solo es el encargado de obtener

nutrientes para el organismo, si no que, también es un área expuesta al medio ambiente del individuo [32].

Condiciones como el estrés ambiental o la necesidad de una respuesta inmune afectan al eje intestino-cerebro, por lo que el cerebro influye de manera neuronal y hormonal en las actividades de las células intestinales, inmunológicas y epiteliales entre muchas más. Todas estas células están, a su vez, influenciadas por la microbiota intestinal, las cuales tienen un papel importante en la comunicación intestino-cerebro. Algunas de estas vías de comunicación pueden verse en la relación entre la disbiosis (alteración en la composición de la microbiota) y enfermedades neuronales; se han realizado estudios en los que se comprobó la influencia de la microbiota en trastornos como la ansiedad o la depresión y más recientemente, se ha descubierto que los pacientes autistas presentan alteraciones puntuales de la microbiota que corresponden al nivel de la enfermedad [21].

2.7 Estado del arte

Se ha demostrado que tanto los MPs como los NPs tienen un efecto negativo en la microbiota de modelos animales acuáticos y terrestres, causando disbiosis, alteraciones metabólicas y un ambiente inflamatorio [55].

En modelos animales se han utilizado micro partículas de PE (10-150 μm) en ratones, Li et al., (2020) demostró que estas partículas afectaban la distribución de la microbiota lo que afectó los procesos inmunológicos desencadenando un incremento de la citoquina IL-1 α y en concentraciones más altas los MPS (600 $\mu\text{g}/\text{día}$ por 5 semanas) causaron inflamación alrededor de todo el tracto digestivo al activar la señalización de TLR4. Concluyeron entonces que, los MPs de PE causaron disbiosis en la microbiota y en consecuencia alteraron los procesos inflamatorios de los ratones[23].

En células de la pared intestinal (Caco-2) se observó daño en el ADN, incremento de la citotoxicidad, absorción y traslocación de nanopartículas, inflamación e incremento de la permeabilidad intestinal. Todos estos efectos reportados tan sólo después de 24 horas de contacto con el plástico (PS, PVC) en concentraciones desde 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [56].

Se han llevado a cabo estudios sobre la cinética del crecimiento de bacterias de la microbiota expuestas a micropartículas de plástico, en los cuales investigadores de la India, China y Corea han examinado el efecto de partículas de poliestireno a diferentes concentraciones. En el caso de las interacciones entre MPs y *Bacillus* estudiadas en la India y China por los investigadores Athulaya et al., (2023) y Yi et al.. (2021) respectivamente, se ha llegado a la conclusión de que el crecimiento bacteriano es más rápido a concentraciones más altas de poliestireno, con tamaños de partícula de

0.1, 0.55 y 5 μm de diámetro. Sin embargo, estos estudios también indicaron que un aumento en la cantidad de plástico resultaba en un mayor estrés para las bacterias [42], [43].

Por otro lado, investigadores de la Universidad de Pusan y la Universidad de Seúl llegaron a la conclusión de que tanto las nanopartículas como las micropartículas tenían un efecto inhibitorio en *Bacillus* sp., utilizando una concentración única de 100 mg/L y examinando tamaños específicos de partículas de 60, 220, 430, 700, 1040, 1700 y 2260 nm, observaron que las partículas de 1040 nm ejercían el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento, mientras que las de 60 nm generaban un mayor estrés en las bacterias al lograr penetrar la membrana [43].

Otros trabajos relacionados al estudio de citotoxicidad de nano y micro plásticos en bacterias se reportan en la Tabla 2

Tabla 2. Reportes de estudios de citotoxicidad por NPs y MPs en bacterias

Bacteria	Plástico	Tamaño	Concentración	Efectos	Referencia
<i>Lactobacillus</i> (<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	PP, PE, PS, PET y PVC	13 μm y 400 nm, y el PVC de 5 μm y 400 nm	0 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$.	PS y PVC fueron capaces de inhibir el crecimiento de <i>Lactobacillus</i>	Chen et al. 2023
<i>Lactobacillus</i>	PP, PVC y PE	100 nm	30 $\mu\text{g/ml}$	Los <i>Lactobacillus</i> poseen una buena capacidad para adsorber varios NPs (nanopartículas)	Zhao et al. 2023
<i>E. coli</i>	PS, PET y PVC	75 nm y 30 μm	0, 10, 50, 100 y 500 mg/L.	Cambio en la membrana, morfológica y químicamente. Más propensas al plásmido y transferencia de genes por la formación de biopelículas	Wang et al., 2022
<i>Bacillus tropicus</i>	PS	24 \pm 10 μm	20 a 320 mg/L	Mayor viabilidad a mayor concentración,	Yi et al. 2021

				pero mayor estrés bacteriano	
<i>E. coli</i> , <i>Bacillus cereus</i>	PS	0.1, 0.55 y 5 µm en diámetro	0 a 320 µg/ml	La viabilidad de <i>la E. coli</i> disminuyó y se formaron biopelículas. Sin embargo <i>B. cereus</i> aumentó su viabilidad. A mayor concentración de MPS aumentaron las ROS	Athulaya et al. 2023
<i>E.coli</i> , <i>Bacillus sp.</i>	PS	60, 220, 430, 700, 1040, 1700, y 2260 nm	100 µg/ml	Todos los tamaños causaron una disminución del crecimiento, y las bacterias absorbieron los nanos, los cuales, sorpresivamente causaron menos daño que los micros.	Kim et al. 2022
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Convencional y bioplástico/ PCL, HDPE, PES, PP/ Obtenidos de bolsas de compra comerciales y envases de alimentos	396–1050 nm	10–100 mg/L	<i>S. aureus</i> mostró aumentos en viabilidad hasta una leve inhibición, <i>E. coli</i> no mostró respuesta o una leve inhibición, <i>P. aeruginosa</i> presentó una leve hasta una inhibición alta, y <i>B. subtilis</i> mostró una alta viabilidad frente a las partículas de plástico.	Saygin & Baysal 2020

Un estudio realizado en 2023 planteó la posibilidad de que los *Lactobacillus* sp. puedan adsorber ciertos NPs y ayudar a la eliminación de partículas del ambiente [42].

Por otro lado, Nugrahapraja et al., (2022) realizaron un estudio con el objetivo de detectar genes presentes en enzimas capaces de degradar MPs en la microbiota humana. Analizando heces de 22 participantes en Indonesia, descubrieron que el gen *feaB*, altamente reportado en cepas de *E. coli*, también estaba presente como un gen degradador de plástico y era el más común en las muestras. Asimismo, confirmaron que la disbiosis causada por HDPE afectaba especialmente a la familia de los *Bacteroides*. A pesar de estos hallazgos, Nugrahapraja et al. reconocen la necesidad de realizar más investigaciones con un mayor número de sujetos, ya que no se pudo encontrar una relación significativa entre la cantidad de contaminación por MPs en la microbiota y la expresión de genes degradadores. Además, reconocen que medir el impacto total de la microbiota en la degradación de MPs es muy complejo y requiere estudios adicionales [57].

Se han realizado diferentes estudios que han demostrado la capacidad de diferentes organismos capaces de degradar plásticos, desde hongos [2], bacterias pertenecientes a gusanos de seda [58], bacterias encontradas en cuerpos de agua como *P. protegens* y *B. cereus*. [59]. En estas investigaciones se pudieron observar alteraciones en los espectros de Raman y FTIR así como micro fracturas en la superficie de los plásticos observadas gracias a un equipo SEM.

Jiménez-Arroyo et al.,(2023) incluyeron en su revisión de literatura bacterias putativas pertenecientes a microbiotas de larvas e insectos donde se incluye bacterias capaces de degradar el PE como *Sebaldella termitidis*, *Brevibacterium* sp., *Pantoea* sp., *Lactococcus* sp., *Elizabethkingia* sp., *Citrobacter* sp. y *Kosakonia* sp. [55]

Thuy-Hanh et al., (2021) resumen algunos de los microorganismos capaces de degradar MPs y las condiciones experimentales necesarias para ver los efectos, estos se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Microorganismos reconocidos como degradadores de plásticos. Recuperado de Thuy-Hanh et al. [10]

Microrganismo	Tipo de MPs	Condiciones experimentales	Eficiencia de degradación
<i>Bacillus</i> sp.	PP	40 días de incubación, cepa de sedimento	4%
<i>Bacillus</i> sp.	PE	28 días de incubación cepa proveniente de	10.7%

		gusanos de cera alimentados con plástico	
<i>Comamonas acidovorans</i> (TB-35)	PUR	8 días de incubación, enzimas degradadoras: Estereasas	100%
<i>Penicillium pinophilum</i>	Polvo de LDPE	31 meses de incubación, cepa ATCC 11797	0.37%
<i>Bacillus sp.</i> y <i>Paenibacillus sp.</i>	PP	60 días, obtenidos de sedimento de terreno urbano	14.7%
<i>Souda</i> y <i>Agios</i> (<i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroides</i> y <i>Actinobacteria</i>)	HDPE	60 días de incubación, provenientes de la bahía Souda	8-18%

Capítulo 3

Metodología

En este apartado se explica a detalle los protocolos empleados en el cultivo de *B. clausii*, la obtención y caracterización de micro y nano partículas de PE, así como los procedimientos de evaluación de citotoxicidad y el efecto ocasionado por la bacteria al plástico.

3.1 Material biológico

La cepa de *B. clausii* fue obtenida en forma de esporas a partir del suplemento Enterogermina® diseñado para lactantes y niños, con suspensiones de 2 mil millones de UFC, en ampollitas de 5 ml cada una.

Las esporas de *B. clausii* se caracterizan por su capacidad para restablecer el equilibrio de la microbiota intestinal. Debido a su naturaleza esporulada, es resistente a condiciones ambientales adversas, como cambios en el pH. Para su cultivo, se empleó caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) de la marca MCDLAB. En la realización de los experimentos, se utilizaron 200 µL de la suspensión microbiana, incubándose en 10 ml de caldo BHI, lo que resultó en un total de 80 millones de UFC por muestra. Las condiciones de cultivo para todas las muestras fueron en incubadora de agitación modelo THZ-100 Luzeren, a 37°C y 180 rpm.

Para el cultivo en placa se realizó una dilución de 1:4000 tomando solamente 50 µL para obtener un aproximado de 400 UFC. Todos los tubos, así como las cajas Petri, fueron de vidrio marca CIVEQ para evitar la contaminación o adherencia de otro tipo de plástico en las muestras.

3.2 Plásticos

Para el desarrollo de esta metodología se utilizaron 5 tipos de plásticos obtenidos de diferentes fuentes. A continuación, se explica la obtención y caracterización de cada uno:

3.2.1 Microplásticos de polietileno de baja densidad

Las partículas de baja densidad fueron obtenidas de raspados de una piseta de laboratorio, de uso, marcada como tal por el fabricante. Es importante recalcar que la edad de la piseta era mayor a los 5 años y había estado en constante contacto con acetona.

Para degradar aún más el plástico, la piseta fue sometida al proceso de esterilización por autoclave, 15 minutos a 120°C y 15 lbf. A este tipo de plástico se le denominara LDPE intemperizado.

Una vez que el plástico se derritió y endureció, se realizó un raspado de toda la superficie para después filtrarlo en un colador de metal y obtener partículas menores a 1 mm de forma y espesor irregulares.

3.2.2 Microplásticos de polietileno de alta densidad

Estos MPs se adquirieron por donación del laboratorio de investigación de paleoceanología del CICESE Ensenada B.C. Fueron obtenidos del raspado de pisetas de plástico de alta densidad, siendo filtrados en un tamiz QuaFooLab que permitió la recuperación de partículas menores a 250 μm , las cuales fueron dejadas al sol durante un período aproximado a los 3 años. Este plástico será denominado HDPE intemperizado.

3.2.3 Plásticos mixtos de polietileno alta densidad

Los plásticos mixtos fueron adquiridos de Coespheric USA. Estas esferas son de alta densidad y en un rango de tamaño de 200 nm a 9990 nm. Este plástico será denominado como MIXBEADS.

3.2.4 Microplásticos fluorescentes de polietileno de alta densidad

Estas esferas de plástico tienen un rango de tamaño de 34 a 44 μm y poseen un color verde fluorescente. Obtenidas como donativo del laboratorio de investigación de paleoceanología del CICESE Ensenada B.C. Este plástico será denominado como MBPE.

3.2.5 Microplásticos de polietileno de baja densidad nuevos

Estos plásticos fueron adquiridos al raspar una piseta de PE de baja densidad, marcada así por el fabricante. Esta piseta se considera como nueva, ya que no fue expuesta de manera intencional a rayos UV o degradación térmica. Las virutas obtenidas tuvieron un tamaño menor a 1 mm y serán denominadas como LDPE nuevo.

3.2.4 Esterilización de microplásticos

El método de esterilización aplicado a todos los plásticos (Figura 4), exceptuando a los MIXBEADS (Figura 5), implicó la adición de agua oxigenada al 30% (CURAPACK) para eliminar cualquier residuo de materia orgánica. Posteriormente, se dejaron reposar durante 24 horas dentro de una incubadora a 37°C para permitir la evaporación completa del agua residual. Luego, los plásticos fueron expuestos a luz ultravioleta en 2 intervalos de 20 minutos cada uno, con una agitación intermedia para asegurar que la luz alcanzara a todas las partículas. La esterilización fue realizada después del pesado.

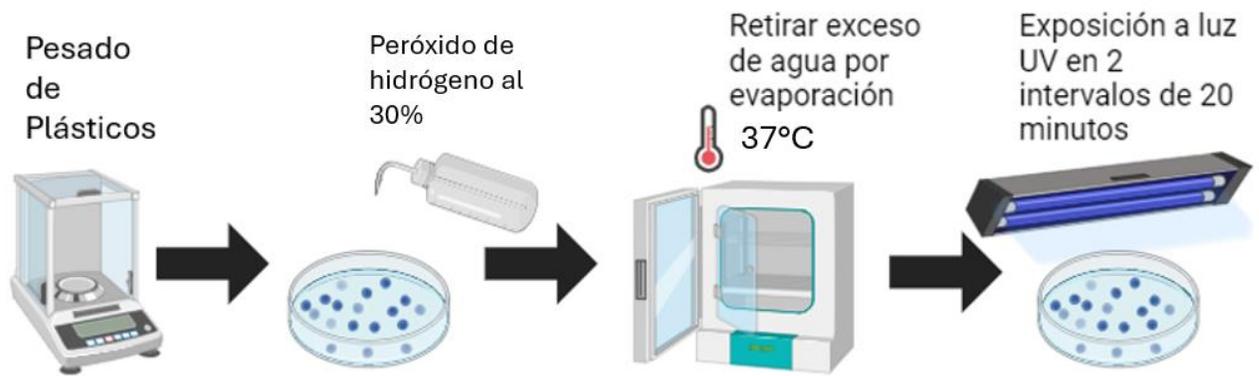


Figura 4. Diagrama del proceso de esterilización de las micropartículas de plástico

Para los MIXBEADS se aplicó un tratamiento de esterilización más breve, debido a que, al ser un estándar de empaque cerrado, estaban menos expuestas a la contaminación. Después de preparar la suspensión principal, las MIXBEADS fueron expuestas a luz ultravioleta durante 30 minutos como medida de esterilización (Figura 5).



Figura 5. Esterilización de la suspensión de MIXBEADS

3.2.5 Preparación de suspensiones de plásticos

Para el desarrollo de los experimentos se eligieron las siguientes concentraciones para todos los plásticos:

- 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$

- 800 µg/ml
- 1000 µg/ml

Todas las partículas fueron suspendidas en PBS. Para los plásticos HDPE intemperizado, MBPE y MIXBEADS se pesaron los plásticos y se realizaron soluciones stock de las cuales se obtuvieron las suspensiones de trabajo.

Las diluciones de MIXBEADS fueron sometidas a tres ciclos de baño ultrasónico hasta que las partículas estuvieran completamente suspendidas y sin aglomeraciones (aprox. 120 segundos cada ciclo), antes de ser utilizadas. Este proceso garantizó una dispersión uniforme de las partículas en la solución (Figura 6).

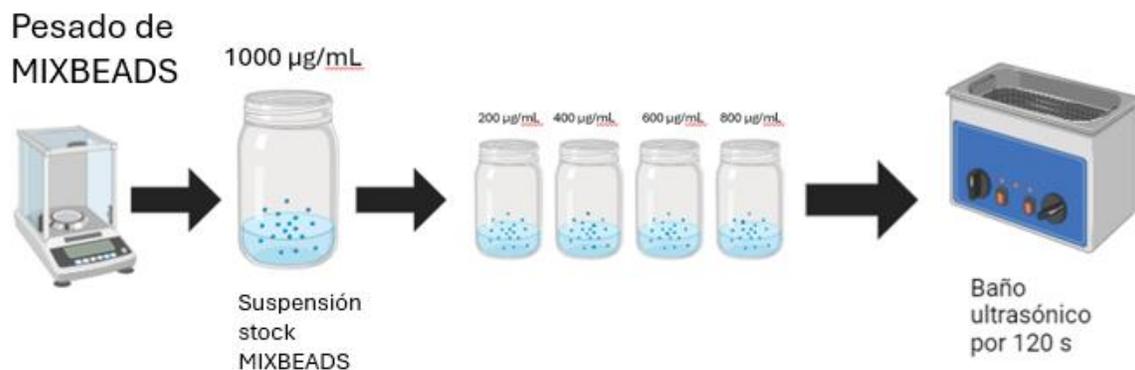


Figura 6. Realización de las suspensiones de MIXBEADS.

3.3 Interacción plástico-bacteria

Se utilizaron tres frascos de vidrio por cada concentración (el control será denominado concentración cero), los cuales fueron esterilizados dos veces. Tanto las bacterias como los plásticos fueron agregados en volúmenes iguales de 200 µL, simultáneamente, a 10 ml de caldo BHI estéril, para obtener un aproximado de 7.8×10^6 UFC por mililitro y las concentraciones de plástico descritas anteriormente. Todos los cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones a 37°C y 180 rpm (Figura 7). Cada experimento fue realizado 2 veces por triplicado.

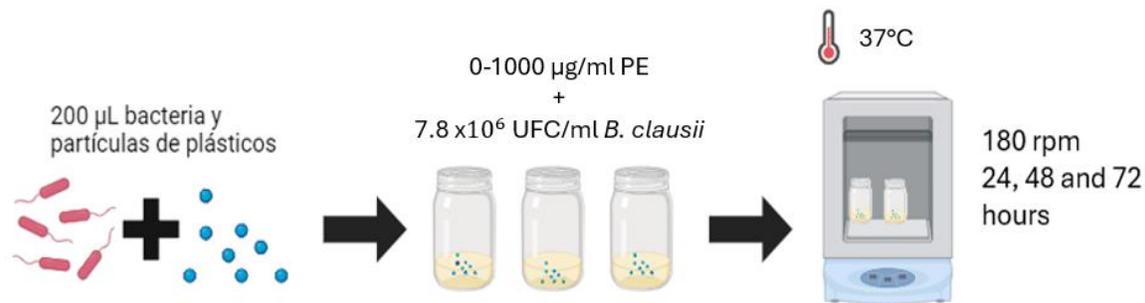


Figura 7. Incubación de las bacterias junto con las partículas de plástico.

3.4 Parámetros evaluados

3.4.1 Densidad óptica

La densidad óptica se ha establecido como una fuente confiable para evaluar el crecimiento bacteriano. Todas las muestras fueron medidas a las 24, 48 y 72 horas después de la incubación con las partículas de PE. Se utilizó una microplaca de 96 pozos CORNING, y se midió la absorbancia a 595 nm utilizando 100 µL de sustrato en cada pocillo (Figura 8). Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Utilizando el control se normalizó para obtener el porcentaje de crecimiento bacteriano

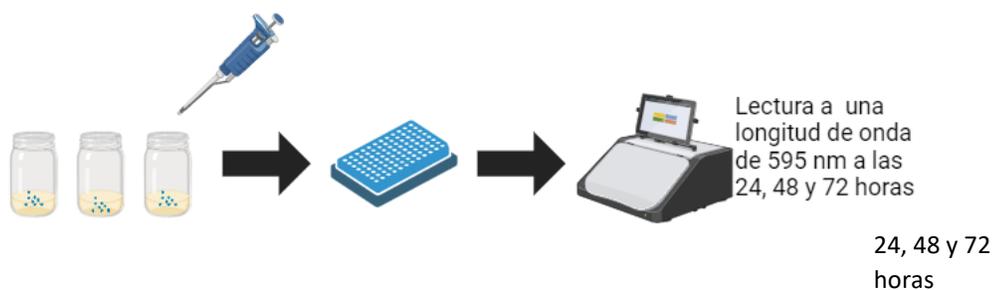


Figura 8. Lectura de densidad óptica para la determinación del crecimiento bacteriano

3.4.2 Unidades formadoras de colonias

Para llevar a cabo el cultivo en placa, se preparó una dilución utilizando una proporción de 1 parte de cada muestra de *B. clausii*, incubadas por 24 horas en contacto con PE o control, por cada 4000 partes de PBS. Se tomó una cantidad de 50 µL de esta dilución y se sembró en una placa de agar BHI, con el objetivo de obtener aproximadamente 300 unidades formadoras de colonias (UFC) en el control, las cuales se dejaron incubar a 37°C por 24 horas antes de hacer el conteo (Figura 9).

