Viviana Garces¹, Manuel Palencia^{1*}, Enrique Combatt²

¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali – Colombia

² Departamento de Ingeniería Agrícola y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería - Colombia

Corresponding author: manuel.palencia@correounivalle.edu.co

Graphical abstract

Development of bacterial inoculums based on biodegradable hydrogels for agricultural applications

Abstract

Polymeric materials with high capacity for water absorption, biodegradable and low cost, are versatile materials with great potential in the agricultural sector. This material can be used for the development of new technologies aimed at increasing productivity and reducing costs of crops. Thus, the objective of this work was to develop two artificial microbial growth systems based on biodegradable hydrogels that allow their use as inoculants of plant growth promoting microorganisms (PGPM). For this, dextrose, starch, agar, citric acid and sorbitol were used as polymer precursors. The obtained polymers were structurally and functionally characterized by: infrared spectroscopy, elemental analysis, thermogravimetric analysis, nuclear magnetic resonance, water absorption capacity and swelling volume. On the other hand, the construction of the bacterial inoculum was carried

Keywords

Bacterial inocule
Hydrogel
Azotobacter

out in three stages: (i) isolation of PGPM from commercial bacterial inoculums, (ii) culture of microorganisms in a suitable medium and (iii) incorporation of the microorganisms into the polymer phase. The results showed that the hydrogels can be easily synthesized by the proposed method, in addition, the resulting polymer matrices are suitable growth media for PGPM, achieving inhibition of growth and reactivation as a function of the water potential of the hydrogel.

Desarrollo de inóculos bacterianos basados en hidrogeles biodegradables para aplicaciones agrícolas

Resumen

Los materiales poliméricos con elevada capacidad de absorción de agua, biodegradables y de bajo costo, son materiales versátiles con gran potencial en el sector agrícola, en lo que respecta al desarrollo de nuevas tecnologías encaminadas al aumento de la productividad y la disminución de costos de las cosechas. El objetivo de este trabajo fue desarrollar dos sistemas artificiales de crecimiento microbiano basados en hidrogeles biodegradables que permitan su uso como inoculos de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (MPCV). Para ello, como precursores poliméricos se usó dextrosa, almidón, agar, ácido cítrico y sorbitol. Los polímeros obtenidos se caracterizaron estructural y funcionalmente, por espectroscopia de infrarrojo, análisis elemental, análisis termogravimétrico, resonancia magnética nuclear, capacidad de absorción de agua y volumen de hinchamiento. Por otra parte, la construcción del inóculo bacteriano se efectuó en tres etapas: (i) aislamiento de MPCV a partir de inóculos bacterianos comerciales, (ii) cultivo de los microorganismos en medios idóneos y (iii) incorporación de los microorganismos a la fase polimérica. Los resultados muestran que los hidrogeles pueden ser fácilmente sintetizados mediante el procedimiento propuesto, además, las matrices poliméricas resultantes son medios de crecimiento adecuados para MPCV, lográndose la inhibición del crecimiento y la reactivación en función del potencial hídrico del hidrogel.

Palabras claves

Inoculos bacterianos
hidrogeles
Azotobacter

Recived: 05-03-2017

Accepted: 15-04-2017

Publishing date: 15 - May - 2017

Revision Code: 20170305-EMCC [Pag. 13-23]

Corresponding author:

manuel.palencia@correounivalle.edu.co

Desarrollo de inóculos bacterianos basados en hidrogeles biodegradables para aplicaciones agrícolas

Viviana Garces¹, Manuel Palencia^{1*}, Enrique Combatt²

¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali – Colombia

² Departamento de Ingeniería Agrícola y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería - Colombia

