

**Estudio del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en sustratos biopoliméricos sintetizados a partir de residuos agroindustriales de *Manihot esculenta***

**Javier Candelo Montaña**

**Directora:  
Sixta Palencia Luna**

**Codirectora:  
Viviana Garcés Villegas**

**Universidad Santiago de Cali  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de Microbiología  
Cali, Colombia  
2023**

**Estudio del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en sustratos biopoliméricos sintetizados a partir de residuos agroindustriales de *Manihot esculenta***

**Javier Candelo Montaña**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:  
Microbiólogo**

**Director (a)  
Sixta Palencia Luna**

**Codirectora:  
Viviana Garcés Villegas**

**Línea de Investigación:  
Sustentabilidad en el uso y transformación de la naturaleza**

**Grupo de Investigación:  
Grupo de Investigación en Microbiología, Industria y Medio Ambiente  
(GIMIA)**

**Universidad Santiago de Cali  
Facultad de Ciencias Básicas  
Programa de Microbiología  
Ciudad, Colombia  
2023**

## IMPACTOS

Relacione el (los) impacto(s) que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
<b>Institucional</b>	Fortalecimiento de los grupos de investigación del programa de microbiología. Avance en la consecución de proyectos interdisciplinarios.	U. Santiago de Cali. Universidad del Valle
<b>Científico</b>	Creación de nuevas líneas de investigación y fortalecimiento de las líneas preexistentes. Formación de nuevos estudiantes.	U. Santiago de Cali. Universidad del Valle
<b>Indicadores de Gestión</b>	Mejora en los indicadores nacionales e internacionales en materia de investigación.	U. Santiago de Cali. Universidad del Valle
<b>Académico</b>	Generación de nuevo conocimiento. Entrenamiento, difusión y fortalecimiento de las competencias de profesionales en formación.	U. Santiago de Cali. Universidad del Valle
<b>Tecnológico</b>	Desarrollo de bioplástico sintetizado a partir de residuos del cultivo de yuca.	Sector agrícola
<b>Ambiental</b>	Contrarrestar la residualidad de la biomasa producida a partir de cultivos de yuca, mediante procesos de biodegradación direccionado al desarrollo de biopolímeros, lo anterior significa que su uso puede ser posteriormente extrapolado a otras aplicaciones eco-amigables.	Sector agrícola Sanidad ambiental de las regiones
<b>Social</b>	Formación de capital humano. Desarrollo de nuevo conocimiento en el marco de sustratos poliméricos a partir de material orgánico.	Sector agrícola Sanidad ambiental de las regiones
<b>Cultural</b>	Contribuir con el fortalecimiento y madurez del comportamiento de la comunidad ante el tratamiento y aprovechamiento de residuos orgánicos como fuente para líneas de trabajo en investigaciones multisectoriales.	Regiones productoras de yuca

\*Incluir los productos obtenidos derivados de la investigación como: apropiación social del conocimiento, generación de nuevo conocimiento entre otros.

# Estudio del crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en sustratos biopoliméricos sintetizados a partir de residuos agroindustriales de *Manihot esculenta*.

Javier Candelo Montaña<sup>1</sup>, Sixta Palencia Luna<sup>2</sup>, Viviana Garcés Villegas<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudiante de Microbiología, Universidad Santiago de Cali. Colombia. *Grupo de Investigación en Microbiología, Industria y Medio Ambiente (GIMIA)*, Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

email: javier.candelo00@usc.edu.co

<sup>2</sup> Ph.D, Docente, Universidad Santiago de Cali, *Grupo de Investigación en Microbiología, Industria y Medio Ambiente (GIMIA)*, Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia.

email: sixta.palencia00@usc.edu.co

<sup>3</sup> Investigadora - Mindtech Research Group (Mindtech-RG), Montería – Córdoba.

email: vivianagarcsvillegas0620@gmail.com

## RESUMEN

En la actualidad, la contaminación es una problemática de alto impacto en la sociedad debido a los efectos adversos del cambio climático, un factor determinante es la presencia de desechos plásticos de un solo uso en el agua y en el suelo, la cual va en aumento, generando daños graves en el ecosistema. Debido a esto, el desarrollo de nuevas tecnologías para la fabricación de materiales más eco amigables es una alternativa necesaria y prometedora para mitigar estos daños. La fabricación de bioplásticos con materiales orgánicos tiene un enorme potencial gracias a aprovechamiento de biomasa residual de distintos procesos agroindustriales. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento de la *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, sobre dos bioplásticos sintetizados a partir de almidón y residuos del cultivo de *Manihot esculenta* específicamente hojas y tallo. La cepa se caracterizó y estudio morfológicamente, para luego evaluar la interacción del microorganismo con el bioplástico sobre medios de cultivo sólido y líquido. De igual manera se evaluó dicha interacción con otros materiales como bioplástico de uso comercial y plástico convencional. Los resultados determinaron que la cepa tuvo un crecimiento ascendente con densidad celular promedio de  $18,6 \times 10^8$  UFC/ml a 48 horas. Asimismo, el porcentaje de pérdida de masa fue mayor en los bioplásticos con 50 %. Finalmente, la microscopía óptica a 10x confirmo cambios en todas las muestras con la aparición de opacidad que se traduce como presencia de una biopelícula adherida, la cual se asocia con la actividad microbiana. Estas biopelículas podrían tener una excelente aplicación ya que *P. fluorescens* por ser una Rizobacteria podría metabolizar la biomasa y a su vez sintetizar sustancias promotoras del crecimiento vegetal, por lo tanto, se mitigaría el impacto negativo del bioplástico sobre el medio ambiente. La evaluación a través de FTIR permitió observar cambio a lo largo del espectro y en el rango  $1800$  a  $1300 \text{ cm}^{-1}$  donde se identificaron señales correspondientes a los enlaces  $\nu_{\text{d}} \text{C=O}$  y  $\nu_{\text{t}} \text{N-H}$  de peptidoglucano depositado como biopelícula en los diferentes materiales poliméricos.

**Palabras clave:** plásticos, bioplástico, biomasa residual, *Pseudomonas fluorescens*, biopelícula.

## Study of the growth of *Pseudomonas fluorescens* in biopolymeric substrates synthesized from *Manihot esculenta* agroindustrial residues

### ABSTRACT

Currently, plastic pollution from single-use plastics in water and soil is on the rise, causing damage to the ecosystem. Therefore, the development of new technologies for the manufacture of more environmentally friendly materials is a promising alternative to mitigate this damage. The manufacture of bioplastics from organic materials has enormous potential due to the use of residual biomass from various agro-industrial processes. Therefore, the objective of this research was to evaluate the growth of *Pseudomonas fluorescens* ATCC13525 on two bioplastics synthesized from starch and residues from the cultivation of *Manihot esculenta*, specifically leaves and stems. The strain was isolated and morphologically studied, and growth was evaluated from the exposure of the substrates to two different culture media. The results determined that the strain had an ascending growth with an average cell density of  $18.6 \times 10^8$  CFU/ml at 48 hours. Likewise, the percentage of mass loss was higher in the bioplastics with 50%. Finally, optical microscopy at 10x confirmed changes in all samples with the appearance of opacity, which translates to the presence of an attached biofilm, which is associated with microbial activity. These biofilms could

have excellent application since *P. fluorescens*, being a rhizobacterium, could metabolize biomass and at the same time synthesize plant growth-promoting substances, therefore, the negative impact of the bioplastic on the environment would be mitigated. The evaluation through FTIR allowed to observe changes along the spectrum and in the range of 1800 to 1300  $\text{cm}^{-1}$  where signals corresponding to the  $\nu_d$  C=O and N-H bonds and  $\nu_t$  N-H of peptidoglycan deposited as a biofilm in the different polymeric materials were identified.

**Keywords:** *plastics, bioplastic, Pseudomona fluorescens, residual biomass, biofilm*

## 1. INTRODUCCIÓN

Estudios revelan que el plástico convencional tarda alrededor de 1000 años para descomponerse en el ambiente y se prevé que la demanda mundial de estos para el año 2050 estaría alrededor de los 1.2 billones de toneladas (Yuxin, *et al.*, 2022). Según la Organización de Naciones Unidas (ONU) cada año se usan 500 millones de bolsas en el mundo y 8 millones de toneladas de plásticos terminan su vida útil en los océanos amenazando así la vida marina por la ingesta o asfixia de los peces y aves. Por parte de este organismo se están promoviendo estudios para iniciar un proceso de elaboración y aprobación de leyes internacionales para contrarrestar la contaminación por plásticos. También se reconoce esta contaminación como un problema ambiental grave de trascendencia mundial, por lo cual se hace necesario indagar por alternativas que permitan reducir su impacto en el planeta (Bollain, *et al.*, 2020).

Actualmente, la necesidad de uso y la mala disposición final del plástico es uno de los problemas ambientales más graves, causando daños a la salud humana y a los ecosistemas. Aunque esta problemática tiene base científica en ecosistemas marinos, los estudios o modelos de contaminación y posibles soluciones aún no se visualizan para la contaminación por plásticos en el sector agrícola. En los últimos informes del programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) prioriza esta problemática para que se construyan planes de desarrollo en medio ambiente bajo la premisa que indica que los suelos agrícolas pueden recibir mayores cantidades de micro plásticos que los océanos debido a que no se han establecido mecanismos mediante los cuales se pueda disponer de estos residuos correctamente.