Este proceso se realizó dos veces por triplicado para las concentraciones de 0, 200 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de todos los plásticos.

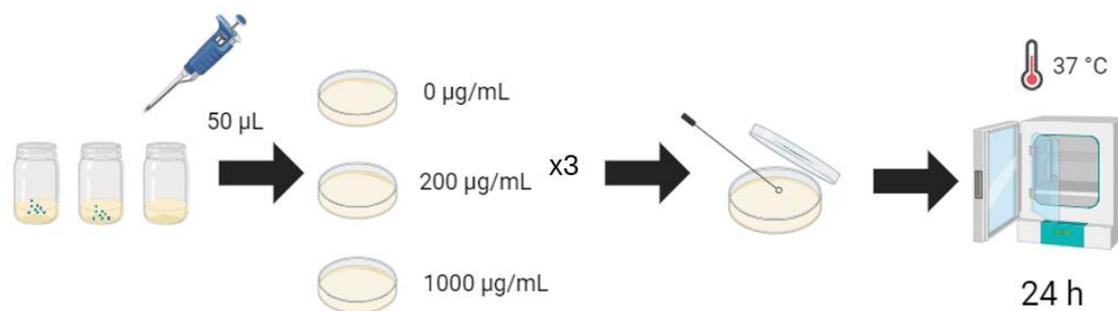


Figura 9. Incubación de muestras en cajas Petri para obtener UFC.

3.4.3 Microscopía

Las muestras bacterianas fueron observadas en el microscopio óptico Carl Zeiss® para buscar posibles cambios en su morfología e interacción con el plástico. Se realizó tinción de Gram en todas las muestras.

Para la tinción se tomó un frotis de cada placa, el cual fue colocado en un portaobjetos previamente esterilizado y se fijó con el calor del mechero. Después se siguió el protocolo de tinción de Gram proporcionado por el fabricante HYCEL, a cada frotis se cubrió por completo con Violeta Genciana para esperar un minuto, después se escurrió el excedente, sin enjuagar se cubrió con Yodo Gram y se esperó un minuto para continuar con un lavado de acetona por 15 segundos. Se enjuagó con agua destilada para retirar el excedente de colorante. Después se cubrió el frotis con colorante Safranina para dejar actuar por un minuto y finalmente enjuagar con agua destilada para quitar el resto de colorante. Se dejó secar la muestra al aire y se cubrió con un cubreobjetos. Se pudieron observar las muestras con un objetivo de 100x.

3.4.4 Raman

Todos los tipos de PE fueron analizados mediante espectroscopía Raman con el equipo Alpha300 R (WiTec) para determinar su composición química tanto antes como después de estar en contacto con las bacterias.

Para el análisis previo al contacto con *B. clausii* se tomaron muestras de las partículas de PE y fueron pegadas en una cinta de carbono (UNLINE) observándose bandas en 2950 – 2800 y 1550 - 1250 cm^{-1} de acuerdo con la composición del PE [60].

Las diferencias entre los tipos de PE se observaron en la variación de la intensidad de estas bandas, la cual depende de la densidad, estructura y cristalinidad del material.[61]

Después de la exposición a *B. clausii*, se tomaron nuevos espectros Raman de las muestras de PE para identificar cualquier cambio significativo en la composición química. Estos análisis permitieron observar cambios en las bandas vibracionales, tales como desplazamientos, variaciones en la intensidad y la aparición o desaparición de picos. Se siguieron los mismos parámetros de análisis anteriores.

Para las partículas que estuvieron en contacto por 72 horas con *B. clausii* fue necesario agregar agua oxigenada (CURAPACK) al 30% para eliminar toda la materia orgánica de los medios en una proporción 1:1 y recuperarlas por un método de filtrado, donde se utilizó una bomba de vacío (GB modelo: Ait-2b) y un filtro WHATMAN® con tamaño de poro de 8 μm . En la Figura 10 se puede observar el arreglo para la filtración y recuperación de partículas.



Figura 10. Arreglo de filtrado y recuperación de micropartículas

El análisis RAMAN permitió obtener información detallada sobre los componentes y la estructura molecular de los plásticos, lo que facilitó la comprensión de cualquier cambio químico o alteración que pudieran experimentar durante la interacción con las bacterias.

Se observó un rango de 400 a 3000 cm^{-1} esperando encontrar las bandas ya mencionadas.

3.4.5 SEM

Para esta prueba se seleccionaron las partículas de LDPD nuevo, debido a que se pudieron obtener fragmentos planos y por su composición “más porosa” las posibles alteraciones superficiales podrían ser más notorias a las 24, 48 y 72 horas de contacto con *B. clausii*.

Se obtuvieron 4 cuadrados de 1 cm x 1 cm de LDPE nuevo, los cuales fueron esterilizados de la misma manera que las demás micropartículas de PE, posteriormente fueron incubados con la misma cantidad de bacterias que los experimentos anteriores y estuvieron en contacto por 0, 24, 48 y 72 horas.

Las muestras fueron analizadas con un microscopio electrónico de barrido de doble haz FEI Scios (Field Electron and Ion Company). Para el análisis, se utilizó un ancho de campo horizontal de 2.07 μm , una ampliación de 100,000x, una potencia de alto voltaje de 10 kV y una resolución de 1.4 nm a 1 keV.

3.4.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico del porcentaje de crecimiento y viabilidad obtenido a partir de las mediciones de D.O. y UFC en relación con el control del día, se empleó el software ORIGIN 2018 junto con su módulo LABVIEW.

Se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), una técnica que permite evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de los grupos bajo comparación. El ANOVA de una vía se utiliza para analizar los datos agrupados en función de una única variable independiente, en este caso, las concentraciones de plástico, y determina si hay diferencias en el porcentaje de crecimiento y viabilidad entre el grupo control y los diferentes niveles de concentración. Se establece un nivel de significancia (α) de 0.001.

Después de determinar si existe una diferencia significativa mediante ANOVA, se procedió con una prueba post hoc de Tukey. Este método es esencial para realizar comparaciones múltiples entre todas las combinaciones posibles de medias de los grupos. La prueba de Tukey permite discernir no solo si hay diferencias generales entre los grupos, sino también identificar específicamente qué grupos muestran diferencias significativas en cuanto a sus medias.

Tabla 4. Ejemplo de resultados de análisis ANOVA y post hoc Tukey obtenidos con ORIGIN 2018 LABVIEW

ANOVAOneWay (20/07/2024 13:25:40)

Notes

Input Data

One Way ANOVA

Overall ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	5	1972.45096	394.49019	13.21339	9.53033E-10
Error	94	2806.40186	29.85534		
Total	99	4778.85282			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.001 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
	0.41275	0.05889	5.464	92.78268

Means Comparison

Tukey Test

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
B A	-6.17231	1.82133	4.79262	0.01277	0.001	0	-13.73368	1.38907
C A	-5.73009	1.94709	4.16189	0.04576	0.001	0	-13.81353	2.35336
C B	0.44222	1.94709	0.3212	0.99991	0.001	0	-7.64123	8.52567
D A	-9.3503	1.82133	7.26024	2.23306E-5	0.001	1	-16.91167	-1.78893
D B	-3.17799	1.82133	2.46762	0.50612	0.001	0	-10.73936	4.38338
D C	-3.62021	1.94709	2.62944	0.43355	0.001	0	-11.70366	4.46323
E A	-5.5842	1.84792	4.27358	0.03698	0.001	0	-13.25597	2.08756
E B	0.58811	1.84792	0.45008	0.99955	0.001	0	-7.08366	8.25987
E C	0.14588	1.97198	0.10462	1	0.001	0	-8.04092	8.33269
E D	3.7661	1.84792	2.88219	0.32911	0.001	0	-3.90567	11.43786
F A	-14.86174	1.91023	11.00268	2.3931E-9	0.001	1	-22.79218	-6.9313
F B	-8.68943	1.91023	6.4331	2.28313E-4	0.001	1	-16.61987	-0.75899
F C	-9.13166	2.03049	6.3601	2.78031E-4	0.001	1	-17.56134	-0.70197
F D	-5.51144	1.91023	4.08032	0.05326	0.001	0	-13.44188	2.419
F E	-9.27754	1.9356	6.77847	8.82076E-5	0.001	1	-17.3133	-1.24178

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0.001 level.

Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0.001 level.

*A= Control, B=200 µg/ml, C=400 µg/ml, D=600 µg/ml, E=800 µg/ml, F=1000 µg/ml

Capítulo 4

Resultados

4.1 Cinética de crecimiento

Gracias a la medición de D.O., se lograron obtener datos sobre el crecimiento de *B. clausii*. Los resultados mostraron una inhibición del crecimiento en presencia de todas las partículas de PE estudiadas. Esta inhibición fue especialmente pronunciada con las partículas de plásticos intemperizados y MIXBEADS a las 24 horas y con MBPE y MIXBEADS a las 48 y 72 horas.

De igual manera, se midió la viabilidad de *B. clausii* en contacto con todos los tipos de PE para las concentraciones de 200 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ a las 24 horas. Se observó que la viabilidad se veía más afectada con las partículas que incluían las más pequeñas (MIXBEADS) y con el plástico intemperizado, lo que indica un mayor impacto de estos factores sobre la viabilidad bacteriana. Estos hallazgos demuestran el impacto significativo de estas partículas en el crecimiento de *B. clausii*, como se detalla a continuación.

4.2 Efecto del microplástico LDPE intemperizado sobre el crecimiento de *B. clausii*

A las 24 horas de interacción entre la bacteria y las diferentes concentraciones de LDPE intemperizado (0, 200, 400, 600, 800 y 1000 $\mu\text{g/ml}$) se observó el máximo crecimiento de *B. clausii* en el grupo de control (0 $\mu\text{g/ml}$), al cual se le atribuyó el 100% de crecimiento. A concentraciones de 200, 400 y 800 $\mu\text{g/ml}$ de LDPE intemperizado, el porcentaje de crecimiento de *B. clausii* se mantuvo similar al del control, sin efecto significativo sobre el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, a una concentración de 600 $\mu\text{g/ml}$ de LDPE intemperizado se observó una ligera disminución, aunque con diferencia significativa, en el crecimiento de *B. clausii* con respecto al control.

Finalmente, la concentración más alta de LDPE intemperizado empleada (1000 $\mu\text{g/ml}$), mostró el porcentaje de crecimiento de *B. clausii* más bajo, significativamente diferente al control, logrando solamente un 84.69% de crecimiento (Figura 11).

Nótese que entre las concentraciones de 200 a 800 $\mu\text{g/ml}$ de LDPE no existe una diferencia significativa entre ellas, lo que indica que, en este rango de concentraciones, el LDPE intemperizado no produce un efecto significativo sobre el crecimiento de *B. clausii* dependiente de la dosis.

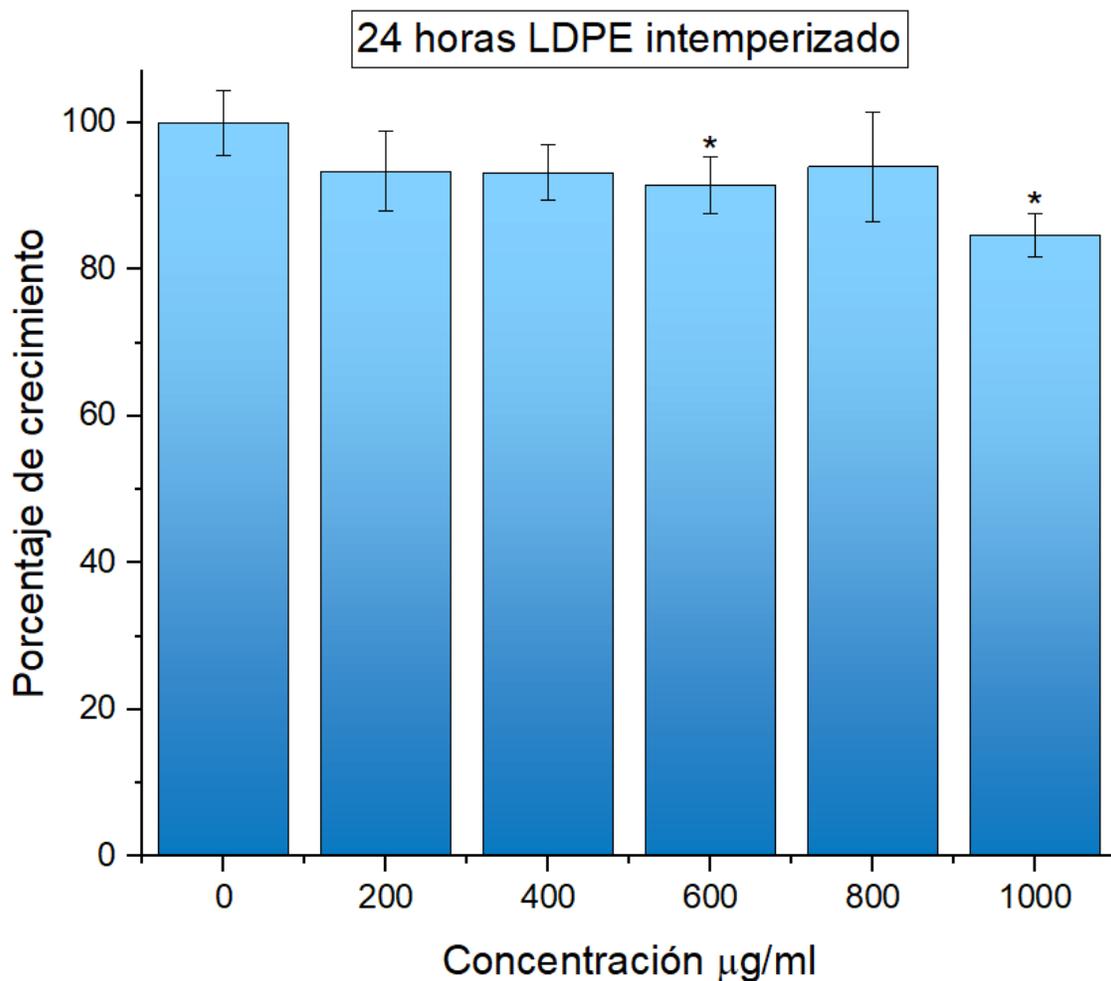


Figura 11. Porcentaje de crecimiento a las 24 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de LDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

A las 48 horas de exposición, el crecimiento de *B. clausii* se vio más afectado. Todas las concentraciones evaluadas presentaron una disminución estadísticamente diferente en el porcentaje de crecimiento, lo que sugiere que, con el transcurso del tiempo, incluso a concentraciones relativamente bajas, el LDPE intemperizado tiene un efecto inhibitorio notable sobre *B. clausii* (Figura 12). Todas las muestras de *B. clausii* expuestas a cualquier concentración de LDPE no presentaron diferencia significativa entre ellas. El porcentaje de crecimiento se observó entre el 73 y el 80.82%.

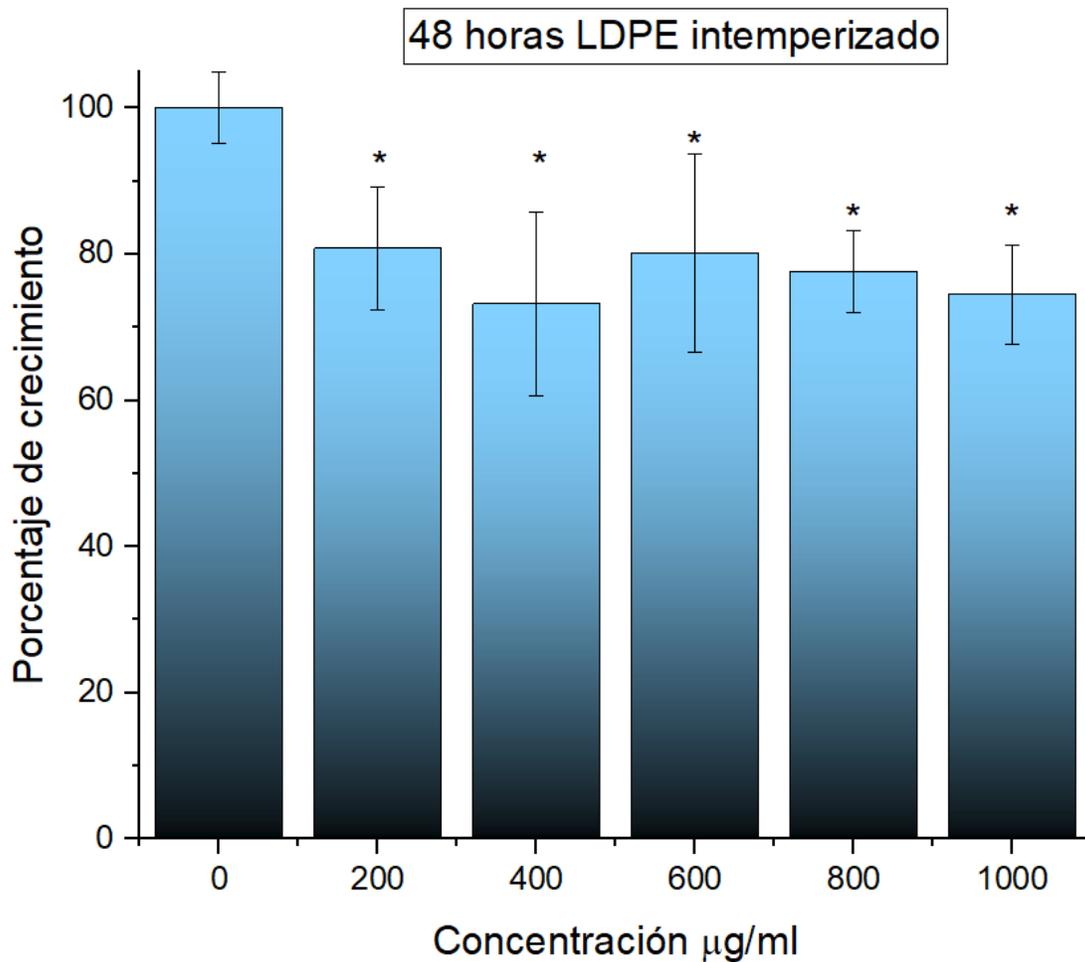


Figura 12. Porcentaje de crecimiento a las 48 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de LDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$

La disminución del porcentaje de crecimiento de *B. clausii* tras 72 horas de exposición a LDPE intemperizado es aún más notable, especialmente a las concentraciones de LDPE más altas 200 $\mu\text{g/ml}$ (86.97%) (400 (68.99%), 600 (68.18%), 800 (67.88%) y 1000 (64.19%) $\mu\text{g/ml}$), donde todos los tratamientos presentaron una disminución significativa en comparación con el control (Figura 13). A partir de la concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$ hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$ no se observó diferencia significativa entre ellas, solo la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ mostró una inhibición menor y significativamente diferente al resto de las concentraciones.

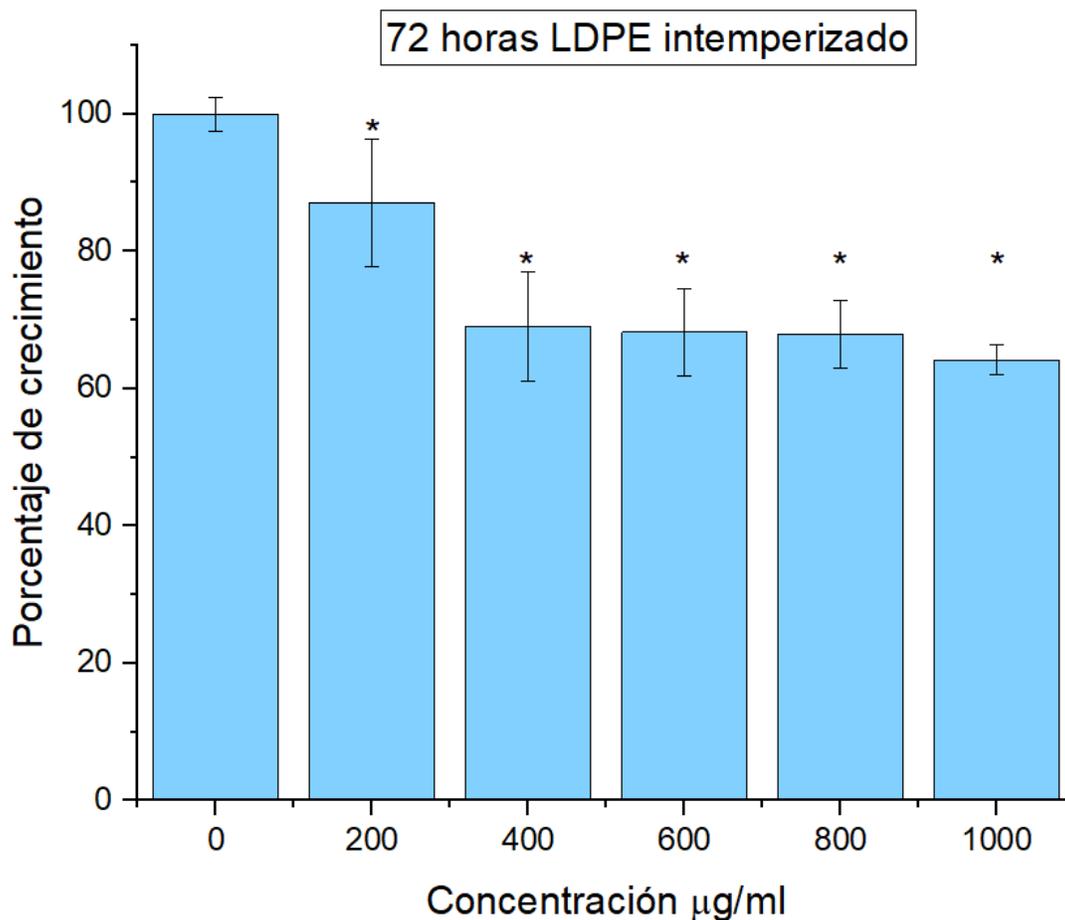


Figura 13. Porcentaje de crecimiento a las 72 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de LDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

4.3 HDPE intemperizado

La medición de D.O. con concentraciones de 0-1000 µg/ml de HDPE intemperizado denotó un efecto tóxico para *B. clausii*. A las 24 horas la concentración más baja, de sólo 200 µg/ml tuvo un efecto ya significativamente diferente respecto al control, puede notarse que el porcentaje de crecimiento alcanzado es solamente del 90.28% comparado con el 100% de crecimiento del control.

