

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

**USO DE FIBRAS POLIMÉRICAS COMO
POTENCIADORES DE LA PROLIFERACIÓN EN
BACTERIAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Doctora en Ciencias

Presenta:

Daniella Alejandra Pompa Monroy

Director de tesis:

Dr. Luis Jesús Villarreal Gómez

Tijuana, Baja California México.

Agosto 2021

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas involucradas en la realización de esta Tesis, a mis sinodales por sus acertados comentarios y el tiempo dedicado a mi trabajo y persona, en especial a mi director de Tesis por convertirse no solamente en mi mentor profesional, sino por su apoyo y comprensión en lo personal.

Al CONACyT por el apoyo financiero en las distintas etapas de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por haberse convertido en grandes amigos a lo largo de los años, y hacer que esas horas en el laboratorio mientras discutíamos resultados fueran no solo provechosas sino divertidas, en especial a Rodolfo y Paulina por su apoyo en la realización de esta Tesis.

Y para finalizar a mi familia que a pesar de las muchas dificultades que hemos afrontado en este capítulo de vida, el amor y comprensión mutua nunca ha menguado.

ÍNDICE GENERAL

PRELIMINARES

Índice General	1
Índice de Figuras	5
Índice de Tablas	7
Lista de abreviaturas	8
Resumen	9

CAPITULO I. Introducción General

I. Introducción General	10
II. Marco Teórico General	13
2.1 Bacterias de uso biotecnológico	13
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	13
2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.1.4 <i>Lactobacillus spp.</i>	14
2.2 Proliferación bacteriana	15
2.2.1 Medición de la densidad bacteriana	15
5.2.2 Tiempo de Generación	15
5.2.3 Curva de Crecimiento	16
5.2.4 Metabolitos	17
2.3 Electrohilado polimérico	17
2.4 Poli (caprolactona)	18
2.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	19

III. Objetivos	20
3.1 Objetivo General	20
3.2 Objetivos específicos	20
IV. Hipótesis	20
CAPITULO II. Fibras PCL/Cs y PCL/Ns	
V. Marco Teórico	21
5.1 Requerimientos nutricionales bacterianos	21
5.2 Fuentes de Carbono	21
5.2.1 Glucosa	23
5.2.2 Galactosa	23
5.2.3 Fructosa	23
5.2.4 Lactosa	24
5.3 Fuentes de Nitrógeno	24
5.3.1 Glicina	24
5.3.2 Urea	25
5.3.3 Peptona	25
5.3.4 Extracto de levadura	25
VI. Antecedentes	26
VII. Metodología	34
7.1 Materiales	34
7.2 Métodos	34
7.2.1 Preparación de soluciones PCL/Cs y PCL/Ns	34
7.2.2 Electrohilado polimérico	35
7.2.3 Síntesis de películas	35

7.2.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	35
7.2.5 Ensayo de proliferación	36
7.2.6 Análisis estadístico.	37
VIII. Resultados y Discusión	38
8.1 Microscopia electrónica de Barrido (SEM)	38
8.2 Ensayo de proliferación en fibras y películas de PCL/Cs	41
8.3 Ensayo de proliferación en fibras y películas de PCL/Ns	49
CAPITULO III. Fibras PCL/CUR	
XI. Marco Teórico	56
9.1 Formación de biopelículas	56
9.2 Estrés celular	56
9.3 Biopelículas en Cepas de Interés	57
9.4 Cúrcuma	57
9.4.1 Agentes activos	58
9.4.2 Aplicaciones	58
X. Antecedentes	59
XI. Metodología	66
11. 1 Materiales	66
11.2 Métodos	66
11.2.1 Preparación de soluciones PCL/CUR	66
11.2.2 Electrohilado polimérico PCL/CUR	67
11.2.3 Síntesis de películas	67
11.2.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	67

11.2.5 Ensayo de proliferación	67
11.2.6 Análisis estadístico.	68
XII. Resultados y Discusión	69
12.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	69
12.2 Ensayo de proliferación en fibras y películas de PCL/CUR	71
12.3 Ensayo de formación de Biofilms	77
CAPITULO IV. Conclusiones Generales	
XIII. Conclusiones	82
XIV. Trabajo a futuro	83
Literatura citada.	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Resumen. Diagrama de la producción de fibras y el crecimiento bacteriano.	9
Figura 1. Esquema de electrohilado polimérico.	18
Figura 2. Estructura química de Poli(caprolactona)	18
Figura 3. Disposición de muestras en placa de 96 pocillos.	36
Figura 4. Micrografía análisis de proliferación de biofilms en <i>S. aureus</i> a 3 y 6 h.	40
Figura 5. Estudio comparativo del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> expuesta a PCL/Cs.	42
Figura 6. Estudio comparativo del crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . expuesta a PCL/Cs.	43
Figura 7. Estudio comparativo del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> expuesta a PCL/Cs.	45
Figura 8. Estudio comparativo del crecimiento de <i>Lactobacillus spp.</i> expuesta a PCL/Cs.	47
Figura 9. Estudio comparativo del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> expuesta a PCL/Cs.	50
Figura 10. Estudio comparativo del crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . expuesta a PCL/Cs.	51
Figura 11. Estudio comparativo del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> expuesta a PCL/Cs.	52
Figura 12. Estudio comparativo del crecimiento de <i>Lactobacillus spp.</i> expuesta a PCL/Cs.	53
Figura 13. Disposición de fibras y películas para muestras de PCL/CUR.	68
Figura 14. Micrografía de las distintas muestras de PCL/CUR.	70

Figura 15. Ensayo de Proliferación en fibras y películas.	75
Figura 16. Micrografía ensayo de formación de biofilms.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura molecular de distintas fuentes de Carbono y Nitrógeno.	22
Tabla 2. Composición de fibras y películas de PCL/Cs y PCL/Ns	35
Tabla 3. Porcentajes de proliferación máxima en fibras y películas expuestas a Cs y Ns.	54
Tabla 4. Preparación de soluciones poliméricas PCL/CUR	66

ABREVIATURAS

SEM	Microscopia electrónica de barrido (del inglés: Scanning Electron Microscope)
PCL	Poli (caprolactona)
CUR	Cúrcuma
Cs	Fuentes de Carbono (del inglés: Carbon source)
LAB	Bacterias ácido lácticas (del inglés: Lactic acid bacteria)
Ns	Fuentes de Nitrógeno (del inglés: Nitrogen source)
PCLc	Muestra PCL control
PCL/CUR1	Muestra de PCL con cúrcuma al 2%
PCL/CUR2	Muestra de PCL con cúrcuma al 2.5%
PCL/CUR3	Muestra de PCL con cúrcuma al 5%
PCL/CUR4	Muestra de PCL con cúrcuma al 10%
PCL/Glu	Muestra PCL con Glucosa
PCL/Gal	Muestra PCL con Galactosa
PCL/Fru	Muestra PCL con Fructosa
PCL/Lac	Muestra PCL con Lactosa
PCL/Yea	Muestra PCL con Extracto de levadura (del inglés: Yeast extract)
PCL/Ure	Muestra PCL con Urea
PCL/Pep	Muestra PCL con Peptona
PCL/Gly	Muestra PCL con Glicina

RESUMEN

Las fibras poliméricas electrohiladas tienen muchas aplicaciones entre las cuales están el cultivo de tejidos y el cargado de fármacos para su liberación prolongada sin embargo debido a sus propiedades mecánicas, como son la gran área superficial y bioactividad pueden ser de gran ayuda en la industria biotecnológica. Estas fibras pueden ser utilizadas como andamios para mejorar la proliferación bacteriana, así como la producción de metabolitos de intereses biotecnológico y las biopelículas formadas pueden ser utilizadas para la biorremediación de metales pesados y petróleo.

En este estudio se realizaron fibras y películas de poli (caprolactona) adicionadas con distintas fuentes de carbono: glucosa, fructosa, galactosa y lactosa; fuentes de nitrógeno: glicina, peptona, urea y extracto de levadura; y para finalizar cúrcuma como agente antibacteriano en bajas concentraciones, con el objetivo de potenciar la producción de biomasa y la formación de biopelículas.

Al realizarse un estudio de proliferación bacteriana con bacterias de interés biotecnológico como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus spp.* se encontró que se puede incrementar la proliferación bacteriana en un intervalo que va de 23 a 400%, sin embargo, no todas las formulaciones son beneficiosas para incrementar el crecimiento bacteriano. Al visualizar las fibras con crecimiento bacteriano en microscopia electrónica de barrido se logra visualizar la formación de biopelículas en la superficie de estas, se sugiere como trabajo a futuro realizar un ensayo capaz de cuantificar la producción de biomasa, así como la producción de metabolitos.

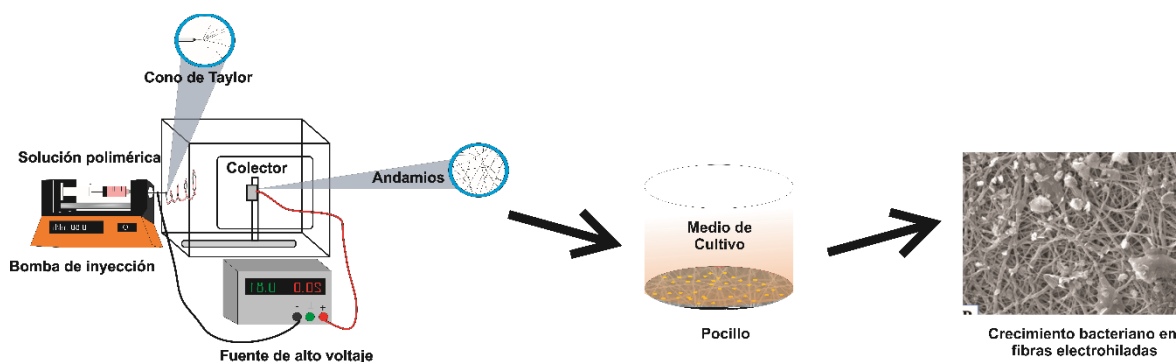


Figura Resumen. Diagrama de la producción de fibras y el crecimiento bacteriano.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad de los microorganismos, su naturaleza única y capacidades biosintéticas en condiciones ambientales específicas hacen que los microorganismos sean candidatos para resolver problemáticas como la escasez de alimentos, control de plagas, biodegradación de xenobióticos, descomposición de desechos, entre otros. Los microorganismos ofrecen un gran potencial para la exploración de moléculas y procesos de interés biotecnológico e industrial (Ostos-Ortíz, Rosas-Arango, & González-Devia, 2019).

Por ejemplo, en condiciones anaeróbicas *Escherichia coli* produce naturalmente una mezcla de ácidos orgánicos, etanol e hidrógeno que se aprovecha esto para producir succinato y lactato, y recientemente etanol e hidrógeno como potenciales biocombustibles (Leonrodriguez *et al.*, 2016).

Cepas de *Lactobacillus spp* homofermentativos son responsables de la acumulación de altas concentraciones de ácido láctico extracelular y la disminución del pH, mediante la producción de ácido láctico. Se sabe que estas condiciones inhiben a otros microorganismos y dan a los alimentos fermentados propiedades sensoriales favorables. Las especies homofermentativas de *Lactobacillus spp* se utilizan comúnmente para elaborar productos fermentados como productos lácteos, salchichas, verduras y frutas (Cui *et al.*, 2016).

Staphylococcus aureus y otras bacterias patógenas se han probado como bacterias tolerantes a metales pesados, con interés en la eliminación de Cadmio, Cromo, Níquel y Zinc, para su uso en un efluente de refinería de petróleo (Endurance Oaikhena *et al.*, 2016). Además, se ha informado que es útil para la biorremediación de efluentes contaminados por tintes textiles (Abatenh *et al.*, 2017).

Por último, *Pseudomonas* es un género grande y diverso que reside de forma ubicua en hábitats acuáticos y terrestres. Aunque, *Pseudomonas aeruginosa* solía ser reconocida como un patógeno oportunista, en las últimas décadas ha recibido mucha atención sobre su potencial capacidad como biocontrol ambiental. Miembros del grupo de *P. aeruginosa* demuestran tener actividad antagonista prominente contra varios fitopatógenos, volviéndola

un recurso prometedor como agente de control biológico de enfermedades de las plantas (Ma et al., 2020).

En la naturaleza las bacterias sometidas a estrés forman biopelículas. La formación de biopelículas bacterianas representa un problema médico importante, los mecanismos del inicio de la formación de biopelículas son poco conocidos (Chu *et al.*, 2018). Sin embargo, la formación de biopelículas ha ganado interés en varios enfoques industriales, como en la industria alimentaria (Galié *et al.*, 2018), la biopelícula de *Pseudomonas* mejora la degradación del petróleo crudo (Dasgupta *et al.*, 2013) y la biorremediación de aguas residuales (Li *et al.*, 2017), entre otros. Sin embargo, métodos específicos para el aprovechamiento de estas propiedades aún se encuentran en estudio, dada la complejidad de las interacciones bacterianas con sus medios y superficies. Siendo de vital importancia buscar formas de producirlos de manera segura y controlable.

Además de lo antes mencionado, los requerimientos alimenticios de los microorganismos han sido ampliamente estudiados, las vías básicas del metabolismo central son comunes a todas las bacterias. Las bacterias se han adaptado para utilizar la diversa gama de fuentes de carbono disponibles en su entorno particular. Las diferentes fuentes de carbono se absorben y se convierten en un compuesto que puede alimentar una de las vías del metabolismo central. La función del metabolismo central es suministrar a las bacterias energía (ATP), poder reductor (NADH y NADPH) y los precursores para la biosíntesis de otros constituyentes celulares. Las actividades de las enzimas de las vías centrales se ajustan para optimizar el uso de los diferentes recursos de carbono. Las fuentes de carbono se utilizan generalmente de manera jerárquica, siendo la glucosa a menudo, pero no siempre, la fuente de carbono preferida (Plumbridge & Deutscher, 2019).

Sin embargo, los microorganismos no solamente necesitan carbono para sobrevivir, el nitrógeno es un componente principal de los organismos vivos y representa entre el 10% y el 15% del peso seco de las bacterias, lo que representa un cuarto de su contenido de carbono. En la materia viva, el nitrógeno está presente en los ácidos nucleicos y las proteínas, las moléculas definitorias de las células, y en las bacterias también está presente en las paredes celulares, siendo este un elemento trascendental en el crecimiento y proliferación bacteriana (Herrero & Flores, 2019).

Por otro lado, la curcumina conocida como bis-1,7- [4-hidroxi-3-metoxifenil] -hepta-1,6-diona (CUR), es un pigmento polifenólico hidrófobo que se encuentra en los rizomas derivados de la *Curcuma longa* (Rezaei *et al.*, 2018). La CUR tiene muchas aplicaciones médicas con actividad sobresaliente como agente antifúngico y antibacteriano, que en pocas cantidades puede funcionar como un inductor del estrés celular, así provocando un incremento en la proliferación y la producción de biopelículas (Shababdoust *et al.*, 2017; Ravikumar *et al.*, 2017; Mutlu *et al.*, 2018).

La producción de biopelículas se ve beneficiada por las estructuras irregulares de las superficies por lo cual, se sugiere la formación de estructuras con esta propiedad mediante la producción de fibras. El electrohilado polimérico es una técnica utilizada para la producción de fibras a escala nanométrica, que se ha utilizado con anterioridad para la producción de gran variedad de andamios con interés biomédico. Consiste en la inyección de una solución polimérica debidamente homogeneizada en un solvente de polar, sobre una base de un material conductor aplicando una corriente del orden de los kilovoltios (kV) de manera que se forme un cono de Taylor que permita la formación de fibras (Velasco-Barraza *et al.*, 2016).

Generalmente los polímeros utilizados en el electrohilado para aplicaciones biomédicas o biotecnológicas son biodegradables y biocompatibles de manera que puedan estar en contacto con medios fisiológicos sin generar reacciones no deseadas. La poli (caprolactona) (PCL) es un polímero alifático semicristalino con la fórmula química $(C_6H_{10}O_2)_n$. Tiene un punto de fusión bajo (60 °C) y la temperatura de transición vítrea es de -60 °C. El PCL también tiene propiedades adecuadas tales como buena biocompatibilidad, buena biodegradabilidad, buena resistencia mecánica y notable tenacidad. Debido a su naturaleza hidrófoba, el PCL tiene una buena solubilidad en cloroformo y tetrahidrofurano (THF). Haciéndolo un candidato interesante para su utilización en biorreactores y medios de cultivo en biotecnología (Abdelrazek *et al.*, 2016). Por lo tanto, en este trabajo se utilizaron fibras electrohiladas de PCL con distintas fuentes de carbono y nitrógeno, así como Cúrcuma India con el objetivo de inducir la proliferación bacteriana y la formación de biopelículas.

II. MARCO TEÓRICO GENERAL

2.1 Bacterias de uso biotecnológico

Los microorganismos están presentes en casi todos los hábitats de la tierra. Los microbios han dado forma a nuestro planeta durante miles de millones de años y son los impulsores de los ciclos globales y locales de carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo que forman la base de la vida en nuestro planeta. La bioingeniería de organismos microbianos individuales o comunidades microbianas tiene un gran potencial en la agricultura, la biorremediación y la industria. Entre los metabolitos que estas micro fabricas producen podemos encontrar: Proteínas, enzimas industriales, pigmentos, alcoholes, fármacos, biopolímeros, entre otros (Sivasubramaniam & Franks, 2016). Algunas de estas bacterias de interés biotecnológico se describen a continuación.

2.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo, oxidasa negativo que ha recibido mucha atención debido a su uso como plataforma de las fábricas de células microbianas a causa de su alta tasa de crecimiento (que proporciona una mayor tasa de producción de metabolitos) y la capacidad de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono (Marzan *et al.*, 2017).

En condiciones anaeróbicas, *E. coli* produce de forma natural una mezcla de ácidos orgánicos, etanol e hidrógeno. La biotecnología aprovecha esto para producir succinato y lactato, y recientemente etanol e hidrógeno como biocombustibles potenciales. El hidrógeno molecular (H₂) es un portador de energía atractivo porque tiene una alta densidad energética y es respetuoso con el medio ambiente, ya que su combustión produce solo agua. El hidrógeno también es una materia prima importante para las industrias química, alimentaria, farmacéutica y algunas otras (Leon-rodriguez *et al.*, 2016).

2.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente

distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se halla colonizadas, aunque no infectadas, por ella. Esta bacteria ha probado ser una bacteria tolerante a metales pesados, con interés en la eliminación de cadmio, cromo, níquel y zinc, también para su uso en un efluente de refinería de petróleo (Endurance Oaikhena *et al.*, 2016), y, por último, se ha informado que es útil para la biorremediación de efluentes contaminados por tintes textiles (Abatenh *et al.*, 2017).

2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Las *pseudomonas* son bacterias Gram negativas, oxidasa positiva y móviles, de vida libre, de las cuales las mejor estudiadas son *P. putida* y *P. aeruginosa*. Prosperan en una variedad de hábitats, tanto terrestres como acuáticos. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que infecta los pulmones y es un agente importante de infecciones nosocomiales. Las *pseudomonas* son metabólicamente versátiles y pueden degradar una amplia gama de compuestos orgánicos y aromáticos, especialmente derivados del material vegetal degradado. Los compuestos aromáticos complejos se degradan a intermedios simples que se alimentan de una de las cuatro vías aromáticas centrales codificadas cromosómicamente (homogentisato, catecol, protocatecuato y fenilacetato), que son responsables de la escisión de los anillos aromáticos (Jiménez *et al.*, 2002).

Esta bacteria también puede ser útil en diversas aplicaciones biotecnológicas, como para producir biosurfactantes, metabolitos con actividad antimicrobiana, lipasas y para eliminar alcanos de cadena ramificada del agua contaminada con petróleo crudo (Bedoya *et al.*, 2019).

2.1.4 *Lactobacillus spp.*

Las bacterias del ácido láctico (LAB por sus siglas en inglés; Lactic acid bacteria) son microorganismos clave con un papel importante en la industria alimentaria y de fermentación. Entre las cepas LAB, *Lactobacillus plantarum* tiene una aplicación particularmente amplia en la industria alimentaria para mejorar la textura, esencia y conservación de los alimentos; por otro lado en el sector sanitario para la síntesis de bacteriocinas contra *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile* además de la producción

de ácido láctico (Jara *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2021). Los *Lactobacillus* spp. se utilizan comúnmente para producir productos fermentados de productos lácteos, salchichas, verduras y frutas. Por lo tanto, es importante preparar productos de *Lactobacillus* homofermentativos a altas concentraciones y con altos niveles de actividad. Sin embargo, el crecimiento de *Lactobacillus* spp. se inhibe fuertemente en condiciones de cultivo por lo que es importante buscar alternativas para su correcta proliferación (Cui *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2018).

2.2 Proliferación bacteriana

El ciclo celular es uno de los procesos más fundamentales en biología, subyacente a la proliferación y crecimiento de todos los organismos vivos. En las bacterias, el ciclo celular se ha estudiado exhaustivamente desde la década de 1950. Trabajos recientes muestran que, al modular su propio crecimiento y proliferación, las bacterias pueden aumentar su supervivencia en condiciones estresantes, incluido el tratamiento con antibióticos. Por lo cual es importante comprender el ciclo celular bacteriano y el control del crecimiento para futuras investigaciones, así como para otras disciplinas (Heinrich, Leslie, & Jonas, 2015).

2.2.1 Medición de la densidad bacteriana

La medición de la densidad bacteriana se puede realizar por dos tipos de métodos; métodos directos que consiste en contar células viables y no viables, y métodos indirectos que puede medir densidad óptica, productos celulares, o sustratos. La técnica de densidad óptica mide la masa de microorganismos en una suspensión con la ayuda de un espectrofotómetro y se mide la cantidad de luz que atraviesa en una suspensión de microorganismos, en comparación con un blanco que es el medio esterilizado y sin sembrar. Cuanto mayor es el número de células en suspensión, tanto menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio. Para relacionar la transmitancia con la densidad bacteriana se requiere de hacer curvas patrón de densidad conocidas (Brock & Madigan, 1993)

2.2.2 Tiempo de generación

Las principales reacciones de la síntesis celular son reacciones de polimerización, proceso por el cual los polímeros (macromoléculas) se sintetizan a partir de monómeros:

síntesis de ADN, ARN y proteínas; que una vez sintetizadas se ensamblan formando las estructuras celulares tales como la envoltura celular, flagelos, ribosomas, cuerpos de inclusión, etc. En la mayor parte de los microorganismos este crecimiento continúa hasta que las células se dividen en dos nuevas células. El tiempo que requiere una célula para completar su ciclo es muy variable y depende de factores nutricionales y genéticos. El intervalo que transcurre en la formación de dos células a partir de una célula se llama generación y el tiempo requerido para esto es el tiempo de generación (Mateos, 2021).

Tiempo de generación (G) es el tiempo requerido para que una célula se divida o una población se duplique y se calcula mediante la fórmula:

$$G = \frac{t}{n} \quad (1)$$

Donde G es el tiempo de generación, t es el tiempo transcurrido y n es el número de generaciones.

2.2.3 Curva de Crecimiento

Es la representación gráfica del logaritmo del número de células frente al tiempo. La curva teórica sería una recta pues los microorganismos estarían creciendo constantemente, pero en la práctica la curva presenta distintas fases:

Fase de latencia: período de adaptación de un microorganismo a un nuevo medio de cultivo.

Fase exponencial o logarítmica: aumento regular de la población que se duplica a intervalos regulares de tiempo (G).

Fase estacionaria: cese del crecimiento por agotamiento de nutrientes, por acumulación de productos tóxicos, etc.

Fase de declinación o muerte: el número de células que mueren es mayor que el número de células que se dividen.

Las propiedades de un microorganismo dependerán de la fase de la curva en que se encuentren (la producción de antibióticos se lleva a cabo en la fase estacionaria).

2.2.4 Metabolitos

Existen procesos metabólicos en la célula enfocados a la proliferación y crecimiento celular denominado metabolismo primario, que incluye todas las rutas bioquímicas e intermediarios (metabolitos primarios) en la obtención de energía, la reproducción celular y viabilidad. Estos intermediarios son producidos en la etapa activa de crecimiento o fase exponencial en la curva de crecimiento microbiano, siendo algunos de ellos ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, entre otros. Pero también existen procesos metabólicos que incluyen al metabolismo secundario el cual produce compuestos que comúnmente son excretados al medio donde crece la célula y que no poseen una importancia vital para la misma, obteniéndose a partir de la energía, intermediarios o productos finales del metabolismo primario principalmente en etapas donde el crecimiento es lento y sostenido. La biosíntesis de metabolitos secundarios ocurre generalmente debido a condiciones de agotamiento de nutrientes en el medio, diferenciación y esporulación. Algunos ejemplos de metabolitos secundarios generados en estos escenarios son los antibióticos, toxinas, alcaloides, entre otros (Cortés-Sánchez & Mosqueda-Olivares, 2013).

