

**María E. Berrio<sup>1,2\*</sup>, Sixta L. Palencia<sup>1,3</sup>, Tulio A. Lerma<sup>1,2\*</sup>, Mayra A. Mora<sup>1,2</sup>**

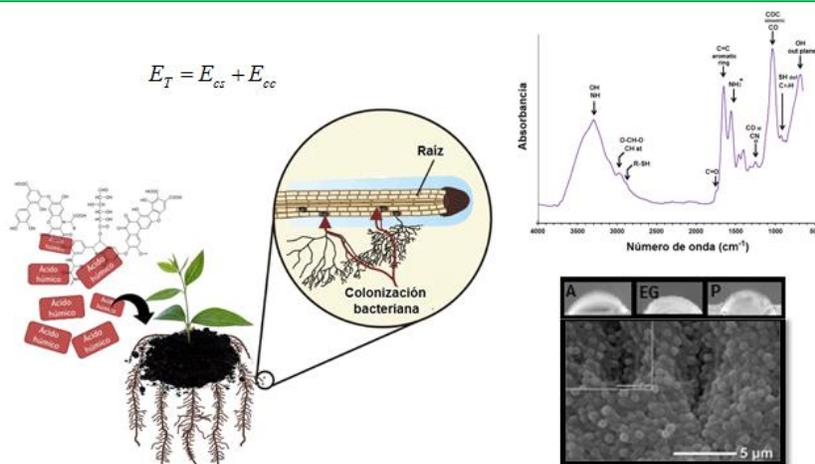
<sup>1</sup> Mindtech Research Group (Mindtech-RG), Mindtech S.A.S., Cali – Colombia

<sup>2</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali – Colombia

<sup>3</sup> Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción - Chile

Corresponding author: [maria.berrio@correounivalle.edu.co](mailto:maria.berrio@correounivalle.edu.co)

**Graphical abstract**



**Colonización bacteriana sobre partículas del suelo: efecto de los ácidos húmicos en la formación de biopelículas de bacterias fijadoras de nitrógeno**

**Resumen**

Se ha demostrado que los factores físicos, químicos y biológicos del suelo afectan la colonización de la raíz, pero los mecanismos detallados asociados con la colonización adecuada de la raíz y los microorganismos no se conocen por completo. Se necesitan estudios cuantitativos sobre la distribución de colonias de raíces en el tiempo y el espacio para desarrollar modelos matemáticos que describan y predigan el proceso de colonización de las raíces; siendo un factor importante, conocer el efecto de las fracciones inorgánicas y orgánicas de los suelos sobre la capacidad de los microorganismos para formar estas colonias. Aquí se describe una metodología para el estudio de la interacción entre microorganismos y superficie y se muestra su aplicación para el estudio de la descripción de la interacción y el mecanismo de colonización entre bacterias fijadoras de

**Palabras claves**

Espectroscopia de IR  
Bacteria fijadora de nitrógeno  
Sustancias húmicas  
Biopelícula

nitrógeno y partículas de suelos, se presta especial atención al efecto de la humificación sobre formación de biopelículas. Para esto, los ácidos húmicos se extrajeron de dos tipos de muestras de suelo y se caracterizaron por espectroscopía de infrarrojo con Transformada de Fourier acopado a Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) y ángulo de contacto (AC). Las sustancias húmicas se depositaron sobre celulosa previamente activada con marcador espectral para el infrarrojo medio y se caracterizaron nuevamente. Posteriormente, la bacteria *Azotobacter chroococcum* (bacteria fijadora de nitrógeno) se depositó en la superficie por contacto directo. Las superficies finales fueron analizadas por ATR y AC. Los resultados sugieren que es necesario analizar diferentes superficies para describir varios mecanismos asociados con la naturaleza de estos a través del uso de técnicas instrumentales y modelos fisicoquímicos con especial énfasis en las interacciones superficiales, lo que lo convierte en una herramienta prometedora para la descripción del proceso de colonización microbiana de suelos.

## Bacterial colonization modelling on soil particles: Effect of humic acids on the formation of nitrogen-fixing bacteria biofilms

### Abstract

Soil physical, chemical, and biological factors have been shown to affect root colonization, but the detailed mechanisms associated with the adequate colonization of root and microorganisms are not completely understood. Quantitative studies on the distribution of root colonies in time and space are needed to develop mathematical models that describe and predict the root colonization process; being a important factor, to know the effect of inorganic and organic fractions of soils on the ability of microorganisms to form these colonies. Here a methodology to the study of interaction between microorganisms and surface is described and its application for the study of the description of interaction and colonization mechanism between nitrogen-fixing bacteria and particle of soils is shown, special attention is directed toward the effect of humic acids on formation of biofilms. For this, humic acids was extracted from two types of soil samples and characterized by Infrared spectroscopy with Fourier Transform coupled to Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) and contact angle (AC). Humic substances were deposited on cellulose previously activated with spectral marker for the mid-infrared and anew characterized. Later, the bacterium *Azotobacter chroococcum* (nitrogen-fixing bacterium) was deposited on the surface by direct contact. End surfaces were analyzed by FTIR-ATR, and AC. The results suggest that it is necessary to analyze different surfaces in order to describe several mechanisms associated with the nature of this through the use of instrumental techniques and physicochemical models with special emphasis on surface interactions, which makes this a promising tool for description of the process of microbial colonization of soils.

