



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Agronomía
Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

Tecnología Jetcutter® para escalar en la producción de un biofertilizante sólido

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas

FRANCISCA BELÉN MARTIN DÍAZ
CHILLÁN-CHILE
2024

Profesor Guía: María Dolores López Belchí
Dpto. de Producción Vegetal
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Producción Vegetal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción.

Profesora Guía

Dra. María Dolores López Belchí
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Juan David Giraldo Pedraza
Instituto de Acuicultura y Medioambiente
Universidad Austral de Chile

Comisión Evaluadora:

Dr. Mauricio Shoebitz Cid
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

Dr. Homero Urrutia Briones
Centro de Biotecnología
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dra. Macarena Gerding González
Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

A mis queridos padres, quienes con su amor incondicional y sabiduría me guiaron en este camino académico. A mis hermanas, quienes siempre estuvieron a mi lado, alentándome y celebrando mis logros. Y a mi esposo, por su paciencia, comprensión y amor infinito. Gracias por ser mis pilares en este proceso. Esta tesis está dedicada a ustedes con gratitud y cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), FONDEF IDEA ID21I10050, por el financiamiento de esta tesis.

A mis profesores:

- A la Dra. María Dolores López quien fue mi profesora guía, gracias por su gran disposición, aunque tuviese su agenda completa siempre se hacía un tiempo para ayudar, además de corregir y ayudar a redactar este escrito.
- Al Dr. Juan David Giraldo, quien a pesar de la distancia siempre estuvo dispuesto a resolver mis dudas, participar en el desarrollo de las formulaciones, ayudar en la metodología y revisión del escrito.
- Al Dr. Mauricio Schoebitz por permitirme realizar los experimentos y análisis en su laboratorio, por su guía en las formulaciones y correcciones de Tesis.
- Al Dr. Homero Urrutia quien con su sabiduría apoyó en los análisis microbiológicos, conocimiento científico y corrección del manuscrito.

A la Dra. Solange Benítez, quien con su gran corazón y paciencia me guió, enseñó y apoyó de inicio a fin en el desarrollo de la tesis. Gracias por su tiempo y consejos.

A Rocío Carrasco por su guía y conocimiento en las formulaciones y apoyo constante en el laboratorio.

Al resto de mis compañeros de laboratorio por su apoyo, gran disposición y amistad, quienes hicieron de esta experiencia una aún más enriquecedora e inolvidable.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, amigos y amigas quienes me acompañaron y estuvieron siempre conmigo.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN	xi
SUMMARY	xvi
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Introducción general	1
1.2. Polímeros sintéticos	5
1.3. Polímeros naturales	9
1.4. Otros	20
1.5. Usos y aplicaciones agrícolas.....	21
2. HIPÓTESIS.....	25
3. OBJETIVO GENERAL.....	26
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5. REFERENCIAS.....	26
CAPÍTULO 2	41
RESULTADOS	41
Innovative JetCutter technology to scale the production of a solid <i>Bacillus pumilus</i> biofertilizer to transit to sustainable agriculture	41
1. INTRODUCTION.....	42
2. MATERIALS AND METHODS	48
2.1. Reagents and materials	48
2.2. Production of bacterial biomass	49
2.3. Preparation of the polymer solutions	50
2.4. JetCutter setup.....	50
2.5. Determination of the optimal cross-linking time.....	52
2.6. Water retention capacity, particle size distribution, and particle roundness.....	53
2.7. Microbial inoculant immobilization	54
2.8. Scanning electron microscopy	55
2.9. Bacterial load determination	56
2.10. Immobilization capacity and cell viability in storage	57

2.11.	Auxin production	57
2.12.	Growth chamber experiments	58
2.13.	Statistical management	60
3.	RESULTS AND DISCUSSION	61
3.1.	JetCutter setup.....	61
3.2.	Determination of optimum cross-linking time	64
3.3.	Bacterial immobilization capacity and viability	67
3.4.	Auxin production	70
3.5.	Growth chamber experiments	73
4.	REFERENCES.....	80
CAPÍTULO 3		94
Evaluación de otros hidrogeles: Comportamiento de Kappa II-carragenina en formación de partículas por medio de métodos de extrusión		94
1.	INTRODUCCIÓN	94
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	96
3.	RESULTADOS.....	96
4.	CONCLUSIONES.....	104
5.	REFERENCIAS.....	105
CONCLUSIONES GENERALES		108
PRODUCTIVIDAD		109
MATERIAL SUPLEMENTARIO		114

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO II

Innovative JetCutter technology to scale the production of a solid *Bacillus pumilus* biofertilizer to transit to sustainable agriculture

Table 1. Densities of the different polymer solutions, pump velocity to reach a fluid velocity of 10 m s^{-1} (V_{p10}), and yield (Y) with a nozzle diameter of 0.9 mm.	62
Table 2. Production yields of microparticles operating the JetCutter at optimal parameters.	63

CAPÍTULO III

Evaluación de otros hidrogeles: Comportamiento de carragenina en formación de partículas por medio de métodos de extrusión

Tabla 1. Parámetros de funcionamiento de JetCutter para las distintas carrageninas a diferentes concentraciones. ρ = densidad, V_{b10} = velocidad de la bomba para que la velocidad del polímero alcance los 10 m s^{-1} y R = rendimiento.	100
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Figura 1. Polímeros de acrilamida. (a) Estructuras resonantes de la acrilamida y (b) copolimerización de la acrilamida con bis-acrilamida.	7
Figura 2. Estructura de la goma xantana.	10
Figura 3. Monómeros de quitosano.	12
Figura 4. Estructuras químicas de la celulosa y sus derivados.	14
Figura 5. Estructura química de alginatos con formación de “caja de huevo”.	17
Figura 6. Adaptado de estructuras de los tipos de carragenanos más conocidos y la presencia de grupos sulfatos.	19
Figura 7. Técnicas de encapsulación.	25

CAPÍTULO II

Innovative JetCutter technology to scale the production of a solid *Bacillus pumilus* biofertilizer to transit to sustainable agriculture

Figure 1. JetCutter technology. a) Scheme with operational workflow and b) diagram of fluid losses caused by the shear angle.	51
Figure 2. Correlation curves between pump velocity, flow rate, and fluid velocity of medium L-guluronic alginate at different concentrations. a) 1 % w/w, b) 2 % w/w, and c) 2.5 % w/w + 1 % w/w of starch.....	63
Figure 3. Jet cut and microparticles formation. b) Segments of the alginate jet cut by the wires and falling in small drops and (b) the obtained microparticles (wet, rehydrated, and dry), from left to right.	65
Figure 4. Size distribution of microparticles at different cross-linking times: a) wet microparticles and b) dry microparticles. c) average roundness of microparticles and d) water retention capacity of microparticles according to cross-linking time. Different letters represent significant differences compared with Tukey’s multiple comparison test at $P \leq 0.05$	66
Figure 5. SEM micrographs. a) Complete biofertilizer, b) bacteria on the surface of the bead, c) bacteria in a crack of the polymer matrix, and d) agglomerations of bacteria.	67
Figure 6. Viability of <i>B. pumilus</i> C26 in biofertilizer in storage with and without L-tryptophan (Trp). Different lowercase letters represent significant differences in day variable in same with and without L-tryptophan variable, and different capital letters represent significant differences in with and without L-tryptophan variable in same day, compared using Tukey’s multiple comparison test at $P \leq 0.05$...	69
Figure 7. Indol-3-acetic acid (IAA) production from biofertilizer with and without L-tryptophan. Different lowercase letters represent significant differences in day variable in same with and without L-tryptophan variable, and different capital	

letters represent significant differences in with and without L-tryptophan variable in same day, compared using Tukey's multiple comparison test at $P \leq 0.05$... 71

Figure 8. Response of wheat seedlings to a water deficiency assay in the presence of different treatments. a) Root and leaf length, b) root and leaf dry weight, b) total root length, and d) root surface and volume. Ck 100%: soil with 100 % of irrigation, Ck 50%: soil with 50 % of irrigation, Mx 50%: soil + 0.1 g of microparticles with 50 % of irrigation, B.p. 50%: soil + B. pumilus pellet on 7 log, w-Trp 50%: soil + 0.1 g of biofertilizer with L-tryptophan with 50 % of irrigation, and wt-Trp 50%: soil + 0.1 g of biofertilizer without L-tryptophan. Different letters on the same variable (leaves or roots) represent significant differences to Tukey's multiple comparison test at $P \leq 0.05$ 74

Figure 9. Water retention capacity of biofertilizers in soil at different concentrations. Different letters represent significant differences compared with Tukey's multiple comparison test at $P \leq 0.05$ 78

CAPÍTULO III

Evaluación de otros hidrogeles: Comportamiento de carragenina en formación de partículas por medio de métodos de extrusión

Figura 1. Comportamiento de los diferentes tipos de carragenina a diferentes concentraciones. a) solución al 1 % p/p κ -I, b) partículas secas de 2 % p/p κ -I, c) solución al 3 % p/p KI, d) mezcla de 4 % p/p κ -I, e) partículas secas de 1 % p/p I, f) partículas secas de 2 % p/p I, g) partículas secas de 3 % p/p I, h) partículas húmedas de 1 % p/p κ -II, i) solución en jeringa de 1.25 % p/p κ -II, j) solución en jeringa de 1.5 % p/p κ -II y k) solución en jeringa de 1.75 % p/p κ -II.

..... 97

Figura 2. Partículas obtenidas por el método de extrusión con jeringa a diferentes concentraciones de kappa carragenina refinada y solución entrecruzante. a) partículas de 0.5 % p/p κ -II y 10 % p/p KCl, b) 0.75 % p/p κ -II y 7.5 % p/p KCl, c) 0.75 % p/p κ -II y 10 % p/p KCl, d) 1 % p/p κ -II y 7.5 % p/p KCl, e) 1 % p/p y κ -II 10 % p/p KCl, f) 0.75 % p/p κ -II y 10 % p/p KOH, g) 1 % p/p κ -II 10 % p/p KOH..... 98

Figura 3. Partículas obtenidas por método de extrusión con los diferentes polímeros. a) mezcla al 3 % p/p de κ -II y b) partículas de κ -II al 2 % p/p en 10 % p/p de KCl formadas en JetCutter. 101

Figura 4. Curvas de correlación entre el caudal y velocidad del fluido con la velocidad de la bomba para κ -carragenina refinada al 1 y 2 % (a y b), κ -carragenina semirrefinada al 1, 2 y 3 % (c, d y e) y I-carragenina al 1, 2 y 3 % (f, g y h)..... 101

FIGURAS COMPLEMENTARIAS

Figure S1. Images of roots taken in Whinrizo by treatment. a) Ck 100%, b) Ck 50%, c) Mx 50%, d) B.p.50%, e) w-Trp 50% and f) wt-Trp 50%..... 114

RESUMEN

Se estima que para 2050, más de tres cuartos de la población del mundo puede verse afectada por la sequía, considerado el segundo desastre más peligroso después de las inundaciones y que afecta factores como el flujo de los ríos y humedad del suelo. Variables del suelo como la estructura y textura influyen en la disponibilidad y almacenamiento del agua, los que se ven afectados por baja calidad de suelos degradados. Esto trae severos problemas al rendimiento de cultivos, donde dependiendo del estadio en el que se encuentre, la sequía puede afectar en el número y tamaño de semillas y frutos, el desarrollo vegetativo, reserva de carbohidratos, relleno de granos y fertilidad de semillas, lo que significa una pérdida de rendimiento entre 30 a 90 % dependiendo de la especie cultivada.

El uso de hidrogeles en la agricultura como acondicionadores de suelos se ha hecho conocido, ya que aumenta su contenido de agua, disminuyendo su conductividad hidráulica y mejorando su retención hídrica. Esto gracias a su gran capacidad de absorber y retener agua, lo que desencadena en una menor evapotranspiración, mejora de la eficiencia de uso de nutrientes y un mejor desarrollo de las plantas y rendimientos. Los hidrogeles son redes tridimensionales de cadenas de polímeros hidrofílicas reticuladas capaces de absorber grandes cantidades de agua sin disolverse y de desorber esa agua

cuando se somete a tensión mecánica. Estas cadenas pueden unirse por reticulación física, correspondiente a enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas), y por reticulación química, formación de enlaces covalentes por irradiación o adición de agentes químicos.

Dependiendo del origen del material polimérico que le da forma al hidrogel, podemos encontrar hidrogeles naturales y sintéticos. Entre los polímeros naturales se encuentra el alginato, uno de los biopolímeros más utilizados debido a sus características de hidrofiliidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, principalmente obtenido de la pared celular de las algas pardas, aunque puede ser sintetizado por bacterias del género *Pseudomonas* y *Azotobacter*. Es un polisacárido iónico que gelifica en presencia de cationes divalentes, resultando en una fuerte interacción descrita como “caja de huevo”. La celulosa es otro biopolímero destacado por ser biocompatible, biodegradable y renovable, hidrofílico y difícil de disolver. Sus derivados, como la hidroxietilcelulosa y carboximetilcelulosa, presentan hidrosolubilidad y son utilizados en la formulación de hidrogeles, donde la disolución de este polímero en diversos disolventes y su regeneración es uno de los métodos de formación de perlas (macropartículas) más conocidos. Por otro lado, el quitosano es un polisacárido catiónico que se obtiene de la deacetilación de la quitina, un biopolímero común en la naturaleza. Tiene las características de ser biodegradable, no tóxico, biocompatible y soluble en soluciones acuosas ácidas, pero poco soluble en

agua, con débiles propiedades mecánicas, por lo que se suelen realizar modificaciones en su cadena. Los carragenanos por su parte, son polisacáridos utilizados en diversas industrias y se obtienen de las membranas celulares de algas rojas, existiendo de diferentes tipos, pero las más importantes en el comercio son la kappa, lambda y iota carragenina. Posee baja toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, es hidrosoluble y estable.

Los hidrogeles sintéticos son preparados por la polimerización de químicos como ácido acrílico, acrilamida o ácido metacrílico, pudiendo diseñarse según las propiedades que se busquen. Suelen tener una alta resistencia, vida útil y gran absorción de agua, pero no posee bioactividad, por lo que se pueden encontrar hidrogeles híbridos, resultado de la mezcla de polímeros sintéticos con naturales.

Los hidrogeles representan una herramienta con muchas oportunidades y beneficios en la agricultura, permitiendo la aplicación de nuevas tecnologías como la encapsulación de fertilizantes y bioestimulantes. Uno de los usos importantes de la encapsulación con esferas biodegradables es inmovilizar rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), las que tienen múltiples efectos en las plantas, con el propósito de beneficiar su supervivencia. Los métodos más importantes para encapsular células de bacterias son la extrusión, spray drying y las emulsiones.

En el método por extrusión las células de bacterias son dispersadas en una matriz polimérica para luego ser extruida por una boquilla para producir gotas que

se colectan en una solución entrecruzante. Existen múltiples sistemas de extrusión, como disco atomizador giratorio, múltiples boquilla o jet-cutting. El spray drying consiste en producir un polvo seco, dispersando las bacterias en un material portador formando una emulsión o dispersión homogénea, para luego pulverizar la mezcla en una cámara caliente. Las emulsiones son la dispersión en gotas de dos líquidos inmiscibles que puede resultar en la mezcla de una fase acuosa en aceite, aceite en fase acuosa, sistema de tres fases y solución de micelas, cuya estabilidad se controla con agentes surfactantes. Estas técnicas permiten formar partículas homogéneas y de diferentes tamaños, pero sus rendimientos son bajos y no permiten trabajar con polímeros de alta viscosidad, lo que sumado a los múltiples usos de estas partículas, se hace necesario estudiar la formación de los hidrogeles y sus características en nuevas técnicas que permitan optimizar los procesos y fomentar su aplicación, como lo es el JetCutter.

El JetCutter puede generar partículas de tamaño pequeño a alta velocidad y con rendimientos por sobre los 20 kg h⁻¹. A estas partículas se les puede inmovilizar bacterias promotoras del crecimiento vegetal que mejoran la tolerancia de las plantas al estrés, lo que lo convierte en un método prometedor para aplicaciones de inmovilización. Las micropartículas obtenidas tienen una forma homogénea, con una capacidad de retención de agua sobre el 60 % p/p y una viabilidad celular de 10⁹, permitiendo mitigar los efectos del déficit hídrico en plantas de trigo, principalmente al fomentar el desarrollo radical. Este estudio

demostró que la tecnología JetCutter presenta resultados prometedores en la producción masiva de bioproductos, sugiriendo que es adecuado para el desarrollo de hidrogeles y la inmovilización de bacterias, siendo una estrategia valiosa en las prácticas agrícolas. Los resultados obtenidos demuestran que es indispensable estudiar los diferentes parámetros y el comportamiento de cada polímero a utilizar en el desarrollo de biofertilizantes o bioestimulantes.

SUMMARY

By 2050, more than three-quarters of the world's population may be affected by drought, which is considered the second most dangerous disaster after floods. This is because drought affects factors such as river flow and soil moisture. Soil variables such as structure and texture exert an influence on water availability and storage, which are themselves affected by poor-quality, degraded soils. This has the effect of creating severe problems for crop yields, whereby drought can affect seed and fruit number and size, vegetative development, carbohydrate reserve, grain filling, and seed fertility. Depending on the crop species, this can result in a yield loss of between 30 and 90%.

Using hydrogels in agricultural settings as soil conditioners has gained considerable recognition, as they enhance soil water content, thereby reducing its hydraulic conductivity and improving its water retention. This is due to their high capacity to absorb and retain water, which reduces evapotranspiration, improves nutrient use efficiency, and enhances plant development and yields. Hydrogels are three-dimensional networks of cross-linked hydrophilic polymer chains that are capable of absorbing large amounts of water without dissolving and of desorbing that water when subjected to mechanical stress. These chains can be joined by two distinct methods: physical cross-linking, which corresponds to non-covalent bonds (hydrogen bridges, Van der Waals forces and hydrophobic

interactions), and chemical cross-linking, which involves the formation of covalent bonds by irradiation or addition of chemical agents.

The classification of hydrogels is dependent on the origin of the polymeric material that forms them. Thus, there are natural and synthetic hydrogels. Among the natural polymers is alginate, which is one of the most widely used biopolymers due to its hydrophilicity, biocompatibility, and biodegradability. It is mainly obtained from the cell wall of brown algae, although it can also be synthesized by bacteria of the genus *Pseudomonas* and *Azotobacter*. It is an ionic polysaccharide that forms a gel in the presence of divalent cations, resulting in a strong interaction described as an 'egg-crate' structure. Cellulose is another biopolymer that has been identified as biocompatible, biodegradable renewable, hydrophilic, and difficult to dissolve. Derivatives of cellulose, such as hydroxyethylcellulose and carboxymethylcellulose, are water-soluble and are employed in the formulation of hydrogels. The dissolution of this polymer in various solvents and its regeneration is one of the most well-known methods of forming beads (macroparticles). Chitosan is a cationic polysaccharide obtained from the deacetylation of chitin, a common biopolymer in nature. The substance displays biodegradable, non-toxic, biocompatible, and soluble characteristics in acidic aqueous solutions, though it is relatively insoluble in water. Its mechanical properties are weak, which is why modifications are usually made to its chain. Carrageenans are polysaccharides employed in a multitude of industrial applications, derived from the cell membranes of red algae. They are classified into three main types: kappa,

lambda, and iota carrageenan. They are characterized by low toxicity, biocompatibility, biodegradability, water solubility, and stability.

Synthetic hydrogels are prepared by the polymerization of chemicals such as acrylic acid, acrylamide, or methacrylic acid, and can be designed according to the desired properties. They typically exhibit high resistance, a useful lifespan, and high water absorption, but lack bioactivity, thus hybrid hydrogels are also found, resulting from the mixture of synthetic and natural polymers.

Hydrogels represent a valuable tool with a multitude of potential applications in agriculture, including the encapsulation of fertilizers and biostimulants. One particularly noteworthy use of encapsulation with biodegradable spheres is the immobilization of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), which have a range of beneficial effects on plants, to enhance their survival. The most significant techniques for the encapsulation of bacterial cells are extrusion, spray drying, and emulsification.

In the extrusion method, bacterial cells are dispersed in a polymer matrix and then extruded through a nozzle to produce droplets, which are subsequently collected in a cross-linking solution. A variety of extrusion systems are available, including those with a rotating atomizer disc, multiple nozzles, or jet-cutting capabilities. Spray drying entails the production of a dry powder through the dispersion of bacteria in a carrier material, resulting in a homogeneous emulsion or dispersion. This mixture is then sprayed in a hot chamber. An emulsion is

defined as a droplet dispersion of two immiscible liquids, which can result in the mixing of an aqueous phase in oil, oil in an aqueous phase, or a three-phase system, as well as a micelle solution. The stability of these emulsions is controlled by surfactants. These techniques permit the formation of homogeneous particles of varying sizes; however, their yields are low and they are not suitable for use with high viscosity polymers. Furthermore, the numerous potential applications of these particles necessitate the study of hydrogel formation and characterization in novel techniques that facilitate process optimization and promote their utilization, such as the JetCutter method.

The JetCutter is capable of generating small particle sizes at high speeds, with yields exceeding 20 kg h⁻¹. The particles can be immobilized with plant growth-promoting bacteria, which enhance plant tolerance to stress, thereby representing a promising method for immobilization applications. The microparticles obtained are homogeneous in shape, with a water-retention capacity of over 60% w/w and a cell viability of 10⁹, which allows the effects of water deficit in wheat plants to be mitigated, mainly by promoting root development. The findings of this study indicate that the JetCutter technology exhibits considerable potential for the large-scale production of bioproducts. This suggests that it may be a suitable approach for the development of hydrogels and the immobilization of bacteria, which could be a valuable strategy in agricultural practices. The results demonstrate the importance of studying the diverse parameters and behaviors of the polymers to be used in the creation of biofertilizers or biostimulants.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción general

Desde mediados del siglo XX se han observado fenómenos meteorológicos y climáticos preocupantes, donde los cambios en las precipitaciones y temperaturas afectan directamente en las reservas de aguas, disminuyendo la disponibilidad y extracción de este recurso (ONU-agua, 2020). A nivel mundial, la agricultura es el sector que más consume agua, extrayendo el 71,64% del agua dulce. En Chile, la agricultura extrae el 90,89% (FAO, 2020), existiendo 900.396 hectáreas bajo riego (INE, 2022), donde factores del suelo como la estructura y textura influyen en el flujo, disponibilidad y almacenamiento del agua, elementos que se ven afectados por la baja calidad de suelos degradados (Bronick & Lal, 2005; Pal et al., 2020).

Teniendo en cuenta la importancia del agua en el sector agrícola, es crucial buscar y utilizar estrategias que mitiguen el estrés hídrico y aumenten la disponibilidad de agua en el suelo. De manera natural, bajo condiciones de estrés

se pueden generar biopelículas alrededor de las raíces que mantienen húmedo este espacio, ya que está compuesta mayoritariamente de agua (Pandit et al., 2020). Sin embargo, se ha observado que la incorporación de hidrogeles al suelo aumenta su contenido de agua, disminuyendo su conductividad hidráulica y mejorando su retención hídrica (Mohawesh & Durner, 2019). Un hidrogel se entiende como una red polimérica reticulada que tiene la capacidad de hincharse y retener grandes cantidades de agua en su estructura, pero que no se disuelve en ella (Ahmed, 2015). El contenido de agua en un hidrogel puede cambiar dependiendo de su capacidad de hincharse, la que está influenciada por la temperatura, pH, fuerza iónica y otros factores externos, esto debido a la afinidad termodinámica de los materiales que componen el hidrogel con el agua, ante la presencia de grupos hidrofílicos como $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-CONH_2$ y $-SO_3H$ en su estructura química (Bahram et al., 2016; Gun'ko et al., 2017). Esto, junto a su amplia versatilidad y propiedades, los hacen objeto de interés investigativos, estudiándose en campos de la ingeniería, biomedicina, biotecnología, entre otros (Yahia, 2015).

