Tulio A. Lerma^{1,2}, Enrique Combatt³, Manuel Palencia^{2*}

¹ Mindtech Research Group (Mindtech-RG), Mindtech S.A.S., Cali – Colombia

² GI-CAT, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali – Colombia

³ Departamento de Ingeniería Agrícola y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería, 230002, Colombia

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

Graphical abstract

Compositos híbridos miméticos del suelo basados en arcilla, polímeros y bacterias fijadoras de nitrógeno para el desarrollo de sistemas de remediación de suelos degradados

Resumen

El deterioro constante del suelo como consecuencia de procesos naturales y antropogénicos provoca la pérdida de la fracción arcillosa y la materia orgánica humificada, lo que conduce inevitablemente a la formación de suelos pobres en nutrientes con baja fertilidad y baja productividad agrícola. Se sugiere que una restauración eficiente y fácil de los suelos puede ser posible mediante la adición de materiales estructural y funcionalmente similares a las partículas del suelo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar materiales que imitaran el suelo a partir de compuestos híbridos polímero-arcilla junto con bacterias fijadoras de nitrógeno para el desarrollo de sistemas de remediación de suelos degradados. Para esto, bentonita se modificó químicamente con triclorovinilsilano con el fin de producir núcleos de arcilla polimerizables. Posteriormente, mediante polimerizaciones secuenciales se generaron los

Palabras claves

Acondicionador polimérico
del suelo
Materia orgánica humificada
Suelos degradados
Azotobacter chroococcum
Bentonita

compositos híbridos, de este modo, el ácido acrílico se polimerizó mediante polimerización por radicales libres en presencia de arcilla modificada. Seguido, unidades de sorbitol y ácido cítrico se incorporaron químicamente en la matriz polimérica por esterificación. Más tarde, la bacteria *Azotobacter chroococcum* (bacteria fijadora de nitrógeno) fue inoculada en la matriz. Finalmente, el sistema se secó y activó para verificar la reactivación bacteriana. El material obtenido se caracterizó por análisis elemental, análisis térmico y espectroscopía infrarroja. Además, se analizó la capacidad de absorción del agua, la capacidad de intercambio catiónico y la capacidad de los microorganismos para activarse metabólicamente mediante la adición de agua. A partir de los resultados, se concluye que a través de la metodología propuesta es posible sintetizar sistemas híbridos que imitan el suelo, en estructura y funcionalidad, utilizando como modelo el conjunto supramolecular de arcilla-humina-ácido húmicos, con alta capacidad de retención de agua e intercambio catiónico. Además, se demuestra que este sistema artificial se puede utilizar como un medio adecuado potencial para el desarrollo de microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas, tales como *Azotobacter chroococcum*.

Soil-mimicking hybrid composites based on clay, polymers and nitrogen-fixing bacteria for the development of remediation systems of degraded soil

Abstract

The constant deterioration of the soil as a consequence of natural and anthropogenic processes causes the loss of the clayey fraction and humified organic matter, leading inevitably to the formation of nutrient-poor soils with low fertility and low agricultural productivity. We suggest that an efficient and easy restoration of soils is possible by addition of materials structurally and functionally like to soil particles. Thus, the objective of this work was to develop soil-mimicking materials from polymer-clay hybrid composites in conjunction with nitrogen-fixing bacteria for the development of remediation systems of degraded soils. For this, bentonite was chemically modified with trichlorovinylsilane in order to produce polymerizable clay cores. Subsequently, the hybrid composites were generated by sequential polymerizations, in this way, the acrylic acid was polymerized by free radical polymerization in the presence of modified clay. Followed, units of sorbitol and citric acid were chemically incorporated into the polymer matrix by esterification reactions. Later, the bacterium *Azotobacter chroococcum* (nitrogen fixing bacteria) was inoculated into the matrix. Finally, the system was dried and activated to verify the bacterial reactivation. The material obtained was characterized by elemental analysis, thermal analysis and infrared spectroscopy. In addition, water absorption capacity, cation exchange capacity and the ability of microorganisms to metabolically activate by the addition of water were analyzed. From the results, it is concluded that through the proposed methodology it is possible to synthesize soil-mimicking hybrid systems, in structure and functionality, using as model the supramolecular ensemble clay-humin-humic acids, with high retention of water and cation exchange capacity. In addition, it is demonstrated that this artificial system can be used as a potential medium for the development of microorganisms that promote the growth of plants, such as *Azotobacter chroococcum*.

