



ECOSISTEMAS MARINOS - COSTEROS

Proyecto: APROVECHAMIENTO DE LOS ECOSISTEMAS MARINOS COSTEROS COMO UNA ALTERNATIVA PARA AUMENTAR TOLERANCIA A LA SEQUÍA Y A LA SALINIDAD DEL SUELO EN LAS PLANTAS DE INTERÉS AGRÍCOLA Y DE LOS BOSQUES DE MANGLAR EN LOS DEPARTAMENTOS DE ATLÁNTICO, CESAR, MAGDALENA. BPIN: 2022000100074

Informe técnico final

Mes de Diciembre de 2023

Actividad 1.2.1 Demostrar la factibilidad técnica de las bacterias encapsuladas en hidrogeles superabsorbentes.

Entidad ejecutora:



Financia:



Entidades aliadas:



1. IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO

- **Nombre del proyecto:** APROVECHAMIENTO DE LOS ECOSISTEMAS MARINOS COSTEROS COMO UNA ALTERNATIVA PARA AUMENTAR TOLERANCIA A LA SEQUÍA Y A LA SALINIDAD DEL SUELO EN LAS PLANTAS DE INTERÉS AGRÍCOLA Y DE LOS BOSQUES DE MANGLAR EN LOS DEPARTAMENTOS DE ATLÁNTICO, CESAR, MAGDALENA.

Código BPIN: 2022000100074

- **Nombre de la entidad proponente y demás entidades**
 - **Nombre entidad proponente:** Universidad Simón Bolívar
 - **Nombre de la entidad aliada No. 1:** Universidad del Magdalena
 - **Nombre de la entidad aliada No. 2:** Universidad Popular del Cesar
 - **Nombre de la entidad aliada No. 3:** Servialimentos del Noroccidente
 - **Nombre de la entidad aliada No. 4:** Bananera El Rubí S.A.S
 - **Nombre de la entidad aliada No. 5:** Cooperativa de productores y comercializadores de productos agrícolas del Sur del Atlántico.
 - **Nombre de la entidad aliada No. 6:** Establecimiento Público Ambiental Barranquilla Verde

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Aumentar el aprovechamiento de los ecosistemas marino-costeros, orientado al mejoramiento de la tolerancia a la sequía y a la salinidad del suelo de las plantas de interés agrícola y de los bosques de manglar.

Objetivos Específicos

- Ampliar aplicación de conocimiento científico- tecnológico en el desarrollo de tecnologías basadas en microorganismos endófitos de manglar.
- Fortalecer la capacidad instalada científico-tecnológica orientada al capital natural de la región Caribe.
- Desarrollar procesos de empaquetamiento, transferencia y comercialización de la tecnología diseñada.

3. ACTIVIDADES

Objetivo específico	Producto	Actividad	Mes	
			Inicio	Final
OE1: Ampliar aplicación de conocimiento científico-tecnológico en el desarrollo de tecnologías basadas en microorganismos endófitos de manglar.	Artículos de investigación	1.1.1 Obtener microorganismos endófitos de manglar con capacidad de promoción de crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés salino e hídrico	1	4
		1.1.2 Participar en entrenamiento especializado en bioprospección Marina	3	6
	Servicio de apoyo para la generación de prototipos materiales, o productos dispositivos derivados del desarrollo experimental	1.2.1 Demostrar la factibilidad técnica de las bacterias encapsuladas en hidrogeles superabsorbentes.	5	8
		1.2.2 Desarrollar prototipo de la tecnología basada en bacterias endófitas de manglar e hidrogeles superabsorbentes a nivel de laboratorio y en un entorno controlado.	9	11
		1.2.3 Validar la tecnología basada en bacterias endófitas de manglar e hidrogeles superabsorbentes en un entorno real.	12	21
		1.2.4 Realizar la administración del proyecto	1	24
		1.2.5 Realizar seguimiento y supervisión del proyecto	1	24
OB2: Fortalecer la capacidad instalada científico-tecnológica	Infraestructura para la investigación	2.1.1 Dotar con equipos científico-tecnológicos laboratorios de investigación orientados a los ecosistemas	3	6

orientada al capital natural de la región Caribe.	dotada	marino-costeros y a los sistemas agrícolas.		
		2.1.2 Monitorear las características fisicoquímicas de suelos agrícolas y bosques de manglar.	6	24
		2.1.3 Desarrollar modelos predictivos sobre los efectos adversos del cambio climático en los ecosistemas marino - costeros y en los sistemas agrícolas.	6	24
		2.1.4 Realizar la administración del proyecto.	1	24
		2.1.5 Realizar seguimiento y supervisión del proyecto	1	24
3. Desarrollar procesos de empaquetamiento, transferencia y comercialización de la tecnología diseñada.	Documentos de lineamientos técnicos.	3.1.1 Desarrollar acciones para la apropiación de la tecnología por parte de los usuarios en instituciones del sector agrícola.	12	24
		3.1.2 Realizar un estudio de exploración del mercado y del desarrollo comercial de tecnologías.	10	24
		3.1.3 Desarrollar estrategias de escalabilidad, aplicabilidad y replicabilidad de las tecnologías desarrolladas.	17	24
		3.1.4 Realizar la administración del proyecto	1	24
		3.1.5 Realizar seguimiento y supervisión del proyecto.	1	24

4. DESARROLLO

4.1 ACTIVIDAD 1.2.1

Actividad 1.2.1 Demostrar la factibilidad técnica de las bacterias encapsuladas en hidrogeles superabsorbentes.

4.1.1 Detalle del cumplimiento de la actividad.

ACTIVIDAD	PRODUCTO	MEDIO DE VERIFICACIÓN	FECHA	% DE AVANCE
Demostrar la factibilidad técnica de las bacterias encapsuladas en hidrogeles superabsorbentes.	Artículos de investigación Medido a través de: Número de artículos Cantidad: 1	Documento de artículo postulado	01 de Septiembre 2023 a 31 Diciembre 2023	1,10%

Fuente: elaboración propia

4.1.1 Detalles del cumplimiento de las tareas.

TAREA	ENTREGABLE	MEDIO DE VERIFICACIÓN	FECHA	% DE AVANCE
Realización de pruebas de laboratorio para identificar la tolerancia a la sequía de las bacterias seleccionadas	Informe de resultados de pruebas de laboratorio de las bacterias seleccionadas con relación a la tolerancia a la sequía	Pruebas de laboratorio y validación de concepto realizada	01 de septiembre del 2023 al 31 de Octubre del 2023	0,50%
Encapsulamiento de bacterias en las esferas de	Documento con el proceso de encapsulamiento	Informes de laboratorio del proceso	01 de Octubre del 2023 al 31 de Diciembre del	0,60%

alginato y validación técnica del proceso	de las bacterias en las esferas de alginato	encapsulamiento de las bacterias en las esferas de alginato	2023		
---	---	---	------	--	--

Fuente: elaboración propia

4.2 METODOLOGÍA

Las acciones desarrolladas para cada periodo corresponden específicamente a lo consignado en el documento técnico del proyecto que se describe a continuación:

A. Análisis de los aislados seleccionados para determinar su tolerancia a la sequía in vitro:

Para comprobar el potencial de los aislados microbiano para crecer en un entorno de estrés hídrico, se preparará el caldo Luria Bertani (LB) con distintas concentraciones (0, 5, 10, 20 y 40%) de polietilenglicol (PEG6000) para obtener distintos niveles de potencial hídrico. A continuación, se inocularán los medios de cultivo con células bacterianas en fase logarítmica media fijado en OD600=0,2. Los cultivos inoculados serán incubados a 28 °C con una agitación constante de 150 rpm. El crecimiento de las bacterias se estimará midiendo la densidad óptica a 600 nm con un espectrofotómetro cada tres horas.