### Keywords

Infrared spectroscopy  
Nitrogen-fixing bacteria  
Humic substances  
Biofilm

Received: 08-03-2018

Accepted: 02-07-2018

Publishing date: 15 - November - 2018

Revision Code: 20160908-MSP (Pag. 33-44)

Corresponding author:

[maria.berrio@correounivalle.edu.co](mailto:maria.berrio@correounivalle.edu.co)

## **Colonización bacteriana sobre partículas del suelo: efecto de los ácidos húmicos en la formación de biopelículas de bacterias fijadoras de nitrógeno**

**María E. Berrio<sup>1,2\*</sup>, Sixta L. Palencia<sup>1,3</sup>, Tulio A. Lerma<sup>1,2\*</sup>, Mayra A. Mora<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Mindtech Research Group (Mindtech-RG), Mindtech S.A.S., Cali – Colombia

<sup>2</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali – Colombia

<sup>3</sup> Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción - Chile

Corresponding author: [maria.berrio@correounivalle.edu.co](mailto:maria.berrio@correounivalle.edu.co)

### **Resumen**

Se ha demostrado que los factores físicos, químicos y biológicos del suelo afectan la colonización de la raíz, pero los mecanismos detallados asociados con la colonización adecuada de la raíz y los microorganismos no se conocen por completo. Se necesitan estudios cuantitativos sobre la distribución de colonias de raíces en el tiempo y el espacio para desarrollar modelos matemáticos que describan y predigan el proceso de colonización de las raíces; siendo un factor importante, conocer el efecto de las fracciones inorgánicas y orgánicas de los suelos sobre la capacidad de los microorganismos para formar estas colonias. Aquí se describe una metodología para el estudio de la interacción entre microorganismos y superficie y se muestra su aplicación para el estudio de la descripción de la interacción y el mecanismo de colonización entre bacterias fijadoras de nitrógeno y partículas de suelos, se presta especial atención al efecto de la humificación sobre formación de biopelículas. Para esto, los ácidos húmicos se extrajeron de dos tipos de muestras de suelo y se caracterizaron por diferentes técnicas. Las sustancias húmicas se depositaron sobre celulosa previamente activada con un marcador espectral para el infrarrojo medio y se caracterizaron nuevamente. Posteriormente, la bacteria *Azotobacter chroococcum* se depositó en la superficie por contacto directo. Los resultados sugieren que es necesario analizar diferentes superficies para describir varios mecanismos asociados con la naturaleza de estos a través del uso de técnicas instrumentales y modelos fisicoquímicos con especial énfasis en las interacciones superficiales, lo que lo convierte en una herramienta para la descripción del proceso de colonización microbiana de suelos.

### **Palabras Claves**

Espectroscopia de infrarrojo  
Bacteria fijadora de nitrógeno  
Sustancias húmicas  
Biopelícula

### **1. Introducción**

El suelo es la primera capa terrestre, que forma un sistema de tres fases que se utiliza como apoyo para el crecimiento vegetativo, el suministro de agua, el crecimiento de plantas y alimentos, y como hábitat de organismos vivos. La proporción en que todos estos componentes se encuentran en

el suelo, confieren diferentes propiedades, tanto físicas, como químicas y biológicas. En especial, las propiedades biológicas están relacionadas con la actividad microbiana y faunística en el suelo; en particular las bacterias, las cuales son los microorganismos más numerosos del suelo y tienen como función principal la nitrificación, la oxidación del azufre y la fijación de nitrógeno en

el suelo, entre otras funciones. En este caso, una de las especies bacterianas encargadas del proceso de fijación de nitrógeno son las *Azotobacter*, las cuales, a falta de interacción simbiótica con la planta, forman un sistema protector a partir de la liberación de adhesinas y la formación de una matriz polimérica, lo que les permite adherirse a la superficie en contacto y en consecuencia, formar colonias bacterianas y biopelículas sobre las raíces [1]. Sin embargo, actualmente no se ha estudiado la distribución de colonias bacterianas en las raíces en el tiempo y el espacio. Por lo tanto, es necesario desarrollar modelos matemáticos que describan y predigan el proceso de colonización bacteriana sobre las raíces; siendo un factor importante, conocer el efecto de las fracciones inorgánicas y orgánicas de los suelos sobre la capacidad de los microorganismos para formar estas colonias. De acuerdo a lo anterior, en esta investigación se describe una metodología para el estudio de la interacción entre microorganismos y superficies; entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y las partículas del suelo, centrándose en el efecto de los ácidos húmicos en la formación de biopelículas.

## 1.2 Teoría del método

La colonización bacteriana requiere mecanismos de adherencia que permitan establecer un sistema de protección que proporcione al microorganismo características de adaptabilidad y resistencia a agentes químicos y externos. Esta adherencia se debe principalmente a la afinidad del microorganismo hacia la superficie para colonizar y a la capacidad de formar biopelículas. Estas conformaciones pueden ocurrir debido a adhesiones reversibles o irreversibles, a través de diversos procesos de interacción a nivel de la superficie y la secreción de exopolímeros generalmente denominados adhesinas.

La estructura de la biopelícula depende del tipo de bacteria involucrada y del ambiente en el que se encuentra inmersa, presentando interacciones cohesivas; que están relacionadas con interacciones físico-químicas entre bacterias, e interacciones adhesivas; que incluyen interacciones físico-químicas con superficies e interfases [1,2]. Por lo tanto, la formación de biopelículas puede ser expresada a través de un método bioanalítico semi-empírico, que incluye una contribución teórica (modelo desarrollado en investigaciones previas

[3]) y experimental, teniendo en cuenta la estructura celular (tipo y morfología de bacteria) y naturaleza de la superficie en términos de funcionalidad, rugosidad, energía superficial y la relación entre la hidrofobicidad y la hidrofiliidad. De esta manera, el sistema superficie-célula-entorno tiene una energía de superficie total ( $E_T$ ) dada por la contribución de las energías de cada subsistema que lo comprende: (energía interfacial del subsistema célula-célula ( $E_{cc}$ ) y subsistema de superficie-célula ( $E_{cs}$ )), como se describe en la ecuación 1.

$$E_T = E_{cs} + E_{cc} \quad (1)$$

A partir de la teoría de XDLVO [5,6] y en el modelo semi-empírico del biofilm dado por las ecuaciones 1 y 2, se describen los procesos de formación de biofilm bacteriano.

$$E_T = 2s\gamma_{cs} + \frac{3s\Delta y\gamma_{cc}}{r_c} \quad (2)$$

Donde  $\gamma_{cs}$  y  $\gamma_{cc}$  son las energías libres en  $\text{mJ}/\text{m}^2$  de las interfaces célula-soporte y célula-célula, respectivamente. Además,  $r_c$  es el radio de la célula bacteriana celular, y  $\Delta y_{\text{biopelícula}}$  es el espesor de la biopelícula [3,7].