El informe de la FAO añade que además se debe implementar la gestión de residuos plásticos agrícolas a través del "modelo de las 6R" desechar, rediseñar, reducir, reutilizar, reciclar y recuperar. Entre las posibles soluciones estaría reemplazar los plásticos con alternativas biodegradables o eco-amigables, diseñar mejores formas de gestionar y reutilizar los desechos plásticos o diseñar e implementar prácticas agrícolas más sostenibles o que permita otorgar un valor agregado a los residuos agroindustriales con potencial aplicación biotecnológica por su naturaleza lignocelulósica (FAO, 2021). En este orden de ideas, el desarrollo de biomateriales sintetizados a partir de almidón son claves, puesto que facilitan la transición entre plásticos que tardan años en degradarse a bioplásticos que fácilmente podrán convertirse en nuevos productos o en abono para el suelo. Así, la obtención de bioplásticos a partir de materiales orgánicos tiene un enorme potencial por su aporte al medio ambiente y aprovechamiento de recursos naturales; en su mayoría desechos de las actividades agroindustriales. La característica principal de los bioplásticos es que por su naturaleza pueden tener la propiedad de ser biodegradados o compostados en tiempos cortos sin dejar residuos tóxicos en el suelo. Además, la biodegradación mediada por los microorganismos y los subproductos de esta son un valor agregado para estos materiales por aprovecharlos por las mismas plantas, mejorando por ejemplo el rendimiento de los cultivos (Chen, *et al.*, 2023).

Entre los microorganismos con capacidad para degradar bioplásticos se encuentra *P. fluorescens*. Estas bacterias tienen una avanzada versatilidad metabólica y genética que les permite adaptarse y crecer para metabolizar diferentes fuentes de nutrientes, incluyendo compuestos orgánicos tóxicos como hidrocarburos, por eso es fácil encontrarla en diferentes ecosistemas. Su actividad enzimática, las posiciona muy bien evolutivamente frente a otras especies aeróbicas de microorganismos degradadores de compuestos, (Hu, 2023). Además, la capacidad antagonista de *P. fluorescens* frente a fitopatógenos o microorganismos que afectan las plantas ha sido ampliamente estudiada. Ya que se ha demostrado que tiene diferentes mecanismos para ejercer un eficiente control microbiano mediante antagonismo directo o ayudando a fortalecer la planta (Wang *et al.*, 2022). Para complementar esta tesis se podría mencionar a las Rizobacterias, son microorganismos que habitan en el ambiente con una mayor incidencia sobre la periferia de las raíces de las plantas y promueven el crecimiento de estas, mediante relaciones de simbiosis o asociaciones para beneficiarse mutuamente con las plantas. *P. fluorescens* son individuos de este grupo que aportan a la nutrición y equilibrio hormonal de las plantas promoviendo la exportación de raíces y facilitando la absorción de nutrientes, también se producen

metabolitos antagónicos para otros microorganismos a su vez que favorecen la solubilización de algunos compuestos inorgánicos disponibles que contengan fósforo, zinc, potasio, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas como desaminasa (Chavez Dias, et al., 2022).

Continuando con las características más interesantes de *P. fluorescens* encontramos que tiene la capacidad de sintetizar gránulos de polihidroxialcanoatos que sirven de reserva de material celular, su nombre se otorga a su capacidad de sintetizar compuestos fluorescentes llamados sideróforos como la pioverdina, que son compuestos secretados cuando el hierro es limitante de los nutrientes del medio (Alvarez, et al., 2020; Potysz and Bartz, 2023). Esta excreción se produce ya que el hierro es esencial para el crecimiento de la bacteria. Estos sideróforos han demostrado actuar como efectores, desencadenando aumentos en la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de carotenoides y clorofila que confiere resistencia a algunas enfermedades en la planta. También puede metabolizar el fósforo mediante dos mecanismos, el primero que se basa en la producción de ácidos orgánicos como el ácido cítrico, oxálico o glucónico, que favorecen la solubilización del fosfato inorgánico mediante la modificación del pH del suelo y la liberación de fosfato en este. El segundo se basa en enzimas hidrolasas que actúan directamente rompiendo los enlaces ésteres de los compuestos liberando así los grupos fosfatos que pueden ser fácilmente absorbidos por las raíces de las plantas. Por otro lado, se producen enzimas como las auxinas, giberelinas y citoquininas que son estimuladoras del crecimiento vegetal (Herrera et al., 2020).

En el mundo se han realizado diversos estudios para la síntesis de bioplásticos a partir de almidón de yuca además de estrategias de degradación mediadas por microorganismos entre los cuales participa *P. fluorescens*, obteniendo resultados alentadores. En Colombia específicamente dichos estudios se dirigen específicamente al compost. En el mundo la síntesis y estudio de degradación de bioplásticos, sintetizados a partir de almidón, por parte de microorganismos ha sido ampliamente aplicado obteniendo resultados alentadores, sin embargo en Colombia

En este sentido, se hace necesario estudiar la interacción entre plásticos y microorganismos, en este caso, *P. fluorescens* que podría actuar como agente de degradación y por su metabolismo, podría convertir estos desechos plásticos en productos que contribuirían de manera nutricional a las plantas al sintetizar sustancias promotoras de crecimiento vegetal, o mediar en la recuperación del suelo desde un punto de vista físico, químico y biológico; mitigando de esta manera el impacto de ciertos contaminantes sobre el medio ambiente.

El objetivo de esta investigación es evaluar la capacidad de *P. fluorescens* para colonizar dos tipos de bioplásticos sintetizados a partir de almidón y residuos agroindustriales de yuca específicamente tallos y hojas, además de un ensayo con plástico convencional, a partir del aislamiento y caracterización de la cepa, crecimiento sobre los materiales biopolímeros y estudio de la interacción microorganismo-material por espectroscopia de infrarrojo en un rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ .

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Obtención de cultivo de *P. fluorescens***

La cepa de *P. fluorescens* ATCC 13525, fue proporcionada por el laboratorio de microbiología de la Universidad Santiago de Cali. La cual fue inoculada en agar nutritivo, tomando una colonia del microorganismo con un asa de siembra estéril, se sembró por agotamiento e incubó durante 24 horas a  $35 \pm 2$  °C. Posteriormente se realizaron repiques bajo las mismas condiciones y se realizó un cultivo en caldo nutritivo suspendiendo unas colonias con un asa de siembra estéril. Esto para realizar pruebas de identificación de las colonias.

#### **2.1.1. Caracterización de la cepa**

Las colonias cultivadas anteriormente en agar nutritivo se caracterizaron a nivel microscópico y macroscópico mediante, pruebas de catalasa, oxidasa, prueba de indol y tinción de Gram. Para realizar la prueba de catalasa y oxidasa se suspendieron unas gotas de peróxido de hidrogeno para el primero y reactivo de oxidasa (solución acuosa al 1 % de N,N,N,N tetrametil-p-fenilendiamina dihidrocloruro) para la segunda prueba, directamente sobre las colonias aisladas en agar nutritivo. En el caso de la prueba de indol, esta, se realizó en medio de cultivo líquido, se utilizó el reactivo de Kovacs suspendiendo unas gotas sobre el en caldo nutritivo. Al finalizar, para realizar la caracterización microscópica mediante tinción de Gram, se utilizó una colonia del microorganismo suspendida sobre un porta objetos limpio. Se procedió a fijar la colonia acercándola al mechero y se realizó la tinción con cristal violeta, Lugol, solución alcohol-acetona y se finalizó con safranina. Luego se observó la morfología a 100X de un microscopio **OLYMPUS EP50**.

### **2.2. Evaluación de crecimiento sobre sustrato polimérico**

#### **2.2.1. Preparación del inóculo estandarizado**

El inóculo estandarizado de *Pseudomona fluorescens* ATCC 13525, se preparó utilizando una suspensión bacteriana, la cual se dispersó en 40,0 ml de agua desionizada estéril. Posteriormente, dicha dispersión se estandarizo por turbidimetría con el patrón 0.5 de McFarland. También se calibro mediante espectrofotometría, midiendo la intensidad de luz dispersada a una longitud de onda de 625 nm en espectrofotómetro de marca **JENWAY 6320D** obteniendo una medición de 0.8 Abs correspondiente en la escala a  $1,8 \times 10^8$  UFC/ml.

#### **2.2.2. Preparación de los sustratos de poliméricos**

Los sustratos polímeros o muestras problema se etiquetaron de la siguiente manera: Bolsa plástica (BP), Bolsa biodegradable (BB), Bioplástico + hojas (B(h)) y Bioplástico + tallos (B(t)). Las muestras se llevaron al horno a una temperatura de 70 °C, esto con el fin de obtener su peso seco, seguido se procedió a esterilizar las muestras mediante exposición a luz ultravioleta por un tiempo de 1 hora. Posteriormente, las muestras se seccionaron empleando bisturí estéril en áreas de aproximadamente 1.0 cm<sup>2</sup>.