Por otro lado, la dosis más alta de HDPE intemperizado, solo alcanzó un 65.65% de crecimiento de *B. clausii* a las 24 horas de contacto. Nótese que todas las partículas utilizadas tenían tamaños estandarizados menores a 250 µm. Además, es notable una respuesta escalonada en la gráfica de la Figura 14, lo que permitió observar una relación dosis-efecto; A mayor cantidad de partículas de HDPE intemperizado *B. clausii* se ve más afectado en la cinética de crecimiento.

La dosis de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de HDPE intemperizado no tuvo diferencia significativa con la dosis de 800 $\mu\text{g/ml}$, aunque sí con las dosis de 200, 400 y 600 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 14).

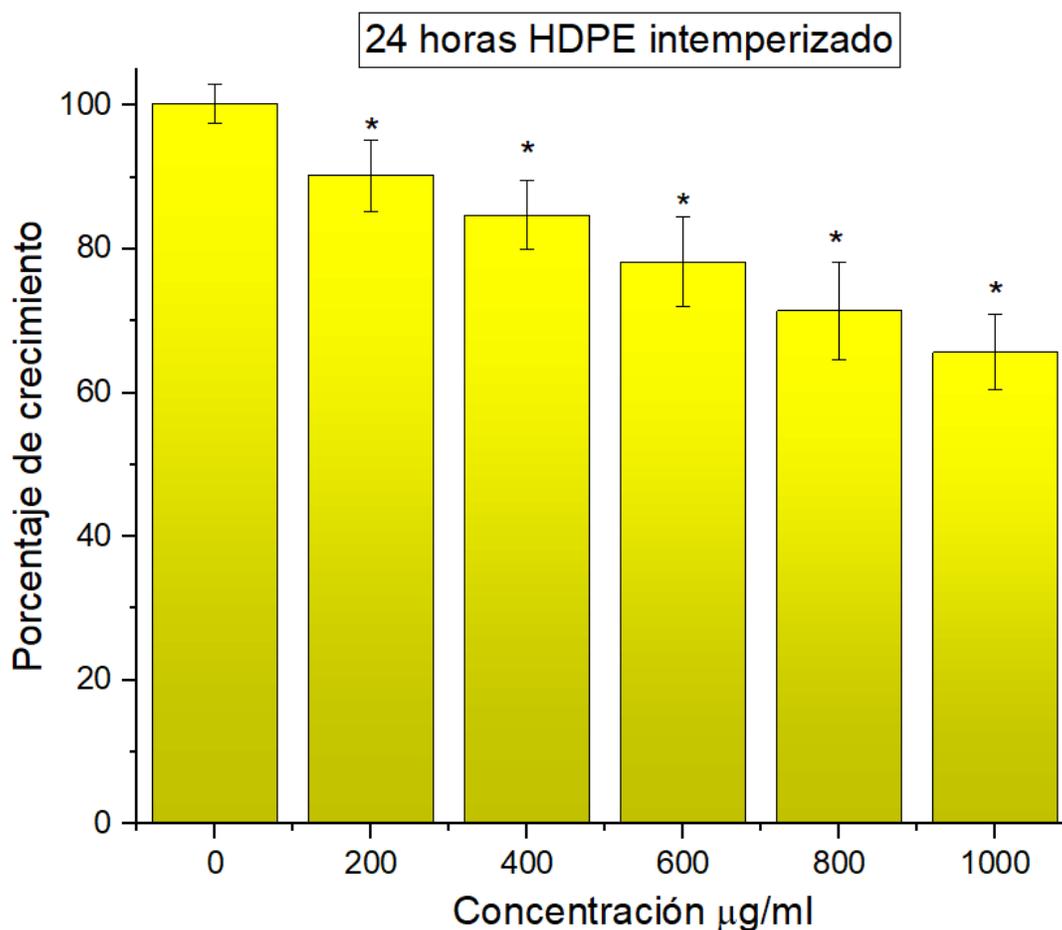


Figura 14. Porcentaje de crecimiento a las 24 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de HDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

A las 48 horas de incubación con el HDPE intemperizado se sigue observando una tendencia dosis-respuesta en la inhibición del crecimiento de *B. clausii*. En este caso se pudo observar que la concentración más baja (200 $\mu\text{g/ml}$) solo alcanzó el 71.4% de crecimiento comparado con el control, y siendo la muestra con más crecimiento después del control (Figura 15).

Se comenzó a observar una cierta estabilidad en el crecimiento de *B. clausii*, viéndose que todas las concentraciones son significativamente diferentes con el control. Sin embargo, entre las

concentraciones de 200-600 $\mu\text{g/ml}$ de HDPE intemperizado no hay diferencia significativa entre ellas, al igual que entre las concentraciones de 400 -1000 $\mu\text{g/ml}$. La concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ mostró solamente el 55.30% de crecimiento comparada con el control (Figura 15).

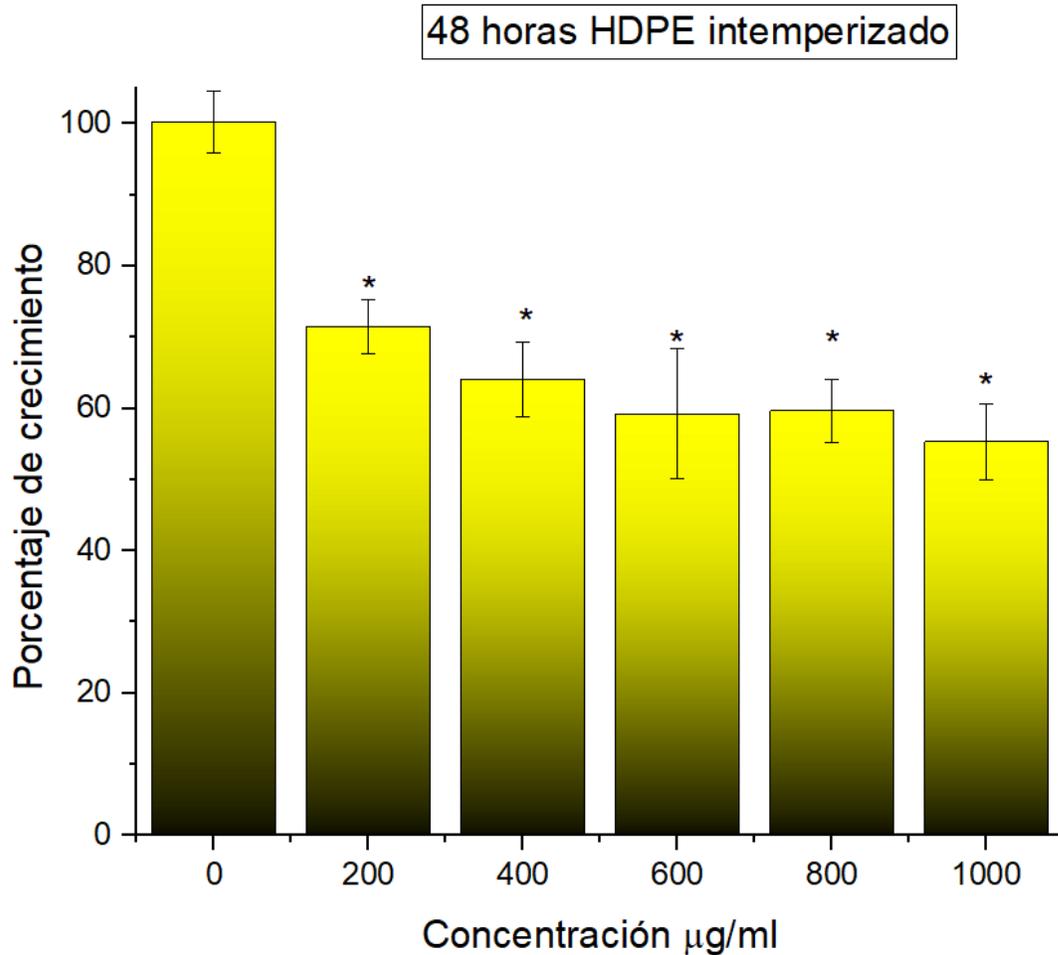


Figura 15. Porcentaje de crecimiento a las 48 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de HDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

Después de 72 horas de exposición a HDPE intemperizado el efecto inhibitorio es claro, desde la concentración más baja (200 $\mu\text{g/ml}$), se observó una disminución significativa en el porcentaje de crecimiento, con solamente el 66.28% de crecimiento en comparación al control y se mantuvo a través de las concentraciones más altas (Figura 16). Sin embargo, la respuesta de crecimiento escalonada observada a las 24 horas se perdió, y las concentraciones de 400 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ se estabilizaron sin tener una diferencia significativa entre ellas, donde el rango se mantuvo entre el 45 y el 49% de crecimiento respecto al control (Figura 16).

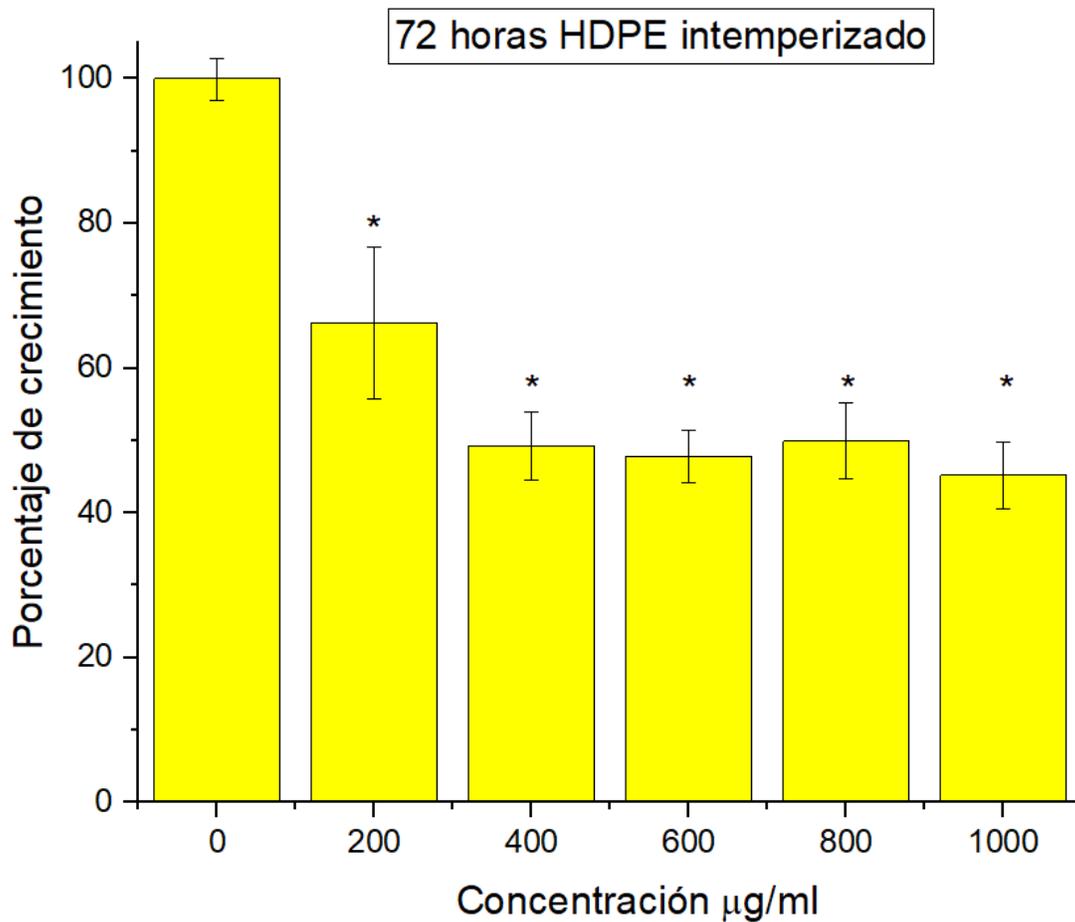


Figura 16. Porcentaje de crecimiento a las 72 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de HDPE intemperizado. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

4.4 MIXBEADS

Las partículas de 200 a 9900 nm de PE causaron un efecto tóxico sobre *B. clausii* a las 24 horas de incubación. Las concentraciones de 400, 600 y 800 µg/ml presentaron el menor crecimiento respecto a las demás concentraciones y al control, estando alrededor del 80%. Aunque todas las concentraciones presentaron una inhibición del crecimiento significativamente diferente respecto al control (Figura 17).

En este caso, la concentración más alta de 1000 µg/ml de MIXBEADS, a pesar de ser significativamente diferente al control, fue la que menos inhibición mostró con un 88.59% de crecimiento con respecto al control. En este caso, la tendencia dosis-efecto no se vio presente, puesto que, todas las concentraciones tuvieron un porcentaje de crecimiento similar, con un promedio

alrededor del 80% de crecimiento con respecto al control, e incluso se presentó una respuesta en forma de meseta (Figura 17).

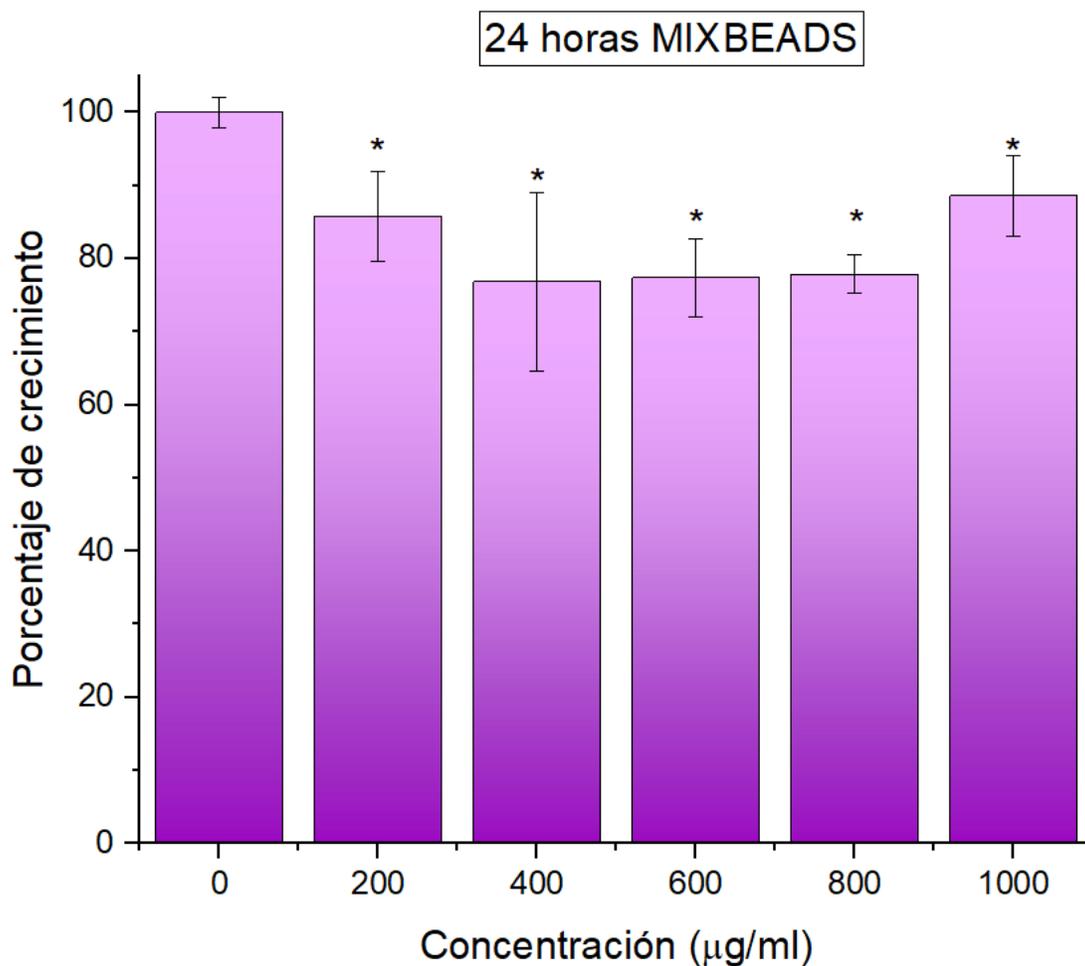


Figura 17. Porcentaje de crecimiento a las 24 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de MIXBEADS. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$

Los resultados observados a las 48 horas mantuvieron la tendencia del efecto inhibitorio observado anteriormente sobre el crecimiento celular de *B. clausii* al estar en exposición a MIXBEADS. La inhibición del crecimiento de *B. clausii* se mantuvo constante con todas las concentraciones de MIXBEADS y fue estadísticamente significativo en todos los tratamientos comparados con el grupo control, lo que indica que no existió una relación dosis-dependiente, pero sí una toxicidad de los MIXBEADS sobre el crecimiento de *B. clausii* con todas las concentraciones. Nuevamente se pudo

observar que las concentraciones no fueron significativamente diferentes entre sí, manteniéndose en un rango de 63-67% de crecimiento comparado con el control (Figura 18).

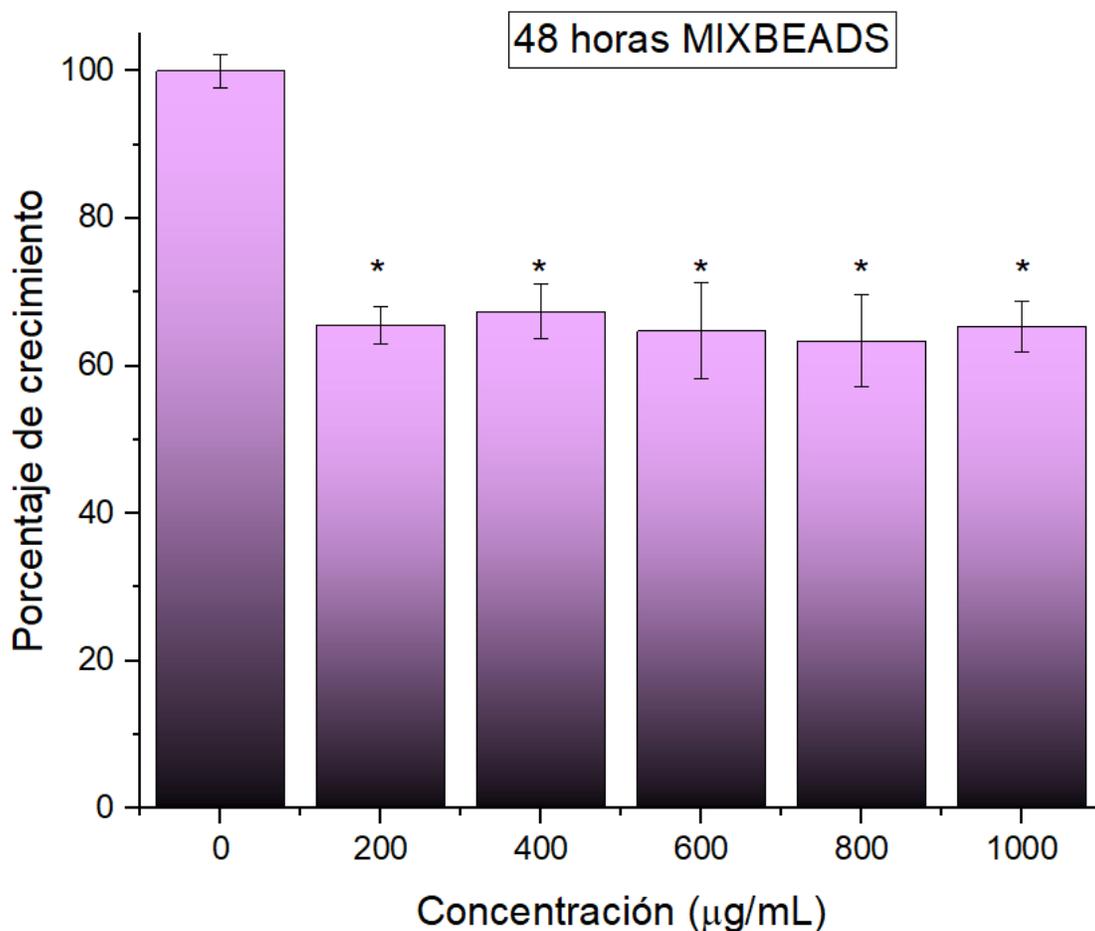


Figura 18. Porcentaje de crecimiento a las 48 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de MIXBEADS. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

El crecimiento de *B. clausii* a las 72 horas de incubación con todas las concentraciones de MIXBEADS mostró un porcentaje de inhibición similar entre ellas (Figura 19). Nótese que el cambio en el porcentaje de crecimiento entre las 48 y 72 horas (Figura 18 y Figura 19) no fue importante, e igualmente todas las concentraciones fueron diferentes significativamente con el control.