2.3 Electrohilado polimérico

El electrohilado es una técnica utilizada desde la década de los ochenta en la industria textil, esta permite obtener fibras muy delgadas de un amplio rango de materiales biopoliméricos. Esta técnica consiste en utilizar una fuente de alto voltaje con el fin de producir un campo electrostático que cambie la polaridad de una solución polimérica, induciendo de esta forma la eyección del líquido mediante un cono que llega al otro lado del campo electrostático y se deposita en un colector en manera de fibras extremadamente delgadas del orden de los micrómetros e incluso nanómetros (Figura. 1). La solución polimérica generalmente es mezclada con un solvente que al momento que es expulsada esta se evapora, dejando que el polímero se solidifique sobre el colector. Las soluciones utilizadas pueden tener distintos componentes además del solvente y el polímero, dependiendo de la aplicación para la cual la fibra se utilizará, como fármacos, precursores, enzimas, etc. (Mendes *et al.*, 2017; Haider *et al.*, 2015, Ahmed *et al.*, 2015).

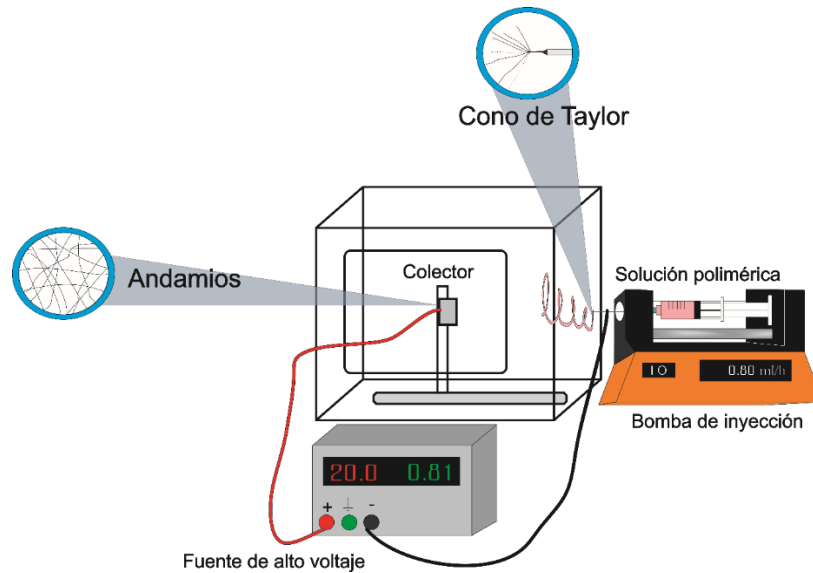


Figura 1. Esquema de electrohilado polimérico.

2.4 Poli (caprolactona)

La policaprolactona [Poli (ϵ -caprolactona)] o PCL (Figura. 2), es un polímero biodegradable sintético que tiene una gran variedad de usos, especialmente en la ingeniería de tejidos. El PCL se considera como un polímero caro, así que generalmente se mezcla con otros polímeros formando un copolímero con el fin de reducir costos y conseguir productos comercializables (Aliah & Ansari, 2017). Este poliéster cristalino tiene una gran ductilidad por su baja temperatura de transición vítrea, de -60°C , gracias a esto se considera un material ecológico que puede ser utilizado en materiales desechables para industria médica, de alimentos y agrícola (Bezerra *et al.*, 2016). El PCL presenta algunos inconvenientes, por ejemplo, aunque es biodegradable tiene una baja tasa de degradación y esta a su vez genera productos ácidos, además de su temperatura de fusión de 60°C ; para algunas aplicaciones tiene el inconveniente de tener una carga neutra.

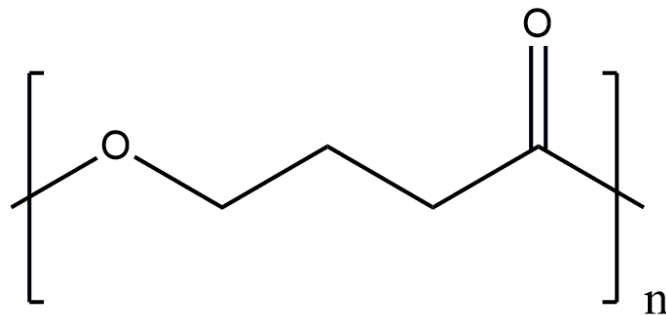


Figura 2. Estructura química de poli (caprolactona).

2.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscope*), es capaz de ofrecer al usuario imágenes detalladas de la estructura y morfología de la superficie de las muestras. Funciona a partir de un haz de electrones que bombardea a la muestra en forma de barrido, para poder visualizar las muestras orgánicas o bien biológicas, se requiere del uso de un recubrimiento de un material conductor, comúnmente de oro; ya que el choque de los electrones en el material conductor es lo que detecta el microscopio y se procesa por medio de un programa informático. Por lo cual es posible visualizar la estructura de las fibras, así como la formación de biopelículas en la superficie de estas.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la eficiencia del uso de andamios enriquecidos en la producción de biomasa y la producción de biopelículas en bacterias de uso biotecnológico.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar andamios electrohilados de PCL/CUR, así como películas en diferentes concentraciones.
- Sintetizar andamios electrohilados de PCL/Cs y películas, así como PCL/Ns.
- Evaluar la proliferación de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Lactobacillus spp.* en andamios y películas de PCL con distintas fuentes de Carbono y Nitrógeno.
- Evaluar la proliferación celular de las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. en andamios y películas de PCL adicionada con Curcumina como inductor del crecimiento.
- Evaluar la proliferación y formación de biopelículas en los andamios electrohilados mediante SEM.

IV. HIPÓTESIS

Los andamios producidos por electrohilado son eficientes para incrementar la producción de biomasa y biopelículas en las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Lactobacillus spp.*

CAPITULO II. Fibras PCL/Cs y PCL/Ns

V. MARCO TEÓRICO

5.1 Requerimientos nutricionales bacterianos

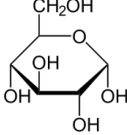
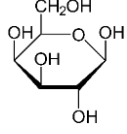
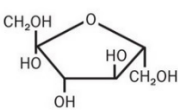
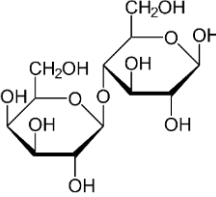
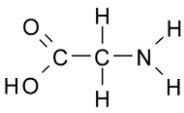
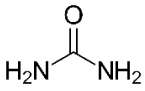
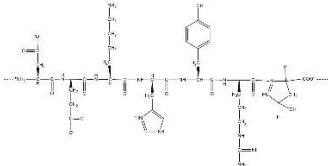
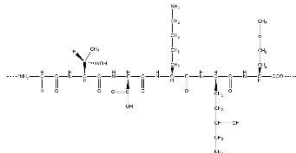
Como todos los organismos vivos, las bacterias deben adaptarse a su entorno. Su principal preocupación es encontrar los nutrientes que necesitan para sobrevivir. Para su supervivencia las bacterias necesitan de distintos tipos de nutrientes que permitirán el correcto funcionamiento de las rutas metabólicas, entre ellos tenemos a los macronutrientes como carbohidratos, lípidos, proteínas, así como micronutrientes (cofactores para las reacciones en la célula como Cu, Zn, Co, Mn y Mo), además de los factores de crecimiento y los factores estimulantes (De la Garza-Ramos & Alcázar-Pozaña, 2018). Una fuente de carbono asimilable es un requisito principal y, a excepción de las bacterias fototróficas (fotosintéticas) u otros autótrofos, esto significa alguna forma de compuesto de carbono orgánico. La capacidad de las bacterias para utilizar una increíble variedad de fuentes de carbono es indicativa de la igualmente amplia variedad de hábitats donde se encuentran (Plumbridge & Deutscher, 2019).

5.2 Fuentes de Carbono

Las fuentes de carbono suelen ser muy diversas, esto permite a los microorganismos la capacidad de colonizar nuevos hábitats, usando estas como materia prima para la captación de energía en forma de ATP, su capacidad de reducción y la biosíntesis de macromoléculas necesarias para la supervivencia. La mayoría de los estudios experimentales se han llevado a cabo en el entorno completamente artificial del matraz Erlenmeyer provisto de altas concentraciones de una sola fuente de carbono o una mezcla definida de nutrientes durante el crecimiento exponencial. Las bacterias en la naturaleza rara vez se encontrarán en un medio con abundante suministro y, en el mejor de los casos, pasarán entre momentos de niveles relativamente altos de nutrientes a una etapa en la que se hayan agotado y las bacterias deben buscar un nuevo suministro o esperar hasta que llegue más comida a su camino. Esto ha llevado al concepto de "fiesta o hambruna". En las últimas décadas se ha intentado imitar un estado más natural mediante el uso de limitación de carbono. Algunas fuentes de Carbono

se describen a continuación, mientras que sus estructuras moleculares pueden ser vistas en la Tabla 1.

Tabla 1. Estructura molecular de distintas fuentes de carbono y nitrógeno.

Nombre	Estructura
Glucosa	
Galactosa	
Fructosa	
Lactosa	
Glicina	
Urea	
Peptona*	
Extracto de levadura*	

* Imagen representativa de un péptido.

5.2.1 Glucosa

La glucosa es el azúcar de preferencia de muchas bacterias. La glucosa es un monosacárido con fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$. Es una hexosa, es decir, contiene 6 átomos de carbono, y es una aldosa, esto es, el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula (es un grupo aldehído). Es una forma de azúcar que se encuentra libre en las frutas y en la miel. Es un isómero de la galactosa, con diferente posición relativa de los grupos $-OH$ y $=O$. Algunas bacterias de uso industrial que utilizan la glucosa como fuente de carbono son *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Fuhrer, Fischer, & Sauer, 2005).

5.2.2 Galactosa

La galactosa es un monosacárido de la familia de las hexosas, es uno de los componentes de la lactosa y estereoisómero de la glucosa. La galactosa es un carbohidrato que no solo se encuentra en los productos lácteos como una subunidad de las moléculas de lactosa, sino también en muchos ambientes como cereales, frutas, legumbres, nueces, carnes, semillas y verduras. Está presente en forma libre o unido a otras unidades de carbohidratos en varios enlaces glicosídicos, como α -1,6, β -1,3 y β -1,4, y como componente de lípidos y proteínas en las células, las bacterias ácido lácticas metabolizan esta fuente de carbono (Iskandar *et al.*, 2019).

5.2.3 Fructosa

La fructosa de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, es una cetohexosa; cetosas porque contiene en su estructura un grupo oxo (grupo de cetonas) y hexosa por los 6 átomos de carbono. La fructosa es un monosacárido natural aislado por primera vez del azúcar de caña en 1847. Se encuentra en muchas frutas y verduras, siendo el azúcar predominante en manzanas, uvas, naranjas y sandías, además de comprender de hasta la mitad del total de azúcares en la miel (Barclay *et al.*, 2012). Esta fuente de carbono es utilizada por diversas bacterias para la producción de metabolitos tal es el caso de *Halomonas sp.* YLGW01 para

la producción de poli-3-hidroxibutirato (Park et al., 2020) y como materia prima para la formación de ácido láctico en bacterias ácido lácticas fructofílicas (Endo, Futagawa-Endo, & Dicks, 2009)

5.2.4 Lactosa

La lactosa es un disacárido que consiste en la combinación de dos azúcares simples, α / β -D-glucosa y β -D-galactosa, unidos por un enlace glucosídico β (1-4) y es la principal fuente de carbono en la leche. La utilización de lactosa está relacionada principalmente con los procesos de fermentación por LAB y está bien documentada (Chen *et al.*, 2015; Iskandar *et al.*, 2019).

5.3 Fuentes de nitrógeno

El ion amonio (NH_4^+) es un compuesto clave en la asimilación de nitrógeno en numerosos sistemas biológicos porque es la forma inorgánica de nitrógeno que se incorpora a los esqueletos de carbono. El amonio presente en el medio ambiente puede ser asimilado por muchas bacterias, levaduras, hongos, algas y plantas. Las soluciones de amonio siempre contienen amoníaco (NH_3), que puede difundirse a través de membranas biológicas. La difusión de amoníaco seguida de la captura de amonio intracelular por la glutamina sintetasa puede representar un proceso significativo para la adquisición de nitrógeno, especialmente en organismos como algunas bacterias que pueden crecer en medios alcalinos (Herrero & Flores, 2019).

5.3.1 Glicina

La glicina (Gly o G) es uno de los aminoácidos que forman las proteínas de los seres vivos. En el código genético está representada por los codones GGU, GGC, GGA o GGG. Es el aminoácido más pequeño y el único no quiral de los 20 aminoácidos presentes en la célula. Su fórmula química es $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ y su masa es 75,07. La glicina es un aminoácido no esencial (Herrero & Flores, 2019).

5.3.2 Urea

La urea es un compuesto orgánico simple presente en el océano, aguas dulces, así como en el suelo (en parte debido a su uso como fertilizante), con frecuencia en concentraciones micromolares o inferiores, y puede ser asimilado por bacterias pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos. Aunque la urea en concentraciones relativamente altas (milimolares) puede penetrar las membranas biológicas permitiendo al menos un crecimiento lento, también puede incorporarse a muchas bacterias mediante un transportador activo. Una vez dentro de la célula, la ureasa degrada la urea para producir CO₂ y amonio, que se incorpora al material orgánico (Herrero & Flores, 2019).

5.3.3 Peptona

Las peptonas son polipéptidos formados durante la degradación enzimática de proteínas. Son la principal fuente de nitrógeno en el medio orgánico para el cultivo de bacterias. Contienen aminoácidos libres y cadenas cortas de péptidos, y a veces carbohidratos. Es soluble en agua e insoluble en etanol y éter. Una de sus aplicaciones es la producción de levanos con *Bacillus subtilis* MTCC 441 como principal fuente de nitrógeno (Veerapandian, Ramiah, & Varadhan, 2020).

5.3.4 Extracto de levadura

El extracto de levadura es un autolizado de células de levadura utilizadas en la preparación de medios de cultivo microbiológicos en un entorno de laboratorio, es la porción soluble en agua de la levadura autolizada. La autólisis se controla cuidadosamente para preservar las vitaminas del complejo B de origen natural siendo un excelente estimulador del crecimiento bacteriano. Extracto de levadura se emplea generalmente en la concentración de 0,3% - 0,5%. El extracto de levadura ha sido exitoso en medios de cultivo para estudios bacterianos en leche y otros productos lácteos además se ha visto favorecida la fotoproducción de hidrógeno por *Rhodobacter sphaeroides* en medios adicionados con extracto de levadura (Hakobyan, Gabrielyan, & Trchounian, 2012).

VI. ANTECEDENTES

La gran mayoría de la investigación en electrohilado polimérico y bacterias se basa en la encapsulación de compuestos bioactivos o bacterias y virus en la matriz de las fibras electrohiladas, a continuación, se describen distintas investigaciones, sin embargo, poco se sabe de la proliferación de estas bacterias sobre la superficie de las fibras.

En una investigación realizada en 2006, se encapsularon bacterias y virus en nanofibras de polímero electrohilado. Las bacterias y los virus se suspendieron en una solución de PVA en agua y se sometieron a un campo electrostático del orden de 1 kV cm^{-1} . Las bacterias encapsuladas en este trabajo (*Escherichia coli*, *Staphylococcus albus*) y los virus bacterianos (T7, T4, λ) lograron sobrevivir al proceso de electrohilado manteniendo su viabilidad en niveles bastante altos. Posteriormente, las bacterias y los virus permanecen viables durante tres meses a -20 y -55 °C sin una mayor disminución en el número. Estos resultados demuestran el potencial del proceso de electrohilado para la encapsulación e inmovilización de material biológico vivo (Salalha, Kuhn, Dror, & Zussman, 2006).

Aunque los microorganismos se han utilizado en aplicaciones industriales y de nicho durante varias décadas, la inmovilización exitosa de estos microorganismos de utilidad para cualquier aplicación biotecnológica es escasa. Un sistema funcionalmente bioactivo de este tipo tiene distintas ventajas sobre los sistemas de reactores microbianos de flujo continuo y discontinuos convencionales que se utilizan en diversos procesos biotecnológicos. Liu *et al.*, utilizaron fibras poliméricas en tribloque de óxido de polietileno 99, óxido de polipropileno 67 y óxido de polietileno 99, creadas mediante electrohilado, para encapsular microorganismos de 3 géneros industrialmente relevantes, *Pseudomonas*, *Zymomonas* y *Escherichia*. La presencia de bacterias en el interior de las fibras se confirmó mediante microscopía de fluorescencia y SEM. Los microorganismos encapsulados fueron viables durante varios meses y su actividad metabólica no se vio afectada por la inmovilización; por tanto, podrían utilizarse en diversas aplicaciones, la matriz activa de microorganismos encapsulados permite un intercambio eficaz de nutrientes y productos metabólicos entre el microorganismo y el medio ambiente (Liu, Rafailovich, Malal, Cohn, & Chidambaram, 2009).

En otro estudio, se muestra la aplicación de la técnica de electrohilado como un método viable para la encapsulación y estabilización de cepas bifidobacterianas. Se usó PVA como material de encapsulación porque generalmente se reconoce como seguro, tiene una alta barrera al oxígeno cuando está seco y es soluble en agua, lo que permite una fácil recuperación de las bacterias para las pruebas de viabilidad. Se utilizó una configuración coaxial para la encapsulación, y las fibras electrohiladas así obtenidas tenían un diámetro medio de aprox. 150 nm. La incorporación de *B. animalis Bb12* condujo a una disminución del punto de fusión y cristalinidad de las fibras de PVA y a un aumento de la temperatura de transición vítrea del polímero. Las pruebas de viabilidad, realizadas a tres temperaturas diferentes (temperatura ambiente, 4 y -20 °C) mostraron que *B. animalis Bb12* encapsulado dentro de las fibras de PVA permaneció viable durante 40 días a temperatura ambiente y durante 130 días a temperatura de refrigeración, mientras que se observó una disminución significativa de la viabilidad en ambos casos cuando las bacterias no estaban encapsuladas (López-Rubio, Sanchez, Sanz, & Lagaron, 2009).

La técnica de electrohilado también se ha utilizado en la inmovilización de rizobios en nanofibras de alcohol polivinílico (PVA) como una alternativa innovadora y prometedora para reducir los efectos nocivos del estrés ambiental sobre las cepas bacterianas en un posible producto de nanotecnología inoculante para uso en agricultura. El objetivo de estos estudios fue evaluar la supervivencia de rizobios incorporados en nanofibras de PVA que fueron aplicadas a semilla de soja y luego sometidas a diferentes tiempos de almacenamiento y exposición a un fungicida. También se evaluó el mantenimiento de las características simbióticas de las cepas bacterianas incorporadas, notándose la formación de nódulos en las plántulas de soja. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia celular a tiempo cero y después de 24 h de almacenamiento. Después de 48 horas, se observó una diferencia significativa en la concentración de células bacterianas de las semillas fijadas con nanofibras de PVA. La exposición al fungicida disminuyó la viabilidad de las cepas de bacterias incluso cuando estaban recubiertas con nanofibras. Se observó un mayor número de nódulos formados en plántulas de soja inoculadas con rizobios incorporados en nanofibras de PVA en comparación con las semillas inoculadas. Mostrando que la técnica de electrohilado es una gran alternativa a los inoculantes protectores habituales por presentar la

capacidad sin precedentes para controlar la liberación de bacterias (Damasceno, Roggia, Pereira, & de Sá, 2013).

Nagy *et al.*, investigaron la idoneidad del electrohilado para la administración de biofármacos y desarrollaron un método basado en el electrohilado para producir sistemas de administración de fármacos por vía vaginal. Se encapsularon bacterias *Lactobacillus acidophilus* en nanofibras de tres polímeros diferentes [poli (vinil alcohol) y poli (vinil pirrolidona)] con dos masas molares diferentes). La vida útil de las bacterias podría mejorarse excluyendo el agua y preparando una forma de dosificación sólida, que es una forma de administración ventajosa y agradable para el paciente. Las formulaciones se almacenaron a -20, 7 y 25 °C, respectivamente. Las pruebas de viabilidad demostraron que las nanofibras pueden proporcionar estabilidad a largo plazo para grandes cantidades de bacterias vivas si se mantienen a 7 °C o menos. Además, todos los tipos de nanoredes preparadas en este trabajo se disolvieron instantáneamente cuando entraron en contacto con el agua, por lo que pueden proporcionar nuevas formas potenciales para curar la vaginosis bacteriana (Nagy *et al.*, 2014).

En otro estudio se produjeron tapetes biocompuestos fibrosos remediadores de cromo hexavalente a través de la inmovilización de una cepa bacteriana reductora de cromo hexavalente, *Morganella morganii STB5*, sobre la superficie de telas de poliestireno y polisulfona electrohiladas. Las membranas con biocompuestos inmovilizados con bacterias han mostrado rendimientos de eliminación de 93,60 y 93,79% para 10 mg / L, 99,47 y 90,78% para 15 mg / L y 70,41 y 68,27% para 25 mg / L de cromo hexavalente inicial en 72 h, respectivamente y podría reutilizarse durante al menos cinco ciclos. Los resultados de las pruebas de almacenamiento indican que los tapetes biocompuestos pueden almacenarse sin perder su capacidad de bioextracción. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los tapetes de biocompuestos demuestran que las biopelículas de *M. morganii STB5* se adhieren fuertemente a las superficies poliméricas fibrosas y se retienen después de ciclos repetidos de uso. En general, los resultados sugieren que los tapetes de biocompuestos fibrosos inmovilizados con bacterias reutilizables podrían ser aplicables para la remediación continua de cromo hexavalente en sistemas de agua (Sarioglu, Celebioglu, Tekinay, & Uyar, 2016).

En los últimos tiempos, las nanofibras electrohiladas se han estudiado ampliamente desde varios enfoques biotecnológicos; En este trabajo se electrohilaban soluciones de poli

(ácido acrílico) mezcladas con quitosano y alginato con el fin de determinar el comportamiento de estas fibras al ser utilizadas en combinación con bacterias, se incubaron diferentes muestras con las cepas bacterianas: *Streptomyces spp.*, *Micromonospora spp.* y *Escherichia coli*, se realizó una prueba de absorbancia a 600 nm. Las fibras demostraron características adecuadas para ser utilizadas como biorreactor bacteriano (Velasco-barraza et al., 2017).

Otro estudio, muestra la preparación y aplicación de nuevos materiales biocompuestos para la eliminación de tintes textiles que se producen mediante la inmovilización de bacterias específicas sobre telas nanofibrosas electrohiladas. Se seleccionó un aislado bacteriano remediador de tinte textil, *Clavibacter michiganensis*, para la inmovilización bacteriana, se seleccionó un tinte textil reactivo comercial, Setazol Blue BRF-X, como el contaminante objetivo y policaprolactona electrohilada (PCL) y telas poliméricas nanofibrosas de ácido poliláctico (PLA) fueron seleccionados para la integración bacteriana. La adhesión de las bacterias a las bandas nanofibrosas se controló mediante imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) y se realizaron mediciones de densidad óptica (DO) para las bacterias desprendidas. Después de lograr cantidades suficientes de bacterias inmovilizadas en telas nanofibrosas electrohiladas, se utilizaron muestras de telas equivalentes para probar las capacidades de eliminación de tinte. Tanto las redes de bacterias / PCL como las de bacterias / PLA han demostrado una remediación eficaz del tinte Setazol Blue BRF-X en 48 h en cada concentración probada (50, 100 y 200 mg / L), y su rendimiento de eliminación fue muy similar a las células de las bacterias libres. Las redes inmovilizadas con bacterias se analizaron cinco veces para su reutilización a una concentración de colorante inicial de 100 mg/L, y se determinó que eran potencialmente reutilizables con una mayor inmovilización bacteriana y capacidades de eliminación de colorante más rápidas al final de la prueba, estos hallazgos sugieren que las redes nanofibrosas electrohiladas son plataformas disponibles para la integración bacteriana y las redes inmovilizadas por bacterias pueden usarse como inóculos de partida para su uso en la remediación de tintes textiles en sistemas de aguas residuales (Sarioglu, Keskin, Celebioglu, Tekinay, & Uyar, 2017a).