Los hidrogeles se pueden clasificar según su tipo de entrecruzamiento, origen de los polímeros que lo forman, método de preparación, estructura física y carga eléctrica (Madduma & Madihally, 2021). Comúnmente, están hechos en base a polisacáridos, polipéptidos, poliacrilamida y poliamida, donde las cadenas de estos polímeros son entrecruzadas química o físicamente (Raghuwanshi & Garnier, 2019). Los hidrogeles que son resultado del entrecruzamiento químico

se dan gracias a la formación enlaces covalentes, lo que les confiere la propiedad de indisolubilidad. Por otro lado, los hidrogeles físicamente entrecruzados se basan en fuerzas no covalentes, como las causadas por interacciones electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno, que bajo ciertas condiciones del sistema puede resultar en su descomposición, por lo que no cuentan con la propiedad de indisolubilidad (Lu et al., 2018). Complejos destacables producto de uniones físicas son los complejos polielectrolitos, donde ocurre una interacción iónica entre cadenas poliméricas ionizadas de cargas opuestas, como por ejemplo los formados por el alginato (-) y el quitosano (+) (Gierszewska et al., 2018).

Para entender el funcionamiento de los hidrogeles agrícolas se debe conocer la interacción del agua, el polímero y el suelo. El agua dentro del hidrogel puede clasificarse en tres tipos: agua libre, con una estructura y movilidad similar al agua normal; agua ligada, agua unida a las cadenas del polímero por fuertes puentes de hidrógeno; y agua intermedia, que interacciona débilmente con las cadenas del polímero y las moléculas de agua adyacentes (Liu et al., 2021). Respecto a la interacción del polímero y el suelo, se debe tener en cuenta cuatro criterios: (1) el polímero ocupa parte del espacio poroso del suelo, afectando su capacidad de retención de agua; (2) el polímero por sí solo puede absorber y perder agua, alterando el contenido total de agua del suelo; (3) al estar presente en los poros del suelo se comporta diferente al polímero puro, ya que no pueden expandirse libremente, absorbiendo menos agua que los puros; (4) el hinchamiento del

hidrogel puede inducir una expansión del suelo, dada por factores del suelo y las propiedades del polímero (Zhou et al., 2020).

En el suelo, la degradación del hidrogel ocurre luego de 6 meses, pudiendo ocurrir por la acción de rayos UV, microorganismos y/o enzimas (Malik et al., 2022), proceso que depende de diferentes factores como la temperatura, pH, humedad, crecimiento de microorganismos y el contenido de oxígeno y nutrientes del suelo (Phetwarotai et al., 2013). Se ha observado que la presencia de urea en el suelo acelera la degradación de materia orgánica, provocando que la degradación de hidrogeles biodegradables sea más rápida. Otro factor es el tipo de suelo, dado que suelos agrícolas tiene una degradación más rápida que en otros suelos, debido a la baja presencia de materia orgánica, así como en suelos arenosos es rápida y en arcillosos es lenta, esto principalmente por el tamaño de sus partículas y la aireación de sus poros (Nie et al., 2004; Turioni et al., 2021).

Actualmente, existe una tendencia en el desarrollo de nuevos materiales, donde se sustituya de manera parcial o completa los polímeros sintéticos por polímeros naturales (Ghobashy et al., 2021). Los hidrogeles no se quedan atrás y su obtención usando polímeros naturales ha permitido desarrollar materiales biodegradables y biocompatibles debido a su origen, ejemplos de estos biopolímeros son la celulosa, almidón, alginato, quitosano y gomas (Varghese et al., 2020). A nivel mundial, el mercado de bioproductos ha tenido una creciente demanda, pronosticando un crecimiento anual de 13,7%, que alcanzaría los

24.600 millones de dólares en el año 2027 (Research and Markets, 2022). Es por esto que, en este capítulo, se revisarán tanto los polímeros sintéticos, mostrando sus ventajas y desventajas, así como los biopolímeros, que son tendencia actualmente como materiales más sostenibles para la síntesis de hidrogeles. Estos representan una herramienta con muchas oportunidades y beneficios en la agricultura, a través de la conservación de suelo agrícola, reducción del estrés por sequía, incremento de la eficiencia del uso de los fertilizantes y aporte de agua al suelo (Neethu et al., 2018). Además, permite la aplicación de nuevas tecnologías como la encapsulación de fertilizantes y bioestimulantes (Olad et al., 2018; Pour et al., 2021).

A continuación, se presentarán los diferentes polímeros que se utilizan en la agricultura para la formulación de hidrogeles, separados en dos grandes grupos: sintéticos y naturales, donde los últimos se clasificarán según su fuente: animal, vegetal y algas. Finalmente, se presentarán sus aplicaciones en la agricultura y las técnicas de producción como bioinsumos.

1.2. Polímeros sintéticos

Los polímeros sintéticos son en base a el petróleo, poseen propiedades físico químicas más controlables, una mayor hidrofobicidad y resistencia mecánica que los naturales, lo que aumenta su vida útil, pero tienen baja actividad biológica. Estos se pueden sintetizar utilizando monómeros vinílicos polimerizables, entre

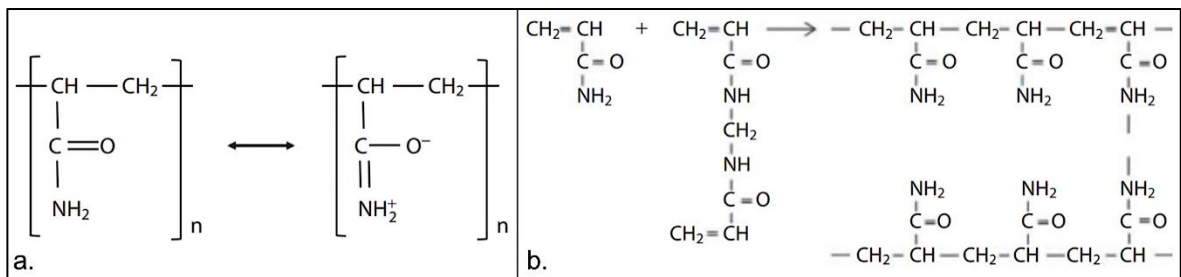
los que podemos encontrar: poli (alcohol vinílico) (PVA), poli (etilenglicol) (PEG), poli (óxido de etileno) (PEO), poli (2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA), poli (ácido acrílico) (PAA) y poli (acrilamida) (PAM). En la agricultura los polímeros sintéticos más utilizados son la poliacrilamida y poliacrilato (Bashir et al., 2020; Behera & Mahanwar, 2020).

Las poliacrilamidas se utilizan hace varios años en estudios para mantener la estructura de los suelos y disminuir la erosión de estos, demostrando que controla la erosión en el riego y mejora la infiltración del agua (Lentz et al., 1992). Existe una amplia variedad de PAM con diferentes densidades, pesos moleculares y estructuras químicas, ya que la acrilamida tiene la capacidad de reaccionar con otros monómeros y producir polímeros con carga, sin carga, anfóteros o zwitteriónicos. Las PAM no iónicas son más hidrofílicas que otros polímeros, ya que los grupos funcionales en su estructura química (grupo amida y carbonilo) forman estructuras resonantes (Figura 1.a), presentando una alta polaridad. Los geles de poliacrilamida son formados por la copolimerización de acrilamida con bis-acrilamida (Figura 1.b), donde el tamaño de los poros se pueden modificar con la concentración del monómero y las condiciones de la reacción (tipo de iniciador, temperatura y tiempo) (Whipple & Zheng, 2014; Wiśniewska, 2018).

Los poliacrilatos son resinas derivadas del éster acrílico, obtenidos de la polimerización por doble enlace de carbono-carbono en su estructura (Bao et al., 2015). Sus monómeros se entrecruzan con moléculas típicas como N,N'-

metilenbisacrilamida (bis-acrilamida) y trialamina, pudiéndose producir hidrogeles capaces de retener más del 99% de su peso en agua si se utilizan monómeros como el ácido acrílico y el metacrílico (Kinney & Scranton, 1994).

Figura 1. Polímeros de acrilamida. (a) Estructuras resonantes de la acrilamida y (b) copolimerización de la acrilamida con bis-acrilamida.



Fuente: Modificado de Wiśniewska, 2018.

Las PAM y los poliacrilatos se pueden entrecruzar con otros polímeros y formar hidrogeles híbridos, entregándoles características diferentes a la matriz del hidrogel, como mayor absorción de agua y resistencia mecánica. Se han explorado estas formulaciones en diferentes áreas (medicina, agricultura, limpieza de agua, entre otros), demostrando la versatilidad de estos polímeros y la facilidad de modificar sus propiedades (Li & Mooney, 2016; Sojka et al., 1998; Xu et al., 2022).

A pesar de los beneficios que puede traer el uso de estos polímeros, la preocupación por su toxicidad ha estado presente hace años, donde Seybold (1994) destacó el hecho de que la poliacrilamida no era tóxica en seres vivos,

pero su monómero, la acrilamida, es considerado un compuesto neurotóxico y cancerígeno, donde su alta solubilidad en el agua y bajo potencial de adsorción a sedimentos la convierte en un potencial contaminante de aguas subterráneas. En el suelo, la acrilamida se degrada rápidamente a CO_2 , NH_4^+ y agua, existiendo bacterias capaces de degradarla a amonio y a ácido acrílico, compuesto menos tóxico. Con los años, se ha demostrado toxicidad de la poliacrilamida en organismos acuáticos (Duggan et al., 2019) y plantas (Tabra et al., 2020).

Tanto la PAM como el poliacrilato se pueden encontrar en el mercado de productos agrícolas, como Terrasorb®, hidrogel a base de poli(acrilato-co-acrilamida) (Panescu et al., 2022). Respecto a sus usos, la PAM se ha utilizado para mejorar la calidad de suelos degradados y aumentar la estabilidad en taludes en conjunto con fragmentos de roca (Shengqiang & Dongli, 2018) y biochar (H. Wang et al., 2019). También se utiliza como portador de fertilizantes (NPK) en conjunto con gelatina, cuyo hidrogel presenta propiedades de liberación lenta de nutrientes, teniendo una buena aplicación en la agricultura (Ghobashy et al., 2018).

Si bien los polímeros sintéticos como la poliacrilamida y el poliacrilato se llevan usando por años en la agricultura, siendo buenos retenedores de agua y mostrando buenos resultados en la entrega controlada de componentes usados en la agricultura (p. ej. Nutrientes), la incertidumbre por los residuos que quedan en el suelo y sus efectos negativos en la salud humana, hacen necesario un

cambio en el uso de matrices absorbentes, optando por alternativas más amigables con el ambiente extraídas de fuentes naturales.

1.3. Polímeros naturales

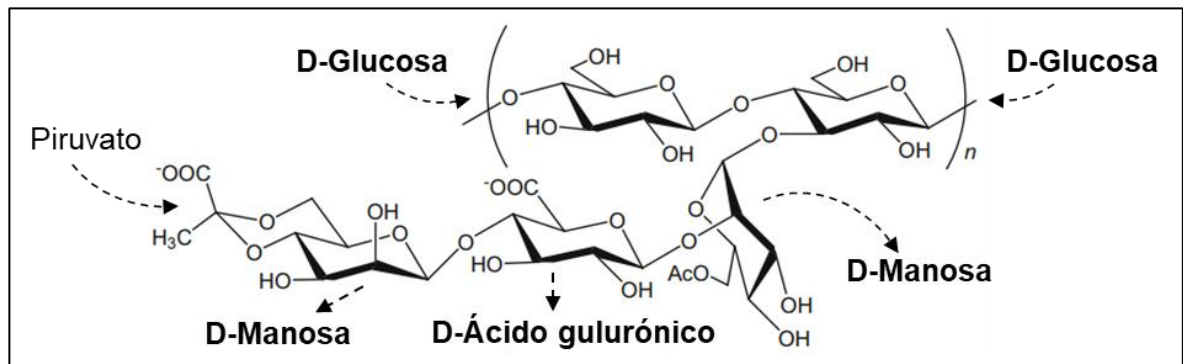
En este capítulo se expondrán polímeros naturales que se utilizan en la formación de hidrogeles, clasificados según su fuente de origen: animal, vegetal y algas, agregando otro polímero en base a residuos orgánicos, como el ácido poliláctico (PLA).

1.3.1. Base animal

Goma xantana: La goma xantana es un exopolisacárido producido por la fermentación de diferentes tipos de bacterias del género *Xanthomonas*, donde la cepa más utilizada para su producción es la *X. campestris* (Ahmad et al., 2019). Es un heteropolisacárido de alto peso molecular y de estructura central similar a la celulosa, compuesto por unidades de β -D-glucosa, β -D-manosa, α -D-manosa y D-ácido glucurónico, donde la manosa terminal de la cadena puede ser sustituida por ácido pirúvico (Figura 2). La presencia de ácido glucurónico y ácido pirúvico en la goma xantana la convierte en un polielectrolito (Berninger et al., 2021), por lo que sus propiedades en solución acuosa están relacionadas con su estructura química.

La goma xantana se utiliza en formulaciones cuando se quiere lograr características espesantes, estabilizadoras y emulsionantes. En la agricultura, se ha utilizado en hidrogeles para su uso en suelos, obteniendo una matriz biodegradable, con propiedades antibacteriales y con la capacidad de liberar de manera prolongada agroquímicos como la urea (Chaudhary et al., 2017). Otro ejemplo, es como un superabsorbente con capacidad de absorción de un 1000%, aumentando el contenido de agua en suelos, reduciendo su evaporación y favoreciendo el crecimiento en plantas (Sorze et al., 2023).

Figura 2. Estructura de la goma xantana.



Fuente: Adaptado de Endo et al., 2015 y Petri, 2015.

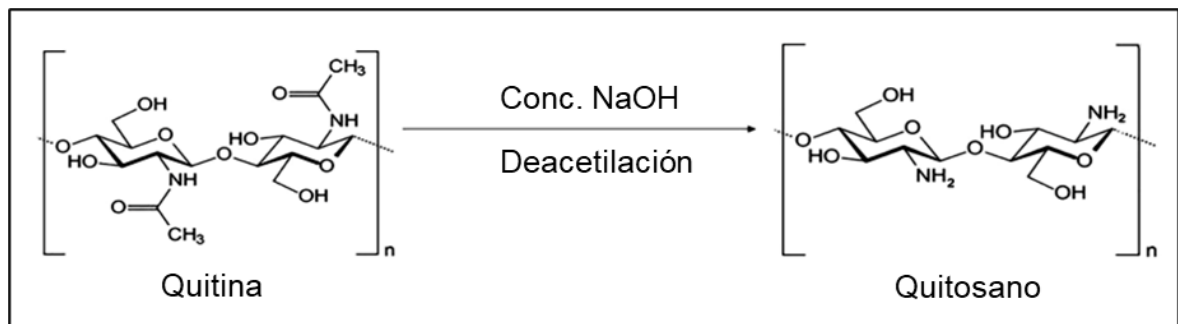
Quitina y Quitosano: La quitina es un homopolímero formado por (1,4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucosa (Muzzarelli, 1983), siendo uno de los biopolímeros más abundantes después de la celulosa. Es encontrado como el mayor componente de la pared de los hongos, del exoesqueleto de los artrópodos, tendones y revestimiento de sus sistemas. Actualmente, las mayores

fuentes comerciales de la quitina son el cascarón de cangrejos y camarones, siendo uno de los subproductos que se reciclan y que conduce a la sostenibilidad del medio ambiente (Bakshi et al., 2020). En la estructura de los exoesqueletos cumple el papel de rigidez del tejido, ya que cuando la quitina se combina con proteínas ocurre cristalización del compuesto y con esto forma una estructura fibrosa estable. En la cáscara de los crustáceos la concentración de quitina varía de un 6% a un 72% dependiendo de la especie, y del análisis utilizado (Aberé et al., 2022).

El quitosano se obtiene de la deacetilación de la quitina, proceso que puede ocurrir de manera química o biológica. Para su obtención química se utilizan tratamientos ácidos y alcalinos, siendo la más común a escala industrial. Por otro lado, en la biológica, participan microorganismos y enzimas, pero la alta cristalinidad de la quitina es la principal limitante en su uso. El quitosano obtenido es un copolímero con una distribución aleatoria de N-acetilglucosamina y glucosamina (Figura 3), cuya distribución en la cadena, peso molecular y proporción molar de estos confieren propiedades únicas al polímero (Gierszewska et al., 2018; Ojeda et al., 2020). El quitosano es estable en términos de compatibilidad, degradabilidad y no toxicidad, siendo adecuado para tecnologías de liberación de fármacos, donde es más demandado en la industria por formar hidrogeles esféricos (Pirsa et al., 2022).

En la agricultura, el interés por los hidrogeles a base de quitosano ha aumentado, debido a su bajo costo y su riqueza en grupos aminos e hidroxilos, siendo utilizados en la entrega de macro y micronutrientes, pesticidas y herbicidas, así como el tratamiento de aguas residuales al remover metales, tinturas, fenoles, pesticidas y fungicidas por absorción (Qu & Luo, 2020). Un ejemplo de esto es un hidrogel de quitosano entrecruzado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el cual funciona como acondicionador de suelo, aumentando su humedad, lo que repercute en un mayor rendimiento en las plantas, ya que provoca un incremento en su número de hojas, contenido de carbono orgánico y potasio (Ritonga et al., 2019).

Figura 3. Monómeros de quitosano.



Fuente: Extraída de Quiñones et al., 2018.

1.3.2. Base Vegetal

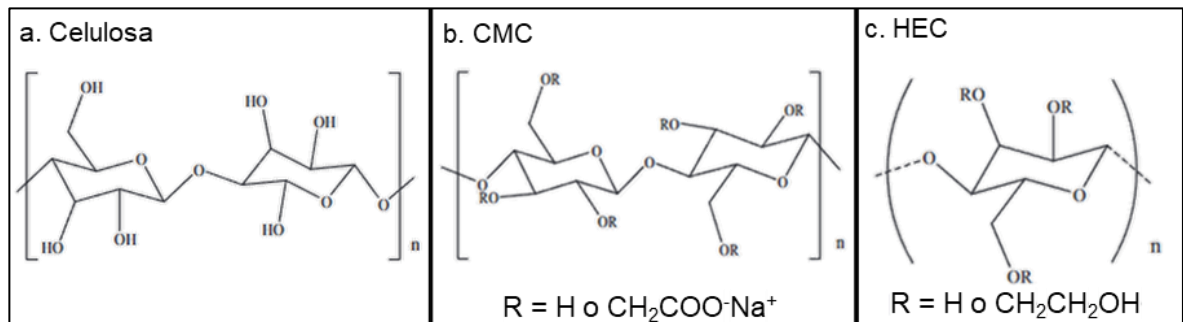
Celulosa: La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza, encontrándose en árboles, plantas, frutas, bio-residuos y algas, además de ser

sintetizada por algunas bacterias. Es un polímero biocompatible, biodegradable, renovable, de buena resistencia mecánica y amigable con el medio ambiente, que requiere varios pasos de purificación para reducir sus contaminantes (lignina y pectina). Aun así, su gran disponibilidad y bajo costo la convierten en una buena opción para la producción a escala industrial de materiales a base de celulosa, incluidos los hidrogeles. Su estructura está conformada por una cadena lineal de unidades de $\beta(1-4)$ D-glucosa (Figura 4.a), que presentan un gran número de fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilos, haciéndola insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos, que repercute en una baja reactividad (Demitri et al., 2019; Zainal et al., 2021).

La carboximetilcelulosa (CMC) es un derivado de la celulosa con grupos carboxilatos en su estructura (Figura 4b). Es un polisacárido aniónico soluble en agua y ampliamente utilizado como coloide hidrofílico (Kunjalukkal et al., 2023), ideal para preparar hidrogeles por su alta capacidad de hincharse. La CMC sódica (CMCNa) es la más utilizada por su alta absorción y fuerza iónica (Durpekova et al., 2020), pero cuando se utiliza sola, forma hidrogeles con poca resistencia mecánica debido a la repulsión entre sus moléculas cargadas. Es por esto que se ha utilizado otro derivado de la celulosa, la hidroxietilcelulosa (HEC) (Figura 4.c), combinada con CMC para mejorar el entrecruzamiento intermolecular (Mali et al., 2018).

En la agricultura, se ha utilizado en la formulación de un hidrogel nanocompuesto con partículas de sílice, capaz de aumentar el contenido de agua en el suelo y liberar de manera controlada fertilizantes de nitrógeno, fósforo y potasio, reduciendo los costos de producción (Olad et al., 2018), También, se ha utilizado en la encapsulación de esporas de *Trichoderma harzianum* como agente de biocontrol y bioestimulante, favoreciendo el crecimiento de los microorganismos encapsulados luego de estar almacenados por 10 días (Brondi et al., 2022)

Figura 4. Estructuras químicas de la celulosa y sus derivados.



Fuente: Extraído de Zainal et al., 2021.

Almidón: El almidón es un homopolisacárido compuesto de amilosa lineal y amilopectina ramificada, siendo uno de los principales componentes de reserva en las plantas. La amilosa está constituida por glucosas unidas por enlaces glicosídicos α -(1,4) y la amilopectina formada por uniones α -(1,4) y α -(1,6), donde su presencia en la cadena del almidón va a depender de la fuente o planta de la que se extraiga, siendo las más importantes en las industrias el trigo, arroz,

mandioca, maíz y papa. Las propiedades del almidón van a depender de su composición, ya que la amilosa proporciona elasticidad al material, mientras que la amilopectina entrega resistencia y elongación (Agarwal et al., 2021; El-Aziz et al., 2022).

El almidón contiene una gran cantidad de grupos OH en su estructura, donde la reactividad de este polímero depende de estos grupos químicos, permitiéndole oxidarse, reducirse y formar enlaces de distinto tipo. El uso de este polímero tiene ventajas y desventajas. Las ventajas son que es biocompatible, no tóxico, barato, de buenas propiedades mecánicas y fácilmente disponible. Por otro lado, las desventajas son que presenta problemas por su baja estabilidad y procesamiento de los productos finales. Es por esto, que se ha utilizado la alternativa de modificarlos para lograr tener mejores características, utilizando métodos de entrecruzamiento físicos, poco estables, y químicos (Qamruzzaman et al., 2022). En los métodos químicos se introducen grupos iónicos o hidrofóbicos que cambian la viscosidad del polímero, ocurriendo una eterificación, donde grupos hidroxilos son sustituidos por grupos éter (ej. el carboximetilalmidón sódico (CMS-Na)), o una injertación de otros polímeros, como acrilamida y ácido acrílico. Sin embargo, el último no parece ser muy utilizado, ya que se ha prestado más atención a la disminución en el uso de polímero sintéticos por los problemas ambientales y de salud (Ismail et al., 2013). Además, la combinación con otros polímeros naturales mejora las características de la matriz, haciéndose tendencia

la mezcla con quitosano, gelatina, gomas, alginato y celulosa (Suriyatem et al., 2019).

Sus aplicaciones en la agricultura se han visto de manera individual o entrecruzado con otros polímeros, utilizando almidón de maíz para la encapsulación de urea (Ibrahim et al., 2019) y de micronutrientes (Fe, Cu y Mn) (Chiaregato & Faez, 2021) para disminuir las pérdidas, mejorando su eficiencia de entrega y controlando la contaminación, así como su interacción con alginato en la encapsulación de microorganismos benéficos como *Metarhizium brunneum* (Krell et al., 2018) y *Pseudomonas protegens* SN15-2 (X. Wang et al., 2021).