## 2. Sección experimental

### 2.1 Reactivos y materiales

(NaOH, Aldrich, USA) y (HCl, Aldrich, USA) fueron usados para la extracción de las sustancias húmicas. Etilenglicol (Merck, Alemania) y 1,3-propanodiol (Aldrich, Alemania) fueron usados en las mediciones de ángulo de contacto. Caldo de tripticosa soya, Agar Müller-Hinton (Aldrich, USA) usados para el crecimiento bacteriano.

### 2.2 Caracterización del suelo

Dos tipos de suelo (S1 y S2) se seleccionaron y caracterizaron físico-químicamente. Por el método de Walkley-Black proporción de agua (1: 1) con el objetivo de conocer su Porcentaje de Materia Orgánica (% MO), por el método de Bouyoucos para conocer información sobre su textura, por espectroscopia FTIR-ATR (IR-Affinity-1) para la

identificación de grupos funcionales y mediante mediciones de pH del suelo [8,9].

### 2.3 Extracción de ácidos húmicos (AHs)

Inicialmente, los suelos  $S_1$  y  $S_2$  fueron lavados por ciclos de 24 horas usando agua destilada, para separar la materia orgánica humificada (MOH) de la materia orgánica libre o no humificada (MOL). Para esto, se prepararon suspensiones de cada uno de los suelos en una relación 1:5 suelo/agua y se sometieron a un proceso de agitación magnética constante. Luego, estas suspensiones fueron filtradas y lavadas con agua destilada, individualmente. Los sólidos obtenidos correspondientes a la HOM, fueron secados a 40°C utilizando un horno de flujo de calor durante 12 horas. Posteriormente, la MOH de los suelos se llevó a pH 10 utilizando una solución básica (NaOH 0,1M) manteniendo agitación durante 1 hora. Posteriormente fue centrifugada (30 min a 3000 rpm) con el objetivo de mejorar la separación de los ácidos húmicos (AH) y fúlvicos (AF). Finalmente, los AH se extrajeron por precipitación utilizando una solución ácida (HCl 0,1 M) hasta alcanzar un pH de 2. La acidificación se realizó mediante 3 ciclos para obtener la mayor cantidad posible de sustancias húmicas extraíbles, las cuales se lavaron usando agua destilada y se secaron a 40 °C usando un horno de flujo de calor. Finalmente se caracterizaron por FTIR-ATR [10].

### 2.4 Formación de capas de AHs

Se utilizó un soporte de celulosa activa (CA) con un marcador espectral incorporado, obtenido mediante la metodología descrita en [3], sobre el cual se depositaron los AHs extraídos de los diferentes suelos (sección 2.3). Para ello, se puso en contacto una solución de HA en acetona (5,2 g/mL) con 1,0 cm<sup>2</sup> del soporte de CA durante 5 horas. Posteriormente se procedió a evaporar el solvente en una campana de flujo laminar y finalmente las superficies modificadas (SM) se secaron a 40 °C y analizaron mediante ángulo de contacto (AC) y FTIR-ATR.

### 2.5 Formación de la biopelícula

Se inocularon cepas bacterianas de *Azotobacter chroococcum* a partir de cultivo celular estanda-

rizado (0,5 UFC McFarland en caldo tripticasa soya) en medio de crecimiento sólido (agar Müller-Hinton) durante 24 horas a 30 °C, formando una superficie homogénea.

La morfología y tamaño de las células fue evaluada por microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Posteriormente, el cultivo bacteriano se puso en contacto directo con las superficies modificadas y se llevó a cabo la incubación durante 12 horas a 30 °C. Finalmente, las biopelículas formadas (BFs) se caracterizaron por AC y FTIR-ATR.

### 2.5 Aplicación del modelo

El modelo semiempírico, requiere una contribución proveniente de las características celulares y de la superficie con la cual entran en contacto. Para ello, es necesario obtener los parámetros de cada contribución; por lo cual; se determinaron las componentes de energía superficial y a partir de mediciones de ángulo de contacto, el área superficial total de las células de la biopelícula a partir de mediciones por MO y SEM y el espesor de la biopelícula  $\Delta y_{\text{biopelícula}}$ , mediante FTIR-ATR.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1 Caracterización físico-química

Se analizaron dos suelos de diferentes regiones colombianas. El primero proveniente del sur del país en el territorio del Valle del Cauca, donde la principal actividad agroeconómica e industrial se basa en el cultivo de la caña de azúcar. Y el segundo proveniente del norte del país en el territorio de Córdoba, en el que la principal actividad agroeconómica e industrial se basa en el ganado, el algodón y el maíz. Las propiedades físico-químicas de estos suelos fueron analizadas arrojando los resultados que se muestran en la Tabla 1. Se observaron valores de pH entre  $6.6 \leq \text{pH} \leq 7.5$  para ambos suelos, que indican características de neutralidad y condiciones adecuadas para la asimilación de nutrientes y el desarrollo adecuado de las plantas que crecen en dicho suelo. Adicionalmente, la actividad de la mayoría de los microorganismos se ve afectada en ambientes ácidos; en el caso de *Azotobacter chroococcum*, su actividad fijadora de nitrógeno se lleva a cabo gracias al complejo enzimático de la

nitrogenasa, que aumenta su actividad a valores de pH cercanos a la neutralidad y disminuye a valores de pH bajos. Por lo que estos resultados sugieren que los suelos estudiados aquí presentan un rango de pH óptimo para el crecimiento y el funcionamiento de este microorganismo [11-13].

En cuanto a la materia orgánica presente en estos suelos, se observaron los niveles más bajos en los suelos vallecaucanos (0,97 %) como consecuencia del manejo agrícola de la región, donde se presenta fertilización excesiva, falta de secuenciación y rotación de cultivos. Mientras que, para el suelo cordobés, se encontraron niveles más altos de MO (2,73 %) debido a la no utilización de monocultivos en esta región [12,14].