B. Encapsulación de microorganismos en esferas de alginato: Para el proceso de encapsulación en esferas de alginato, las bacterias se cultivarán en caldo LB y se incubarán a 25°C a 120 rpm por 24 h. Posteriormente se centrifugarán a 6.000 rpm durante 10 min y con 57 el pellet bacteriano se preparará una solución de 20 mL cuya densidad óptica a 600 nm será de 1,770. Para la obtención de las esferas se preparará una solución de alginato de sodio al 1,25% cuya dispersión completa se llevará a cabo mediante agitación constante en una plancha de calentamiento a 120°C. Una vez obtenida la mezcla homogénea de alginato de sodio, la temperatura será llevada a 50°C, y la solución de bacterias será adicionada y mezclada durante 15 min. Posteriormente con una bomba de presión positiva se le adicionará por goteo la mezcla de alginato y bacterias a una solución de cloruro de calcio al 2%, manteniéndose en agitación constante durante 30 min para la estabilización de las esferas. Subsecuentemente, las esferas serán extraídas de la solución de cloruro de calcio y se lavarán con solución salina al 0.9%. Las esferas así obtenidas serán inmediatamente utilizadas para recuento bacteriano y las pruebas de promoción de crecimiento vegetal.

C. Biodegradación de las microesferas de alginato en suelo: Las microesferas con bacterias inmovilizadas se colocarán en recipientes de vidrio que contienen tierra húmeda para el cultivo de plantas, 30 microesferas por recipiente y serán enterradas a 5 cm por debajo de la superficie del suelo. El suelo se mantendrá durante 30 días ligeramente por debajo de la saturación con agua, añadiendo agua destilada si es necesario. Cada 3 días, se sacarán 3 perlas del suelo, y cada una de las perlas se examinará en estereoscópico para observar cambios en su estructura.

D. Recuento de bacterias encapsuladas en esferas de alginato: Para el recuento de las UFC/g (unidades formadoras de colonias por gramo de esferas) se realizarán diluciones de las esferas en

citrato de sodio al 2.0% seguido de diluciones seriadas en solución salina, y el conteo se realizará por siembra en profundidad en agar LB.

4.2.1 Realización de pruebas de laboratorio para identificar la tolerancia a la sequía de las bacterias seleccionadas

Septiembre 2023: Planificación de la actividad y elaboración de documentación.

Planificación de la actividad:

Se inició la actividad con el establecimiento de las tareas y entregables y la asignación de las diferentes responsabilidades para cada uno de estas por parte de los investigadores adscritos a esta actividad. Se realizó además una verificación de los requerimientos a nivel de laboratorio en cuanto a equipos y reactivos necesarios para los ensayos de laboratorio asociados con la actividad.

Elaboración de protocolos de laboratorio:

Se elaboró el protocolo de prueba de laboratorio para identificar la tolerancia a la sequía de las bacterias endófitas aisladas de tejido vegetal procedente de la especie de mangle *Avicennia germinans*. Para ello se revisaron artículos científicos asociados a la evaluación de la tolerancia a la sequía de bacterias usando polietilenglicol (PEG) para confirmar y ajustar la metodología presentada durante la planificación del proyecto.

Elaboración de modelo de informe de laboratorio:

Se elaboró un modelo de informe para presentar los resultados de laboratorio de la prueba de tolerancia a la sequía de las bacterias endófitas aisladas de manglar. Para ello se escribió una Introducción que recopiló el análisis de artículos científicos relacionados con la sequía, adaptación microbiana y pruebas para medir la tolerancia en bacterias. Se establecieron los lineamientos para presentar los resultados con una base de datos diseñada para el registro de estos y un modelo de gráfica para presentarlos.

Octubre 2023: Ensayos preliminares de tolerancia de bacterias aisladas en el departamento del Atlántico.

Ensayo preliminar de tolerancia a la sequía

Se desarrolló un ensayo preliminar de una réplica para conocer la tolerancia a la sequía de los 9 aislamientos más tolerantes al NaCl (>15%) a partir de la exposición de las bacterias al PEG, tal como se describe a continuación: se preparó el caldo Luria Bertani (LB) con distintas concentraciones (0, 5, 10, 20 y 40%) de polietilenglicol (PEG6000) con el objetivo de obtener distintos niveles de potencial hídrico. En cada una de las concentraciones se inocularon los medios de cultivo con células bacterianas en fase logarítmica media fijado en OD₆₀₀=0,2 (Fig. 1). Los cultivos inoculados se incubaron a 28 °C con una agitación constante de 150 rpm durante 72 horas. El crecimiento de las bacterias se estimó midiendo la densidad óptica a 600 nm con un espectrofotómetro a las 0, 24, 48 y 72 horas.

Noviembre 2023: Ensayos preliminares de tolerancia de bacterias aisladas en el departamento del Magdalena y confirmatorios de bacterias aisladas del departamento del Atlántico.

Ensayo preliminar de tolerancia a la sequía (Magdalena):

Se desarrolló un ensayo preliminar para conocer la tolerancia a la sequía de los 4 aislamientos más tolerantes al NaCl (>15%) de los manglares muestreados en el departamento del Magdalena, a partir de la exposición de las bacterias al PEG, tal como se describe a continuación: se preparó el caldo Luria Bertani (LB) con distintas concentraciones (0, 5, 10, 20 y 40%) de polietilenglicol (PEG6000) con el objetivo de obtener distintos niveles de potencial hídrico. En cada una de las concentraciones se inocularon los medios de cultivo con células bacterianas en fase logarítmica media fijado en OD₆₀₀=0,2 (Fig. 1). Los cultivos inoculados se incubaron a 28 °C con una agitación constante de 150 rpm durante 72 horas. El crecimiento de las bacterias se estimó midiendo la densidad óptica a 600 nm con un espectrofotómetro a la 0, 24, 48 y 72 horas.

Ensayo confirmatorio de tolerancia a la sequía (Atlántico):

Se realizó la confirmación de la tolerancia a la sequía de las 5 bacterias seleccionadas en el departamento del Atlántico bajo el mismo protocolo descrito en el ensayo preliminar.

Ensayo complementario de tolerancia a la sequía de hongos (Magdalena):

Se llevó a cabo un ensayo complementario para el caso de las cepas fúngicas aisladas de manglares igualmente del departamento del Magdalena, para determinar la xerotolerancia a partir del crecimiento de estos aislamientos en placas con agar Extracto de Malta-Levadura-Glucosa (MYG), según Pitt y Hocking (1985) con diferentes concentraciones de glucosa de 20, 40, 50, 60 y 70% genera ambientes con actividad acuosa (aw) de 0.97, 0.93, 0.89, 0.85 y 0.76, respectivamente.

Diciembre 2023: Ensayos confirmatorios de tolerancia a la sequía bacterias aisladas del departamento del Atlántico y Magdalena:

Ensayo confirmatorio de tolerancia a la sequía del departamento del Atlántico y Magdalena.

Se realizó una tercera replica para la confirmación de la tolerancia a la sequía de las 5 bacterias seleccionadas en el departamento del Atlántico y un ensayo completo con las 18 cepas más tolerantes al NaCl (>12%) aisladas del departamento del Magdalena bajo el mismo protocolo descrito en el ensayo preliminar.

4.2.2 Encapsulamiento de bacterias en las esferas de alginato y validación técnica del proceso

Septiembre 2023: Planificación de la actividad

Planificación de la actividad:

De esta actividad se avanzó igualmente en la planificación de la misma con la asignación de las responsabilidades; en especial en lo referente a la elaboración de los protocolos, modelos de informes, trabajo experimental y elaboración de informes de laboratorio. Se determinó igualmente la entrega del protocolo general de encapsulamiento y la del modelo de prueba de laboratorio para el mes de octubre, debido a que el inicio de esta actividad será el 1 de octubre de 2023.

Octubre 2023: Planificación de la actividad y caracterización del crecimiento bacteriano.

Elaboración de protocolos de laboratorio:

Se elaboró el protocolo de prueba de laboratorio para la encapsulación de bacterias endófitas aisladas de tejido vegetal procedente de la especie de mangle *Avicennia germinans*. Para ello se revisaron artículos científicos asociados a la encapsulación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, en especial aquellos relacionados con el uso del alginato para confirmar y ajustar la metodología presentada durante la planificación del proyecto.