Corresponding author: manuel.palencia@correounivalle.edu.co

Resumen

Los materiales poliméricos con elevada capacidad de absorción de agua, biodegradables y de bajo costo, son materiales versátiles con gran potencial en el sector agrícola, en lo que respecta al desarrollo de nuevas tecnologías encaminadas al aumento de la productividad y la disminución de costos de las cosechas. El objetivo de este trabajo fue desarrollar dos sistemas artificiales de crecimiento microbiano basados en hidrogeles biodegradables que permitan su uso como inóculos de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (MPCV). Para ello, como precursores poliméricos se usó dextrosa, almidón, agar, ácido cítrico y sorbitol. Los polímeros obtenidos se caracterizaron estructural y funcionalmente, por espectroscopia de infrarrojo, análisis elemental, análisis termogravimétrico, resonancia magnética nuclear, capacidad de absorción de agua y volumen de hinchamiento. Por otra parte, la construcción del inóculo bacteriano se efectuó en tres etapas: (i) aislamiento de MPCV a partir de inóculos bacterianos comerciales, (ii) cultivo de los microorganismos en medios idóneos y (iii) incorporación de los microorganismos a la fase polimérica. Los resultados muestran que los hidrogeles pueden ser fácilmente sintetizados mediante el procedimiento propuesto, además, las matrices poliméricas resultantes son medios de crecimiento adecuados para MPCV, lográndose la inhibición del crecimiento y la reactivación en función del potencial hídrico del hidrogel.

Palabras Claves

Inoculos bacterianos
hidrogeles
Azotobacter

1. Introducción

Ante la necesidad creciente de aumentar los rendimientos de las cosechas para la producción de alimentos y otros productos agrícolas, se han desarrollado diferentes estrategias con el fin de crear las condiciones propicias para el crecimiento de la planta en condiciones agrícolas adversas o inadecuadas; algunos ejemplos son: la construcción de sistemas de riego y drenaje (intervención física), la adición de fertilizantes (intervención química) y la aplicación de inóculos bacterianos al suelo, semillas, raíces o esquejes (intervención biológica)

[1,2]. En particular, en el caso de los inóculos bacterianos, entre los efectos benéficos asociados con esta práctica se encuentran la fijación de nitrógeno, el control biológico de enfermedades transmitidas por microorganismos y el mejoramiento de la absorción de minerales. Además, se ha reportado que el uso de “cocteles microbianos” o comunidades microbianas ofrece resultados más eficientes si se les compara con microorganismos aislados [3-5].

Los microorganismos capaces de colonizar las raíces de las plantas, y que promueven su crecimiento, se conocen como Microorganismos

Promotores de Crecimiento Vegetal (MPCV). Además, los MPCV también son capaces de producir metabolitos secundarios con propiedades antibióticas, antifúngicas, insecticidas e inmunosupresoras que contribuyen con la protección contra fitopatógenos. Ejemplos típicos de MPCV son microorganismos de los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Azotobacter* y *Azospirillum* [6-7].

En la tecnología de inóculos bacterianos, la aplicación y supervivencia de los microorganismos es una etapa crítica en la que se debe lograr alcanzar una adecuada colonización de la rizosfera, hecho que se dificulta por la competencia con los microorganismos autóctonos; en consecuencia, las condiciones del entorno no deben ser sólo adecuadas para el crecimiento de la planta sino también para el crecimiento de los microorganismos exógenos, hecho que no es necesariamente compatible para los extensos rangos de condiciones agrícolas. La efectividad de los inóculos bacterianos puede verse muy limitada en suelos ácidos, salinos, pobres en nutrientes o con un déficit en sus condiciones hídricas. Además, la escasez de suelos y su continua degradación, así como la expansión de cultivos a zonas no óptimas para la agricultura por la necesidad de incrementar la producción agrícola de alimentos, dificultan en muchos casos el uso de MPCV como insumo agrícola [8].

Existen diferentes métodos para la aplicación de microorganismos a la planta (por ej., inoculación de la semilla, construcción de camas sobre el suelo, aspersión foliar e inmersión de la raíz) [9]. Una de las técnicas más apropiadas para la introducción de microorganismos en suelos es el recubrimiento de las semillas con la(s) bacteria(s) apropiada(s); en este caso, las bacterias necesitan contar con condiciones de campo adecuadas para lograr adherirse a la semilla y constituir una población viable en número. Sin embargo, aunque la técnica de inmersión resulta apropiada para las semillas, resulta poco viable para otras técnicas de reproducción como lo es la multiplicación asexual por esquejes [10].

Por otra parte, los hidrogeles (HGs) son materiales absorbentes que presentan alta capacidad de retención de agua, debido a que su estructura es una red tridimensional, altamente hidrofílica, conectada por reticulación física o química. Los HGs son capaces de absorber grandes cantidades de agua en un tiempo relativamente corto y pueden mantener

un estado de hinchamiento incluso bajo un poco de presión. Estos materiales son empleados en áreas como la agricultura, el tratamiento de aguas, la medicina, entre otros. En la agricultura, por ejemplo, se ha reportado el uso de HGs para la liberación controlada de agua y conservación de la humedad en condiciones de bajo potencial hídrico del suelo [11-13].