Keywords

Soil polymeric conditioner
Humified organic matter
Degraded soils
Azotobacter chroococcum
Bentonite

Received: 08-05-2018

Accepted: 02-05-2018

Publishing date: 15 - Mayo - 2018

Revision Code: 20180908-EMCC (Pag. 17-27)

Corresponding author:

manuel.palencia@correounivalle.edu.co

Compositos híbridos miméticos del suelo basados en arcilla, polímeros y bacterias fijadoras de nitrógeno para el desarrollo de sistemas de remediación de suelos degradados

Tulio A. Lerma^{1,2}, Enrique Combatt³, Manuel Palencia^{2*}

¹ Mindtech Research Group (Mindtech-RG), Mindtech S.A.S., Cali – Colombia

² GI-CAT, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali – Colombia

³ Departamento de Ingeniería Agrícola y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería, 230002, Colombia

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

Resumen

El deterioro constante del suelo como consecuencia de procesos naturales y antropogénicos provoca la pérdida de la fracción arcillosa y la materia orgánica humificada, lo que conduce inevitablemente a la formación de suelos pobres en nutrientes con baja fertilidad y baja productividad agrícola. Se sugiere que una restauración eficiente y fácil de los suelos puede ser posible mediante la adición de materiales estructural y funcionalmente similares a las partículas del suelo. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar materiales que imitaran el suelo a partir de compuestos híbridos polímero-arcilla junto con bacterias fijadoras de nitrógeno para el desarrollo de sistemas de remediación de suelos degradados. Para esto, bentonita se modificó químicamente con triclorovinilsilano con el fin de producir núcleos de arcilla polimerizables. Posteriormente, mediante polimerizaciones secuenciales se generaron los compositos híbridos, de este modo, el ácido acrílico se polimerizó mediante polimerización por radicales libres en presencia de arcilla modificada. Seguido, unidades de sorbitol y ácido cítrico se incorporaron químicamente en la matriz polimérica por esterificación. Más tarde, la bacteria *Azotobacter chroococcum* (bacteria fijadora de nitrógeno) fue inoculada en la matriz. Finalmente, el sistema se secó y activó para verificar la reactivación bacteriana. El material obtenido se caracterizó por análisis elemental, análisis térmico y espectroscopía infrarroja. Además, se analizó la capacidad de absorción del agua, la capacidad de intercambio catiónico y la capacidad de los microorganismos para activarse metabólicamente mediante la adición de agua. A partir de los resultados, se concluye que a través de la metodología propuesta es posible sintetizar sistemas híbridos que imitan el suelo, en estructura y funcionalidad, utilizando como modelo el conjunto supramolecular de arcilla-humina-ácido húmicos, con alta capacidad de retención de agua e intercambio catiónico. Además, se demuestra que este sistema artificial se puede utilizar como un medio adecuado potencial para el desarrollo de microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas, tales como *Azotobacter chroococcum*.

Palabras Claves

Acondicionador polimérico
del suelo
Materia orgánica humificada
Suelos degradados
Azotobacter chroococcum
Bentonita

1. Introducción

Actualmente, el constante aumento en la demanda alimenticia causado por el incremento de la población mundial, que para el año 2050 se estima que habrá llagado a 9.000 millones de personas, provocará una extensa y la escasez, cada vez más severa, del recurso suelo [1]. Siendo estos procesos de degradación intensificados por factores antropogénicos y por efectos climáticos [2]. Por otro lado, la materia orgánica de los suelos, en especial la materia orgánica humificada, es uno de los componentes que actúa mayoritariamente sobre los equilibrios de la actividad suelo-planta. Siendo sus efectos ya sean indirectos, influyendo y modificando las propiedades del suelo que determinan su fertilidad, o directos, en este caso actuando sobre los mecanismos fisiológicos y/o metabólicos de las plantas. [3, 4]. En este mismo sentido, la fracción inorgánica del suelo, específicamente los minerales de arcillas, son también unos de los principales componentes, que les otorgan importantes características a los suelos, debido a su naturaleza coloidal que hace que sus propiedades químicas de superficie y físicas difieran de los otros constituyentes inorgánicos [5]. Generando la pérdida de estos dos importantes componentes en los suelos, arcilla y materia orgánica humificada, su deterioro y la disminución de sus propiedades agrícolas.