#### **2.2.3. Evaluación de crecimiento en medio sólido**

La evaluación de crecimiento en medio sólido se realizó por cuatuplicado en agar nutritivo, incluyendo un control positivo (agar inoculado) y control negativo (agar y muestra sin inocular) para cada material. A partir del inóculo estandarizado mencionado en la sección 2.2.1, se realizó una siembra masiva utilizando un hisopo estéril sobre agar nutritivo, luego sobre esta siembra masiva, se suspendió la muestra problema estéril y se incubo por 24 horas a 37 °C.

#### **2.2.4. Evaluación de crecimiento en medio líquido**

La evaluación de crecimiento en medio líquido de *P. fluorescens* ATCC 13525, se llevó a cabo por triplicado en tubos de ensayo que contenían 9 ml de caldo nutritivo. Estos tubos de ensayo se inocularon con 1,0 ml del microorganismo estandarizado y se suspendieron las muestras problema en cada tubo de ensayo. Los sistemas

inoculados se incubaron a 37 °C por 48 horas. Paralelamente se analizó la cinética de crecimiento, tomando alícuotas cada 4 horas para medirlas en el espectrofotómetro a 625 nm.

### 2.2.5. Determinación de porcentaje de pérdida de peso

Al finalizar las evaluaciones todas las muestras problema se llevaron al horno a 70 °C hasta obtener un peso contante, esto con el objetivo de evaluar la variación gravimétrica del material. Esta técnica es una manera sencilla y eficaz para medir la biodegradación de los polímeros mediante la pérdida de peso. Para realizar el análisis se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{Pf}{Pi} \times 100$$

En donde *Pf*: Peso Final y *Pi*: Peso inicial

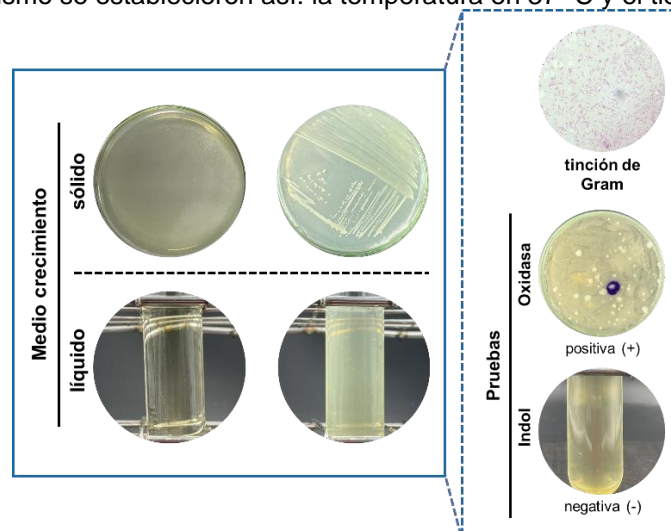
### 2.2.6. Evaluación del crecimiento *P. fluorescens* sobre los materiales poliméricos por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR-ATR)

La evaluación de la interacción entre el microorganismo-polimérico se realizó mediante el análisis de la formación de biopelículas en el sustrato. En este contexto, las muestras problema, se analizaron mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier acoplada a reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), mediante el uso de un espectrofotómetro IRAffinity-1S (Shimadzu Co, Kyoto, Japón), en el rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , apodización Box-car y 16 scan, todas las muestras se analizaron por quintuplicado.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Caracterización y aislamiento

Se realizaron análisis macroscópicos en las cepas de *P. fluorescens*. La ilustración 1 muestra el microorganismo aislado en medio agar nutritivo; las colonias son blancas, circulares y superficie plana, borde continuo, elevación convexa, consistencia blanda y color brillante. características morfológicas reportadas en la literatura para el microorganismo correspondiente a *P. fluorescens* (Rabelo, *et al.*, 2020); el control negativo asegura que no hubo contaminación por otros microorganismos y que el aislamiento se realizó en óptimas condiciones de esterilidad. Además, la cepa se cultivó en medio líquido contra un medio de cultivo sin inocular. Las condiciones de crecimiento del microorganismo se establecieron así: la temperatura en 37 °C y el tiempo de cultivo en 48 horas.

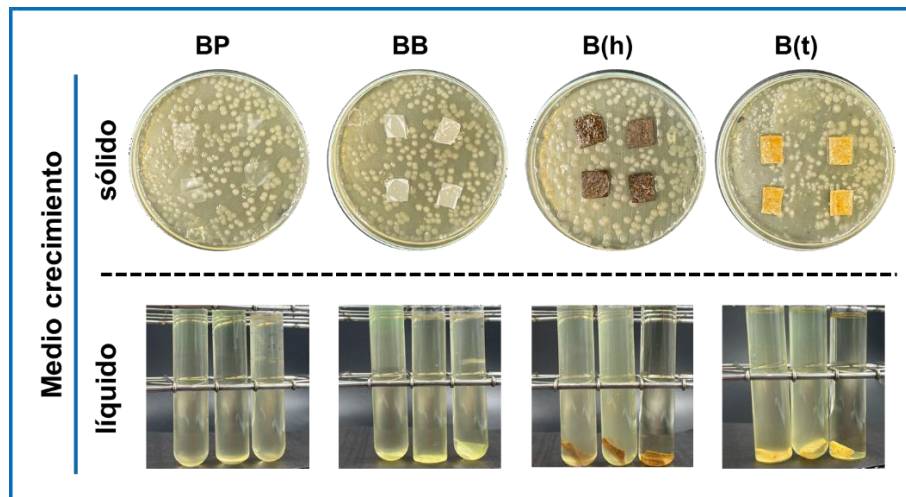


**Ilustración 1.** Cepa de *P. fluorescens* ATCC 13525 aislado en medio sólido agar nutritivo y medio líquido caldo nutritivo, a la derecha, pruebas de identificación bacteriana, oxidasa, indol y tinción de Gram. **Fuente:** Elaboración propia

Para identificar a los microorganismos bacterianos, se emplean varias técnicas como la tinción de Gram, que permite distinguir las bacterias entre positivas y negativas. Los resultados obtenidos del análisis microscópico (ilustración 1, parte derecha) coinciden con la literatura, ya que *Pseudomona fluorescens*, por su parte es un bacilo alargado Gram negativo presentándose coloraciones rosadas debido a la retención del colorante en su pared celular (Hu, *et al.*, 2023). La prueba para identificar el citocromo oxidasa se obtuvo positiva debido al desarrollo de una coloración púrpura en las colonias al hacer contacto con el reactivo. Dicha coloración es resultado de la actividad de las enzimas oxidasas sobre el reactivo (Callicó, *et al.*, 2004). Otra prueba realizada a este microorganismo fue para evaluar la producción de indol, mediante el reactivo de Kovacks. El resultado positivo se obtiene cuando la coloración del medio de cultivo líquido se torna rosado. En este caso el microorganismo es indol positivo, por su incapacidad para metabolizar los compuestos químicos y transformarlos en indol.

### 3.2 Evaluación de crecimiento microorganismo-sustrato en medio sólido y líquido

La ilustración 2 muestra los materiales después de 48 horas en incubadora a 37 °C, se puede observar un crecimiento regular del microorganismo en las cajas Petri, donde la textura de las muestras se muestra gruesa y delicada. Esto podría ser por el metabolismo del microorganismo o por la sobrehidratación y exposición a la temperatura de estas en el medio de cultivo. En otros estudios Jianlei Yang y colaboradores, en su investigación sobre caracterización de bioplásticos sintetizados a partir de almidón de yuca, manifiestan que este tipo materiales presentan una alta afinidad al agua y deficientes propiedades térmicas (Yang, *et al.*, 2023; Xie, *et al.*, 2023).



**Ilustración 2.** Evaluación de crecimiento sobre muestras problema en medio de cultivo sólido y líquido **Fuente:** Elaboración propia