Elaboración de modelo de informe de laboratorio:

Se elaboró un modelo de informe para presentar los resultados de laboratorio de los ensayos de encapsulación de bacterias endófitas aisladas de manglar. Para ello se escribió una Introducción que recopiló el análisis de artículos científicos relacionados con la encapsulación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, en especial aquellos relacionados con el uso del alginato. Se establecieron los lineamientos para presentar los resultados con una tabla que muestre las variaciones realizadas durante la encapsulación.

Ensayos preliminares de caracterización de crecimiento bacteriano:

Se ha ido caracterizando el crecimiento bacteriano, mediante la realización de curvas de crecimiento de los aislamientos más tolerantes al NaCl (>15%) con el propósito de conocer el crecimiento de cada bacteria en miras de su encapsulación. Para ello se prepararon inóculos, inicialmente en LB de 24 horas de incubación. En el caso de las cepas aisladas del departamento de Atlántico se colocaron a crecer en lector de placas (9 cepas) durante 24 horas, con mediciones de OD cada 10 minutos. En el caso de las cepas aisladas en el departamento del Magdalena, los ensayos fueron realizados en Erlenmeyer con un volumen final de medio de 50 mL, en este caso se hicieron mediciones a las 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24, 36, 48 y 72 horas para recuento en placa en profundidad y medición espectrofotométrica de la densidad óptica a 600 nm (DO600).

Noviembre 2023: Ensayos preliminares de encapsulación.

Selección de cepas a encapsular:

A partir de la identificación de las bacterias aisladas con tolerancias al NaCl iguales superiores al 15% y una vez culminado el screening de todas las pruebas de promoción de crecimiento vegetal y tolerancia a la sequía de los 9 aislamientos obtenidos de los manglares del departamento del Atlántico, se procedió a la selección de las bacterias que serán encapsuladas y que así mismo serán enviadas a secuenciar. Para ello se hizo un análisis se organizó la base de datos de la actividad 1.1.1 y se

realizó un análisis en equipo de todos los resultados: inicialmente se descartaron aquellas bacterias patógenas; posteriormente se seleccionaron las más tolerantes al PEG y después se tuvieron en cuenta las mejores en cuanto a las pruebas de promoción de crecimiento vegetal.

Ensayos preliminares de encapsulación

Se realizaron ensayos preliminares para el encapsulamiento de una de las cepas seleccionadas. Inicialmente se realizaron ajustes mecánicos de la bomba peristáltica para controlar el flujo de la bomba y así poder obtener las esferas de alginato, a partir de las cuales se empezaron los ensayos de biodegradación de las mismas. Una vez se logró esto, se procedió al encapsulamiento bacteriano con la comprobación del número de bacterias encapsuladas partir de recuento placa siguiendo el protocolo de laboratorio establecido.

Diciembre 2023: Ensayos finales de encapsulación.

Se continuó con el ensayo de biodegradación de las esferas de alginato, con las observaciones realizadas a los 13 y 24 días. Así mismo se repitió el proceso de encapsulación, en este caso utilizando la segunda bacteria seleccionada identificada como *Bacillus tequilensis*.

5. RESULTADOS

Septiembre 2023: Planificación y documentación tolerancia a la sequía:

A partir de la revisión de los siguientes artículos científicos:

- Ashwin, R., Bagyaraj, D. J., & Mohan Raju, B. (2023). Ameliorating the drought stress tolerance of a susceptible soybean cultivar, MAUS 2 through dual inoculation with selected rhizobia and AM fungus. *Fungal Biology and Biotechnology*, 10(1), 1-19.
- Rigi, F., Saberi, M., & Ebrahimi, M. (2023). Improved drought tolerance in *Festuca ovina* L. using plant growth promoting bacteria. *Journal of Arid Land*, 15(6), 740-755.
- Rosa, A. P., Dias, T., Mouazen, A. M., Cruz, C., & Santana, M. M. (2023). Finding optimal microorganisms to increase crop productivity and sustainability under drought—a structured reflection. *Journal of Plant Interactions*, 18(1), 2178680.
- Tang, Y., Winterfeldt, S., Brangarí, A. C., Hicks, L. C., & Rousk, J. (2023). Higher resistance and resilience of bacterial growth to drought in grasslands with historically lower precipitation. *Soil Biology and Biochemistry*, 177, 108889.
- Getahun A, Muleta, D., Assefa, F. and Kiros, S. (2023). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from Degraded Habitat Enhance Drought Tolerance of Acacia (*Acacia abyssinica* Hochst. ex Benth.) Seedlings. *International Journal of Microbiology*.

La revisión de la literatura permitió establecer la contextualización del protocolo y determinar los aspectos más importantes a tener en cuenta en el procedimiento tales como:

Aspecto	Condición establecida
Tiempo de incubación	72 horas

OD inicial de inoculación	0.2 OD600 nm													
Tiempo de toma de muestra	0, 24, 48 y 72 horas													
Volumen de los ensayos	10 mL													
Concentraciones de PEG	0%, 5%, 10%, 20% y 40%													
Análisis de resultado	Según la DO de tolerancia a la sequía se determinarán como sigue: completamente sensible < 0,3; sensible= (0,3-0,39); tolerante=(0,4-0,5), y completamente tolerante > 0,5.													
Porcentaje de inoculación	10%													
Medio de cultivo	LB													

Tabla 1: Compilación de parámetros de ensayo de tolerancia a la sequía a partir de la revisión de artículo de investigación. Fuente: Elaboración propia.

Así mismo, se estableció la forma de organizar los ensayos de la siguiente manera:

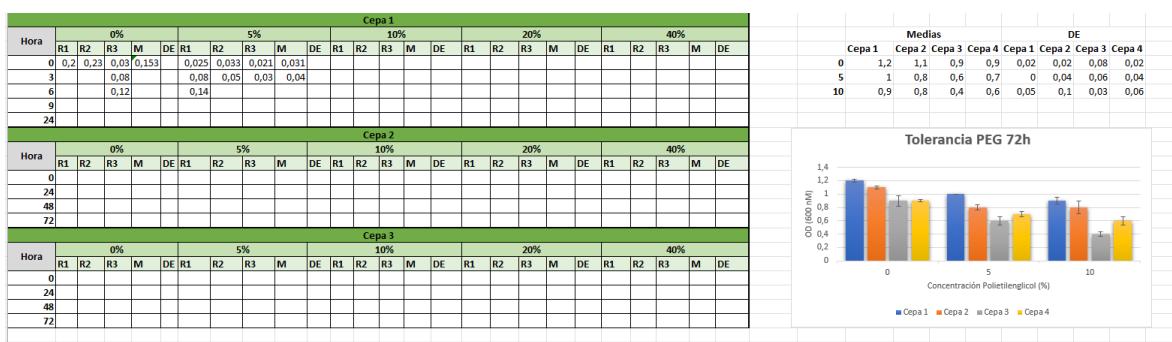


Figura 1: Base de datos de la actividad 1.2.1 para el registro de la información de la tolerancia al PEG y modelo de gráfica para representar tolerancia. Fuente: elaboración propia.

Octubre 2023: Ensayos preliminares de tolerancia a la sequía de bacterias aisladas en el departamento del Atlántico y planificación de la encapsulación (Documentación y curvas de crecimiento).

Ensayo preliminar de tolerancia a la sequía bacterias del departamento del Atlántico:

A partir de los resultados preliminares se ha podido evidenciar que 2 de los aislamientos, específicamente C1NG02 y C3TMA03, exhiben la capacidad de tolerar la concentración más elevada de PEG, tal como se detalla en la tabla 2 de resultados. Así mismo, cabe señalar que en 6 se observó un crecimiento incluso en presencia de concentraciones del 20% de PEG, como se refleja igualmente en la tabla 2. Por su parte, la cepa C1TMA03 se distinguió por no presentar crecimiento en las diversas concentraciones utilizadas durante el ensayo.