Finalmente, la composición granulométrica del suelo, evidenció que el suelo 1 presenta una textura franco-arcillosa, mientras que el suelo 2 posee una textura arcillosa. Esto indica que tienen menos facilidad para modificar su pH, lo cual es importante ya que de esta manera poseen un fuerte poder tampón [12].

### 3.2 Caracterización por FTIR-ATR

Los espectros de infrarrojo de la celulosa activa y biopelícula formada sobre la superficie de este sustrato con los ácidos húmicos obtenidos del suelo 1 y 2 (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>), se muestran a la izquierda de la Figura 1, donde se observa una banda entre 3500-3200 cm<sup>-1</sup> que corresponde a la vibración de tensión característica de los grupos OH y NH en el soporte de CA, entre 3000-2800 cm<sup>-1</sup> bandas de

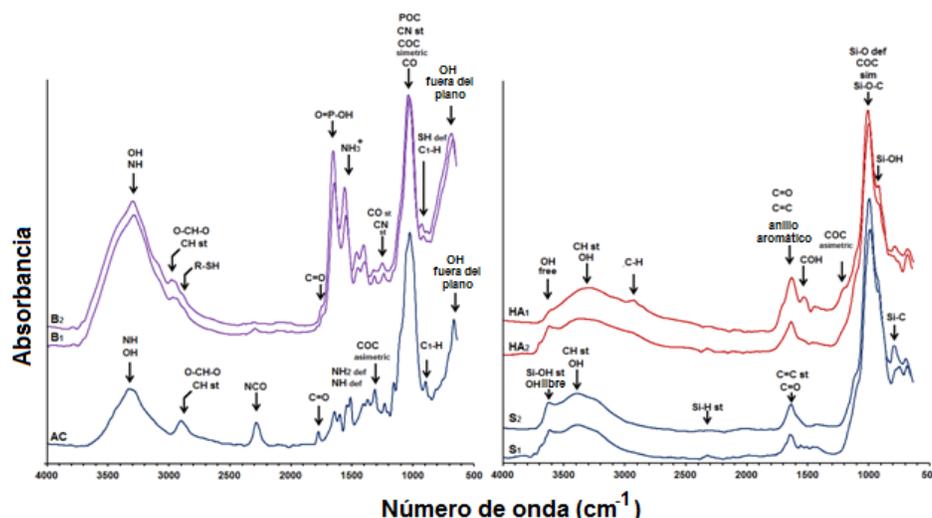
**Tabla 1.** Propiedades físico-químicas de los suelos; pH, MO (%) y textura de los dos tipos de suelo estudiados.

Suelo	pH	O.M (%)	Textura
S <sub>1</sub>	7,47	0,97	Franco-arcilloso
S <sub>2</sub>	6,74	2,73	Arcilloso

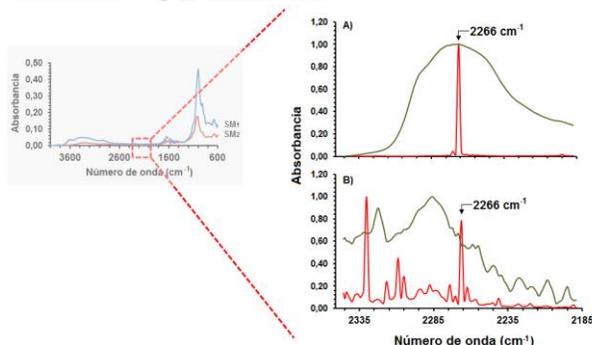
\*S<sub>1</sub>: suelo 1 (origen vallecaucano), S<sub>2</sub>: suelo 2 (origen cordobés)

vibración de tensión de los enlaces C-H y grupos acetal (O-CH-O), alrededor de 2400-2200 cm<sup>-1</sup> se observan vibraciones para grupos isocianato (N-C-O) provenientes de CA. Entre 1700-1800 cm<sup>-1</sup>, se encuentran las bandas de vibración de tensión de los grupos carbonilo (C=O) características de los ésteres presentes en soporte de la celulosa activa. Además, dos señales están presentes entre 1300-1200 cm<sup>-1</sup> y 1100-1000 cm<sup>-1</sup>, correspondientes a las bandas de vibración asimétrica y simétrica respectivamente, características del enlace glicosídico (C-O-C) característico de los soportes celulósicos.

Finalmente, en la región entre 1000-900 cm<sup>-1</sup> la banda que se observa es atribuida a la vibración de los enlaces entre el carbono anomérico y el hidrógeno (C<sub>1</sub>H) presentes en la celulosa [15,16]. Por su parte, el espectro para las biopelículas formadas mostró señales adicionales a las encontradas en el soporte; entre 3000-2800 cm<sup>-1</sup> para las vibraciones de tensión simétricas y asimétricas de los enlaces C-H de los ácidos grasos presentes en la pared celular, entre 3500-3200 cm<sup>-1</sup> para el estiramiento del enlace del grupo hidroxilo -OH y NH de las proteínas.



**Figura 1.** Espectro FTIR-ATR. Izquierda: CA) celulosa activa, B<sub>1-2</sub>) biopelícula formada sobre superficie modificada utilizando ácidos húmicos del suelo 1 y 2. Derecha: S<sub>1-2</sub>) suelo 1 and 2, AH<sub>1-2</sub>) ácidos húmicos del suelo 1 y 2 respectivamente.



**Figura 2.** Espectros de infrarrojo para: derecha: superficies modificadas con ácidos húmicos provenientes de los suelos 1 y 2 (SM<sub>1</sub> y SM<sub>2</sub>), izquierda: espectros FEDS para A) CA y B) SM en la región de análisis 2185-2345 cm<sup>-1</sup>.

En la región de 1800-1700 cm<sup>-1</sup> se encontraron señales características de los grupos C=O de ésteres y grupos carboxilo, presentes en las estructuras secundarias de las proteínas (amidas I y II). Finalmente, en la región de 1700-1600 cm<sup>-1</sup> y 1050-900 cm<sup>-1</sup>, se encuentran bandas de vibración de los enlaces de grupos fosfatados O=P-OH y P-O-C respectivamente, presentes en las endotoxinas, fosfolípidos y proteínas de la superficie celular bacteriana.