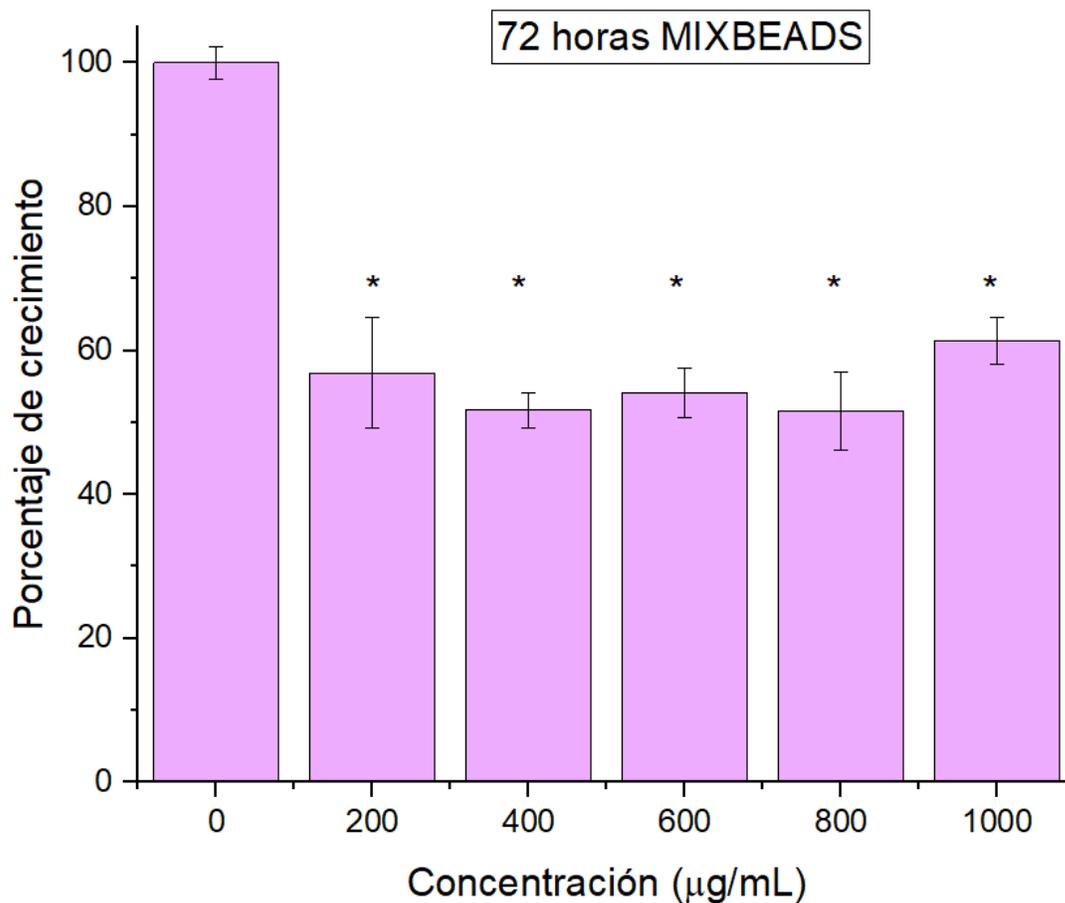


Figura 19. Porcentaje de crecimiento a las 72 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de MIXBEADS. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

4.5 MBPE

Todas las concentraciones de MBPE causaron una inhibición en el crecimiento de *B. clausii* con diferencia significativa respecto al control a las 24 horas de incubación. Sin embargo, todos los tratamientos se comportaron de manera similar entre ellos. La concentración más alta llegó solamente a un porcentaje de crecimiento del 88% con respecto al control (Figura 20).

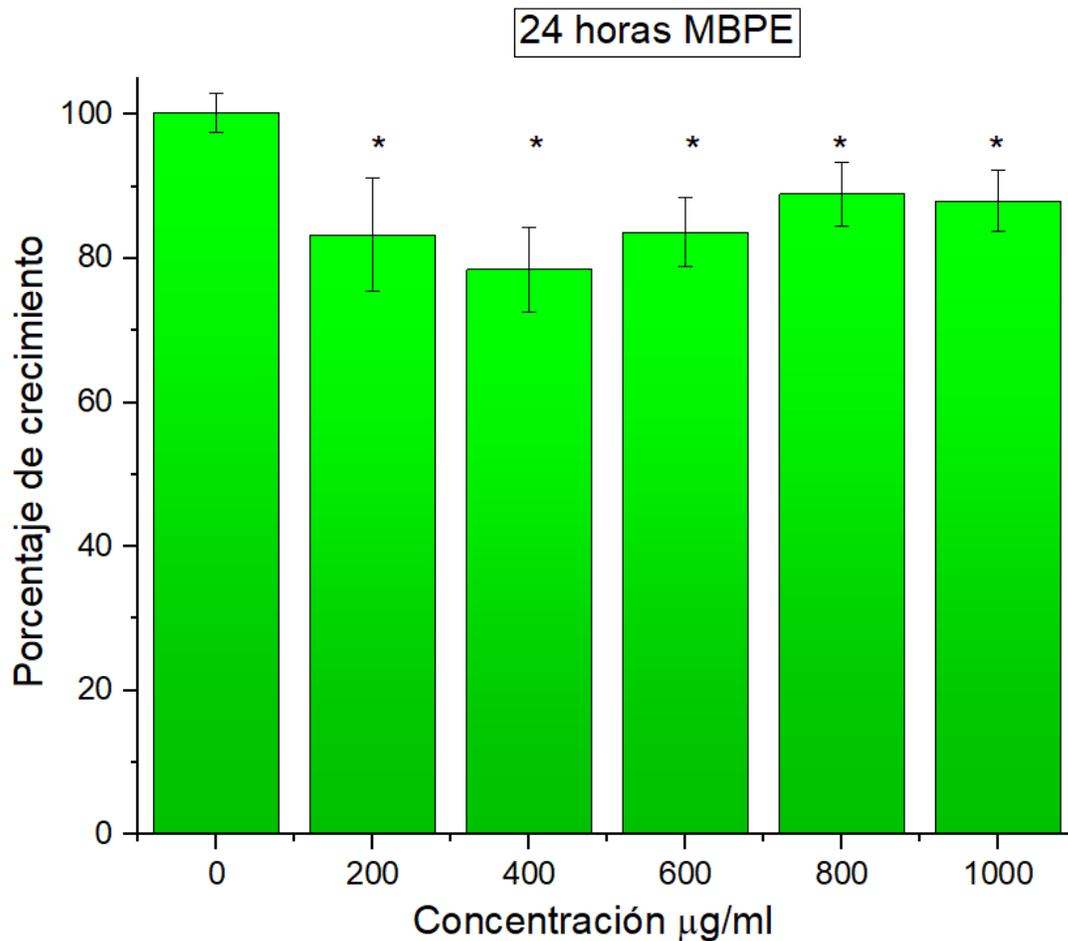


Figura 20. Porcentaje de crecimiento a las 24 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de MBPE. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

A las 48 horas de contacto con las partículas de MBPE se pudo observar una disminución drástica en el crecimiento de *B. clausii*, en donde la concentración más alta de MBPE fue la más tóxica. A este tiempo de incubación comenzó a observarse la tendencia a la estabilización en el crecimiento de *B. clausii* a todas las concentraciones de MBPE estudiadas, todos los tratamientos nuevamente mostraron diferencia significativa con respecto al control. Estando todos en un rango entre 45 y 58% de crecimiento en comparación al control (Figura 21).

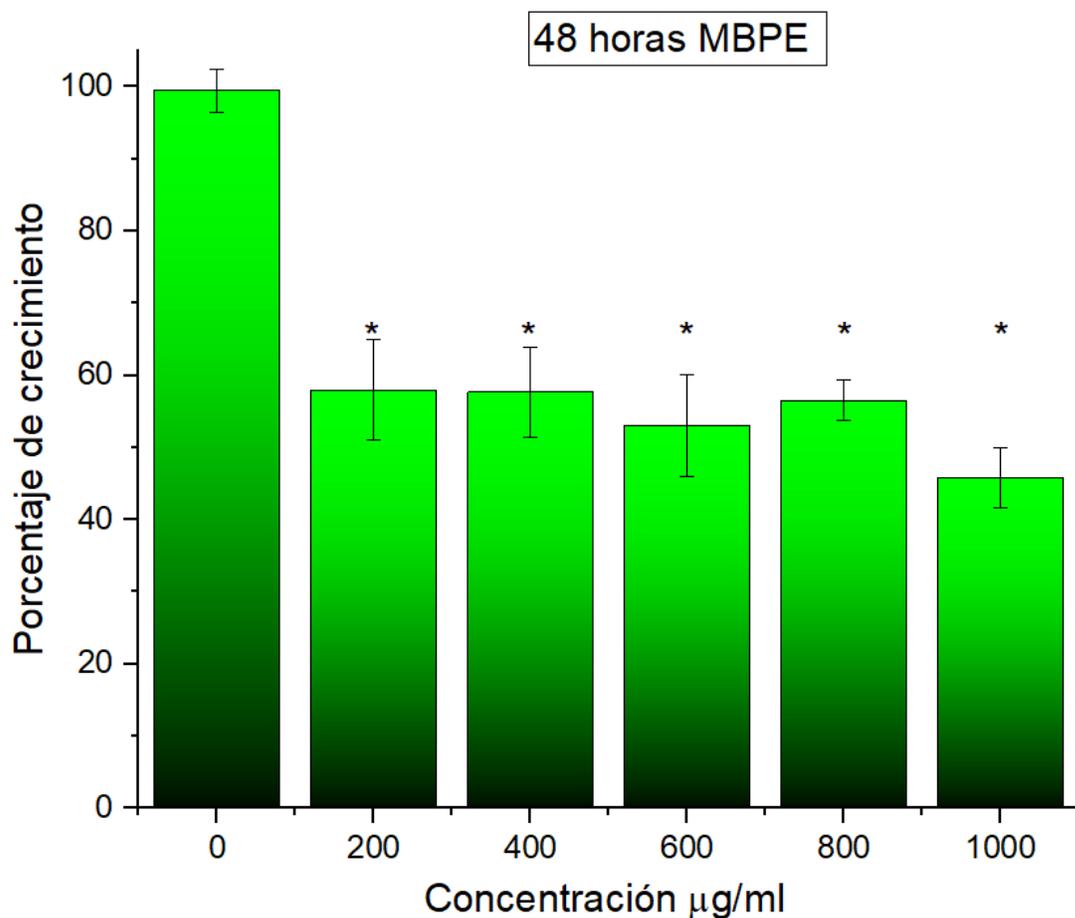


Figura 21. Porcentaje de crecimiento a las 48 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de MBPE. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

Finalmente, a las 72 horas el efecto inhibitor de crecimiento de *B. clausii* fue aún más notorio, donde incluso la concentración más baja estuvo por debajo del 50% de crecimiento comparado con el control (Figura 22).

Nuevamente, se pudo observar la estabilización del porcentaje de crecimiento en todas las concentraciones de MBPE empleadas, variando de un 39% con la concentración más alta (1000 µg/ml) a sólo un 48% con la concentración más baja (200 µg/ml). Se pudo observar que la tendencia de respuesta a las 72 horas mostró nuevamente una estabilización. Estos resultados demuestran que las partículas de MBPE tienen un efecto tóxico sobre el crecimiento de *B. clausii*, importante desde las 24 horas, siendo que a las 72 horas, todas las dosis habían inhibido más del 50% de crecimiento de la cepa.

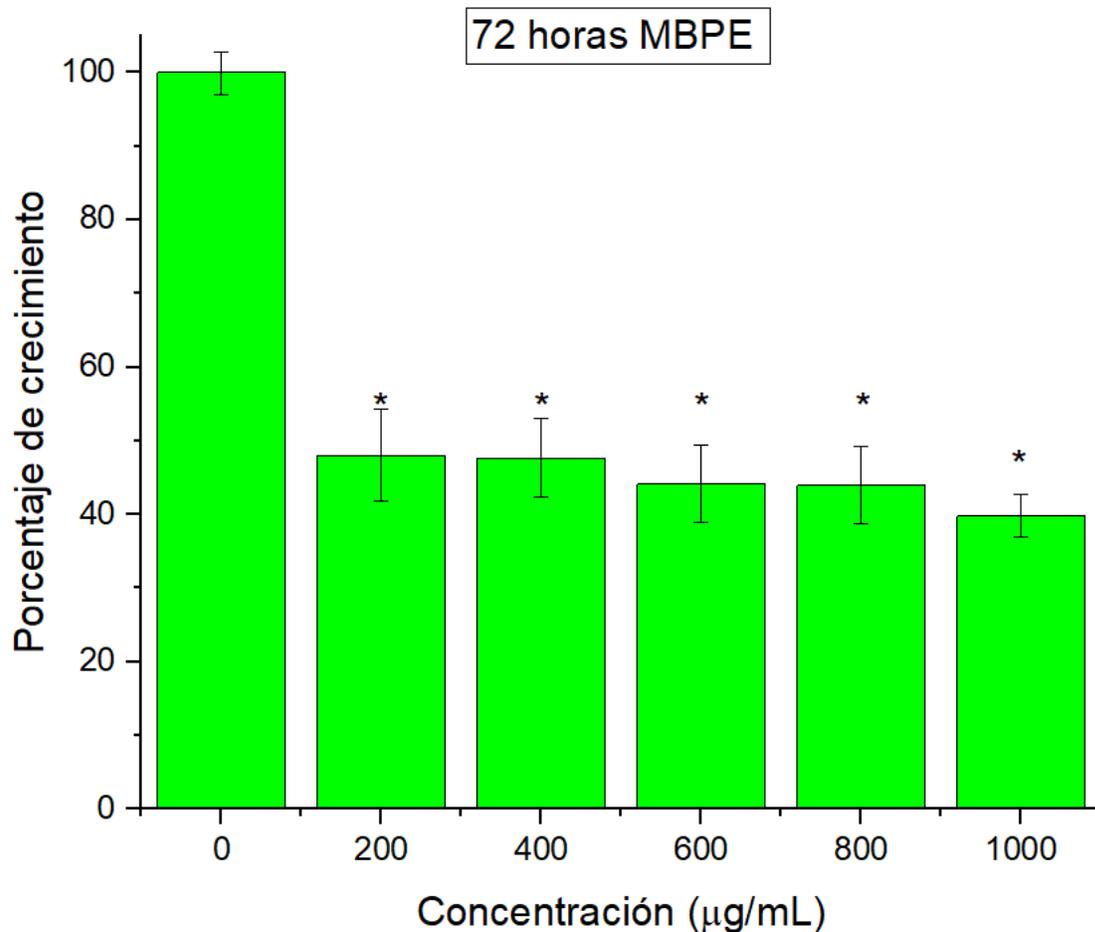


Figura 22. Porcentaje de crecimiento a las 72 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de MBPE. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

4.6 LDPE nuevo

El crecimiento de *B. clausii* también se vio afectado al estar en contacto con partículas de LDPE nuevo. Puede notarse que se presentó inhibición en el crecimiento en todos los tratamientos, aun cuando fue menor al presentado con los plásticos anteriores, ya que solo se observó una diferencia significativa entre el control y la concentración de 800 µg/ml con un 88.4% de crecimiento respecto al control. Las demás concentraciones mostraron un crecimiento entre 99.43% y 93.73% con respecto al control. Aun cuando el crecimiento bacteriano se vio alterado, se puede observar que LDPE nuevo no afectó significativamente a *B. clausii* después de 24 horas de incubación (Figura23).

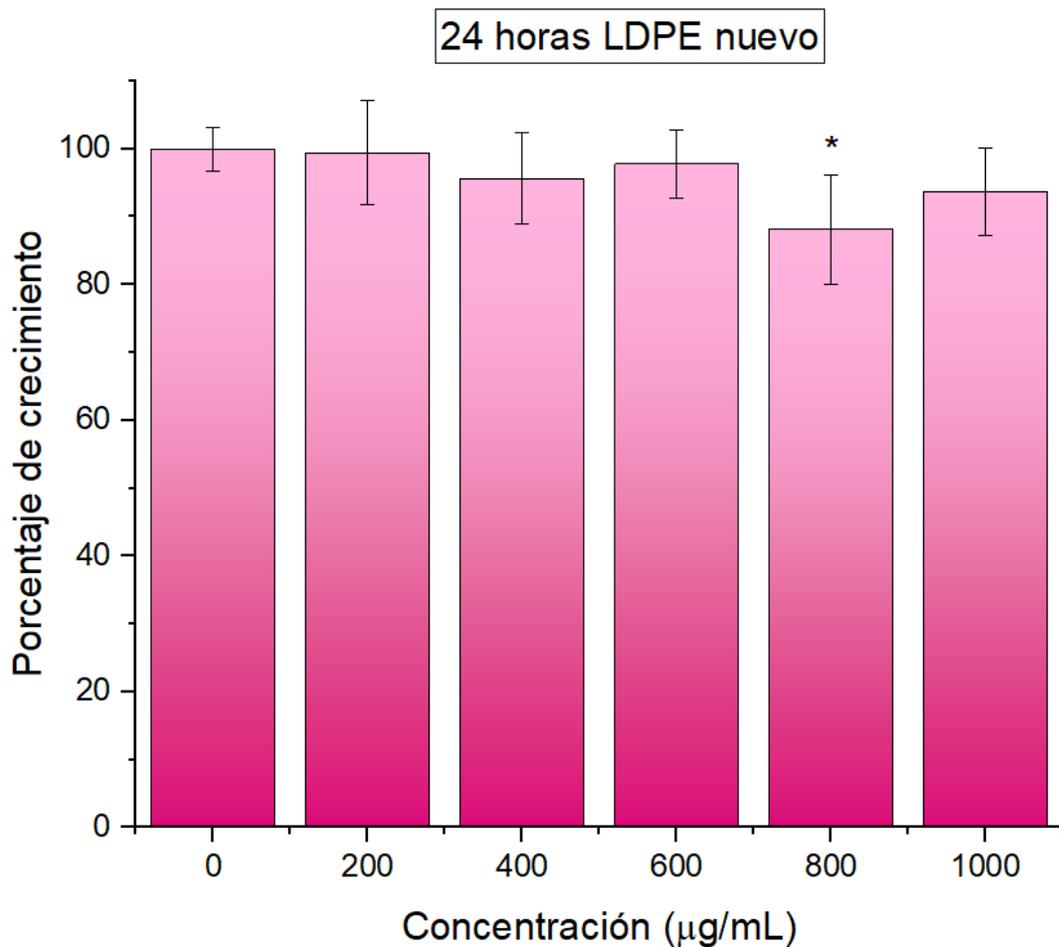


Figura 23. Porcentaje de crecimiento a las 24 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de LDPE nuevo. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

Los resultados observados a las 48 horas indican que las partículas de LDPE nuevo tuvieron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento celular de *B. clausii* pero solo a partir de una concentración de 600 µg/ml. Las concentraciones de 600, 800 y 1000 µg/ml presentaron reducciones en el porcentaje de crecimiento estadísticamente significativas en comparación con el grupo control.

Aunque hay una tendencia general a la disminución del crecimiento celular con el aumento de la concentración del compuesto, la inhibición no parece incrementarse de manera proporcional con concentraciones superiores a 600 µg/ml. Esto sugiere que el efecto tóxico alcanza una meseta a

concentraciones más altas, indicando que la máxima inhibición se logró a partir de 600 µg/ml de LDPE nuevo (Figura 24).