Código de la cepa	0%	5%	10%	20%	40%
C1NG02	SI	SI	SI	SI	SI
C3HPC02	SI	SI	SI	SI	NO
C4PLANTULAG02	SI	SI	SI	SI	NO
C1HMA02	SI	SI	SI	SI	NO
C1TMA03	SI	NO	NO	NO	NO
C3TMA03	SI	SI	SI	SI	SI
C1NPC03	SI	SI	SI	SI	NO
C2HMA01	SI	SI	SI	SI	NO
C2PLANTULAG02	SI	SI	SI	SI	NO

Tabla 2. Ensayo preliminar de tolerancia al PEG a las 72 horas de los microorganismos endófitos de *Avicennia germinans* aislados en el departamento del Atlántico. Fuente: Elaboración Propia.

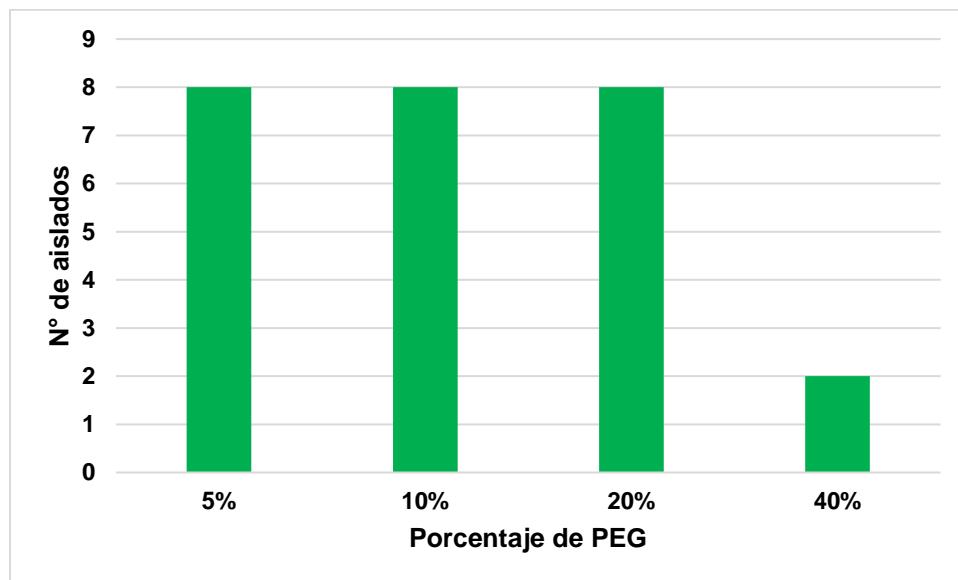


Figura 2. Número de aislados bacterianos endófitos de *Avicennia germinans* obtenidos de manglares del departamento del Atlántico seleccionados por resistir altas concentraciones de NaCl (>15%) tolerantes a distintas concentraciones PEG a las 72 horas. Fuente: Elaboración Propia.

Planeación de los ensayos de encapsulamiento bacteriano:

A partir de la revisión de los siguientes artículos científicos:

- Szopa, D., Mielczarek, M., Skrzypczak, D., Izydorczyk, G., Mikula, K., Chojnacka, K., & Witek-Krowiak, A. (2022). Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix—A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products*, 181, 114846.
- Zheng, L., Ma, X., Lang, D., Zhang, X., Zhou, L., Wang, L., & Zhang, X. (2022). Encapsulation of *Bacillus pumilus* G5 from polyvinyl alcohol-sodium alginate (PVA-SA) and its implications in improving plant growth and soil fertility under drought and salt soil conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 231-243.
- Zhang, W., Zheng, L., Lang, D., Zhang, X., Ma, X., Li, X., & Zhang, X. (2023). Eco-friendly bio-encapsulation from sodium alginate-trehalose-kaolin and its performance evaluation in improving plant growth under salt or/and drought conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 225, 123-134.
- Singh, G., & Paithankar, I. (2023). Encapsulation of Biofertilizers, Biopesticides and Biocontrol Agents. In *Sustainable Agriculture Reviews 60: Microbial Processes in Agriculture* (pp. 121-150). Cham: Springer Nature Switzerland.

La revisión de la literatura permitió establecer la contextualización del protocolo y determinar los aspectos más importantes a tener en cuenta en el procedimiento tales como:

Aspecto	Condición establecida
Tiempo de incubación bacteriano	Depende del crecimiento de cada aislamiento que se utilizará.
Medio de cultivo	LB
OD de concentrado bacteriano	1.770 (OD: 600 nM)
Nº de células inicial en perlas	$10^6\text{-}10^8$
Concentración cloruro de calcio	2%
Concentraciones de Alginato	1-3% (Inicio pruebas 1,15)
Medio de cultivo	LB
Tiempo de agitación	30 minutos.

Tabla 3: Compilación de parámetros del proceso de encapsulamiento bacteriano a partir de la revisión de artículo de investigación. Fuente: Elaboración propia.

Así mismo, se estableció la forma de organizar los ensayos de la siguiente manera:

Ensayo de encapsulamiento No1		
Concentración de alginato:		
OD del cultivo:		
Tiempo del cultivo		
Recuento bacteriano en suspensión:		
Promedio de Recuento bacteriano en perla:		
Otros:		
Día	Características de la microesfera	Recuentos bacteriano suelo

	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						

Tabla 4: Modelo para recopilación de ensayos de encapsulación de bacterias en esferas de alginato.
Fuente elaboración propia.

Ensayos preliminares de caracterización de crecimiento bacteriano previo al encapsulado:

Los resultados de la caracterización del crecimiento muestran que en el caso de las cepas del departamento del Atlántico, de las 9 bacterias caracterizadas, 5 formaron biofilms, lo que dificultó la medición de su crecimiento en el lector de microplacas. En la figura 3, se muestran las curvas de crecimiento de aquellos aislamientos que no formaron biofilms (C2: C1NPC03; C3: C3HPC02; C4: C1HMA02; C7: C2HMA01; C8: C1TMA03), donde se observa que la cepa 7 tuvo un mejor crecimiento.

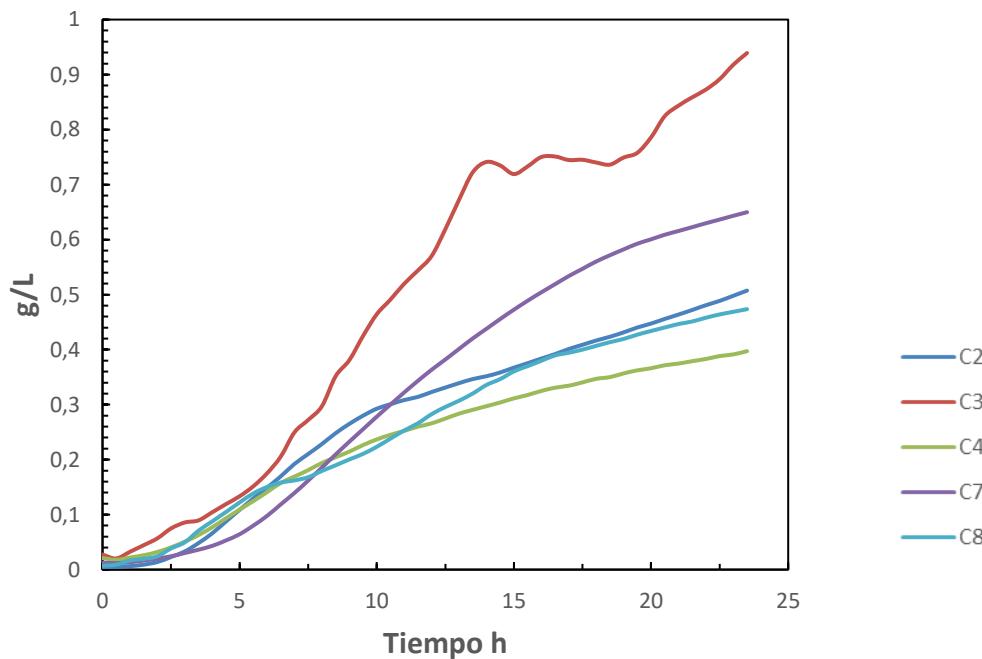


Figura 3: Curvas de crecimiento preliminares de bacterias no formadoras de biofilm aisladas del departamento del Atlántico en lector de microplacas. Fuente: Elaboración propia.