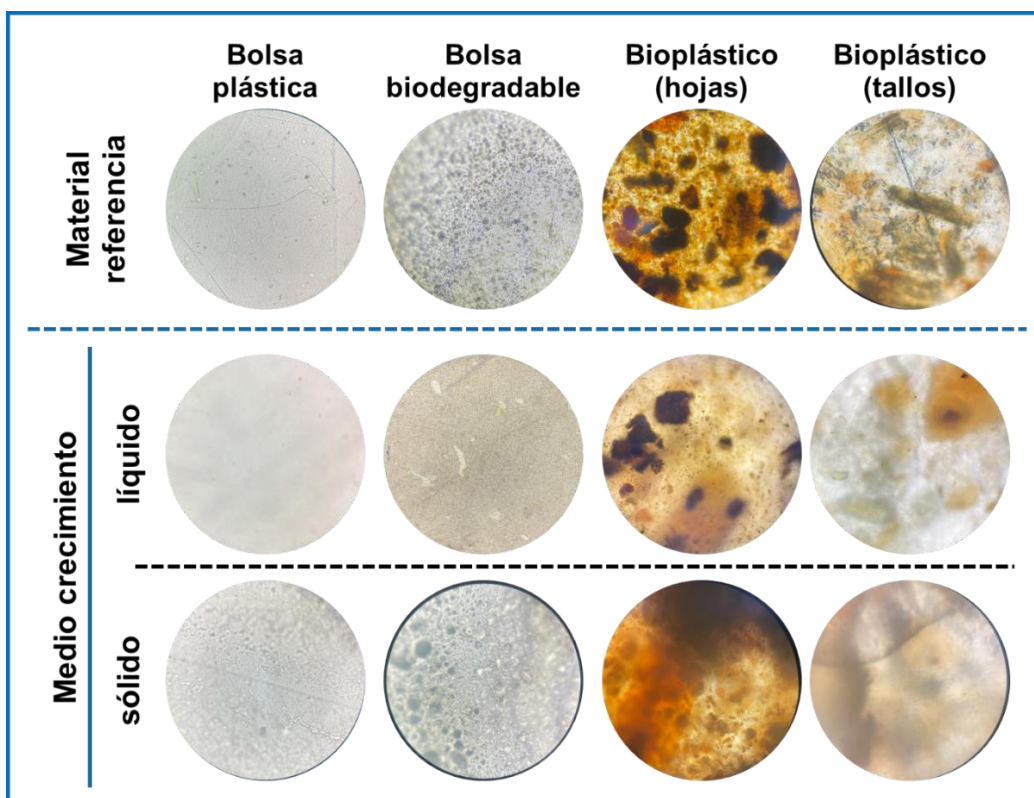
Continuando con el análisis, en el caso del medio de cultivo líquido, se observa una leve coloración verde en los tubos de ensayo, y un precipitado blanco relacionado con la producción de metabolitos por parte del microorganismo. En este sentido, *P. fluorescens*, se caracteriza por la capacidad de excretar diferentes sustancias, entre estas la pioverdina, la cual es un metabolito que se sintetiza cuando el hierro está presente en el medio de cultivo (David, *et al.*, 2022). Así, se observa que dicho metabolito tiene presencia en los tratamientos de BB, B(h) y B(t) mostrando este último la mayor producción. Caso contrario para BP, donde no se evidencia una coloración verde, por la naturaleza sintética del material.

En los resultados, se observa una mejor afinidad del microorganismo por los materiales de base biológica. Para respaldar lo anterior se hace referencia a un estudio del año 2021 donde se realizó un análisis comparativo entre bioplásticos y plásticos comerciales obteniendo que la producción de plásticos no degradables es una carga para el medio ambiente ya que estos tardan décadas en descomponerse. Esta imposibilidad de los plásticos para degradarse se debe a que su estructura química no puede ser modificada eficientemente por la capacidad metabólica de los microorganismos, la actividad del agua y demás. Mientras tanto, los bioplásticos son materiales compostables que pueden convertirse en basura verde en cuestión de meses. (Kjeldsen, *et al.*, 2018).

En general, factores como bajo el peso molecular, la cristalinidad, la hidrofobicidad y solubilidad general en agua, son de los factores más importantes para determinar si un compuesto es degradable o no (Ghada, *et al.*, 2021).

### 3.3 Análisis microscópico de muestra problema

Se procedió a realizar un análisis microscópico de las muestras problema. En este estudio se comparan con las muestras de referencia para estudiar posibles interacciones entre el microorganismo y el material. En la **ilustración 3**, se presenta (parte superior), el material de referencia o blanco. En general, se observan cambios significativos en todas las muestras, donde la bolsa plástica, en medio líquido, presenta una transformación en su forma estructural (líneas y puntos), quedando casi invisibles. En medio sólido se evidencian agrupaciones circulares como la morfología de las colonias de los microorganismos o espacios libres que significarían ausencia de partículas en el material. En la bolsa biodegradable, para el medio líquido se observa una superficie plana y una coloración amarillenta diferente a la muestra de referencia con burbujas, también se observan espacios amorfos con una tonalidad más clara, representados en la fase de medio sólido. En las muestras de bioplásticos (hojas y tallo), se puede apreciar cambios bastante significativos en la estructura del bioplástico donde los colores se aprecian total mente claros y las estructuras porosas prácticamente han desaparecido. En medio de cultivo sólido, es imposible observar con claridad la superficie de las muestras esto podría ser debido a la presencia de una biopelícula, cubriendo toda la zona de enfoque en el microscopio o por otra parte se podría inferir que la actividad microbiana ha continuado en las muestras después del experimento.



**Ilustración 3.** Análisis microscópico de muestras problemas en medio de cultivo sólido y líquido observado a 10X, muestras de bolsa plástica, bolsa biodegradable, bioplástico (hojas) y bioplástico (tallos) de izquierda a derecha. **Fuente:** Elaboración propia

Así, mediante el análisis visual que, en medio sólido, la aparición de una opacidad en todas las muestras se traduciría como presencia de una biopelícula adherida, que podría asociarse con la actividad microbiana. Para concluir se puede mencionar que los cambios en la estructura de las muestras son un indicio clave de la interacción entre el microorganismo y el material biopolímero, ya que los llamados espacios no son más que porosidades, resultado de la colonización bacteriana o la actividad del agua.

### 3.4 Valoración gravimétrica del material

El peso seco, es la razón porcentual del peso final sobre el peso inicial de los materiales a evaluar. Este estudio se realizó para analizar cuantitativamente el porcentaje de pérdida de peso de las muestras durante el ensayo. La Tabla 1 contiene los datos registrados de pérdida de peso en medio de cultivo sólido y líquido. En medio sólido la BP registro la menor pérdida de peso con un 23,2 %, seguido de la BB con 33,7 %, en los bioplásticos los porcentajes de pérdida de peso son mayores, B(h) y B(t) con 50,0 % y 48,3 % respectivamente.

En medio líquido se registró que la BP conserva un bajo porcentaje en pérdida de peso, un 17,4 % (5,8 puntos menos que en medio sólido), y BB registra 37,4%, un 3,7 % más que en medio sólido. Para el B(t) 56,3 % siendo este un 8,0 % más que en medio sólido y B(h) con un 12,6 % más que en medio sólido, registrando un 62.5% de pérdida de peso.

Los resultados mostraron que hubo una pérdida de peso significativa en las muestras de bioplásticos compuesto por tallos y hojas, siendo este último, el mayor porcentaje en medio líquido y en medio sólido. Se podría inferir que el microorganismo pudo utilizar la composición química de estas muestras para llevar a cabo su metabolismo, consumiendo así más del 50 % en peso seco del material. *P. fluorescens* es un microorganismo metabólicamente capacitado para degradar el almidón, siendo este la mayor parte de la composición de los bioplásticos. Por otra parte, diferentes autores han informado en publicaciones que la concentración de almidón en hojas y raíces de la yuca es superior al 0.6 % (DIAZ y LOPEZ, 2022); (Cartay, 2004); (da Silva, *et al.*, 2020).

**Tabla 1.** Valoración gravimétrica de las muestras problema, se relación peso inicial y final con su respectiva desviación estándar y se calcula el porcentaje de pérdida de peso.

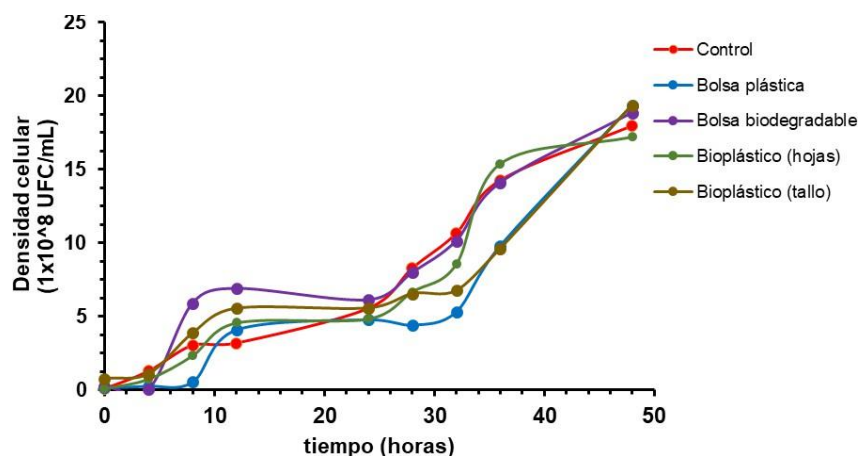
	Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Perdida de peso (%)
Medio sólido	BP	0,052 ± 0,015	0,040 ± 0,013	23,2
	BB	0,049 ± 0,003	0,033 ± 0,004	33,7
	B(h)	1,015 ± 0,110	0,506 ± 0,033	50,0
	B(t)	0,955 ± 0,373	0,500 ± 0,225	48,3
Medio líquido	BP	0,066 ± 0,022	0,055 ± 0,020	17,4
	BB	0,074 ± 0,006	0,046 ± 0,007	37,4
	B(h)	1,034 ± 0,018	0,388 ± 0,012	62,5
	B(t)	1,009 ± 0,172	0,393 ± 0,051	56,3

### 3.5 Evaluación del crecimiento *P. fluorescens* sobre los sustratos poliméricos

La turbiedad es un factor importante para determinar la actividad microbiana, en este orden de ideas, podría deducirse que la observada en los tubos de ensayo se debe a la actividad microbiana por la producción de biomasa o la producción de metabolitos suspendidos. Los resultados obtenidos de la evaluación de crecimiento en medio líquido mediante absorbancias se consiguieron en la **tabla 2**.