Actualmente, ante la necesidad creciente de aumentar los rendimientos de las cosechas para la producción de alimentos y como estrategias para la recuperación de suelos degradados, 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) [6,7]. 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 en comparación con el uso de microorganismos aislados [8-10].

Por otro lado, la estrategia de biomimesis surge como una alternativa para la fabricación de nuevos materiales y ensambles supramoleculares cuyo diseño y función está basado en sistemas análogos a los existentes en la naturaleza. Estos, al ser el resultado de un extenso proceso de adaptación, modificación y perfeccionamiento permiten la consecución de nuevas y novedosas aplicaciones [11]. De este modo, el desarrollo de nanocompositos híbridos emerge como una alternativa para la obtención de materiales que sirvan como base para la construcción de sistemas artificiales análogos al suelo.

En este sentido, el término composito híbrido (CH) hace referencia a estructuras sólidas compuestas de dos o más fases de diferente naturaleza, donde una de sus fases posee dimensiones a escala nanométrica (i.e., <100 nm en al menos una dimensión) [12]. Entre los diversos nanocompositos desarrollados se encuentran los CHs poliméricos, constituidos por un polímero y un material a nanoescala de refuerzo, siendo comúnmente utilizadas las arcillas, nanofibras de carbón, nanosilica, nanopartículas de aluminio y titanio, entre otros [13]. Recientemente, los investigadores han enfocado sus estudios en el desarrollo de CHs basados en polímeros y arcillas, no sólo por las diversas características que poseen las arcillas, como su geometría en forma de láminas de escala nanométrica, alta abundancia y su origen natural, sino también por las mejoras en las propiedades que estos materiales exhiben en comparación a los convencionales, tales como resistencia, rigidez, estabilidad térmica y oxidativa, propiedades de barrera y de retardo de llama [14].

Por lo anterior, el desarrollo de sistemas miméticos de la estructura humificada del suelo, basados en CH, con capacidad de formar, mejorar y rehabilitar las propiedades de éste, y que, además, actúen como reservorio de bacterias fijadoras de nitrógeno, son una alternativa para la solución a la problemática que se presenta por el continuo y el cada vez más creciente deterioro del recurso edafológico. Así, el objetivo de este trabajo fue desarrollar materiales que imitaran el suelo a partir de compuestos híbridos polímero-arcilla junto con bacterias fijadoras de nitrógeno para el desarrollo de sistemas de remediación de suelos degradados.

2. Sección experimental

2.1 Reactivos y materiales

Triclorovinilsilano (tClVS, Aldrich) se utilizó en la modificación de la bentonita (Derivados de bentonita colombiana S.A.S.). Ácido acrílico (Aldrich), ácido cítrico (Merck), sorbitol (Merck), persulfato de amonio (Aldrich) y la bentonita modificada se utilizaron en la obtención de los CHs. Acetato de amonio (Merck), NaCl (Merck) y formaldehído (Merck) se utilizaron en la determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC). El producto comercial MONIBAC®, con registro ICA No. 9437 de 2014, se empleó como fuente de bacterias Gram negativas de *Azotobacter chroococcum*. Caldo de tripticasa de soya (Aldrich) y Agar Mueller Hinton (Aldrich) se emplearon como medios de cultivos para la preparación de los inóculos bacterianos. Acetona (Aldrich), tolueno (Merck) y agua bidestilada se utilizaron como solventes.

2.2 Generación de núcleos de arcilla polimerizables

La formación de núcleos de arcilla polimerizables, se realizó mediante el anclaje covalentemente del monómero tClVS sobre la bentonita, mediante reacciones de sustitución nucleofílica entre los grupos silanol de la bentonita y el tClVS [15]. Para esto, 8,0 g de bentonita se dispersó en 50 mL de tolueno. Seguido, la dispersión se calentó a 95 °C en un equipo de reflujo. Posteriormente, 2,4 g (15,6 mmol) de tClVS se adicionaron a la mezcla de reacción y se dejó en reflujo por 4 horas. Finalmente, la bentonita modificada (bentonita-F) se filtró, se lavó, con tolueno y acetona, y se secó a 40 °C. El material obtenido se verificó mediante análisis elemental (AE, ThermoFiningan Flash EA1112 CHN) y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier – reflectancia total atenuada (FT-IR/ATR, IR-Affinity-1).