Por otro lado, las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos producidos a partir de la degradación enzimática del almidón en forma de polvo blanco que tiene la capacidad de transformarse en forma de fibra electrohilada ultradelgada mediante la técnica de electrohilado. Las fibras de ciclodextrina electrohiladas (CD-F) pueden ser materiales bastante atractivos para encapsular bacterias con fines de biorremediación. Las CD-F no solo sirvieron como matriz portadora, sino que también como fuente de alimentación para las bacterias encapsuladas. Las propiedades naturales y no tóxicas de las CD-F proporcionan una mejor viabilidad bacteriana para el biocompuesto fibroso. Las bacterias encapsuladas en CD-F exhiben viabilidad celular durante más de 7 días en condiciones de almacenamiento de 4 °C. Además, se probó la capacidad de biorremediación de bacterias/biocompuestos CD-F para el tratamiento de metales pesados (níquel (II) y cromo (VI)) y colorantes textiles (Reactive Black 5, RB5). El biocompuesto de bacterias / CD-F demostró una eficiencia de eliminación de Ni (II), Cr (VI) y RB5 de $70 \pm 0,2\%$, $58 \pm 1,4\%$ y $82 \pm 0,8$, respectivamente. La capacidad de eliminación de contaminantes de las bacterias / CD-F fue mayor en comparación con las bacterias libres, ya que las bacterias pueden usar CD como una fuente de carbono adicional que promueve su tasa de crecimiento. Este estudio demuestra que las CD-F son plataformas adecuadas para la encapsulación de células bacterianas para desarrollar nuevos biocompuestos que tengan capacidades de biorremediación para el tratamiento de aguas residuales (Sarioglu, Keskin, Celebioglu, Tekinay, & Uyar, 2017b)

Otro estudio, describe la preparación y aplicación de nuevos materiales biocompuestos que fueron producidos por encapsulación de células bacterianas dentro de redes nanofibras electrohiladas. Se seleccionó una cepa comercial de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 47085 que tiene capacidad de remediación del colorante azul de metileno (MB) para la encapsulación, y se seleccionaron poli (vinil alcohol) (PVA) y poli (óxido de etileno) (PEO) como matrices poliméricas para el electrohilado de redes nanofibras encapsuladas en bacterias. La encapsulación de las células bacterianas se controló mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fluorescencia, y se comprobó la viabilidad de las bacterias encapsuladas mediante tinción viva / muerta y ensayo de recuento de células viables. Tanto las redes de bacterias / PVA como las de bacterias / PEO han mostrado un gran potencial para la remediación de MB. Las bacterias encapsuladas en redes nanofibras electrohiladas se almacenaron a 4 ° C durante tres meses y se descubrió que

eran potencialmente almacenables para mantener vivas las células bacterianas encapsuladas. En general, los resultados sugieren que las redes de nanofibras hiladas eléctricamente son plataformas adecuadas para la conservación de células bacterianas vivas y pueden usarse directamente como inóculo inicial para la biorremediación de sistemas de agua (Sarioglu et al., 2017b).

Los *Streptomyces* se explotan para la producción de una amplia gama de metabolitos secundarios, incluidos los antibióticos. Por lo tanto, los esfuerzos de investigación tanto académicos como industriales se centran en mejorar la producción de estos preciosos metabolitos. Hasta ahora, esto se ha logrado principalmente mediante técnicas genéticas clásicas o recombinantes, en asociación con la optimización del proceso para fermentación sumergida o en estado sólido. Los nuevos enfoques de cultivo que abordan el crecimiento y el ciclo de vida del micelio natural permitirían aprovechar mucho mejor el potencial biosintético de las cepas filamentosas. *Moffa et al.*, desarrollaron un sistema de cultivo para microorganismos productores de antibióticos que involucra nanofibras orgánicas electrohiladas depositadas en placas de agar o sumergidas en medios líquidos. Se encontró que densas redes filamentosas de hifas ramificadas formadas por colonias bacterianas se envolvían alrededor de las fibras. Se analizaron los efectos de las fibras sobre el crecimiento y la producción de antibióticos en *Streptomyces lividans*, y se encontró que las producciones de antibióticos dependientes de actinorrodina, undecilprodigiosina y calcio se modulaban positivamente, con una mejora de dos a seis veces en comparación con las condiciones de cultivo estándar. Destacando el papel promotor del metabolismo secundario de las nanofibras en cultivos bacterianos, estos resultados abren una ruta para el diseño de sistemas de cultivo mejorados para microorganismos basados en nanoestructuras orgánicas (Moffa et al., 2017)

Las bacterias del ácido láctico pueden tener efectos beneficiosos para la salud y se pueden utilizar para el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, sigue existiendo el desafío de encapsular probióticos en sistemas de administración con una alta viabilidad y eficacia de encapsulación. El electrohilado de bacterias es un método nuevo y poco estudiado, y se necesita una mayor investigación de su potencial prometedor en este trabajo se estudiaron las características de crecimiento de nueve especies diferentes de *Lactobacillus* y una de *Lactococcus spp.* Se electrohilieron soluciones poliméricas que contenían ~ 10 log unidades formadoras de colonias (UFC)/mL de bacterias ácido lácticas permitiendo la incorporación exitosa de todas las especies bacterianas probadas, desde la más pequeña (0,74

m; *Lactococcus lactis*) hasta la más grande (10,82 m; *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*), en nanofibras de poli (óxido de etileno) con un diámetro promedio de ~ 100 nm. Todos estos lactobacilos fueron viables después de la incorporación en nanofibras, con una pérdida de viabilidad de 0 a 3 log UFC/mg, dependiendo de la especie. La viabilidad se correlacionó con la hidrofobicidad y la longitud extrema de las bacterias del ácido láctico. El electrohilado representa un método prometedor para la incorporación de bacterias del ácido láctico en sistemas de suministro de sólidos (Zupancic, Skrlec, Kocbek, Kristl, & Ales, 2019).

Por otro lado, Ma *et al.* en el 2021, prepararon nanofibras basadas en goma arábica (GA) y se caracterizaron en combinación con pululano (PUL) mediante electrohilado por primera vez, para la encapsulación de *Lactobacillus*. Las nanofibras electrohiladas GA / PUL 20:80 cargadas con *Lactobacillus* mostraron una mejor supervivencia probiótica (85,38 a 97,83%) en comparación con la liofilización (80,92 a 89,84%) y conservaron la viabilidad durante 28 días de almacenamiento a 4 °C. La aplicación de nanofibras GA/PUL con características prebióticas proporciona un nuevo enfoque para la protección eficaz de los probióticos (Ma *et al.*, 2021).

Para utilizar el efecto de los probióticos en la cavidad oral, se preparó una forma de dosificación de *Lactobacillus paracasei* de fácil aplicación y disolución oral mediante electrohilado de alta velocidad. La tecnología de secado electrostático ampliada dio como resultado una alta productividad de fibras submicrónicas de rápida disolución. Para minimizar la pérdida de viabilidad de las bacterias, se desarrollaron sistemas de polímeros a base de poli (alcohol vinílico)-poli (óxido de etileno) combinados con diferentes excipientes estabilizantes (glucosa, lactosa, manitol, sacarosa, trehalosa, inulina y leche desnatada). El uso de excipientes fue exitoso para disminuir el estrés osmótico y por deshidratación mientras aumentaba la supervivencia bacteriana durante el electrohilado y el almacenamiento a largo plazo. La aplicación de trehalosa, sacarosa y leche desnatada como excipiente estabilizador proporcionó una supervivencia bacteriana del 80% o más durante el electrohilado; además, en las formulaciones que contienen leche desnatada y manitol se detectó una pérdida de viabilidad de 0,5 unidades logarítmicas y 0,2 unidades logarítmicas después de un año. La leche descremada mostró los mejores resultados considerando la tasa de supervivencia y la estabilidad a largo plazo: después de 1 año de almacenamiento, se midió un recuento celular

de $7,4 \times 10^9$ UFC/g a 7°C y $1,56 \times 10^{10}$ UFC/g a -20°C (la carga inicial fue de $2,7 \times 10^{10}$ CFU/g). Por lo tanto, el electrohilado con excipientes bien seleccionados proporciona un sistema adecuado que puede mantener una alta viabilidad de las células probióticas durante el almacenamiento a largo plazo (Hirsch et al., 2021).

VII. METODOLOGÍA

7.1 Materiales

Se utilizó Poli (ϵ -caprolactona) PM ~ 80000 (Sigma Aldrich, CAS: 24980-41-4), para realizar los andamios y películas. Como solventes para la disolución del polímero se utilizó metanol ACS (Fermont, CAS: 67-56-1), tetrahidrofurano (Tecsiquim, CAS: 109-99-9), cloroformo (Fermont, PQ06201) y etanol (ACS, Sigma Aldrich, CAS: 64-17-5).

Para las muestras PCL/Cs se utilizó glucosa (Sigma Aldrich, CAS: 50-99-7), fructosa (Sigma Aldrich, CAS: 57-48-7), galactosa (Sigma Aldrich, CAS: 59-23-4) y lactosa (Sigma Aldrich, CAS: 63-42-3), y para las muestras PCL/Ns: peptona (Sigma Aldrich, CAS: 73049-73-7), glicina (Sigma Aldrich, CAS: 56-40-6), extracto de levadura (Sigma Aldrich, CAS: 8013-01-2) y urea (Sigma Aldrich, CAS: 57-13-6) sin modificaciones previas para el proceso de electrohilado y la formación de películas.

Para el ensayo de proliferación se utilizaron cepas bacterianas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus spp.* (ATCC 49342) en caldo nutritivo No. 1 (Sigma Aldrich).

7.2 Métodos

7.2.1 Preparación de soluciones PCL/Cs y PCL/Ns

Las muestras con fuentes de carbono y nitrógeno (Tabla 2) se prepararon disolviendo en metanol el 0.16% p/v en viales de borosilicato, posteriormente se agitó por magnetismo a 500 rpm por dos horas a 50 grados, después de disolver las fuentes se agregó tetrahidrofurano (3:1 v/v) y 13% de PCL la mezcla completa se disolvió por agitación magnética a 500 rpm por 5 horas a la misma temperatura. Para el control PCLc se utilizó una solución tetrahidrofurano:metanol (3:1 v/v) y PCL al 13% en las mismas condiciones de agitación.

Tabla 2. Composición de fibras y películas de PCL/Cs y PCL/Ns

Nombre de la muestra	Soluciones con Cs	Nombre de la muestra	Soluciones con Ns
PCL	PCL (Control)	PCL	PCL (Control)
PCL/Glu	PCL y Glucosa	PCL/Pep	PCL and Peptona
PCL/Lac	PCL y Lactosa	PCL/Gly	PCL and Glicina
PCL/Fru	PCL y Fructosa	PCL/Yea	PCL y Extracto de levadura
PCL/Gal	PCL y Galactosa	PCL/Ure	PCL y Urea

Cs: Fuentes de Carbono; Ns: Fuentes de Nitrógeno.

7.2.2 Electrohilado polimérico

La solución de PCLc así como aquellas con PCL/Cs y PCL/Ns se electrohilaron a 20 kV por una hora, con una distancia de 18 cm entre el colector de metal recubierto de aluminio y la punta de la jeringa (21G) con un flujo de 3 mL/h, una temperatura de 25 – 32 °C y humedad relativa de 30 – 50%.

7.2.3 Síntesis de películas

Todas las películas fueron preparadas utilizando las mismas soluciones stock del electrohilado, vertiendo 3 mL en cajas Petri de borosilicato (35 mm) y dejando secar los solventes por la noche en una campana de extracción de gases, sin más modificaciones.

7.2.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

De las fibras fabricadas, se recortaron segmentos de 0.5 cm x 0.5 cm para evaluar la morfología y porosidad de los andamios. Posteriormente se fijaron a colectores con cinta adhesiva metálica y se recubrieron con partículas de oro por medio de pulverización catódica.

Para las muestras con bacterias, se cultivaron bacterias y andamios a 3 y 6 h. Una vez concluido el tiempo de incubación, los andamios se recuperaron y se colocaron en portaobjetos previamente bañados en una solución de gelatina al 5% con el objetivo de adherir las muestras. Después, se secaron a temperatura ambiente por un día y finalmente se recubrieron por pulverización.

7.2.5 Ensayo de proliferación

Las fibras electrohiladas y películas fueron cortadas en círculos de 5 mm de diámetro usando una perforadora y posteriormente esterilizados por exposición a radiación de luz ultravioleta (254 nm) por 5 min de cada lado. Al finalizar el proceso de esterilización se colocaron al fondo de una placa de 96 pocillos como se indica en la Figura 3. Se realizaron 3 placas diferentes para cada una de las cepas con la finalidad de revisar el crecimiento a 24, 48 y 72 h.

	Fibras						Filmes					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		PCLc	PCL/Lac	PCL/Fru	PCL/Ure	PCL/Pep		PCLc	PCL/Lac	PCL/Fru	PCL/Ure	PCL/Pep
B		PCLc	PCL/Lac	PCL/Fru	PCL/Ure	PCL/Pep		PCLc	PCL/Lac	PCL/Fru	PCL/Ure	PCL/Pep
C		PCLc	PCL/Lac	PCL/Fru	PCL/Ure	PCL/Pep		PCLc	PCL/Lac	PCL/Fru	PCL/Ure	PCL/Pep
D		PCL/Glu	PCL/Gal	PCL/Yea	PCL/Gly	Medio		PCL/Glu	PCL/Gal	PCL/Yea	PCL/Gly	Medio
E		PCL/Glu	PCL/Gal	PCL/Yea	PCL/Gly	Medio		PCL/Glu	PCL/Gal	PCL/Yea	PCL/Gly	Medio
F		PCL/Glu	PCL/Gal	PCL/Yea	PCL/Gly	Medio		PCL/Glu	PCL/Gal	PCL/Yea	PCL/Gly	Medio
G		C+	C+	C+	C+	C+		C+	C+	C+	C+	C+
H		C-	C-	C-	C-	C-		C-	C-	C-	C-	C-

Figura 3. Disposición de muestras en placa de 96 pocillos.

Las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) y *Lactobacillus spp.* criopreservadas en glicerol se cultivaron previamente en Caldo Nutritivo N. 1 por 24 h a 35 °C en tubos de 5 mL, al verificar su crecimiento las cepas fueron estandarizadas a 0.5 McFarland (Absorbancia de 0.132 a 600 nm, 1.5×10^8 CFU/mL) con solución fisiológica al 0.85%.

Para el proceso de montaje de placa 150 µL de caldo nutritivo N. 1 se colocó en todos los pocillos de las placas y alícuotas de 50 µL de las cepas de estudio (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Lactobacillus spp.*) en todos los pocillos con excepción de los pocillos de medio que se trató como blanco de lectura. Como control positivo (C+) se empleó medio de cultivo inoculado con la cepa de estudio y como control negativo (C-) se utilizó gentamicina (10 mg/mL), las placas se incubaron a 35°C por 24, 48 y 72 h según correspondiera.

Al finalizar el periodo de incubación, las fibras y películas se retiraron de los pocillos con pinzas estériles y colocados en una nueva placa para posteriormente ser lavados con 200 μL de medio limpio, las fibras y películas se descartaron y ambas placas fueron leídas en un lector de microplaca (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 600 nm., finalmente se calculó el porcentaje de proliferación como:

$$\text{Porcentaje de proliferación (\%)} = \frac{\text{O.D.muestra (fibra o película)} \times 100}{\text{O.D. C+}} \quad (1)$$

7.2.6 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente. Los resultados se expresaron como el promedio de las mediciones \pm desviación estándar. Los datos fueron evaluados utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía), utilizando el programa Graph Pad Prism versión 6.0c. Los resultados son considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

IIX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Microscopia electrónica de Barrido (SEM)

Las bacterias comprenden la mayor parte de la biomasa de la tierra, realizando funciones importantes en entornos naturales y artificiales, así como en organismos vivos y dentro de ellos. A pesar de sus innumerables funciones beneficiosas, el crecimiento incontrolado de bacterias sigue siendo una gran amenaza para la humanidad, planteando varios problemas en la salud pública y la industria. En plantas, animales y seres humanos, las bacterias son los agentes causantes de diversas infecciones cuyo tratamiento sigue siendo un desafío; en la industria, el riesgo de contaminación asociado con el crecimiento bacteriano requiere estrategias de prevención de alto costo, por otro lado muchas de ellas nos permiten obtener metabolitos secundarios que de otra manera serían muy difícil o incluso imposible de obtener, por lo que el control de su crecimiento no solo su eliminación es de vital importancia para la industria biotecnológica. Las bacterias son los organismos de crecimiento más rápido. En condiciones óptimas, muchos pueden duplicarse en un tiempo asombroso de menos de 20 minutos durante un número aparentemente interminable de generaciones. Por otro lado, en condiciones adversas como la privación de nutrientes, las bacterias ralentizan o detienen por completo su proliferación, uno de los mecanismos que estas utilizaron para sobrevivir condiciones adversas y producir metabolitos es la producción de biofilms (Lewis, 2007; Wood, Knabel, & Kwan, 2013).

En este ensayo se probó la formación de biofilms en los andamios de PCL con *Staphylococcus aureus* debido a que en estudios preliminares la cepa mostró un incremento mayor de proliferación con respecto a las otras cepas.

Las fibras de PCL sin inocular tienen una apariencia bastante uniforme (Fig. 8A). En determinados puntos las fibras cambian de diámetro y presentan ligeros defectos en su morfología. Una mirada más cercana al material muestra que los defectos se deben a la fusión del polímero, posiblemente debido a cambios en el medio ambiente y transporte del material (Fig. 8B-C). El diámetro medio de la fibra fue de 984 ± 241 nm con un porcentaje de porosidad de aproximadamente 44,31%.

La Fig. 8D muestra fibras en cultivo bacteriano con caldo de mínimas sales, después de tres horas de cultivo comienza a desarrollarse una cubierta en los poros de PCL y entre las fibras, posiblemente indicando el desarrollo de biopelícula de *Staphylococcus aureus* en el andamio. Al evaluar las imágenes a 4,000X y 6,000X (Fig. 8E-F), el recubrimiento solo aparece translúcido y amorfo. En la parte superior de la Fig. 8F se puede observar una formación irregular en capas sobre la fibra, este comportamiento es similar al observado en la Fig. 8E, se pueden observar racimos en las fibras con forma de pequeñas esferas.

A las seis horas, el andamio ha "desaparecido" pues la superficie ha sido recubierta y sólo las fibras más gruesas parecen permanecer en la superficie. En la Fig. 8G-I, se observó una topología irregular en la que no se puede observar ningún rastro de las fibras, se pueden ver formaciones irregulares y amorfas debido a la colonización de las bacterias en la superficie del andamio, y la liberación de sustancias exopoliméricas para la formación del biofilm, sin embargo se recomienda realizar un ensayo de cuantificación con proteínas asociadas a los biofilms como método de cuantificación de la producción de la biopelícula como lo es la proteína Bap para *Staphylococcus aureus*, que promueve la adhesión a superficies bióticas y abióticas (Latasa, Solano, Penadés, & Lasa, 2006).

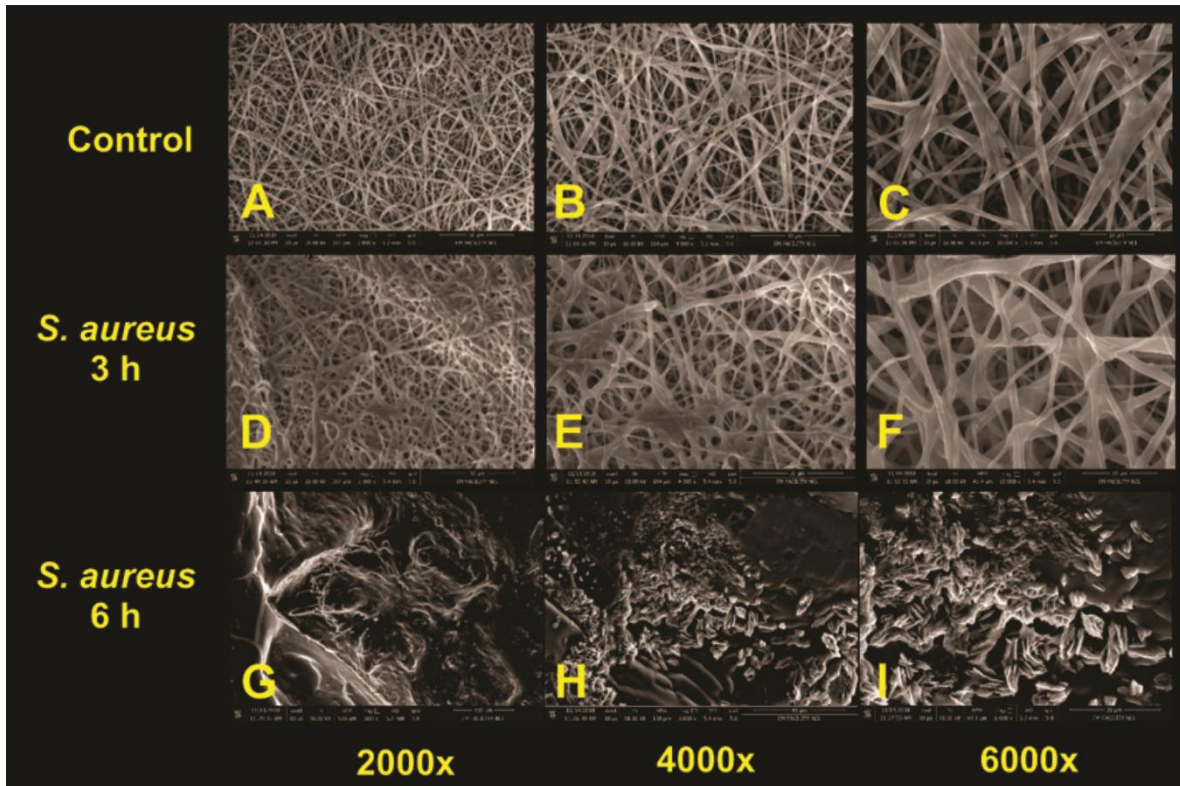


Figura 4. Micrografía análisis de proliferación de biofilms en *S. aureus* a 3 y 6 h.

Zeng *et al.*, realizaron una investigación en los efectos de bloques de PCL funcionalizados con quitosano para probar los efectos antibacterianos de este último en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, al evaluar la actividad antimicrobiana de los bloques de PCL solo, no se encontró ninguna diferencia en el crecimiento de estas cepas, sin embargo la estructura de estos bloques no era en forma de fibrillas, sino de películas sin grandes irregularidades en su superficie (Zeng, Wang, Li, Guo, & Chen, 2020).

Staphylococcus aureus V329 ha sido probada por su propiedad para tolerar el uranio IV mediante propiedades que adquiere al desarrollar biofilms y la actividad de la enzima fosfatasa ácida, reduciendo hasta un 47% del uranio IV en una solución de 10 ppm, para esto fue necesario adicionar fosfatos a una solución de nitrato de uranilo (Shukla, Hariharan, & Rao, 2020)

Por otro lado, *Staphylococcus aureus* y otras bacterias patógenas se han probado como bacterias tolerantes a metales pesados, con interés en la eliminación de cadmio, cromo,

níquel y zinc, para su uso en el efluente de una refinería de petróleo (Endurance-Oaikhena et al., 2016). Además, se ha informado que puede ser útil para la biorremediación de aceite en tintes de tina en efluentes textiles, etc. (Abatenh *et al.*, 2017). Por lo tanto, un aumento en la producción de biomasa de estas bacterias puede ser eficaz para la producción de todos los metabolitos antes mencionados. Aunado a esto la producción de biofilms sobre superficies membranosas estables puede hacer posible la reutilización y disposición de los andamios al haber concluido su capacidad biorremediadora.

8.2 Ensayo de proliferación en fibras y películas de PCL/Cs

En este ensayo se evaluó la proliferación de distintas cepas de interés biotecnológico expuestas a fibras electrohiladas de PCL con distintas fuentes de carbono (glucosa, lactosa, galactosa y fructosa) en contraste a películas de superficie lisa con las mismas concentraciones que las fibras, esto con el propósito de evaluar el incremento en la proliferación debido al andamio de PCL y también la posible relación entre las fuentes de carbono y dicho crecimiento.