Las curvas de crecimiento de las cepas aisladas en el departamento del Magdalena se muestran en la figura 4. Del análisis de estas, se puede observar que los cuatro aislamientos mostraron perfiles del rápido crecimiento los cuales alcanzaron su fase exponencial antes de las 12 horas de cultivo, cuando el cultivo ha sido previamente activado en el mismo medio. De modo que partiendo de una OD₆₀₀= 0.2 se espera que antes de las 12 horas se haya alcanzado su máximo crecimiento.

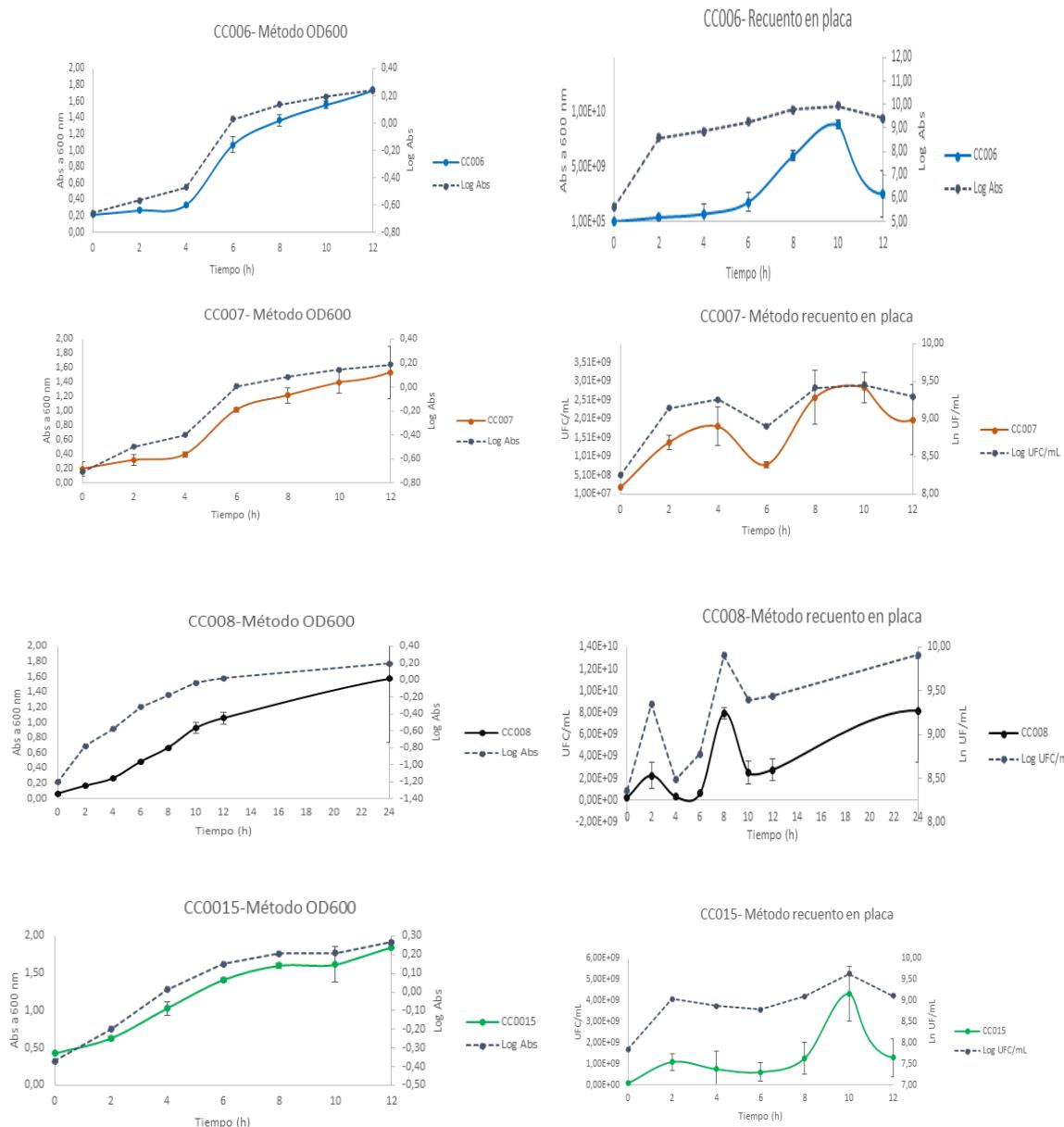


Figura 4. Curvas de crecimiento de bacterias aisladas en el departamento del Magdalena realizadas por recuento en placa y mediciones de absorbancia. Fuente: Elaboración propia.

Noviembre: Ensayos confirmatorios de tolerancia a la sequía de las cepas aisladas del departamento del Atlántico y preliminares de bacterias del departamento del Magdalena y ensayos iniciales de encapsulación.

Confirmación de tolerancia a la sequía de aislamientos del departamento del Atlántico

Después de llevar a cabo los ensayos, se determinó que ninguno de los cinco aislados poseía la capacidad de tolerar un 40% de PEG. No obstante, se observó tolerancias en concentraciones del 0%, 5%, 10%, y 20%, como se detalló en la tabla 5 de resultados. Destacó el aislado C3TMA3, que exhibió el mayor crecimiento 72 horas después de la inoculación con un 20% de PEG, alcanzando un valor de 0,743. En contraste, el aislado C1HMA02 mostró el menor crecimiento, presentando una diferencia significativa en comparación con el anterior. Los aislados C1NPC03, C2PLANTULAG02 y C3HPC02 registraron concentraciones de 0,468, 0,429 y 0,424 respectivamente (Figura 5).

Código de la cepa	0%	5%	10%	20%	30%	40%
C3HPC02	CT	CT	CT	T	CS	CS
C1HMA02	CT	CT	CT	T	-	CS
C3TMA03	CT	CT	CT	T	CS	CS
C1NPC03	CT	CT	CT	T	CS	CS
C2PLANTULAG02	CT	CT	CT	T	CS	CS

Tabla 5. Confirmación de la tolerancia al PEG a las 72 horas de las 5 bacterias endófitas de *Avicennia germinans* aisladas del departamento del Atlántico (Segunda replica). Completamente sensible (CS), sensible (S), tolerante (T) y completamente tolerante (CT). Fuente: Elaboración propia.

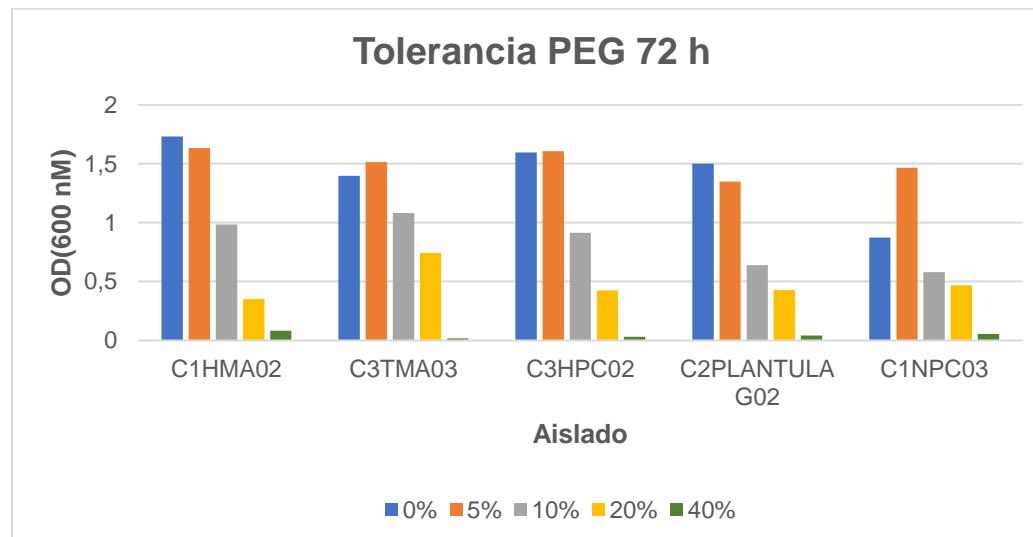


Figura 5. Absorbancias obtenidas de los ensayos de tolerancia al PEG a las 72 horas de las bacterias endófitas de *Avicennia germinans* aisladas del departamento del Atlántico (Segunda replica). Fuente: Elaboración propia.