**Tabla 2.** Evaluación de crecimiento del microorganismo *P. fluorescens*, mediante turbidimetría

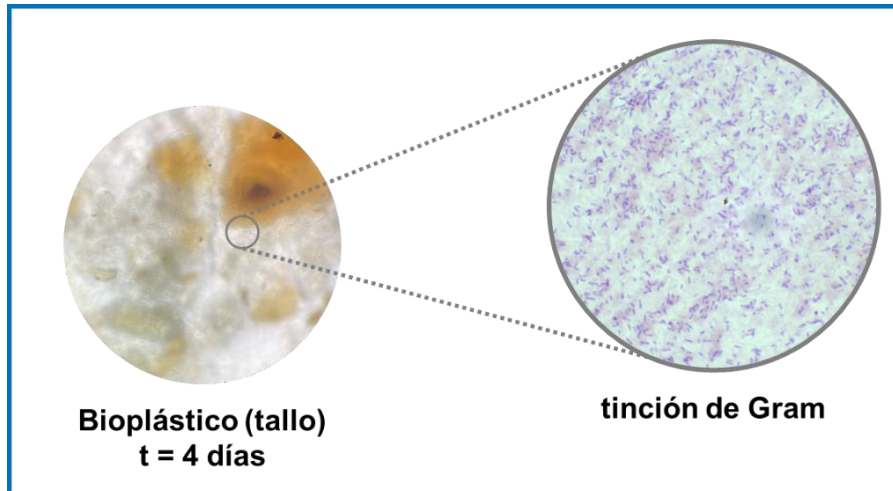
Tiempo (horas)	Control		Bolsa plástica		Bolsa biodegradable		Bioplástico (hojas)		Bioplástico (tallo)	
	Abs	Densidad celular (1x10 <sup>8</sup> UFC/mL)	Abs	Densidad celular (1x10 <sup>8</sup> UFC/mL)	Abs	Densidad celular (1x10 <sup>8</sup> UFC/mL)	Abs	Densidad celular (1x10 <sup>8</sup> UFC/mL)	Abs	Densidad celular (1x10 <sup>8</sup> UFC/mL)
0	0,035	0,1	0,040	0,2	0,045	0,2	0,037	0,1	0,077	0,8
4	0,106	1,3	0,046	0,3	0,034	0,1	0,075	0,8	0,095	1,1
8	0,209	3,0	0,062	0,5	0,378	5,9	0,168	2,3	0,258	3,9
12	0,218	3,2	0,271	4,1	0,437	6,9	0,300	4,6	0,357	5,5
24	0,357	5,5	0,311	4,8	0,391	6,1	0,316	4,8	0,358	5,6
28	0,518	8,3	0,290	4,4	0,500	8,0	0,424	6,7	0,416	6,6
32	0,657	10,7	0,343	5,3	0,627	10,1	0,533	8,5	0,428	6,8
36	0,869	14,3	0,607	9,8	0,859	14,1	0,935	15,4	0,596	9,6
48	1,088	18,0	1,169	19,4	1,138	18,8	1,042	17,2	1,169	19,4



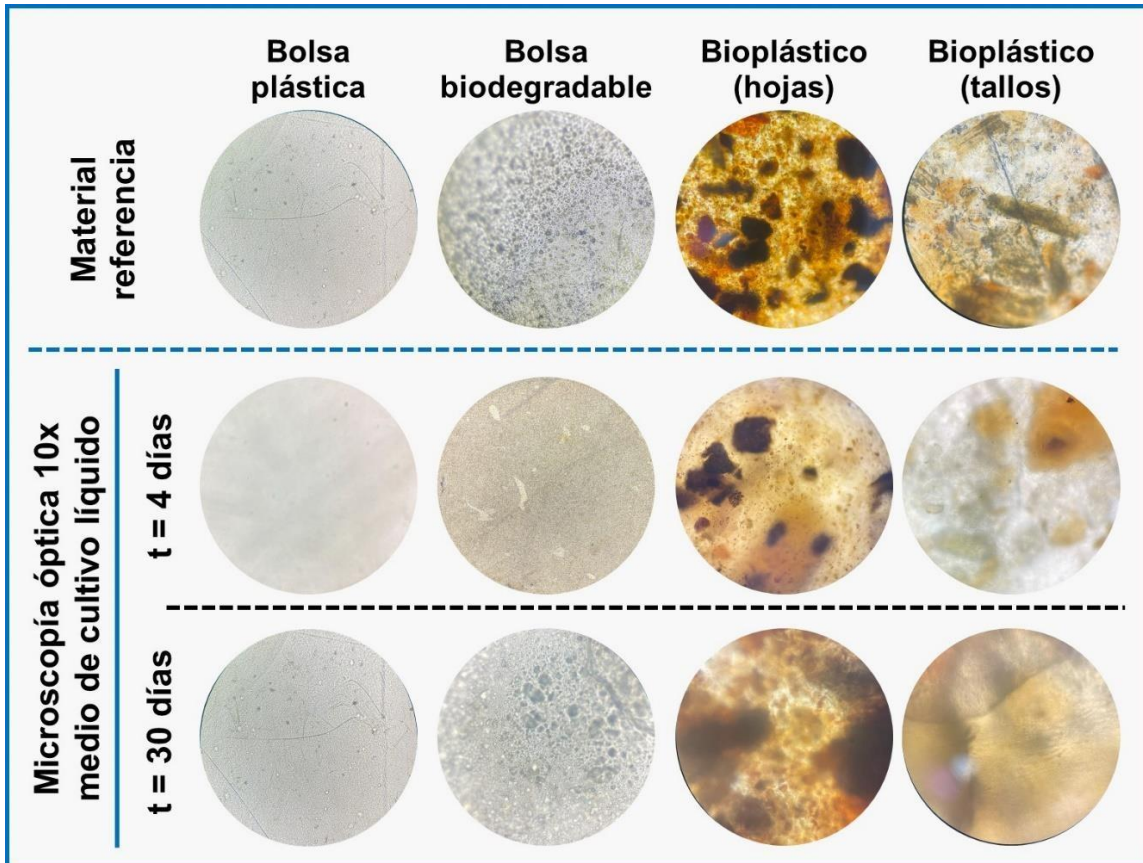
**Ilustración 4.** Cinética de crecimiento *P. fluorescens* para muestra control y los sustratos poliméricos. **Fuente:** Elaboración propia

Los resultados de la cinética de crecimiento (ilustración 4) mostraron que el desarrollo del microorganismo junto a las muestras problema obedece al patrón de referencia, por lo que no se observan mejoras significativas en el desarrollo del microorganismo, en el caso la bolsa biodegradable comercial sintetizada con almidón de yuca, se retrasa la fase de adaptación del microorganismo en las primeras horas con respecto a las demás curvas de crecimiento, pero al superar las 5 horas se obtiene el mejor rendimiento del experimento por 20 horas consecutivas. Los tratamientos con bioplásticos correspondientes a hojas y tallos presentan un desarrollo en el crecimiento similar por más de 25 horas. Entre las 12 y las 24 horas, todos los tratamientos presentan una leve caída en el crecimiento, excepto el control, que sigue creciendo lentamente en ese rango de tiempo. Después de las 24 horas, el control y el tratamiento con la bolsa biodegradable comercial obedecen a la misma cinética de crecimiento iniciando aquí su fase exponencial donde este último obtiene el mejor rendimiento hasta las 36 horas de iniciado el tratamiento, pero termina siendo el menor rendimiento en las últimas horas. En este mismo momento los tratamientos de bioplástico con tallo y la bolsa plástica comercial tienen un crecimiento muy lento, pero alcanzan su fase exponencial a las 32 horas al igual que los demás ensayos. Según la tabla 2, los tiempos máximos de crecimiento se obtuvieron a las 48 horas, donde el mejor rendimiento fue por parte del bioplástico de tallos, seguido de la bolsa plástica comercial, la bolsa biodegradable comercial, y finalizan el control positivo y el bioplástico de hojas. En este sentido los valores de crecimiento a las 48 horas que finaliza el experimento, no se presentan diferencias significativamente grandes sin embargo en las primeras horas, los materiales biodegradables presentan un mejor rendimiento que el control positivo y la bolsa plástica.

Finalizando el experimento y basándonos en estudios que sugieren que las biopelículas proporcionan a las bacterias un ambiente propicio para la captación de nutrientes y además esta organización les otorga ventajas a los microorganismos frente a la descomposición de material orgánico (Guanghui, *et al.*, 2024). Se realizaron frotis de las muestras 4 días después (ilustración 5) y se realizó tinción de Gram para validar la presencia de biopelículas adheridas a las muestras problema, con lo cual se evidenció la presencia de las bacterias gran negativas protagonistas de este estudio, la cual formó biopelículas en el material y se integró a la muestra problema. Dichas biopelículas podrían tener una excelente aplicación ya que *P. fluorescens* por ser una *Rizobacteria* podría metabolizar el almidón y a su vez sintetizar sustancias promotoras del crecimiento vegetal y de esta manera mitigar el impacto negativo del bioplástico sobre el ambiente. En otros estudios recientes del año 2023 Gargi Phadke menciona algunas aplicaciones de bioplásticos en el mundo, donde se relacionan plásticos biodegradables por las bacterias del suelo o películas que contienen semillas de plantas que fácilmente podrían germinar una vez las películas sean dispuestas en el suelo (Phadke y Rawtani, 2023).