En primera instancia se trabajó con *E. coli*, como cepa de interés biotecnológico, en este caso la presencia de fibras o películas no tuvo impacto en términos de mejorar el crecimiento de las bacterias en comparación al control positivo de crecimiento que fue el cultivo sin alterar, el control negativo que fue una concentración de 0.2 mg/mL de gentamicina nos muestra que ninguna fibra o película tiene actividad antimicrobiana como era de esperarse. Sin embargo, la mayor parte de las muestras mostraron una disminución en la proliferación, el mayor aumento fue del 26% para las fibras de PCL/Gal a las 72 h de exposición, seguido del 23% para las películas de PCL/Fru en el mismo tiempo de exposición por lo que la matriz compuesta de fibras electrohiladas no tienen un gran impacto en el crecimiento comparado con el crecimiento en las películas y además las distintas fuentes de carbono no tienen una gran impacto en la proliferación de esta cepa (Figura 5).

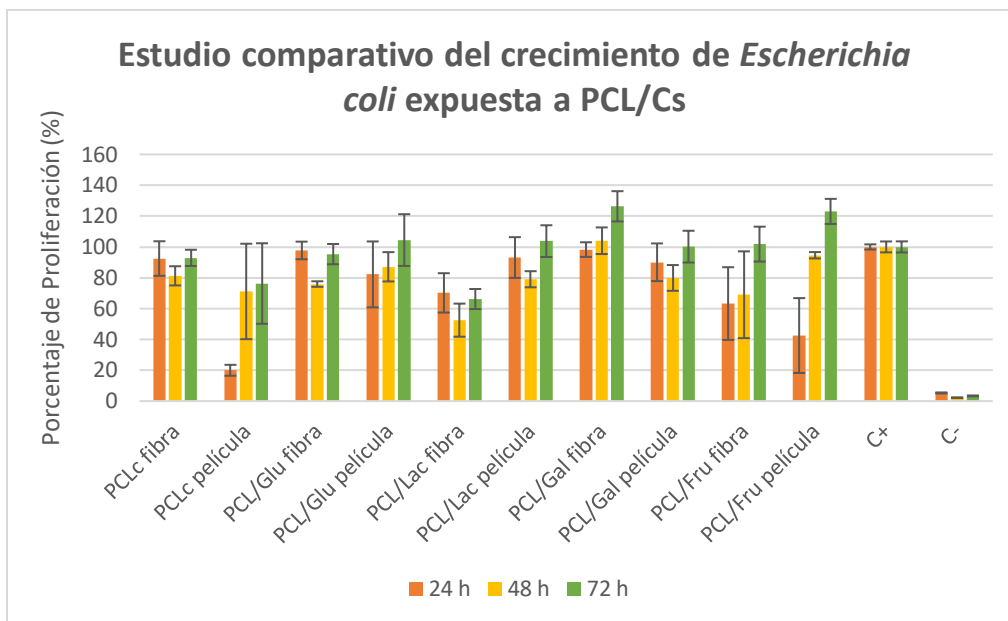


Figura 5. Estudio comparativo del crecimiento de *Escherichia coli* expuesta a PCL/Cs.

En condiciones anaeróbicas y en ausencia de los aceptores de electrones alternativos *Escherichia coli* convierte los azúcares en una mezcla de productos por fermentación. Los principales productos solubles son acetato, etanol, lactato y formiato con cantidades más pequeñas de succinato. *E. coli* muestra capacidad para fermentar cada una de las fuentes de carbono probadas en este ensayo. (Clark, 1989; Gutiérrez & Agudelo, 2009; Hernández, Domínguez, & Gonzaga, 2015). Sin embargo, las bajas concentraciones de estas azúcares no marcaron una diferencia significativa para esta bacteria. Pues se esperaría que la bacteria metabolizara mejor azúcares como la glucosa y lactosa.

Se han observado tasas de proliferación similares para *Escherichia coli*, en un estudio publicado anteriormente (Velasco-Barraza *et al.*, 2017) en el que las capacidades de las fibras de poli (ácido acrílico) (PPA), PAA / quitosano y PAA / alginato redujeron la proliferación de *E. coli*. Aunque se utilizaron diferentes medios de cultivo y diferentes polímeros para el estudio, los resultados entre ambos estudios muestran una reducción drástica en la concentración celular en comparación con las muestras de control, sin embargo, en este estudio se obtuvo un aumento en la proliferación de *Streptomyces spp.* en un 50%.

Mientras que en *E. coli* no se observó un aumento en el crecimiento bacteriano, tanto *P. aeruginosa* (Figura 6) como *S. aureus* (Figura 7) mostraron una mejora en el rendimiento del cultivo.

En el caso de *P. aeruginosa* las fibras aumentan hasta un 36% de la concentración bacteriana con fibras PCL/Glu a las 48 h, mientras que a las 72 h el porcentaje comienza a disminuir esto posiblemente al agotamiento de nutrientes en los pocillos de la placa, y puesto que el periodo estacionario de crecimiento está próximo a terminar. En general el uso de las fibras o películas de PCL muestran un incremento en la proliferación, sin embargo, la película control sin fuentes de carbono se ve disminuida sin importar el tiempo de exposición. Se puede observar una proliferación mayor al crecimiento del C+ (Medio inoculado) en el caso de todas las fibras a las 42 h de inoculación, a excepción de la película lisa de PCLc el crecimiento con estas matrices se ve disminuido.

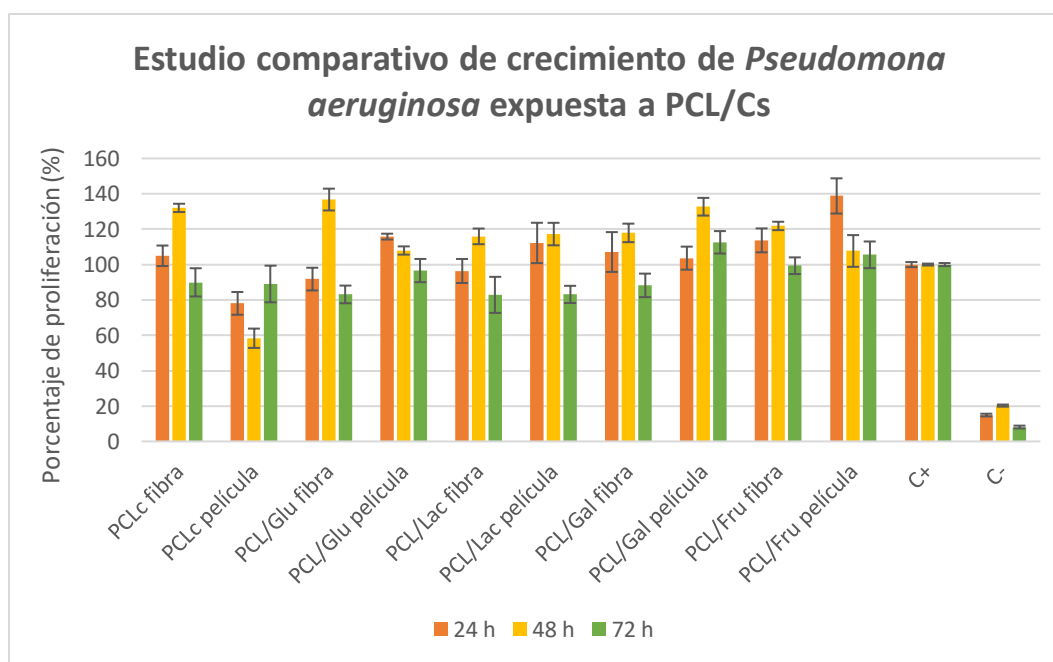


Figura 6. Estudio comparativo del crecimiento de *Pseudomona aeruginosa*. expuesta a PCL/Cs.

Pseudomona es un bacilo Gram negativo, aerobio, no formador de esporas, puede presentar de 1.5 a 5 μm de largo y un diámetro de 0.5 a 1 μm . Las especies de este género son móviles, debido a la presencia de 1 o más flagelos polares. Es oxidasa y catalasa positiva,

no fermentadora de lactosa. La mayoría de especies del género, no crecen bajo condiciones ácidas (pH 4.5 o menor). El género *Pseudomonas* es bien conocido por su versatilidad metabólica y plasticidad genética. Las especies de *Pseudomonas*, en general, crecen rápidamente y presentan habilidad para metabolizar una gran variedad de sustratos (Hernández *et al.*, 2015)

Estas bacterias son conocidas por la producción de ramnolípidos. Los ramnolípidos son biosurfactantes con alto potencial industrial. Las posibles aplicaciones son múltiples, por ejemplo, pueden usarse como detergentes en agentes de lavado debido a sus propiedades tensioactivas y como emulsionantes en la industria cosmética y alimentaria. Por lo que el incremento en la proliferación bacteriana es de gran interés biotecnológico. En particular, presentan una buena alternativa a los detergentes sintetizados químicamente, porque son biodegradables, muestran propiedades novedosas como efecto antimicrobiano y se producen a partir de recursos renovables (Wittgens *et al.*, 2011).

Sin embargo, se sabe que *Pseudomonas ruginosa* es un patógeno oportunista de gran preocupación en la industria médica produciendo enfermedades nosocomiales, aunque *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* también son patógenas estas se encuentran en la biota normal, mientras que *Pseudomonas* no se encuentra y las interacciones con esta suelen ser más peligrosas que las otras ya mencionadas (Vlamakis & Kolter, 2010); por lo tanto, se recomienda hacer uso de medidas de bioseguridad cuando se utilicen estas biopelículas.

El siguiente estudio se realizó con la cepa *Staphylococcus aureus*, que a pesar de ser patógena ha demostrado su capacidad como agente biorremediador para distintas moléculas dañinas al ser humano y el medio ambiente. En el caso de esta cepa se alcanza la mayor proliferación con fibras electrohiladas de PCL/Lac al ser un microorganismo fermentador de lactosa, sin embargo, con las demás fibras y membranas la proliferación no se encuentra incrementada en gran medida y para la gran mayoría de las muestras el crecimiento se ve disminuido con forme al control en algunos casos de forma severa al llegar a las 72 h de exposición ya que su etapa de muerte comienza antes de las 72 h. Ninguna de las muestras presenta actividad antimicrobiana mayor al control negativo de crecimiento.

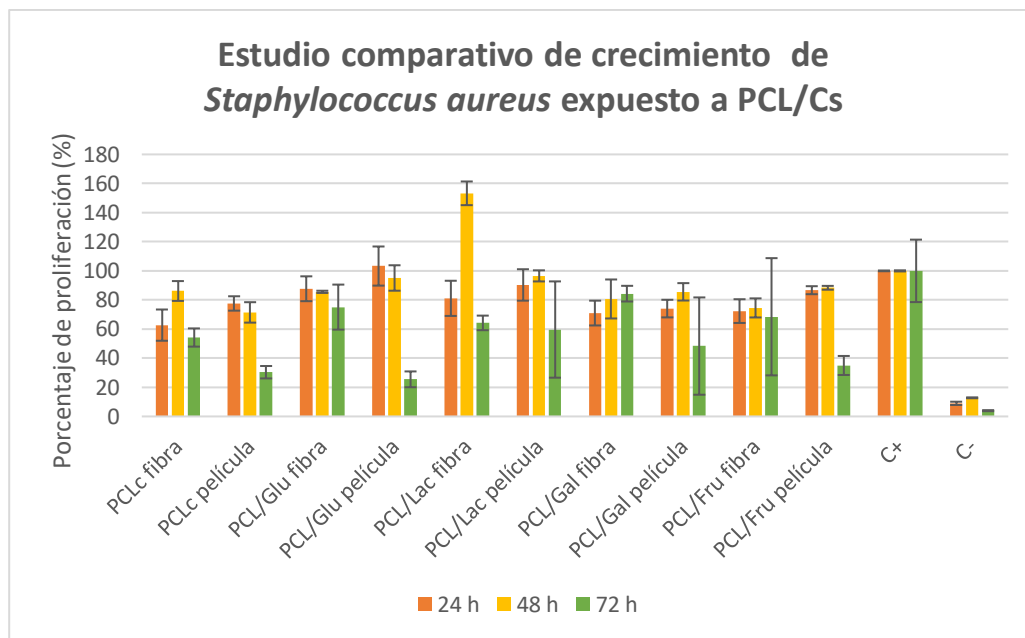


Figura 7. Estudio comparativo del crecimiento de *Staphylococcus aureus* expuesta a PCL/Cs.

Según Chakraborty y colaboradores, las cepas de *S. aureus* tienen reactividad positiva en la hidrólisis de urea, debido a la liberación del producto final de la hidrólisis de urea, que es el amoníaco, también muestra un resultado positivo en la prueba de fermentación de lactosa. En este estudio se observó que todas las cepas aisladas mostraron un resultado negativo en la prueba de fermentación de sacarosa, lo que indica que estos aislados no tienen actividad fermentadora de sacarosa y se observó que todas las cepas aisladas tienen actividad de galactosa y puede deberse a la enzima galactasa, que fue secretada por las bacterias, que causo la hidrólisis de la galactosa en carbohidratos solubles (Chakraborty, Mahapatra, & Roy, 2011). Por lo que puede explicar el incremento en la proliferación de esta cepa al estar en contacto con lactosa, por otro lado, no se vió un incremento en la proliferación al estar en contacto con galactosa.

Moffa *et al.*, mostró que es posible optimizar el rendimiento de cultivos en la producción de metabolitos secundarios utilizando andamios electrohilados de *S. lividans*. El informe indica que la cepa utilizada en sus experimentos parecía preferir un soporte fibroso al soporte de vidrio que ofrece el matraz y que posiblemente use los andamios como sitio de anclaje donde puede generar micelios (Moffa *et al.*, 2017). Se sabe que la movilidad de *S. aureus* es reducida en comparación con *E. coli* y *P. aeruginosa*, sin embargo, la movilidad

entre cepas puede contribuir de alguna manera al desempeño de los cultivos con las fibras, aunque también debe tenerse en cuenta el efecto de la porosidad en *P. aeruginosa* (Persat *et al.*, 2015) y cómo el posible ajuste de este parámetro podría conducir a cultivos que pueden tener el mismo potencial que *S. aureus*.

Por último, se evaluó la proliferación en *Lactobacillus spp.* (Figura 8). Las bacterias ácido lácticas son productoras de gran variedad de productos en la industria alimenticia debido a su capacidad de fermentación, sin embargo, esta bacteria también es utilizada para el tratamiento de ciertas infecciones por su actividad antagonista a ciertas bacterias patógenas. Por lo que en la actualidad se busca encontrar nuevos métodos para la administración de estas en diversos aspectos biotecnológicos (Endo *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2021; Zupancic *et al.*, 2019).

Lactobacillus spp. es fermentadora de lactosa, molécula formada por monómeros de galactosa y glucosa, que al degradarse toman la ruta *Galactosa-6-fosfato* para producir energía en forma de piruvato. Por lo cual, los resultados de esta investigación concuerdan con la literatura al ver un incremento en la proliferación bacteriana del 65 % para las fibras de PCL/Lac a las 48 h de exposición y un incremento de 130 % en las fibras de PCL/Gal a las 72 h de exposición. Para las fibras con glucosa el incremento se da a las 48 h sin embargo el incremento con respecto al control es de solo 23 % (Figura 8). También es importante señalar que las películas con las mismas composiciones no generaron un incremento en la proliferación, por lo que se supone que la estructura tridimensional del andamio electrohilado favorece la proliferación de esta bacteria.

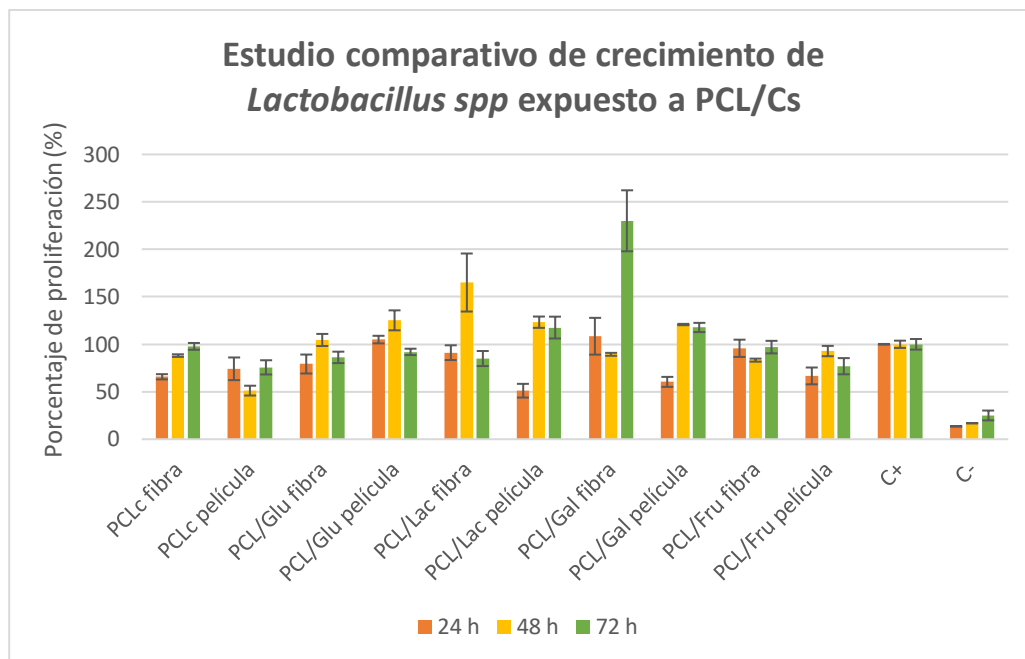


Figura 8. Estudio comparativo del crecimiento de *Lactobacillus* spp. expuesta a PCL/Cs.

Los probióticos *Lactobacillus* generalmente se administran por vía oral para el tratamiento de enfermedades intestinales, como gastroenteritis aguda, enterocolitis necrotizante, diarrea asociada a antibióticos y enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras. Además, estos probióticos también han mostrado un potencial prometedor para el tratamiento de enfermedades extra-intestinales, incluidas las infecciones del tracto urinario, la enfermedad periodontal y la vaginosis bacteriana. Sin embargo, para tales enfermedades, parece aconsejable la administración tópica de los lactobacilos, para promover su mayor eficiencia (Zupancic *et al.*, 2019). Por lo que se trabaja en nuevas alternativas para la administración farmacológica de estos probióticos.

En la actualidad se está trabajando con *Lactobacillus* encapsulados en matrices electrohiladas para el tratamiento de vaginosis bacteriana, donde el andamio confiere protección y fácil localización del concentrado bacteriano cuando se requiera (Nagy *et al.*, 2014), además de esto pueden ser utilizados como probióticos orales al utilizar polímeros biodegradables como la goma arábiga y polulano, confirmando protección para que de esta manera los probióticos alcancen a sobrevivir su paso por el tracto gastrointestinal (Ma *et al.*, 2021). Sin embargo, el proceso de electrohilado al que se someten las bacterias es bastante

agresivo con estas menguando la viabilidad de las células. Por esta razón es necesario buscar alternativas menos drásticas con las células, dado que las bacterias en nuestro estudio crean biopelículas que de igual manera protegen a la estructura celular de las bacterias podría ser un método que ayude a garantizar la viabilidad de las células. Este mismo acercamiento de generación de biofilms de *Lactobacillus* se tomó para eliminar la proliferación de *Listeria monocytogenes* en superficies de la industria alimenticia (Jara *et al.*, 2020).

Por lo tanto, las fibras electrohiladas de PCL suplementadas con fuentes de carbono son una alternativa novedosa para la producción de metabolitos secundarios de interés en la industria biotecnológica, así como un vehículo para la correcta disposición de probióticos en distintas áreas del cuerpo humano.

8.3 Ensayo de proliferación en fibras y películas de PCL/Ns

Otro aspecto importante de la nutrición bacteriana es el consumo de nitrógeno, precursor de proteínas y ácidos nucleicos, además de ser un componente de las paredes celulares. Se puede utilizar una gran diversidad de compuestos orgánicos nitrogenados como fuentes de nitrógeno en el mundo bacteriano. Los compuestos relativamente simples que pueden ser utilizados por diferentes bacterias incluyen urea, algunos aminoácidos, aminoazúcares y compuestos simples que contienen aminas como metilamina, etanolamina o algunas poliaminas. Utilización de aminoácidos a veces implica una degradación previa de péptidos que deberían considerarse la fuente real de nitrógeno. Algunas bacterias también pueden utilizar otros compuestos complejos, como compuestos nitrogenados heterocíclicos, que incluyen, por ejemplo, bases nitrogenadas (pirimidinas y purinas) o xenobióticos como la atrazina (Herrero & Flores, 2019).

Para este estudio se utilizaron cuatro distintas fuentes de nitrógeno: urea, glicina, peptona y extracto de levadura, con el objetivo de incrementar el crecimiento bacteriano en bacterias de interés biotecnológico, de la misma manera que se realizó en el apartado anterior. La primera bacteria analizada fue *E. coli*, que al igual que el ensayo pasado no se obtuvo un gran incremento en la proliferación con fibras o películas de PCL con las distintas fuentes de nitrógeno en especial no se vio beneficiada por las fibras electrohiladas y su estructura tridimensional, las películas por otro lado pudieron alcanzar alrededor del 20 % de incremento al añadir urea y peptona a las 72 h de exposición. Por otro lado, se ve una gran disminución de la proliferación en el control PCLc en su forma como película lisa, pudiera deberse a restos de solvente en la muestra (Figura 9).

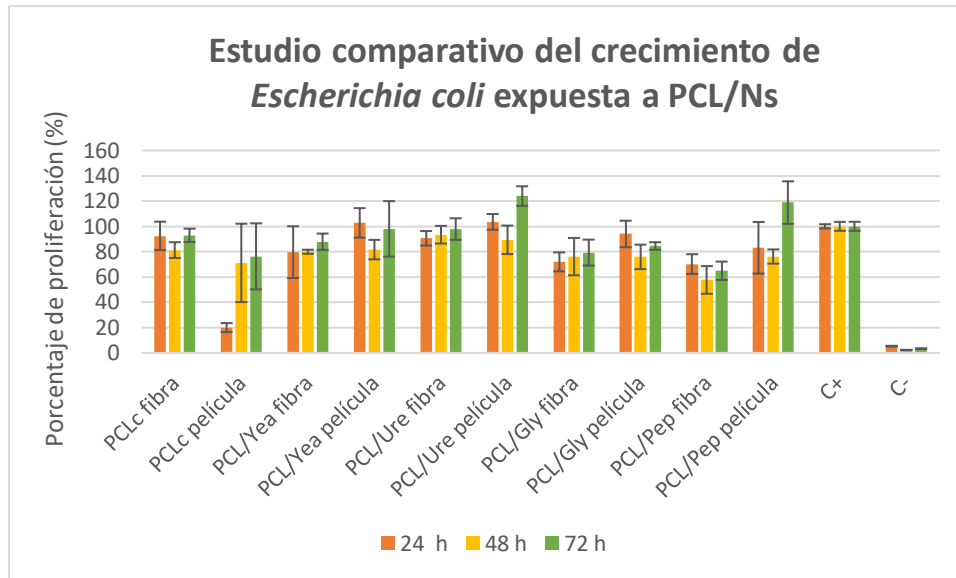


Figura 9. Estudio comparativo del crecimiento de *Escherichia coli* expuesta a PCL/Ns.

La segunda bacteria de estudio, *Pseudomonas aeruginosa* muestra un incremento de 45 y 35 % para películas de glicina y peptona respectivamente a las 48 h de exposición, es importante recalcar que para esta cepa las fibras electrohiladas con fuentes de nitrógeno no mejoraron la proliferación bacteriana al igual que en *E. coli*, en las 24 h podemos ver que la película de PCL/Ure tuvo mejor proliferación que las demás muestras, sin embargo; esta fue solamente de 9 % con respecto al control, además podemos ver que la proliferación a las 72 h para todas las muestras fue menor que el C+ (Medio inoculado). Por lo tanto, fibras como películas lisas no son eficientes pasadas las 48 h de exposición en este caso (Figura 10).