Por otro lado, los espectros infrarrojos de suelos y AHs se muestran a la derecha de la Figura 1, se observa alrededor de 3500-3200 cm<sup>-1</sup> la vibración de los enlaces OH libres y las vibraciones de estiramiento de Si-OH debido a la presencia de arcillas. Además, entre 1100-1000 cm<sup>-1</sup>, 900-800 cm<sup>-1</sup>, 1100-1000 cm<sup>-1</sup> y 1300-1200 cm<sup>-1</sup>, se observa la vibración de deformación, vibración simétrica y asimétrica de Si-OH y SiOC, Si-OH, C-O-C respectivamente. Finalmente, para los ácidos húmicos, se observa la vibración alrededor de 1715 cm<sup>-1</sup>, 1630 cm<sup>-1</sup> y 1200 cm<sup>-1</sup> debida al estiramiento de los grupos carbonilo y cetónico, a los enlaces C=C presentes en anillos aromáticos, y al estiramiento de los enlaces C-O de los fenoles y éteres, respectivamente [17].

Los AHs al contener gran cantidad de grupos hidroxilo, su reactividad frente a la superficie de celulosa activa con grupos isocianato libres en ella, se hace evidente. Por tanto, la intensidad de las señales características otorgadas al marcador espectral (2266 cm<sup>-1</sup>) se ven disminuidas e imperceptibles en los espectros de infrarrojo convencionales para las SM (ver Figura 2).

### 3.3 Caracterización superficial y desarrollo de los parámetros de entrada

**3.3.1 Ángulo de contacto y energía superficial, componentes ( $\gamma_{cs}$  y  $\gamma_{cc}$ ).** Cada una de las imágenes de la Figura.3 fue empleada para la medición del carácter hidrófilo-hidrófobo de las superficies iniciales y modificadas y del biofilm formado. Para esto, se depositó una gota de tres líquidos estándar con diferente polaridad (agua (W), 1,3-propanodiol (PD) y etilenglicol (EG)) y se determinó el ángulo de contacto de Young (teta  $\theta$ , ver Tabla 2) entre la superficie y el líquido. De acuerdo a los resultados reportados en la Tabla 2, se observa un fuerte carácter hidrófobo de las superficies activas, dado por los ángulos altos ( $\theta \sim 90^\circ$ ) utilizando agua como disolvente, y ángulos menores a medida que disminuye la polaridad del disolvente (etilenglicol, seguido de 1,3-propanodiol). Además, se observa un aumento en el ángulo de contacto en las superficies luego de la modificación con los ácidos húmicos; estas moléculas orgánicas son estabilizadas principalmente por interacciones hidrófobas y enlaces de hidrogeno, lo que le proporciona características hidrofílicas a las SM.

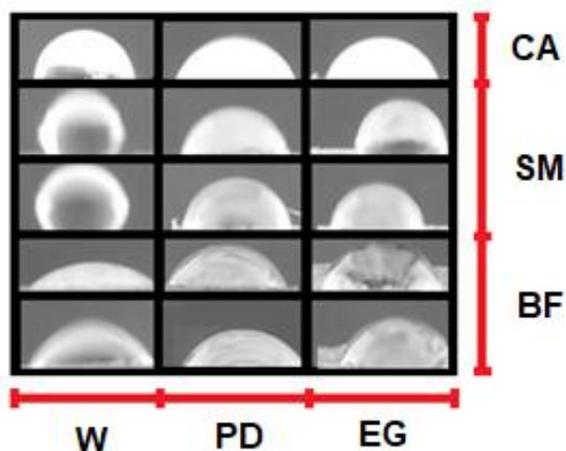
Mientras que, para las biopelículas formadas en dichas superficies, se observan ángulos mayores a medida que disminuye la polaridad del solvente, lo que sugiere que la superficie de la biopelícula formada muestra una tendencia hidrofílica.

**Tabla 2.** Medidas de ángulo de contacto con agua (W), 1,3-propanodiol (PD) y etilenglicol (EG) para celulosa activa (AC), superficie modificada (MS) con ácidos húmicos del suelo 1 y 2 y biofilm formado sobre MS<sub>1-2</sub> (BF<sub>1</sub> y BF<sub>2</sub>).

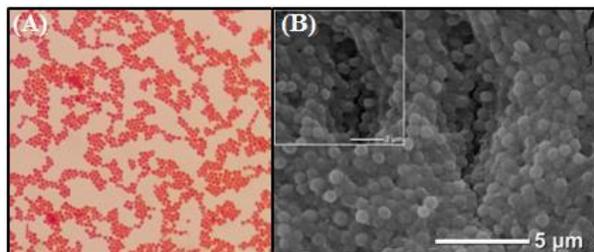
	Ángulo de contacto de Young $\theta$ (°)				
	AC	MS <sub>2</sub>	BF <sub>1</sub>	MS <sub>1</sub>	BF <sub>2</sub>
W	73,37±2,03	85,18±1,33	46,19±5,27	83,58±0,48	43,30±1,11
PD	51,95±3,34	66,01±2,80	59,10±4,09	66,86±1,04	64,43±4,97
EG	56,86±3,24	66,80±2,73	56,75±1,74	72,89±5,54	59,56±0,37

**Tabla 3.** Componentes polares, no polares, y total para cada solvente utilizado, y energías superficiales para cada superficie; CA, SM y BF.

Solvente	$\gamma_{i,r}^+$	$\gamma_{i,r}^-$	$\gamma_{i,r}^{AB}$	$\gamma_{i,r}^{lw}$	$\gamma_{i,r}^{total}$	Superficie	$\gamma_s^{tot}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	
							Componente de suelo 1	Componente de suelo 2
							(mJ/m <sup>2</sup> )	
W	34,2	19,0	51	21,9	72,9	CA	0,26 ± 0,86	
PD	3,3	34,1	21,2	6,8	28	SM	1,12 ± 0,76	0,86 ± 0,71
EG	2,6	34,8	19,0	29,0	48,0	BF	0,32 ± 0,46	0,67 ± 0,21



**Figura 3.** Imagen de ángulo de contacto con agua (W), 1,3-propanodiol (PD) y etilenglicol (EG) para celulosa activa (CA), superficie modificada (SM) con ácidos húmicos del suelo 1 y 2, y BF sobre MS<sub>1-2</sub>.