Ensayo preliminar de tolerancia a la sequía (Bacterias del departamento del Magdalena):

A partir de los resultados preliminares se ha podido evidenciar que 2 de los aislamientos, específicamente CC007 y CC008, exhiben la capacidad de tolerar la concentración más elevada de PEG, tal como se detalla en la tabla 6 de resultados. Así mismo, cabe señalar que en los otros dos aislamientos CC006 y CC015 se observó un crecimiento incluso en presencia de concentraciones del 20% de PEG, como se refleja igualmente en la tabla 6.

Nombre de la cepa	0%	5%	10%	20%	40%
C1T-CT01 (CC006)	SI	SI	SI	SI	NO
C2T-CT01 (CC007)	SI	SI	SI	SI	SI
C1T-KM1901B (CC008)	SI	SI	SI	SI	SI
C1FCT01 (CC015)	SI	SI	SI	SI	NO

Tabla 6. Tolerancia al PEG a las 72 horas de las 4 bacterias endófitas de *Avicennia germinans* aisladas de manglares del departamento del Magdalena que toleran altas concentraciones de NaCl (>15%).

En la figura 6, se muestra el consolidado del número de bacterias resistentes a cada concentración del PEG.

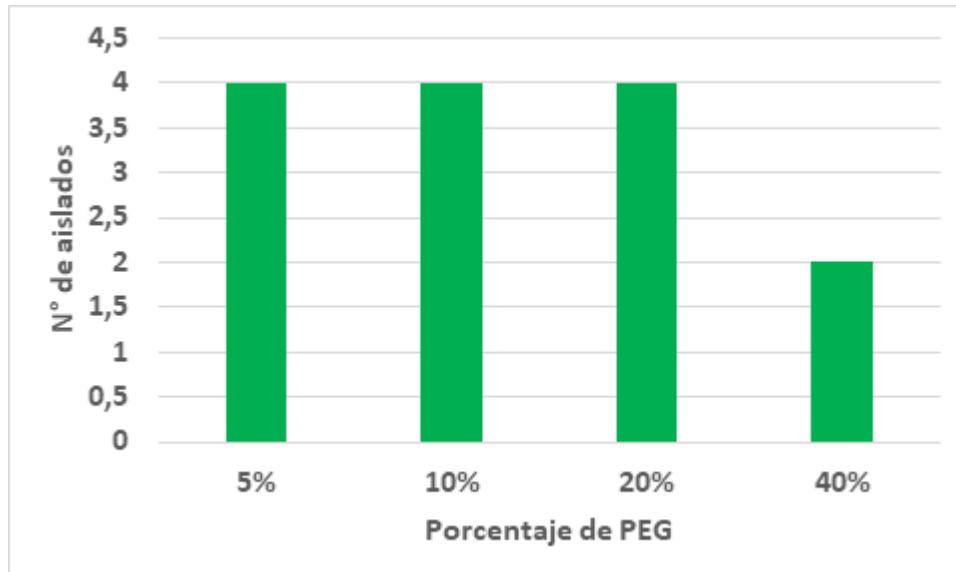


Figura 6. Número de aislados bacterianos endófitos de *Avicennia germinans* obtenidos de manglares del departamento del Magdalena seleccionados por resistir altas concentraciones de NaCl (>15%) tolerantes a distintas concentraciones PEG a las 72 horas.

Así mismo, se muestran los resultados del ensayo complementario de dos cepas de hongos tolerantes al cloruro de sodio aisladas de hojas y flores de *Avicennia germinans*. Se puede observar que en la medida que disminuye el aw de los medios (por la concentración de glucosa adicionada), el porcentaje de crecimiento relativo se reduce. La cepa CC020 (Figura 7) presenta crecimiento incluso a aw de

0.85% (concentración de glucosa del 60%), aunque este es inferior al 10% comparada con el medio control de aw >0.97 y en la cepa CC016 (Figura 8), el porcentaje de crecimiento relativo cae drásticamente, a menos del 10% en medios con aw de 0.93 (40% de glucosa). Ninguna de las cepas creció a concentraciones de glucosa del 70%.

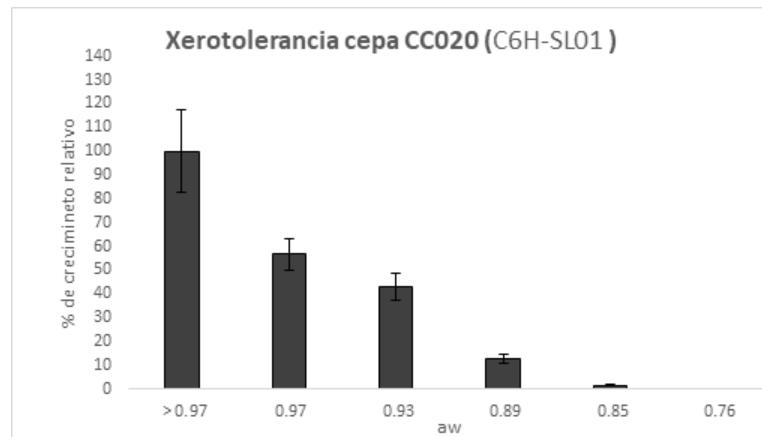


Figura 7. Porcentaje de crecimiento relativo de la CC020 procedentes de hojas de la especie de manglar *Avicennia germinans* del departamento del Magdalena a diferentes aw. Fuente: Elaboración propia.

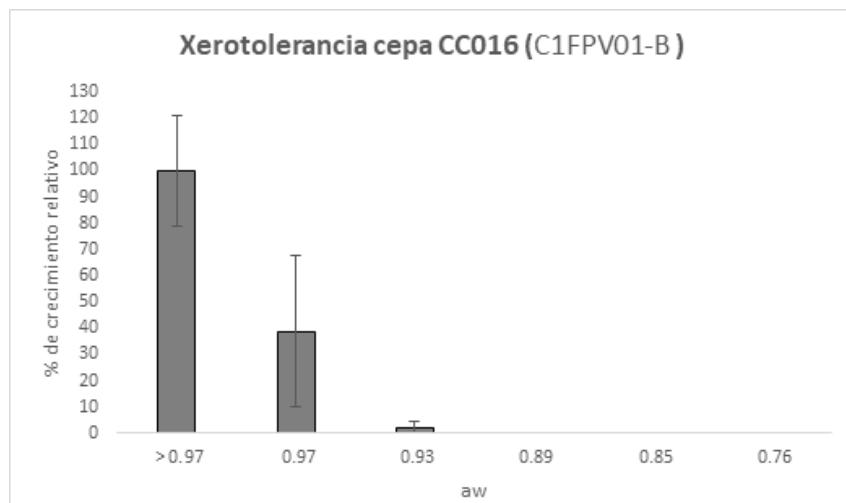


Figura 8. Porcentaje de crecimiento relativo de la CC016 procedentes de flores de la especie de manglar *Avicennia germinans* del departamento del Magdalena a diferentes aw. Elaboración propia.

Ensayos preliminares de encapsulamiento bacteriano:

Selección de las cepas:

Con base a los resultados obtenidos se determinó un orden de prioridad para el trabajo subsiguiente con los aislamientos, en especial para la realización de los encapsulamientos. En primera medida se descartaron dos cepas ambas identificadas como *Nocardia wallacei*. Posteriormente se le dio prioridad a la cepa más tolerantes inicialmente al PEG (40%), que fue *Bacillus safensis*, seguidas a las cepas resistentes al 20%. Dentro de estas se tuvieron en cuenta aquellas bacterias que cumplieran mayor cantidad de actividades de promoción de crecimiento y de antagonismos contra los hongos fitopatógenos. El proceso de selección y la prioridad se muestra en la tabla 7, donde aquellas de color verde se consideraron las más promisorias para su uso como bioinoculante.