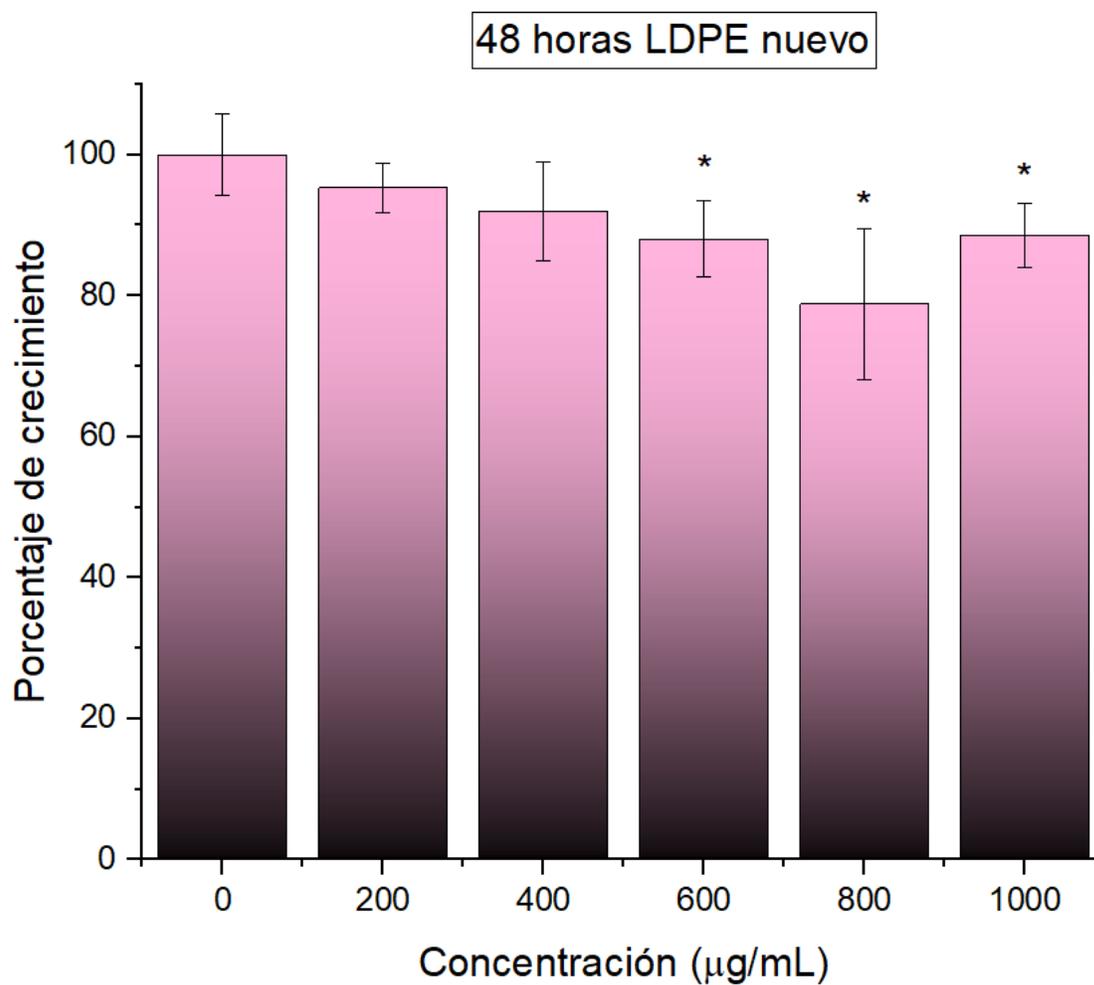


Figura 24. Porcentaje de crecimiento a las 48 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de LDPE nuevo. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

A las 72 horas se empezó a notar una inhibición de crecimiento bacteriano a consecuencia de la exposición al LDPE nuevo (Figura 25) en donde la concentración más alta alcanzó un porcentaje de crecimiento del 78.6% con respecto al control.

En este caso todas las concentraciones tuvieron una inhibición con diferencia significativa respecto al control, y nuevamente se pudo observar una tendencia a la estabilización del porcentaje del crecimiento bacteriano, ya que las concentraciones de LPDE nuevo no presentaron inhibición sobre el crecimiento de *B. clausii* significativamente diferente entre ellas.

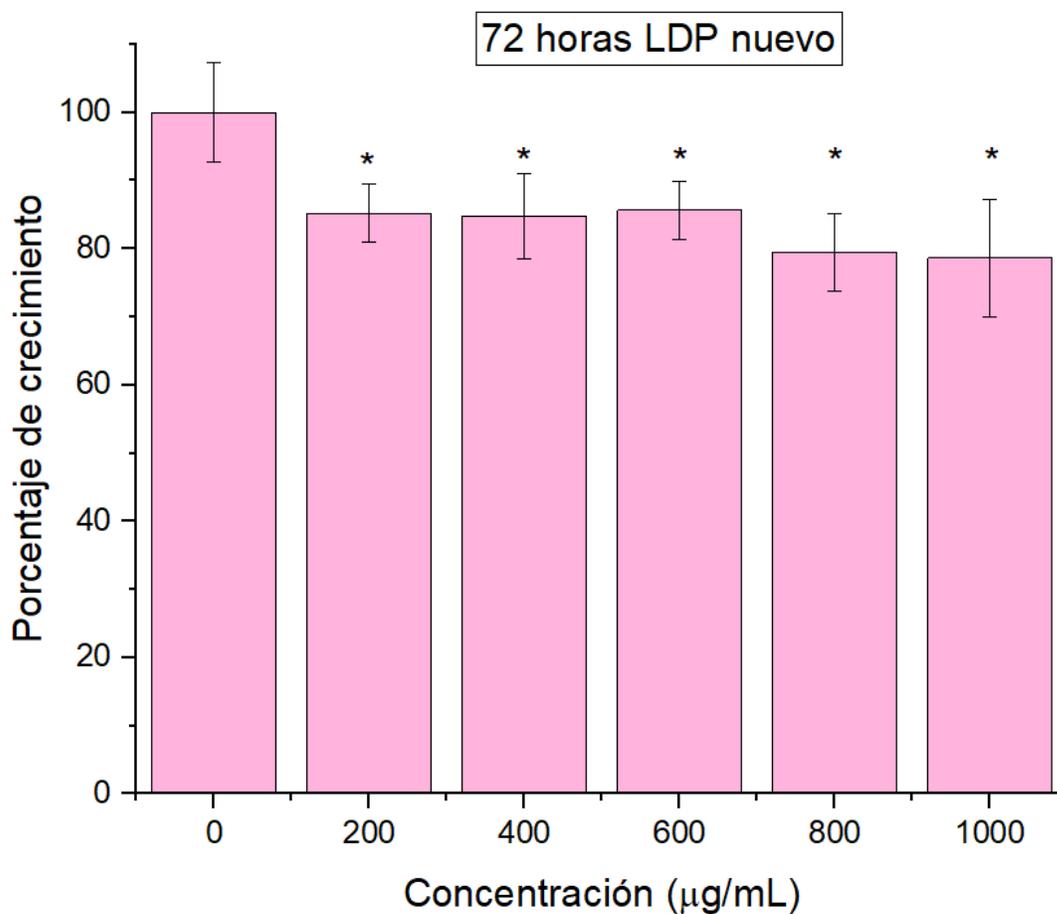


Figura 25. Porcentaje de crecimiento a las 72 horas de *B. clausii* en contacto con diferentes concentraciones de LDPE nuevo. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

4.7 Viabilidad celular

De manera complementaria se evaluaron las UFC resultantes de la interacción de *B. clausii* con los diferentes plásticos de PE a las 24 horas con las concentraciones de 200 y 1000 µg/ml (Figura 29).

A una concentración de 200 µg/ml, tanto el LDPE intemperizado como el HDPE intemperizado redujeron significativamente el número de colonias bacterianas. El MBPE a la misma concentración también redujo el crecimiento bacteriano, aunque menos que los dos plásticos intemperizados.

Las partículas más pequeñas (MIXBEADS) a 200 µg/ml fueron particularmente tóxicas, mostrando una clara reducción en el porcentaje de viabilidad *B. clausii* logrando solamente el 40% comparado con el control. El LDPE nuevo a 200 µg/ml no inhibió el crecimiento bacteriano de manera significativa como su contraparte intemperizada.

A una concentración de 1000 µg/ml, todos los plásticos mostraron una inhibición significativa del crecimiento bacteriano. El LDPE y HDPE intemperizados, así como el MBPE, redujeron el número de colonias, y las partículas de menor tamaño (MIXBEADS) demostraron una inhibición casi completa del crecimiento bacteriano (Figura 26).

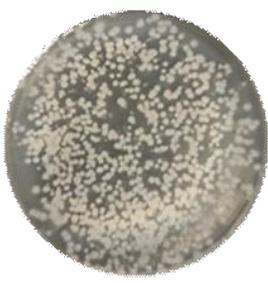
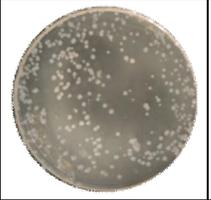
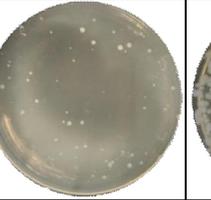
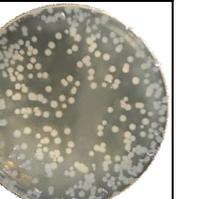
Control	200 µg/ml				
	LDPE intemperizado	HDPE intemperizado	MBPE	MIXBEADS	LDPE nuevo
					
	1000 µg/ml				
	LDPE intemperizado	HDPE intemperizado	MBPE	MIXBEADS	LDPE nuevo
					

Figura 26 . UFC de *B. clausii* después de 24 horas de interacción con diferentes plásticos de PE a concentraciones de 200 y 1000 µg/ml.

El tipo de PE que más afectó la viabilidad de *B. clausii* en la concentración de 200 µg/ml fueron los plásticos MIXBEADS con un tamaño de 200 a 9900 nm donde el porcentaje de viabilidad sólo alcanzó un 41.04% con respecto al control (Figura 27).

Cuatro de cinco plásticos tuvieron un efecto inhibitor de la viabilidad celular en *B. clausii* significativamente diferente en relación con el control. LDPE nuevo no presentó inhibición significativa sobre la viabilidad de *B. clausii* con respecto al control.

Nótese que el HDPE intemperizado tuvo un efecto similar al de las partículas MIXBEADS que incluyen a las más pequeños de todos los plásticos.

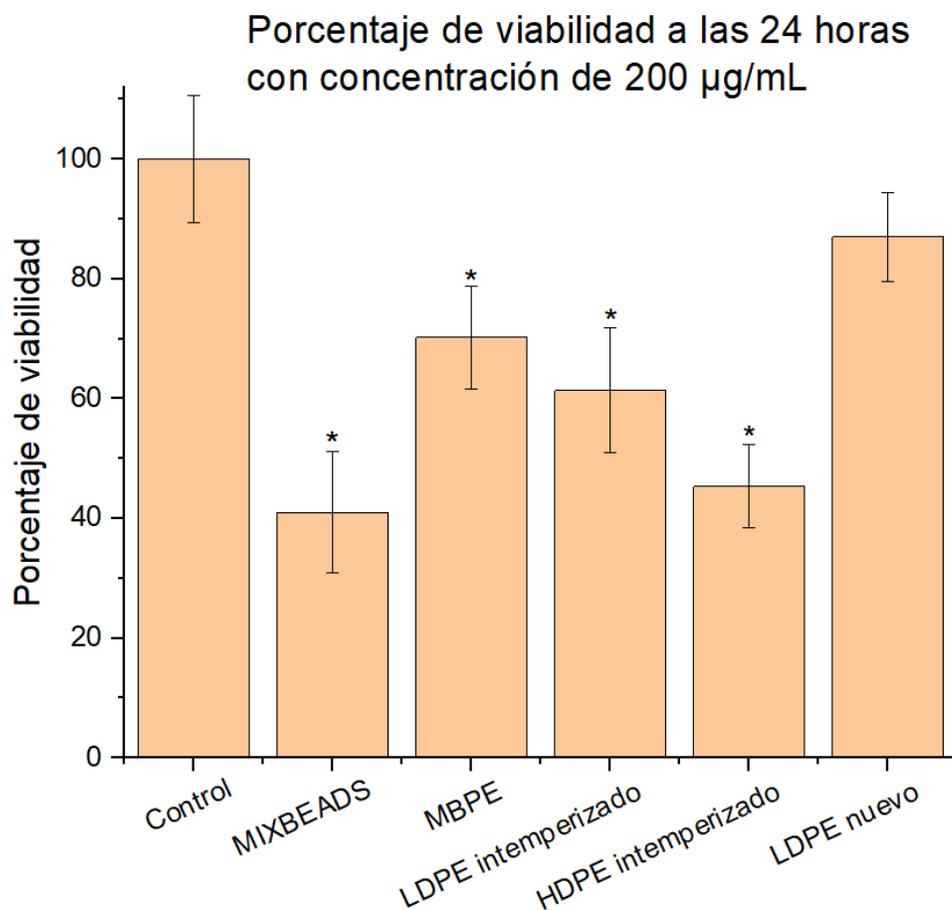


Figura 27. Comparación del porcentaje de viabilidad bacteriana al estar en contacto por 24 horas con una concentración de 200 µg/ml de diferentes tipos de plástico. *diferencia significativa con el control con $p < 0.001$

Al igual que en la concentración de 200 µg/ml, en la Figura 31 se puede observar que con la mayor concentración (1000 µg/ml) y después de 24 horas de interacción, el plástico más tóxico para *B. clausii* fue MIXBEADS, seguido de LDPE y HDPE intemperizados. En esta ocasión, todos los plásticos presentaron una inhibición de la viabilidad celular con diferencia significativa respecto al control. Aunque LDPE nuevo fue el que presentó menor efecto de toxicidad sobre *B. clausii*, a esta concentración ya muestra una diferencia significativa con el control.

Nuevamente se pudo observar que los plásticos intemperizados presentaron un efecto de inhibición (LDPE intemperizado = 51.48% y HDPE intemperizado = 55.03%) sobre la viabilidad de *B. clausii* similar a aquellas partículas que son más pequeñas y no presentaron diferencia significativa con ellas (MIXBEADS = 44.26%).

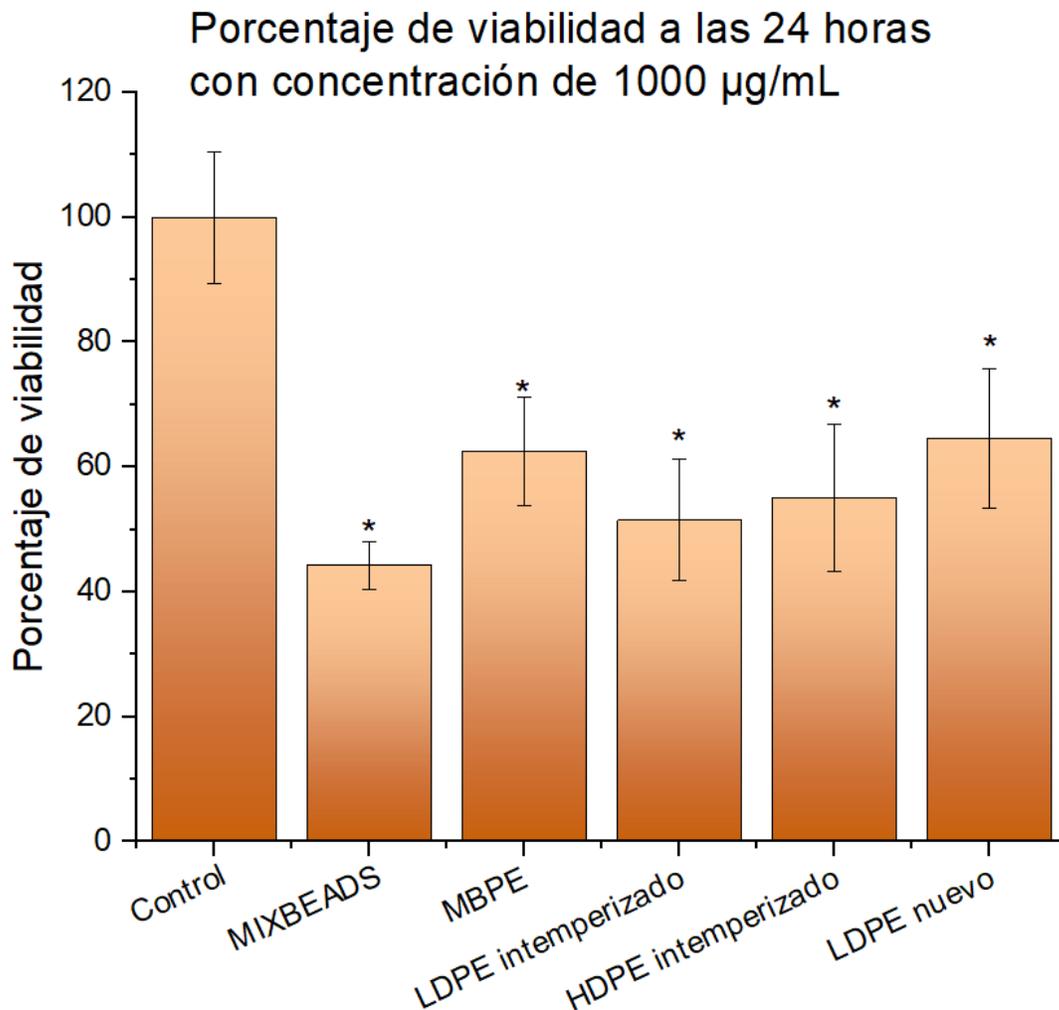


Figura 28. Comparación del porcentaje de viabilidad bacteriana al estar en contacto por 24 horas con una concentración de 1000 µg/ml de diferentes tipos de plástico. * diferencia significativa con el control con $p < 0.001$.

4.8 Efectos morfológicos de diferentes plásticos de PE sobre *B. clausii*

En las micrografías de los cultivos de *B. clausii* en contacto con los diferentes tipos de PE se observó la interacción plástico – bacteria (Figura 32). En el grupo control (Figura 32 A), la morfología de *B. clausii* a las 24 horas crecido en medio de cultivo agar BHI, se visualizó con la tinción de Gram y se observó un crecimiento denso al no tener interacción con partículas de plástico. En contraste, las micrografías de *B. clausii* con exposición a LDPE intemperizado (Figura 32 B) reveló una notable agrupación bacteriana sobre de una gran partícula plástica, sugiriendo una potencial adhesión a su superficie y la capacidad de formar biofilms. Al igual que para el HDPE intemperizado (Figura 32 C), las imágenes mostraron bacterias agrupadas alrededor de la partícula de plástico, posiblemente colonizando la superficie de las partículas.

En el caso del MBPE se observó una menor densidad de bacterias, en donde las partículas plásticas no fueron fácilmente visibles en microscopía óptica, pero sí con fluorescencia, como ejemplo se puede observar en la Figura 32 D, una partícula de MBPE de 16.23 μm y sobre ella un par de *B. clausii* “enroscadas” teniendo una menor interacción en comparación con las observadas con LDPE y HDPE intemperizados, con una densidad bacteriana disminuida respecto al control. De igual manera, se muestra que MIXBEADS presentaron una interacción significativa entre las bacterias y las partículas plásticas (Figura 32 E), con varias bacterias morfológicamente afectadas por la presencia de este tipo de PE. Algunas células bacterianas se mostraron más gruesas y cortas que el control y que el resto de las bacterias como se puede observar en la Figura 32.

Finalmente, en el caso del LDPE nuevo (Figura 32 F), aunque se observó cierta adhesión y agrupamiento de bacterias alrededor de la partícula de plástico (marcada con la flecha roja), *B. clausii* creció de manera densa y con una morfología muy parecida al control.