**Figura 4.** Imágenes mediante microscopía óptica (A) y electrónica (B) de *Azotobacter chroococcum*.

Estos resultados demuestran una buena adhesión bacteriana en superficies hidrófobas. En congruencia con esto, los estudios han encontrado que en superficies rugosas la colonización microbiana aumenta ya que las fuerzas de deslizamiento se reducen y la estructura de la biopelícula formada se mantiene estable [18].

A partir de los resultados de ángulo de contacto (ver Tabla 2) y de los componentes polares (ácido  $\gamma^+$  y base  $\gamma^-$ ) y no polares o dispersivos ( $\gamma^{lw}$ ) de

los solvente de prueba registrados en la literatura [3,19] se obtiene los valores de la energía superficial total de cada una de las superficies modificadas y las biopelículas formadas sobre ellas (Tabla 3). Es posible observar un aumento en  $\gamma_s^{tot}$  para cada una de las SM obtenidas, dada probablemente por el aumento de la rugosidad superficial, lo que conduce a sustratos con un área de superficie mayor, la reducción de las fuerzas de deslizamiento en la superficie y mayor susceptibilidad a la formación de biopelículas bacterianas en ellas. Sin embargo, se aprecia un incremento de energía superficial para las SM<sub>1</sub> mayores con respecto a SM<sub>2</sub>, indicando una buena mojabilidad y fuerte afinidad a adherir sustancias sobre ellas con el objetivo de mantener un estado de mínima energía.

### 3.3.2 Determinación del área superficial total de las células de la biopelícula ( $r_c$ )

Las células de *Azotobacter chroococcum* se caracterizan por ser bacterias Gram-negativas, y tener una morfología pleomórfica, variando su forma desde bacilos hasta células en forma cocoide en distribuciones celulares individuales, pares o formando agregados irregulares [20]. Para la determinación del área celular total de cepas bacterianas de *A. chroococcum*, se realizó aproximación geométrica mediante Microscopía óptica (MO, con el objetivo de obtener información sobre la estructura celular y verificar la pureza de las colonias mediante tinción de Gram) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, para determinar la morfología y cuantificar el radio de las células). De acuerdo a las imágenes de MO y SEM, se logró identificar una morfología en forma de cocos (Figura 4), permitiendo estimar una geometría esférica con un diámetro celular de aproximado de 0,78 µm [20].

**Tabla 5.** Espesor de biopelícula y energía superficial total para las BFs

$\lambda(m) = 4,42 \times 10^{-6}$	$\Delta Y_{biopelícula} (m) \times 10^{-7}$	$E_T (mJ) \times 10^{-3}$
BF <sub>1</sub>	5,36 ± 2,42	7,25 ± 5,89
BF <sub>2</sub>	2,52 ± 1,30	6,03 ± 4,73

Este tipo de bacterias son conocidas como bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB por sus siglas en inglés), ya que, por medio de interacciones no simbióticas, llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno, favoreciendo el crecimiento y nutrición de la planta [21]. Para llevar a cabo este proceso, se requiere de altos niveles energéticos que son proporcionados por la materia orgánica presente en el entorno microbiano. Por lo tanto, sería de esperarse que suelos ricos en materia orgánica satisfagan esta elevada demanda.

Por otra parte, la materia orgánica en los suelos puede encontrarse como MOH y MOL. En la primera, los AHs son el principal componente y debido a sus interacciones hidrófobas con las zonas no polares de las cadenas de lipopolisacáridos presentes en la pared celular bacteriana, forman un sistema AH-bacteria, el cual ha sido ampliamente usado como vehículo transportador de PGPB y de esta manera favorecer cambios fisiológicos y anatómicos en las raíces de la planta, fomentando la adhesión de la bacteria y la colonización [21, 22]. Adicionalmente, los contenidos de cadenas alifáticas de aminoácidos, péptidos y ácidos alifáticos presentes en los AHs, representan fuentes nutritivas para las células microbianas [23]

Algunos autores han reportado que el uso de AHs en cultivos de maíz, incrementa directamente el número de comunidades bacterianas adheridas a la superficie de las raíces de la planta, formando sistemas raíz-bacteria-AH, en los cuales se fomenta la encapsulación de las PGPB como medio de protección frente a compuestos quimioatrayentes o antimicrobianos [24].

### 3.3.3 Determinación del espesor de la biopelícula ( $\Delta Y_{biopelícula}$ )

El espesor de la biopelícula formada sobre las SM<sub>1</sub> y SM<sub>2</sub> (BF<sub>1</sub> y BF<sub>2</sub> respectivamente) se determinó mediante análisis por FTIR-ATR y FEDS, utilizando la ecuación 3. Para ello, los espectros obtenidos fueron analizados en la región de

vibración del marcador espectral incorporado (rango espectral 2185-2345 cm<sup>-1</sup>) antes y después de la formación de la biopelícula sobre las superficies. Los resultados se encuentran en la Tabla 5.

$$\Delta Y_{biopelícula} = g \ln \frac{A_1}{A_0} - j \ln \frac{A_2}{A_0} \quad (3)$$

Siendo

$$g = \frac{\lambda dp_1}{\pi(n_2^2 \text{sen}^2 \phi - n_1^2)^{0,5}} \quad (4)$$

$$j = \frac{\lambda dp_2}{\pi(n_2^2 \text{sen}^2 \phi - n_1^2)^{0,5}} \quad (5)$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda asociada al marcador en las SM como en las BFs ( $\sim 4,42 \times 10^{-6}$  m),  $dp_1$ ,  $A_1$  y  $dp_2$ ,  $A_2$  es la profundidad de penetración y la absorbancia máxima en la región de análisis para SM y BF respectivamente,  $A_0$  es la absorbancia máxima blanco (CA),  $n_1$  es el índice de refracción del cristal FTIR-ATR ( $n_1=2.42$ ),  $n_2$  es el índice de refracción de la muestra ( $n_2=1,50$  para las SM y 1,35 para las biopelículas [3, 25]) y  $\phi$  es el ángulo de incidencia del haz IR ( $\phi = 45^\circ$ ) [3].