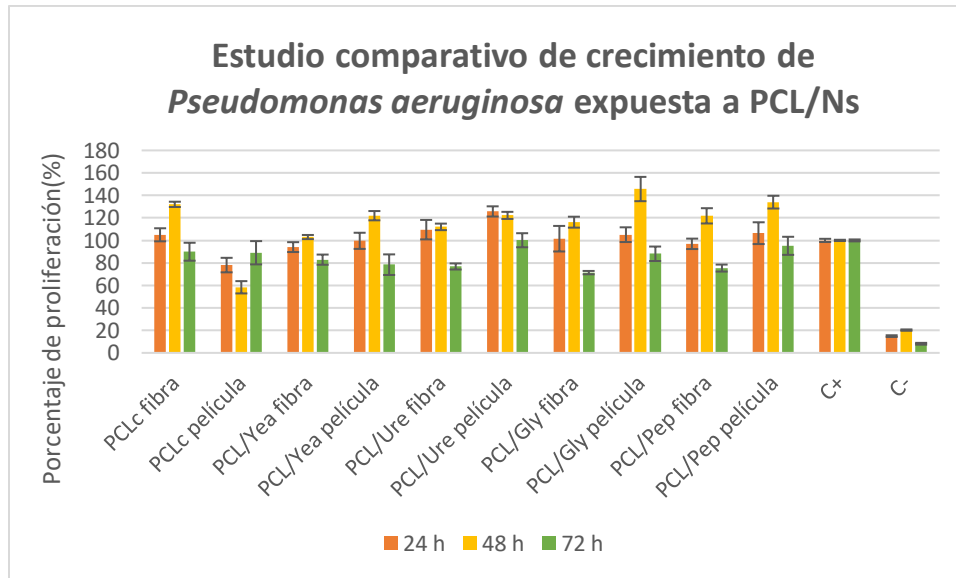


Figura 10. Estudio comparativo del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. expuesta a PCL/Ns.

La siguiente bacteria *Staphylococcus aureus* (Figura 11), presentó un disparado aumento en la proliferación cuando alcanzó las 48 h en películas de PCL/Yea (Extracto de levadura), alcanzando casi un 95 % más de proliferación con respecto al control, también encontramos un incremento en las fibras de PCL / Gly con un aumentó de 42 % con respecto al C+. la película de PCL/Pep mostró un ligero aumento en la proliferación a las 24 h (20 %) sin embargo después de este pico podemos ver que la proliferación descendió con el paso del tiempo.

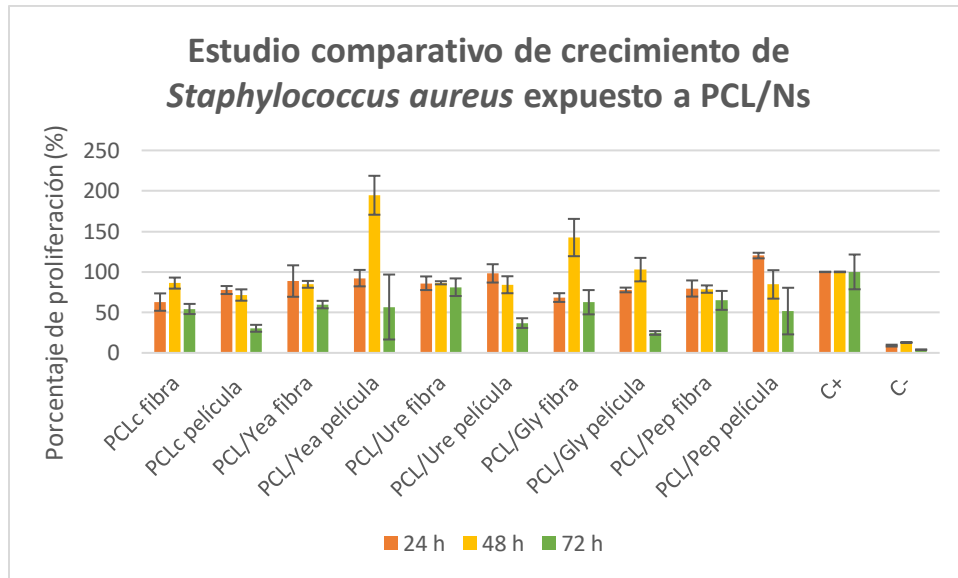


Figura 11. Estudio comparativo del crecimiento de *Staphylococcus aureus* expuesta a PCL/Ns.

Por último, *Lactobacillus spp.* mostró un importante crecimiento a las 72 h, cuando se expone a de fibras electrohiladas suplementadas con fuentes de nitrógeno, sin embargo, este no es el caso de las películas que no incrementaron en gran medida el crecimiento y en algunos casos este disminuyó. El mayor incremento en la proliferación se dió cuando se expuso a fibras de PCL/Yea con 294 % más de proliferación comparada con el control, a este le sigue la proliferación en fibras de PCL / Gly con 289 % y en tercer lugar las fibras de PCL / Pep con 110 %. Por lo que podemos decir que la bacteria *Lactobacillus spp.* se ve beneficiada por la estructura tridimensional de las fibras cuando están suplementadas con fuentes de nitrógeno (Figura 12).

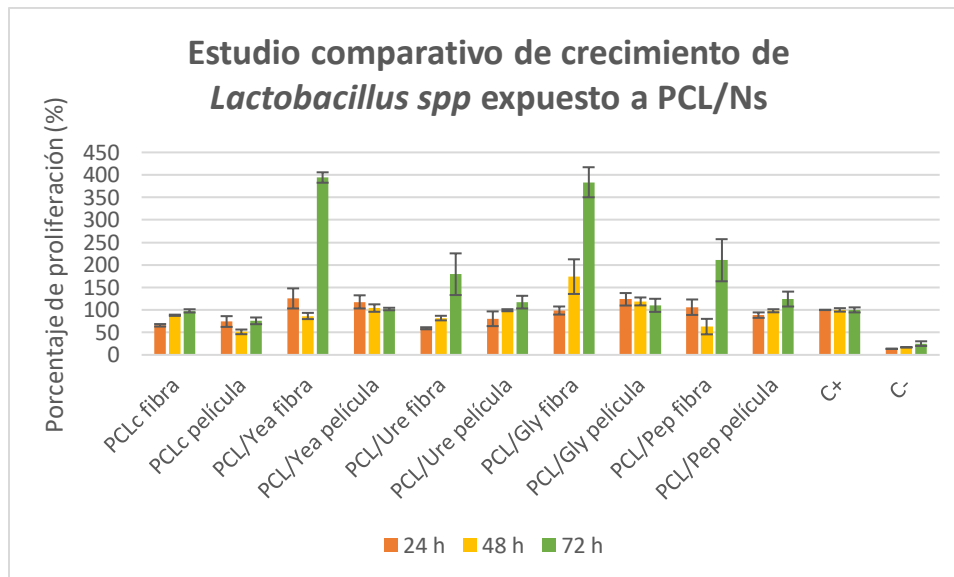


Figura 12. Estudio comparativo del crecimiento de *Lactobacillus spp.* expuesta a PCL/Ns.

En la Tabla 3, podemos ver la proliferación máxima alcanzada en fibras y películas para cada una de las bacterias de estudio a las distintas horas evaluadas. En donde se puede apreciar que para *Escherichia coli* la mayor proliferación se da a las 72 h con las fibras de PCL/Gal con 26 %, sin embargo, existe por un lado crecimiento por el uso de fibras y películas de manera indiscriminada. Por otro lado, analizando las fuentes Cs y Ns podemos ver que la galactosa, urea y glicina son las que promovieron el crecimiento de la cepa.

Para *Pseudomonas* el mayor crecimiento se da con películas de PCL/Gly con un 45% de incremento, las fuentes que lograron mostrar el mayor incremento fueron variadas, en orden descendente tenemos glicina, fructosa, glucosa, urea y galactosa. También podemos observar que a las 72 h no se registró un incremento para las fibras electrohiladas.

Continuando con *Staphylococcus aureus*, la mayor proliferación se da a las 48 h para las películas de PCL/Yea con un 95%, casi el doble del crecimiento normal, esta bacteria mostró un incremento con las fuentes de extracto de levadura, lactosa y peptona, sin embargo, también mostró que las fibras suprimieron la proliferación normal a 24 y 72 h.

Por último, *Lactobacillus spp.* se ve beneficiada por las películas por al menos 23% de incremento en la proliferación con distintas fuentes de carbono y nitrógeno (glicina, glucosa y peptona), sin embargo; se puede apreciar un incremento de casi 300% cuando

exponemos la cepa a fibras electrohiladas de PCL/Yea, aunado a esto el extracto de levadura también mostró el mayor incremento a las 24 h, por otro lado, a las 48 h, la fibra con mayor porcentaje fue PCL / Gly, por lo que podemos decir que esta cepa ha reaccionado mejor al tratamiento con fuentes de nitrógeno en las estructuras tridimensionales formadas por los andamios electrohilados.

Tabla 3. Porcentajes de proliferación máxima en fibras y películas expuestas a Cs y Ns.

Bacteria	Fibras			Películas		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>Escherichia coli</i>	*	PCL/Gal (4%)	PCL/Gal (26%)	PCL/Gly (3%)	*	PCL/Ure (24%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PCL/Fru (39%)	PCL/Glu (37%)	*	PCL/Ure (26%)	PCL/Gly (45%)	PCL/Gal (12%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	*	PCL/Lac (53%)	*	PCL/Pep (20%)	PCL/Yea (95%)	*
<i>Lactobacillus spp.</i>	PCL/Yea (25%)	PCL/Gly (74%)	PCL/Yea (294%)	PCL/Gly (23%)	PCL/Glu (25%)	PCL/Pep (24%)

*Estas muestras presentaron una disminución en la proliferación con respecto al control.

La urea es la forma más sencilla que una bacteria puede fijar como fuente de nitrógeno, en el caso de *E. coli* se alcanzó una proliferación de 24 % en su proliferación al utilizar esta fuente cuando no se utilizaron fibras electrohiladas, aunque no se alcanzó la misma proliferación que con galactosa. La actividad la ureasa (urea amidohidrolasa) cataliza la hidrólisis de la urea para producir amoníaco y carbamato, que se descompone espontáneamente en otra molécula de amoníaco y ácido carbónico (Herrero & Flores, 2019).

Pseudomonas aeruginosa utilizó glicina y urea en mayor medida, la glicina es el aminoácido más sencillo que forma parte de las proteínas, sin embargo; no es el más utilizado para fijar el nitrógeno, ya que puede inhibir el crecimiento debido a su acción antagonica con la alanina que también forma parte de las membranas (Hammes, Schleifer, & Kandler, 1973), por otro lado, se describe en la literatura un incremento en la producción de piomicina implementando un medio de harina de semilla de algodón suplementada con peptona, esta fuente de nitrógeno también aumentó la proliferación con nuestras fibras y películas, sin embargo; no tanto como las otras fuentes.

El extracto de levadura funcionó mejor en *Staphylococcus aureus* y en gran medida en *Lactobacillus spp.*, en la literatura se informa sobre un incremento en la proliferación de *Rhodobacter sphaeroides* y mejorando la foto-producción de hidrógeno (Hakobyan et al., 2012). El extracto de levadura contiene vitamina B en su composición además de ser una importante fuente de nitrógeno gracias a la liofilización de las membranas de levaduras, que podrán ser de utilidad para el crecimiento y proliferación de *Lactobacillus*, Nancyb et al., probaron los efectos de distintas fuentes de nitrógeno con *Lactobacillus casei* sub-especie *rhamnosus*, encontrando que el extracto de levadura fue también la que provocó mejor proliferación para la producción de ácido láctico (Nancib, Nancib, Meziane-cherif, & Boubendir, 2005). En nuestro estudio el extracto de levadura mejoró la producción casi un 300%, haciendo esta conformación de fibras electrohiladas una alternativa deseable para su aplicación biotecnológica.

CAPITULO III. Fibras de PCL/CUR

XI. MARCO TEÓRICO

9.1 Formación de biopelículas

Las bacterias pueden crecer adheridas a casi cada superficie, formando comunidades arquitectónicamente complejas llamadas biopelículas. En estas biopelículas, las células crecen en agregados multicelulares encapsuladas por una matriz extracelular producida por la bacteria misma. Los mecanismos que diferentes bacterias emplean para formar dicha capacidad varían, con frecuencia dependiendo de las condiciones a las cuales estas reaccionan a un estímulo estresante, ya sea ambiental o antibacterial (Høiby *et al.*, 2011).

Los mecanismos moleculares que regulan la formación de biopelículas varían mucho entre diferentes especies, e incluso varían entre diferentes cepas de la misma especie. Sin embargo, algunas características son reconocidos como atributos generales de la biopelícula en formación (Monds & O'Toole, 2009). Por ejemplo, todas las biopelículas contienen una matriz extracelular que mantiene las células juntas. Esta matriz es a menudo compuesta de un biopolímero polisacárido junto con otros componentes como proteínas o ADN. La naturaleza de la matriz exopolisacárida varía mucho dependiendo de las condiciones de crecimiento, medio y sustratos (Vlamakis & Kolter, 2010).

9.2 Estrés celular

La respuesta al estrés bacteriano se puede definir como una cascada de alteraciones en la expresión génica y la actividad de las proteínas con el fin de sobrevivir a condiciones extremas, que cambian rápidamente y potencialmente dañinas detectadas por las bacterias, y que hace que las células se vuelvan ampliamente resistentes al estrés o eliminen el agente de estrés o mediar la reparación de la lesión celular, una de los mecanismos de defensa hacia este fenómeno es la producción de biopelículas que se ve favorecido mediante las superficies no homogéneas (Giuliodori *et al.*, 2007; Roveto, Gupta, & Schuler, 2021).

9.3 Biopelículas en cepas de interés

Las cepas de *Pseudomonas* podrían considerarse para uso futuro en la biorremediación de petróleo derramado en fuentes de agua. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar el potencial de las cepas aisladas para degradar los hidrocarburos *in situ* en condiciones ambientales naturales. La tecnología de la biorremediación podría desarrollarse aún más para detectar cualquier contaminante presente en la tierra que cree enormes peligros ambientales y para la salud (Dasgupta *et al.*, 2013).

Escherichia coli es una de las bacterias con las que se ha estudiado en detalle la formación de biopelículas, y es especialmente apreciada para aplicaciones de biotecnología debido a su capacidad genética (Da Re *et al.*, 2007). Entre los productos industriales que *E. coli* puede producir, se pueden enumerar: producción de licopeno (Wang *et al.*, 2012) y ácido succínico (Mienda *et al.*, 2017) entre otros, con el fin de obtener mejoras de producción en procesos industriales.

Finalmente, *Staphylococcus aureus* y otras bacterias patógenas se han probado como bacterias tolerantes a metales pesados, con interés en la eliminación de cadmio, cromo, níquel y zinc, para su uso en un efluente de refinería de petróleo (Endurance Oaikhena *et al.*, 2016). Además, se ha informado que es útil para la biorremediación de petróleo en tintes de tina, efluentes textiles (Abatenh *et al.*, 2017).

9.4 Cúrcuma

La cúrcuma (CUR), un género muy importante en la familia *Zingiberaceae*, consta de unas 110 especies, distribuida en la región tropical de Asia y Asia-Pacífico. La mayor diversidad del género se produce en India, Myanmar, Tailandia, Corea, China, Australia y el Pacífico Sur. La CUR es conformada por un tubérculo primario elipsoide, por 2.5 cm; emite muchos rizomas de 5 a 8 cm de largo, 1.5 cm de espesor, rectos o un poco curvados, portando ramas secundarias, todo formando un grupo denso; color interior naranja intenso, fuera naranja amarillento; Los tubérculos de la raíz suelen estar ausentes del tallo de la hoja hasta aproximadamente 1 m; el tamaño de hoja rara vez es más de 50 cm; por lo general 30 por 7 a 8 cm; completamente verde peciolo delgado, abruptamente ensanchado en la vaina. Lóbulos pequeños (1 mm); vaina cerca de las lígulas con bordes ciliados (Fallis *et al.*, 2013).

9.4.1 Agentes activos

La CUR se compone de un grupo de tres curcuminoides flavonoides (derivados fenólicos): Diferulometileno (Curcumina I) principal componente activo de la CUR (0.3 – 5.4 %), compone el 90% del contenido de los tres curcuminoides principales en la cúrcuma cruda siendo así el responsable de la pigmentación amarilla característica; Demetoxycurcumina (Curcumina II) presente en un 6%, y bisdesmetoxy curcurmina (Curcumina III) presente en un 0.3 %. Estos activos son solubles en ácido acético, etanol, álcali, cetona y cloroformo. El resto de su contenido distribuye entre aceites volátiles (tumerone, atlantone, y zingiberone), azúcares, proteínas y resinas (Labban *et al.*, 2014; Rafieian-Kopaei *et al.*, 2014).

9.4.2 Aplicaciones

La cúrcuma en forma cruda es una de las plantas medicinales herbarias más útiles. Investigaciones exhaustivas han demostrado que la mayor parte de las actividades de cúrcuma se deben al diferulometileno (cúrcumina I). Tiene varias propiedades útiles con actividades antioxidantes y es útil en afecciones como inflamación, úlceras y cáncer. También tiene actividades antifúngicas, antimicrobianas, y hepatoprotectoras. Por lo tanto, tiene el potencial contra varios tipos de cáncer, diabetes, alergias, artritis, enfermedad de Alzheimer entre otras enfermedades crónicas (Rafieian-Kopaei *et al.*, 2014).

X. ANTECEDENTES

La formación de biopelículas ha sido estudiada con anterioridad y se dice que la forma de las superficies puede influir en la formación de estas para distintas bacterias tanto de interés biotecnológico como de interés médico. Los siguientes estudios muestran algunas de estas investigaciones, así como crecimiento de bacterias de interés sobre distintas superficies y el desarrollo de biopelículas.

Abrigo *et al.*, en 2015 realizaron un estudio para determinar la unión y proliferación bacteriana y adherencia en materiales nanofibrosos, con el objetivo de utilizar fibras de poliestireno en filtros, ropa protectora, apósitos cutáneos y andamios de ingeniería de tejidos. En este estudio se generaron diferentes funcionalidades químicas en la superficie de nanofibras de poliestireno electrohiladas a través de la polimerización con plasma de cuatro monómeros (ácido acrílico, alilamina, 1,7-octadieno y 1,8-cineol). Las interacciones de *Escherichia coli* con las fibras modificadas en la superficie se investigaron mediante una combinación de microscopía electrónica de barrido y microscopía de barrido láser confocal. Se descubrió que la humectabilidad de la fibra, la carga superficial y la química afectan la capacidad de las células bacterianas para adherirse y proliferar a través de las mallas de nanofibras. La mayor proporción de unión de células viables se produjo en el recubrimiento rico en amina hidrófila, seguido por el octadieno hidrófobo. El recubrimiento de ácido acrílico rico en grupos carboxilo mostró una atracción significativamente menor de células bacterianas. El 1,8-cineol retuvo la actividad antibacteriana del monómero, lo que dio como resultado una alta proporción de células muertas aisladas unidas a las fibras. Los resultados mostraron que las propiedades químicas de la superficie de las membranas nanofibrosas se pueden ajustar estratégicamente para controlar el comportamiento bacteriano (Abrigo *et al.*, 2015)

Por otro lado, *P. aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista responsable de infecciones tanto agudas como crónicas. Más allá de su resistencia natural a muchos fármacos, su capacidad para formar biopelículas, un sistema biológico complejo, hace ineficaz el aclaramiento por los sistemas de defensa inmunológica y la antibioterapia. El estudio del ciclo de vida en los biofilms de *P. aeruginosa* y su regulación debe ser de vital

importancia para comprender su formación y erradicación de las infecciones resistentes causadas por *P. aeruginosa* (Rasamiravaka, Labtani, Duez, & Jaziri, 2015).

Las infecciones crónicas asociadas a las biopelículas causadas por *Staphylococcus aureus* a menudo dan lugar a aumentos significativos de la morbilidad y la mortalidad, en particular cuando se asocian con dispositivos médicos permanentes. Esto ha desencadenado una gran cantidad de investigaciones que intentan comprender los mecanismos moleculares que controlan la formación de biopelículas de *S. aureus* y la base de la resistencia de estas estructuras multicelulares a la terapia con antibióticos. La formación de microcolonias en *S. aureus* sugiere que estas estructuras se originan como resultado de la heterogeneidad metabólica regulada estocásticamente y la proliferación dentro de una población de biopelículas en maduración, en lugar de un proceso sustractivo que involucra la liberación de grupos de células de una biopelícula gruesa y no estructurada. Este nuevo modelo de desarrollo de biopelículas implica la generación programada genéticamente de subpoblaciones de células metabólicamente distintas, lo que da como resultado una población general que es más capaz de adaptarse a las condiciones ambientales rápidamente cambiantes (Moormeier & Bayles, 2017).

El funcionamiento de los reactores biológicos clásicos en condiciones de inanición es ineficaz debido al lavado y desprendimiento de bacterias. Desitti *et al.*, trabajó un enfoque innovador para mantener altas concentraciones de células en un reactor continuo en condiciones de inanición basado en la encapsulación electrohilada con *Pseudomonas sp. ADP* (*P. ADP*) encapsulándola en microtubos electrohilados utilizándolos como cubiertas en soportes plásticos para la biorremediación de atrazina sin agregar un donante de electrones externo para minimizar la contaminación. Se investigó una formulación de microtubos que consistía en poli (vinil pirrolidona) (PVP) como solución central y fluoruro de polivinilideno-co-hexafluoropropileno (PVDF-HFP) como material de cubierta para la encapsulación de bacterias. Las bacterias *P. ADP* encapsuladas mostraron una inhibición inicial de la degradación de la atrazina debido principalmente al estrés del electrohilado o los disolventes que quedaron en los microtubos. Sin embargo, la actividad de degradación de la atrazina se recuperó después de varios lotes consecutivos. Los microtubos que contenían bacterias se envolvieron en soportes de plástico, se colocaron en un reactor y se hicieron funcionar

continuamente sin una fuente de carbono externa durante 50 días. En el reactor se observó una buena degradación de la atrazina ($83,1 \pm 3,9\%$) y recuperación de amonio ($75,5 \pm 5,9\%$). Las muestras tomadas al final del experimento no mostraron un deterioro significativo de los microtubos, aunque apareció crecimiento de biopelícula en la superficie externa de los microtubos debido a las condiciones no estériles imperantes (Desitti et al., 2017).

Los biosorbentes, como las algas y las levaduras, se han aplicado en la adsorción de metales pesados debido a su bajo costo y eficacia. Sin embargo, no se pueden reciclar y reutilizar después de una aplicación directa, lo que puede causar una contaminación secundaria. Xin *et al.*, utilizó una técnica de bioelectropulverización para inmovilizar *Saccharomyces cerevisiae* (un subproducto de la fermentación de alimentos) sobre la superficie de materiales compuestos ternarios de poli(ϵ -caprolactona) / quitosano / rectorita basados en esteras nanofibras. Esta técnica no solo combinó las ventajas de *S. cerevisiae* (bajo costo) y de las nanofibras (gran superficie) en la eliminación de metales pesados, sino que también hizo que los biosorbentes fueran fáciles de recolectar y reutilizar. También se fabricaron esterillas nanofibras estructuradas capa por capa alternando electrohilado y bioelectropulverización durante un par de veces y se cargaron más *S. cerevisiae* para mejorar la biosorción de metales pesados. Los resultados mostraron que las esteras nanofibras cargadas de *S. cerevisiae* tenían una capacidad de biosorción de Pb^{2+} hasta 238 mg/g. El ensayo de desorción indicó que estos tapetes eran reutilizables y mantenían una alta capacidad de biosorción después de tres ciclos de biosorción-desorción (Xin et al., 2017).

Por otro lado, el polímero poli- ϵ -caprolactona (PCL) con gentamicina de diferentes concentraciones (0, 2,5, 5 y 10% en peso) se electrohiló en diversas condiciones, y las nanofibras resultantes de diferentes espesores (1, 2 y 4 capas) se utilizaron contra el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas, como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Staphylococcus epidermidis*. Los resultados de las pruebas bacterianas revelaron que las moléculas de gentamicina en las nanofibras se liberaron gradualmente de las nanofibras de PCL durante las pruebas *in vitro* y evitaron el crecimiento bacteriano en diferentes zonas de inhibición y cinéticas. Pudiendo ser una alternativa viable para el control antimicrobiano de los nuevos sistemas de administración de fármacos para muchos campos

biomédicos, como el andamiaje; suministro de fármacos, ADN y proteínas; y cicatrización de heridas (Ceylan, Yang, & Asmatulu, 2017).