2.3 Desarrollo de CHs

El desarrollo de los CHs se realizó mediante polimerizaciones secuenciales, inicialmente mediante reacciones de polimerización vía radicales, entre los núcleos de arcilla obtenidos y el ácido acrílico, y posteriormente, se incorporaron

mediante reacciones de esterificación unidades de sorbitol y ácido cítrico. Para ello, 4,0 g de bentonita modificada se dispersaron en 75,0 mL de agua y se adicionaron diferentes cantidades de ácido acrílico, para obtener materiales con porcentajes de arcilla del 60 y 80 % (p/p). Posteriormente, se adicionó el iniciador de reacción persulfato de amonio (2 % molar con respecto al monómero) a la dispersión y se calentó a 80 °C por 60 minutos con agitación constante. Los materiales obtenidos en esta etapa de síntesis se lavaron con agua y se secaron a 50 °C. Posteriormente, se tomaron 5 g de ácido cítrico y se mezclaron con 2,36 g de sorbitol. Seguido, se adicionó a la mezcla de reacción cantidades ascendentes, 10, 30 y 50 %, del CH obtenido en la etapa previa y se llevaron a 140 °C por 24 h. Finalmente, el material obtenido se caracterizó mediante AE, FT-IR/ATR y análisis termogravimétrico (TGA, TA instruments SDT Q600).

2.4 Caracterización funcional de los NCHs

A los CHs obtenidos se les determinaron las siguientes propiedades: capacidad de retención de agua (CRA) y capacidad de intercambio catiónico (CIC).

CRA. Se evaluó mediante la técnica de la bolsa de té. Para esto, una cantidad determinada del material se depositó en una bolsa de té (bolsa de papel) y se sumergió en agua por 24 horas [16]. Posteriormente, se retiró del agua y por diferencia en peso se obtuvo la cantidad de agua retenida.

CIC. Estos experimentos se realizaron de acuerdo al protocolo establecido por el Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC) para la determinación de la CIC por el método de acetato de amonio 1N [17].

2.5 Preparación de los inóculos bacterianos

La preparación de los inóculos bacterianos se realizó mediante variaciones de la metodología publicada por Garcés y Palencia (2017) [18]. Para ello se realizó lo siguiente:

2.5.1 Incorporación de Azotobacter chroococcum a las matrices poliméricas: La incorporación de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal se llevó a cabo mediante la inoculación de los CHs con una dispersión bacteriana de *Azotobacter chroococcum*. Para ello, se cultivó la

bacteria en un medio de crecimiento bacteriano, tripticasa de soya (TS, de Sigma Aldrich; 30 g/L), a 32 °C por 24 horas. Posteriormente, a partir de los resultados de la CRA de los CHs, se adicionó la cantidad necesaria de la dispersión bacteriana hasta lograr su máxima capacidad de retención.

2.5.2 Inactivación del metabolismo microbiano: Posterior a la incorporación de la dispersión de los micro-organismos, la actividad metabólica de estos se suprimió mediante la inducción de un estado de latencia. Para ello, el potencial hídrico de los CHs se redujo a cero mediante un calentamiento suave a temperaturas entre 35 - 45 °C, aumentándose gradualmente por 24 horas.

2.5.3 Activación del metabolismo microbiano: La evaluación de los inóculos preparados se realizó mediante la reactivación de la actividad metabólica de los microorganismos. Para llevar a cabo lo anterior, se agregó 1,0 mL de agua destilada a los inóculos basados en CHs desarrollados y se incubaron a 32 °C por 48 horas. Finalmente, la reactivación de la cepa bacteriana se comprobó mediante la siembra de los mismos en placas de Agar Mueller Hinton.

3. Resultados y discusión

El desarrollo de CH basados en arcilla y polímeros inició con la funcionalización covalente de la bentonita con tCIVS; monómero de doble funcionalidad, con capacidad de reaccionar, por un extremo con los grupos silanol de la bentonita y por el otro, al poseer un grupo vinílico, puede llevar a cabo reacciones de polimerización vía radicales libres [15]. La funcionalización se verificó mediante la determinación de la composición elemental, Tabla 1, en ella se puede observar como los contenidos de carbono e hidrogeno incrementan en la bentonita-M, en comparación con su precursor, estando estos asociados directamente con el carbono e hidrógeno de los grupos vinílicos del tCIVS incorporado, sugiriendo esto la correcta funcionalización de la bentonita.