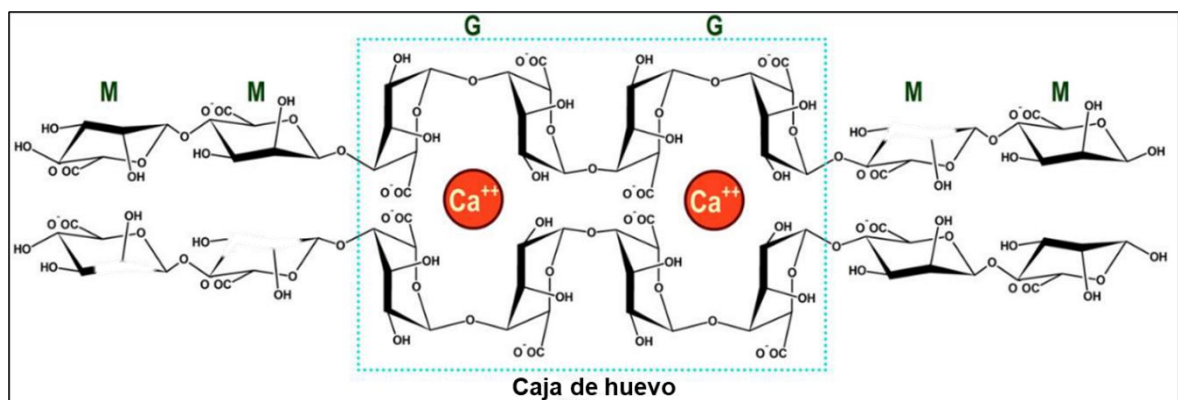
1.3.3. Base algas

Ácido algínico: Es un biopolímero obtenido de algas pardas de la clase Phaeophyceae y algas rojas de la familia Corallinaceae, además de ser producidos por bacterias del suelo de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Belik et al., 2018), cuyo uso en humanos está autorizado, siendo aplicado en muchas industrias como su sal sódica el alginato: farmacéutica, química, textil, alimentaria, entre otras, por sus propiedades de compatibilidad con otros compuestos (Hurtado et al., 2020).

La estructura del alginato se compone de subunidades de ácido $\beta(1 - 4)$ -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G), cuya secuencia de bloques M y G varía según la fuente y las condiciones de crecimiento del organismo productor,

determinando sus propiedades reológicas. Las propiedades gelificantes del alginato están relacionadas con la interacción de los bloques GG con cationes divalentes, principalmente el Ca^{2+} , uniéndose y formando una red conocida como “caja de huevo”, capaz de formar la matriz de los geles (Figura 5). La frecuencia de subunidades G determina la fuerza del gel, ya que en presencia de calcio forma geles más fuertes y viscosos, mientras que sin calcio y poca secuencia de bloques G son flexibles y menos viscosos (Rhein et al., 2017; Urtuvia et al., 2017).

Figura 5. Estructura química de alginatos con formación de “caja de huevo”.



Fuente: Extraído de Lee et al., 2019.

Entre las propiedades de los alginatos, aparte de ser hidrocoloides, son además espesantes, gelificantes, emulsionantes, estabilizantes y funcionan como agentes de control de recubrimiento, encapsulación e inhibidores de sinéresis (Kaya, 2020; Verhelst, 2021). Debido a estas propiedades, su uso en la industria alimentaria es bien conocida. Entre los distintos tipos de alginatos se da

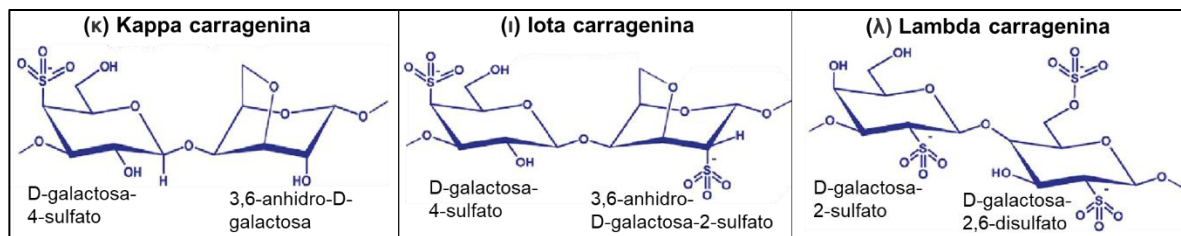
lugar a diversos usos: regeneración de tejidos, apósitos, aplicaciones en biomedicina y en sistemas de liberación controlada de fármacos (Parveen et al., 2019; Sahoo & Biswal, 2021).

En agricultura, cabe destacar a los alginatos como intercambiadores catiónicos, por lo que además de retener grandes cantidades de agua y proteger compuestos de interés también liberaran al suelo ciertos nutrientes que podrían ser usados por la planta. Los alginatos son solubles en agua (Niculescu & Grumezescu, 2022), por lo que tanto sus encapsulados como los componentes y minerales de la matriz pueden quedar disponibles para el ambiente. Se han utilizado en la encapsulación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), microencapsulando diferentes cepas de *Bacillus*, donde las microesferas en el suelo pueden funcionar como pequeños biorreactores capaces de aumentar la concentración inicial de células bacterianas, mostrando efectos positivos en plantas de trigo (Rojas et al., 2022), así como en la formación de cápsulas de alginato de sodio y celulosa con alfalfa inmovilizada como material de entrega controlada de Cu^{+2} en suelos, pudiendo ser utilizado en la industria de los fertilizantes como reemplazo de los fertilizantes químicos (Skrzypczak et al., 2019).

Carragenanos: En cuanto a la carragenina, cumple un papel importante como estabilizador, espesante y gelificante, utilizado en la industria alimentaria, médica, y textil, extraído de las algas rojas de la clase Rhodophyceae (Fathiraja

et al., 2021; Kaya, 2020). Estructuralmente, están compuestas por unidades repetidas de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa, sulfatadas y/o no sulfatadas. Sus propiedades están dadas por el número y posición de los grupos éster sulfato, donde niveles más altos dan lugar a una temperatura de solubilidad más baja y producción de geles menos resistentes o, incluso, inhibición de la gelificación. De los diferentes tipos de carrageninas se destacan la kappa, iota y lambda carragenina, donde la primera forma geles fuertes, la segunda forma geles suaves y la tercera no forma geles (Figura 6) (Machado et al., 2019).

Figura 6. Adaptado de estructuras de los tipos de carragenanos más conocidos y la presencia de grupos sulfatos.



Fuente: Extraído y modificado de Sankalia et al., 2006.

Se ha utilizado a la carragenina como elicitador en diferentes plantas para mejorar la producción del cultivo, pudiendo funcionar como biofertilizante y mejorador de las defensas de la planta ante patógenos. Se ha demostrado que la lambda carragenina por su alto grado de sulfatación induce una alta actividad elicitora en banano por las vías de aumento de fijación de carbono, biosíntesis protéica, entrega de nutrientes, entre otras (Thye et al., 2022). También se ha utilizado en

la entrega controlada de micronutrientes, entrecruzado con NaCMC, aumentando el contenido de agua en el suelo y el crecimiento en plantas de trigo (Akalin & Pulat, 2020).

1.4. Otros

Ácido poliláctico: El ácido poliláctico (PLA) es un termoplástico renovable y un poliéster alifático hecho de ácido láctico, componente clave en la producción de productos biodegradables, siendo uno de los biopolímeros más prometedores en el mundo. Es un polímero biodegradable, compostable, amigable con el medio ambiente y reciclable, ya que es hecho en base de fuentes renovables como son la caña de azúcar, maíz, papa, mandioca, trigo y arroz (Ilyas et al., 2022).

La materia prima del PLA es un monómero de alta pureza, la lactida, que se forma a partir del ácido láctico, compuestos altamente soluble en agua y biológicamente estable. Este monómero presenta dos estructuras isoméricas: L-láctico y D-láctico, de los que se pueden obtener tres formas estereoquímicas de lactida: LL-lactida (LLA), DD-lactida (DLA) y DL-lactida (meso-lactida (MLA)). De estos monómeros se obtienen sus polímeros: poli-L-lactida (PLLA), poli-D-lactida (PDLA) y poli-DL-lactida (PDLLA), los cuales tienen distintos grados de cristalinidad, afectando su velocidad de degradación, factor que puede modificarse por injertación de otros polímeros, como el polietilenglicol (PEG) (Naser et al., 2021; Tyler et al., 2016).

Las desventajas de este material son que es poco flexible, con una tasa de degradación lenta, hidrofobicidad, baja afinidad celular y químicamente inerte (Casalini et al., 2019). Sin embargo, se ha demostrado que es un buen estabilizante de matrices de hidrogeles, donde un hidrogel formulado a base de suero, NaCMC y HEC al incorporar PLA en la matriz mejoró las propiedades mecánicas del hidrogel, su estabilidad en el suelo y eficiencia de atrapamiento de fertilizantes (Durpekova et al., 2022). En la industria alimentaria se ha hecho conocido en la elaboración de materiales antibacteriales para envases con PLA relleno con nanopartículas de TiO_2 , que permite la disminución de exopolisacáridos, alterando el tamaño de las bacterias (González et al., 2018), dando lugar a una mejor calidad de las uvas empaquetadas, aumentando la vida útil de la fruta hasta doce semanas bajo condiciones de calor (Batool et al., 2022).

Con la creciente tendencia en el uso de biopolímeros en la agricultura es importante conocer sus características y aplicaciones para hacer uso de una herramienta versátil que puede aplicarse en nuevas áreas como una alternativa más sostenible y que puede abaratar costos.

1.5. Usos y aplicaciones agrícolas

Los distintos polímeros descritos anteriormente tienen múltiples usos en la agricultura, que van desde mejoramiento de suelos hasta encapsulación para la entrega de compuestos a la planta. Su versatilidad los hace candidatos

adecuados como encapsulantes en la agricultura, utilizando diferentes matrices con el fin de proteger variados componentes.

Los usos más convincentes de los hidrogeles en la agricultura son como reservorios de agua, en recubrimiento de semillas y en la inmovilización de componentes (Kaur et al., 2023). En la entrega de agua, se ha visto que la capacidad de retención de agua del suelo puede aumentar cerca de un 15,5% adicionando un 10% del hidrogel al suelo, reduciendo a la vez la pérdida de humedad (Garduque et al., 2020). Esto es de gran ayuda en inducción de tolerancia en las plantas ante estrés hídrico, ya que en plantas de maíz se pudo observar que en presencia del hidrogel estas tuvieron mayor contenido de biomasa y fósforo (Mazloom et al., 2020). La germinación de las semillas es un punto crítico, por lo que el recubrimiento de estas con hidrogeles ha podido mejorar las condiciones de este proceso, donde en semillas de maíz recubiertas con hidrogel de almidón mejoró su emergencia, asegurando la entrega de agua a la semilla (Pathak & Ambrose, 2020). También se han desarrollado coberturas dobles, donde la primera se inocula con bacterias fijadoras de nitrógeno y la segunda al estar compuesta de polisacáridos sirven de fuente de carbono a las bacterias y como depósito de agua para la semilla, mejorando la tolerancia al estrés hídrico de semillas de frijol (Zvinavashe et al., 2021). La entrega controlada de nutrientes se ha hecho conocida por el aumento de la disponibilidad de estos y la disminución de las pérdidas de fertilizante, donde se han hecho varios estudios utilizando hidrogeles en la formulación de fertilizantes con entrega

controlada de nutrientes, preparación de un fertilizante de urea de liberación lenta encapsulado en membrana de almidón, ácido acrílico y acrilamida (Guo et al., 2005) e hidrogel de carragenina para la entrega de iones NO_3^- , PO_3^- y NH_4^+ , disminuyendo el impacto ambiental por el uso excesivo de fertilizantes (Rozo et al., 2019). También se ha hecho para las aplicaciones en pesticidas con el uso de un hidrogel de almidón con quitosano para la liberación controlada del herbicida atrazina (Supare & Mahanwar, 2022).

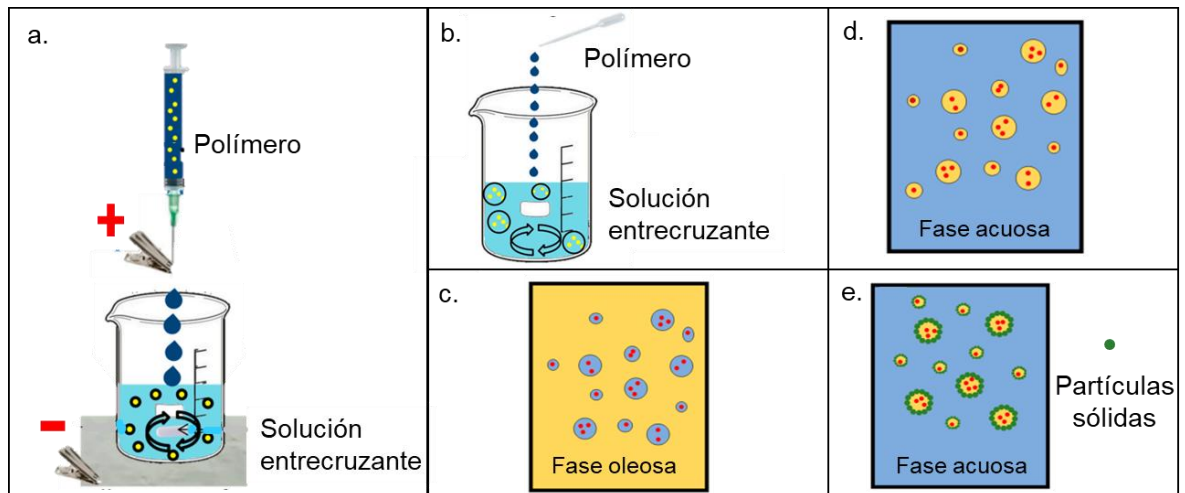
Un bioestimulante se define como un producto que estimula la nutrición de la planta independiente de su contenido de nutrientes, pudiendo mejorar la eficiencia de uso de nutrientes, tolerancia a estrés y/o disponibilidad de nutrientes (Reglamento de la UE, 2019). Existen microorganismos benéficos que por diferentes mecanismos favorecen a las plantas, mercado de productos que posee un crecimiento anual del 15% en la industria agroalimentaria mundial (Tabassum et al., 2017). La encapsulación de estos microorganismos ha mostrado efectos positivos en las plantas, por ejemplo, *Bacillus pumilus* encapsulado en alginato de sodio, aliviando efectos adversos de sequía y salinidad en las plantas (Zheng et al., 2022). También, la encapsulación de la bacteria *Azospirillum brasilense* AbV5/6 en perlas de almidón y quitosano con el potencial de promover el crecimiento de plantas de maíz (Lima et al., 2023) y encapsulaciones en carragenina de la bacteria *Streptomyces fulvissimus* Uts22 para el biocontrol de *Gaeumannomyces graminis* en trigo, obteniendo un control de 75-90% del patógeno (Saberri & Moradi, 2021).

La encapsulación tiene el objetivo de inmovilizar, proteger, estabilizar y liberar de manera controlada su contenido (Bhatia, 2020). Existen diferentes métodos de encapsulación (spray drying, spray chilling, extrusión, coacervación, dropping, etc) (El-Kader & Abu, 2020), pero los más utilizados son la técnica de electro-pulverización, gelificación ionotrópica y emulsión (Jiménez et al., 2023). La electro-pulverización consiste en la pulverización de una solución de polímero ante la aplicación de un campo magnético que forma gotas cargadas, donde el polímero está en una jeringa con punta metálica cargada positivamente. Cuando las fuerzas electrostáticas superan la tensión superficial de la solución, se forman gotas que se repelen entre sí, cayendo a la solución entrecruzante que le entrega electrones (carga negativa) (Figura 7.a.) (Lemr & Borovcová, 2020).

La gelificación ionotrópica produce partículas por la interacción electrostática entre dos especies iónicas, donde el polímero por medio de un goteo cae en una solución con carga opuesta acuosa, formándose esferas, siendo una técnica más barata y rápida que la anterior (Figura 7.b.) (Pedroso & Fleitas, 2020). Por último, la emulsión es la mezcla de dos líquidos inmiscibles, existiendo las emulsiones de “aceite en agua” (Figura 7.c.), donde la fase oleosa se gotea sobre la acuosa, “agua en aceite” (Figura 7.d.), donde un líquido acuoso se gotea en una fase oleosa, y la múltiple, donde pequeñas gotas están dentro de gotas grandes, suspendidas en fases continuas, por ejemplo, “aceite en agua y aceite” (Goodarzi & Zendejboudi, 2019). Se suelen utilizar tensioactivos para estabilizar las emulsiones, impidiendo la coalescencia de las partículas, pero las emulsiones de

Pickering (Figura 7.e.) se han hecho conocidas, ya que poseen una mayor estabilidad por la presencia de partículas sólidas que se ensamblan en alguna fase (Tang et al., 2019).

Figura 7. Técnicas de encapsulación.



Fuente: Modificado de Jiménez et al., 2023.

2. HIPÓTESIS

Los hidrogeles en base a alginato y carrageninas, formulados con *Bacillus pumilus*, retienen agua en el sistema radicular de las plantas y promueven el crecimiento vegetal liberando un bioestimulante en condiciones de estrés hídrico.

3. OBJETIVO GENERAL

Validar una formulación combinada de microorganismos, compuestos bioactivos y nutrientes de liberación controlada a base de biopolímeros que formen hidrogeles.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar parámetros en JetCutter para los polímeros en distintas concentraciones.
2. Caracterizar las esferas obtenidas por JetCutter enfocado en aspectos morfológicos, retención de agua, viabilidad bacteriana y liberación de bioestimulante.
3. Evaluar el efecto de las esferas sobre el crecimiento en plántulas en condiciones de estrés hídrico.

5. REFERENCIAS

- Abere, D., Ojo, S., Paredes, M., & Hakami, A. (2022). Derivation of composites of chitosan-nanoparticles from crustaceans source for nanomedicine: A mini review. *Biomedical Engineering Advances*, 4(100058). <https://doi.org/10.1016/j.bea.2022.100058>
- Agarwal, S., Singhal, S., Godiya, C., & Kumar, S. (2021). Prospects and applications of starch based biopolymers. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1–20. <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1963717>

- Ahmad, S., Ahmad, M., Manzoor, K., Purwar, R., & Ikram, S. (2019). A review on latest innovations in natural gums based hydrogels: Preparations & applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 870–890. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.113>
- Ahmed, E. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
- Akalin, G., & Pulat, M. (2020). Controlled release behavior of zinc-loaded carboxymethyl cellulose and carrageenan hydrogels and their effects on wheatgrass growth. *Journal of Polymer Research*, 27(6). <https://doi.org/10.1007/s10965-019-1950-y>
- Bahram, M., Mohseni, N., & Moghtader, M. (2016). An introduction to hydrogels and some recent applications. En S. Biswas (Ed.), *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels* (p. 9). InTech. <https://doi.org/10.5772/64301>
- Bakshi, P., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., & Kumar, N. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1072–1083. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113>
- Bao, Y., Ma, J., Zhang, X., & Shi, C. (2015). Recent advances in the modification of polyacrylate latexes. *Journal of Materials Science*, 50(21), 6839–6863. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9311-7>
- Bashir, S., Hina, M., Iqbal, J., Rajpar, A., Mujtaba, M., Alghamdi, N., Wageh, S., Ramesh, K., & Ramesh, S. (2020). Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties and their applications. *Polymers*, 12(11), 2702. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>
- Batool, M., Abid, A., Khurshid, S., Bashir, T., Ismail, M., Razaq, M., & Jamil, M. (2022). Quality control of nano-food packing material for grapes (*Vitis vinifera*) based on ZnO and polylactic acid (PLA) biofilm. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 47(1), 319–331. <https://doi.org/10.1007/s13369-021-05361-9>

- Behera, S., & Mahanwar, P. (2020). Superabsorbent polymers in agriculture and other applications: a review. *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 59(4), 341–356. <https://doi.org/10.1080/25740881.2019.1647239>
- Belik, A., Silchenko, A., Kusaykin, M., Zvyagintseva, T., & Ermakova, S. (2018). Alginate lyases: Substrates, structure, properties and prospects of application. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 44(4), 386–396. <https://doi.org/10.1134/S1068162018040040>
- Berninger, T., Dietz, N., & González, Ó. (2021). Water-soluble polymers in agriculture: xanthan gum as eco-friendly alternative to synthetics. *Microbial Biotechnology*, 14(5), 1881–1896. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13867>
- Bhatia, M. (2020). A review on application of encapsulation in agricultural processes. En S. Sonawane, B. Bhanvase, & M. Sivakumar (Eds.), *Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System* (pp. 131–140). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819363-1.00008-9>
- Brondi, M., Florencio, C., Mattoso, L., Ribeiro, C., & Farinas, C. (2022). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* with nanocellulose/carboxymethyl cellulose nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, 295(119876), 119876. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119876>
- Bronick, C., & Lal, R. (2005). Soil structure and management: a review. *Geoderma*, 124(1–2), 3–22. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.03.005>
- Casalini, T., Rossi, F., Castrovinci, A., & Perale, G. (2019). A perspective on polylactic acid-Based polymers use for nanoparticles synthesis and applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(259). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00259>
- Chaudhary, S., Kaith, B., Jindal, R., Kumari, M., & Kaur, M. (2017). Biodegradable-stimuli sensitive xanthan gum based hydrogel: Evaluation of antibacterial activity and controlled agro-chemical release. *Reactive and Functional Polymers*, 120, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.08.012>

- Chiaregato, C., & Faez, R. (2021). Micronutrients encapsulation by starch as an enhanced efficiency fertilizer. *Carbohydrate Polymers*, 271(118419), 118419. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118419>
- Demitri, C., Madaghiele, M., Grazia, M., Sannino, A., & Ambrosio, L. (2019). Investigating the structure-related properties of cellulose-based superabsorbent hydrogels. En L. Popa, M. V. Ghica, & C. Dinu (Eds.), *Hydrogels - Smart Materials for Biomedical Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80986>
- Duggan, K., Morris, M., Bhatia, S., Khachan, M., & Lewis, K. (2019). Effects of cationic polyacrylamide and cationic starch on aquatic life. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*, 23(4), 04019022. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)HZ.2153-5515.0000467](https://doi.org/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000467)
- Durpekova, S., Bergerova, E., Hanusova, D., Dusankova, M., & Sedlarik, V. (2022). Eco-friendly whey/polysaccharide-based hydrogel with poly(lactic acid) for improvement of agricultural soil quality and plant growth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 212, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.053>
- Durpekova, S., Filatova, K., Cisar, J., Ronzova, A., Kutalkova, E., & Sedlarik, V. (2020). A novel hydrogel based on renewable materials for agricultural application. *International Journal of Polymer Science*, 2020, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2020/8363418>
- El-Aziz, G., Ibrahim, A., & Fahmy, A. (2022). Using environmentally friendly hydrogels to alleviate the negative impact of drought on plant. *Open Journal of Applied Sciences*, 12, 111–133. <https://doi.org/10.4236/ojapps.2022.121009>
- El-Kader, A., & Abu, H. (2020). Encapsulation techniques of food bioproduct. *Egyptian Journal of Chemistry*, 63(5), 1881–1909. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2019.16269.1993>
- Endo, R., Setoyama, M., Yamamoto, K., & Kadokawa, J. (2015). Acetylation of xanthan Gum in ionic liquid. *Journal of Polymers and the Environment*, 23(2), 199–205. <https://doi.org/10.1007/s10924-014-0701-8>
- FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2020). Libro de trabajo: AQUASTAT.

https://tableau.apps.fao.org/views/AQUASTATDashboard/region_dashboard?%3Aembed=y&%3AisGuestRedirectFromVizportal=y