En la investigación de Zamel en 2019, se estudió la eliminación de azul de metileno en medios acuosos mediante el uso de especies aisladas de bacterias (*Bacillus paramycooides*) de aguas residuales industriales e inmovilizadas en nanofibras de acetato de celulosa y poli (óxido de etileno) usando DMSO como disolvente. El tiempo de decoloración varió de 0 a 72 h, se investigaron diferentes concentraciones de colorante de 20 a 200 mg/L y se investigó el recuento de células bacterianas para lograr la máxima eliminación del colorante mediante la membrana nanofibrosa inmovilizada con bacterias. La decoloración efectiva del tinte se logró en 48 horas y el porcentaje de eliminación de azul de metileno fue de alrededor del 93%. Además, se probó la reutilización de la membrana nanofibrosa inmovilizada con bacterias y se encontró que después del cuarto uso, todavía se podía lograr el 44% de la capacidad de decoloración del tinte. Estos resultados son prometedores y sugieren que la membrana nanofibrosa inmovilizada con bacterias podría ser económicamente viable y ecológica cuando se utiliza en la eliminación de metilbromuro de aguas residuales industriales (Zamel, Hassanin, Ellethy, Singer, & Abdelmoneim, 2019).

La formación de biopelículas de *Escherichia coli* se ha evaluado principalmente en grupos específicos de *E. coli* patógenos. Flament-Simon *et al.*, evaluaron la formación temprana de biofilm (EBF), es decir, la etapa de adhesión, utilizando BioFilm Ring Test R en 394 aislados clínicos de *E. coli*. Posteriormente, la capacidad de formación de biopelículas se contrastó con los flogrupos, clonotipos (fumC-fimH) y tipos de secuencia (ST), todos utilizados para definir clones, factores de virulencia (VF) y FimB. En este estudio se obtuvo que, de los 394 aislamientos, menos del 10% son capaces de producir niveles altos de biopelícula durante 5 h. Estos aislados son clones descritos en varios estudios como colonizadores intestinales dominantes en mamíferos y aves y comprendían el clon B2-CH40-22-ST131, el clon dominante entre los débiles productores de biopelículas (Flament-Simon *et al.*, 2019).

En otro estudio, se mezcló polietilenimina (PEI) con PCL para proporcionar grupos amino funcionales en la superficie de la estera de las nanofibras y se inmovilizó *Gluconobacter oxydans* en la superficie con la ayuda de la química del glutaraldehído. Se

tomaron imágenes de microscopía electrónica de barrido después de la inmovilización de *G. oxydans* en una estera de nanofibras PCL-PEI. Por primera vez en este estudio, se inmovilizó un microorganismo sobre la estera de nanofibras electrohiladas mediante modificación covalente para su posible utilización como biosensor de células enteras de *G. oxydans* para detectar glucosa como analito modelo (Gordegir et al., 2019).

En este estudio, se han desarrollado biopelículas biodegradables bioabsorbentes innovadoras y ecológicas para remediar el agua contaminada con aceite. Esto se logró mediante la inmovilización de *gammaproteobacterias* y *actinobacterias* degradantes de hidrocarburos en vehículos biodegradables que adsorben aceite, basados en membranas electrohiladas de ácido poliláctico y policaprolactona. Se observaron altas capacidades de adhesión y proliferación de células bacterianas mediante microscopía electrónica de barrido. La eficiencia de biorremediación de los sistemas, probados en petróleo crudo y cuantificados por cromatografía de gases, mostró que la inmovilización aumentaba la biodegradación de hidrocarburos hasta en un 23% en comparación con las bacterias de vida libre. Las biopelículas biodegradables biosorbentes resultantes adsorbieron simultáneamente el 100% del aceite derramado y se biodegradaron más del 66% durante 10 días, con una dispersión ambiental limitada de las células. La biorremediación mediada por biopelículas, utilizando soportes ecológicos, es una herramienta versátil, de bajo costo y de bajo impacto para la biorremediación de sistemas acuáticos (Catania, Lopresti, Cappello, Sca, & Quatrini, 2020).

Las biopelículas bacterianas son responsables de infecciones persistentes y bioincrustaciones, lo que genera serias preocupaciones tanto en los procesos médicos como industriales. Estas motivaciones sustentan la necesidad de desarrollar metodologías para estudiar las complejas estructuras biológicas de las biopelículas y prevenir su formación en implantes médicos, herramientas y aparatos industriales. Ripa *et al.*, estudiaron la formación de biopelículas de *Escherichia coli* (adhesión, maduración y dispersión) en superficies de oro y titanio, además de utilizarse una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM) como sensor, se encontró que los sensores QCM también brindan condiciones experimentales bien controladas para estudiar tratamientos de superficie antimicrobianos y procedimientos de erradicación, incluso en biopelículas maduras (Ripa, Shen, & Funari, 2020).

En otro estudio, se incorporó una cepa modelo de bacteria anaeróbica del microbioma intestinal (*Clostridium butyricum*) que produce moléculas antiinflamatorias en fibras sin polímero de una matriz de ciclodextrina soluble en agua utilizando una nanotecnología prometedora a escala de alta velocidad electrohilado. También se llevó a cabo un estudio de estabilidad a largo plazo de las bacterias de las fibras. Se investigó el efecto de las condiciones de almacenamiento (temperatura, presencia de oxígeno) y las condiciones de crecimiento sobre la viabilidad bacteriana en las fibras. La viabilidad de las bacterias anaerobias esporuladas en las fibras se mantuvo durante 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente en presencia de oxígeno. Se utilizó compresión directa para preparar tabletas a partir de las fibras que contienen bacterias producidas después de triturarlas (usando un molino oscilante) y mezclarlas con excipientes para tabletas, lo que facilita la administración oral de las bacterias. No se observó una disminución significativa en la viabilidad bacteriana después del procesamiento de las fibras (Vass et al., 2020).

En otro estudio se encapsularon células de levadura vivas en membranas de Poliacrilamida soluble en agua mediante la técnica de electrohilado. Se observó que después del proceso de electrohilado la estructura elipsoidal original de las células de levadura se convierte en una estructura esferoide achatada. Los resultados muestran que la eficiencia de encapsulación se mantiene en aproximadamente el 40% y las células de levadura inmovilizadas permanecen activas incluso después de siete días de almacenamiento, lo que proporciona una perspectiva de aplicación prometedora para la inmovilización por electrohilado (Fan et al., 2021).

En otro estudio se evaluaron los efectos de la asimetría de la superficie de unión (variación asimétrica de la altura de la superficie) en el desarrollo de biopelículas bacterianas. Se utilizaron moldes impresos en 3D para crear superficies con características de 300 μm para proporcionar asimetría opuesta, pero valores de rugosidad idénticos. Las superficies con sesgo negativo tuvieron una oxidación de nitrito y un crecimiento de biomasa consistentemente mayores que otras superficies durante el desarrollo de biopelículas cuando se estudiaron en sistemas de biorreactores anulares para *Acinetobacter* y *Terrimonas*. Los resultados sugieren que la asimetría es particularmente importante en sistemas donde las biopelículas no han crecido demasiado en las características de la superficie, como en el

inicio del sistema, biopelículas delgadas y estudios de marcos de tiempo más cortos, que incluyen una cuantiosa investigación previa sobre la adhesión microbiana (Roveto et al., 2021).

Por todo lo anterior, el objetivo de este capítulo es estudiar la capacidad de formación de biofilms bacterianos de fibras electrohiladas de poli (caprolactona)/Cúrcuma para su potencial uso en la biorremediación.

XI. METODOLOGÍA

11. 1 Materiales

Poli (ϵ -caprolactona) Mn ~ 80000 (Sigma Aldrich, CAS: 24980-41-4), se utilizó para realizar los andamios y películas. Como solventes para la disolución se utilizó cloroformo (Fermont, PQ06201) y etanol (ACS, Sigma Aldrich, CAS: 64-17-5).

En el caso de las fibras PCL/CUR, las hojas de Cúrcuma longa L. fueron donadas por el Dr. Syed Dastager de la Colección Nacional de Microorganismos Industriales (NCIM), CSIR-National Chemical Laboratory, Pune-41008, Maharashtra, India.

Para el ensayo de proliferación se utilizaron cepas bacterianas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) en Caldo nutritivo No. 1 (Sigma Aldrich).

11.2 Métodos

11.2.1 Preparación de soluciones PCL/CUR

La solución PCLc se preparó al 10% p/v utilizando cloroformo como disolvente, con la metodología de Ruckh *et al.* (Ruckh *et al.*, 2012). Luego, se agregaron a las distintas muestras soluciones etanólicas de CUR en diferentes proporciones (Tabla 3). La solución se agitó a 60 rpm y 35 °C durante 30 minutos, hasta que se hizo evidente una solución homogénea.

Tabla 4. Preparación de soluciones poliméricas PCL/CUR

Muestra	% PCL w/v	% CUR v/v	Proporción PCL/CUR
PCLc	10	0	--
PCL/CUR1	10	2	1.8:0.2
PCL/CUR2	10	2.5	1.6:0.4
PCL/CUR3	10	5	1.2:0.8
PCL/CUR4	10	10	1:1

11.2.2 Electrohilado polimérico PCL/CUR

Las fibras electrohiladas se sinterizaron cargando las soluciones antes preparadas en un sistema de inyección de bomba, con los siguientes parámetros: temperatura: 20 - 22°C, humedad relativa: 32 - 43 %, distancia desde la punta de la jeringa al colector: 10 cm, voltaje: 20 kV y caudal: 1 mL/h.

11.2.3 Síntesis de películas

Todas las películas fueron preparadas utilizando las mismas soluciones stock del electrohilado, vertiendo 3 mL en cajas Petri de borosilicato (35 mm) y dejando secar los solventes por la noche en una campana de extracción de humos, sin más modificaciones.

11.2.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

De las fibras fabricadas, se recortaron segmentos de 0.5 cm x 0.5 cm para evaluar la morfología y porosidad de los andamios. Posteriormente se fijaron a colectores con cinta adhesiva metálica y se recubrieron con partículas de oro por medio de pulverización catódica.

Para las muestras con bacterias, se cultivaron bacterias y andamios por 24 h. Una vez concluido el tiempo de incubación, los andamios se recuperaron y se colocaron en portaobjetos previamente bañados en una solución de gelatina al 0.1%. Después, se secaron a temperatura ambiente por un día y finalmente se recubrieron por pulverización.

11.2.5 Ensayo de proliferación

Las fibras electrohiladas y películas fueron cortadas en círculos de 5 mm de diámetro usando una perforadora y posteriormente esterilizados por exposición a radiación de luz ultravioleta por 5 min de cada lado. Al finalizar el proceso de esterilización se colocaron al fondo de una placa de 96 pocillos como se indica en la Figura 13. Se realizaron 3 placas diferentes para cada una de las cepas con la finalidad de revisar el crecimiento a 24, 48 y 72 h.

Las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) criopreservadas en glicerol se cultivaron previamente en Caldo Nutritivo N. 1 por 24 h a 35 °C en tubos de 5 mL, al verificar

su crecimiento las cepas fueron estandarizadas a 0.5 McFarland (Absorbancia de 0.132 a 600 nm, 1.5×10^8 CFU/mL) con agua salina.

	Fibras						Filmes					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			PCLc	PCL/CUR2	PCL/CUR4			PCLc	PCL/CUR2	PCL/CUR4		
B			PCLc	PCL/CUR2	PCL/CUR4			PCLc	PCL/CUR2	PCL/CUR4		
C			PCLc	PCL/CUR2	PCL/CUR4			PCLc	PCL/CUR2	PCL/CUR4		
D			PCL/CUR1	PCL/CUR3	Medio			PCL/CUR1	PCL/CUR3	Medio		
E			PCL/CUR1	PCL/CUR3	Medio			PCL/CUR1	PCL/CUR3	Medio		
F			PCL/CUR1	PCL/CUR3	Medio			PCL/CUR1	PCL/CUR3	Medio		
G			C+	C+	C+			C+	C+	C+		
H			C-	C-	C-			C-	C-	C-		

Figura 13. Disposición de fibras y películas para muestras de PCL/CUR.

Para el proceso de montaje de placa 150 μ L de caldo nutritivo N. 1 se colocó en todos los pocillos de las placas y alícuotas de 50 μ L de las cepas de estudio (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) en todos los pocillos con excepción de los pocillos de Medio que se trató como blanco de lectura. Como control positivo (C+) se empleó Medio de Cultivo inoculado con la cepa de estudio y como control negativo (C-) se utilizó medio limpio adicionado con fibras y películas de PCL. Adicionalmente se agregaron controles de las cuatro concentraciones de CUR pura, las placas se incubaron a 35°C por 24, 48 y 72 h según correspondiera.

Al finalizar el periodo de incubación, las fibras y películas se retiraron de los pocillos con pinzas estériles y colocados en una nueva placa para posteriormente ser lavados con 200 μ L de medio limpio, las fibras y películas se descartaron y ambas placas fueron leídas en un lector de microplaca (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 600 nm. Finalmente, las absorbancias fueron reportadas.

11.2.6 Análisis estadístico.

Los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente. Los resultados se expresaron como el promedio de las mediciones \pm desviación estándar. Los datos fueron evaluados utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía), utilizando el programa Graph Pad Prism versión 6.0c. Los resultados son considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

XII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó la técnica estándar de electrohilado para preparar las nanofibras PCL / CUR. Para el presente estudio, las condiciones óptimas de electrohilado fueron las siguientes: distancia desde la punta de la jeringa al colector: 10 cm, voltaje: 20 kV y caudal: 1 mL / h. Condiciones similares para PCL electrohilado las fibras se describieron antes (Ruckh *et al.*, 2012) utilizando una solución de PCL al 12% p / v que se cargó en una jeringa de vidrio con una aguja de punta roma de calibre 20G mediante una bomba de inyección a una velocidad de 2,3 a 2,6 mL/h. Un alto voltaje proveniente de una fuente de alimentación de 18-21 kV a la aguja de punta roma que se colocó a 10–11,5 cm de la placa colectora conectada a tierra. Por lo tanto, condiciones similares de electrohilado ambos estudios tuvieron éxito en la producción de nanofibras.

Se utilizó SEM para determinar el diámetro promedio de fibra, porcentaje de porosidad y morfología de las fibras. Desde una vista macroscópica, las nanofibras eran suaves y estables, con adecuada elasticidad y resistencia a la deformación al tacto; el espesor para todas las muestras utilizadas fue de 0,3 cm (Figura 14A). Las membranas con mayor concentración de cúrcuma (PCL/CUR3 y PCL/CUR4) eran de color amarillo a simple vista.

Todas las muestras presentaron fibras bien definidas, con superficie lisa y sin presencia de microesferas, PCL/CUR2, PCL/CUR3 y PCL/CUR4 presentaron un tamaño y forma similares a las de PCLc (control) (Figura 14D-F); Por el contrario, las fibras PCL/CUR1 eran tres veces más gruesas que las fibras PCLc, y con una apariencia de fibras planas (Figura 14 C) en contraste con el resto de las muestras que presentaban fibras uniformes (Ding *et al.*, 2010). En el caso de las fibras de PCL/CUR4, se pueden ver algunos artefactos electropulverizados en las membranas; esto puede ser debido a las pequeñas variaciones de temperatura y porcentaje de humedad en el medio ambiente.

El diámetro promedio de las fibras fue uniforme, con una desviación estándar baja, en el rango de los 441 a 557 nm para las fibras PCL/CUR con excepción de las PCL/CUR1. Para las fibras PCLc, el tamaño estaba entre 500 ± 165 nm con una frecuencia más alta entre

los 320 y 440 nm. Como se mencionó antes, con excepción de las fibras PCL/CUR1 (1734 ± 525 nm), los diámetros de las fibras PCL/CUR fueron constantes. Por otro lado, para las fibras de PCL/CUR2 los tamaños de las fibras estaban por encima de 709 ± 254 nm, las fibras PCL/CUR3 eran de 441 ± 154 nm y las fibras PCL/CUR4 presentó diámetros de 557 ± 161 nm.

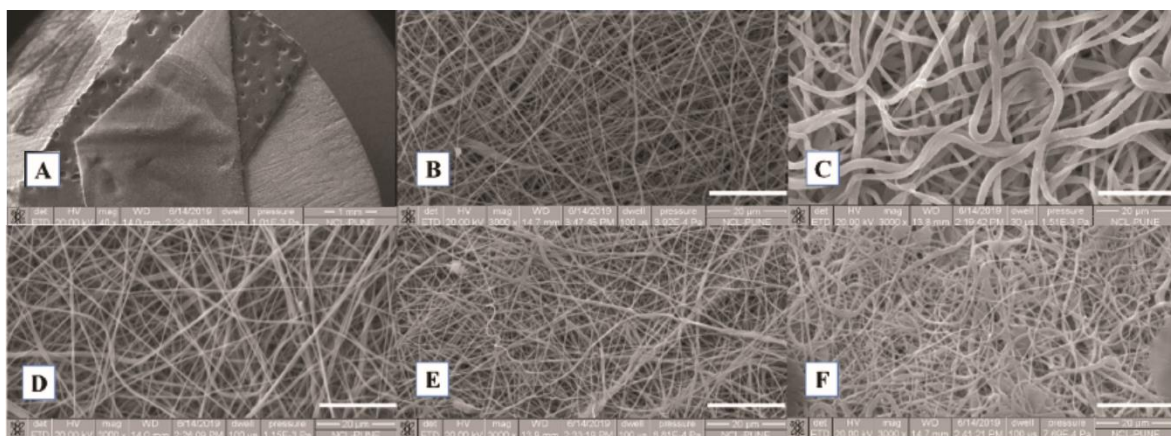


Figura 14. Micrografía de las distintas muestras de PCL/CUR.

Los diámetros de las fibras fueron similares a los informados por Ruckh *et al.*, donde el diámetro de la fibra PCL estaba entre 557 ± 399 nm. Las últimas fibras de PCL se propusieron para la ingeniería de tejidos óseos y un sistema de administración de fármacos de rifampicina. Varios estudios informaron diversos diámetros promedio de fibras (Ruckh *et al.*, 2012) para aplicaciones biomédicas. Por su parte, Yang *et al.*, obtuvieron fibras PCL y PCL-gentamicina con un diámetro promedio de 100-120 nm (Yang *et al.*, 2017). En otro estudio, se obtuvieron diámetros entre 1403 ± 660 nm (Guatam *et al.*, 2014).

Finalmente, Ramírez-Cedillo *et al.*, informó el diámetro de fibra más alto entre 2990 ± 1020 nm, que se consideró adecuado para la ingeniería de tejido óseo. Como puede observarse en la literatura anterior y nuestros resultados, no se informa de un diámetro específico para las fibras de PCL, que están destinadas a aplicaciones biomédicas. Shababdoust *et al.*, informó que el diámetro más alto para las fibras PU/CUR estaba por encima de 284 ± 112 nm (Shababdoust *et al.*, 2017). En el caso de las fibras CAP/CUR, el tamaño estaba entre 300 ± 20 nm (Ravikumar *et al.*, 2017). El diámetro medio de fibra de las nanofibras PHBV/CUR varió de 207 ± 56 a 519 ± 15 nm, dependiendo de la concentración

de curcumina (Mutlu *et al.*, 2018); Las nanofibras de goma de almendra/PVA/CUR variaron de 121 ± 31 a 169 ± 35 nm, dependiendo también de la concentración de curcumina (Rezaei & Nasirpour, 2018). Por lo tanto, como se citó anteriormente, no existe una relación clara entre la concentración de CUR y el diámetro de la fibra. Para nuestra aplicación propuesta, es deseable que las fibras se degraden o reabsorban en el medio de la biopelícula de modo que en la producción y recuperación de metabolitos secundarios no se necesite más extracción. El primer paso de nuestro estudio es demostrar que las fibras de PCL/CUR son útiles para la producción de biopelículas bacterianas. Luego, serán necesarios más estudios para determinar los diámetros de fibra apropiados para la aplicación específica o el metabolito requerido.

12.2 Ensayo de proliferación en fibras y películas de PCL/CUR

Los estudios de crecimiento bacteriano son importantes para determinar si las fibras PCLc y PCL/CUR mejoran la proliferación bacteriana en comparación con las películas de PCLc y PCL/CUR y si estas membranas fibrosas alteran la viabilidad de las células bacterianas, ya que estos dos parámetros influyen en la formación de biopelículas. Por lo tanto, en este trabajo, una bacteria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) y dos bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) se expusieron durante 0,5, 12 y 24 h a todas las muestras de fibras y películas para evaluar su citotoxicidad bacteriana y promoción de la formación de biopelículas.

La Figura 15 muestra cómo la presencia de las nanofibras no afecta la viabilidad de ninguno de las tres cepas bacterianas probadas; El comportamiento de todas las densidades ópticas (O.D.) es similar con el crecimiento normal durante el tiempo (ANOVA $P < 0,05$). Para explicar mejor los resultados obtenidos, el porcentaje de proliferación se calculó la tasa, teniendo en cuenta el crecimiento normal de cada bacteria (suspensión bacteriana sin fibras ni películas), donde la O.D. es la densidad óptica obtenida a 600 nm después del tiempo de exposición.

Comparando la eficiencia en el incremento de la proliferación bacteriana entre las fibras PCL/CUR y las películas PCL/CUR para *Escherichia coli*, después de 30 min de

incubación, tanto las fibras como las películas retrasan el crecimiento normal, ~ 7% para fibras y ~ 30% para películas, respectivamente. Luego, después de las 12 h, se observó alrededor de ~ 30% de crecimiento mejorado en presencia de fibras, y se provocó una gran reducción del crecimiento de alrededor de ~ 73% en las películas. El mismo comportamiento se observó a las 24 h de incubación. Por lo tanto, para *E. coli*, las nanofibras de PCL/CUR incrementan claramente la tasa de proliferación y las películas de PCL/CUR alteran el crecimiento normal. Al comparar entre cada formulación individual de películas y fibras, las microfibras electrohiladas más eficientes son PCL/CUR3, que aumentó el crecimiento aproximadamente un 37% más que el crecimiento normal en 12 y 24 h, seguido de las fibras PCLc, que potenciaron el crecimiento alrededor de un 32% a las 24 h. las fibras menos interesantes fueron PCL/CUR1 con solo un 5% más de crecimiento que el control a las 24 h. No se puede ver una diferencia clara entre las fibras PCL/CUR con respecto a su efecto bioactivo cuando se varió la concentración de CUR. Este último resultado es valioso para evaluar la concentración adecuada de CUR, según la aplicación y los resultados esperados (Figura 15A).

En el caso del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, se observó un comportamiento bacteriano diferente en comparación con los últimos resultados. En general, las películas de PCL/CUR no afectaron el crecimiento bacteriano en ningún intervalo de tiempo probado (ANOVA $P < 0,05$). Por el contrario, las fibras PCL/CUR retrasan el crecimiento en ~ 52% después de las primeras 12 h, pero después de 24 h, todas las fibras PCL/CUR aumentan la tasa de proliferación ~ 15%; esto podría deberse a un período de adaptación. A las 24 h, PCL/CUR3 presentó los mejores resultados con un incremento de (~ 31%), seguido de las fibras PCLc con un 22% de crecimiento mejorado con respecto al control. Al igual que con las películas de PCL/CUR, PCL/CUR2 y PCL/CUR4 no afectan significativamente el crecimiento normal de *P. aeruginosa* (Figura 15B).

Finalmente, las fibras PCL/CUR promovieron de manera eficiente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en comparación con las películas PCL/CUR. A las 0,5 h, las fibras de PCL/CUR promovieron ~ 16% la tasa de proliferación y las películas de PCL/CUR redujeron el crecimiento en ~ 11%. Luego, a las 12 h, las fibras PCL/CUR mejoraron la replicación celular en aproximadamente 80%, mientras que las películas PCL/CUR mejoraron solo ~

5%. Por último, después de 24 h, las fibras PCL/CUR promovieron el crecimiento en ~ 36% y las películas de PCL / CUR redujeron el crecimiento normal en ~ 14%. La fibra PCL/CUR con los mejores resultados fue la PCL/CUR1, con ~ 94% de incremento en el crecimiento a las 12 h, seguida de las fibras PCL/CUR3, que promovieron la replicación de *S. aureus* en ~ 86% a las 12 h (Figura 15C).