Nº	Nombre de la bacteria	Código cepario	Promoción del crecimiento						Botrytis (%)	Alternaria (%)	Fusarium (%)
			Biofilm	FN	SF	SP	AP	AIA (μ g/ml)			
	<i>Nocardia wallacei</i>	C2 HMA01	No	-	-	-	+		20	10	27,7
5	<i>Bacillus altitudinis</i>	C1 HMA 02	No	-	+	-	+	1,007	20	12,5	62,5
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	C1 TMA03	No	+	-	-	+		0	7,5	22,2
2	<i>Bacillus tequilensis</i>	C3 TMA03	Si	+	-	-	+		20	8,75	36,1
3	<i>Priestia aryabhatai</i>	C3 HPC 02	No	+	+	-	+	0	20	40	14,06
1	<i>Bacillus safensis</i>	C1 NPC 03	No	+	+	-	+	4,625	20	6,25	57,8
	<i>Nocardia wallacei</i>										
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	C1 NG02	Si	+	-	-	-	1,664	40	6,25	0
4	<i>Bacillus halotolerans</i>	C2 PLANTULA G02	Si	+	-	-	+	1,928	20	52,5	71,87
	<i>Bacillus subtilis</i>	C4 PLANTULA G02	Si	+	-	-	+	1,664	20	50	67,1
											43,75

Tabla 7. Selección de cepas a encapsular de acuerdo con la capacidad de promoción de crecimiento vegetal, resistencia al PEC, actividad antagónica. Fuente: elaboración propia.

Producción de esferas de alginato y encapsulación bacteriana:

Los ensayos preliminares del encapsulamiento evidencian que fue posible la formación de esferas de alginato usando de cloruro de calcio y 1,25 % de alginato de sodio (Figura 9). Las primeras observaciones de las esferas obtenidas muestran que, al octavo día, las esferas elaboradas con alginato experimentaron una transformación significativa. Su tamaño se redujo de manera notable, alcanzando una disminución del 50% respecto a su estado inicial. Los primeros recuentos bacterianos muestran recuentos en el orden de 10^7 - 10^8 .



Figura 9: Microesferas de alginato producidas de acuerdo con el protocolo de encapsulamiento establecido. Fuente: elaboración propia.

Diciembre 2023: Ensayos finales de tolerancia a la sequía de bacterias del departamento del Magdalena y del Atlántico y ensayos finales de encapsulamiento

Ensayo confirmatorio cepas del departamento del Atlántico

Se evidenció un crecimiento bacteriano en los medios de cultivo con concentraciones del 0%, 5%, 10%, 20% y 30%, como se detalla en la tabla 8 de resultados. Destacaron especialmente los aislados C1NPC03, C1HMA02 y C2PLANTULAG02, gracias a su capacidad para prosperar incluso en concentraciones del 40% de PEG. Sin embargo, es importante señalar que su crecimiento fue mínimo en dicha concentración, atribuible a la absorbancia registrada por el espectrofotómetro (ver figura 10).

Código de la cepa	0%	5%	10%	20%	30%	40%
C3HPC02	CT	CT	CT	CT	CS	CS
C1HMA02	CT	CT	CT	CT	S	CS
C3TMA03	CT	CT	CT	CT	S	CS
C1NPC03	CT	CT	T	T	CS	CS
C2PLANTULAG02	CT	CT	CT	T	T	CS

Tabla 8. Confirmación de la tolerancia al PEG a las 72 horas de las 5 bacterias endófitas de *Avicennia germinans* aisladas del departamento del Atlántico (Tercera replica). Completamente sensible (CS), sensible (S), tolerante (T) y completamente tolerante (CT). Fuente: Elaboración propia.

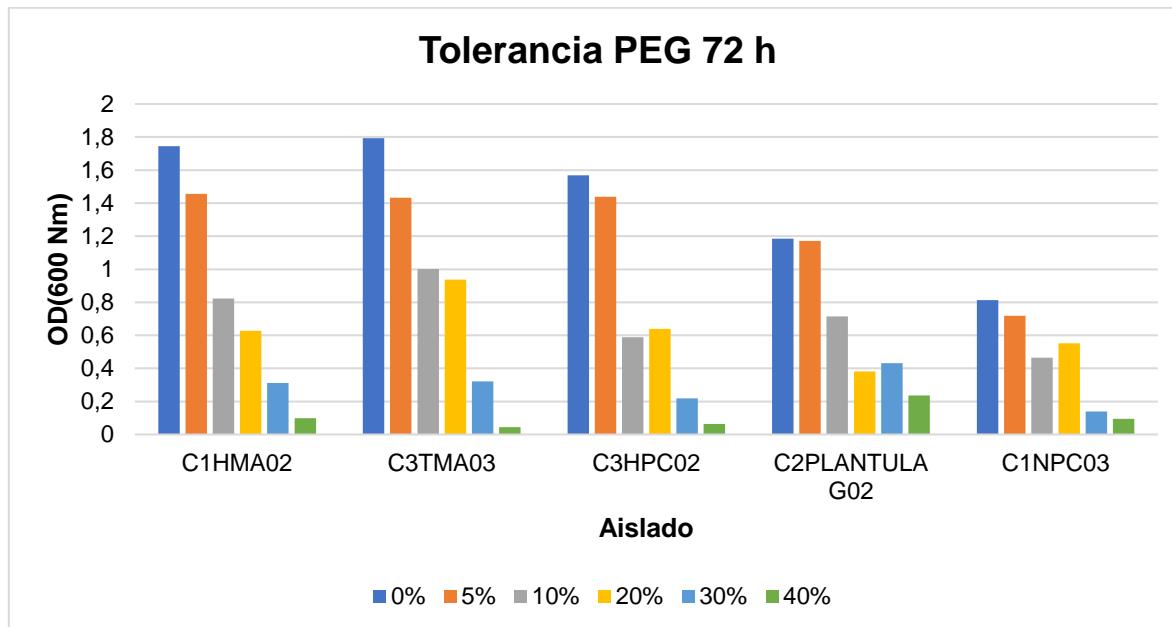


Figura 10. Absorbancias obtenidas de los ensayos de tolerancia al PEG a las 72 horas de las bacterias endófitas de *Avicennia germinans* aisladas del departamento del Atlántico (Tercera replica). Fuente: Elaboración propia.

Ensayo confirmatorio cepas del departamento del Magdalena.

En el caso del departamento del Magdalena, se completó el ensayo de tolerancia al PEG con todas las bacterias resistentes al NaCl por encima de 12%. De acuerdo con la tabla 9 y la figura 11, el número de aislados completamente sensibles al PEG, incrementan conforme incrementó la concentración de PEG en el medio de cultivo, 11 de los 18, fueron completamente sensibles al 20% y todos fueron completamente sensibles al 40% de PEG.

Código de la cepa	Código	0%	5%	10%	20%	40%
C2R-SL01_A	CC001	CT	CT	CT	CS	CS
C2R-SL01_B	CC002	T	S	CT	CS	CS
C4R-SL01_B	CC003	CT	CT	S	CS	CS
C3R-CT01-C	CC004	T	CT	S	CS	CS
C1T-CT01	CC005	CT	CT	CT	CS	CS
C2T-CT01	CC006	CT	CT	CT	CS	CS
C1T-KM1901B	CC007	CT	CT	CT	CT	CS
C1H-SL01	CC008	CT	CS	CS	CS	CS
C3H-SL01-B2	CC009	CT	T	S	CT	CS
C5H-SL01	CC010	T	CS	CS	CS	CS
C1H-PV01	CC011	CT	CT	T	S	CS
C2H-PV01	CC012	CT	CT	CT	CT	CS
C3H-PV01	CC013	CT	CT	S	S	CS
C1FPV01-B	CC014	CT	CT	CT	CS	CS
C1P-CT01-A	CC015	CT	CT	S	CS	CS
C2P-CT01-B	CC016	CT	CT	CT	CS	CS
C1N-SL01	CC017	S	CT	CT	S	CS
C6H-SL01	CC018	CT	CT	CT	T	CS

Tabla 9: Tolerancias obtenidas de los aislamientos bacterianos del departamento del Magdalena sometidos a diferentes concentraciones de PEG a las 72 horas. Completamente sensible (CS), sensible (S), tolerante (T) y completamente tolerante (CT). Fuente: Elaboración propia.