Desde un punto de vista químico, los HGs son macromoléculas entrecruzadas, con un gran número de grupos polares y cuya composición estructural puede ser controlada para la modulación de sus propiedades físicas y químicas. En consecuencia, es posible la síntesis de HGs biodegradables, que se caractericen por poseer en su estructura grupos funcionales fácilmente hidrolizables por acción de los microorganismos, y en este sentido, estos materiales son excelentes candidatos para la construcción de sistemas artificiales de crecimiento y adaptación de MPCV.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar sistemas artificiales de crecimiento de MPCV basados en HGs biodegradables; de este modo, estos materiales suministrarían condiciones óptimas de colonización microbiológica, facilitando la adaptación y el incremento poblacional de los microorganismos, pero a su vez, actuarían como un reservorio hídrico cuyo potencial de agua fitodisponible se vería modulado por el metabolismo microbiano.

2. Sección experimental

2.1. Síntesis y caracterización de los hidrogeles

2.1.1. Síntesis de un HG basado en ácido cítrico y sorbitol (AcS-HG): Para la preparación del AcS-HG, se agregaron 3,0 mL de sorbitol al 70 % en un vaso de precipitados y se calentó hasta su temperatura de fusión (95 °C), posteriormente, se adicionaron 5,0 g de ácido cítrico y se elevó la temperatura hasta 120 °C, por 3 horas. El polímero resultante se lavó con agua destilada, se filtró, y se secó en un horno a 50 °C por 4 horas. El porcentaje de rendimiento se determinó por gravimetría, y el HG se caracterizó mediante espectroscopia de infrarrojo por la técnica de reflectancia total atenuada (Shimadzu IRAffinity-1S, FTIR-ATR), análisis termogravimétrico (Q-50, TGA), calorimetría diferencial de barrido (Q-100, DSC), resonancia magnética nuclear de ¹³C (Bruker 500MHz Ultra-Shield, ¹³C-RMN) y análisis

elemental (FlasHEA 1112 Series). Además, se determinaron su capacidad de absorción de agua (CAA, por el método de la bolsa de té [14,15]) y su volumen de hinchamiento (VH, por volumetría).

2.1.2. Síntesis de un HG basado en polisacáridos y glucosa (PDA-HG): Para la preparación del PDA-HG, inicialmente se extrajo el almidón, a partir de 135,22 g de papa (*Solanum tuberosum* cv. Parda Pastusa) en 250,0 mL de agua destilada a 100 °C por 25 minutos. La mezcla se filtró, correspondiendo el almidón de papa de trabajo al extracto acuoso filtrado. A este filtrado se le adicionaron 5,00 g de dextrosa y de agar. La mezcla se agitó por 10 minutos y se sirvió en cajas de Petri, las cuales fueron posteriormente secadas en un horno a 40 °C por 5 horas. El porcentaje de rendimiento y las caracterizaciones, estructural y funcional, del HG se realizaron de igual manera que en el caso anterior.

2.2. Aislamiento de la cepa del MPCV

A partir del producto comercial MONIBAC®, el cual es un biofertilizante, con registro ICA No. 9437 de 2014, basado en bacterias Gram negativas de *Azotobacter chroococum* con una concentración de 1×10^8 UFC/mL, se aisló el microorganismo en dos medios diferentes de crecimiento: Agar Mueller Hinton (Sigma Aldrich) y placas de PDA-HG. El crecimiento se realizó por 24 horas a 30 °C en incubadora. Las células de *A. chroococum* se identificaron mediante tinción de Gram.