- Fathiraja, P., Gopalrajan, S., Karunanithi, M., Nagarajan, M., Obaiah, M., Durairaj, S., & Neethirajan, N. (2021). Response surface methodology model to optimize concentration of agar, alginate and carrageenan for the improved properties of biopolymer film. *Polymer Bulletin*, 1–27. <https://doi.org/10.1007/S00289-021-03797-5>
- Garduque, R., Gococo, B., Yu, C., Nalzaró, P., & Tumolva, T. (2020). Synthesis and characterization of sodium carboxymethyl cellulose/sodium alginate/hydroxypropyl cellulose hydrogel for agricultural water storage and controlled nutrient release. *Solid State Phenomena*, 304, 51–57. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.304.51>
- Ghobashy, M., El-Damhougy, B., Nady, N., El-Wahab, H., Naser, A., & Abdelhai, F. (2018). Radiation crosslinking of modifying super absorbent (polyacrylamide/gelatin) hydrogel as fertilizers carrier and soil conditioner. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(9), 3981–3994. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1273-9>
- Ghobashy, M., Elbarbary, A., & Hegazy, D. (2021). Gamma radiation synthesis of a novel amphiphilic terpolymer hydrogel pH-responsive based chitosan for colon cancer drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 263(117975). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117975>
- Gierszewska, M., Ostrowska, J., & Chrzanowska, E. (2018). pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate. *European Polymer Journal*, 101, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.031>
- González, E., Olmos, D., Lorente, M., Vélaz, I., & González, J. (2018). Preparation and characterization of polymer composite materials based on PLA/TiO₂ for antibacterial packaging. *Polymers*, 10(12), 1365. <https://doi.org/10.3390/polym10121365>
- Goodarzi, F., & Zendehboudi, S. (2019). A comprehensive review on emulsions and emulsion stability in chemical and energy industries. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97(1), 281–309. <https://doi.org/10.1002/cjce.23336>

- Gun'ko, V., Savina, I., & Mikhalovsky, S. (2017). Properties of water bound in hydrogels. *Gels*, 3(4), 37. <https://doi.org/10.3390/gels3040037>
- Guo, M., Liu, M., Zhan, F., & Wu, L. (2005). Preparation and properties of a slow-release membrane-encapsulated urea fertilizer with superabsorbent and moisture preservation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44(12), 4206–4211. <https://doi.org/10.1021/ie0489406>
- Hurtado, A., Selgas, R., & Serrano, Á. (2020, marzo). El alginato y sus inmensas aplicaciones industriales. *Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelación y Simulación*, 12, 137–149. https://doi.org/10.46583/nereis_2020.12.573
- Ibrahim, K., Naz, M., Shukrullah, S., Sulaiman, S., Ghaffar, A., & AbdEl, N. (2019). Controlling nitrogen pollution via encapsulation of urea fertilizer in cross-linked corn starch. *BioResources*, 14(4), 7775–7789. <https://doi.org/10.15376/biores.14.4.7775-7789>
- Ilyas, R., Zuhri, M., Aisyah, H., Asyraf, M., Hassan, S., Zainudin, E., Sapuan, S., Sharma, S., Bangar, S., Jumaidin, R., Nawab, Y., Faudzi, A., Abrial, H., Asrofi, M., Syafri, E., & Sari, N. (2022). Natural fiber-reinforced polylactic acid, polylactic acid blends and their composites for advanced applications. *Polymers*, 14(1), 202. <https://doi.org/10.3390/polym14010202>
- INE Instituto Nacional de Estadística. (2022, octubre). Censo Agropecuario. <https://www.ine.gob.cl/censoagropecuario>
- Ismail, H., Irani, M., & Ahmad, Z. (2013). Starch-based hydrogels: present status and applications. *International Journal of Polymeric Materials*, 62(7), 411–420. <https://doi.org/10.1080/00914037.2012.719141>
- Jiménez, D., Morales, S., Silva, P., Carrêlo, H., Gonçalves, A., Ganança, J., Nunes, N., Gouveia, C., Alves, S., Borges, J., & Pinheiro, M. (2023). Encapsulation with natural polymers to improve the properties of biostimulants in agriculture. *Plants*, 12(1), 55. <https://doi.org/10.3390/plants12010055>
- Kaur, P., Agrawal, R., Pfeffer, F., Williams, R., & Bohidar, H. (2023). Hydrogels in agriculture: Prospects and challenges. *Journal of Polymers and the Environment*, 31(9), 3701–3718. <https://doi.org/10.1007/S10924-023-02859-1>

- Kaya, A. (2020). Karakteristik produk gel kombinasi karaginan dan pati sagu. *Majalah BIAM*, 16(2), 79–85.
- Kinney, A., & Scranton, A. (1994). Formation and structure of cross-linked polyacrylates. En F. Buchholz & N. Peppas (Eds.), *Superabsorbent Polymers* (Vol. 573, pp. 2–26). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-1994-0573.ch001>
- Krell, V., Jakobs, D., Vidal, S., & Patel, A. (2018). Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. *Biological Control*, 116, 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.05.004>
- Kunjalukkal, S., Lamanna, L., Friuli, M., Sannino, A., Demitri, C., & Licciulli, A. (2023). Carboxymethylcellulose-based hydrogel obtained from bacterial cellulose. *Molecules*, 28(2), 829. <https://doi.org/10.3390/molecules28020829>
- Lee, H., Jung, S., Yoon, S., Yoon, W., Park, T., Kim, S., Shin, H., Hwang, D., & Jung, S. (2019). Immobilization of planktonic algal spores by inkjet printing. *Scientific Reports*, 9(1), 12357. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48776-z>
- Lemr, K., & Borovcová, L. (2020). Ionizace elektrosprejem. *Chemické listy*, 114(3), 169–178.
- Lentz, R., Sojka, R., Carter, D., & Shainberg. (1992). Preventing irrigation furrow erosion with small applications of polymers. *Soil Science Society of America Journal*, 56(6), 1926–1932. <https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600060046x>
- Li, J., & Mooney, D. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12), 16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
- Lima, M., Furmam, F., Karas, P., Hyeda, D., Takahashi, W., Pinto, A., Galvão, C., Tenório, E., & Etto, R. (2023). *Azospirillum brasilense* AbV5/6 encapsulation in dual-crosslinked beads based on cationic starch. *Carbohydrate Polymers*, 308, 120631. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120631>

- Liu, Y., Liu, X., Duan, B., Yu, Z., Cheng, T., Yu, L., Liu, L., & Liu, K. (2021). Polymer–water interaction enabled intelligent moisture regulation in hydrogels. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 12(10), 2587–2592. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.1c00034>
- Lu, H., Yuan, L., Yu, X., Wu, C., He, D., & Deng, J. (2018). Recent advances of on-demand dissolution of hydrogel dressings. *Burns & Trauma*, 6(35). <https://doi.org/10.1186/s41038-018-0138-8>
- Machado, N., Fernández, M., Häring, M., Saldías, C., & Díaz, D. (2019). Niosomes encapsulated in biohydrogels for tunable delivery of phytoalexin resveratrol. *RSC Advances*, 9(14), 7601–7609. <https://doi.org/10.1039/C8RA09655D>
- Madduma, U., & Madihally, S. (2021). Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(19), 50376. <https://doi.org/10.1002/app.50376>
- Mali, K., Dhawale, S., Dias, R., Dhane, N., & Ghorpade, V. (2018). Citric acid crosslinked carboxymethyl cellulose-based composite hydrogel films for drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(4), 657–667. <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000405>
- Malik, S., Chaudhary, K., Malik, A., Punia, H., Sewhag, M., Berkesia, N., Nagora, M., Kalia, S., Malik, K., Kumar, D., Kumar, P., Kamboj, E., Ahlawat, V., Kumar, A., & Boora, K. (2022). Superabsorbent polymers as a soil amendment for increasing agriculture production with reducing water losses under water stress condition. *Polymers*, 15(1), 161. <https://doi.org/10.3390/POLYM15010161>
- Mazloom, N., Khorassani, R., Zohury, G. H., Emami, H., & Whalen, J. (2020). Lignin-based hydrogel alleviates drought stress in maize. *Environmental and Experimental Botany*, 175, 104055. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104055>
- Mohawesh, O., & Durner, W. (2019). Effects of Bentonite, Hydrogel and Biochar Amendments on Soil Hydraulic Properties from Saturation to Oven Dryness. *Pedosphere*, 29(5), 598–607. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60426-0](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60426-0)

- Muzzarelli, R. (1983). Chitin and its derivatives: New trends of applied research. *Carbohydrate Polymers*, 3(1), 53–75. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(83\)90012-7](https://doi.org/10.1016/0144-8617(83)90012-7)
- Naser, A., Deiab, I., & Darras, B. (2021). Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. *RSC Advances*, 11(28), 17151–17196. <https://doi.org/10.1039/D1RA02390J>
- Neethu, T., Dubey, P., & Kaswala, A. (2018). Prospects and applications of hydrogel technology in agriculture. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(05), 3155–3162. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.369>
- Niculescu, A., & Grumezescu, A. (2022). Applications of chitosan-alginate-based nanoparticles — an up-to-date review. *Nanomaterials*, 12(2), 186. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/nano12020186>
- Nie, H., Liu, M., Zhan, F., & Guo, M. (2004). Factors on the preparation of carboxymethylcellulose hydrogel and its degradation behavior in soil. *Carbohydrate Polymers*, 58(2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.06.035>
- Ojeda, D., Canales, A., Matias, J., Gomez, U., & Mateos, J. (2020). Potential of chitosan and its derivatives for biomedical applications in the central nervous system. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(389), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00389>
- Olad, A., Zebhi, H., Salari, D., Mirmohseni, A., & Reyhani Tabar, A. (2018). Slow-release NPK fertilizer encapsulated by carboxymethyl cellulose-based nanocomposite with the function of water retention in soil. *Materials Science and Engineering: C*, 90, 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.083>
- ONU-agua. (2020). Informe mundial de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos: Agua y cambio climático.
- Pal, A., Adhikary, R., Bera, M., Garanayak, R., & Kumar, S. (2020). Soil and water quality for healthy crop: A review. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 13(12), 73–77.

- Pandit, A., Adholeya, A., Cahill, D., Brau, L., & Kochar, M. (2020). Microbial biofilms in nature: unlocking their potential for agricultural applications. *Journal of Applied Microbiology*, 129(2), 199–211. <https://doi.org/10.1111/JAM.14609>
- Panescu, P., Browne, M., Chen, K., Sack, L., & Maynard, H. (2022). Effects of trehalose and polyacrylate-based hydrogels on tomato growth under drought. *AoB PLANTS*, 14(4). <https://doi.org/10.1093/aobpla/plac030>
- Parveen, I., Maraz, K., Mahmud, I., & Khan, R. (2019). Seaweed based bio polymeric film and their application: A review on hydrocolloid polysaccharides. *Scientific Review*, 5(5), 93–102. <https://doi.org/10.32861/SR.55.93.102>
- Pathak, V., & Ambrose, R. (2020). Starch-based biodegradable hydrogel as seed coating for corn to improve early growth under water shortage. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(14), 48523. <https://doi.org/10.1002/APP.48523>
- Pedroso, S., & Fleitas, N. (2020). Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polymer International*, 69(5), 443–447. <https://doi.org/10.1002/pi.5970>
- Petri, D. (2015). Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(23), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/app.42035>
- Phetwarotai, W., Potiyaraj, P., & Aht, D. (2013). Biodegradation of polylactide and gelatinized starch blend films under controlled soil burial conditions. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(1), 95–107. <https://doi.org/10.1007/S10924-012-0530-6/FIGURES/8>
- Pirsa, S., Khodaei, S., Karimi, I., Ghasemi, Y., Jawhar, Z., & Eghbaljoo, H. (2022). Hydrogels and biohydrogels: investigation of origin of production, production methods, and application. *Polymer Bulletin*, 1–40. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04580-w>
- Pour, M., Saberi, R., Esmailzadeh, K., Mohammadinejad, R., & Loit, E. (2021). Evaluation of *Bacillus velezensis* for biological control of *Rhizoctonia solani* in bean by alginate/gelatin encapsulation supplemented with

nanoparticles. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(10), 1373–1382. <https://doi.org/10.4014/JMB.2105.05001>

Qamruzzaman, M., Ahmed, F., & Mondal, M. (2022). An overview on starch-based sustainable hydrogels: potential applications and aspects. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(1), 19–50. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02180-9>

Qu, B., & Luo, Y. (2020). Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.240>

Quiñones, J., Peniche, H., & Peniche, C. (2018). Chitosan based self-assembled nanoparticles in drug delivery. *Polymers*, 10(3), 235. <https://doi.org/10.3390/polym10030235>

Raghuwanshi, V., & Garnier, G. (2019). Characterisation of hydrogels: Linking the nano to the microscale. *Advances in Colloid and Interface Science*, 274, 102044. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102044>

Reglamento de la UE. (2019). Regulation (EU) 2019/1009 of the european parliament and of the council of 5 June 2019 laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing regula.

Research and Markets. (2022, marzo). Global agricultural biologicals market by function, product type (microbials, macrobials, semiochemicals, natural products), mode of application (foliar spray, Soil & seed treatment), crop type, and region - forecast to 2027. Research and Markets. <https://www.researchandmarkets.com/reports/4995068>

Rhein, N., Ale, M., Ajallouei, F., & Meyer, A. (2017). Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum* spp. and *Padina* spp. *Food Hydrocolloids*, 71, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.016>

Ritonga, H., Nurfadillah, A., Rembon, F., Ramadhan, L., & Nurdin, M. (2019). Preparation of chitosan-EDTA hydrogel as soil conditioner for soybean

- plant (*Glycine max*). *Groundwater for Sustainable Development*, 9, 100277. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2019.100277>
- Rojas, J., de Bashan, L., Parra, F., Rocha, J., & de los Santos, S. (2022). Microencapsulation of *Bacillus* strains for improving wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) growth and development. *Plants*, 11(21), 2920. <https://doi.org/10.3390/plants11212920>
- Rozo, G., Bohorques, L., & Santamaría, J. (2019). Controlled release fertilizer encapsulated by a κ -carrageenan hydrogel. *Polímeros*, 29(3), 1–7. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.02719>
- Saberi, R., & Moradi, M. (2021). A novel encapsulation of *Streptomyces fulvissimus* Uts22 by spray drying and its biocontrol efficiency against *Gaeumannomyces graminis*, the causal agent of take-all disease in wheat. *Pest Management Science*, 77(10), 4357–4364. <https://doi.org/10.1002/ps.6469>
- Sahoo, D., & Biswal, T. (2021). Alginate and its application to tissue engineering. *SN Applied Sciences*, 3(1), 30. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04096-w>
- Sankalia, M., Mashru, R., Sankalia, J., & Sutariya, V. (2006). Stability improvement of alpha-amylase entrapped in kappa-carrageenan beads: Physicochemical characterization and optimization using composite index. *International Journal of Pharmaceutics*, 312(1–2), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.048>
- Seybold, C. (1994). Polyacrylamide review: Soil conditioning and environmental fate. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25(11–12), 2171–2185. <https://doi.org/10.1080/00103629409369180>
- Shengqiang, T., & Dongli, S. (2018). Synergistic effects of rock fragment cover and polyacrylamide application on erosion of saline-sodic soils. *CATENA*, 171, 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2018.06.033>
- Skrzypczak, D., Mikula, K., & Witek, A. (2019). Hydrogel capsules with alfalfa as micronutrients carrier. *SN Applied Sciences*, 1(6), 573. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0575-4>

- Sojka, R., Lentz, R., Ross, C., Trout, T., Bjorneberg, D., & Aase, J. (1998). Polyacrylamide effects on infiltration in irrigated agriculture. *Journal of Soil and Water Conservation*, 53(4), 325–331.
- Sorze, A., Valentini, F., Dorigato, A., & Pegoretti, A. (2023). Development of a xanthan gum based superabsorbent and water retaining composites for agricultural and forestry applications. *Molecules*, 28(4), 1952. <https://doi.org/10.3390/molecules28041952>
- Supare, K., & Mahanwar, P. (2022). Starch-chitosan hydrogels for the controlled-release of herbicide in agricultural applications: A study on the effect of the concentration of raw materials and crosslinkers. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(6), 2448–2461. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02379-4>
- Suriyatem, R., Auras, R., & Rachtanapun, P. (2019). Utilization of carboxymethyl cellulose from durian rind agricultural waste to improve physical properties and stability of rice starch-based film. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(2), 286–298. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1343-z>
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal, M., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, 121, 102–117. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>
- Tabra, K., Arellano, E., Contreras, S., & Ginocchio, R. (2020). Evaluation of phytotoxic effects of cationic polyacrylamide polymers: implication for the use of sludges as organic soil amendments in assisted phytostabilization. *International Journal of Phytoremediation*, 22(10), 1068–1074. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1726870>
- Tang, J., Lin, N., Zhang, Z., Pan, C., & Yu, G. (2019). Nanopolysaccharides in emulsion stabilization. In N. Lin, J. Tang, A. Dufresne, & M. Tam (Eds.), *Advanced Functional Materials from Nanopolysaccharides*. Springer Series in Biomaterials Science and Engineering (pp. 221–254). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0913-1_6
- Thye, K., Wan, W., Balia, Z., Wee, C., Ong, J., Loh, J., Cheng, W., Lamasudin, D., & Lai, K. (2022). λ -Carrageenan promotes plant growth in banana via enhancement of cellular metabolism, nutrient uptake, and cellular

homeostasis. *Scientific Reports*, 12(1), 19639.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-21909-7>

Turioni, C., Guerrini, G., Squartini, A., Morari, F., Maggini, M., & Gross, S. (2021). Biodegradable hydrogels: evaluation of degradation as a function of synthesis parameters and environmental conditions. *Soil Systems*, 5(3), 47. <https://doi.org/10.3390/soilsystems5030047>

Tyler, B., Gullotti, D., Mangraviti, A., Utsuki, T., & Brem, H. (2016). Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 163–175.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.018>

Urtuvia, V., Maturana, N., Acevedo, F., Peña, C., & Díaz, A. (2017). Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 198.
<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>

Varghese, S., Rangappa, S., Siengchin, S., & Parameswaranpillai, J. (2020). Natural polymers and the hydrogels prepared from them. En Y. Chen (Ed.), *Hydrogels Based on Natural Polymers* (pp. 17–47). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00002-1>

Verhelst, A. (2021). Los Hidrocoloides alimentarios obtenidos a partir de productos vegetales. *Revista de Investigación Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 5(1), 39–44.

Wang, H., She, D., Fei, Y., & Tang, S. (2019). Synergic effects of biochar and polyacrylamide amendments on the mechanical properties of silt loam soil under coastal reclamation in China. *CATENA*, 182, 104152.
<https://doi.org/10.1016/j.catena.2019.104152>

Wang, X., Tang, D., & Wang, W. (2021). Characterization of *Pseudomonas protegens* SN15-2 microcapsule encapsulated with oxidized alginate and starch. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70(10), 684–692.
<https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1760270>

Whipple, W., & Zheng, H. (2014). Water-soluble free radical addition polymerizations: polyacrylamides. *Plastics Engineering*, 70(8), 44–48.
<https://doi.org/10.1002/j.1941-9635.2014.tb01232.x>

- Wiśniewska, M. (2018). High performance polymers and their nanocomposites. En V. P & S. A (Eds.), High Performance Polymers and Their Nanocomposites. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119363910>
- Xu, T., Zhu, W., & Sun, J. (2022). Structural modifications of sodium polyacrylate-polyacrylamide to enhance its water absorption rate. *Coatings*, 12(9), 1234. <https://doi.org/10.3390/coatings12091234>
- Yahia, Lh. (2015). History and applications of hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences*, 4(2), 1–23. <https://doi.org/10.4172/2254-609X.100013>
- Zainal, S., Mohd, N., Suhaili, N., Anuar, F., Lazim, A., & Othaman, R. (2021). Preparation of cellulose-based hydrogel: a review. *Journal of Materials Research and Technology*, 10, 935–952. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.12.012>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.017>
- Zhou, C., So, P., & Chen, X. (2020). A water retention model considering biopolymer-soil interactions. *Journal of Hydrology*, 586, 124874. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.124874>
- Zvinavashe, A., Laurent, J., Mhada, M., Sun, H., Fouda, H., Kim, D., Mouhib, S., Kouisni, L., & Marelli, B. (2021). Programmable design of seed coating function induces water-stress tolerance in semi-arid regions. *Nature Food*, 2(7), 485–493. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00315-8>

CAPÍTULO 2

RESULTADOS

Innovative JetCutter technology to scale the production of a solid *Bacillus pumilus* biofertilizer to transit to sustainable agriculture

(Artículo enviado a Journal of Agricultural and Food Chemistry el 25-09-2024)

Abstract

The immobilization of beneficial bacteria using innovative techniques like JetCutter has garnered attention in agriculture due to its high efficiency and production rate. This study focused on immobilizing *Bacillus pumilus* using alginate hydrogels with JetCutter to enhance water retention in soil and plant biostimulant properties. Key operational parameters, bacterial viability, auxin production, and microparticle effects were evaluated. Operating at 445 rpm and a flow of 6.55 g s^{-1} was critical for optimal immobilization matrix formation. The resulting dried microparticles ranged from 0.52 to 0.99 mm in size, with a water retention capacity of 67% w/w. After 180 days, cell viability was $2.61 \times 10^9 \text{ CFU mL}^{-1}$, with average auxin production of 162.02 and 208.94 $\mu\text{g g}^{-1}$, with and without L-tryptophan, demonstrating the effectiveness of this technique in maintaining

bacterial activity. These findings suggest that immobilization can be a valuable strategy in agriculture for enhancing plant resilience to water deficit conditions.

Keywords: *Hydrogel, water retention, phytohormone production, viability, plant growth-promoting bacteria.*

1. INTRODUCTION

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) have gained significant attention for their beneficial effects on plant growth by offering sustainable solutions to enhance plant growth, productivity, and resilience to environmental stresses (Hafeez et al., 2006; Martínez et al., 2021). Microbial biostimulants are associated with biological nitrogen fixation, phosphate solubilization, auxin production, and antibiotic production (Bhupenchandra et al., 2022). These principles can be applied in the context of adverse conditions such as heat stress (Cocetta et al., 2022), salinity (Bantis and Koukounaras, 2023; Elisa et al., 2023), and drought (Eswaran et al., 2024; Radzikowska et al., 2022).

The genus *Bacillus* comprises an important group of plant growth-promoting bacteria. These bacteria can produce resilient spores, enabling them to enhance their cell viability and survive in adverse environments (Etesami et al., 2023). Glick (2012) and de la Paz et al. (2023) emphasized the positive influence of *Bacillus pumilus* on plant growth, highlighting its ability to enhance mineral nutrition, phytohormone synthesis, and biocontrol properties. Güneş et al. (2014) assessed

the impact of diverse PGPR, including *B. pumilus* C26, which exhibited the lowest gibberellic and salicylic acid levels while displaying auxin production comparable to the other strains. Nevertheless, it has been demonstrated that the inoculation of *B. pumilus* C26 in bean plants results in increased seed yield and the number of pods per plant. However, more pronounced outcomes have been observed with the addition of humic acid and rock phosphate (Ozaktan et al., 2020). The impact of *B. pumilus* on plants in boron-toxic environments, particularly its ability to enhance antioxidant activity, has been documented (Sirajuddin et al., 2016). Additionally, this species has demonstrated efficacy in the biological control of phytopathogenic fungi (Dobrzyński et al., 2023). Its potential for use in soil bioremediation has also been investigated, as it has been shown to reduce the concentration of the pesticide chlorpyrifos in soil (Yadav et al., 2016).

Studies by Zheng et al. (2022) and Ariani et al. (2023) have shown that immobilization of *B. pumilus* can help maintain viable numbers of bacteria for extended periods, ensuring their long-term effectiveness in promoting plant growth. Immobilization technologies, such as those using alginate, provide a protective environment for bacteria, allowing them to survive and function optimally under harsh soil conditions, protecting them from environmental stress, and enhancing their rhizosphere colonization. This provides a practical approach for harnessing the potential of *B. pumilus* in sustainable agricultural practices.