**Ilustración 5.** Tinción de Gram después del experimento. **Fuente:** Elaboración propia



**Ilustración 6.** Comparación de análisis microscópico de muestras problema a los 4 y 30 días en medio de cultivo sólido y líquido observado a 10X, muestras de bolsa plástica, bolsa biodegradable, bioplástico (hojas) y bioplástico (tallos) de izquierda a derecha. **Fuente:** Elaboración propia

En estudios adicionales a los contemplados, se optó por observar al microscopio las muestras problema de medio líquido, después de 30 días de finalizado el experimento (ilustración 6) con el fin de estudiar variaciones en la superficie de estas. Se encontró que las muestras de bioplásticos (hojas y tallos), en ciertas regiones, contenían la opacidad observada en las muestras de medio sólido (ilustración 3) de la sección 3.2. para las muestras de

bolsa plástica y bolsa biodegradable se observan cambios drásticos en la textura y la composición de las muestras. Dichos cambios pueden ser evoluciones propias a otras regiones específicas de la muestra problema.

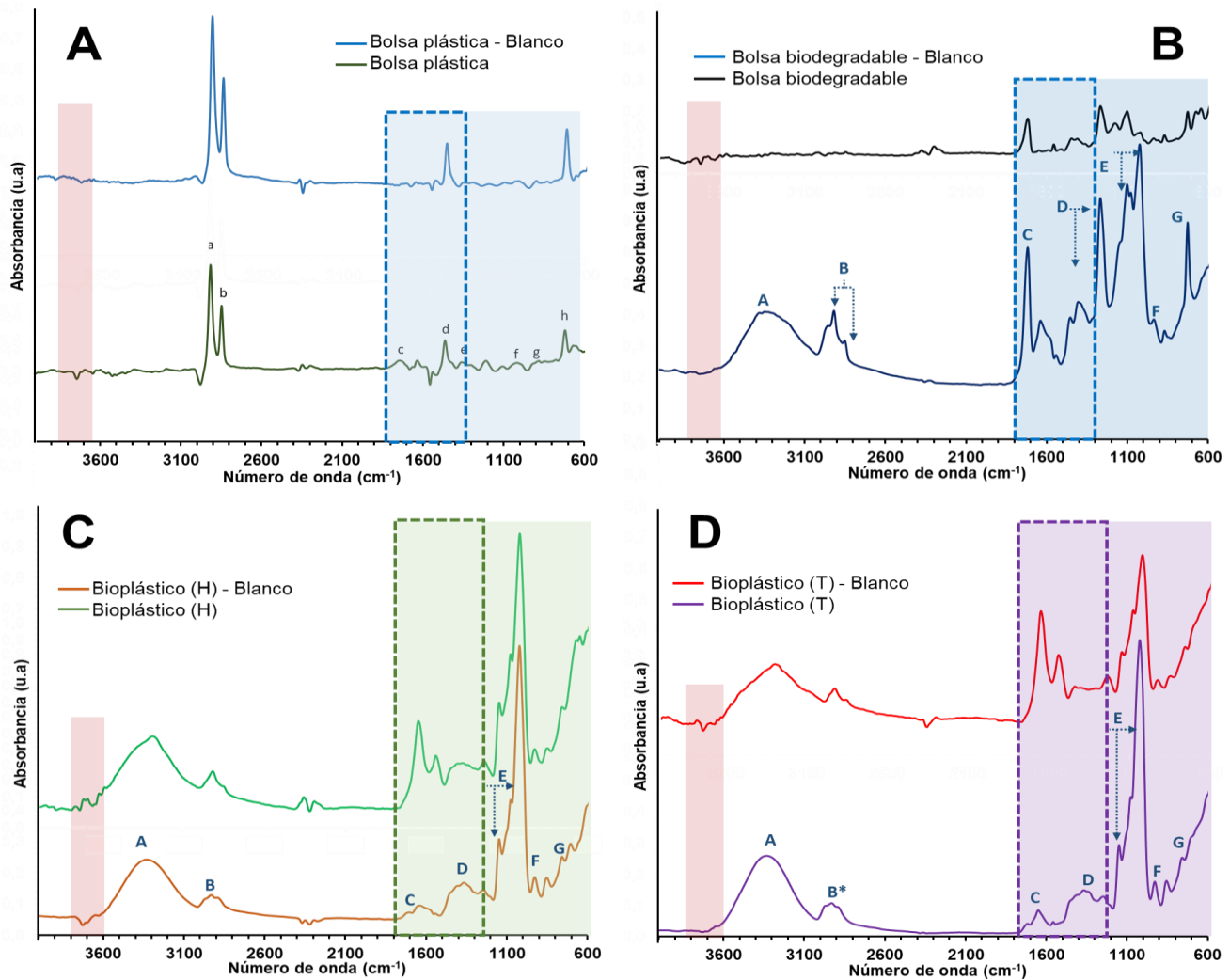
Este análisis cuestiona el impacto del medio de cultivo y el medio ambiente sobre las muestras problema, ya que una vez retiradas del medio líquido, al tiempo sus características físicas se asemejan a los resultados obtenidos en medio de cultivo sólido. Por otra parte, se podría pensar que las biopelículas o sustancias que recubren la muestra se suspendieron en el medio de cultivo por su naturaleza líquida y, como consecuencia, no se observó claramente sobre las estructuras del material, una vez transcurrido el tiempo se confirma que la actividad microbiana continua sobre las muestras problema porque tienen en su composición una porosidad, que pudo inmovilizar células viables que continuaron con su metabolismo una vez favorables. En un estudio de inmovilización de bacterias en el año 2018, Reyes y colaboradores, mencionan que los microorganismos inmovilizados en matrices tienen ventajas, entre las cuales se encuentra un aumento de la estabilidad catalítica y la actividad microbiana. Asimismo, un incremento de la viabilidad de las células inmovilizadas, esto es debido a que la concentración de nutrientes se dispone alrededor de las células y en la matriz de soporte las protege de efectos externos (Reyes Reyes, *et al.*, 2018; Akar, *et al.*, 2023; Ismail, *et al.*, 2023). En conjunto se puede concluir que los microorganismos aquí estudiados crecen de manera adecuado sobre los sustratos biopoliméricos de interés, los cambios en pérdida de peso y microscópico sugieren que existe una interacción microorganismos-material a través de la formación de una biopelícula sobre la superficie de los sustratos. Para el estudio de esta interacción esta investigación emplea la espectroscopia infrarroja FTIR-ATR en el rango de 4000 – 600  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.6 Análisis de crecimiento de *P. fluorescens* sobre sustratos poliméricos mediante espectroscopia de infrarrojo FTIR-ATR**

Las Rizobacterias son microorganismos que habitan en la periferia de las raíces de las plantas y promueven el crecimiento de estas, mediante relaciones de simbiosis o asociaciones para beneficiarse mutuamente con las plantas. Las *Pseudomonas* son individuos de este grupo que aportan a la nutrición y equilibrio hormonal de las plantas promoviendo la exportación de raíces y facilitando la absorción de nutrientes, también se producen metabolitos antagónicos para otros microorganismos a su vez que favorecen la solubilización de algunos compuestos inorgánicos disponibles que contengan fósforo, zinc, potasio, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas como desaminasa (Chavez Dias, *et al.*, 2022). Entre estos individuos se encuentra *P. fluorescens* cuyo metabolismo genera sustancias para promover el crecimiento vegetal mediante la síntesis de hormonas y compuestos con características antibacterianas y fungicidas. *P. fluorescens* tiene movilidad mediante ápices o flagelos polares que a su vez le permite comunicarse con otras bacterias, su metabolismo es estrictamente aerobio y tiene la capacidad de sintetizar gránulos de polihidroxialcanoatos que sirven de reserva de material celular, su nombre se otorga a su capacidad de sintetizar compuestos fluorescentes llamados sideróforos como la pioverdina, que son compuestos secretados cuando el hierro es limitante de los nutrientes del medio (Alvarez, *et al.*, 2020). Una vez se conforman conglomerados bacterianos denominados biopelículas, esta excreción se produce ya que el hierro es esencial para el crecimiento de la bacteria. Los sideróforos han demostrado actuar como efectores, desencadenando aumentos en la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de carotenoides y clorofila que confiere resistencia a algunas enfermedades en la planta.

Los microorganismos presentes en la biopelícula son más beneficiosos para la biorremediación que las células planctónicas que flotan libremente por su mayor tolerancia a los contaminantes y al estrés ambiental, y pueden degradar contaminantes tóxicos por diversas vías catabólicas. El éxito de la remediación a través de la biopelícula es la capacidad metabólica de la comunidad microbiana inmovilizada en una matriz auto sintetizada, que brinda protección contra el estrés, otros patógenos y contaminantes los cuales no hacen contacto directo con las bacterias, sino que se van ingresando a la matriz conforme a la capacidad celular (Arenas Piza, 2018; Herrera, *et al.*, 2020).