De esta forma se puede demostrar que las fibras PCL/CUR son sistemas eficientes que promueven el crecimiento de todas las bacterias probadas; en particular, estas membranas fibrosas fueron más efectivas para promover el crecimiento en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Las bacterias expuestas a películas PCL/CUR presentaron diferente comportamiento dependiendo de la cepa bacteriana. De todas las fibras PCL/CUR, el sistema con mejores resultados fue PCL/CUR3, pero no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de CUR (ANOVA $P < 0.05$). El comportamiento de las bacterias expuestas hacia los andamios de PCL/CUR depende sobre la cepa bacteriana. No obstante, el sistema con mejores resultados fue PCL/CUR3, aunque no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de CUR (ANOVA $P < 0.05$).

En el presente estudio, para asegurar el proceso de esterilización (15 min de irradiación UV por ambos lados), todas las fibras y películas de PCL/CUR fueron expuestas a medio de cultivo estéril para observar la presencia de cualquier crecimiento, en los cuales no se observaron cambios en la O.D. Además, para demostrar que diferentes concentraciones de CUR tienen efecto sobre las bacterias, y confirmar la capacidad de CUR para causar estrés celular, extracto etanólico de CUR pura (secado) a diferentes concentraciones (CUR1: 5 μM ; CUR2: 7 μM ; CUR3: 14 μM y CUR4: 27 μM) y hojas de CUR pura se probaron en presencia de las tres cepas bacterianas. Se puede observar que la hoja de CUR sin procesar no afecta significativamente el crecimiento normal de cada bacteria (ANOVA $P < 0.05$), pero los extractos etanólicos de CUR secos disminuyeron el crecimiento proporcionalmente a la concentración; por lo tanto, cuanto mayor sea la concentración de CUR empleada, mayor será la reducción de la proliferación en las tres bacterias en todo momento. Sin embargo, esta disminución no es significativamente diferente (ANOVA $P < 0.05$) entre las concentraciones de CUR, y se observa claramente una tendencia.

A pesar de nuestros resultados, se ha informado que la CUR tiene actividad bactericida, especialmente con bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). En nuestro estudio, CUR se cargó en fibras poliméricas a concentraciones muy bajas (5-27 M), lo que explica la baja actividad bactericida de las fibras PCL / CUR. Además, se informó que el modo de acción antimicrobiana de la curcumina depende del sistema de administración (Shlar *et al.*, 2017). En nuestro estudio, no se observaron diferencias significativas (ANOVA $P < 0,05$) en la actividad de PCL / CUR entre bacterias Gram positivas (*S. aureus*) y Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*); sin embargo, se informó que las bacterias Gram positivas muestran una sensibilidad significativamente mayor a la curcumina que las Gram negativas.

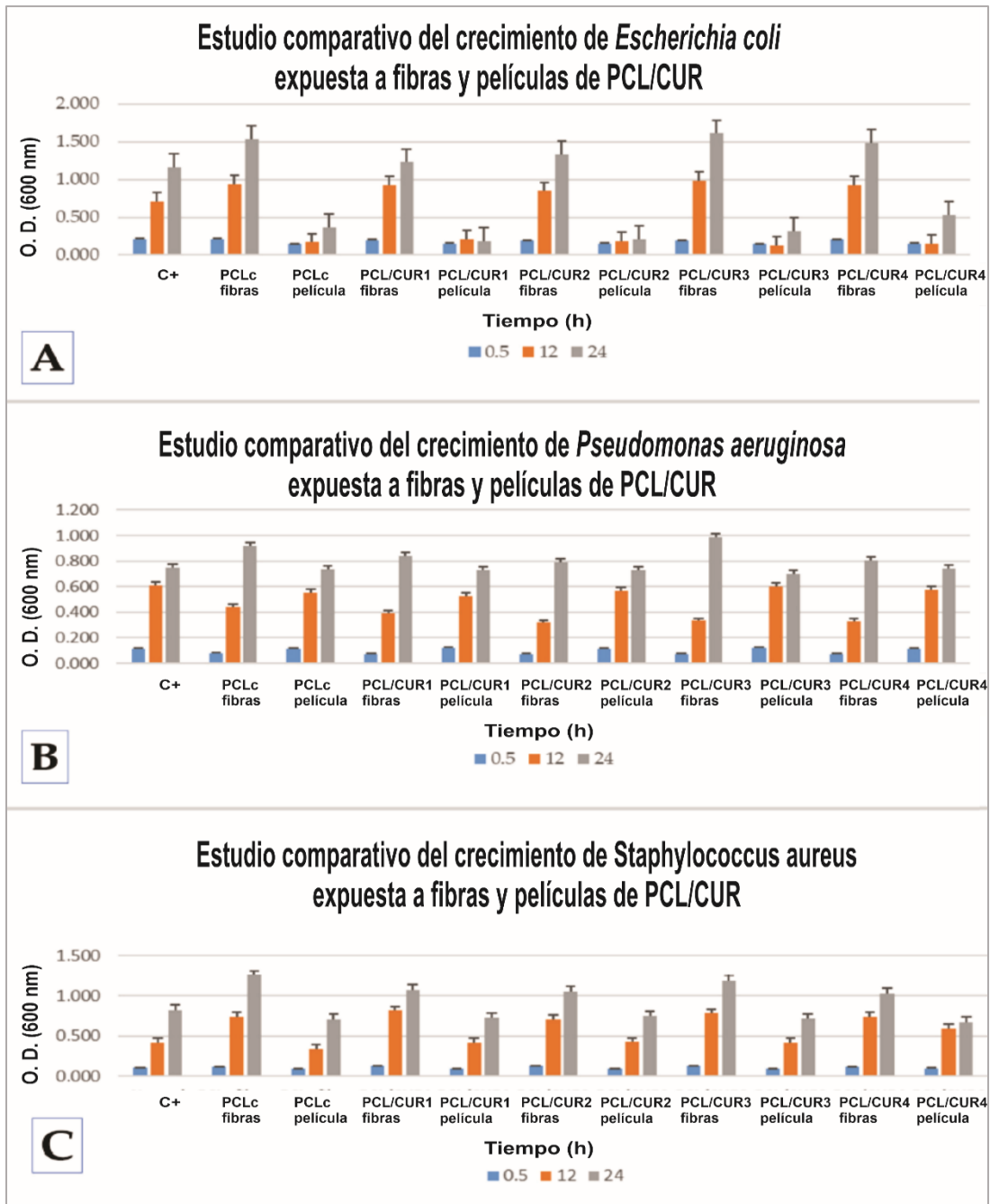


Figura 15. Ensayo de Proliferación en fibras y películas.

Nuestras observaciones concuerdan con la literatura disponible, Ramírez-Cedillo *et al.*, estableció que las fibras de PCL sin ningún tratamiento no provocan la inhibición de *S. aureus* (Ramírez-Cedillo *et al.*, 2019). En otro estudio, *P. aeruginosa* (Gram-negativa) y *S. epidermidis* (Gram-positiva), las especies bacterianas mostraron un crecimiento suspendido desinhibido en medio expuesto a membranas de PCL después de 6 h a 37 °C (Ruckh *et al.*,

2012); Asimismo, *P. aeruginosa* proliferó rápidamente mientras secretaba sustancias poliméricas extracelulares (EPS), con 6 h en caldo expuesto a andamios de PCL, lo que indica que las horas iniciales después de la inoculación son críticas para inhibir la formación de biopelículas (Ruckh *et al.*, 2012). Finalmente, Adeli-Sardou *et al.* informó que la fibra PCL/GEL no tenía ningún efecto sobre las bacterias productoras de biopelículas *S. aureus*, *P. mirabilis*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *P. aeruginosa* (Adeli-Sardou *et al.*, 2018) Así, este último y nuestros resultados confirman que los andamios de PCL no dificultan el crecimiento de cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas, por lo que pueden ser una excelente opción para estudiar la formación de biopelículas bacterianas.

Varios estudios arrojan información importante sobre las propiedades bioactivas de CUR que provocan daños en la membrana en todos los microorganismos probados. Con concentraciones de 25, 50 y 100 μM de CUR I, y después de 30 min de exposición, entre ~ 10-20% de la viabilidad celular se vio afectada en la mayoría de las cepas probadas. CUR I a la concentración más baja de 25 μM después de 120 min no disminuye la viabilidad celular más de ~ 20%, con la excepción de *S. aureus*, que mostró una alta susceptibilidad a CUR (Tyagy *et al.*, 2015). Los investigadores explicaron que la mejor protección de las bacterias Gram negativas contra los antimicrobianos se debe a la estructura específica de sus paredes celulares. Lipopolisacáridos de la envoltura celular externa representan la barrera de permeabilidad más externa para una variedad de compuestos antimicrobianos, responsables del flujo inusualmente lento de solutos lipofílicos en bacterias Gram negativas. Por el contrario, las proteínas porinas incrustadas en la membrana externa representan los principales canales de entrada de solutos en las células de las bacterias Gram negativas (Priyadarsini, 2014).

Comparando los resultados obtenidos entre las fibras y películas PCL/CUR, las fibras PCL/CUR incrementaron significativamente el crecimiento (ANOVA $P < 0.05$) de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en todo momento (en todos los periodos de incubación). Para *Pseudomonas aeruginosa*, el crecimiento se produjo solo después de 24 h. Las películas de PCL/CUR, por otro lado, retrasan la tasa de replicación bacteriana de

Escherichia coli y no afectan significativamente el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Las propiedades potenciadoras del crecimiento bacteriano se atribuyen a la estructura tridimensional que ofrecen las fibras y a la mayor superficie de contacto que poseen estas escamas fibrosas (Villarreal-Gómez et al., 2016).

Las células no solo crecieron sobre la superficie fibrosa, sino que la porosidad de las membranas condujo a la penetración de células bacterianas en las fibras. Este fenómeno se puede ver claramente en la Figura 16. Estas reacciones también se pueden corroborar comparando el tamaño celular de cada bacteria; *Escherichia coli* es una bacteria bacilo Gram negativa típica con dimensiones cilíndricas de 1,0 a 2,0 μm de longitud y un radio de aproximadamente 0,5 μm (Zheng et al., 2016). Se ha informado que *Pseudomonas aeruginosa* tiene un tamaño de alrededor de $\sim 10 \mu\text{m}$, y alrededor de 0,1 a 0,25 μm de ancho (Deforet et al., 2015) y aproximadamente de 1 a 1,5 μm de largo para *Staphylococcus aureus* (Monteiro et al., 2015). Las fibras PCL creadas con los parámetros de la técnica de electrohilado estándar informaron fibras con tamaños de poros entre 10 y 45 μm (Rnkak-Kovacina & Weiss, 2011). Estos datos apoyan la idea de la penetración bacteriana en la estructura tridimensional de las membranas de PCL/CUR, donde las células bacterianas proliferan dentro de la estera; en consecuencia, después de la exposición a CUR, las células bacterianas se estresaron y sintetizaron las moléculas extracelulares que producen las biopelículas.

12.3 Ensayo de formación de Biofilms

Este ensayo se realizó como una prueba cualitativa para observar la eficacia de las fibras como andamios bacterianos para la formación de biopelículas y, por lo tanto, es complementario al ensayo de crecimiento bacteriano anterior. Por esa razón, teniendo en cuenta los resultados anteriores, y que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento celular, y no muchas incidencias fueron definitivas entre las concentraciones de CUR en los resultados. Las fibras PCL/CUR4 se eligieron para mostrar la formación de biopelículas bacterianas a lo largo de las fibras debido a la mayor cantidad

de CUR embebida en las fibras y la mejor apreciación de las células bacterianas colocadas en las fibras.

La Figura 16 A-F muestra cómo *E. coli* y *P. aeruginosa* están formando la biopelícula bacteriana a lo largo de las fibras de PCL / CUR4 durante las 12 h de incubación. Como han demostrado otros estudios, las bacterias Gram negativas *P. aeruginosa* y Gram positivas *S. epidermidis* han mostrado un crecimiento suspendido desinhibido en medio expuesto a fibras de PCL después de 6 h a 37 °C; Además, ambas especies bacterianas se multiplicaron prolíficamente y poblaron las superficies membranosas dentro de densas colonias.

S. aureus creó una biopelícula muy consolidada (Figura 16G), pero parece degradar las fibras poliméricas después de 12 h (Figura 16I). *S. aureus* ha sido identificado productora de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que son capaces de degradar varias moléculas poliméricas, con el objetivo de despegarse la superficie a la que se encuentran adheridas (Kaplan *et al.*, 2018); esta observación es una idea del mecanismo de estrés celular de *S. aureus*.

A pesar de este hecho, varios grupos de investigación han estudiado la formación de biofilms a las 24 h (Moormeier & Bayles, 2017; Ripa *et al.*, 2020), y otros estudios han empleado periodos más cortos de incubación (Flament-Simon *et al.*, 2019; Rasamiravaka *et al.*, 2015). En este estudio, el objetivo era observar como las colonias bacterianas se adhieren a la superficie de las fibras y proliferan dentro de la estructura tridimensional de los andamios creando biofilms. Sin embargo, como trabajo a futuro se pretende estudiar la formación de biofilms bacterianos después de 24 h y evaluar su eficiencia en distintos estudios de aplicación biotecnológica.

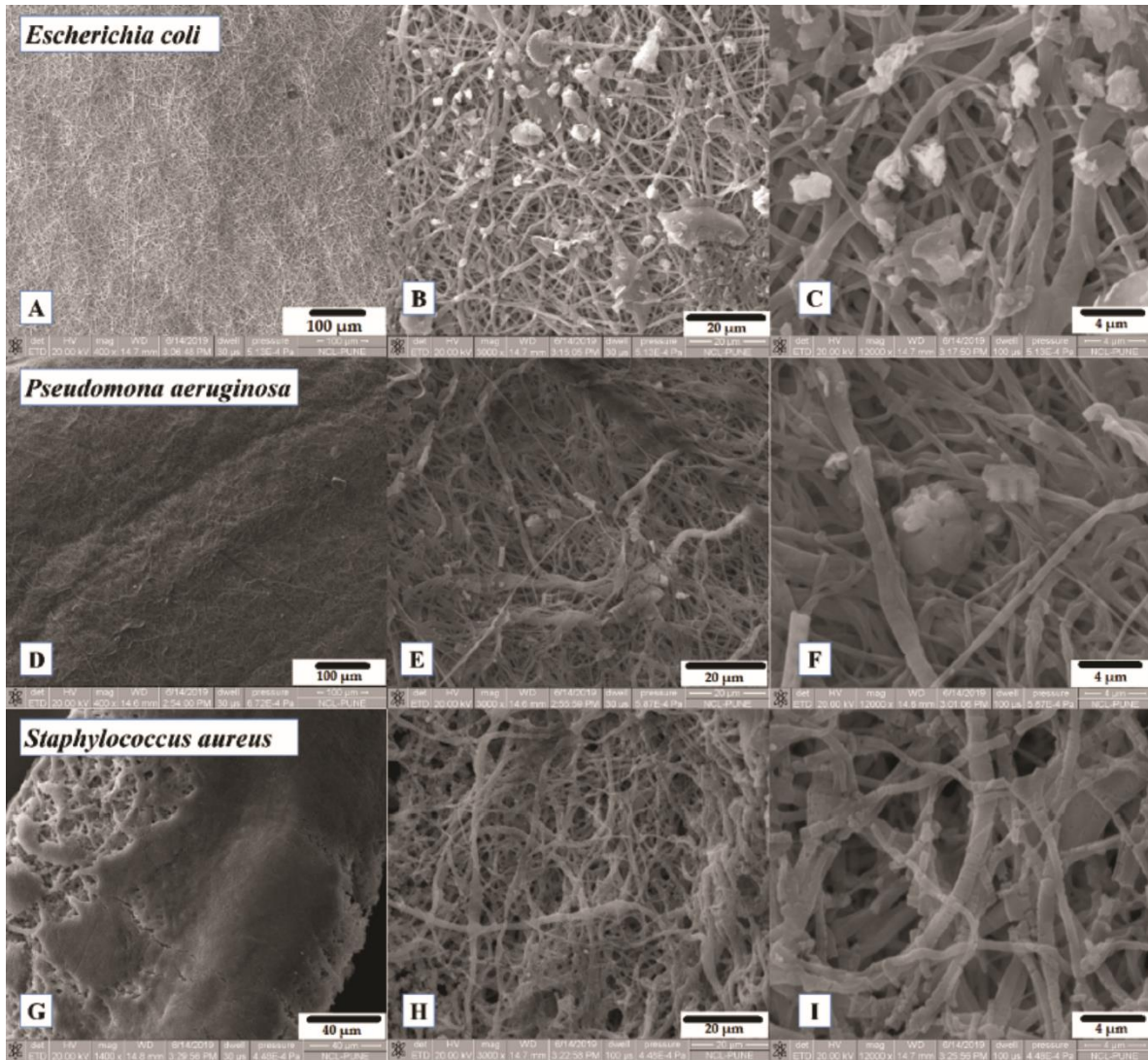


Figura 16. Micrografía ensayo de formación de biofilms.

El objetivo de incorporar un componente bactericida natural como CUR (Killi *et al.*, 2017) en las nanofibras poliméricas inertes de PCL es estimular la biopelícula bacteriana provocando estrés celular en las bacterias probadas. Asimismo, Chu *et al.*, propusieron que el estrés mecánico (que es una de las formas de estrés celular que promueve la formación de biopelículas) podría surgir inicialmente del estrés físico, que acompaña al confinamiento de la colonia, dentro de microcavidades o entornos de hidrogel que recuerdan al citosol de las células huésped. La formación de biopelículas se puede mejorar mediante un circuito de retroalimentación modulado por el acceso de nutrientes, en el que la deposición de la matriz de biopelículas puede ser particularmente alta en áreas de mayor estrés mecánico y biológico,

con la matriz depositada mejorando aún más los niveles de estrés. Esta regulación de retroalimentación puede conducir a la formación de biopelículas adaptativas y diversas guiadas por tensiones ambientales (Chu *et al.*, 2018).

Por lo tanto, nuestros andamios tridimensionales PCL/CUR pueden generar el estrés mecánico anterior a las células bacterianas, mientras que el efecto antimicrobiano de la CUR puede aumentar las especies reactivas de oxígeno (ROS) e inhibir el transporte de electrones (Shlar *et al.*, 2017). En algunas bacterias, como *E. coli* y *P. aeruginosa*, la motilidad bacteriana es importante para el crecimiento celular (Oura *et al.*, 2015); por lo tanto, gracias al empleo del electrohilado, las nanofibras electrohiladas cancelarán la motilidad que las células bacterianas necesitan para replicarse, lo que provocará un estrés celular que estimulará la formación de biopelículas.

Una vez más, en condiciones de estrés, las células bacterianas pueden buscar activamente nichos protectores, espacialmente aislados, como microcavidades en los microambientes mecánicos complejos o los compartimentos citosólicos de las células huésped. Allí, pueden protegerse de los efectos adversos del medio ambiente y crecer a altas densidades. El empaquetamiento celular ajustado resultante conduce a diversas formas de comportamiento colectivo, moldeadas tanto por respuestas biológicas como por efectos mecánicos (Chu *et al.*, 2018).

La investigación en la producción de biopelículas de forma controlada debe su interés a la producción potencial de metabolitos interesantes en la industria biotecnológica. Los biofilms permiten que las células sésiles vivan de forma coordinada y favorece su proliferación. La biopelícula en sí es una matriz circundante que se compone principalmente de exopolisacáridos que permite su unión a superficies inertes (por ejemplo, rocas, vidrio, plástico) u orgánicas (por ejemplo, piel, cutícula, mucosa) (Berlanga *et al.*, 2016).

Las cepas de *Pseudomonas* podrían considerarse para uso futuro en la biorremediación de fuentes de agua contaminadas con derrames de petróleo. Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar el potencial de las cepas aisladas para degradar los hidrocarburos *in situ* en condiciones ambientales naturales (Dasgupta *et al.*, 2013).

Escherichia coli es una de las bacterias con las que se ha estudiado en detalle la formación de biopelículas, y es especialmente apreciada para aplicaciones biotecnológicas debido a su capacidad genética (Da Re *et al.*, 2007). Entre los productos industriales que puede producir *E. coli* se encuentran el licopeno (Wang *et al.*, 2012) y el ácido succínico (Mienda & Salleh, 2017), entre otros.

Por último, *Staphylococcus aureus* y otras bacterias patógenas se han probado como bacterias tolerantes a metales pesados para la eliminación de cadmio, cromo, níquel y zinc en los efluentes de las refinerías de petróleo (Oaikhena *et al.*, 2016). Asimismo, otros usos incluyen la biorremediación de aceite en tintes de tina de efluentes textiles (Abatenh *et al.*, 2017).

CAPITULO IV. CONCLUSIONES GENERALES

XIII. CONCLUSIONES

El estudio de la producción de biopelículas ha cobrado interés de dos formas: en primer lugar, las biopelículas son uno de los principales problemas a los que se enfrentan las aplicaciones biomédicas, ya que su presencia afecta a un gran número de dispositivos médicos. Además, la mayoría de las bacterias patógenas pueden protegerse gracias a la producción de biopelículas. Por otro lado, las biopelículas de bacterias específicas pueden producir metabolitos que se pueden extraer y utilizar en diferentes áreas de la industria biotecnológica. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Lactobacillus spp.* son interesantes en ambos sentidos. Por lo tanto, es importante controlar y manipular la formación de biopelículas para su estudio y para una mejor comprensión para el diseño de métodos estandarizados para evitar la presencia de biopelículas en dispositivos médicos o recolectar biopelículas de bacterias para su uso en enfoques biotecnológicos.

En la primera parte de esta investigación se estudiaron los efectos que pueden tener fibras electrohiladas con distintas fuentes de carbono y nitrógeno para la proliferación bacteriana y la formación de biofilms en estas bacterias, encontrando que, aunque la proliferación en *E. coli* no se ve beneficiada en gran medida (23 % de proliferación), las otras bacterias pueden tener un incremento en su proliferación de hasta 400 % para *Lactobacillos spp.*, implementando fibras de PCL suplementadas con extracto de levadura, para *Staphylococcus aureus* podemos incrementar el crecimiento en un 95 % con películas de PCL adicionadas con extracto de levadura, por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa* podemos incrementar la producción en un 36% si utilizamos fibras de PCL con glucosa.

En la segunda parte de este estudio, se demostró que el uso de fibras electrohiladas de PCL/CUR incrementan significativamente el crecimiento bacteriano comparado con películas lisas con la misma composición, además de ser eficaces en la formación de biofilms.

XIV. TRABAJO A FUTURO

Debido a la novedad de este tipo de trabajo poco se conoce sobre la capacidad de las bacterias para adherirse a superficies membranosas producidas por electrohilado. Por lo tanto, se requiere un estudio extensivo en las distintas áreas de aplicación, la adhesión y formación de biofilms, no solo de las cepas estudiadas sino de otras bacterias de interés. Algunas sugerencias puntuales se describen a continuación.

- Realizar estudios que evalúen y cuantifiquen la adhesión de las bacterias a superficies inertes, como la proteína BAP para *S. aureus.*, de esta manera no solamente se medirá la adhesión sino el potencial de crear biofilms.
- Estudios que demuestren la eficiencia en la producción de metabolitos secundarios de interés biotecnológicos, así como la extracción de estos, y la posible reutilización de los andamios.
- Probar la capacidad de los andamios electrohilados con crecimiento de biofilm, como biorremediadores de suelos, aguas y superficies contaminadas.

LITERATURA CITADA

- Abatenh E., Gizaw B., Tsegaye Z., Wassie M. (2017) Application of microorganisms in bioremediation-review. *J. Environ. Microbiol.* 1 (1), 2–9.
- Abdelrazek, E. M., Hezma, A. M., El-khodary, A., & Elzayat, A. M. (2016). Spectroscopic studies and thermal properties of PCL / PMMA biopolymer blend. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2015.06.001>
- Abrigo, M., Kingshott, P., Mearthur, S. L., Abrigo, M., Kingshott, P., & Mearthur, S. L. (2015). Bacterial response to different surface chemistries fabricated by plasma polymerization on electrospun nanofibers Bacterial response to different surface chemistries fabricated by plasma polymerization on electrospun nanofibers. *Biointerphases*, 301(04), 1–9. <https://doi.org/10.1116/1.4927218>.
- Adeli-Sardou, M.; Torkzadeh-Mahani, M.; Yaghoobi, M.M.; Dodel, M. (2018) Antibacterial and Anti-Biofilm Investigation of Electrospun PCL/gelatin/Lawsone Nano Fiber Scaffolds against Biofilm Producing Bacteria. *Biomacromol.*, 4, 46–57.
- Ahmed, F. E., Lalia B.S. y Hashaikeh, R. (2015). A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. *Desalination*. 356:15–30.
- Aliah N.N., Ansari M.N.M. (2017) Thermal analysis on Characterization of Polycaprolactone (PCL) – Chitosan Scaffold for Tissue Engineering. *Int J Sci Res Eng Technol.*, 6(2):2278–882.
- Barclay, T., Ginic-markovic, M., Cooper, P. D., Petrovsky, N., & Article, R. (2012). The chemistry and sources of fructose and their effect on its utility and health implications ., 3(June), 67–82.
- Bedoya, J. C., Dealis, M. L., Silva, C. S., Niekawa, E. T. G., Navarro, M. O. P., & Simionato, A. S. (2019). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas Aeruginosa* LV strain, 17(January), 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.025>
- Berlanga, M.; Guerrero, R. (2016) Living together in biofilms: The microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb. Cell Factories*, 15, 165.