Hydrogels can be used in agriculture because of their unique properties that benefit soil quality, water retention, and nutrient management. Hydrogels are recognized for their water-retention capabilities, which can enhance soil properties by improving water availability for plants and reducing fertilizer loss (Klein and Poverenov, 2020; Patel et al., 2023). The utilization of hydrogels in agricultural settings extends beyond water retention, encompassing the coverage and immobilization of plant growth promoters or nutrients. Additionally, controlled agrochemical release can be controlled through hydrogels, thereby offering a sustainable approach to nutrient management (Karoyo and Wilson, 2017; Kaur et al., 2023). It has been observed that the incorporation of hydrogels in the soil mitigates the effects of water deficit in plants (Arbona et al., 2005; Jamnická et al., 2013; Reddy et al., 2021), thus becoming a good alternative to improve the tolerance of plants to drought, which is an object of interest in different research (Yahia, 2015). Hydrogels are cross-linked, three-dimensional, hydrophilic polymer networks capable of absorbing and retaining large amounts of water. This ability is due to the presence of functional groups in their chain, such as hydroxyl (-OH), carboxylic (-COOH), amide (-CONH-), amine (-NH₂), and sulfonic (-SO₃H) groups (Thakur et al., 2018).

The use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) has been widely studied, as they play an essential role in plant tolerance to different stresses, where their immobilization allows the protection and survival of cells, as well as their slow release and greater benefits in plant growth (Saber et al., 2021).

Different polymers are usually used as matrices, highlighting natural polymers with biodegradability and biocompatibility properties, such as cellulose, starch, chitosan, carrageenan, and alginate (Madduma and Madihally, 2021; Varghese et al., 2020), the latter has several applications in agriculture (Martínez et al., 2022). Since its discovery, alginate has become an important industrial product, with applications in a range of industries. This polysaccharide is derived from brown algae and exhibits a random distribution of D-mannuronic acid and L-guluronic acid. The proportion of L-guluronic acid present is a key factor in determining the gel-forming properties of alginate, with higher levels of this acid leading to a more rigid gel (Sehgal et al., 2019).

There are several methods for obtaining hydrogel microparticles, the most basic and simplest of which is the drip extrusion method, in which a polymer solution is extruded through a nozzle and allowed to separate into droplets that fall into a gelling solution (Lee et al., 2013). Limitations of this technique include the size of the beads produced and their low throughput. Values for bead size ranged from 3 to 4 mm, whereas values for production capacity ranged from 50 to 250 mL h⁻¹. Consequently, advances have been made in producing smaller beads and in improving their performance. These advances include the use of magnetic fields, vibrations, and cutting tools (Bidoret et al., 2017; Ganesan et al., 2018). The electrostatic method allows the formation of small and uniform microparticles with a diameter < 50 µm, but its operation is more complex than that of the previous method, as several parameters have to be taken into account, the main limitation

being the high viscosity of the polymer (Manojlovic et al., 2006; Nedovic et al., 2006). The vibration method can increase the flow rate by approximately 100 times over the droplet method but with a polymer viscosity limit of > 200 mPa (Hunik and Tramper, 1993; Truong et al., 2021). Other techniques include the atomization method, in which the microparticles produced have controlled size, good sphericity, and good mechanical properties; however, their large-scale application is difficult due to process limitations (Chen et al., 2021), such as low output, overspray, material waste, high maintenance cost, and difficulty in controlling the spray pattern (Ali et al., 2021; Zafar et al., 2024).

Among the cutting tool methods, JetCutter® stands out as an innovative tool. This system is based on the fluid being forced out of a nozzle as a constant jet that is cut into cylindrical segments using a cutting tool consisting of several interconnected wires. The cut segments assume a spherical shape owing to the surface tension of the polymer when they fall into a gelling medium. There is a loss of polymer solution when the jet is cutting, which consists of a drag of the cutting wire and spraying of the segment ends due to the jet motion (Prüße et al., 1998b). This spray loss can be reduced depending on the cutting angle since it has been shown that a horizontal cutting tool generates more spray than an inclined one. Hence, the equipment has a lever to adjust the inclination of the cut to reduce or eliminate the spray loss, where the angle is given by the relationship between the fluid velocity and the cutting velocity (Prüße et al., 1998a).

To achieve a constant fluid flow, it is necessary to reach high velocities between 10 and 30 m s⁻¹, which translates into a high flow rate. This represents a significant advantage of this technique, as the bead production of this tool is considerably higher than that of other methods. For a concentration of 1 % w/w alginate, the expected yield for the JetCutter was 1.5 g s⁻¹, while in the electrostatic and vibration methods it was 0.004 and 0.17 g s⁻¹, respectively. Furthermore, the viscosity of the polymer is not a limiting factor, which allows for the use of high-viscosity fluids. This technique can be applied at the industrial and laboratory scales (Prüsse et al., 2008; Prüße et al., 2000). To obtain microparticles with a given diameter, various parameters such as nozzle diameter, fluid velocity, cutting velocity, and the number of wires in the cutting tool, must be considered (Prüße et al., 2002). Microparticles of the same diameter can be produced with different nozzle diameters and can be cut into short, thick cylinders or long, thin cylinders with the same volume (Pruesse and Vorlop, 2004).

Many of these microparticle production techniques have been developed to produce in laboratory conditions and on a relatively small scale. Using JetCutter facilitates the scaling-up of biofertilizer production to an industrial level (Schoebitz et al., 2013). The impact of diverse biopolymers and operational variables on particle morphology and dimensions in the JetCutter has been investigated, enabling the identification of the requisite operational parameters for the formation of particles of a specific size for each polymer (Paulo et al., 2024). The tool has been employed in the large-scale production of alginate-encapsulated liver cell

spheroids for the treatment of hepatic renal failure, facilitating the expeditious delivery of high-volume cell therapies (Brookshaw et al., 2024), also has been used in the production of drug carrier particles (El Allaoui et al., 2023; Méndez et al., 2023; Wang and Hu, 2021). High yields of JetCutter are associated with high mechanical stress, so when encapsulating live cells, their viability could be affected by the stresses generated, but it was possible to immobilize viable fibroblast cells in an alginate matrix with high yields (Schwinger et al., 2002). Also, the potential of the JetCutter to immobilize organic compounds with high yields has been highlighted (Chaves et al., 2023).

Hence, this study aimed to develop a biofertilizer based on natural polymers using the JetCutter tool by determining the operating parameters of the equipment and the physiochemical characteristics of the beads, assessing the immobilization of *B. pumilus*, and assessing plant performance under reduced watering conditions. It is our understanding that this would be the first instance of utilizing this equipment to produce an agricultural biofertilizer.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents and materials

Sodium alginate with a medium content of L-guluronic acid (MGA) from Gelymar (Puerto Montt, Chile), potato starch from Prosecor (Purranque, Chile), distilled

water, CaCl₂ as a cross-linking agent, NaCl and tryptophan were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Microbiological analysis was performed using the Biological Safety Cabinet Class II Type A2 Model JSCB-1200SB (JS Research Inc., Cheongju, Korea). The bacterial strain used was *Bacillus pumilus*, which was obtained from the Banco de Recursos Genéticos Microbianos of INIA-Chillán, Chile, for its growth, a Shaking Incubator JSSI-100 Series (JS Research Inc., Cheongju, Korea) and a Memmert ICO150 incubator (Schwabach, Germany). The media used were plate count agar, nutrient agar, and trypticase soybean broth (TSB), acquired from Becton Dickinson BD (Wokingham, UK). Sodium citrate was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ultra-Turrax IKA T-18 (IKA, Sao Pablo, Brazil) was used to homogenize the polymer solutions, and a forced convection oven DK-500DT DK-600DT (Yihder Co., Xinbei, China) was used to dry the microparticles.

2.2. Production of bacterial biomass

Bacterial biomass production by *B. pumilus* was determined according to the methodology described by Benítez et al. (2024). A colony of bacteria was isolated on a Petri dish with plate count agar and allowed to grow for 24 h at 28 °C in an incubator. The isolated bacteria were seeded onto a Petri dish containing nutrient agar and allowed to grow for 24 h at 28 °C in an incubator. In a 1 L flask, 400 mL of a solution of sterile trypticase soybean broth was prepared, and four grids and

L-tryptophan were added to a final concentration of 0.2 g L⁻¹. The mixture was incubated with shaking at 140 rpm for 24 h at 28 °C.

2.3. Preparation of the polymer solutions

A solution of alginate with a medium content of L-guluronic acid at 2.5 % w/w and 1.0 % w/w potato starch was prepared in distilled water. This concentration combination was found to be the most suitable for the microparticle formulation, as reported by Benítez et al. (2024). The alginate was dissolved in distilled water at 60 °C with continuous stirring for 15 min, and starch was added with stirring until it dissolved. To homogenize the mixture, an Ultra Turrax IKA T-18 disperser was used at 10000 rpm for 15 minutes until completely dissolved, and the resulting solution was allowed to cool to room temperature.

2.4. JetCutter setup

A JetCutter Type S device with a nozzle of 0.9 mm in diameter and a cutting tool with 16 wires of 0.59 mm in diameter (Figure 1), and an eccentric screw pump from geniaLab® (Braunschweig, Germany) were used to form the microparticles.

JetCutter tool parameters were set for each polymer concentration. The fluid velocity at different bomb operating velocities was determined. This was done by measuring the density of each polymer solution and the time it takes 100 mL of fluid to pass through the nozzle at different bomb velocities: 300, 600, 900, and

1200 rpm, to obtain the flow rate (Q) in $\text{cm}^3 \text{s}^{-1}$. The measurements were performed in triplicate. The fluid velocity was calculated using equation (1):

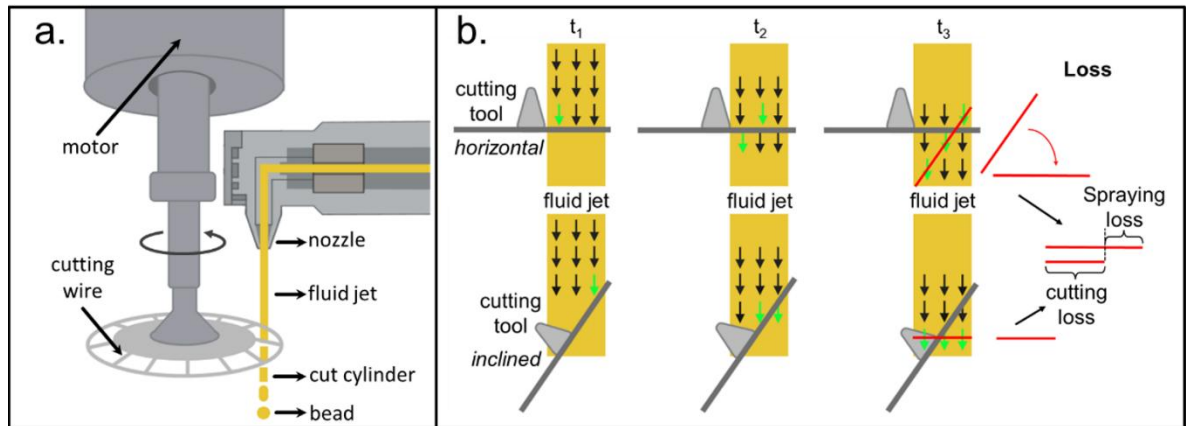
$$\text{Fluid velocity (m s}^{-1}\text{)} = \frac{Q}{\pi * \left(\frac{D_N}{2}\right)^2 * 100} \quad (1)$$

Where D_N is the nozzle diameter (0.9 mm). Yield in g s^{-1} was calculated from equation (2):

$$\text{Yield (g s}^{-1}\text{)} = Q * \rho \quad (2)$$

Where ρ is the fluid density in g mL^{-1} .

Figure 1. JetCutter technology. a) Scheme with operational workflow and b) diagram of fluid losses caused by the shear angle.



Fuente: Elaboración propia.

To prevent spray losses during the jet cut, the angle of inclination of the cutting tool (α) was calculated using the equations (3) (Prüße et al., 1998a), where V_f is fluid velocity and V_w is wire velocity:

$$\alpha = \arcsin\left(\frac{V_f}{V_w}\right) \quad (3)$$

2.5. Determination of the optimal cross-linking time

1.5 L of the polymer solution was prepared and injected into the JetCutter at a velocity of 10 m s⁻¹. The cutting tool velocity was adjusted so that the ratio of fluid velocity to cutting tool speed resulted in a coefficient of 1 and the process was allowed to run for three minutes. The cut segments were placed in a 2.5 % (w/w) aqueous CaCl₂ solution at a mass ratio of 1:5 (polymer solution:CaCl₂ solution). The resulting microparticles were left in CaCl₂ solution for 5–30 min. Finally, 150 g of bead sample were removed every 5 min with a sieve to be washed with 0.85 % w/w NaCl solution (for 20 min at 140 rpm). Subsequently, the microparticles were then dried in an oven at 30 °C for 36 h. The optimal crosslinking time was determined by conducting measurements of water retention capacity (WRC), particle size distribution, and roundness on the previously obtained microparticles. This was done to identify the time with the highest WRC values and the most homogeneous size distribution and roundness, which were then used for immobilization.

2.6. Water retention capacity, particle size distribution, and particle roundness

An initial dry mass (m_S) of 1 g of microparticles was placed in a 50 mL Falcon tube, 30 mL of distilled water was added, and then the system was agitated for 24 h at 25 °C and 140 rpm. After this time, the rehydrated microparticles were collected on filter paper, and after removing the excess water, they were massaged to obtain the wet mass (m_W). The water retention capacity (WRC) was calculated using an equation according to Khodadadi and Shamsnia (2020) (3):

$$WRC (\% w/w) = \frac{m_W - m_D}{m_W} \times 100 \quad (3)$$

The measurements were performed in triplicate.

The diameter and size distribution of the microparticles and dry biofertilizers were determined using the ImageJ® software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). To obtain scaled images of the particles, the surface area of 50 microparticles was measured, and the average diameter of each bead was calculated using equation (4):

$$D = 2 \sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (4)$$

Where D is the diameter and A is the particle area.

Finally, to study particle roundness three diameters, maximum ($i = 1$), average ($i = 2$), and minimum ($i = 3$), were determined on 10 microparticles and dry biofertilizers using the ImageJ® tool. The roundness was calculated using equation (5) (Wadell, 1932):

$$Roundness = \sum_i^N \frac{r_i}{NR}$$

Where r_i corresponds to one of the measured radios ($i = 1, 2, 3$), R is the maximum radius of the circle inscribed in the longitudinal section of the particle and N is the number of measured radio ($N = 3$). Particles were considered "spherical" if their roundness value was greater than 0.75.

2.7. Microbial inoculant immobilization

The polymer solution was prepared as described above and separated into two samples: one with L-tryptophan (0.2 g L^{-1}) and the other without L-tryptophan because L-tryptophan is a precursor of auxins in bacteria (Yasmin et al., 2017). The separated solutions were injected into the JetCutter at a bomb velocity of 445 rpm. The velocity of the cutting tool (geniaLab®, Braunschweig, Germany) was set so that the ratio of the fluid velocity to the cutting tool velocity was 1. The resulting microparticles were left in a CaCl_2 solution for the previously determined optimal cross-linking time. The formed microparticles were then removed and subjected to agitated washing in 0.85 % w/w NaCl solution for 20 min at 140 rpm.

After washing, microparticles were spread on the trays and exposed to UV radiation for 30 min to reduce contamination. They were then suspended in a flask containing bacterial culture broth at a ratio of 1:4 (grams of microparticles:milliliter of culture broth) with agitation for 30 min at 28 °C and 140 rpm. Finally, the resulting biofertilizer was removed from the culture broth, placed in trays on Kraft paper, and dried in an oven at 30 °C for 24 h.

2.8. Scanning electron microscopy

The dried microparticles and biofertilizers were observed using scanning electron microscopy (SEM) (Philips XL30ESEM, Amsterdam, Netherlands). To visualize *B. pumilus*, the biofertilizers were placed in a solution of glutaraldehyde (2.5 % v/v) in sodium cacodylate buffer at pH 7.2 and 4°C for 7 days. They were then washed with sodium cacodylate buffer solution (0.1 mol L⁻¹) for 10 min in duplicate and dehydrated by placing them in ethanol for 10 min on increasing scales (30, 40, 50, 50, 70, 80, 90, and 100 %) (Benítez et al., 2024; Glauert, 1980). They were mounted on aluminum supports with double-sided adhesive tape and coated with a metallic layer of gold. Particle morphology was determined at a field emission of 3 kV and magnifications ranging from 50 to 800x.

2.9. Bacterial load determination

Inside the laminar flow chamber, two samples (1 mL) of the culture broth containing the bacteria were separated into Eppendorf tubes. Bacterial load was determined by microdilution as described by Benítez et al., (2024), where 100 µL of each sample was extracted and placed separately in an Eppendorf tube containing 900 µL of NaCl solution at 0.85 % w/w, which is a dilution factor of 10^{-1} . The solution was homogenized in a vortex apparatus, and then 100 µL was extracted and added to another tube containing 900 µL of 0.85% w/w NaCl solution, giving a dilution factor of 10^{-2} . The same steps were repeated to obtain eight dilutions of the culture broth with dilution factors of 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , and 10^{-8} . Subsequently, 10 µL of each dilution was inoculated into a plate of Plate Count Agar and divided into three sections, resulting in three replicates for each dilution. After drying and adhering to the agar, they were incubated at 28 °C for 24 h to count the colony-forming units (CFU). The bacterial load was calculated using the following equation:

$$\text{Bacterial load of medium (CFU mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Colonies number}}{DF * 0.01} \quad (5)$$

Where *DF* is the dilution factor at which the colonies were counted.

2.10. Immobilization capacity and cell viability in storage

0.1 g of biofertilizer was dissolved in 10 mL of sterile sodium citrate solution (Sigma, Aldrich, Canada) at a concentration of 60 g L⁻¹ in sterile 15 mL Falcon tubes under agitation for 24 h at 28 °C and 140 rpm in triplicate, according to Benítez et al. (2024). The resulting solutions were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatant was discarded. 100 µL of the resulting pellet was diluted with 900 µL of NaCl solution at 0.85% w/w and the bacterial load of the biofertilizer was determined in CFU mL⁻¹ by microdilution on Plate Count Agar incubated at 28 °C for 24 h. The immobilization efficiency (*IE*) was measured using equation (6):

$$IE (\%) = \frac{\text{Bacterial load of the microparticles}}{\text{Bacterial load of the medium}} * 100 \quad (6)$$

The viability of the bacteria during storage was evaluated by quantifying the bacterial load on the microparticles, as previously described, at five-day intervals until day 30. The measurement was performed in triplicate.

2.11. Auxin production

As reported by Benítez et al., (2024), based on modifications by Pan et al., (2010) and Prasad et al., (2010), 0.1 g of biofertilizer were dissolved in 10 mL of sodium citrate solution at 60 g L⁻¹ and incubated for 24 h at 28 °C and 140 rpm. Subsequently, a solution of indole 3-acetic acid (IAA) at a concentration of 10 ppm

in methanol and 0.4 % v/v of HCl was combined with 1 mL of the dissolved biofertilizer solution in a 1:1 volume ratio. The mixture was then centrifuged at 7,000 rpm for 10 min at 4 °C and the supernatant was filtered through a 0.22 µm pore syringe filter. Finally, the extract was injected into a Primaide HPLC system (Hitachi, Tokyo, Japan) to quantify the auxin content. Measurements were performed at five-day intervals until day 30, and three replicates were performed.

2.12. Growth chamber experiments

2.12.1. Inoculation Bioassays

A completely randomized design trial was conducted using wheat seedlings, with each formulation applied to three pots per treatment plus a control. Seeds were first disinfected in a 0.5 % (v/v) sodium hypochlorite solution with agitation for 30 min, washed with potable water, and drained. Seed germination was carried out in an incubation chamber in sterile Petri dishes and filter paper, and kept at 28 °C for 5 days. Three seedlings were placed in each pot with 100 g of sterile Andisol (volcanic soil), watered to field capacity, and then weighed. After 48 h, the pots were weighed again, and the evapotranspiration of the pots was determined. The treatments were applied in each pot: only soil with 100 % of irrigation (*Ck* 100%), only soil with 50 % of irrigation (*Ck* 50%), soil + 0.1 g of microparticles with 50 % of irrigation (*Mx* 50%), soil + *B. pumilus* pellet diluted to 7 logs (*B.p.* 50%), soil + 0.1 g of biofertilizer with L-tryptophan (*w – Trp* 50%) and without L-tryptophan

(*wt – Trp* 50%) with 50 % of irrigation. Irrigation corresponded to evapotranspiration and was replaced with distilled water every two days. After 15 days, the plants were harvested, and the roots were gently rinsed three times with distilled water, dried for 24 h at 70 °C in an oven, and stored in paper envelopes. The following plant parameters were measured: seedling length, dry weight, total root length, root volume, and root surface area. Seedling length and dry weight were separated by the length of the leaves and roots. The term "root length" refers to the depth of the roots, while the "total root length" is the sum of the lengths of all roots. Root parameters were measured by scanning the samples using WinRHIZO Reg software (Regent Instrument Inc., Canada).

2.12.2. Effect of biofertilizers on the water retention capacity of the soil

The effect of biofertilizers on the water retention capacity of the soil (WRC_s) was carried out following the study of Wang et al., (2012). The soil used in this study was obtained from the Santa Rosa experimental station of INIA Quilamapu (Chillán, Chile), which is classified within the Diguillín series and exhibits a silty clay texture. It is situated within the Andisol order. In 6 PVC tubes of known mass, 4.5 cm in diameter and 11 cm in height, with one end covered with qualitative filter paper, 130 g of a homogeneous mixture of sterile dry soil with biofertilizers in different percentages: 0, 1, 2, 3, 4, and 5 % w/w were introduced into each of them. Water was slowly added to each tube for 30 min and the tubes were allowed

to drain. When the water stopped falling, the tube-mixture-water system was massaged at 24 °C, taking this data as time zero. Each tube was massaged every 24 h for five days. The WRC_s was calculated according to the equation (7) (Wang et al., 2021):

$$WRC_s(\% \text{ w/w}) = \frac{m_{WM_t} - m_{DM}}{m_{WM_0}} \times 100 \quad (7)$$

Where m_{WM_t} is the wet mass of the mixture at a given time ($t = 0, 1, 2, 3, 4,$ and 5 days), m_{DM} is the dry mass of the mixture, and m_{WM_0} is the wet mass of the mixture at time zero. Each treatment was replicated three times. The growth chamber conditions were a 16:8 h (day:night) cycle, 60 % humidity, and 24 °C temperature.

2.13. Statistical management

The R software was employed to analyze the data of the microparticle parameters and soil study. The ranges of the variables to be controlled and the maxima and minima of the response variables were evaluated using analysis of variance (ANOVA) at a significance level of $p < 0.05$. The Tukey's multiple comparison test was used to ascertain significant differences. The diameter, water retention capacity, viability, and bacterial load values were expressed as mean \pm standard deviation (SD).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. JetCutter setup

Among the parameters obtained, correlation curves were established between the variables for medium guluronic alginate (MGA) with their respective equations for calculating the pump operating velocity at a given fluid velocity (Figure 2). As the pump velocity increases, the flow rate and fluid velocity increase, and the fitted equations have R^2 values between 0.99 and 1, so they predict the variables very accurately. According to Table 1, the velocity at which the pump must work to reach a fluid velocity of 10 m s^{-1} increases as the alginate concentration increases, which suggests an increase in the viscosity of the solution. However, for the polymer solution composed of alginate and starch, the data show a decrease in the pump velocity required to reach a fluid velocity of 10 m s^{-1} and yield. This implies a thinning effect in the range of pump velocity evaluated (300 to 1200 rpm) by incorporating starch, which suggests a different reordering of the structure of the blend compared with the alginate solution when applied at a shear rate.