La técnica de espectroscopia infrarroja FTIR-ATR permitió analizar el crecimiento de estos organismos sobre los materiales poliméricos identificando señales propias de los materiales referencia y comparando las visualizadas tras el experimento de contacto con la cepa, la técnica FTIR-ATR estableció la formación de biopelícula (Quiles, *et al.*, 2010). La Ilustración 7 muestra la comparación entre espectros de infrarrojo de cada material. En cada caso de los espectros referencia se asignaron las señales de vibración correspondiente.



**Figura 7.** Espectros FTIR el rango de 4000 – 600  $\text{cm}^{-1}$  para los materiales A) Bolsa plástica, B) Bolsa biodegradable, C) Bioplástico (hojas) y Bioplástico (tallos). **Fuente:** Elaboración propia

En este orden de ideas en la Ilustración 7A muestra el espectro para la bolsa plástica, este material es sintetizado a partir de policloruro de vinilo (PVC) con plastificante ftalato de dioctil (DOP), el espectro de este material exhibe las señales esperadas para un polímero sintético de carácter lineal altamente hidrofóbico. De la cadena de carbono del PVC se tiene [a y b] corresponden al estiramiento de  $-\text{CH}$  y  $-\text{CH}_2$  a 2912 y 2843  $\text{cm}^{-1}$ , la señal [c] a 1745  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al carbonilo  $-\text{C}=\text{O}$  del plastificante, de la cadena principal de C seguiría la señal [d,e] del modo vibracional de flexión de  $-\text{CH}$  y  $-\text{CH}_2$  a 1464 y 1371  $\text{cm}^{-1}$ , [f] 1020  $\text{cm}^{-1}$  al estiramiento de  $\text{C}-\text{C}$ , la flexión del  $-\text{CH}_2$  a 956  $\text{cm}^{-1}$  [g], y [h] 712  $\text{cm}^{-1}$  al estiramiento  $\text{C}-\text{Cl}$  (Nguyen, *et al.*, 2018).

Las bandas vibracionales para BB, se muestran en la Ilustración 7B corresponden a [A] 3304  $\text{cm}^{-1}$  asociada al estiramiento del enlace (O-H) de los grupos  $(-\text{OH})$  unidos intra e intermolecularmente presentes en el almidón y el plastificante empleado. La banda a aproximadamente [B] 2912 y 2841  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento de  $-\text{CH}$  en grupos alifáticos metilo ( $-\text{CH}_3$ ), metileno ( $-\text{CH}_2$ ). El fuerte pico a [C] 1714  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye al estiramiento vibracional del grupo carbonilo ( $-\text{C}=\text{O}$ ). Las bandas entre el rango de [D] 1400 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  podrían atribuirse a múltiples modos de vibración de flexión ( $-\text{CH}$ ) y ( $-\text{OH}$ ). Las bandas en [E] 1095 y 1035  $\text{cm}^{-1}$  se pueden asignar a la vibración de estiramiento del enlace  $-\text{C}-\text{O}$  en los grupos funcionales ( $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ ). La banda a [F] 928  $\text{cm}^{-1}$  representa vibración de flexión ( $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ ) desde el enlace glicosídico, y el pico a [G] 730  $\text{cm}^{-1}$  indica una deformación simétrica de ( $-\text{CH}$  y  $\text{CH}_2$ ) en el almidón (Otman, *et al.*, 2021; Liang, *et al.*, 2021).

En el caso particular de los dos bioplásticos evaluados, estos son materiales un poco más complejos al tener partículas (hojas y tallos) como relleno en sus matrices por ende al igual que BB, presentan los mismos tipos de vibraciones a lo largo del espectro con la diferenciación de la señal [D] de 1400 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  que se atribuyen a múltiples modos de vibración de flexión (-CH) y (-OH) este solapamiento de señales puede atribuirse a la lignina.

Los cambios en los espectros de respuesta después del crecimiento de *P. fluorescens* sobre los materiales son más evidente para BP y BB, en el primer caso, se pasa de espectro correspondiente a un polímero lineal de cadenas de carbono e hidrogeno a una matriz más compleja en la zona de las 1800 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , este rango en particular, es característico de vibraciones mucho más complejas de macromoléculas orgánicas en este caso particular, lípidos, péptidos, nucleoides, entre otros (Quiles, *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, para B(h) y B(t) al tener partículas lignocelulósicas estas matrices son mucho más complejas, aunque propicias para el crecimiento de la cepa no hay un cambio tan evidente en las señales, sin embargo, si un corrimiento como se reporta más adelante. Las biopelículas son proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, fosfolípidos y sustancias extracelulares, por lo tanto, todos los espectros exhiben alrededor de los 3700  $\text{cm}^{-1}$  la aparición de una señal que corresponde al enlace -P=O; una ventana de análisis entre los 1800 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  permitió observar la aparición y corrimiento de los enlaces tipo -C=O, N-H de deformación y tensión, además, los cambios en para -CH y -CH<sub>2</sub>. Estos tipos de vibración asociados a las amidas I, amida II y amida III, del tipo de enlace en las macromoléculas de la biopelícula, ver tabla 3.

**Tabla 3.** Modos vibracionales para los enlaces de las biopelículas depositas en los sustratos poliméricos estudiados en la ventana de análisis entre 1800 a 1300  $\text{cm}^{-1}$

Materiales poliméricos	Modos vibracionales ( $\text{cm}^{-1}$ )				
	$\nu_d$ C=O	$\nu$ H <sub>2</sub> O	$\nu_d$ N-H	-CH, -CH <sub>2</sub>	$\nu_t$ N-H
BP - blanco	1745	1645	----	-----	----
BP	1722	1652	1533	1460	1359
BB - blanco	1718	1622	-----	1406	-----
BB	1720	1651	1550	1448	1371
B(h) – blanco	1703	1641	----	1404	----
B(h)	1752	1657	1542	1427	1351
B(t) – blanco	1714	1645	-----	1422	-----
B(t)	1768	1649	1539	1438	1333

Finalmente, la espectroscopia infrarroja determino la aparición de bandas de vibración asociadas a los tipos de enlaces típicos de las macromoléculas orgánicas que componen las biopelículas en todos los materiales estudiados. La presencia de enlaces P=O son característicos de la actividad de las fosfatasa, metabolitos sintetizados por *P. fluorescens* para capturar el fosforo y otros minerales presentes en el medio, por otro lado, los enlaces N-H se podrían atribuir a la producción de metabolitos como la pocianina o fenanzas que son compuestos nitrogenados sintetizados por el microorganismo.

#### 4. Conclusiones

Mejorar la relación de los plásticos con el medio ambiente es un reto que se debe asumir con firmeza ya que de ello depende la calidad del medio ambiente en el futuro. Esta investigación el estudio del crecimiento de la cepa *Pseudomonas fluorescens* sobre sustrato biopolimérico sintetizado a partir de almidón y residuos agroindustriales de *Manihot esculenta*. Los resultados indicaron que fue posible aislar y caracterizar la cepa. Los resultados demuestran que la cepa *Pseudomonas fluorescens* creció sobre bioplásticos sintetizados a partir de almidón y residuos agroindustriales de *Manihot esculenta* como lo son hojas y tallos. Este experimento de crecimiento determino que el tiempo máximo de fue a 48 horas con una densidad celular promedio de  $18,6 \times 10^8$  UFC/ml para todos los materiales en el orden de B(t), BP, BB, control y B(h). El porcentaje de pérdida de masa de BP y BB es menor en ambos medios de estudio en comparación con los resultados de B(h) y B(t) con 56 % y 52 %. Finalmente, con la microscopia óptica a 10X antes y después se observó cambios en todas las muestras, la desaparición de algunas estructuras superficiales y la aparición de una mayor densidad celular en todos los sustratos que se puede

traducir como presencia de una biopelícula adherida, la cual se asocia con la actividad microbiana. Dichas biopelículas podrían tener una excelente aplicación ya que *P. fluorescens* por ser una Rizobacteria podría metabolizar el almidón y a su vez sintetizar sustancias promotoras del crecimiento vegetal y de esta manera mitigar el impacto negativo sobre el medio ambiente.

La espectroscopia infrarroja FTIR se puede emplear para el estudio de las interacciones entre la cepa *Pseudomonas fluorescens* y el sustrato. Con cambios notorios en materiales más simples como BP y BB, sin embargo, se hizo necesario el análisis en el rango entre 1800 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ , el cual permitió observar cambios del espectro donde se identificaron señales correspondientes a los enlaces  $\nu_{\text{as}} \text{C}=\text{O}$  y  $\nu_{\text{t}} \text{N}-\text{H}$  de peptidoglucano, lípidos y fosfolípidos depositados como parte de la biopelícula en los materiales.

Los resultados coinciden con los esperados y reportados en la literatura, pero se necesitan investigaciones para cuantificar el nivel de interacción del microorganismo con el material y determinar los subproductos de la degradación. Adicionalmente se podrían comparar los resultados en condiciones de crecimiento deferente de temperatura, pH, humedad y disponibilidad de nutrientes.