En la Figura 1, se muestra la caracterización por FT-IR/ATR de la bentonita y bentonita-M. En el espectro de la bentonita se pueden apreciar dos bandas alrededor de las 3300 cm⁻¹ y 1000 cm⁻¹, características de las vibraciones de los enlaces O – H y Si – O, respectivamente. En este mismo sentido,

en el espectro de la bentonita-M se pueden observar las bandas características de la bentonita, sin embargo, adicionalmente se observa una banda débil en la región de 3000 cm⁻¹, típica de la vibración del enlace C – H, asociado al grupo vinílico del tCIVS incorporado. Por lo tanto, los resultados evidencian la satisfactoria funcionalización de la bentonita y generación de núcleos de arcilla activos frente a reacciones de polimerización en cadena.

Tabla 1. Composición elemental de bentonita y bentonita-M.

Muestra	Composición elemental (%)			
	C	H	N	Otros elementos
Bentonita	0,15	1,71	0,01	98,13
Bentonita-M	3,50	2,23	0,01	94,26

Por otro lado, la obtención de los CHs se llevó a cabo en dos etapas; la primera consistió en la polimerización vía radicales libres de la bentonita-M con ácido acrílico, empleando como iniciador radicalario al persulfato de amonio, con el objetivo de incorporar cadenas poliméricas con grupos ácidos sobre la superficie de la arcilla que pueden ser posteriormente empleados en reacciones de esterificación, los resultados de esta etapa fueron previamente publicados [15]. Como segunda etapa, se generó el CH basado en ácido cítrico, sorbitol y la arcilla modificada previamente, mediante reacciones de esterificación en ausencia de solvente, es decir, no se emplea solvente, siendo el ácido cítrico el que actúa como este [16]. La identificación de los CHs desarrollados y su composición molecular porcentual, se muestran en la Tabla 2.

Figura 1. Espectro FT-IR/ATR de la bentonita y bentonita-M.

Tabla 2. Identificación de la muestra, composición molecular y elemental de los CHs desarrollados.

Muestra	Composición CH (% p/p)			Composición elemental (%)				
	Bentonita-M	Ácido acrílico	Ácido cítrico	Sorbitol	C	H	N	Otros elementos
CHB	0,00	0,00	67,93	32,07	39,88	4,31	0,01	55,80
CH 60-10	5,45	3,64	61,76	29,15	36,40	4,02	0,01	59,57
CH 60-20	10,00	6,67	56,61	26,72	33,64	3,75	0,01	62,60
CH 60-40	17,14	11,44	48,52	22,90	29,20	3,21	0,01	67,58
CH 80-10	7,27	1,82	61,76	29,15	36,40	3,97	0,01	59,62
CH 80-20	13,33	3,34	56,61	26,72	32,75	3,41	0,01	63,83
CH 80-40	22,86	5,72	48,52	22,90	29,32	3,35	0,01	67,32

Figura 2. Espectro FT-IR/ATR de CHB, CH 60-40 y CH 80-40.

En la Tabla 2, se muestra la caracterización de la composición elemental de cada uno de los CHs desarrollados. Como se puede observar para el CHB sus contenidos de C e H son superiores a los presentados por el resto de los materiales, como consecuencia a la ausencia de bentonita, específicamente, en su estructura. Por otra parte, para los diferentes CH-60 y CH-80, los contenidos de estos dos elementos, C e H, se encuentran en función a los contenidos de bentonita-M en la matriz polimérica, siendo mayores en aquellos casos donde sus contenidos son menores. Sugiriendo estos resultados, que el empleo de polimerizaciones secuenciales permite la obtención de CHs poliméricos.

La Figura 2 muestra los espectros FT-IR/ATR del CHB, CH 60-40 y CH 80-40. En el espectro del CHB, el cual en su estructura no posee arcilla, se puede observar alrededor de los 3300 cm⁻¹, la banda de vibración de los grupos hidroxilo, O-H,