2.3. Preparación de los inóculos bacterianos

2.3.1. Incorporación de *Azotobacter chroococum* a las matrices poliméricas: Para llevar a cabo la incorporación del MPCV a los HGs, inicialmente la bacteria se cultivó en tres medios de cultivos líquidos diferentes. El primero fue una disolución acuosa de tripticasa de soya (TS, de Sigma Aldrich; 30 g/L), el segundo consistió en una disolución acuosa de la mezcla extracto de papa-dextrosa (PD) y, el tercero una combinación de extracto de papa-dextrosa y tripticasa de soya (PDT, TS; 7,5 g/L). El crecimiento celular en estos medios de cultivo, se cuantificó mediante la escala de McFarland. Los ensayos posteriores se realizaron empleando el medio de cultivo PD por tener una alta tasa de crecimiento, un costo relativamente bajo y por estar

basados en insumos de la región. Una vez determinada la capacidad de hinchamiento de los materiales, estos se inocularon con la dispersión de microorganismos en PD.

Para determinar el efecto de condiciones adversas sobre el crecimiento del microorganismo, el efecto del pH se evaluó a tres valores diferentes (2, 4 y 10), para esto, se ajustó el pH en el agua de hidratación del HG.

2.3.2. Inactivación del metabolismo microbiano: Posterior a la incorporación de los microorganismos, la actividad metabólica de estos debió ser suprimida mediante la inducción de un estado de latencia. Para ello, el potencial hídrico de los HG se redujo a cero mediante un calentamiento suave con temperaturas entre 35-45 °C, con un aumento gradual por 8 horas.

2.3.3. Activación del metabolismo microbiano: Con el fin de probar que los inóculos preparados funcionan, las células de la bacteria deben ser sacadas de su estado de latencia fácilmente con el fin de reactivar su actividad metabólica. Para llevar a cabo lo anterior, se agregó 1,0 mL de agua destilada a los HGs y se incubaron a 32 °C por 48 horas. La reactivación de las cepas se comprobó por siembra en placa de Agar Mueller Hinton.

3. Resultados y discusión

3.1. Síntesis y caracterización de los HGs

3.1.1. Caracterización del AcS-HG por FTIR-ATR: En la Figura 1A se muestran los espectros de FTIR-ATR para los precursores y para el polímero. En todos los espectros, se puede observar una banda ancha de vibración de tensión de los grupos hidroxilos (O-H) a 3401 cm^{-1} , la cual se encuentra solapada con la banda correspondiente a la vibración de tensión del enlace C-H en $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$, y la banda asociada con el enlace C-OH a $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$. Para el ácido cítrico, a 1708 cm^{-1} se observa la banda de vibración de tensión del grupo carbonilo (C=O). En el espectro del AcS-HG se observa la banda de vibración característica de los grupos ésteres a 1165 cm^{-1} , la cual evidencia que la reacción entre los grupos de los precursores tuvo lugar; esta reacción corresponde a una reacción de esterificación y, en consecuencia, se puede afirmar

Figura 1. Espectros de FTIR-ATR de precursores A) AcS-HG y B) PDA.

que ocurrió una reacción de poliesterificación. Debido a que tanto el sorbitol como el ácido cítrico tienen más de dos grupos funcionales ($-\text{OH}$ y $-\text{COOH}$, respectivamente), las moléculas pueden reaccionar por diferentes puntos conllevando a la obtención de polímeros entrecruzados e insolubles. El porcentaje de rendimiento para esta reacción fue del 85 %. En esta reacción, los altos rendimientos obtenidos se pueden explicar debido a las condiciones de síntesis. Normalmente, durante una reacción de esterificación la formación de los productos se ve limitada por la presencia de un estado de equilibrio. Esta reacción se muestra a continuación

Como se puede observar, dentro de los productos se obtiene agua, por consiguiente, la realización de la síntesis en ausencia de la misma favorece el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de productos, incrementándose de esta forma los rendimientos. Como se indicó en la metodología, en

la primera etapa de la síntesis se procedió a la fusión del sorbitol que actuó como solvente del ácido cítrico; pero, además, el calentamiento de la mezcla hasta 120 grados centígrados asegura que el H_2O producido se elimine en forma de vapor al efectuarse la reacción en un reactor abierto; esta eliminación de agua, también promueve el desplazamiento del equilibrio hacia los productos.