## 5. Agradecimientos

Gracias a mi universidad, por la grandiosa oportunidad de haberme formado en ella, a todas las personas que fueron participe de manera directa o indirecta en este largo proceso; quiero agradecer especialmente, a mi tutora, Sixta Palencia Luna y Co-tutora Viviana Garcés Villegas les agradezco muy profundamente por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada. A mis familiares por ser siempre el motor que impulsa mis sueños y esperanzas, quienes estuvieron siempre a mi lado en los días y noches más difíciles durante mis días de estudio. Y finalmente a la vida por enseñarme que sin sacrificio no hay victoria.

## 5. Referencias bibliográficas

- [1] Yuxin H, Yuanyuan K, Fang H. H, *et al.*. Distinct responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exposed to different levels of polystyrene nanoplastics. *Science of the Total Environment*. (2022): 2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158214>
- [2] Bollain P. C, Agullo D. V, Presencia de microplásticos en aguas y su potencial impacto en la salud pública. *Revista española de salud pública*. (2020): 4. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1135-57272019000100012&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272019000100012&lng=es).
- [3] FAO. 2021. Assessment of agricultural plastics and their sustainability. A call for action. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb7856en>
- [4] Chen, M., Chen, F., Li, Z., *et al.*. Environmental risk assessment of microplastics and nanoplastics generated. *Tendencias TrAC en química analítica*. (2023): 1,2. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.11738>
- [5] Hu Ting, Zeng Y. X, Zhang y.h, *et al.*. Complete genome sequence of one novel marine *Pseudomonas* sp. BSw22131 growing with dimethylsulfoniopropionate (DMSP) as the sole carbon source. *Marine Genomics*. (2023): 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2023.101016>
- [6] Wang Z, Zhong T, Chen X, *et al.*. Multiple pre-harvest applications of antagonist *Pseudomonas fluorescens* ZX induce resistance against blue and green molds in postharvest citrus fruit. *LWT*. (2022): 2. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112922>
- [7] Chavez D. I, Cruz C. C, Sandoval C. G, *et al.*. Seedling growth promotion and potential biocontrol against phytopathogenic fusarium by native rhizospheric *Pseudomonas* spp. Strains from Amarillo Zamorano maize landrace. *Rhizosphere*. (2022): 2,3. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100601>
- [8] Álvarez G. J, Santoyo A, Rocha G. M. *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sostenible. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. (2020): 2-3. <https://revista.itson.edu.mx/index.php/rln/article/view/286/259>
- [9] Potysz A, Bartz W. Dissolution of red sandstones exposed to siderophore-producing bacterium *Pseudomonas fluorescens*: Experimental bioweathering coupled to a geochemical model. *Construction and Building Materials*. (2023): 2. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2023.130584>

- [10] Herrera Q. A, Toledo H. E, Aguirre J, Romero Y, *et al.*. Antagonic and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA. (2020): 232. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.08.003>
- [11] Rabelo Florez, R. A., Cuadrado Cano, B. S., Márquez Gómez, M. A., *et al.*. DETECCIÓN DE Pseudomonas spp. EN LA BAHÍA DE CARTAGENA. Revista de Investigaciones Universidad del Quindío. (2020). 34. <https://doi.org/10.33975/riuq.vol32n1.293>
- [12] Hu Ting, Zeng Y. X, Zhang y.h, *et al.*. Complete genome sequence of one novel marine Pseudomonas sp. BSw22131 growing with dimethylsulfoniopropionate (DMSP) as the sole carbon source. Marine Genomics. (2023): 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2023.101016>
- [13] Callicó A, Cedré B, Sifontes S, *et al.*. Phenotypical and Serological Characterizations of Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolates. Vaccimonitor. (2004): 4. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-028X2004000300001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2004000300001)
- [14] Yang J, Xu S, Wang W, *et al.*. Preparation and characterization of bioplastics from silylated cassava starch and epoxidized soybean oils. Carbohydrate Polymers. (2023) 1,2. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120253>
- [15] Xie D, Zhang R, Zhang C, *et al.*. A novel, robust mechanical strength, and naturally degradable double crosslinking starch-based bioplastics for practical applications. International Journal of Biological Macromolecules. (2023): 2. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126959>
- [16] David S. R, Ihiawakrim D, Regis R, Geoffroy V. A. Efficiency of pyoverdines in iron removal from flocking asbestos waste: An innovative bacterial bioremediation strategy. Journal of Hazardous Materials (2022): 1,2. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122532>
- [17] Kjeldsen A, Price M, Lilley C, Guzniczak E. A Review of Standards for Biodegradable Plastics. Industrial Biotechnology Innovation Center. (2018): 2. <https://bioplasticsnews.com/wp-content/uploads/2019/07/review-standards-for-biodegradable-plastics-IBIIC.pdf>
- [18] Ghada A, Abanoub M, Parrish C. C, Banoub J, Le T. A. T. Environmental impact of bioplastic use: A review. Heliyon. (2021): 3. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07918>
- [19] DIAZ P. A, LOPEZ C. E. YUCA: PAN Y CARNE, UNA ALTERNATIVA POTENCIAL PARA HACER FRENTE AL HAMBRE OCULTA. Acta Biológica Colombiana. (2022): 239. <https://doi.org/10.15446/abc.v26n2.84569>
- [20] Cartay R. Difusión y comercio de la yuca (Manihot Esculenta) en Venezuela y en el mundo. Agroalimentaria, (2004).19. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-03542004000100001](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-03542004000100001)
- [21] da Silva B. R, Ferreira R. E, Cavalcante M. L. A, *et al.*. Evaluation of the nutritional composition in effect of processing cassava leaves (Manihot esculenta) using multivariate analysis techniques. Microchemical Journal. (2020): 1,2. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104271>
- [22] Guanghui Zhou, Pengcheng Dong, Xin Luo, Lixian Zhu, *et al.*. Combined effects of cold and acid on dual-species biofilms of Pseudomonas fluorescens and Listeria monocytogenes under simulated chilled beef processing conditions. Food Microbiology. (2024):1,2. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104394>
- [23] Phadke G, Rawtani D. Bioplastics as polymeric building blocks: Paving the way for greener and cleaner environment. European Polymer Journal. (2023): 3. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112453>
- [24] Reyes R. M. A, Puentes C. E. A, Casanova M. E. L, *et al.*. INMOVILIZACIÓN DE BACTERIAS POTENCIALMENTE DEGRADADORAS DE PETRÓLEO CRUDO EN MATRICES ORGÁNICAS NATURALES Y SINTÉTICAS. Rev. Int. Contam. Ambie. (2018) <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.04.04>
- [25] Akar T, Duman N, Celik S, *et al.*. Mucor cells passively immobilized on rose waste phyto biomass: An eco-friendly hybrid material for the biotreatment of reactive dye contamination. Sustainable Materials and Technologies. (2023): 1,2. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2023.e00705>
- [26] Ismail Z. Z, Najim A. A, Hummadi K. K. Immobilization of mixed cells by Flaxseeds (Linum usitatissimum) extract as new nonconventional biocarrier for biodegradation of sodium dodecyl sulfate. Biochemical Engineering Journal. (2023): 1,2. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108881>

- [22] Chavez D. I, Cruz C. C, Sandoval C. G, *et al.*. Seedling growth promotion and potential biocontrol against phytopathogenic fusarium by native rhizospheric *Pseudomonas* spp. Strains from Amarillo Zamorano maize landrace. *Rhizosphere*. (2022): 2,3. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100601>
- [23] Álvarez G. J, Santoyo A, Rocha G. M. *Pseudomonas fluorescens*: Mecanismos y aplicaciones en la agricultura sostenible. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. (2020): 2,3. <https://revista.itson.edu.mx/index.php/rlrn/article/view/286/259>
- [24] Arenas P. D. *PROCESO DE BIODEGRADACIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE DERRAMES*. bogota: Monografía para optar el título de: ESPECIALISTA EN GESTIÓN AMBIENTAL, (2018). <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7130/1/392273-2018-I-GA.pdf>.
- [25] Herrera Q. A, Toledo H. E, Aguirre J, *et al.*. Antagonic and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. *REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA*. (2020): 232. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.08.003>
- [26] Quilès, F., Humbert, F., Delille, A. Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. (2010): 75(2), 610-616. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.11.026>
- [27] Nguyen, T. D., Nguyen, C. T., Tran, V. T. T. *et al.* Enhancement of the thermomechanical properties of a fly ash-and carbon black-filled polyvinyl chloride composite by using epoxidized soybean oil as a secondary bioplasticizer. *International Journal of Polymer Science*. (2018): 1-8. <https://doi.org/10.1155/2018/8428736>
- [28] Othman, S. H., Nordin, N., Azman, N. A. A., *et al.*. Effects of nanocellulose fiber and thymol on mechanical, thermal, and barrier properties of corn starch films. *International Journal of Biological Macromolecules*. (2021) : 183, 1352-1361. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.082>
- [29] Liang, R., Liang, Q., Li, Z., *et al.*. Assessment of the thermal hazards and oxidization mechanism of coloured corn starch dust by TG–FTIR. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*. (2021): 69, 104380 <https://doi.org/10.1016/j.jlp.2020.104380>
- [30] Di Martino, P. Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS microbiology*. (2018): 4(2), 274. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.2.274>