presentes en su estructura; y dos bandas alrededor de los 1710 cm⁻¹ y 1170 cm⁻¹, características de los enlaces C=O y C-O-C, respectivamente, de los grupos éster formados. Por otro lado, en la Figura 2 se muestra únicamente los espectros de dos CHs desarrollados, 60-40 y 80-40, dada a su semejanza estructural y espectral con sus homólogos, 60-10, 60-20, 80-10 y 80-20, difiriendo únicamente en las intensidades de absorbancia. En ambos espectros, se observa las bandas típicas presentadas por el grupo éster a 1710 cm⁻¹ y 1170 cm⁻¹; además, la banda del grupo hidroxilo a 3300 cm⁻¹ y una cuarta banda a 1000 cm⁻¹, típica del enlace Si-O, proveniente de la bentonita-M empujada para la generación de los CHs. En general, los resultados anteriores sugieren la posibilidad de obtención de CHs de forma fácil y eficiente, mediante reacciones de polimerización secuencial, destacando el empleo del ácido cítrico como agente de reacción y como medio de solubilización y dispersión de los otros precursores. En la Tabla 3 se muestran los resultados del estudio de la estabilidad térmica de los CHs desarrollados. En cuanto a la caracterización térmica del precursor, bentonita, se logró identificar claramente dos etapas de pérdida de masa, una inicial alrededor de los 100 °C, asociada a la pérdida de agua superficial de las arcillas y una segunda etapa de pérdida de masa, iniciando en 336 °C, asociada con procesos que corresponden a la eliminación de los grupos hidroxilos de los extremos de las láminas de arcillas, asociados a la estructura interna de las láminas, generándose un residuo del 84 % [19].

Por otro lado, en el análisis por TGA para el CHB se identificó claramente tres procesos de pérdida de masa. El primer proceso, inicia desde condiciones ambientales hasta temperaturas alrededor de los 107 °C, con una disminución del 5 %, asociadas a la pérdida de agua contenida en el material, que no fue

Tabla 3. Análisis de estabilidad térmica de los CHs.

Muestra	Etapas						Residuo (%)
	1		2		3		
	T (°C)	Δm (%)	T (°C)	Δm (%)	T (°C)	Δm (%)	
Bentonita	25	11	336	5	---	---	84
CHB	25	5	175	38	377	46	11
CH 60-10	31	5	166	36	361	39	20
CH 60-20	34	5	168	33	362	35	27
CH 60-40	25	4	169	29	360	30	37
CH 80-10	30	5	165	37	361	38	20
CH 80-20	30	6	167	35	361	33	26
CH 80-40	32	5	164	31	360	27	37

eliminada durante el proceso de obtención o fue absorbida por el mismo material durante el tiempo de almacenamiento. Los dos procesos adicionales a temperaturas alrededor de los 321 y 441 °C, se asocian a procesos de descomposición de la matriz polimérica, deshidroxilación, rompimiento enlaces éster, etc., obteniéndose un residuo del 11 %. [18] Finalmente, la caracterización térmica de los CHs que poseen en su estructura bentonita-M, evidenciaron igualmente tres etapas de pérdida de masa, una inicial a temperaturas alrededor de los 100 °C, asociadas a la deshidratación de los materiales, con pérdidas de alrededor de los 4 al 6 %. Las dos etapas posteriores, asociadas a procesos de degradación, inician alrededor de los 160 y 360 °C, siendo este último proceso de degradación solapado por la deshidroxilación interna de la bentonita. En cuanto a los residuos generados, estos se encuentran, principalmente, en función de los contenidos de bentonita en la matriz polimérica. Lo anterior, sugiere que estos materiales pueden ser empleados en campo, sin verse alterada su estructura debido a las condiciones ambientales. Sin embargo, en situaciones de incendios a pequeña escala o quemaduras programadas, donde las temperaturas pueden alcanzar valores entre 207 – 237 °C y 768 – 1118 °C, respectivamente, la estabilidad de los CHs puede verse alterada drásticamente [20-21].

En la Figura 3 (A) se muestra los resultados de la evaluación de la CRA de los CHs desarrollados. En general, los CHs obtenidos presentaron una CRA superior a la presentada por la bentonita, siendo esta última de 2,2 g H₂O/g muestra. y la presentada por los diferentes CHs superiores a 4,0 g H₂O/g muestra; esta alta capacidad de retención de agua se puede explicar debido a la alta hidrofiliidad del material, conferida por los grupos ácidos carboxílicos e hidroxilos presentes en la estructura

polimérica [22]. Por otro lado, en la Figura 3 (B) se muestran los resultados de la evaluación de la CIC de los CHs desarrollados. En general, todos los CHs mostraron capacidades superiores a los presentados por el mineral de arcilla, bentonita, estando inversamente relacionada con los contenidos de esta. Lo anterior se explica debido a la eliminación de sitios intercambiables de la bentonita por la reacción con tCIVS. Los resultados en general, de la caracterización funcional de los CHs arcilla-polímero, mostraron que estos poseen CIC similares a suelos orgánicos de 200 meq/100 g, con CRA superiores a las presentadas en suelos [23].