The fact that the yield suffers a decrease when its density is higher, related to the alginate solution, implies a larger or easier incorporation of air in the blend when it is fluidized or extruded through the nozzle.

Table 1. Densities of the different polymer solutions, pump velocity to reach a fluid velocity of 10 m s^{-1} (V_{p10}), and yield (Y) with a nozzle diameter of 0.9 mm.

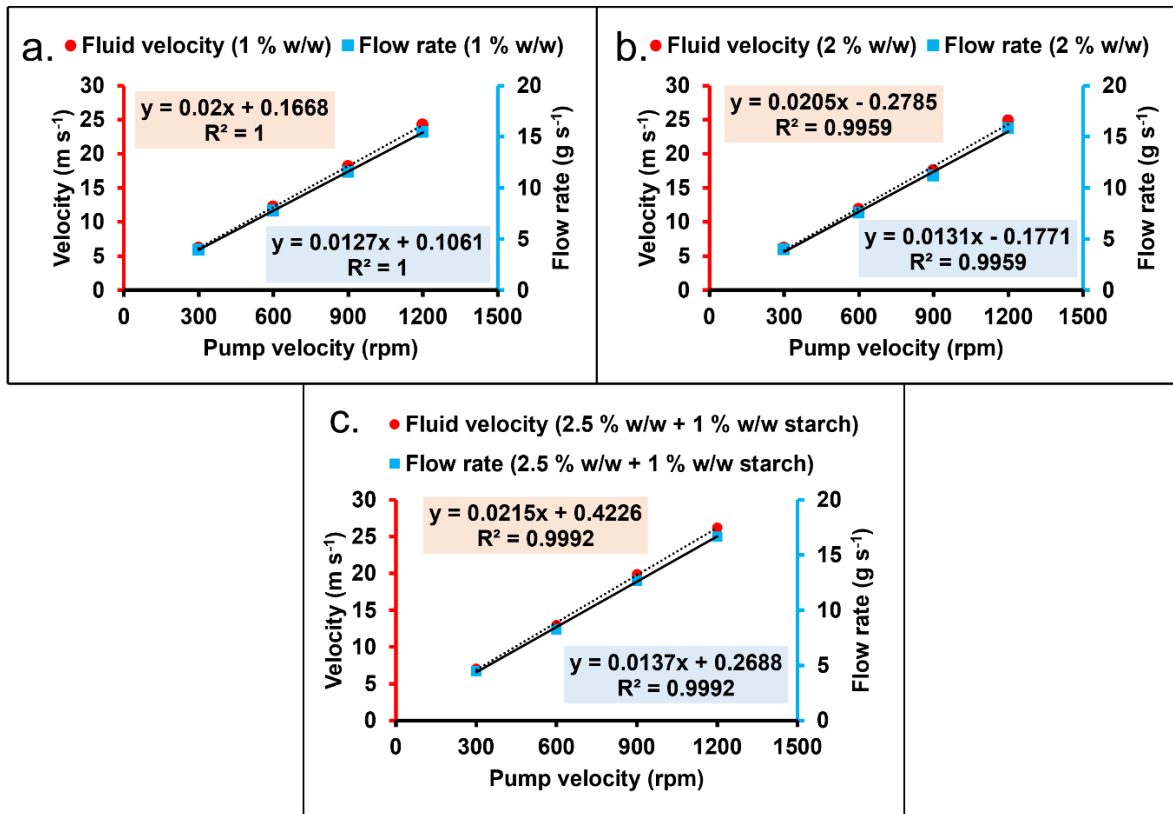
Matrix	Concentration (% w/w)	r (g mL⁻¹)*	V_{p10} (rpm)	Y (g s⁻¹)
MGA	1	0.9912	491	7.00
	2	0.9989	501	7.22
MGA + Starch	2.5 MGA + 1 Starch	1.0280	445	6.55

*r = fluid density

Fuente: Elaboración propia.

The yields calculated using the model postulated by Prüße et al. (1998c) are reported, indicating that this technique has great potential for scalability (Table 2). These results refer to one unit of JetCutter type S, which requires an area of approximately 1 m^2 for operation. That means using several devices to cut multiple jets to feed a sizeable agitated tank containing the crosslinking solution. However, the loss of the polymer solution by cutting can be recirculated, increasing the efficiency of the process (Prüße et al., 1998a). A previous work demonstrated that the drying time could be reduced to 30 min using a drying tower with air at ambient temperature and a pressure of 856 Pa to obtain dry macroparticles of chitosan-tripolyphosphate-urea formed by extrusion (Giraldo and Rivas, 2019).

Figure 2. Correlation curves between pump velocity, flow rate, and fluid velocity of medium L-guluronic alginate at different concentrations. a) 1 % w/w, b) 2 % w/w, and c) 2.5 % w/w + 1 % w/w of starch.



Fuente: Elaboración propia.

Table 2. Production yields of microparticles operating the JetCutter at optimal parameters.

Microparticles (units s ⁻¹)	Wet mass (kg h ⁻¹)	Dry mass (kg day ⁻¹)*	Loss (% v/v)
944	19.53	3.90	16.38

*Considering the drying time used in the reported methodology.

Fuente: Elaboración propia.

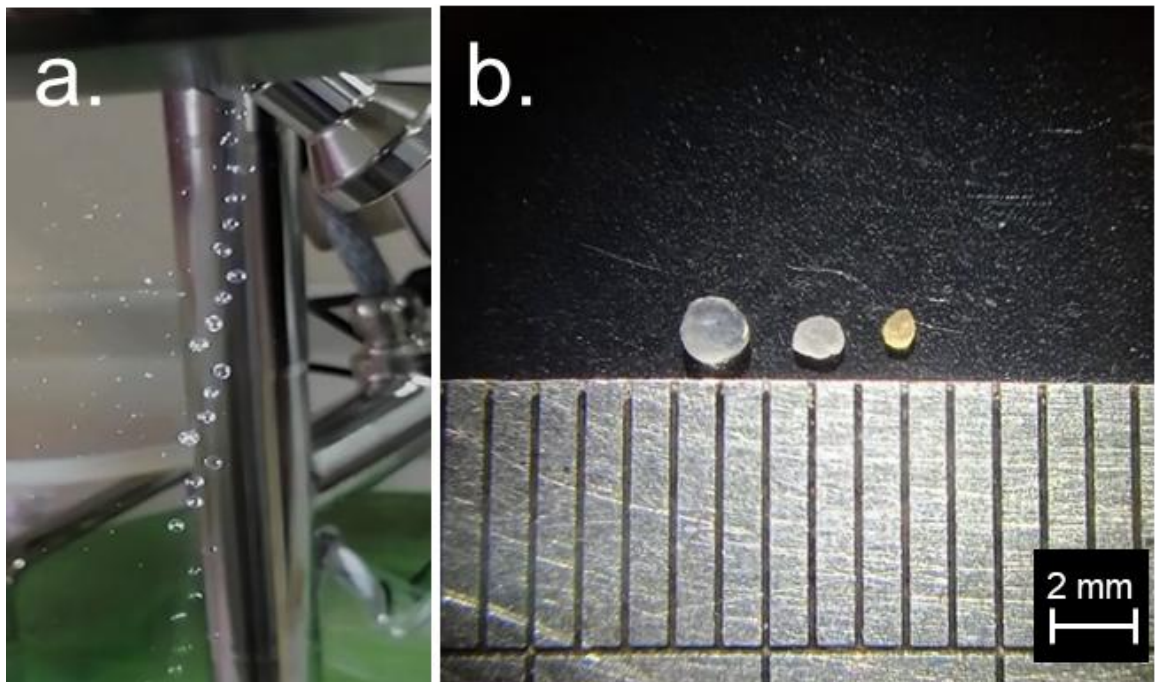
3.2. Determination of optimum cross-linking time

Determining the optimum cross-linking time in the JetCutter study provided crucial insights into the production of homogeneous and spherical particles with varying water retention capacities. The jet inclination was adjusted to 2.45° to reduce spray losses and achieve a homogeneous jet (Figure 3.a). The obtained particles exhibited a homogeneous spherical shape, decreasing most of their size during drying and gaining a little when rehydrated (Figure 3. b).

In accordance with the model proposed by Prüße et al. (1998a), the estimated diameter of the microparticles is 2.21 mm. The diameter of the newly formed microparticles ranged from 1.37 to 2.42 mm, with a mean of 1.82 ± 0.07 mm close to the projected diameter, while the diameter distribution of the dried particles ranged from 0.52 to 0.99 mm, with a mean of 0.75 ± 0.04 mm. However, the roundness of the particles at different cross-linking times was greater than 0.9, indicating that the particles were spherical (Figure 4.a, b, and c). The formation of small microparticles is associated with a high degree of roundness. This phenomenon can be ascribed to the ratio of the external surface area of the microparticle to its volume (external surface area:volume). This ratio is higher in microparticles of a smaller size than in those of a larger size. This enables the gelled external surface to offer a more stable platform for the spherical shape,

thus preventing deformation when the microparticle falls into the gelling solution (Preibisch et al., 2018; Schroeter et al., 2021).

Figure 3. Jet cut and microparticles formation. a) Segments of the alginate jet cut by the wires and falling in small drops and (b) the obtained microparticles (wet, rehydrated, and dry), from left to right.



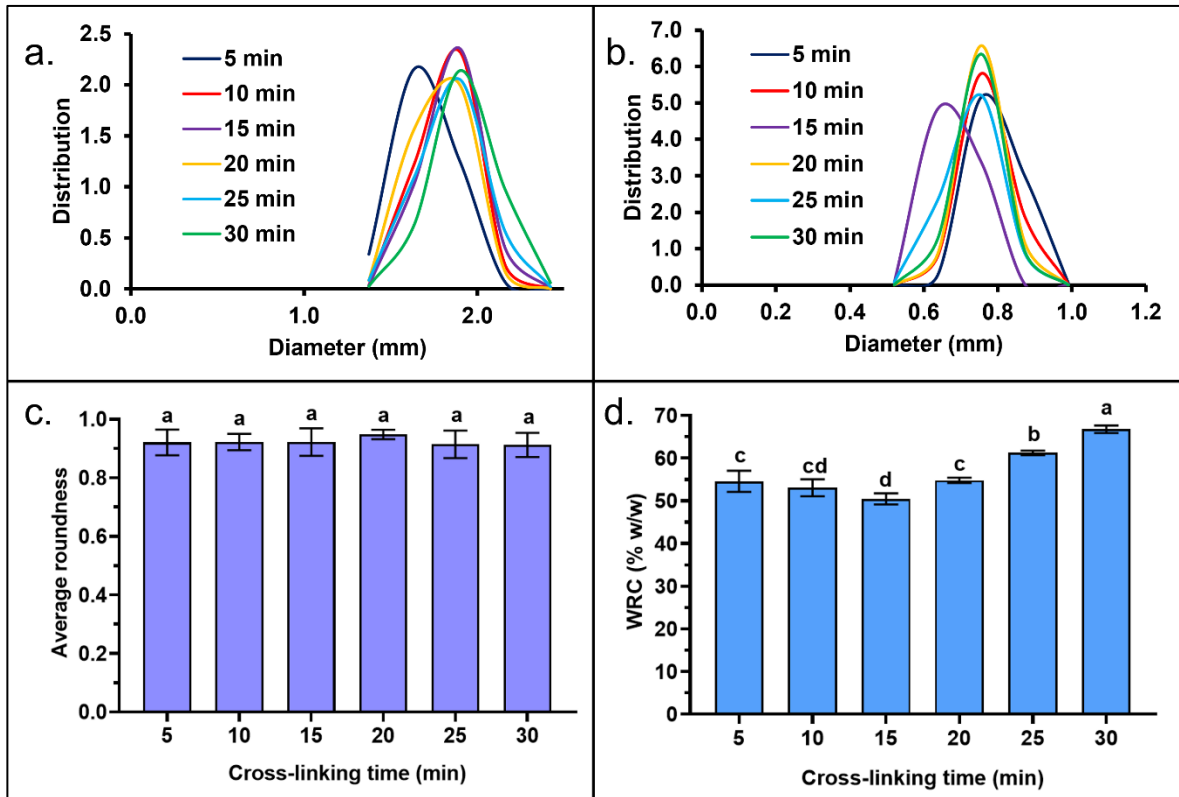
Fuente: Elaboración propia.

The water retention capacity of microparticles varied depending on the cross-linking time. Figure 4.d shows that the lowest water retention values occurred between 5 and 20 min of cross-linking, with a minimum of 50.47 ± 1.32 % w/w at 15 min. At 25 min, the water retention increases to 61.24 ± 0.52 % w/w, and the highest water retention of 66.80 ± 0.89 % w/w was obtained at 30 min. Because

of the small size of the microparticles and their similar roundness at different times, the optimum cross-linking time was 30 min, which was the time at which the highest water retention capacity of the microparticles was obtained. The degree of cross-linking of a polymer has been demonstrated to influence the water-retention capacity of hydrogels, where the duration of cross-linking is a crucial factor (Iliasov et al., 2023; Perez and Francois, 2016). An increase in cross-linking time has been observed to reduce the degree of hydrogel swelling (Doderio et al., 2019; Li et al., 2022). The gelation time varied depending on the concentration of alginate and the cross-linking agent. In this case, 30 min of crosslinking allowed more alginate to fixate to the matrix, which signified increased water retention capacity of the resulting materials (Bjørnøy et al., 2016). The optimization of the cross-linking time to achieve maximum water retention capacity is crucial for applications requiring efficient water absorption and retention, as demonstrated in this JetCutter study. By understanding the relationship between cross-linking duration and particle characteristics, future studies can tailor their processes to achieve the desired particle properties for various applications, such as drug delivery systems, environmental remediation, and agricultural practices.

Figure 4. Size distribution of microparticles at different cross-linking times: a) wet microparticles and b) dry microparticles. c) average roundness of microparticles and d) water retention capacity of microparticles according to cross-linking time.

Different letters represent significant differences compared with Tukey's multiple comparison test at $P \leq 0.05$.



Fuente: Elaboración propia

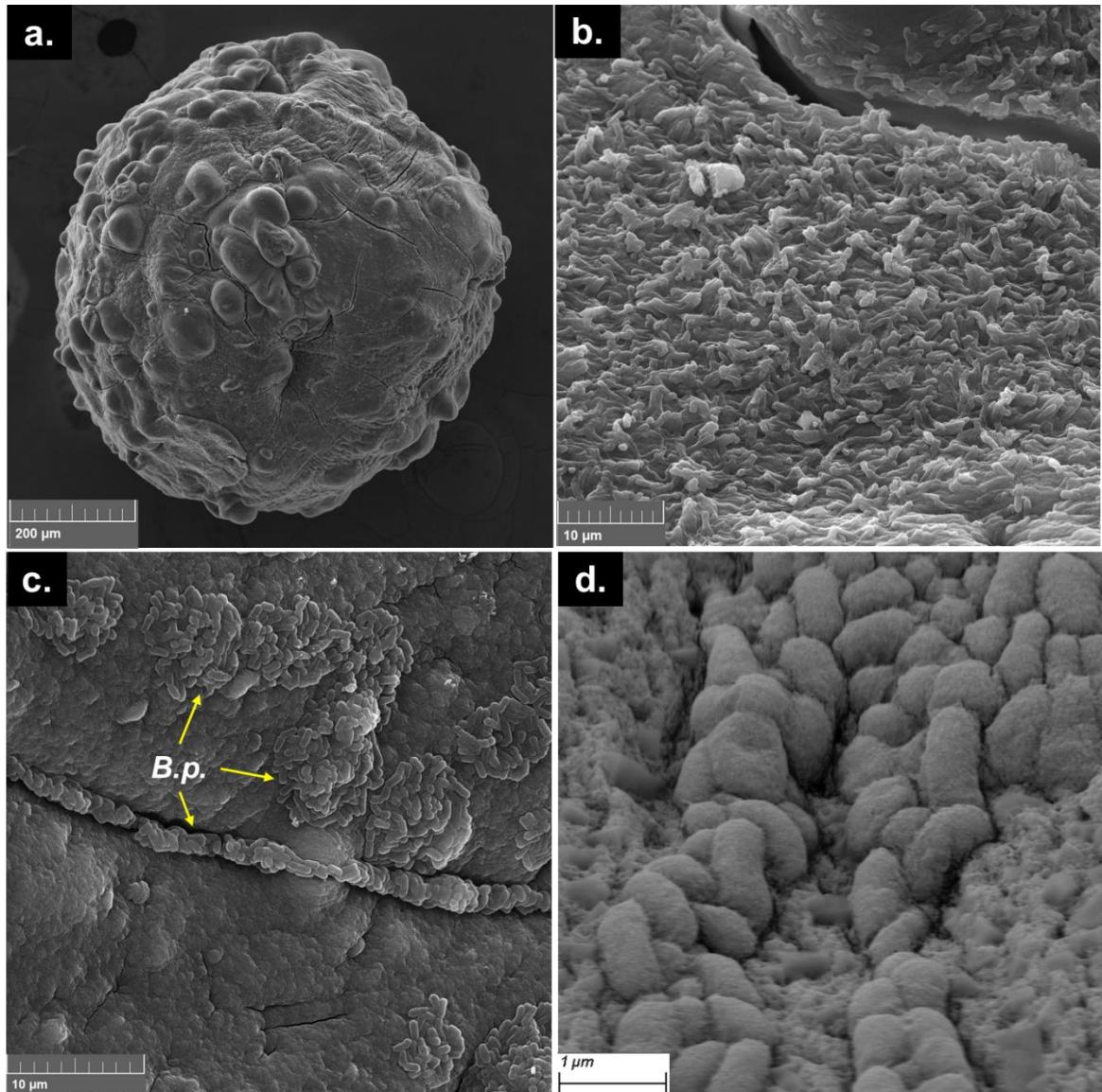
3.3. Bacterial immobilization capacity and viability

Bacterial immobilization in the hydrogel is presented in Figure 5. The bacteria formed a film that covered the surface of the microparticles and was positioned in their crevices. Before immobilization, the bacterial load of the *B. pumilus* broth was $7.61 \times 10^{12} \pm 3.93 \times 10^{11}$ CFU. Following immobilization, the biofertilizers

exhibited a final bacterial load of $4.08 \times 10^{11} \pm 9.86 \times 10^{10}$ CFU, corresponding to an immobilization efficiency of 5.36 ± 0.90 %.

On the other hand, Figure 6 illustrates the temporal variation in the bacterial viability of the biofertilizer. It can be observed that the formulation with L-tryptophan maintains a consistent bacterial content over time. In contrast, the formulation without L-tryptophan exhibited a variable bacterial load that tended to decline after 20 days. This suggests that the presence of L-tryptophan in the formulation provided greater stability to the bacterial content during the first month of storage. A bacterial count was conducted on biofertilizer stored for six months, yielding a $2.61 \times 10^9 \pm 3.83 \times 10^8$ CFU mL⁻¹ of viable bacteria. This is consistent with the goals of bacterial immobilization, as it protects bacteria from external agents and improves storage conditions, thereby maintaining bacterial load and increasing shelf life (Dianawati et al., 2016; Gagné et al., 2015; Qiu and Anselmo, 2021; Serna and Vallejo, 2013). These results underscore the importance of formulation components in maintaining bacterial viability and stability over extended periods, which is crucial for applications that require prolonged bacterial activity.

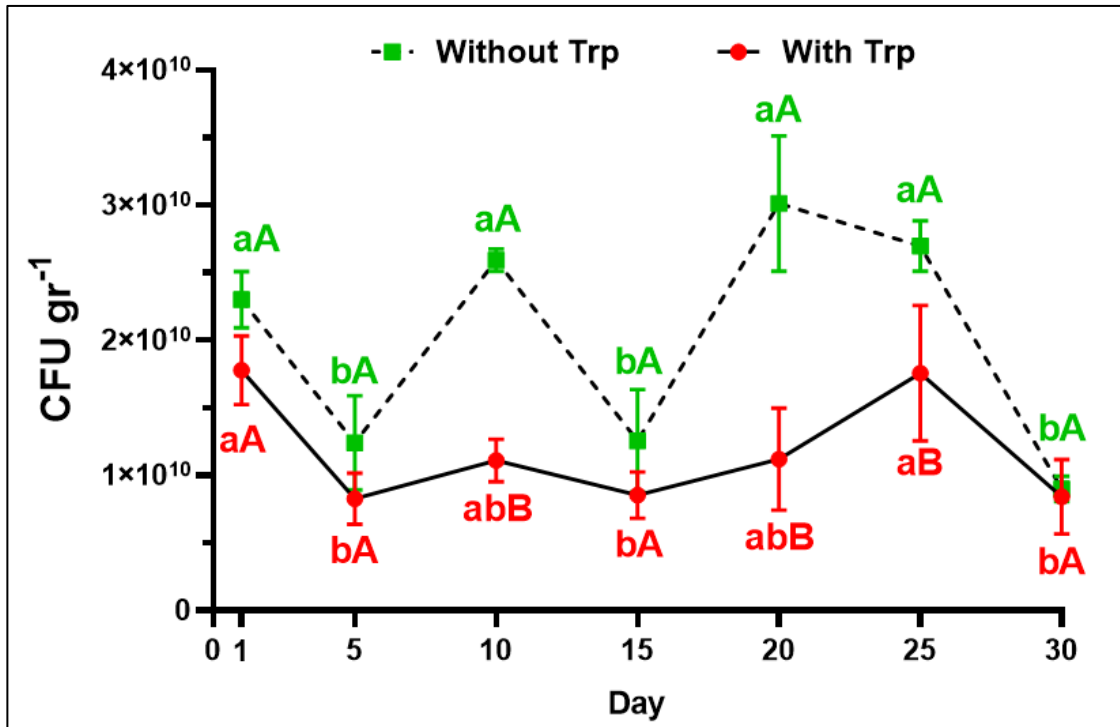
Figure 5. SEM micrographs. a) Complete biofertilizer, b) bacteria on the surface of the bead, c) bacteria in a crack of the polymer matrix, and d) agglomerations of bacteria.



Fuente: Elaboración propia.

Figure 6. Viability of *B. pumilus* C26 in biofertilizer in storage with and without L-tryptophan (Trp). Different lowercase letters represent significant differences in day variable in same with and without L-tryptophan variable, and different capital

letters represent significant differences in with and without L-tryptophan variable in same day, compared using Tukey's multiple comparison test at $P \leq 0.05$.



Fuente: Elaboración propia.