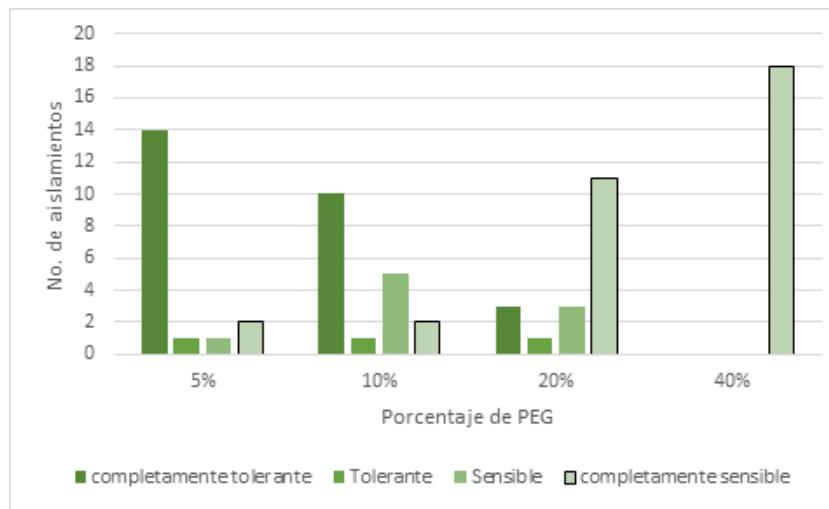


Figura 11. Número de aislamientos del departamento del Magdalena a diferentes grados de tolerancia al PEG ante distintas concentraciones. Fuente: elaboración propia.

Ensayos finales de encapsulamiento:

Se continuó con la realización de ensayos de degradación de las esferas de alginato a los tiempos de 13 y 24 días (figura 12), donde fue posible observar cambios morfológicos como su forma irregular, color mate, suelo adherido a la esfera y de la misma forma se observaron estas características en el día 24. Por su parte los recuentos microbianos de la cepa de *Bacillus tequilensis* después de la encapsulación fueron mayores a 10^8 en las tres repeticiones.

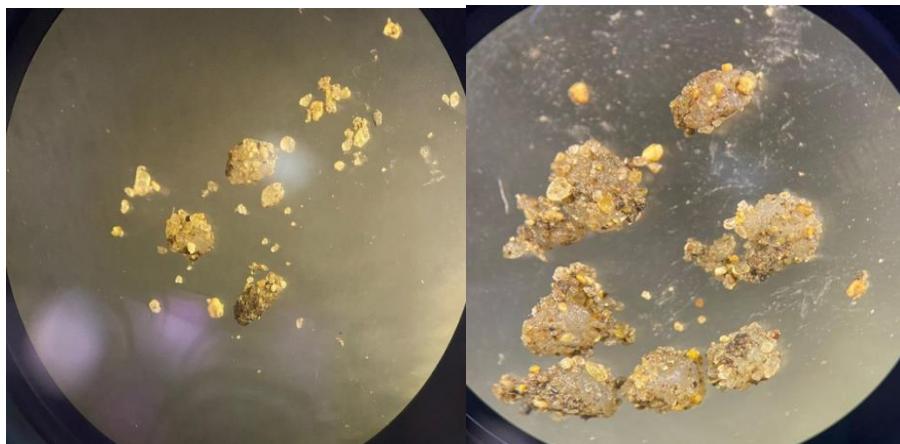


Figura 12: Observaciones de perlas de alginato como parte de los ensayos de biodegradación del suelo. Izquierda: 13 días y Derecha 24 días.

CONCLUSIONES

La metodología inicialmente propuesta para la determinación de la tolerancia a la sequía en bacterias tolerantes al NaCl (>15%), está acorde a los artículos recientes que evalúan este parámetro. Para un mayor seguimiento de la tolerancia a la sequía se definió realizar varias tomas de muestra a lo largo del tiempo para la medición de la OD. Se definieron algunos de los parámetros concretados para la prueba, dentro de los que se puede destacar: la OD del inoculo (0.2), el tiempo de incubación (72 h), los tiempos de toma de muestra (0, 24, 48 y 72 h).

La metodología inicialmente propuesta para la encapsulación bacteriana en perlas de alginato está acorde a los artículos recientes que desarrollan este procedimiento. Se definieron algunos de los parámetros concretados para la prueba de encapsulamiento, dentro de los que se puede destacar: concentración inicial del inoculo, concentración de alginato (1,15%), concentración de cloruro de calcio (2%), tiempo de agitación (30 minutos).

En relación con la capacidad de tolerancia a la sequía en función de la tolerancia a la concentración de PEG de las bacterias aisladas del departamento del Magdalena los datos más relevantes indican que los aislados CC007 Y CC008 mostraron una alta tolerancia, resistiendo a concentraciones de hasta el 40% de PEG. En el caso de cepas aisladas en el departamento del Atlántico los datos más predominantes señalan que todos los aislados exhibieron una notable capacidad de tolerancia a la

sequía, evidenciada por su resistencia a concentraciones del 20% de PEG, siendo, el aislado C3TMA3 el que demostró mayor crecimiento a esta concentración.

En relación con el crecimiento de las bacterias, algunas bacterias aisladas del departamento del Atlántico forman biofilm, lo que dificulta la medición de su crecimiento y además a futuro puede dificultar su cultivo en reactores. Dentro de las bacterias no formadoras de biofilm la cepa 7 (C2HMA01), fue la que obtuvo un mayor crecimiento. Las cepas aisladas del departamento del Magdalena tienen una máxima de crecimiento alrededor de las 12 horas.

Fue posible la formación de esferas usando cloruro de calcio al 2% y 1,25 % de alginato de sodio. La evaluación de la degradación de las esferas a lo largo del tiempo demostró que estas no se degradan; sin embargo, su estructura cambia a través de los días, sobre todo en lo relacionado con la reducción de su tamaño. Se realizó el proceso de encapsulación de las cepas *Bacillus safensis* (C1NPC03) y *Bacillus tequilensis* (C3TMA03) observándose que se mantenían viables después de dicho proceso. Además, se obtuvieron recuentos $>10^8$ UFC/ gr de esferas.

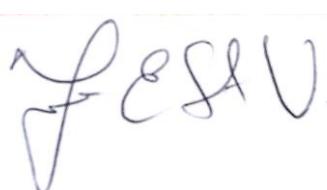
6. OBSERVACIONES

Ninguna

7. ANEXOS

- Anexo C1_Informe de resultados de pruebas de laboratorio de las bacterias seleccionadas con relación a la tolerancia a la sequía
- Anexo C2_Informe de Proceso de encapsulamiento de bacterias endófitas aisladas de tejido vegetal procedente de la especie de mangle *Avicennia germinans* para su uso como inoculante biológico.

Evidencias: https://unisimonedu-my.sharepoint.com/personal/miglesias1_unisimon.edu.co/_layouts/15/onedrive.aspx?login_hint=maria%2Eiglesias%40unisimon%2Edu%2Eco&id=%2Fpersonal%2Fmiglesias1%5Funisimon%5Fedu%5Fc%2FDocuments%2FEcosistemas%20Marinos%20Costeros%2FInformaci%C3%B3n%20general%2FActividades%2FDocumentos%20actividad%201%2E2%2E1%2FModelo%20de%20informes&view=0

Elaboró	
----------------	--



	Zamira Elena Soto Varela.
Revisó	María Auxiliadora Iglesias
Aprobó	María Auxiliadora Iglesias