En la Figura 4 se muestran fotografías digitales de (A) CHs y (B y C) del proceso de obtención de los inóculos bacterianos. La cepa de *Azotobacter chroococcum* se aisló del producto comercial, llamado MONIBAC®, tanto en medio líquido como sólido, empleando caldo de tripticosa soya y agar

Figura 3. CRA y CIC de los CHs.

Muller Hilton, respectivamente. En las graficas 4, B y C, en el proceso de inoculación, se puede observar el satisfactorio aislamiento de la bacteria, comprobándose mediante la tinción de Gram, donde se obtuvo una manifestación rosada, característica de bacterias Gram-negativas. Además, la *Azotobacter chroococcum* presento una morfología ovoide, sin embargo, esta última característica depende de las condiciones de crecimiento, al ser la *Azotobacter chroococcum* pleomórfica, es decir, que adopta distintas formas de crecimiento [24]. Por otro lado, para la incorporación de la cepa de *Azotobacter chroococcum* a los CHs se aprovechó

la alta hidrofiliidad de los mismos y su alta CRA. De este modo, se estandarizó la dispersión bacteriana a valores de $\sim 1,0 \times 10^9$ UFC/mL y se adicionó la cantidad correspondiente a cada CHs en función de la máxima CRA. Posteriormente, se procedió a la inactivación de la *Azotobacter chroococcum*, tras la inducción a un estado de latencia mediante estrés ambiental, es decir, mediante la eliminación del agua de los CHs, con el fin de disminuir o detener su metabolismo. Finalmente, luego haber pasado de 72 horas desde el proceso de secamiento, se procedió a la hidratación e incubación de los inóculos preparados.

Figura 4. Fotografías digitales (A) compositos híbridos, (B y C, respectivamente) medio de crecimiento en agar y test de Gram de la *Azotobacter chroococcum* antes de la deshidratación y después de la reactivación.

Los resultados de este proceso se muestran en la Figura 4, B y C, proceso de reactivación. Como se puede observar, para todos los materiales evaluados se logra la reactivación de la *Azotobacter chroococcum*, pasando de una morfología cocoide a bacilar, como producto de las variaciones ambientales inducidas durante el proceso de generación de los inóculos. Lo anterior se explica debido a la capacidad de la *Azotobacter chroococcum*, de formar quistes, recubrimientos poliméricos de poli(b-hidroxibutirato), diversos polisacáridos, proteínas y lipolisacáridos; que protegen al microorganismo del calor, radicación, tratamiento ultrasónico y desecación del medio [18, 24]. Por lo tanto, los resultados sugieren que la *Azotobacter chroococcum* puede soportar el proceso de secado, que induce a su enquistamiento y permite su sobrevivencia al interior de los CHs.

4. Conclusiones

A partir de los resultados, se concluye que a través de la metodología propuesta es posible sintetizar sistemas híbridos que imitan el suelo, en estructura y funcionalidad, utilizando como modelo el conjunto supramolecular arcilla-humina-ácidos húmicos, con retención de agua y capacidad de intercambio catiónico mayor que los observados por los minerales de arcilla y sus precursores. Además, se demuestra que este sistema artificial se puede usar de forma potencial como medio propicio para el desarrollo de microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas, como *Azotobacter chroococcum*.

Agradecimientos

Autores agradecen a Mindtech s.a.s. y a la Universidad del Valle por los recursos suministrados en el marco de: Program for Scientific Knowledge Diffusion of Mindtech s.a.s. (PSKD 2016-2020) y Alianza para el Fortalecimiento de la Investigación Científica, aplicada y Tecnológica (AFICAT UV-MT 2018-2023).