De acuerdo a los resultados en la Tabla 5, no se puede apreciar diferencia en los espesores de biopelícula en cada de las superficies modificadas con los ácidos húmicos provenientes de los suelos vallecaucanos y cordobeses, sin embargo, se espera que la formación de biopelículas bacterianas tenga una marcada tendencia sobre las SM<sub>1</sub>, debido a su elevada energía superficial, haciendo que los mecanismos de adherencia bacteriana presenten preferencias hacia dichas superficies.

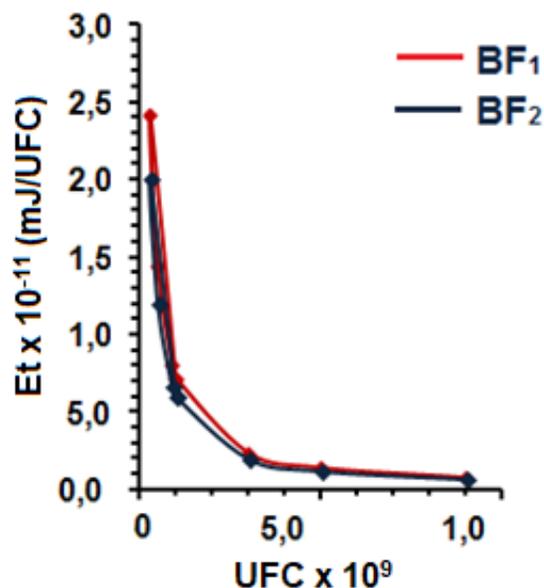
Adicionalmente, se cuentan con  $\Delta Y_{biopelícula}$  muy bajos (aprox 1,4-3,1 veces el diámetro de la célula), lo que sugiere dos formulaciones hipotéticas: 1) las condiciones de formación de biopelícula evaluadas apuntan a una primera fase de evolución, donde se cuentan con capas bacterianas de poco espesor, y 2) posterior a la primera interacción entre la célula bacteriana y la superficie, se presenta la segregación de material polimérico al medio conformando la matriz de exopolisacáridos o glicocalix, el cual permite la adherencia irreversible de las células en contacto con la superficie y de otras células bacterianas desde los alrededores hasta la matriz polimérica, incrementando el espesor de la biocapa bacteriana [26]. De esta manera, se asume que el espesor de la

biopelícula depende principalmente de los nutrientes presentes en la matriz polimérica una vez la interacción célula-superficie se ha llevado a cabo e inicia la interacción y atracción con otras células microbianas mediante señales químicas peptídicas que estimulan la generación de enzimas, proceso conocido como: *Quorum sensing* [27,28].

### 3.3.4 Determinación de la energía superficial total ( $E_T$ )

De acuerdo con las ecuaciones 2 y 3 y una superficie de  $0,0025\text{m}^2$ , se determinó la energía superficial total para las biopelículas formadas (ver Tabla 5).  $E_T$  representa la afinidad de las células bacterianas hacia una superficie en especial y la tendencia de dicha superficie hacia la colonización bacteriana en términos de energía de interacción, por lo que de acuerdo con los resultados obtenidos se pueden apreciar valores de  $E_T$  ( $0,0021$  y  $0,0038\text{ nJ}/\mu\text{m}^3$ ; tomando el volumen de la biocapa a partir del  $\Delta y_{\text{biopelícula}}$  encontrado y asumiendo una adherencia en total en toda la superficie) los cuales, en comparación con mediciones hechas a partir de microscopía de fuerza atómica [29], son valores alrededor de 26-47 veces más pequeños. Esto puede presentarse debido a los bajos espesores de biopelícula obtenidos en comparación con los estudios citados.

La gran ventaja de este modelamiento, es la estimación de la fuerza con la cual las células bacterianas están adheridas a la superficie, sin necesidad de implementar técnicas costosas y laboriosas como micromanipulación, microbalanzas de cuarzo, FEM, entre otros, que buscan eliminar la batería de la superficie utilizando una fuerza igual y opuesta para dicho proceso [28]. En este caso, la medición de diversos parámetros a partir de técnicas analíticas sencillas y económicas, junto con el modelamiento del mecanismo de adhesión bacteriana, permitió elucidar la fuerza con la cual las células de *A. chroococcum* están adheridas sobre superficies modificadas con ácidos húmicos. Asimismo, da una apreciación de la fuerza de interacción del sistema bacteria-AHs que se lleva a cabo en los suelos. Por otro lado, para evaluar la energía superficial total por UFC ( $E_T/\text{UFC}$ ) en función de las UFC en el medio, se idealiza la situación en la cual se tengan presentes entre  $1 \times 10^8$  y  $9 \times 10^9$  con incrementos impares (1, 3,



**Figura. 4.** Estimación de la energía superficial total por unidades formadoras de colonia;  $E_T/\text{UFC}$  en función de las UFC en el medio.

5 y  $9 \times 10^8$  y 1, 3, 5 y  $9 \times 10^9$ ), se encontró que evidentemente  $E_T$  disminuye a medida que incrementan la concentración bacteriana (ver Figura 5), esto es debido a que, al incrementar las UFC adheridas en la superficie, los espesores de biopelícula incrementan, y las biocapas celulares más externas presentan fuerzas de interacción cada vez menores, llegando a una etapa de desprendimiento celular [28]. Esto concuerda con los patrones de patogenicidad y virulencia de las células que conforman biopelículas, de esta manera se garantiza la colonización de nuevas superficies y entornos.