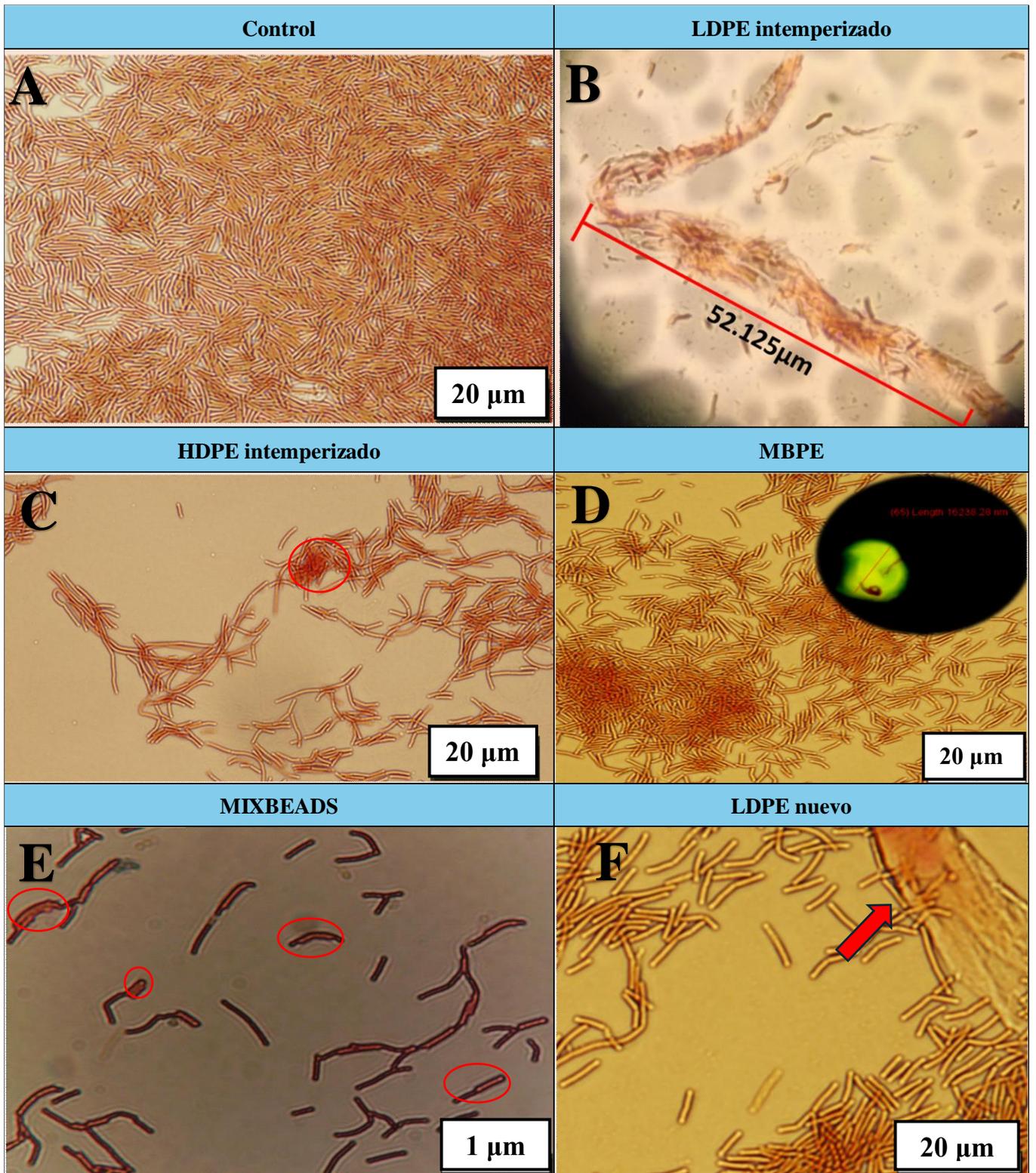


Figura 29. Micrografías de *B. clausii* en presencia de diferentes tipos de PE a las 24 horas de contacto.

4.9 Comparación del efecto inhibitorio sobre *B. clausii* con diferentes plásticos de PE

Los resultados obtenidos muestran una variación notable en el efecto de diferentes tipos de plásticos de PE sobre el crecimiento de *B. clausii* a lo largo del tiempo, así como en función de la concentración utilizada (Figura 30). Se destaca que las partículas de LDPE nuevo tuvieron el menor impacto en la cinética de crecimiento en todas las concentraciones, en contraste con el HDPE intemperizado, que exhibió un efecto dosis-dependiente y se posicionó como el plástico más tóxico para el crecimiento de *B. clausii* a las 24 horas. Sin embargo, a una concentración de 200 µg/ml, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de crecimiento ni en la viabilidad entre las partículas de HDPE intemperizado, MIXBEADS y LDPE intemperizado (Figura 27).

El MBPE, a una concentración de 200 µg/ml, mostró una viabilidad similar a las partículas de MIXBEADS, lo cual concuerda con los resultados de porcentaje de crecimiento. A lo largo del tiempo, especialmente a las 48 y 72 horas, se observó que MIXBEADS, HDPE intemperizado y MBPE presentaron comportamientos muy similares, diferenciándose significativamente solo a la dosis de 1000 µg/ml. A esta concentración, el LDPE intemperizado mostró un comportamiento comparable al de MIXBEADS y MBPE.

Al comparar los plásticos intemperizados, se evidenció que el HDPE intemperizado tuvo un efecto tóxico claro sobre el crecimiento bacteriano desde las 24 horas, mientras que para el LDPE intemperizado la toxicidad fue visible a partir de las 48 horas. No obstante, en las pruebas de viabilidad, se observó que a las dosis de 200 y 1000 µg/ml, el LDPE intemperizado tenía efectos significativamente diferentes de acuerdo a la estadística en comparación con el control. Por otro lado, los plásticos MIXBEADS y MBPE mostraron un efecto meseta, donde las dosis medias inhibieron el crecimiento bacteriano en mayor medida, sin diferencias significativas entre ellos.

En cuanto a las interacciones entre los plásticos y las bacterias, se observó que las bacterias tendían a acercarse a los plásticos en las primeras 24 horas de contacto, lo cual afectó negativamente la viabilidad y el crecimiento de *B. clausii* en las siguientes 48 y 72 horas. A las 48 horas, el efecto inhibitorio de las partículas de plástico se acentuó en todas las muestras y concentraciones, mostrando una tendencia hacia la estabilización del porcentaje de crecimiento. Comparando con resultados previos, el MBPE se destacó como el plástico más tóxico, presentando el menor porcentaje de crecimiento en todas las concentraciones, especialmente a 1000 µg/ml.

Al igual que con HDPE, los plásticos MIXBEADS presentaron efectos tóxicos desde las 24 horas que persistieron y se intensificaron a las 48 y 72 horas.

El plástico más tóxico en todas las mediciones fue el MBPE, que mostró un efecto pronunciado a las 48 horas, pasando de un promedio de porcentaje del 80% a tan sólo el 55% y se mantuvo constante a las 72 horas, con reducciones significativas en el porcentaje de crecimiento en todas las concentraciones llegando a estar por debajo del 50%. Por el contrario, el LDPE nuevo fue el menos tóxico, exhibiendo el mayor porcentaje de crecimiento en comparación con los demás plásticos.

En general, todos los tipos de plástico tendieron a estabilizar la inhibición del crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo en todas las concentraciones evaluadas.

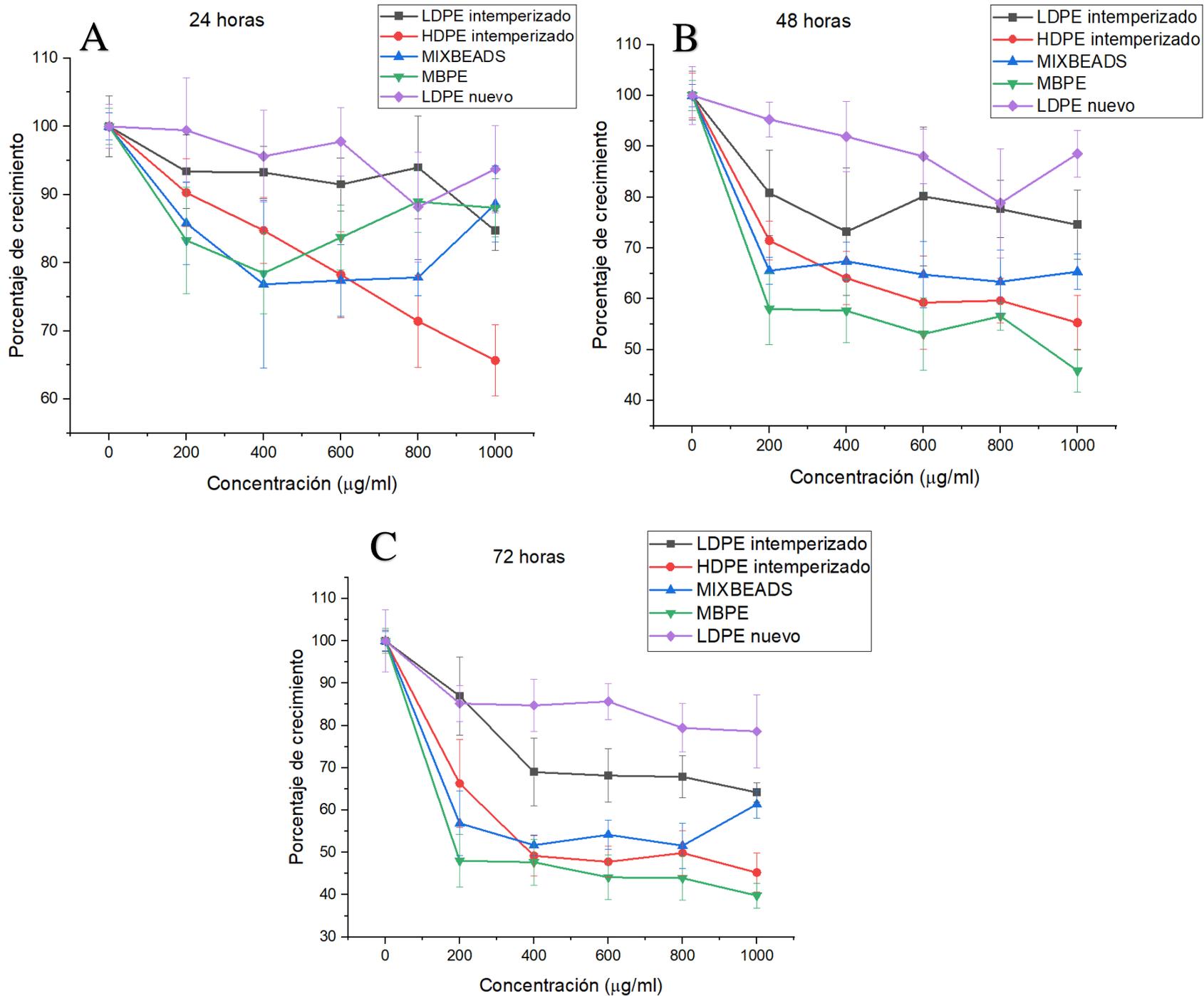


Figura 30. Comparación del porcentaje de crecimiento obtenido por D.O. entre los 5 tipos de PE a las 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas de interacción.

4.10 Efecto de *B. clausii* sobre diferentes plásticos de PE

4.10.1 Caracterización de los plásticos de PE por técnica de RAMAN

Se obtuvieron los espectros Raman de todos los tipos de PE, antes y después de estar en contacto durante 72 horas con *B. clausii*. Los picos notorios en estos espectros corresponden a vibraciones moleculares específicas dentro de las cadenas poliméricas del material. Por ejemplo, la región de 2800-3000 cm^{-1} está dominada por las bandas de estiramiento C-H, que son características de los grupos metilo y metileno presentes en los polímeros como el PE.

La región de 1000-1500 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de deformación C-H y a las vibraciones de esqueleto del carbono-carbono (C-C) en las cadenas poliméricas, mientras que la región de 500-1000 cm^{-1} se asocia con movimientos más complejos del esqueleto del polímero, incluyendo vibraciones de torsión y flexión (Figura 33).

En el LDPE intemperizado después de interactuar con *B. clausii* se observó una disminución significativa en la intensidad de los picos del espectro con respecto a la obtenida antes de la interacción (2800 cm^{-1} y el rango de 1000 – 1500 cm^{-1}). Además, se pudo observar un desplazamiento en los picos pasando de los 2700 a los 2400 cm^{-1} y la aparición de una nueva curva en el espectro entre el rango de 1600 a 2600 cm^{-1} (Figura 33 A).

De manera similar, el HDPE intemperizado mostró una reducción en la intensidad de sus picos característicos (2800 cm^{-1} y el rango de 1000 – 1500 cm^{-1}) después de la interacción con *B. clausii*. Además, se pudo observar que en el rango de 2800 a 3000 cm^{-1} pertenecientes a las bandas de estiramiento, se redujeron significativamente los picos, pasando de una intensidad de 1934.90 a 738.20 u.a., más no se perdieron por completo (Figura 33 B).

En el caso de MBPE, la reducción en la intensidad fue aún más pronunciada, es importante considerar que este tipo de plástico tiene adicionado un tinte verde fluorescente, por lo cual el espectro de RAMAN previo al contacto se notó diferente al resto de los plásticos de PE (Figura 33). Nótese que nuevamente el pico de 2800 a 3000 cm^{-1} se observó en el espectro original y se perdió en el espectro después de las 72 horas de interacción con *B. clausii* (Figura 33 C).

MIXBEADS presentó una disminución en la intensidad de los picos característicos del PE ya mencionados, después del contacto con la bacteria, en el punto de 2500 cm^{-1} se observó solamente una disminución de intensidad de 690.29 a 557.50 u.a. a las 72 horas (Figura 33 D).

Por último, el LDPE nuevo (Figura 33 E) también mostró una notable reducción en la intensidad de sus picos pasando del punto más alto en 2800 cm^{-1} de 3897.89 a 590.90 u.a. Es notable que el material sufrió una disminución y aplanamiento en todos los picos excepto en la región cercana a 0 cm^{-1} donde se pudo observar un pequeño pico presente de manera más ancha relacionado a la cristalinidad del material. De entre los 5 tipos de PE el LDPE nuevo es el que presentó un mayor cambio donde el rango de $1000 - 1500\text{ cm}^{-1}$ paso de un punto más alto de intensidad de 932.59 a 565.90 u.a. en los espectros de Raman entre las 0 y 72 horas.

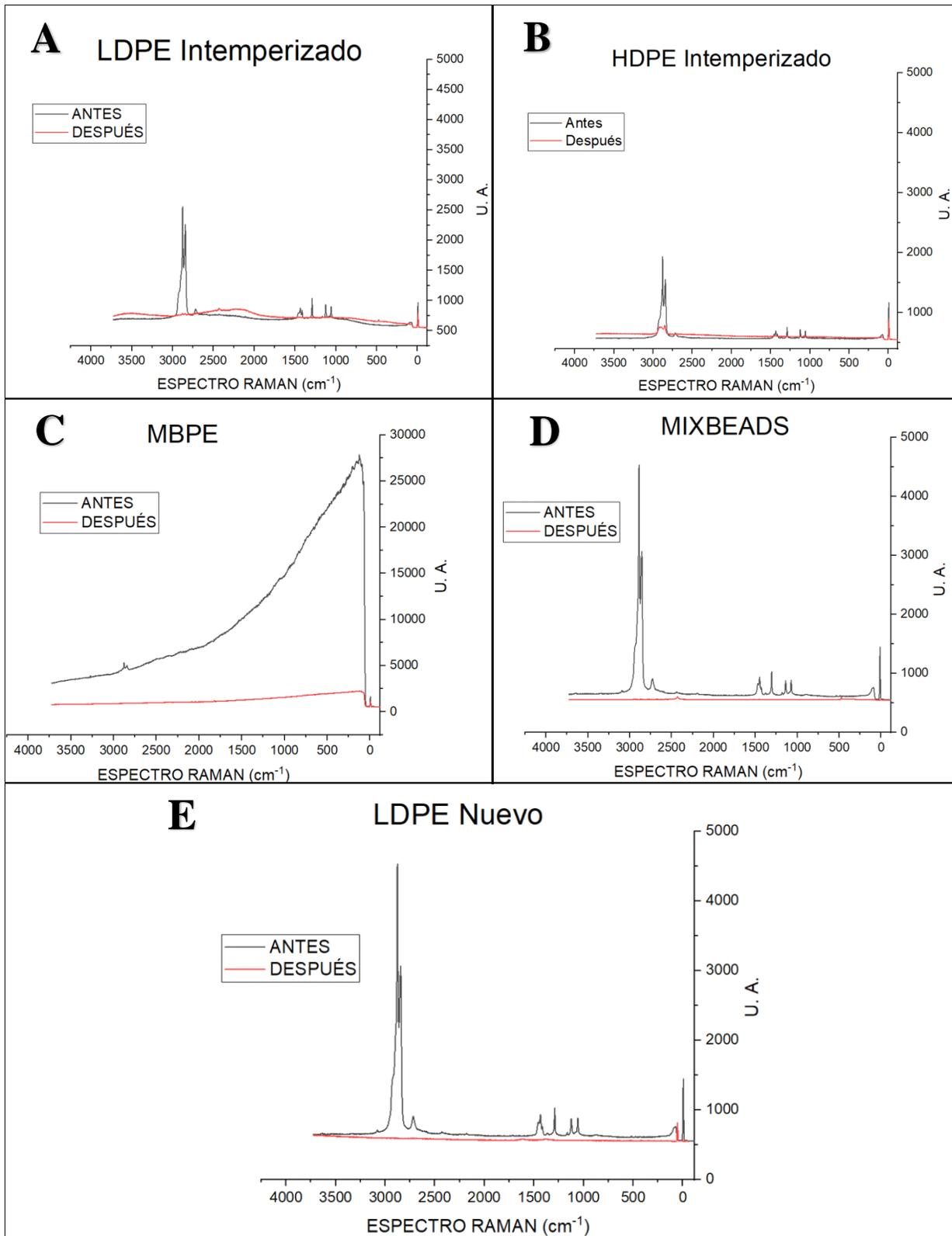


Figura 31. Cambio en el espectro de RAMAN en los diferentes tipos de PE antes y después de estar 72 horas en contacto con *B. clausii*.

4.10.2 Caracterización de los plásticos de PE por SEM

Se obtuvieron imágenes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie de LDPE nuevo a una escala de 10 μm en diferentes intervalos de tiempo (0 h, 24 h, 48 h y 72 h) después de estar en contacto con *B. clausii* (Figura 34).

A las 0 horas, la superficie del LDPE se observó lisa y sin alteraciones visibles, lo que indica que el plástico estaba inicialmente intacto, mostrando únicamente las marcas inherentes al propio material.

Tras 24 horas de exposición, comenzaron a aparecer pequeños cambios en la superficie, marcados en un círculo rojo en la Figura 32. A las 48 horas, las alteraciones se volvieron más pronunciadas, con la aparición de surcos y grietas más profundos, observados a una escala de 10 μm . Finalmente, a las 72 horas, las alteraciones en la superficie del LDPE fueron aún más marcadas, se observaron surcos visibles y posibles áreas de degradación más extensas.

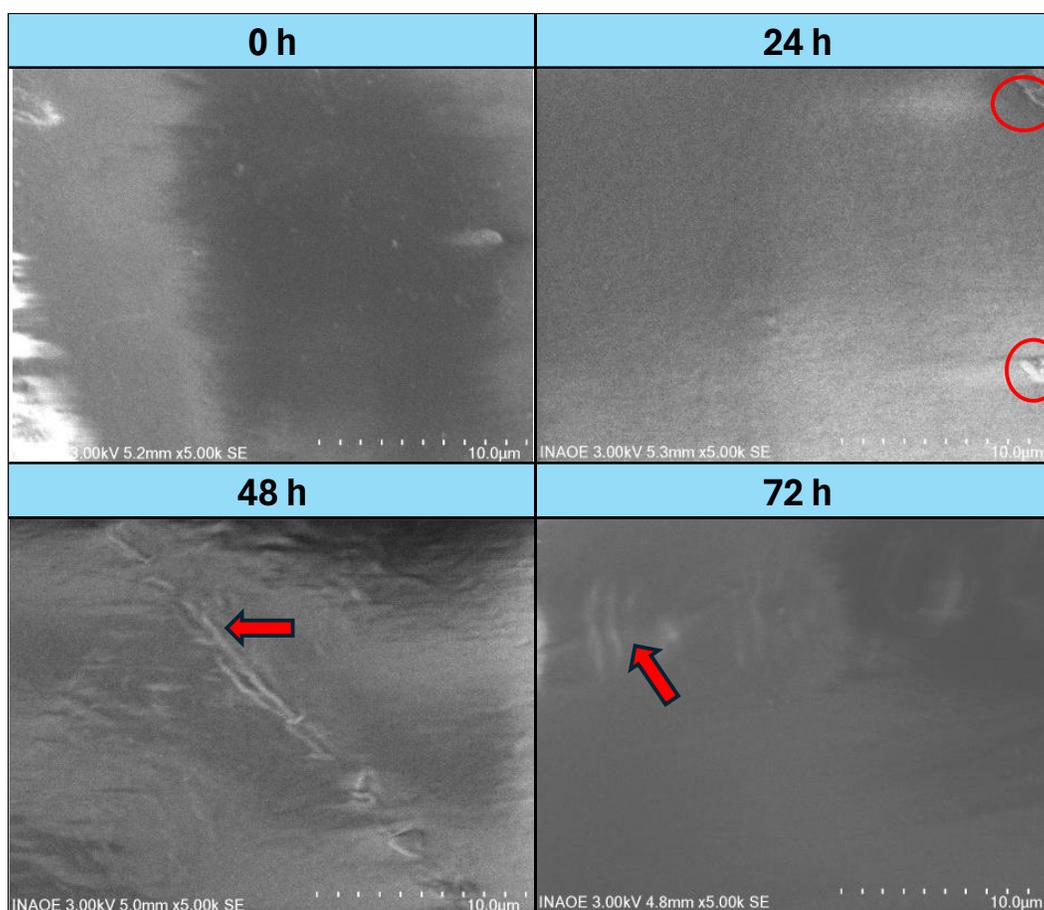


Figura 32. Imágenes obtenidas por SEM de los fragmentos de LDPE nuevo a las 0, 24, 48 y 72 horas de contacto con *B. clausii* a una escala de 10 μm .

Capítulo 5

5.1 Discusión

Múltiples estudios han demostrado que diferentes tipos de MPs derivados de PS, PP, PE y PVC, son capaces de generar disbiosis en la microbiota humana [62]. Sin embargo, no hay un estudio previo donde se aborden los efectos de diferentes tipos de PE específicamente en *B. clausii*, bacteria reconocida de la microbiota capaz de regular la homeostasis y vital para la salud intestinal humana [63].