- Bezerra E.B., França D.C., Morais D.D., Rosa M., Morais J.P.S., Araújo E.M. (2017) Processing and Properties of PCL/Cotton Linter Compounds. *Mater Res*, 20(2):317–25.
- Brock, T. & Madigan, M. 1993. *Microbiología*. 6ta Edición. Prentice Hall Hispanoamérica S. A. México. Ranea, F. 2002. <http://www.microbiologia.com.ar/fisiologia/crecimiento.html>
- Catania, V., Lopresti, F., Cappello, S., Sca, R., & Quatrini, P. (2020). Innovative , ecofriendly biosorbent-biodegrading bio fi lms for bioremediation of oil- contaminated water. *New BIOTECHNOLOGY*, 58(May), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.04.001>
- Ceylan, M., Yang, S., & Asmatulu, R. (2017). Effects of gentamicin-loaded PCL nanofibers on growth of Gram positive and Gram negative bacteria. *IJAMBR*, 5, 40–51.
- Chakraborty, S. P., Mahapatra, S. K., & Roy, S. (2011). Biochemical characters and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(3), 212–216. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60029-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60029-4)
- Chen, J., Wang, J., Li, R., Lu, A., & Li, Y. (2015). Thermal and X-ray Diffraction Analysis of Lactose Polymorph. *Procedia Engineering*, 102, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.01.165>
- Chu, E.K.; Kilic, O.; Cho, H.; Groisman, A.; Levchenko, A. (2018) Self-induced mechanical stress can trigger biofilm formation in uropathogenic Escherichia coli. *Nat. Commun.*, 9, 4087.
- Clark, D. P. (1989). The fermentation pathways of Escherichia coli. *FEMS Microbiology Reviews*, 5(3), 223–234. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03398.x>
- Cortés-Sánchez, A., & Mosqueda-Olivares, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico . *Química Viva*, (2), 64–90.
- Cui, S., Zhao, J., Liu, X., Chen, Y. Q., Zhang, H., & Chen, W. (2016). Maximum-biomass prediction of homofermentative Lactobacillus. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.12.003>

- Da Re, S.; Le Quéré, B.; Ghigo, J.-M.; Beloin, C. (2007) Tight Modulation of Escherichia coli Bacterial Biofilm Formation through Controlled Expression of Adhesion Factors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 3391–3403.
- Damasceno, R., Roggia, I., Pereira, C., & de Sá, E. (2013). Rhizobia survival in seeds coated with polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibres. *Can J Microbiology*, 59(11), 1–15.
- Dasgupta, D.; Ghosh, R.; Sengupta, T.K. (2013) Biofilm-Mediated Enhanced Crude Oil Degradation by Newly Isolated Pseudomonas Species. *ISRN Biotechnol.*, 1–13.
- De la Garza-Ramos, M. Alcázar-Pizaña, A. (2018). Crecimiento, Nutrición y Metabolismo bacteriano en M. Negroni (Ed.), *Microbiología Estomatológica* (3er ed., Vol. 1, pp. 30–38). Panamericana.
- Deforet, M.; Van Ditmarsch, D.; Xavier, J.B. (2015) Cell-Size Homeostasis and the Incremental Rule in a Bacterial Pathogen. *Biophys. J.*, 109, 521–528.
- Desitti, C., Beliavski, M., Tarre, S., Avrahami, R., Zussman, E., & Green, M. (2017). Journal of Water Process Engineering Durable electrospun microtubes for encapsulation of bacteria in atrazine bioremediation. *Journal of Water Process Engineering*, 19(August), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.08.004>
- Ding, B.; Wang, M.; Wang, X.; Yu, J.; Sun, G. (2010) Electrospun nanomaterials for ultrasensitive sensors. *Mater. Today*, 13, 16–27
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., & Dicks, L. (2009). Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Systematic Applied Microbiology*, 32(8), 593–600. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.08.002>
- Endurance-Oaikhena E., Bawa-Makaije D., Dangmwan-Denwe S., Muktar-Namadi M., Ahmed-Haroun A. (2016) Bioremediation potentials of heavy metal tolerant bacteria isolated from petroleum refinery effluent. *Am. J. Environ. Prot.*, 5 (2), 29–34.
- Fallis, A. (2013) Turmeric genus Curcuma. *Journal of Chemical Information and Modeling*. (Vol. 53). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Fan, Y., Tian, X., Zheng, L., Jin, X., Zhang, Q., Xu, S., ... Wang, H. (2021). Materials Science & Engineering C Yeast encapsulation in nanofiber via electrospinning : Shape transformation , cell activity and immobilized efficiency. *Materials Science & Engineering C*, 120(November 2020), 111747.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111747>

Flament-Simon, S., Duprilot, M., Mayer, N., Garcia, V., Alonso, M., Blanco, J., & Nicolas-Chanoine, M. (2019). Association Between Kinetics of Early Biofilm Formation and Clonal Lineage in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01183>

Fuhrer, T., Fischer, E., & Sauer, U. (2005). Experimental Identification and Quantification of Glucose Metabolism in Seven Bacterial Species †, *187*(5), 1581–1590. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1581>

Galié S, García-Gutiérrez C, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. (2018) Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol* [Internet]. May 7; 9:898. Available characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite sca_old for tissue engineering applications. *J. Mater. Sci.*, *49*, 1076–1089

Gautam, S.; Chou, C.-F.; Dinda, A.K.; Potdar, P.D.; Mishra, N.C. (2014) Fabrication and comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arab J Chem*. doi: 10.1016/j.arabjc. 2015.11.015

Giuliodori, A. M., Gualerzi, C. O., Soto, S. M., & Vila, J. (2007). Review on Bacterial Stress Topics, (January 2019). <https://doi.org/10.1196/annals.1391.008>

Gordegir, M., Oz, S., Yezer, I., Buhur, M., Unal, B., & Demirkol, D. O. (2019). Enzyme and Microbial Technology Cells-on-nano fibers: Effect of polyethyleneimine on hydrophobicity of poly-ε-caprolacton electrospun nano fibers and immobilization of bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, *126*(December 2018), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.03.002>

Gutiérrez, L., & Agudelo, D. (2009). Control del crecimiento In Vitro sobre cepas Gram positivas y Gram negativas productoras de mastitis *. *Rev. Lasillista de Investigación*, *6*(1), 67–74.

Haider A, Haider S, Kang IK. (2015) A from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29867809>.

- Hakobyan, L., Gabrielyan, L., & Trchounian, A. (2012). Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* strains from mineral springs. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(8), 6519–6526. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.077>
- Hammes, W., Schleifer, K. H., & Kandler, O. (1973). Mode of Action of Glycine on the Biosynthesis of Peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*, 116(2), 1029–1053.
- Heinrich, K., Leslie, D. J., & Jonas, K. (2015). *Modulation of Bacterial Proliferation as a Survival Strategy*. *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 92). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.02.004>
- Hernández, S. J., Domínguez, E. L., & Gonzaga, L. (2015). Magnetic Field Influence in *E. coli* and *S. Cerevisiae* Growth and the Ability of *Pseudomonas* sp and *Bacillus* sp to be Phosphorus Solubilizers for Industrial Usage *S. cerevisiae* y la capacidad de solubilizar fósforo en *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp de uso. *Revista de Ciencias*, (1), 109–121.
- Herrero, A., & Flores, E. (2019). Nitrogen Assimilation in Bacteria. In *Encyclopedia of Microbiology* (4th editio, pp. 280–300). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20680-8>
- Hirsch, E., Pantea, E., Vass, P., Domján, J., Verreck, G., Marosi, G. J., & Nagy, Z. K. (2021). Food and Bioproducts Processing Probiotic bacteria stabilized in orally dissolving nanofibers prepared by high-speed electrospinning. *Food and Bioproducts Processing*, 128, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2021.04.016>
- Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35, 322–332.
- Iskandar, C. F., Cailliez-Grimal, C., Borges, F., & Revol-Junelles, A. (2019). Trends in Food Science & Technology Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. *Trends in Food Science & Technology*, 88(March), 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.020>
- Jara, J., Pérez-ramos, A., Rodríguez, J. M., & Fernández, L. (2020). International Journal of

- Food Microbiology Role of *Lactobacillus* biofilms in *Listeria monocytogenes* adhesion to glass surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 334(July), 108804. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108804>
- Jimenez JJ, Minambres B, Garcia JL, and Diaz E (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 4: 824–84.
- Kaplan, J.; Mlynek, K.D.; Hettiarachchi, H.; Alamneh, Y.A.; Biggemann, L.; Zurawski, D.V.; Black, C.C.; Bane, C.E.; Kim, R.K.; Granick, M.S. (2018) Extracellular polymeric substance (EPS)-degrading enzymes reduce staphylococcal surface attachment and biocide resistance on pig skin in vivo. *PLoS ONE*, 13, e0205526.
- Killi, N.; Paul, V.L.; Rathna, G.V.N. (2015) Antibacterial non-woven nanofibers of curcumin acrylate oligomers. *New J. Chem.*, 39, 4464–4470.
- Labban, L. (2014) Medicinal and pharmacological properties of Turmeric (*Curcuma longa*): A review The association between dietary patterns, visceral fat and chronic diseases View project PharmaInterScience Publishers Medicinal and pharmacological properties of Turmeric (Cur.) *Int J Pharm Biomed Sci. Int J Pharm Biomed Sci.* 555(111), 17–2317.
- Latasa, C., Solano, C., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2006). Biofilm-associated proteins. *C. R. Biologies*, 329, 849–857. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.07.008>
- Leon-rodriguez, A. De, Caño-muñiz, S. L., Liu, J., & Summers, D. K. (2016). Indole modifies the central carbon flux in the anaerobic metabolism of *Escherichia coli*: application to the production of hydrogen and other metabolites. *New BIOTECHNOLOGY*, 33(6), 868–873. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.09.005>
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), 48e56.
- Li, Q.; Yu, S.; Li, L.; Liu, G.; Gu, Z.; Liu, M.; Liu, Z.; Ye, Y.; Xia, Q.; Ren, L. (2017) Microbial Communities Shaped by Treatment Processes in a Drinking Water Treatment Plant and Their Contribution and Threat to Drinking Water Safety. *Front. Microbiol.*, 8, 2465.
- Liu, Y., Rafailovich, M. H., Malal, R., Cohn, D., & Chidambaram, D. (2009). Engineering

- of bio-hybrid materials by electrospinning polymer-microbe fibers. *PNAS*, *106*(34), 14201–14206.
- López-Rubio, A., Sanchez, E., Sanz, Y., & Lagaron, J. M. (2009). Encapsulation of Living Bifidobacteria in Ultrathin PVOH Electrospun Fibers. *Biomacromolecules*, *10*, 2823–2829.
- Ma, Jiage, Xu, C., Yu, H., Feng, Z., Yu, W., Gu, L., ... Hou, J. (2021). Food Hydrocolloids Electro-encapsulation of probiotics in gum Arabic-pullulan blend nanofibres using electrospinning technology. *Food Hydrocolloids*, *111*(August 2020), 106381. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106381>
- Ma, Jiangshan, Jiang, H., Li, P., Li, C., Liu, R., & Li, J. (2020). Production of free amino acid fertilizer from tung meal by the newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* LYT-4 strain with simultaneous potential biocontrol capacity. *Renewable Energy*, *166*, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.11.130>
- Marzan, L. W., Barua, R., Akter, Y., Arifuzzaman, M., Islam, M. R., & Shimizu, K. (2017). A single metabolite production by *Escherichia coli* BW25113 and its pflA . cra mutant cultivated under microaerobic conditions using glycerol or glucose as a carbon source. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *15*(1), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.004>
- Mateos P. (22 de abril de 2021). Crecimiento Microbiano. Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema07.html>
- Mendes, A. C., Stephansen K, and Chronakis, I. S. (2017). Electrospinning of food proteins and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *68*:53–68.
- Mienda, B.S.; Salleh, F.M. (2017) *Escherichia coli* strains design from genome-scale perspectives. *AIMS Bioeng.*, *4*, 418–430.
- Moffa, M., Pasanisi, D., Scarpa, E., Marra, A. R., Alifano, P., & Pisignano, D. (2017). Secondary Metabolite Production from Industrially Relevant Bacteria is Enhanced by Organic Nanofibers. *Biotechnology Journal*, *12*(11), 1–7. <https://doi.org/10.1002/biot.201700313>

- Monteiro, J.M.; Fernandes, P.B.; Vaz, F.; Pereira, A.R.; Tavares, A.C.; Ferreira, M.T.; Pereira, P.M.; Veiga, H.; Kuru, E.; VanNieuwenhze, M.S. (2015) Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle. *Nat. Commun.*, 6, 8055.
- Moormeier, D., & Bayles, K. (2017). Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, 104(3), 365–376.
- Mutlu, G.; Calamak, S.; Ulubayram, K.; Guven, E. (2018) Curcumin-loaded electrospun PHBV nanofibers as potential wound-dressing material. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 43, 185–193.
- Nagy, Z. K., Wagner, I., Suhajda, Á., Tobak, T., Harasztos, A. H., Vigh, T., & Sóti, P. L. (2014). Nanofibrous solid dosage form of living bacteria prepared by electrospinning. *EXPRESS Polymer Letters*, 8(5), 352–361. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.39>
- Nancib, A., Nancib, N., Meziane-cherif, D., & Boubendir, A. (2005). Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp . *rhamnosus*, 96, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.09.018>
- Oaikhena, E.E.; Makaije, D.B.; Denwe, S.D.; Namadi, M.M.; Haroun, A.A. (2016) Bioremediation Potentials of Heavy Metal Tolerant Bacteria Isolated from Petroleum Refinery Effluent. *Am. J. Environ. Prot.*, 5, 29–34.
- Ostos-Ortíz, O. L., Rosas-Arango, S. M., & González-Devia, J. L. (2019). Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos. *NOVA*, 129–162.
- Oura, H.; Tashiro, Y.; Toyofuku, M.; Ueda, K.; Kiyokawa, T.; Ito, S.; Takahashi, Y.; Lee, S.; Nojiri, H.; Nakajima-Kambe, T. (2015) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Swarming Motility by 1-Naphthol and Other Bicyclic Compounds Bearing Hydroxyl Groups. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 2808–2818
- Park, Y., Kant, S., Gurav, R., Choi, T., Joong, H., Song, H., ... Yang, Y. (2020). International Journal of Biological Macromolecules Fructose based hyper production of poly-3-hydroxybutyrate from *Halomonas* sp . YLGW01 and impact of carbon sources on bacteria morphologies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 929–

936. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.129>

- Persat A., Inclan Y.F., Engel J.N., Stone H.A., Gitai Z. (2015) Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci*, 112(24):7563–8.
- Plumbridge, J., & Deutscher, J. (2019). Regulation of Carbon Assimilation in Bacteria ☆. In *Encyclopedia of Microbiology* (4th Editio, pp. 20–48). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02454-5>
- Priyadarsini, K.I. (2014) The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules.*, 19, 20091–20112.
- Rafieian-Kopaei, M., Nasri, H., Sahinfard, N., Rafieian, M., Rafieian, S., & Shirzad, M. (2014). Turmeric: A spice with multifunctional medicinal properties. *Journal of HerbMed Pharmacology Journal Homepage: J HerbMed Pharmacol*, 3(1), 5–8. <https://doi.org/10.1172/JCI115814>
- Ramírez-Cedillo, E.; Ortega-Lara, W.; Rocha-Pizaña, M.R.; Gutiérrez-Uribe, J.A.; Elias-Zuniga, A.; Rodríguez, C.A. (2019) Electrospun Polycaprolactone Fibrous Membranes Containing Ag, TiO₂ and Na₂Ti₆O₁₃. Particles for Potential Use in Bone Regeneration. *Membranes*, 9, 12.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & Jaziri, M. El. (2015). The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *Hindawi Publishing Corporation, 2015(759348)*, 17.
- Ravikumar, R.; Ganesh, M.; Ubaidulla, U.; Choi, E.Y.; Jang, H.T. (2017) Preparation, characterization, and in vitro diffusion study of nonwoven electrospun nanofiber of curcumin-loaded cellulose acetate phthalate polymer. *Saudi Pharm. J.*, 25, 921–926.
- Ripa, R., Shen, A. Q., & Funari, R. (2020). Detecting *Escherichia coli* Bio film Development Stages on Gold and Titanium by Quartz Crystal Microbalance. *ACS Omega*, 5, 2295–2302. research-article. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03540>

- Rezaei, A.; Nasirpour, A. (2018) Encapsulation of curcumin using electrospun almond gum nanofibers: Fabrication and characterization. *Int. J. Food Prop.*, 21, 1608–1618.
- Rnjak-Kovacina, J.; Weiss, A.S. (2011) Increasing the Pore Size of Electrospun Scaffolds. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 17, 365–372.
- Roveto, P. M., Gupta, A., & Schuler, A. J. (2021). Bioresource Technology Effects of surface skewness on local shear stresses , biofilm activity , and microbial communities for wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 320(PA), 124251. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124251>
- Ruckh, T.T.; Oldinski, R.A.; Carroll, D.A.; Mikhova, K.; Bryers, J.D.; Popat, K.C. (2012) Antimicrobial effects of nanofiber poly(caprolactone) tissue scaolds releasing rifampicin. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23, 1411–1420.
- Salalha, W., Kuhn, J., Dror, Y., & Zussman, E. (2006). Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres. *Nanotechnology*, 17, 4675–4681. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/18/025>
- Sarioglu, O., Celebioglu, A., Tekinay, T., & Uyar, T. (2016). Bacteria-immobilized electrospun fibrous polymeric webs for hexavalent chromium remediation in water. *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1033-0>
- Sarioglu, O., Keskin, N., Celebioglu, A., Tekinay, T., & Uyar, T. (2017a). Chemosphere Bacteria immobilized electrospun polycaprolactone and polylactic acid fibrous webs for remediation of textile dyes in water. *Chemosphere*, 184, 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.020>
- Sarioglu, O., Keskin, N., Celebioglu, A., Tekinay, T., & Uyar, T. (2017b). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.034>
- Sharma, A., Mukherjee, S., Rami, S., Tadi, R., Ramesh, A., & Sivaprakasam, S. (2021). Kinetics of growth , plantaricin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic *Lactobacillus plantarum* CRA52. *LWT*, 139(June 2020), 110744.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110744>

- Shababdoust, A.; Ehsani, M.; Shokrollahi, P.; Zandi, M. (2017) Fabrication of curcumin-loaded electrospun nanofibrous polyurethanes with anti-bacterial activity. *Prog. Biomater.*, 7, 23–33.
- Shlar, I.; Droby, S.; Choudhary, R.; Rodov, V. (2017) The mode of antimicrobial action of curcumin depends on the delivery system: Monolithic nanoparticles vs. supramolecular inclusion complex. *RSC Adv.* 7, 42559–42569.
- Shukla, S. K., Hariharan, S., & Rao, T. S. (2020). Uranium bioremediation by acid phosphatase activity of *Staphylococcus aureus* biofilms: Can a foe turn a friend? *Journal of Hazardous Materials*, 384(September 2019), 121316. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121316>
- Sivasubramaniam, D., & Franks, A. E. (2016). Bioengineering microbial communities: Their potential to help, hinder and disgust, 5979(May). <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1187346>
- Tian, X., Wang, Y., Chu, J., Mohsin, A., & Zhuang, Y. (2018). Exploring cellular fatty acid composition and intracellular metabolites of osmotic-tolerant mutant *Lactobacillus paracasei* NCBI-M2 for highly efficient lactic acid production with high initial glucose concentration, 286(June), 27–35.
- Tyagi, P.; Singh, M.; Kumari, H.; Kumari, A.; Mukhopadhyay, K. (2015) Bactericidal Activity of Curcumin Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. *PLoS ONE*. 10, e0121313
- Vass, P., Pantea, E., Domokos, A., Hirsch, E., Domján, J., Németh, Á., ... Nagy, Z. K. (2020). Electrospun Solid Formulation of Anaerobic Gut Microbiome Bacteria. *AAPS PharmSciTech*, 21(214), 1–9. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01769-y>
- Veerapandian, B., Ramiah, S., & Varadhan, S. (2020). Levan production from sucrose using chicken feather peptone as a low cost supplemental nutrient source. *Carbohydrate Polymers*, 227(August 2019), 115361. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115361>
- Velasco-barraza, R. D., Vera-graziano, R., Alberto, E., Oropeza-guzmán, M. T., Dastager, S. G., Álvarez-andrade, A., ... Villarreal-gómez, L. J. (2017). Study of nanofiber scaffolds

- of PAA , PAA / CS and PAA / ALG for its potential use in biotechnological applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 4037. <https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1378887>
- Velasco-Barraza, R.D.; Álvarez-Suarez, A.S.; Villarreal-Gómez, L.J.; Paz-González, J.A.; Iglesias, A.L.; Vera-Graziano, R. (2016) Designing a low cost electrospinning device for practical learning in a bioengineering biomaterials course. *Rev. Mex. Ing. Biomed.* 37, 7–16.
- Villarreal-Gómez, L.J.; Cornejo-Bravo, J.M.; Vera-Graziano, R.; Grande, D.; Jesús, V.-G.L.; Manuel, C.-B.J.; Ricardo, V.-G.; Daniel, G. (2016) Electrospinning as a Powerful Technique for Biomedical Applications: A Critically Selected Survey. *J. Biomater. Sci. Polym.* Ed. 27, 157–176
- Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010) biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2 (7); a 000398.
- Wang, G.-S.; Grammel, H.; Abou-Aisha, K.; Sägesser, R.; Ghosh, R. (2012) High-Level Production of the Industrial Product Lycopene by the Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 7205–7215.
- Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T. T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., ... Blank, L. M. (2011). Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440 Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440, 80(October).
- Wood, T. K., Knabel, S. J., & Kwan, B. W. (2013). Bacterial persister cell formation and dormancy. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7116e7121.
- Xin, S., Zeng, Z., Zhou, X., Luo, W., Shi, X., Wang, Q., ... Du, Y. (2017). Recyclable *Saccharomyces cerevisiae* loaded nanofibrous mats with sandwich structure constructing via bio-electrospraying for heavy metal removal. *Journal of Hazardous Materials*, 324, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.070>

- Yang, S.-Y.; Asmatulu, R.; Ceylan, M. (2017) Effects of gentamicin-loaded PCL nanofibers on growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*, 40–51
- Zamel, D., Hassanin, A. H., Ellethy, R., Singer, G., & Abdelmoneim, A. (2019). Novel Bacteria-Immobilized Cellulose Acetate / Poly (ethylene oxide) Nanofibrous Membrane for Wastewater Treatment. *Scientific Reports*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55265-w>
- Zeng, A., Wang, Y., Li, D., Guo, J., & Chen, Q. (2020). Chinese Journal of Chemical Engineering Preparation and antibacterial properties of polycaprolactone / quaternized chitosan blends. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, (xxxx). <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.10.001>
- Zheng, H.; Ho, P.-Y.; Jiang, M.; Tang, B.; Liu, W.; Li, D.; Yu, X.; Kleckner, N.E.; Amir, A.; Liu, C. (2016) Interrogating the Escherichia coli cell cycle by cell dimension perturbations. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 113, 15000–15005.
- Zupancic, S., Skrlec, K., Kocbek, P., Kristl, J., & Ales, B. (2019). Effects of Electrospinning on the Viability of Ten Species of Lactic Acid Bacteria in Poly (Ethylene Oxide) Nanofibers. *Pharmaceutics*, 11(483), 1–14.