3.4. Auxin production

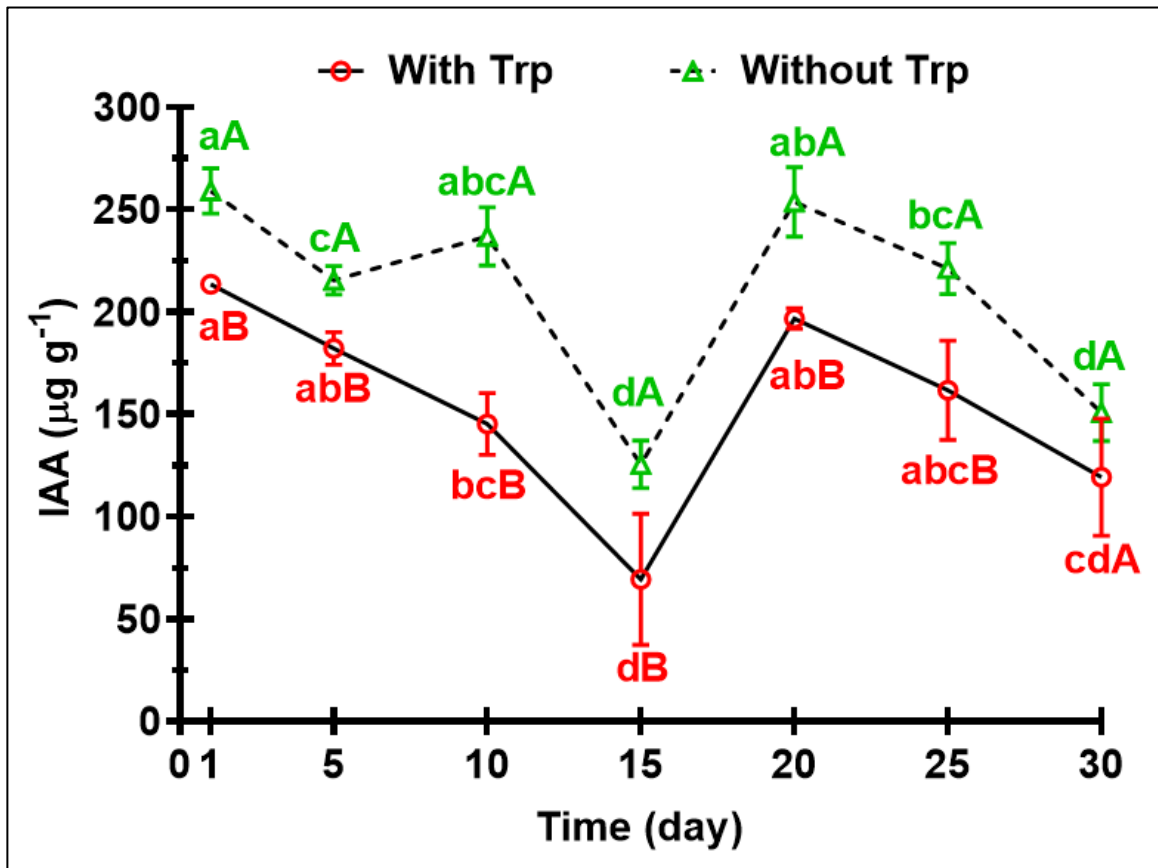
Both, L-tryptophan and non-tryptophan-containing biofertilizers exhibit a symmetrical response to auxin production, which undergoes a pronounced decline at 15 days, followed by a modest increase at 20 days and a subsequent decline until 30 days (Figure 7). Significant differences in auxin production were observed only between day 15 and the others, except on day 30, for biofertilizer without L-tryptophan. Conversely, in biofertilizer with L-tryptophan, significant

differences were observed between days 15 and 1 and days 1 and 5. The mean auxin production by the microparticles biofertilizers over a one -month of storage period was $162.02 \pm 50.89 \mu\text{g gr}^{-1}$ for those with Trp and $208.94 \pm 51.37 \mu\text{g g}^{-1}$ for those without Trp. During the first 15 d, the auxin level dropped significantly, then rose close to the initial level, and then dropped again. Auxins in bacteria function as signaling and interaction molecules (Spaepen and Vanderleyden, 2011). If IAA is not used, bacteria can deal with it in different ways: degradation, excretion, or storage in less active forms (Laird et al., 2020). Therefore, variations in the IAA content of the biofertilizer during storage could be due to the bacteria trying to maintain a balance in the IAA content.

There is a clear difference in auxin content between the presence and absence of L-tryptophan, being higher in the absence of L-tryptophan at days 10, 20, and 25. Although there are bacteria capable of producing auxins in the absence of tryptophan (Dashti et al., 2021; Goud et al., 2024), this contradicts the findings of several studies, where there is a positive relationship between the presence of L-tryptophan and the production of indole acetic acid by bacteria (Barazani and Friedman, 2000; Noor et al., 2023; Yasmin et al., 2017). Thus, the steps of the immobilization method used in this study could alter the incorporation of L-tryptophan and/or its effect on IAA biofertilizer production.

Figure 7. Indol-3-acetic acid (IAA) production from biofertilizer with and without L-tryptophan. Different lowercase letters represent significant differences in day

variable in same with and without L-tryptophan variable, and different capital letters represent significant differences in with and without L-tryptophan variable in same day, compared using Tukey's multiple comparison test at $P \leq 0.05$.



Fuente: Elaboración propia.

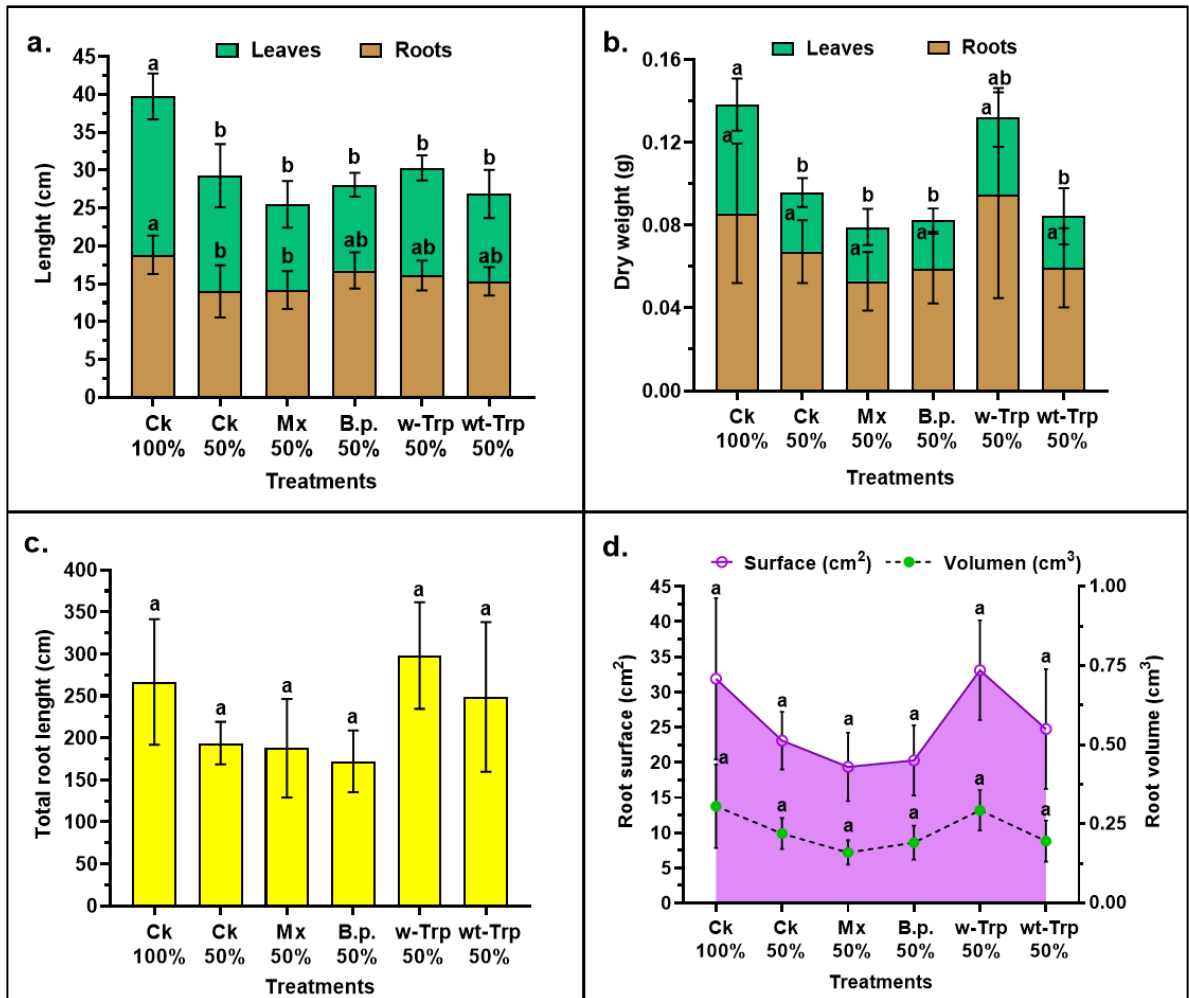
3.5. Growth chamber experiments

3.5.1. Related to Inoculation bioassay

Photographs taken by Whinrizo of the roots of the seedlings in the different treatments are shown in Figure S2. Figure 8 illustrates the effects of microparticles and biofertilizer on wheat seedlings under deficit irrigation conditions. It can be observed that the best scenario is with 100 % irrigation, whereas with 50 % irrigation, the presence of bacteria had better results than the microparticles, since the latter tended to have a lower length and dry weight than the 50 % control. Among the presentations of the bacteria, the one with the best effects was that of the biofertilizer with L-tryptophan, since the length and dry weight of the seedlings tended to be greater than the liquid presentations of the bacteria and wt-Trp, and close to the control with 100% irrigation. Figure 8.a shows mainly a decrease in the aerial part of the seedling (leaves) in all treatments with 50 % irrigation compared to 100% irrigation, whereas the length of the roots tended to be maintained in the presence of the bacterium and decreased in its absence. This is related to the fact that *B. pumilus* inoculation affects the expression of genes related to plant root development (Dobrzyński et al., 2022). This has also been observed in other vegetables, such as soybean and buckwheat (Agarwal et al., 2017; Stefan et al., 2010). Figure 8.b shows that in the 50 % irrigation treatments, the w-Trp treatment tended to improve root dry weight and was very close to the

100% irrigation treatment. This is related to what has been found in other studies where the presence of the bacterium improves plant growth parameters and the presentation of the microorganism in solid (immobilized) form produces better results (Conde et al., 2022; Saberi et al., 2022; Saberi and Moradi, 2020). *B. pumilus* can increase the content of primary metabolites (sugars and proteins) and some secondary metabolites (Zhang et al., 2021), possibly owing to a higher dry matter content.

Figure 8. Response of wheat seedlings to a water deficiency assay in the presence of different treatments. a) Root and leaf length, b) root and leaf dry weight, b) total root length, and d) root surface and volume. Ck 100%: soil with 100 % of irrigation, Ck 50%: soil with 50 % of irrigation, Mx 50%: soil + 0.1 g of microparticles with 50 % of irrigation, B.p. 50%: soil + *B. pumilus* pellet on 7 log, w-Trp 50%: soil + 0.1 g of biofertilizer with L-tryptophan with 50 % of irrigation, and wt-Trp 50%: soil + 0.1 g of biofertilizer without L-tryptophan. Different letters on the same variable (leaves or roots) represent significant differences to Tukey's multiple comparison test at $P \leq 0.05$.



Fuente: Elaboración propia.

The total root length, area, and volume were statistically equal among the different treatments (Figure 8.c and d. However, it can be observed that in the biofertilizer treatment with L-tryptophan, total root length, area, and root volume tended to be equal to or greater than the 100% irrigation control, followed by the fertilizer treatment without L-tryptophan. This further supports the theory that the

presentation of immobilized bacteria is better for plant root development under water deficit than the presentation of the matrix alone and bacteria in liquid.

3.5.2. Water retention capacity of microparticles in soil

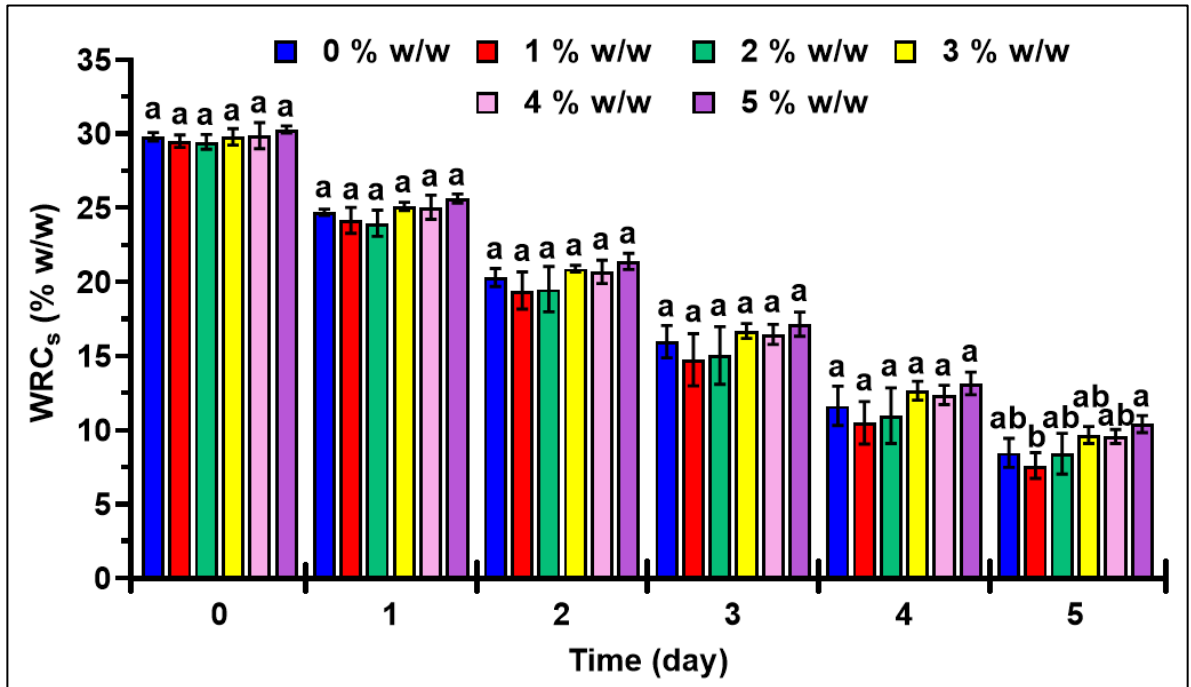
As shown in Figure 9, only on day 5 did the WRCs with biofertilizer concentrations of 1 and 5 % w/w differ, with 7.61 ± 0.87 % w/w and 10.40 ± 0.57 %w/w, respectively. On the remaining days, no significant differences were observed. These results could be due to the small size of the biofertilizer obtained by the JetCutter technique, which does not allow modification of the soil's water retention capacity.

Dorochesi et al. (2023) reported that the water retention capacity of soil with an alginate hydrogel was not significantly different from that of the control (soil alone) and was even lower in the first two days after irrigation. Zowada and Foudazi (2023) observed that the water retention capacity in sandy loam soil was initially the same with or without the presence of a hydrogel, whereas Tomadoni et al. (2020) found that a 1% w/w concentration of an alginate hydrogel formulation had no change in the soil water retention capacity, suggesting that the amount of polymer applied has a great effect in increasing the soil water retention capacity. It was found that the water retention capacity of soil increased in the presence of hydrogel, but most of them were synthetic formulation hydrogels or mixtures of biopolymers with synthetic polymers (Akhter et al., 2004; Khodadadi and Shamsnia, 2020; Kim et al., 2022; Shahid et al., 2012; Wu and Liu, 2008),

although superabsorbents formulated with biopolymers can also be found (Durpekova et al., 2022; Sorze et al., 2023; Wang et al., 2021). In addition, most studies have been conducted in sandy soils, which are known for their low water retention capacity; thus, hydrogels have a greater impact. The low mechanical strength of natural hydrogels, compared to synthetic hydrogels, results in a lower capacity to retain water in the soil because the swelling of the hydrogel depends on the osmotic pressure of the hydrogel and the force exerted by the surrounding soil. If the external forces are greater than those of the hydrogel, the water loss and/or its retention capacity will be reduced (Adjuik et al., 2022). Accordingly, biofertilizer microparticles had a limited influence on the water retention capacity of the soil, largely because of the intrinsic characteristics of the polymer and soil particles.

The immobilization of *B. pumilus* using the JetCutter tool for the production of biofertilizers for agricultural applications was found to be an effective method. The models generated for the equipment are relevant for estimating the yields and parameters to be used in its optimal operation. The immobilization matrix (2.5 % w/w MGA + 1 % w/w Starch) yielded spherical biofertilizer with a diameter of less than 2.42 mm and a yield of 6.55 g s⁻¹ in this equipment. These results provide a basis for optimizing the process of generating bioproducts using this tool, thereby facilitating their large-scale production.

Figure 9. Water retention capacity of biofertilizers in soil at different concentrations. Different letters represent significant differences compared with Tukey's multiple comparison test at $P \leq 0.05$.



Fuente: Elaboración propia.

The water retention capacity of these microparticles provides evidence of their potential use as water retainers. However, this is contingent on the necessity for high concentrations to alter the water retention capacity of the soil. Furthermore, the absence of the bacterial component precludes the microparticles from functioning as water stress prolongers. Furthermore, the maintenance of bacterial viability and the production of bacterial auxins during storage indicate that these microparticles safeguard the cells and their functions. They can be employed as

biofertilizers in suitable concentrations and with plants under stress conditions, exhibiting greater efficacy than applying PGPB in liquid form alone.

The quantity of hydrogel to be applied is contingent upon the soil texture and may be administered via two principal methods: (1) Dry the hydrogel and apply it to the subsoil, mixing it with the soil, and (2) Wet the hydrogel and apply it to the surface, placing it on top of wet soil (Patra et al., 2022). These methods are commonly employed in small areas and can even be applied concurrently with sowing. However, in large areas of land or established crops, such as fruit trees, manual application is not an efficient technique. This highlights the need for further research to investigate the behavior of this hydrogel in the field and to study its application on a larger scale.

The high cost of hydrogels represents a significant obstacle to their universal application in agricultural settings. Although natural polymers have a lower cost than synthetic polymers (Ahmed and Fahmy, 2019), the cost-benefit ratio is more favorable for crops that do not require hydrogels than for those that do. This is due to the fact that the yield increase in the former is below the threshold that would justify the use of hydrogels, and this does not entail a significant economic cost (Saini and Malve, 2023). As Qin et al. (2024) observe, the lack of research on the long-term environmental friendliness of these materials and the need to investigate different agricultural scenarios individually to gain a more nuanced understanding of their behavior represent significant limitations to their more

widespread application. It would be beneficial to conduct an economic analysis of the use of this biofertilizer, with a longer study period to analyze the impact on crop yields. In the future, it would be advantageous to explore alternative biopolymers and their behavior within the equipment. Furthermore, investigating the effects of different bacteria and immobilization methods could prove beneficial.

4. REFERENCES

- Adjuik, T., Nokes, S., Montross, M., and Wendroth, O. (2022). The Impacts of Bio-Based and Synthetic Hydrogels on Soil Hydraulic Properties: A Review. *Polymers*, 14(21), 4721. <https://doi.org/10.3390/polym14214721>
- Agarwal, M., Dheeman, S., Dubey, R., Kumar, P., Maheshwari, D., and Bajpai, V. (2017). Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Microbiological Research*, 205, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.012>
- Ahmed, S. and Fahmy, A. (2019). Applications of Natural Polysaccharide Polymers to Overcome Water Scarcity on the Yield and Quality of Tomato Fruits. *Journal of Soil Sciences and Agricultural Engineering*, 10(4), 199–208. <https://doi.org/10.21608/jssae.2019.36727>
- Akhter, J., Mahmood, K., Malik, K., Mardan, A., Ahmad, M., and Iqbal, M. (2004). Effects of hydrogel amendment on water storage of sandy loam and loam soils and seedling growth of barley, wheat and chickpea. *Plant, Soil and Environment*, 50(10), 463–469. <https://doi.org/10.17221/4059-PSE>
- Ali, A., Zaman, A., Sayed, E., Evans, D., Morgan, S., Samwell, C., Hall, J., Arshad, M., Singh, N., Qutachi, O., Chang, M., and Ahmad, Z. (2021). Electrohydrodynamic atomisation driven design and engineering of opportunistic particulate systems for applications in drug delivery,

therapeutics and pharmaceuticals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176(113788). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.026>

Arbona, V., Iglesias, D., Jacas, J., Primo, E., Talon, M., and Gómez, A. (2005). Hydrogel substrate amendment alleviates drought effects on young citrus plants. *Plant and Soil*, 270(1), 73–82. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1160-0>

Ariani, N., Fitriatin, B., and Suryatmana, P. (2023). Prospective bioencapsulation to improve the quality of phosphate-solubilizing biofertilizers for crop production: A review. *International Journal of Frontiers in Life Science Research*, 5(2), 22–30. <https://doi.org/10.53294/ijflsr.2023.5.2.0090>

Bantis, F. and Koukounaras, A. (2023). Ascophyllum nodosum and Silicon-Based Biostimulants Differentially Affect the Physiology and Growth of Watermelon Transplants under Abiotic Stress Factors: The Case of Salinity. *Plants*, 12(3), 433. <https://doi.org/10.3390/plants12030433>

Barazani, O. and Friedman, J. (2000). Effect of Exogenously Applied L-Tryptophan on Allelochemical Activity of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Journal of Chemical Ecology*, 26, 343–349. <https://doi.org/10.1023/A:1005449119884>

Benítez, S., Carrasco, R., Giraldo, J., and Schoebitz, M. (2024). Microbeads as carriers for *Bacillus pumilus*: a biofertilizer focus on auxin production. *Journal of Microencapsulation*, 41(3), 170–189. <https://doi.org/10.1080/02652048.2024.2324812>

Bhupenchandra, I., Chongtham, S., Devi, E., R., R., Choudhary, A., Salam, M., Sahoo, M., Bhutia, T., Devi, S., Thounaojam, A., Behera, C., M., H., Kumar, A., Dasgupta, M., Devi, Y., Singh, D., Bhagowati, S., Devi, C., Singh, H., and Khaba, C. (2022). Role of biostimulants in mitigating the effects of climate change on crop performance. *Frontiers in Plant Science*, 13(967665). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.967665>

Bidoret, A., Martins, E., De Smet, B. P., and Poncelet, D. (2017). Cell Microencapsulation: Dripping Methods. In E. Opara (Ed.), *Cell Microencapsulation. Methods in Molecular Biology* (Vol. 1479, pp. 43–55). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6364-5_3

- Bjørnøy, S., Mandaric, S., Bassett, D., Åslund, A., Ucar, S., Andreassen, J., Strand, B., and Sikorski, P. (2016). Gelling kinetics and in situ mineralization of alginate hydrogels: A correlative spatiotemporal characterization toolbox. *Acta Biomaterialia*, *44*, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.07.046>
- Brookshaw, T., Fuller, B., Erro, E., Islam, T., Chandel, S., Zotova, E., and Selden, C. (2024). Cryobiological aspects of upscaling cryopreservation for encapsulated liver cell therapies. *Cryobiology*, *117*, 105155. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2024.105155>
- Chaves, F., Pereira, M., Dutra, I., Barcelos, T., Lopes, T., Adeodato, M., Silvia, A., and Soares, M. (2023). Jet cutter technique as a tool to achieve high lipase hydrolytic activity. *Food and Bioprocess Technology*, *137*, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.12.001>
- Chen, J., Xue, W., Xu, C., Luo, P., Cheng, J., and Lu, Y. (2021). Preparation of ZrO₂ beads by an improved micro-droplet spray forming process. *Journal of the American Ceramic Society*, *104*(8), 3855–3861. <https://doi.org/10.1111/jace.17788>
- Cocetta, G., Landoni, M., Pilu, R., Repiso, C., Nolasco, J., Alajarin, M., Ugena, L., Levy, C. C. B., Scatolino, G., Villa, D., and Ferrante, A. (2022). Priming Treatments with Biostimulants to Cope the Short-Term Heat Stress Response: A Transcriptomic Profile Evaluation. *Plants*, *11*(9), 1130. <https://doi.org/10.3390/plants11091130>
- Conde, V., Ortega, L., Loera, O., Pérez, B., and Martínez, C. (2022). Encapsulation of *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in Alginate-Na Beads as a Tomato Seedling Inoculant. *Current Microbiology*, *79*(4), 112. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02797-6>
- Dashti, N. H., Al-Sarraf, N. Y. A., Cherian, V. M., and Montasser, M. S. (2021). Isolation and characterization of novel plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) isolates from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) rhizospheric soil: A novel IAA producing bacteria. *Kuwait Journal of Science*, *48*(2). <https://doi.org/10.48129/kjs.v48i2.8427>
- de la Paz, D., Sanches, L., Portilla, N., Vaca, R., Lugo, J., Wong, A., Águila, P., Mora, M., and Yañez, G. (2023). Integrated Effect of *Bacillus pumilus* and Mineral Fertilizers on Growth Parameters on Potato (*Solanum tuberosum*