3.1.2. Caracterización del PDA-HG por FTIR-ATR:

En la Figura 1B se muestran los espectros de FTIR-ATR para los precursores (almidón de papa, dextrosa y agar) y para el HG. En los espectros de los precursores se pueden observar las bandas asociadas con los enlaces $-\text{OH}$, $-\text{CH}$ y enlace glucosídico a 3200, 2900 y $\sim 1000 \text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Debido a que el PDA-HG no es un HG formado por la reacción química entre sus componentes, sino que es una mezcla de los diferentes constituyentes, es de esperarse que las señales anteriormente mencionadas se encuentren en el espectro de la mezcla. Además, la vibración del enlace α -1,4-glucosídico se evidencia entre 1013

y 1029 cm^{-1} . El rendimiento para PDA-HG respecto a la masa de papa utilizada fue de $0,19\text{ g de HG/g de papa}$. El porcentaje de rendimiento puede verse afectado por diferentes factores relacionados con la variedad y calidad de papa, así como también por la fuente de almidón empleada; sin embargo, estas variables no se evaluaron en el presente proyecto.

3.1.3. Caracterización por RMN del AcS-HG y PDA-HG: Los espectros de ^{13}C -RMN para AcS-HG y PDA-HG se muestran en la Figura 2. Para el AcS-HG el desplazamiento $\delta 165 - 170\text{ ppm}$ corresponde a los carbonos del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) y sus derivados, en este caso los ester y grupos ácidos carboxílicos sin reaccionar, $\delta 60-95$ es el desplazamiento para el C-O [16]; cerca de la región entre $\delta 35-55\text{ ppm}$ se observa la señal correspondiente al enlace del carbono (CH_n).

En el PDA-HG, los desplazamientos que corresponden al carbono anomérico de los diferentes hidratos de carbono se observan a $\delta 95-110\text{ ppm}$, en la región de $\delta 70 - 90\text{ ppm}$ se tiene la resonancia de C-OH, por último, para la región entre $\delta 60 - 70\text{ ppm}$ resuena el $\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})$.

3.1.4. Caracterización térmica de los HGs: La caracterización térmica se realizó a partir de $80\text{ }^\circ\text{C}$ para explorar el comportamiento de los polímeros a temperaturas en las que puede ser sometido el material durante su aplicación, esto es, por ejemplo, en el caso de incendios forestales y quemaduras controladas. Los termogramas de los HGs se muestran en la Figura 3. Se puede observar que en los termogramas se identifican dos regiones de pérdida de masa. La primera, para ambos polímeros, es la eliminación de agua, siendo para el PDA-HG de $6,64\%$ a $102\text{ }^\circ\text{C}$ y para el AcS-HG de $1,17\%$ a $112\text{ }^\circ\text{C}$. En la segunda región, el porcentaje de pérdida de masa para el PDA-HG fue de $26,88\%$ a $222\text{ }^\circ\text{C}$ y estaría asociada con la descomposición de la estructura entrecruzada del almidón o de los anillos aromáticos, esta inicia con la condensación de los grupos OH de las uniones éter y de manera posterior con la deshidratación de los OH vecinos en el anillo causando su ruptura; para el AcS-HG, la segunda región de pérdida de masa corresponde al 83% a una temperatura de $375\text{ }^\circ\text{C}$ y se debe al rompimiento de los enlaces C-O del éster. Si se comparan las dos matrices poliméricas, el AcS-HG muestra una mejor estabilidad térmica que el PDA-HG como resultado del grado de entrecruzamiento

Figura 2. ^{13}C -RMN para AcS-HG y PDA-HG

Figura 3. Análisis termogravimétrico AcS-HG y PDA-HG

Tabla 1. Análisis elemental polímeros AcS-HG y PDA-HG, capacidad de absorción de agua (CAA) y volumen de hinchamiento (VH)

Hidrogel	%C	%H	%N	%S
AcS-HG	39,06	5,11	-	-
PDA-HG	35,87	6,62	0,78	0,02
CAA	AcS-HG	$3,8 \pm 0,7$		
	PDA-HG	$4,0 \pm 0,4$		
VH	AcS-HG	$0,4 \pm 0,1$		
	PDA-HG	$0,5 \pm 0,1$		

del polímero y la conformación más ordenada en su estructura.

3.1.5. Análisis elemental: La composición porcentual de C, H, N y S para los HGs se reportan en la Tabla 1. Se puede observar que el contenido de carbono de ambos HG es aproximadamente similar, siendo la principal diferencia en cuanto a composición la presencia de pequeñas cantidades de nitrógeno y azufre en el PDA-HG. Se estima que el contenido de oxígeno en ambos casos es de aproximadamente ~53 %. Además, a partir de la composición elemental se puede inferir que los subproductos de degradación pueden ser mayoritariamente similares, existiendo la posibilidad de evidenciar diferencias en algunos compuestos nitrogenados y/o azufrados.