Conflicto de intereses

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

Referencias

- [1] FAO. Escasez y degradación de las tierras y el agua: creciente amenaza para la seguridad alimentaria, 2011. <http://www.fao.org/news/story/es/item/95186/icode/>
- [2] M. Juárez, J. Sánchez, A. Sánchez. Química del suelo y medio ambiente. Publicaciones de la Universidad de Alicante, 2006. p. 552-554
- [3] G.H. Bolt, M.G.M. Bruggenwert. Chapter 1 Composition of the Soil, In: G.H. Bolt, and M.G.M. Bruggenwert (Eds.), Soil Chemistry: A. Basic Elements, Developments in Soil Science, Elsevier, 1976, Volume 5, Part A, p. 1-12
- [4] Z. Filip, K. Demmerova. Humic Substances as Natural Interacting Agents: Their Characteristics and Possible Fate in Environment, In: L. Simeonov, M. Hassanien, H. editor(s), Exposure and Risk Assessment of Chemical Pollution-Contemporary Methodology, Springer Netherlands, 2009, p. 247-257
- [5] C.J. Bronick, R. Lal. Soil structure and management: a review, Geoderma, 2005, Volume 124, Issues 1–2, p. 3-22
- [6] C. Wang, W. Liu, Q. Li, D. Ma, H. Lu, W. Feng, T. Guo. 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, 2014, Volume 165, p. 138-149
- [7] M.I. Rashid, L.H. Mujawar, T. Shahzad, T. Almeelbi, I.M. Ismail, M. Oves. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. Microbiological Research, 2016, Volume 183, p. 26-41
- [8] P. Padmavathiamma, L. Li, U. Kumari. An experimental study of vermi-biowaste composting for agricultural soil improvement. Bioresource Technology, 2008, Volume 99, p. 1672-1681
- [9] J. Singh. Microbes: The chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2015, Volume 203, p. 80-82
- [10] W. Xun, T. Huang, J. Zhao, W. Ran, B. Wang, Q. Shen, R. Zhang. 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, 2015, Volume 90, p. 10-18
- [11] C. Zollfrank. Bioinspired material surface – Science or engineering?. Scripta Materialia, 2014, Volume 74, p. 3-8
- [12] J. Koo. Polymer Nanocomposites: Processing, Characterization, And Applications; 1 st ed.; McGraw-Hill: New York, 2006, p. 272.
- [13] S. Pavlidou, C. Papaspyrides. A Review on Polymer-layered Silicate Nanocomposites. Prog. Polym. Sci. 2008, Volume, 33, p. 1119-1198

- [14] M. Alexandre, P. Dubois. Polymer-Layered Silicate Nanocomposites: Preparation, Properties and Uses of a New Class of Materials. *Mater. Sci. Eng. R Reports*, 2000, Volume 28, p. 1-63
- [15] T. Lerma, M. Palencia, E. Combatt. Soil polymer conditioner based on montmorillonite-poly(acrylic acid) composites. *J. Appl. Polym. Sci.* 2018, Volume 135, Issue 18, 46211
- [16] M. Palencia, M. Mora, S. Palencia. Biodegradable Polymer Hydrogels Based in Sorbitol and Citric Acid for Controlled Release of Bioactive Substances from Plants (Polyphenols). *Curr. Chem. Biol.* 2017, Volume 11, Issue 1, p 36-43
- [17] Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC). 2006. Métodos analíticos de laboratorio de suelos. VI Edición. Bogotá, Subdirección de Agrología.
- [18] V. Garcés, M. Palencia. Development of bacterial inoculums based on biodegradable hydrogels for agricultural applications. *J. Sci. Technol. Appl.* 2017, Volume 2, p. 13-23
- [19] E. Villegas. Modificación y caracterización de un material arcilloso tipo esmectita de potencial aplicación en catálisis. Tesis de Magister. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 2013, 67 p.
- [20] J. Reynard-Callanan, G. Pope, M. Gorrington, H. Feng. Effects of high-intensity forest fires on soil clay mineralogy. *Physical Geography*, 2010, Volume 31, p 407-422
- [21] L. Zarate. Estudio de la temperatura de la llama en incendios forestales. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya. 2004
- [22] C. Demitri, et al. Novel superabsorbent cellulose-based hydrogels crosslinked with citric acid. *J. Appl. Polym. Sci.* 2008, Volume 110, Issue 4, p 2453-2460
- [23] P. Gruba, J. Mulder. Tree species affect cation exchange capacity (CEC) and cation binding properties of organic matter in acid forest soils. *Sci. Total Environ.* 2015, Volume 511, p 655-662
- [24] G. Vela, G. Cagle. Formation of Fragile Cysts by a Strain of *Azotobacter chroococcum*. *J. Gene. Microbiol.* 1969, Volume 57, p 365-3