En el presente trabajo se presenta por primera vez el efecto de diferentes plásticos a base de PE y en un tiempo de exposición relativamente grande (hasta 72 horas) sobre una cepa de *B. clausii*. Si bien las investigaciones reportadas con ratones tienen un tiempo de exposición prolongado (hasta por 5 semanas) [23], los estudios de “single cell” se centran en tiempos cortos, de 24 a 36 horas máximo [42], [43]. Athulaya et al. [41] y Chen et al [64] muestran la respuesta temprana de las bacterias a la interacción con los plásticos proporcionando una visión inicial pero incompleta de los efectos a largo plazo a concentraciones de 320 µg/ml y 500 µg/ml respectivamente. Athulaya et al. trabajaron con plásticos de PS (partículas nuevas menores a 5 µm) y no encontraron una afectación a la viabilidad celular en *E. coli* o *B. cereus*, sino al contrario, un mayor crecimiento y viabilidad. En el caso de Chen et al., al observar el efecto de diferentes tipos de plásticos, incluido el PE, en *Lactobacillus*, el crecimiento bacteriano a lo largo de 24 horas sí se vio afectado disminuyendo comparado con el control.

Los resultados expuestos en el presente trabajo muestran una cinética de toxicidad conforme transcurre el tiempo, en donde a mayor tiempo se observó mayor toxicidad con todos los tipos de PE evaluados. Este fenómeno podría estar relacionado con que la exposición prolongada a microplásticos puede inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que provoca un estrés oxidativo acumulativo en las células bacterianas [65]. Estudios previos han demostrado que la acumulación de ROS puede dañar componentes celulares críticos, como lípidos de membrana, proteínas y ADN, lo que conduce a una disminución de la viabilidad celular con el tiempo [54].

En otro enfoque, varios autores han estudiado la aportación del tamaño de las partículas de plástico sobre la toxicidad bacteriana. Kim et al., (2022) investigó los efectos de plásticos de PS sobre la cinética de crecimiento de *Bacillus* sp. y *E. coli*, donde ambas cepas fueron expuestas a concentraciones de 100 µg/ml [43]. Sin embargo, una diferencia clave en su estudio fue la inclusión de tamaños de partículas que varían entre 60 y 2260 nm. Ellos observaron que las partículas más

pequeñas lograban penetrar la membrana bacteriana y observaron que las partículas en el orden de micrómetros de PS afectaban de mayor manera en el crecimiento de *B. subtilis* que aquellas en el orden de nanómetros. Así mismo, Zhang et al. (2023), investigó la toxicidad de los MPs de PS en renacuajos de *Bufo gargarizans*, encontrando que los MPs de gran tamaño tenían un impacto más significativo en la microbiota simbiótica, mientras que los MPs pequeños estaban relacionados con una reacción más intensa del hospedador [66]. Este hallazgo concuerda con estudios anteriores, que descubrieron que las partículas a nanoescala causaban mayores tensiones oxidativas en los tejidos en el medaka marino *Oryzias melastigma*, mientras que las partículas a microescala causaban una disbiosis más severa de la microbiota intestinal [67].

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los autores mencionados, dado que la mayor toxicidad se observó en los plásticos de HDPE intemperizado (aprox. 250 μm), MBPE (34-44 μm), LDPE intemperizado y MIXBEADS, todos contienen MPs y mostraron efectos de toxicidad muy similar. Por su parte las partículas más pequeñas estudiadas en el presente trabajo que están incluidas en las MIXBEADS (200 a 9900 nm) ocasionaron cambios importantes en la morfología microscópica de *B. clausii*, observándose bacilos más gruesos y cortos, estos resultados concuerdan con las alteraciones morfológicas observadas por Dai et al., (2022) quienes reportaron cambios en la membrana y morfología de *E. coli* y *B. subtilis* con partículas de PS de 80 y 200 nm [68].

Finalmente, y a diferencia de los estudios anteriores, como el de Chen et al. (2022), que utilizaron concentraciones de PE de hasta 500 $\mu\text{g/ml}$, este trabajo evaluó los efectos de diferentes tamaños y tipos de PE en concentraciones mucho más altas, que varían desde 200 hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$. Esta amplia variación en las dosis permitió observar la cinética de crecimiento bacteriano y determinar las dosis a las cuales se alcanza una mortalidad del 50% (DL50) en *B. clausii*. Esto proporciona un umbral más claro de toxicidad que no había sido reportado en estudios anteriores.

Aunque el tamaño de las partículas pueda influenciar en la toxicidad de los plásticos, como el que las partículas más pequeñas puedan penetrar más fácilmente y causar efectos tóxicos rápidos, las partículas más grandes pueden desarrollar características superficiales que aumentan su toxicidad a largo plazo [69] la mayor afectación parece estar en otros factores, como el hecho de que los plásticos hayan sido expuestos a intemperización. La gran mayoría de los artículos referenciados trabajan con partículas estándar (nuevas) de PS y PE [15], [23], [42], [70], a diferencia de aquellos que se centran en las posibles habilidades de biodegradación [59], [71]. Por lo que en este trabajo se muestra por primera vez un estudio comparativo entre plásticos de PE similares con y sin intemperización, específicamente con LDPE, el cual presentó una toxicidad mucho mayor al estar intemperizado en comparación del LDPE nuevo tanto en la cinética de crecimiento como en la viabilidad, donde solo

fue significativamente diferente con el control en la dosis más alta. probablemente debido a la formación de productos de degradación que interactúan de manera más agresiva con las células bacterianas.

En estudios realizados con ratones, se observó que un plástico intemperizado como el PS fue potencialmente más dañino para procesos metabólicos y las funciones inmunitarias de los ratones que su versión virgen [72]. Deng et al. (2020) realizaron un estudio donde compararon los efectos de los MPs intemperizados de PE versus los MPs vírgenes sobre un modelo de ratón, en el que descubrieron que los plásticos intemperizados pueden adsorber, transportar y liberar diferentes ésteres de ftalato, resultando en efectos más diversos y severos que los ésteres de ftalato o los MPs vírgenes por sí solos [73]. Miranda et al., (2021) investigaron como el proceso de intemperización en un ambiente urbano afectaba al LDPE, observó que el plástico intemperizado tenía niveles más altos de grupos carbonilo respecto al plástico virgen [74], por otro lado Dimassi et al., (2024) investigaron el efecto de diferentes parámetros de intemperización en LDPE y concluyeron que el proceso liberaba ftalatos y BPA [71] compuestos que pueden generar desregulaciones metabólicas, causar problemas reproductivos y causar alteraciones hormonales en humanos [75].

El LDPE y el HDPE intemperizados son más representativos de las condiciones reales en las que se encuentran los MPs en el ambiente, donde los plásticos están expuestos a la intemperie y sufren procesos de degradación física y química. Como lo menciona Romera-Castillo et al. (2022), los restos de plástico al llegar al ambiente pueden comenzar a liberar aditivos químicos agregados para mejorar su resistencia, cuando estos están expuestos al sol, el proceso se acelera llegando incluso a aumentar la degradación de las cadenas de carbono presente en los plásticos y sustancias húmicas e incluso detectaron sustancias con estructuras similares a las proteínas que afectan a la población de células y materia orgánica encontrada en agua de mar estudiada [76]. Así mismo, Luo et al., (2022) sugieren que al estar en un proceso de intemperización, los MPs se ven afectados en la rugosidad de su superficie por lo que facilita la lixiviación de aditivos agregados al plástico como BPA, además que este proceso genera grupos conteniendo oxígeno lo que mejora la hidrofiliidad y polaridad lo que influye en la interacción de los MPs con su entorno [77].

Además de los plásticos intemperizados, los plásticos que contienen colorantes, especialmente los colorantes fluorescentes también pueden difundirlos en el ambiente o medio de cultivo, este fenómeno lo estudiaron Malafaia et al., (2022) y comprobaron que aquellos MPs de PE teñidos con colorante fluorescente o rojo de Nilo reducían la actividad antioxidante en renacuajos [78], por lo que suponemos que en el caso de MBPE no se mostró un efecto tóxico inicial significativo (24 horas) pero con el transcurso del tiempo (48 y 72 horas) el porcentaje de crecimiento se redujo de manera

drástica, probablemente debido al tipo de colorante fluorescente añadido a las partículas y su posible difusión en *B. clausii*.

Después de 24 horas, se observó que el HDPE intemperizado presentó un efecto dosis-dependiente significativamente más pronunciado en comparación con los otros plásticos analizados. Este comportamiento puede atribuirse a varios factores interrelacionados, incluyendo la estandarización del tamaño de las partículas y las condiciones específicas de intemperización a las que fue sometido el plástico. Como mencionan Herath y Salehi (2022), los efectos de la intemperización en los plásticos influyen en su interacción con el entorno; por ejemplo, aquellos expuestos a la luz UV experimentan una mayor oxidación en comparación con los degradados por otros medios lo que puede derivar en la lixiviación de contaminantes que afectan a las bacterias[79].

Por otro lado, la falta de un efecto dosis-dependiente claro en los otros tipos de plástico podría estar relacionada con la variabilidad en sus características físicas y químicas como la adición de colorantes, el tipo de intemperizado y el tamaño de partícula. Mientras que el HDPE intemperizado se presentó con una combinación de factores mencionados anteriormente, que aumentan su toxicidad, los otros plásticos mostraron variaciones en sus efectos a lo largo de las diferentes concentraciones. Estas pueden ser el resultado de variaciones en la homogeneidad de las muestras en la distribución del tamaño de partículas, o en la cantidad o el tipo de compuestos tóxicos generados durante el proceso de intemperización. Por ejemplo, los plásticos que no fueron intemperizados pueden tener superficies menos reactivas, lo que reduce la liberación de sustancias tóxicas en comparación con el resto [76].

Además, la variabilidad en los efectos observados podría deberse a la interacción diferencial de las bacterias con las partículas de plástico. Es posible que las bacterias tengan distintas capacidades para adherirse o incluso biodegradar ciertos tipos de plásticos, lo que podría influir en las respuestas observadas. Tanto el tipo de plástico como la concentración de las partículas pueden desempeñar un papel clave en esta interacción, diferenciando así las respuestas bacterianas. Mientras que ciertos plásticos podrían facilitar una mayor adhesión bacteriana debido a su composición o estado de degradación, la concentración de estas partículas también podría amplificar o reducir estos efectos [80].

El análisis del efecto de *B. clausii* sobre los plásticos estudiados reveló su capacidad como potencial degradador de LDPE a tan solo 72 horas de contacto. Numerosos estudios han demostrado la capacidad de biorremediación de microorganismos en plásticos, evidenciando alteraciones tanto en la estructura química como en la morfología de estos materiales. Por ejemplo, se ha comprobado que *B. gottheilii* e *Ideonella sakaiensis* pueden degradar el PE; ya que en entornos marinos, la

colonización del LDPE por bacterias comienza en pocas horas, y los metabolitos producidos por las bacterias son capaces de descomponer el plástico [69].

Como señala Demaquoy (2024), la degradación de MPs por bacterias de la microbiota es posible, pero depende de múltiples factores difíciles de controlar, como el tamaño, la forma y el tipo de plástico, así como de las bacterias presentes en la microbiota y las condiciones ambientales del hospedador. Además, es crucial considerar los subproductos que podrían liberarse durante este proceso y su impacto en la salud del hospedador [81]. Bacterias del género *Bacillus* (del cual algunas especies forman parte de la microbiota humana) han demostrado la capacidad de degradar plásticos. Los hallazgos de este estudio confirman que *B. clausii* también posee esta capacidad, aunque es necesario realizar más investigaciones para comprender mejor el proceso.

En el presente trabajo, se observó que tras 72 horas de contacto con *B. clausii*, todos los tipos de PE analizados presentaron una alteración significativa en la intensidad de los picos característicos del PE en el espectro de Raman. La disminución en la intensidad de los picos en los espectros de todos los plásticos expuestos a *B. clausii* sugiere que la bacteria ejerce un efecto degradativo sobre estos. Esta degradación es probablemente resultado de la acción enzimática de la bacteria, que rompe las cadenas poliméricas y modifica la estructura química del material [59].

La desaparición de los picos característicos del PE ($2800-3000\text{ cm}^{-1}$ y $1000-1500\text{ cm}^{-1}$) podría indicar la degradación completa de estructuras específicas dentro del polímero, como grupos funcionales o segmentos de la cadena polimérica. Tiwari et al. (2020) ya han registrado enzimas capaces de degradar el PE, como la lacasa y la manganoso peroxidasa, ambas producidas por especies de *Bacillus* [69]. La presencia de estas enzimas sugiere un mecanismo biológico activo en la degradación del PE, donde *B. clausii* no solo coloniza la superficie del plástico, sino que también inicia un proceso de descomposición enzimática que podría llevar a la desintegración del material con el tiempo. La aparición de estas alteraciones tempranas podría ser un indicio de que *B. clausii* está colonizando la superficie del plástico buscando una fuente de nutrientes, utilizando enzimas degradativas para descomponer el material en componentes más simples que la bacteria pueda asimilar [81]. Esta interacción no solo destaca la capacidad de *B. clausii* para sobrevivir en ambientes plásticos, sino que también sugiere un posible papel ecológico en la degradación de residuos plásticos, tanto en el medio ambiente como en la microbiota.

Entre todos los plásticos de PE estudiados en este trabajo, el LDPE nuevo fue el que sufrió un cambio más notorio en el espectro Raman. Esto podría deberse a que los tamaños de partícula eran lo suficientemente grandes para permitir la formación de biofilms y que al no estar intemperizado,

permitió que fuera menos tóxico para *B. clausii* y ésta pudiera colonizarlo [76]. Estudios como el de Sundar Dey (2020) explican este fenómeno, donde *Stenotrophomonas* sp. y *Achromobacter* sp. forman un biofilm sobre un fragmento de LDPE. Ellos sugirieron que el proceso de degradación por parte de los microorganismos podría haber comenzado con la formación de radicales, los que permitieron la oxidación mediante la intervención de oxígeno y agua. Estos productos de oxidación se transformaron en grupos funcionales y vinílicos, lo que pudo reducir la hidrofobicidad del LDPE y permitió que las enzimas bacterianas optimizaran el proceso de degradación [59].

Por lo reportado anteriormente por Dey et al. [59] creemos que es posible que *B. clausii* produjera lacasas capaces de formar subproductos como ésteres y alcoholes, que podrían haberse convertido en ácidos grasos más pequeños a través de un proceso intermedio de producción de aldehídos por enzimas deshidrogenasas lo que permitió que se formaran productos metabólicos que la bacteria pudiera utilizar como alimento.

A ser el LDPE nuevo el más afectado por *B. clausii* de acuerdo con el espectro de Raman, se utilizó un enfoque inspirado en el trabajo de Yang et al. (2021), que utilizaron bacterias de la microbiota intestinal de gusanos de seda para estudiar la degradación de películas de bolsas de LDPE. En dicho estudio, se observó que *Bacillus* sp. eran capaces de causar microfracturas en la película a lo largo de 28 días [58]. De igual manera, Puliga et al. (2023) analizaron la capacidad de *Cladosporium cladosporioides* para degradar y causar fracturas y agujeros en películas de LDPE observados con SEM. En este estudio, el tiempo de contacto fue de 90 días, durante el cual se observaron cambios en las intensidades de los picos de Raman. Estos cambios indicaron que la cristalinidad y el ordenamiento de la estructura del LDPE se habían visto afectados en la muestra tratada [82].

A pesar de que el tiempo de contacto en el presente estudio fue significativamente menor (72 horas), se pudieron observar posibles microfracturas en la superficie del LDPE (Figura 36). Estas microfracturas fueron similares a las observadas en estudios previos [58], [59], [82], aunque de menor tamaño. Estos hallazgos sugieren que, aunque el tiempo de exposición fue corto, *B. clausii* tiene el potencial de iniciar la biodegradación del LDPE nuevo y podría desempeñar un papel significativo en la reducción de la persistencia del LDPE en el entorno. Sin embargo, en el futuro se deberá considerar el estado de intemperización de los plásticos, ya que, el plástico utilizado en este estudio fue nuevo y no afectó de manera significativa la viabilidad de bacteriana. Si el plástico es más citotóxico para las bacterias posiblemente la degradación se vea afectada.

Capítulo 6

6.1 Conclusiones

En conclusión, el trabajo realizado en esta tesis proporcionó información importante acerca de la interacción PE-*B. clausii*:

- Se desarrolló un protocolo adecuado y funcional para la obtención y esterilización de micropartículas de PE de productos de desecho (pisetas de laboratorio) para su uso en experimentos con microorganismos.
- Los cinco tipos de PE evaluados en este estudio demostraron efectos tóxicos significativos sobre *B. clausii*, lo que se tradujo en alteraciones notables tanto en la cinética de crecimiento como en la viabilidad celular de esta bacteria.
- La toxicidad de las micro y nano partículas de PE sobre *B. clausii* es tiempo-dependiente, donde los efectos de inhibición de crecimiento fueron más notables conforme al paso del tiempo.
- Cuatro de los 5 plásticos de PE evaluados (MIXBEADS, LDPE intemperizado y HDPE intemperizado y MBPE mostraron efectos de toxicidad similares sobre *B. clausii*, a diferencia de LDPE nuevo, el cual fue el menos tóxico de todos.
- Los datos observados con la microscopía óptica demostraron que *B. clausii* tiende a acercarse e interactuar con los plásticos adhiriéndose a ellos y degradándolos.
- Las MIXBEADS, que incluían el tipo de partícula más pequeña, alteraron la morfología microscópica de *B. clausii*, observándosele más ancha y acortada que el resto de las bacterias observadas.
- La relación dosis-efecto entre *B. clausii* y los plásticos solo se observó con HDPE a las 24 horas de interacción. Sin embargo, con el paso del tiempo todas las concentraciones estudiadas (200, 400, 600, 800 y 1000 µg/ml) en todos los tipos de plástico presentaron una estabilización en el porcentaje de inhibición.

6.2 Trabajo a futuro

A pesar de que esta tesis proporciona información valiosa sobre la respuesta de *B. clausii* frente a MPs y NPs de PE, es crucial continuar investigando para comprender mejor las interacciones entre las partículas plásticas y la microbiota. Los siguientes puntos destacan áreas de oportunidad importantes para futuros estudios:

- Realizar estudios de exposición a largo plazo para evaluar los efectos crónicos de los MPs en diversas bacterias de la microbiota intestinal. Esto permitirá entender mejor cómo la exposición prolongada afecta la viabilidad, el crecimiento y la función bacteriana a lo largo del tiempo.
- Incluir una mayor variedad de tipos de plásticos, como PP, PET y PS, así como diferentes grados de intemperización en los estudios. Esto proporcionará una visión más completa de los impactos de diversos plásticos en la microbiota.
- Estudiar diferentes tipos de bacterias en conjunto para analizar de manera más exhaustiva la disbiosis causada por MPs en la microbiota. Esto ayudará a comprender cómo los MPs afectan la composición y la función de comunidades microbianas completas, creando modelos in vitro de ecosistemas microbianos para estudiar las interacciones complejas entre bacterias y MPs en un entorno controlado.
- Realizar pruebas y estudios para analizar las respuestas metabólicas de las bacterias ante la presencia de plásticos. Esto incluiría estudios para identificar cambios en las rutas metabólicas y los mecanismos de estrés bacteriano.
- Analizar los subproductos producidos en la degradación del plástico por *B. clausii* para comprender los posibles efectos adversos que pueden tener en la salud humana.
- Comparar la respuesta de la degradación superficial en muestras de plásticos intemperizados y nuevos por parte de *B. clausii* en un periodo de tiempo más extenso.

Al avanzar en esta línea de investigación, se espera no solo profundizar en la comprensión de los mecanismos de toxicidad de los MPs, los estudios futuros deben enfocarse en una mayor diversidad de plásticos, grados de intemperización y comunidades bacterianas para obtener una visión más completa y precisa de los impactos biológicos.