3.1.6. Capacidad de absorción de agua y volumen de hinchamiento: En la Tabla 1 se muestran los valores medios de CAA y VH obtenidos para los HGs. En ambos casos no se observó una diferencia apreciable que permitiera, en cuanto a su función como HG, evidenciar la ventaja composicional de uno respecto al otro. Comparando los HGs obtenidos con HGs acrílicos [17-18], se puede observar que la CAA es relativamente menor. Esto se puede explicar debido a la mayor hidrofiliidad de los grupos ácidos carboxílicos respecto a las uniones tipo ésteres presentes en los HGs desarrollados.

3.2 Aislamiento y evaluación del crecimiento de la cepa de *Azotobacter chroococcum*

En la Figura 4 se muestran fotos del crecimiento de la *A. chroococcum* en los dos medios estudiados: PDA y Agar Mueller Hinton. Se puede observar que el crecimiento fue satisfactorio en ambos medios. De igual forma, la extracción y el aislamiento fue adecuado, comprobándose lo anterior mediante la tinción de Gram, manifestándose su característica de Gram-negativa por la coloración rosada de las células (Figura 4C). Además, la *A. chroococcum* es pleomorfica, es decir, adopta distintas formas de crecimiento, siendo su forma más usual la ovoide con un tamaño entre 0,2-1,5 μm de diámetro [19].

Por otro lado, el estudio del efecto del pH sobre el crecimiento de la *A. chroococcum* mostró una mar-

Figura 4. Cepa de *A. chroococcum* en dos medios de cultivo: (A) PDA y (B) Agar Mueller Hinton; y (C) imagen de microscopía óptica a 100X mediante tinción de Gram.

Figura 5. Imágenes del crecimiento de la cepa de *A. chroococcum* para los medios de cultivo a diferentes valores de pH.

cada disminución a pH 2, un crecimiento completamente nulo a pH 10 y un adecuado crecimiento a pH 4. Lo anterior, sugiere que pH extremadamente ácidos y extremadamente básicos inhiben el crecimiento de la *A. chroococcum*. Para esta bacteria se ha reportado que los valores de pH óptimos para el crecimiento de la cepa *Azotobacter chroococcum* oscilan entre 4.8 y 8 [19]; sin embargo, nuestros resultados evidencian que la tolerancia a ambientes ácidos es un poco mayor que lo reportado (ver Figura 5).

3.3 Incorporación del MPCV a los HGs

La incorporación de la cepa de *Azotobacter* se realizó aprovechando la naturaleza hidrofílica de los HGs. Así, los microorganismos se hicieron crecer en medios de cultivo líquido, siendo satisfactorio en todos los casos (PDT, AD y TP), obteniéndose en la escala de McFarland valores de $\sim 9,5 \times 10^8$ UFC/mL. En la Figura 6A se ilustra el crecimiento de *A. chroococcum* en diferentes medios líquidos.

Así, al conocer la CAA de cada uno de los HGs, fue posible la incorporación de una cantidad estandarizada de UFC (0,5 McFarland, lo cual corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Una imagen ilustrativa del hinchamiento de los HGs por la absorción del cultivo del microorganismo en PDT se muestra en la Figura 6B. Cabe destacar que, en suelos naturales, se ha reportado que la población de *Azotobacter* no es superior a 1×10^4 - 1×10^6 UFC por gramo de suelo [20]. Por lo tanto, cabe destacar que, en los medios de cultivos evaluados y en los HGs se logró un aumento poblacional del orden de 10^9 - 10^{10} UFC/mL de medio de crecimiento.

3.4 Inactivación y reactivación de la *Azotobacter chroococcum* en los HGs

Tras la incorporación de la *A. chroococcum* se procedió a inducir el estado de latencia del microorganismo mediante estrés ambiental, este consistió en la eliminación del agua del HG, obligándola a ralentizar o detener su metabolismo como mecanismo de supervivencia.

Figura 6. Crecimiento de *A. chroococcum* en diferentes medios líquidos (A) e hinchamiento de los hidrogeles con cepas del microorganismo en PDT con una concentración celular de 10^8 UFC/mL (B); y (C) HGs biodegradados posterior a la rehidratación e incubación ($t = 15$ días).