## 4. Conclusiones

Mediante la metodología desarrollada en esta investigación, no fue posible identificar una diferenciación entre la afinidad de la célula bacteriana hacia los mismos tipos de compuestos del suelo ( $AH_1$  y  $AH_2$ ). Los resultados sugieren que se presenta adhesión bacteriana cuya energía de adhesión es medible mediante  $E_T$ . Sin embargo, es necesario analizar diferentes superficies para describir varios mecanismos asociados con la naturaleza de estas mediante el uso de técnicas instrumentales y modelos fisicoquímicos con especial énfasis en las interacciones de la

superficie. Por lo que este método es una herramienta prometedora para la descripción del proceso de colonización microbiana de suelos.

### Agradecimientos

Autores agradecen a Mindtech s.a.s. por los recursos suministrados. Program for Scientific Knowledge Diffusion of Mindtech s.a.s. (PSKD 2016-2020).

### Conflicto de intereses

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

### Referencias

- [1]. S. KumariK, S. Chourasia, U. Singh, U. Singh, R. Kant, R. Kant. Azotobacter: Its Role in Sustainable Agriculture. *New Agriculturist*, 28(2), 2017; 485–492.
- [2]. C. Chagnot, M. A. Zorgani, T. Astruc y M. Desvaux. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Frontiers in Microbiology*, 4, 2013; 1-26.
- [3]. L. Sabbatini. *Polymer Surface Characterization*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2004.
- [4]. T. Boland, R. Latour, F. Stutzenberger. Molecular basis of bacterial adhesion, *Handbook of Bacterial Adhesion Principles, Methods, and Applications*. Edt: Y. H. An and R. J. Friedman, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2000.
- [5]. M. Hermansson. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14, 1999; 105-119.
- [6]. Y. Liu, Q. Zhao. Influence of surface energy of modified surfaces on bacterial adhesion. *Biophysical Chemistry*, 117, 2005; 39-45.
- [7]. W. Costerton, T. Marrie, K. Cheng, Cap. 1, Phenomena of bacterial adhesion. *Bacterial adhesion; mechanism and physiological significance*, Plenum Press, NY, 1985.
- [8]. A. Wakley, I.A. Black. Determination of organic carbon in soils. *Soil Sci.*, 37, 1934; 27-38.
- [9]. M. E. Sumner. Measurement of soil pH: Problems and solutions. *Journal Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25 [7], 1994; 7-8.
- [10]. S. Jayaganesh, V.K. Senthurpandian. Extraction and Characterization of Humic and Fulvic Acids from Latosols under Tea Cultivation in South India. *Asian Journal of Earth Sciences*, 3[3]: 130-135, 2010.
- [11]. S. Garrido. Interpretación de análisis de suelos. Ministerio de agricultura, pezca y alimentación, Instituto nacional de reforma y desarrollo agrario. Dirección general de infraestructuras y cooperación, 1994, Madrid.
- [12]. H. Sains, H. Echeverria, H. Angelini. Niveles de materia orgánica y pH en suelos agrícolas de la región pempeana y extrapampeada argentina. *Informaciones Agronómicas*, 2; 6-12.
- [13]. J. P. López, R. Boronat. Aspectos básicos de la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de bacterias. Estudio en el laboratorio de educación secundaria, *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias* 13[1], 203-209, 2016.
- [14]. Jorge Emilio Adames Bohórquez y Lotario Levy Hofmann. Propiedades físicas de algunos suelos del valle del cauca. *Acta Agron*, 10[3-4], 1960; 213-253.
- [15]. J. Pizarro-Cerda, P. Cossart. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell* 124, 2006; 715-727.
- [16]. R. Beckett. *Surface and Colloid Chemistry in Natural Waters and Water Treatment*. Springer Science+Business Media, NY, 1990
- [17]. J. Coates. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. Coates Consulting, Ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers, Newtown, USA.
- [18]. J. Nazar, *Biofilms Bacterianos*. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 67, 2007; 61-72.
- [19]. H. J. Busscher, A. H. Weerkamp, H. C. VAN der Mei, A. W. J. Van Pelt, H. P. Jong y J. Arends. Measurement of the Surface Free Energy of Bacterial Cell Surfaces and Its Relevance for Adhesion. *Applied Environmental Microbiology*, 48[5], 1984; 980–983.
- [20]. D. Gospodaryov, V. Lushchak. Some properties of melanin produced by *Azotobacter chroococcum* and its possible application in biotechnology, *БИОТЕХНОЛОГИЯ*, 4[2], 2011; 61-69.
- [21]. D. Benjumedá. *Bacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal: Mecanismos y Aplicaciones*. Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. Documento de tesis. 2017.
- [22]. D. A. Guzmán. Optimización de un inoculante promotor de crecimiento vegetal y su potencialización por lecho inmovilizado en matriz polimérica. Aplicación en suelos inceptisoles cultivados con *Pisum sativum* L. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias. 2017.
- [23]. G. Téllez, J. Castaño. Antimicrobial peptides. *Infect.* 14 [1], 2010; 55-67.
- [24]. R. Bakke, R. Kommedal, S. Kalvenes. Quantification of biofilm accumulation by an optical approach. *Métodos de Microbiol J.* 44 [1], 2001; 13-26.
- [25]. G. Pinilla, A. Bautista, C. Cruz, B. Chavarro, J. Navarrete, L. Muñoz, J. Gutiérrez. Determination of adhesion factors associated with biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and

Staphylococcus epidermidis. NOVA. 15 [27], 2017; 67-75.

[26]. E. J. Walsh , H. Miajlovic, O. V. Gorkun, T. J. Foster. Identification of the Staphylococcus aureus MSCRAMM clumping factor B (ClfB) binding site in the  $\alpha$ C-domain of human fibrinogen. Microbiology. ; 154[Pt 2], 2008; 550–558.

[27]. A. Ghasemian, S. Najar Peerayeh, B. Bakhshi, M. Mirzaee. The Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) Genes among Clinical Isolates of

Staphylococcus aureus from Hospitalized Children. Iran J Pathol. 10[4], 2015; 258–264.

[28]. T. Garrett, M. Bhakoo, Z. Zhang. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science, 18[9], 2008; 1049-1056.

[29]. A. Razatos, Y. L. Ong, M. M. Sharma, G. Georgiou. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. Proc Natl Acad Sci U S A, 95[19], 1998; 11059-64.