Referencias

- [1] M. Sewwandi, H. Wijsekara, A. U. Rajapaksha, S. Soysa, y M. Vithanage, «Microplastics and plastics-associated contaminants in food and beverages; Global trends, concentrations, and human exposure», *Environ. Pollut.*, vol. 317, p. 120747, ene. 2023, doi: 10.1016/j.envpol.2022.120747.
- [2] W. Qv, X. Wang, N. Li, J. Du, G. Pu, y H. Zhang, «How do the Growth and Metabolic Activity of Aquatic fungi *Geotrichum Candidum* and *Aspergillus Niger* Respond to Nanoplastics?», *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 109, n.º 6, pp. 1043-1050, dic. 2022, doi: 10.1007/s00128-022-03625-0.
- [3] M. M. Oliveira *et al.*, «Biofilms of *Pseudomonas* and *Lysinibacillus* Marine Strains on High-Density Polyethylene», *Microb. Ecol.*, vol. 81, n.º 4, pp. 833-846, may 2021, doi: 10.1007/s00248-020-01666-8.
- [4] P. Wu *et al.*, «Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity of microplastics in the human body and health implications», *J. Hazard. Mater.*, vol. 437, p. 129361, sep. 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129361.
- [5] M. C. Machado, G. V. Vimbela, T. T. Silva-Oliveira, A. Bose, y A. Tripathi, «The response of *Synechococcus* sp. PCC 7002 to micro-/nano polyethylene particles - Investigation of a key anthropogenic stressor», *PLOS ONE*, vol. 15, n.º 7, p. e0232745, jul. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0232745.
- [6] J. C. Prata, J. P. da Costa, I. Lopes, A. C. Duarte, y T. Rocha-Santos, «Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects», *Sci. Total Environ.*, vol. 702, p. 134455, feb. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134455.
- [7] E. Fournier *et al.*, «Microplastics in the human digestive environment: A focus on the potential and challenges facing in vitro gut model development», *J. Hazard. Mater.*, vol. 415, p. 125632, ago. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125632.
- [8] E. Thursby y N. Juge, «Introduction to the human gut microbiota», *Biochem. J.*, vol. 474, n.º 11, pp. 1823-1836, jun. 2017, doi: 10.1042/BCJ20160510.
- [9] R.-X. Ding *et al.*, «Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease», *J. Food Drug Anal.*, vol. 27, n.º 3, pp. 623-631, jul. 2019, doi: 10.1016/j.jfda.2018.12.012.
- [10] T.-H. Pham *et al.*, «Global challenges in microplastics: From fundamental understanding to advanced degradations toward sustainable strategies», *Chemosphere*, vol. 267, p. 129275, mar. 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129275.

- [11] R. Xu, J. Cao, H. Lv, Y. Geng, y M. Guo, «Polyethylene microplastics induced gut microbiota dysbiosis leading to liver injury via the TLR2/NF- κ B/NLRP3 pathway in mice», *Sci. Total Environ.*, vol. 917, p. 170518, mar. 2024, doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.170518.
- [12] E. Ghelardi, A. T. Abreu y Abreu, C. B. Marzet, G. Álvarez Calatayud, M. Perez, y A. P. Moschione Castro, «Current Progress and Future Perspectives on the Use of *Bacillus clausii*», *Microorganisms*, vol. 10, n.º 6, p. 1246, jun. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10061246.
- [13] C. P. Acosta-Rodríguez-Bueno, A. T. Abreu Y Abreu, F. Guarner, M. J. V. Guno, E. Pehlivanoğlu, y M. Perez, «*Bacillus clausii* for Gastrointestinal Disorders: A Narrative Literature Review», *Adv. Ther.*, vol. 39, n.º 11, pp. 4854-4874, nov. 2022, doi: 10.1007/s12325-022-02285-0.
- [14] G. L. Marseglia *et al.*, «Efficacy of *Bacillus clausii* spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a pilot study», *Ther. Clin. Risk Manag.*, vol. 3, n.º 1, pp. 13-17, 2022, doi: 10.2147/tcrm.s3113.
- [15] X. Yi, W. Li, Y. Liu, K. Yang, M. Wu, y H. Zhou, «Effect of Polystyrene Microplastics of Different Sizes to *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*», *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 107, n.º 4, pp. 626-632, oct. 2021, doi: 10.1007/s00128-021-03215-6.
- [16] S. Fijan, T. Fijan, y N. Connil, «Overview of Probiotic Strains of *Weizmannia coagulans*, Previously Known as *Bacillus coagulans*, as Food Supplements and Their Use in Human Health», *Appl. Microbiol.*, vol. 3, n.º 3, pp. 935-947, ago. 2023, doi: 10.3390/applmicrobiol3030064.
- [17] SCOPUS. (2024). ELSEVIER. [En línea]. Disponible en: <https://www.scopus.com/home.uri>
- [18] «Industria del plástico en México cierra 2022 con números positivos». Accedido: 8 de julio de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.pt-mexico.com/noticias/post/industria-del-plastico-en-mexico-cierra-2022-con-numeros-positivos>
- [19] H. Niu *et al.*, «Are Microplastics Toxic? A Review from Eco-Toxicity to Effects on the Gut Microbiota», *Metabolites*, vol. 13, n.º 6, Art. n.º 6, jun. 2023, doi: 10.3390/metabo13060739.
- [20] V. K. Sharma, X. Ma, E. Lichtfouse, y D. Robert, «Nanoplastics are potentially more dangerous than microplastics», *Environ. Chem. Lett.*, vol. 21, n.º 4, pp. 1933-1936, ago. 2023, doi: 10.1007/s10311-022-01539-1.
- [21] M. Carabotti, A. Scirocco, M. A. Maselli, y C. Severi, «The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems», *Ann. Gastroenterol. Q. Publ. Hell. Soc. Gastroenterol.*, vol. 28, n.º 2, pp. 203-209, 2015.
- [22] X. Chen, L. Xu, Q. Chen, S. Su, J. Zhuang, y D. Qiao, «Polystyrene micro- and nanoparticles exposure induced anxiety-like behaviors, gut microbiota dysbiosis and metabolism disorder in

- adult mice», *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 259, p. 115000, jul. 2023, doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.115000.
- [23] B. Li *et al.*, «Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice», *Chemosphere*, vol. 244, p. 125492, abr. 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125492.
- [24] S. Wen, Y. Zhao, S. Liu, H. Yuan, T. You, y H. Xu, «Microplastics-perturbed gut microbiota triggered the testicular disorder in male mice: Via fecal microbiota transplantation», *Environ. Pollut. Barking Essex 1987*, vol. 309, p. 119789, sep. 2022, doi: 10.1016/j.envpol.2022.119789.
- [25] R. Wang, X. Li, J. Li, W. Dai, y Y. Luan, «Bacterial Interactions with Nanoplastics and the Environmental Effects They Cause», *Fermentation*, vol. 9, n.º 11, Art. n.º 11, nov. 2023, doi: 10.3390/fermentation9110939.
- [26] M. Ibrahim y H. He, «Classification of polyethylene by Raman spectroscopy».
- [27] A. R. Cowan, C. M. Costanzo, R. Benham, E. J. Loveridge, y S. C. Moody, «Fungal bioremediation of polyethylene: Challenges and perspectives», *J. Appl. Microbiol.*, vol. 132, n.º 1, pp. 78-89, ene. 2022, doi: 10.1111/jam.15203.
- [28] H. Saygin y A. Baysal, «Similarities and Discrepancies Between Bio-Based and Conventional Submicron-Sized Plastics: In Relation to Clinically Important Bacteria», *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 105, n.º 1, pp. 26-35, jul. 2020, doi: 10.1007/s00128-020-02908-8.
- [29] «Polyethylene (PE): Structure, Properties, and Applications | Xometry». Accedido: 13 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.xometry.com/resources/materials/polyethylene/>
- [30] «Polyethylene (High Density) HDPE». Accedido: 13 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.bpf.co.uk/plastipedia/polymers/HDPE.aspx>
- [31] Y. Zhao, L. Wang, A. Xiao, y H. Yu, «The synthesis of modified polyethylene via coordination polymerization followed by ATRP, RAFT, NMRP or ROP», *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, n.º 10, pp. 1195-1216, oct. 2010, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.05.002.
- [32] W. Grodzicki, K. Dziendzikowska, J. Gromadzka-Ostrowska, y M. Kruszewski, «Nanoplastic Impact on the Gut-Brain Axis: Current Knowledge and Future Directions», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n.º 23, p. 12795, nov. 2021, doi: 10.3390/ijms222312795.
- [33] E. Rinninella *et al.*, «The role of diet in shaping human gut microbiota», *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 62-63, p. 101828, feb. 2023, doi: 10.1016/j.bpg.2023.101828.
- [34] R. M. Wong-Chew, J.-A. A. De Castro, L. Morelli, M. Perez, y M. Ozen, «Gut immune homeostasis: the immunomodulatory role of *Bacillus clausii* , from basic to clinical

- evidence», *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 18, n.º 7, pp. 717-729, jul. 2022, doi: 10.1080/1744666X.2022.2085559.
- [35] F. Leblhuber *et al.*, «The Immunopathogenesis of Alzheimer's Disease Is Related to the Composition of Gut Microbiota», *Nutrients*, vol. 13, n.º 2, p. 361, ene. 2021, doi: 10.3390/nu13020361.
- [36] A. W. Walker y L. Hoyles, «Human microbiome myths and misconceptions», *Nat. Microbiol.*, vol. 8, n.º 8, pp. 1392-1396, jul. 2023, doi: 10.1038/s41564-023-01426-7.
- [37] E. Ghelardi, F. Celandroni, S. Salvetti, S. A. Gueye, A. Lupetti, y S. Senesi, «Survival and persistence of *Bacillus clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation», *J. Appl. Microbiol.*, vol. 119, n.º 2, pp. 552-559, ago. 2015, doi: 10.1111/jam.12848.
- [38] M. Guerrero P. y J. F. Castro F., «Evaluación de viabilidad de microorganismos», en *Conformación de colecciones de cultivos microbianos*, en Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación Quilamapu. , 2020, pp. 139-153.
- [39] K. T. L. Trinh y N. Y. Lee, «Recent Methods for the Viability Assessment of Bacterial Pathogens: Advances, Challenges, and Future Perspectives», *Pathogens*, vol. 11, n.º 9, p. 1057, sep. 2022, doi: 10.3390/pathogens11091057.
- [40] S. S. Kumar y A. R. Ghosh, «Assessment of bacterial viability: a comprehensive review on recent advances and challenges», *Microbiology*, vol. 165, n.º 6, pp. 593-610, jun. 2019, doi: 10.1099/mic.0.000786.
- [41] K. Kovárová-Kovar y T. Egli, «Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics», *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, n.º 3, pp. 646-666, sep. 1998, doi: 10.1128/MMBR.62.3.646-666.1998.
- [42] H. Chen, H. Chen, S. Nan, H. Liu, L. Chen, y L. Yu, «Investigation of Microplastics in Digestion System: Effect on Surface Microstructures and Probiotics», *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 109, n.º 5, pp. 882-892, nov. 2022, doi: 10.1007/s00128-022-03571-x.
- [43] S. Y. Kim, Y. J. Kim, S.-W. Lee, y E.-H. Lee, «Interactions between bacteria and nano (micro)-sized polystyrene particles by bacterial responses and microscopy», *Chemosphere*, vol. 306, p. 135584, nov. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.135584.
- [44] «Morphology, Different shapes of bacterial cell», BYJUS. Accedido: 13 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://byjus.com/neet/important-notes-of-biology-for-neet-shapes-of-bacteria/>
- [45] G. Clark y Biological Stain Commission, Eds., *Staining procedures*, 4th ed. Baltimore: Published for the Biological Stain Commission by Williams & Wilkins, 1981.

- [46] J. Otero y V. G. Cano, «Espectroscopía Raman: Fundamento y aplicaciones», 2015, *Unpublished*. doi: 10.13140/RG.2.1.5015.5362.
- [47] R. L. Rosas y M. J. Robles-Águila, «Desarrollo y evaluación teórico-experimental de sensores de CO₂ basados en óxidos metálicos semiconductores WO₃, ZnO y SnO₂.», 2022, doi: 10.13140/RG.2.2.13177.03680.
- [48] J. A. Koningstein, *Introduction to the Theory of the Raman Effect*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1972. doi: 10.1007/978-94-010-2901-8.
- [49] C. L. Zavaleta *et al.*, «A Raman-based endoscopic strategy for multiplexed molecular imaging», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, n.º 25, jun. 2013, doi: 10.1073/pnas.1211309110.
- [50] J.-L. Xu, K. V. Thomas, Z. Luo, y A. A. Gowen, «FTIR and Raman imaging for microplastics analysis: State of the art, challenges and prospects», *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 119, p. 115629, oct. 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.115629.
- [51] L.-E. Tympa, K. Katsara, P. N. Moschou, G. Kenanakis, y V. M. Papadakis, «Do Microplastics Enter Our Food Chain Via Root Vegetables? A Raman Based Spectroscopic Study on *Raphanus sativus*», *Materials*, vol. 14, n.º 9, p. 2329, abr. 2021, doi: 10.3390/ma14092329.
- [52] A. Saraluck, T. Techarang, P. Bunyapipat, K. Boonchuwong, Y. Pullaput, y A. Mordmuang, «Detection of Microplastics in Human Breast Milk and Its Association with Changes in Human Milk Bacterial Microbiota», *J. Clin. Med.*, vol. 13, n.º 14, p. 4029, jul. 2024, doi: 10.3390/jcm13144029.
- [53] S. Caputi *et al.*, «Microplastics Affect the Inflammation Pathway in Human Gingival Fibroblasts: A Study in the Adriatic Sea», *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, vol. 19, n.º 13, p. 7782, jun. 2022, doi: 10.3390/ijerph19137782.
- [54] O. Hollóczki y S. Gehrke, «Can Nanoplastics Alter Cell Membranes?», *Chemphyschem*, vol. 21, n.º 1, pp. 9-12, ene. 2020, doi: 10.1002/cphc.201900481.
- [55] C. Jiménez-Arroyo, A. Tamargo, N. Molinero, y M. V. Moreno-Arribas, «The gut microbiota, a key to understanding the health implications of micro(nano)plastics and their biodegradation», *Microb. Biotechnol.*, vol. 16, n.º 1, pp. 34-53, ene. 2023, doi: 10.1111/1751-7915.14182.
- [56] B. Wu, X. Wu, S. Liu, Z. Wang, y L. Chen, «Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells», *Chemosphere*, vol. 221, pp. 333-341, abr. 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.01.056.

- [57] H. Nugrahapraja *et al.*, «Effects of Microplastic on Human Gut Microbiome: Detection of Plastic-Degrading Genes in Human Gut Exposed to Microplastics—Preliminary Study», *Environments*, vol. 9, n.º 11, p. 140, nov. 2022, doi: 10.3390/environments9110140.
- [58] J. Yang, Y. Yang, W.-M. Wu, J. Zhao, y L. Jiang, «Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 48, n.º 23, pp. 13776-13784, dic. 2014, doi: 10.1021/es504038a.
- [59] A. S. Dey, H. Bose, B. Mohapatra, y P. Sar, «Biodegradation of Unpretreated Low-Density Polyethylene (LDPE) by *Stenotrophomonas* sp. and *Achromobacter* sp., Isolated From Waste Dumpsite and Drilling Fluid», *Front. Microbiol.*, vol. 11, p. 603210, dic. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.603210.
- [60] Y. Jin, A. P. Kotula, C. R. Snyder, A. R. Hight Walker, K. B. Migler, y Y. J. Lee, «Raman Identification of Multiple Melting Peaks of Polyethylene», *Macromolecules*, vol. 50, n.º 16, pp. 6174-6183, ago. 2017, doi: 10.1021/acs.macromol.7b01055.
- [61] T. Furukawa *et al.*, «Molecular Structure, Crystallinity and Morphology of Polyethylene/Polypropylene Blends Studied by Raman Mapping, Scanning Electron Microscopy, Wide Angle X-Ray Diffraction, and Differential Scanning Calorimetry», *Polym. J.*, vol. 38, n.º 11, pp. 1127-1136, nov. 2006, doi: 10.1295/polymj.PJ2006056.
- [62] H. Zha *et al.*, «Alterations of gut and oral microbiota in the individuals consuming take-away food in disposable plastic containers», *J. Hazard. Mater.*, vol. 441, p. 129903, ene. 2023, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129903.
- [63] I. Khatri, G. Sharma, y S. Subramanian, «Composite genome sequence of *Bacillus clausii*, a probiotic commercially available as Enterogermina®, and insights into its probiotic properties», *BMC Microbiol.*, vol. 19, n.º 1, p. 307, dic. 2019, doi: 10.1186/s12866-019-1680-7.
- [64] L. Zhao *et al.*, «Adsorption abilities and mechanisms of *Lactobacillus* on various nanoplastics», *Chemosphere*, vol. 320, p. 138038, abr. 2023, doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.138038.
- [65] J. Dawan y J. Ahn, «Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance», *Microorganisms*, vol. 10, n.º 7, p. 1385, jul. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10071385.
- [66] Q. Zhang *et al.*, «Size matters either way: Differently-sized microplastics affect amphibian host and symbiotic microbiota discriminately», *Environ. Pollut.*, vol. 328, p. 121634, jul. 2023, doi: 10.1016/j.envpol.2023.121634.

- [67] H.-M. Kang, E. Byeon, H. Jeong, M.-S. Kim, Q. Chen, y J.-S. Lee, «Different effects of nano- and microplastics on oxidative status and gut microbiota in the marine medaka *Oryzias melastigma*», *J. Hazard. Mater.*, vol. 405, p. 124207, mar. 2021, doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124207.
- [68] S. Dai *et al.*, «Distinct lipid membrane interaction and uptake of differentially charged nanoplastics in bacteria», *J. Nanobiotechnology*, vol. 20, n.º 1, p. 191, abr. 2022, doi: 10.1186/s12951-022-01321-z.
- [69] N. Tiwari, D. Santhiya, y J. G. Sharma, «Microbial remediation of micro-nano plastics: Current knowledge and future trends», *Environ. Pollut.*, vol. 265, p. 115044, oct. 2020, doi: 10.1016/j.envpol.2020.115044.
- [70] F. Tabatabaei, R. Mafizholami, H. Moghimi, y S. Khoramipoor, «Investigating biodegradation of polyethylene and polypropylene microplastics in Tehran DWTPs», *Water Sci. Technol.*, vol. 88, n.º 11, pp. 2996-3008, dic. 2023, doi: 10.2166/wst.2023.360.
- [71] S. N. Dimassi, J. N. Hahladakis, M. Chamkha, M. I. Ahmad, M. A. Al-Ghouti, y S. Sayadi, «Investigation on the effect of several parameters involved in the biodegradation of polyethylene (PE) and low-density polyethylene (LDPE) under various seawater environments», *Sci. Total Environ.*, vol. 912, p. 168870, feb. 2024, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.168870.
- [72] H. Cui, W. Yang, Y. Cui, L. Qi, X. Jiang, y M. Li, «Adverse effects of pristine and aged polystyrene microplastics in mice and their Nrf2-mediated defense mechanisms with tissue specificity», *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 30, n.º 14, pp. 39894-39906, ene. 2023, doi: 10.1007/s11356-022-24918-1.
- [73] Y. Deng *et al.*, «Microplastics release phthalate esters and cause aggravated adverse effects in the mouse gut», *Environ. Int.*, vol. 143, p. 105916, oct. 2020, doi: 10.1016/j.envint.2020.105916.
- [74] M. N. Miranda, M. J. Sampaio, P. B. Tavares, A. M. T. Silva, y M. F. R. Pereira, «Aging assessment of microplastics (LDPE, PET and uPVC) under urban environment stressors», *Sci. Total Environ.*, vol. 796, p. 148914, nov. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148914.
- [75] F. Arrigo, F. Impellitteri, G. Piccione, y C. Faggio, «Phthalates and their effects on human health: Focus on erythrocytes and the reproductive system», *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 270, p. 109645, ago. 2023, doi: 10.1016/j.cbpc.2023.109645.
- [76] C. Romera-Castillo, S. Birnstiel, X. A. Álvarez-Salgado, y M. Sebastián, «Aged Plastic Leaching of Dissolved Organic Matter Is Two Orders of Magnitude Higher Than Virgin

- Plastic Leading to a Strong Uplift in Marine Microbial Activity», *Front. Mar. Sci.*, vol. 9, p. 861557, mar. 2022, doi: 10.3389/fmars.2022.861557.
- [77] H. Luo *et al.*, «Interactions between microplastics and contaminants: A review focusing on the effect of aging process», *Sci. Total Environ.*, vol. 899, p. 165615, nov. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.165615.
- [78] G. Malafaia, T. M. da Luz, M. A. I. Ahmed, S. Karthi, y A. P. da C. Araújo, «When toxicity of plastic particles comes from their fluorescent dye: a preliminary study involving neotropical *Physalaemus cuvieri* tadpoles and polyethylene microplastics», *J. Hazard. Mater. Adv.*, vol. 6, p. 100054, may 2022, doi: 10.1016/j.hazadv.2022.100054.
- [79] A. Herath y M. Salehi, «Studying the combined influence of microplastics' intrinsic and extrinsic characteristics on their weathering behavior and heavy metal transport in storm runoff», *Environ. Pollut.*, vol. 308, p. 119628, sep. 2022, doi: 10.1016/j.envpol.2022.119628.
- [80] G. Liu, Z. Zhu, Y. Yang, Y. Sun, F. Yu, y J. Ma, «Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater», *Environ. Pollut. Barking Essex 1987*, vol. 246, pp. 26-33, mar. 2019, doi: 10.1016/j.envpol.2018.11.100.
- [81] J. Demarquoy, «Microplastics and microbiota: Unraveling the hidden environmental challenge», *World J. Gastroenterol.*, vol. 30, n.º 16, pp. 2191-2194, abr. 2024, doi: 10.3748/wjg.v30.i16.2191.
- [82] F. Puliga *et al.*, «Cladosporium cladosporioides (strain Clc/1): a candidate for low-density polyethylene degradation», *Chem. Biol. Technol. Agric.*, vol. 10, n.º 1, p. 50, jun. 2023, doi: 10.1186/s40538-023-00419-2.