Figura 7. Imágenes del crecimiento de *A. chroococcum* antes de la deshidratación de los HGs y después de la reactivación.

Los HGs deshidratados se muestran en la Figura 6C ($t = 0$ h). Posteriormente, tras la hidratación e incubación, el crecimiento de los microorganismos se reactivó. Lo anterior se verificó por la biodegradación de los HGs en un período de tiempo de 15 días (Figura 6C, $t = 15$ días). En la Figura 7 se muestran imágenes del ciclo completo de inoculación, siembra, deshidratación, reactivación y verificación del crecimiento mediante siembra.

En términos generales, en el crecimiento de toda bacteria pueden identificarse cuatro etapas en el ciclo de crecimiento de células bacterianas: una fase de latencia o de retardo, una fase exponencial, una fase estacionaria y una fase de muerte celular. En la etapa de latencia existe un aparente reposo en el que las células sintetizan las enzimas necesarias para la actividad metabólica subsiguiente; pasado este período, el cultivo entra en la denominada fase de crecimiento exponencial, donde la velocidad de crecimiento es máxima. Se encuentra muy bien documentado que la velocidad de crecimiento que alcanza un cultivo, depende del tipo de microorganismo y los factores ambientales como son la temperatura, el pH, oxigenación, etc. La velocidad de crecimiento comenzará a disminuir hasta hacerse nula cuando alcance la fase estacionaria, ya que cambios en la composición y concentración de nutrientes entre el cultivo del inóculo y el medio fresco. Por último, el cultivo entra en la fase de muerte, en la que el número de células que mueren se va haciendo mayor. Sin embargo, algunos investigadores definen un estado de inactividad metabólica diferente al de la latencia como dormancia. En este sentido, las células bacterianas no estarían preparándose para la actividad metabólica, sino, más bien, por las condiciones adversas del entorno, ellas cesan su actividad metabólica a la espera de condiciones óptimas de crecimiento. Por lo tanto, la dormancia es entendida como un mecanismo de supervivencia y la latencia como la etapa inicial del crecimiento bacteriano [19]. Los estados de dormancia, en diversos microorganismos bacterianos más no en todos, se manifiesta en forma de esporas y quistes; siendo estos últimos, una de las etapas dormantes del ciclo de vida de diversas clases de Azotobacteraceae [17-19]. Además, se ha reportado que la formación de quistes protege a este tipo de microorganismos de la radiación ultravioleta, del calor, el tratamiento ultrasónico y de la desecación del medio. Estos quistes corresponden a un

recubrimiento polimérico por acumulación de poli(b-hidroxibutirato), y diversos polisacáridos, proteínas y lipopolisacáridos [19-21].

En el caso de la *A. Chroococcum*, se ha reportado la formación de quistes mecánicamente frágiles pero que hacen al microorganismo resistente a la desecación y la radiación ultravioleta [20]; en consecuencia, los resultados sugieren que, durante el secado de los HGs, la *A. Chroococcum* formaría quistes que conllevarían a la dormancia celular y la sobrevivencia de la bacteria en el interior del HG.

4. Conclusiones

A partir de los resultados presentados, se concluye que mediante la metodología propuesta es posible sintetizar hidrogeles biodegradables que a su vez son medios idóneos para el crecimiento de MPCV, como la *A. chroocorum*, completamente estables térmicamente hasta 200 °C y con una relativamente baja capacidad de absorción de agua en comparación con polímeros basados en ácidos acrílicos. Además, experimentalmente se observó que la cepa de *A. chroocorum* tiene una resistencia a pH ácidos evidenciándose crecimiento a un pH=4.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad del Valle, al grupo de investigación GI-CAT, al programa de semilleros de investigación 2016-II y a Mindtech s.a.s. por el financiamiento suministrado. Además, agradecen al Program for Scientific Knowledge Diffusion of Mindtech s.a.s. (PSKD 2016-2020) por los fondos asociados a los costos de publicación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses de ningún tipo en relación a la publicación.

Referencias

- [1] Wang, C., Liu, W., Li, Q., Ma, D., Lu, H., Feng, W., & Guo, T. Effects of different irrigation and nitrogen regimes on root growth and its correlation with above-ground plant parts in high-yielding wheat under field conditions. *Field Crops Research*, 165, 2014. 138-149p.
- [2] Rashid, M. I., Mujawar, L. H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I. M., Oves, M. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiological Research*, 183, 2016. 26-41p.

- [3] Padmavathiamma, P. K., Li, L. Y., Kumari, U. R. An experimental study of vermi-biowaste composting for agricultural soil improvement. *Bioresource Technology*, 99, 2008, 1672-1681p.
- [4] Singh, J. S. Microbes: The chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 203, 2015, 80-82p.
- [5] Xun, W., Huang, T., Zhao, J., Ran, W., Wang, B., Shen, Q., Zhang, R. Environmental conditions rather than microbial inoculum composition determine the bacterial composition, microbial biomass and enzymatic activity of reconstructed soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 2015, 10-18p.
- [6] Grobelak, A., Napora, A., Kacprzak, M. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*, 84, 2015, 22-28p.
- [7] Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., SkZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological research*, 184, 2016, 13-24p.
- [8] Ahemad, M., Kibret, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26, 2014, 1-20p.
- [9] Saraf, M., Pandya, U., Thakkar, A. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiological research*, 169, 2014, 18-29p.
- [10] Severino, L. S., Lima, R. L., Lucena, A. M., Freire, M. A., Sampaio, L. R., Veras, R. P. & Arriel, N. H. Propagation by stem cuttings and root system structure of *Jatropha curcas*. *biomass and bioenergy*, 35(7), 2011. 3160-3166p.
- [11] Zhou, Y., Fu, S., Zhang, L., Zhan, H. Super-absorbent nanocomposite hydrogels made of carboxylated cellulose nanofibrils and CMC-gp (AA-co-AM). *Carbohydrate polymers*, 97, 2013. 429-435p.
- [12] Chang, C., Duan, B., & Zhang, L. Fabrication and characterization of novel macroporous cellulose-alginate hydrogels. *Polymer*, 50(23), 2009. 5467-5473p
- [13] Peng, N., Wang, Y., Ye, Q., Liang, L., An, Y., Li, Q., Chang, C. Biocompatible cellulose-based superabsorbent hydrogels with antimicrobial activity. *Carbohydrate polymers*, 137, 2016. 59-64p.
- [14] Palencia, M., Mora, M., Palencia, S. Biodegradable polymer hydrogels based in sorbitol and citric acid for controlled release of bioactive substances from plants (polyphenols). *Current Chemical Biology*, 10, 2016.
- [15] Palencia, M., Lerma, T., Combatt, E. Hydrogels Based in Cassava Starch with Antibacterial Activity for Controlled Release of Cysteamine-Silver Nanostructured Agents. *Current Chemical Biology*, 10, 2016.
- [16] Tokita, M., Sone, M., Kurosu, H., Ando, I., Watanabe, J. High resolution ¹³C NMR studies for crystalline and liquid crystalline phases of PB-18 polyester composed of 4, 4'-dihydroxybiphenyl and octadecanedioic acid. *Journal of molecular structure*, 446 (3), 1998. 215-221p.
- [17] B. Rojas, D. Contreras, A. Ramirez, José Prin, H. Astudillo, L. Rojas, Y. Figueroa, C. Palomo, A. Muller, I. Katime. Estudio de hidrogeles de poli(acrilamida) y poli(acrilamida-co-ácido itacónico) cargados con antibiótico y con calcio. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales S5*, 2012, 39-42p.
- [18] E. Orozco, S. Hernandez, S. Gomez E. Salazar, I. Katime. Estudio del hinchamiento de hidrogeles acrílicos terpoliméricos en agua y en soluciones acuosas de ión plumboso. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 2011, 465-470.
- [19] G. Vela, G. Cagle. Formation of Fragile Cysts by a Strain of *Azotobacter chroococcum*. *Journal Genetic Microbiology* 57, 1969. 365-368p.
- [20] R. Gupta, A. Kalia, S. Kapoor. *Bioinoculants: A step towards sustainable agriculture*. New Indian Publishing Agency, New Delhi, 2007. 300p.
- [21] E. Lubzens, J. Cerda, M. Clark. *Dormancy and resistance in harsh environments*. Springer Science, New York, 2010. 280p.