L. cv. Citlali). *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3143767/v1>

Dianawati, D., Mishra, V., and Shah, N. (2016). Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(10), 1685–1716. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.798779>

Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., and Dybek, B. (2022). Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1069053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1069053>

Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., Kulkova, I., Kowalczyk, P., and Kramkowski, K. (2023). Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1194606. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1194606>

Dodero, A., Pianella, L., Vicini, S., Alloisio, M., Ottonelli, M., and Castellano, M. (2019). Alginate-based hydrogels prepared via ionic gelation: An experimental design approach to predict the crosslinking degree. *European Polymer Journal*, 118, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.06.028>

Dorochesi, F., Barrientos, C., Díaz, Á., and Cuneo, I. (2023). Enhancing Soil Resilience: Bacterial Alginate Hydrogel vs. Algal Alginate in Mitigating Agricultural Challenges. *Gels*, 9(12), 988. <https://doi.org/10.3390/gels9120988>

Durpekova, S., Bergerova, E. D., Hanusova, D., Dusankova, M., and Sedlarik, V. (2022). Eco-friendly whey/polysaccharide-based hydrogel with poly(lactic acid) for improvement of agricultural soil quality and plant growth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 212, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.053>

El Allaoui, B., Benzeid, H., Zari, N., Qaiss, A. el kacem, and Bouhfid, R. (2023). Functional cellulose-based beads for drug delivery: Preparation, functionalization, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 88, 104899. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104899>

Elisa, G., Neumann, V., Mendes, P., and Pedro, S. (2023). Physiology of carrot seeds treated with red seaweed biostimulant and exposed to different

temperatures and salinity. *Acta Agronómica*, 72(1), 63–69. <https://doi.org/10.15446/acag.v72n1.96143>

- Eswaran, S., Sundaram, L., Perveen, K., Bukhari, N., and Sayyed, R. (2024). Osmolyte-producing microbial biostimulants regulate the growth of *Arachis hypogaea* L. under drought stress. *BMC Microbiology*, 24(165). <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03320-6>
- Etesami, H., Jeong, B. R., and Glick, B. R. (2023). Potential use of *Bacillus* spp. as an effective biostimulant against abiotic stresses in crops—A review. *Current Research in Biotechnology*, 5, 100128. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2023.100128>
- Gagné, F., Xu, M., Dumont, M., and Jabaji, S. (2015). Pea Protein Alginate Encapsulated *Bacillus subtilis* B26, a Plant Biostimulant, Provides Controlled Release and Increased Storage Survival. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, 6(2). <https://doi.org/10.4172/2471-2728.1000157>
- Ganesan, K., Budtova, T., Ratke, L., Gurikov, P., Baudron, V., Preibisch, I., Niemeyer, P., Smirnova, I., and Milow, B. (2018). Review on the Production of Polysaccharide Aerogel Particles. *Materials*, 11(11), 2144. <https://doi.org/10.3390/ma11112144>
- Giraldo, J. and Rivas, B. (2019). *Un proceso para elaborar fertilizantes compuestos de liberación controlada de urea granulados usando matrices poliméricas de quitosano-tripolifosfato y dichos fertilizantes* (201903567).
- Glauert, A. (1980). *Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens* (3rd ed.). North-Holland Publishing Company.
- Glick, B. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Goud, M. S., Sharma, S. K., Kharbikar, L. L., Prasanna, R., Sangwan, S., Dahuja, A., and Dixit, A. (2024). *Bacillus* species consortium with tryptophan-dependent and -independent pathways mediated production of IAA and its derivatives modulates soil biological properties, growth and yield of wheat. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-024-06782-9>
- Güneş, A., Turan, M., Güllüce, M., and Şahin, F. (2014). Nutritional content analysis of plant growth-promoting rhizobacteria species. *European*

- Hafeez, F., Yasmin, S., Ariani, D., Ur, M., Zafar, Y., and Malik, K. (2006). Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agronomy for Sustainable Development*, 26(2), 143–150. <https://doi.org/10.1051/agro:2006007>
- Hunik, J. and Tramper, J. (1993). Large-Scale Production of κ -Carrageenan Droplets for Gel-Bead Production: Theoretical and Practical Limitations of Size and Production Rate. *Biotechnology Progress*, 9(2), 186–192. <https://doi.org/10.1021/bp00020a011>
- Iliasov, L., Shibaev, A., Panova, I., Kushchev, P., Philippova, O., and Yaroslavov, A. (2023). Weakly Cross-Linked Anionic Copolymers: Kinetics of Swelling and Water-Retaining Properties of Hydrogels. *Polymers*, 15(15), 3244. <https://doi.org/10.3390/polym15153244>
- Jamnická, G., Ditmarová, L., Kurjak, D., Kmet', J., Pšidová, E., Macková, M., Gömöry, D., and Střelcová, K. (2013). The soil hydrogel improved photosynthetic performance of beech seedlings treated under drought. *Plant, Soil and Environment*, 59(10), 446–451. <https://doi.org/10.17221/170/2013-PSE>
- Karoyo, A. and Wilson, L. (2017). Physicochemical Properties and the Gelation Process of Supramolecular Hydrogels: A Review. *Gels*, 3(1). <https://doi.org/10.3390/gels3010001>
- Kaur, P., Agrawal, R., Pfeffer, F., Williams, R., and Bohidar, H. (2023). Hydrogels in agriculture: Prospects and challenges. *Journal of Polymers and the Environment*, 31(9), 3701–3718. <https://doi.org/10.1007/S10924-023-02859-1>
- Khodadadi, D. and Shamsnia, S. (2020). Application of Reclaimed Sodium Polyacrylate to Increase Soil Water Retention. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 48(11), 2000068. <https://doi.org/10.1002/clen.202000068>
- Kim, S., Rhie, Y., Kong, S., Kim, Y., and Na, Y. (2022). Synthesis of Nanocomposite Hydrogels for Improved Water Retention in Horticultural Soil. *ACS Agricultural Science & Technology*, 2(6), 1206–1217. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.2c00187>

- Klein, M. and Poverenov, E. (2020). Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2337–2347. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10274>
- Laird, T., Flores, N., and Leveau, J. (2020). Bacterial catabolism of indole-3-acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(22), 9535–9550. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10938-9>
- Lee, B., Ravindra, P., and Chan, E. (2013). Size and Shape of Calcium Alginate Beads Produced by Extrusion Dripping. *Chemical Engineering & Technology*, 36(10), 1627–1642. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300230>
- Li, Z., Yu, C., Kumar, H., He, X., Lu, Q., Bai, H., Kim, K., and Hu, J. (2022). The Effect of Crosslinking Degree of Hydrogels on Hydrogel Adhesion. *Gels*, 8(10), 682. <https://doi.org/10.3390/gels8100682>
- Madduma, U. and Madihally, S. (2021). Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(19), 50376. <https://doi.org/10.1002/app.50376>
- Manojlovic, V., Djonlagic, J., Obradovic, B., Nedovic, V., and Bugarski, B. (2006). Investigations of cell immobilization in alginate: rheological and electrostatic extrusion studies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(4), 505–510. <https://doi.org/10.1002/jctb.1465>
- Martínez, B., García, J., Sánchez, A., Toledano, M., and Soto, G. (2021). Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Compost Bacteria That Improved Physiological Characteristics in Tomato and Lettuce Seedlings. *Agriculture*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/agriculture12010003>
- Martínez, B., Mendoza, C., García, J., Macías, G., Aguirre, H., Soto, G., and Feregrino, A. (2022). Review and Perspectives of the Use of Alginate as a Polymer Matrix for Microorganisms Applied in Agro-Industry. *Molecules*, 27(13), 4248. <https://doi.org/10.3390/molecules27134248>
- Méndez, D. A., Schroeter, B., Martínez-Abad, A., Fabra, M. J., Gurikov, P., and López-Rubio, A. (2023). Pectin-based aerogel particles for drug delivery: Effect of pectin composition on aerogel structure and release properties. *Carbohydrate Polymers*, 306(120604), 120604. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120604>

- Nedovic, V., Manojlovic, V., Pruesse, U., Bugarski, B., Djonlagic, J., and Vorlop, K. (2006). Optimization of the electrostatic droplet generation process for controlled microbead production: Single nozzle system. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 12(1), 53–57. <https://doi.org/10.2298/CICEQ0601053N>
- Noor, A., Ziaf, K., Naveed, M., Khan, K. S., Ghani, M. A., Ahmad, I., Anwar, R., Siddiqui, M. H., Shakeel, A., and Khan, A. I. (2023). L-Tryptophan-Dependent Auxin-Producing Plant-Growth-Promoting Bacteria Improve Seed Yield and Quality of Carrot by Altering the Umbel Order. *Horticulturae*, 9(9), 954. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9090954>
- Ozaktan, H., Ciftci, C. Y., Uzun, S., Uzun, O., and Kaya, M. (2020). Effects of humic acid, microbiological fertilizer and phosphate rock on yield and yield components of field bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Fresenius Environmental Bulletin*, 29(2), 856–863. <https://www.cabidigitalibrary.org/doi/full/10.5555/20219960062>
- Pan, X., Welti, R., and Wang, X. (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nature Protocols*, 5(6), 986–992. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.37>
- Patel, K., Shah, A., and Latore, A. (2023). Effects of Hydrogel on Physical and Chemical Properties of Soil. *International Journal of Plant & Soil Science*, 35(8), 129–135. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i82889>
- Patra, S., Poddar, R., Brestic, M., Acharjee, P., Bhattacharya, P., Sengupta, S., Pal, P., Bam, N., Biswas, B., Barek, V., Ondrisik, P., Skalicky, M., and Hossain, A. (2022). Prospects of Hydrogels in Agriculture for Enhancing Crop and Water Productivity under Water Deficit Condition. *International Journal of Polymer Science*, 2022, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2022/4914836>
- Paulo, B. B., Ramos, F. de M., Feliciano, M. D., Prado, D. P., Silveira, M. P., Alvim, I. D., and Prata, A. S. (2024). Spherification of Hydrocolloids by Jet Cutter. *Journal of Culinary Science & Technology*, 22(4), 759–772. <https://doi.org/10.1080/15428052.2022.2077877>
- Perez, J. and Francois, N. (2016). Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers.

- Prasad, K., Das, A., Oza, M., Brahmabhatt, H., Siddhanta, A., Meena, R., Eswaran, K., Rajyaguru, M., and Ghosh, P. (2010). Detection and Quantification of Some Plant Growth Regulators in a Seaweed-Based Foliar Spray Employing a Mass Spectrometric Technique sans Chromatographic Separation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4594–4601. <https://doi.org/10.1021/jf904500e>
- Preibisch, I., Niemeyer, P., Yusufoglu, Y., Gurikov, P., Milow, B., and Smirnova, I. (2018). Polysaccharide-Based Aerogel Bead Production via Jet Cutting Method. *Materials*, 11(8), 1287. <https://doi.org/10.3390/ma11081287>
- Pruesse, U. and Vorlop, K. (2004). The Jetcutter Technology. In V. Nedović & R. Willaert (Eds.), *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology. Focus on Biotechnology* (8A ed., pp. 295–309). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1638-3_16
- Prüsse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., Lewińska, D., Manojlovic, V., Massart, B., Nastruzzi, C., Nedovic, V., Poncelet, D., Siebenhaar, S., Tobler, L., Tosi, A., Vikartovská, A., and Vorlop, K.-D. (2008). Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers*, 62(4), 364–374. <https://doi.org/10.2478/s11696-008-0035-x>
- Prüße, U., Bruske, F., Breford, J., and Vorlop, K. (1998a). Improvement of the Jet Cutting Method for the Preparation of Spherical Particles from Viscous Polymer Solutions. *Chemical Engineering & Technology*, 21(2), 153–157. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4125\(199802\)21:2<153::AID-CEAT153>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4125(199802)21:2<153::AID-CEAT153>3.0.CO;2-8)
- Prüße, U., Dalluhn, J., Breford, J., and Vorlop, K. (2000). Production of Spherical Beads by JetCutting. *Chemical Engineering & Technology*, 23(12), 1105–1110. [https://doi.org/10.1002/1521-4125\(200012\)23:12<1105::AID-CEAT1105>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1521-4125(200012)23:12<1105::AID-CEAT1105>3.0.CO;2-V)
- Prüße, U., Fox, B., Kirchhoff, M., Bruske, F., Breford, J., and Vorlop, K. (1998b). New Process (Jet Cutting Method) for the Production of Spherical Beads from Highly Viscous Polymer Solutions. *Chemical Engineering &*

Technology, 21(1), 29–33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4125\(199801\)21:1<29::AID-CEAT29>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4125(199801)21:1<29::AID-CEAT29>3.0.CO;2-Y)

Prüße, U., Fox, B., Kirchhoff, M., Bruske, F., Breford, J., and Vorlop, K. (1998c). The Jet Cutting Method as a new immobilization technique. *Biotechnology Techniques*, 12(2), 105–108. <https://doi.org/10.1023/A:1008828214839>

Prüße, U., Jahnz, U., Wittlich, P., Breford, J., and Vorlop, K. (2002). Bead production with JetCutting and rotating disc/nozzle technologies. In U. Prüße & K. Vorlop (Eds.), *Practical aspects of encapsulation technologies* (241st ed., pp. 1–10). Landbauforschung. www.fal.de

Qin, C., Wang, H., Zhao, Y., Qi, Y., Wu, N., Zhang, S., and Xu, W. (2024). Recent advances of hydrogel in agriculture: Synthesis, mechanism, properties and applications. *European Polymer Journal*, 219, 113376. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.113376>

Qiu, K. and Anselmo, A. (2021). Enhanced Storage of Anaerobic Bacteria through Polymeric Encapsulation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(39), 46282–46290. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c11785>

Radzikowska, D., John, P., Piechota, T., Nowicki, M., and Kowalczewski, P. (2022). Response of Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) to Selected Biostimulants under Drought Conditions. *Agriculture*, 13(121). <https://doi.org/10.3390/agriculture13010121>

Reddy, B., Vasudevan, S., Mani, S., Uppaluri, S., and Sudakar, M. (2021). Drought Mitigation Through Hydrogel Application in Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivation. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 9(6), 727–733. [https://doi.org/10.18006/2021.9\(6\).727.733](https://doi.org/10.18006/2021.9(6).727.733)

Saberi, R., Ebrahimi, M., Gholizadeh, M., and Skorik, Y. (2021). Reducing Drought Stress in Plants by Encapsulating Plant Growth-Promoting Bacteria with Polysaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12979. <https://doi.org/10.3390/ijms222312979>

Saberi, R. and Moradi, M. (2020). The effect of *Bacillus subtilis* Vru1 encapsulated in alginate – bentonite coating enriched with titanium nanoparticles against *Rhizoctonia solani* on bean. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 1089–1097. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.197>

- Saberi, R., Moradi, M., and Ait, E. (2022). A Novel Route for Double-Layered Encapsulation of *Streptomyces fulvissimus* Uts22 by Alginate-Arabic Gum for Controlling of *Pythium aphanidermatum* in Cucumber. *Agronomy*, 12(3), 655. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030655>
- Saini, A. K. and Malve, S. H. (2023). Impact of Hydrogel on Agriculture – A review. *Ecology, Environment and Conservation*, 29, S36–S47. <https://doi.org/10.53550/EEC.2023.v29i01s.007>
- Schoebitz, M., López, M. D., and Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(4), 751–765. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0142-0>
- Schroeter, B., Yonkova, V. P., Niemeyer, N. A. M., Jung, I., Preibisch, I., Gurikov, P., and Smirnova, I. (2021). Cellulose aerogel particles: control of particle and textural properties in jet cutting process. *Cellulose*, 28(1), 223–239. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03555-2>
- Schwinger, C., Koch, S., Jahnz, U., Wittlich, P., Rainov, N. G., and Kressler, J. (2002). High throughput encapsulation of murine fibroblasts in alginate using the JetCutter technology. *Journal of Microencapsulation*, 19(3), 273–280. <https://doi.org/10.1080/02652040110105328>
- Sehgal, R., Mehta, A., and Gupta, R. (2019). Alginates: General Introduction and Properties. In S. Ahmed (Ed.), *Alginates: Applications in the Biomedical and Food Industries* (pp. 1–20). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119487999.CH1>
- Serna, L. and Vallejo, V. (2013). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 7(40), 4743–4753. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5718>
- Shahid, S., Qidwai, A., Anwar, F., Ullah, I., and Rashid, U. (2012). Improvement in the Water Retention Characteristics of Sandy Loam Soil Using a Newly Synthesized Poly(acrylamide-co-acrylic Acid)/AlZnFe₂O₄ Superabsorbent Hydrogel Nanocomposite Material. *Molecules*, 17(8), 9397–9412. <https://doi.org/10.3390/molecules17089397>
- Sirajuddin, Khan, A., Ali, L., Chaudhary, H. J., Hussain Munis, M. F., Bano, A., and Masood, S. (2016). *Bacillus pumilus* alleviates boron toxicity in tomato

(*Lycopersicum esculentum* L.) due to enhanced antioxidant enzymatic activity. *Scientia Horticulturae*, 200, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.024>

Sorze, A., Valentini, F., Dorigato, A., and Pegoretti, A. (2023). Development of a Xanthan Gum Based Superabsorbent and Water Retaining Composites for Agricultural and Forestry Applications. *Molecules*, 28(4), 1952. <https://doi.org/10.3390/molecules28041952>

Spaepen, S. and Vanderleyden, J. (2011). Auxin and Plant-Microbe Interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), a001438. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>

Stefan, M., Dunca, S., Olteanu, Z., Oprica, L., Ungureanu, E., Hritcu, L., Mihasan, M., and Cojocaru, D. (2010). Soybean (*glycine max* [L] merr.) Inoculation with *bacillus pumilus* RS3 promotes plant growth and increases seed protein yield: Relevance for environmentally-friendly agricultural applications. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 5(1), 131–138.

Thakur, S., Thakur, V., and Arotiba, O. (2018). History, Classification, Properties and Application of Hydrogels: An Overview. In V. Thakur & M. Thakur (Eds.), *Hydrogels: Recent Advances* (pp. 29–50). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6077-9_2

Tomadoni, B., Salcedo, M., Mansilla, A., Casalongué, C., and Alvarez, V. (2020). Macroporous alginate-based hydrogels to control soil substrate moisture: Effect on lettuce plants under drought stress. *European Polymer Journal*, 137, 109953. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109953>

Truong, V., Nguyen, P. T., and Truong, V. T. (2021). The prediction model of nozzle height in liquid jet-drop method to produce Ca-alginate beads under microencapsulation process. *Journal of Food Process Engineering*, 44(4), e13663. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13663>

Varghese, S., Rangappa, S., Siengchin, S., and Parameswaranpillai, J. (2020). Natural polymers and the hydrogels prepared from them. In Y. Chen (Ed.), *Hydrogels Based on Natural Polymers* (pp. 17–47). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00002-1>

- Wadell, H. (1932). Volume, Shape, and Roundness of Rock Particles. *The Journal of Geology*, 40(5), 443–451. <https://doi.org/10.1086/623964>
- Wang, Y.-L. and Hu, J.-J. (2021). Sub-100-micron calcium-alginate microspheres: Preparation by nitrogen flow focusing, dependence of spherical shape on gas streams and a drug carrier using acetaminophen as a model drug. *Carbohydrate Polymers*, 269, 118262. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118262>
- Wang, Y., Liu, M., Ni, B., and Xie, L. (2012). κ-Carrageenan–Sodium Alginate Beads and Superabsorbent Coated Nitrogen Fertilizer with Slow-Release, Water-Retention, and Anticompaction Properties. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(3), 1413–1422. <https://doi.org/10.1021/ie2020526>
- Wang, Y., Shaghaleh, H., Hamoud, Y., Zhang, S., Li, P., Xu, X., and Liu, H. (2021). Synthesis of a pH-responsive nano-cellulose/sodium alginate/MOFs hydrogel and its application in the regulation of water and N-fertilizer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.154>
- Wu, L. and Liu, M. (2008). Preparation and properties of chitosan-coated NPK compound fertilizer with controlled-release and water-retention. *Carbohydrate Polymers*, 72(2), 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.08.020>
- Yadav, M., Shukla, A. K., Srivastva, N., Upadhyay, S. N., and Dubey, S. K. (2016). Utilization of microbial community potential for removal of chlorpyrifos: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(4), 727–742. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1015958>
- Yahia, Lh. (2015). History and applications of hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences*, 4(2), 1–23. <https://doi.org/10.4172/2254-609X.100013>
- Yasmin, H., Nosheen, A., Naz, R., Bano, A., and Keyani, R. (2017). L-tryptophan-assisted PGPR-mediated induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 567–578. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1402212>
- Zafar, S., Sayed, E., Rana, S., Rasekh, M., Onaiwu, E., Nazari, K., Kucuk, I., Fatouros, D., Arshad, M., and Ahmad, Z. (2024). Particulate atomisation

design methods for the development and engineering of advanced drug delivery systems: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 666(124771). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124771>

Zhang, X., Xie, Z., Lang, D., Chu, Y., Cui, G., and Jia, X. (2021). *Bacillus pumilus* improved drought tolerance in *Glycyrrhizauralensis* G5 seedlings through enhancing primary and secondary metabolisms. *Physiologia Plantarum*, 171(3), 388–399. <https://doi.org/10.1111/ppl.13236>

Zheng, L., Ma, X., Lang, D., Zhang, X., Zhou, L., Wang, L., and 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.017>

Zowada, R. and Foudazi, R. (2023). Macroporous hydrogels for soil water retention in arid and semi-arid regions. *RSC Applied Polymers*, 1(2), 243–253. <https://doi.org/10.1039/D3LP00117B>

CAPÍTULO 3

Evaluación de otros hidrogeles: Comportamiento de Kappa II-carragenina en formación de partículas por medio de métodos de extrusión

1. INTRODUCCIÓN

El mercado de los carragenanos ocupa el cuarto lugar en el mercado mundial de hidrocoloides, de los que aproximadamente el 90 % proviene de especies de *Kappaphycus* y *Eucheuma*, principalmente cultivadas en Indonesia y Filipinas (Campbell and Hotchkiss, 2017). *Kappaphycus alvarezii* es la principal fuente del tipo Kappa-carragenina, mientras que *Eucheuma denticulatum* es la principal fuente de Iota-carragenina (Nurlaida et al., 2023).

Chile lidera la comercialización de biomasa de algas no cultivadas y ha sido el principal productor desde 2015, cosechando sobre 340000 ton anuales, donde 15 especies de algas son comercializadas: seis especies de algas pardas y nueve de algas rojas (Oyarzo et al., 2023). La exportación de carrageninas representa el 7,7 % de los productos de algas chilenos, donde *Sarcopeltis skottsbergii* es una de las carragenofitas más importantes (Westermeyer et al., 2022)

Las carrageninas pueden absorber agua fácilmente y formar un gel, sin embargo, su habilidad de gelificar disminuye con el aumento de la presencia de

grupos sulfatos. En general, kappa-carragenina contiene entre 25 – 30 % de grupos éster sulfato, iota-carragenina posee de 28 – 30 % de grupos éster sulfato, mientras que lambda carragenina 32 – 39 % de grupos éster sulfato. De esta manera, kappa-carragenina forma geles fuertes y duros, iota-carragenina produce geles débiles y suaves, y lambda carragenina no produce geles, aunque estudios modernos sugieren que puede gelificar usando iones trivalentes. Iota y kappa carragenina forman geles termorreversibles en adición de cationes (Qamar et al., 2024; Rahmawati et al., 2023; Sedayu et al., 2019). Sus usos se extienden por la industria alimentaria, farmacéutica, de higiene y agrícola (Necas and Bartosikova, 2013). Se ha reportado que las carrageninas tienen importantes aplicaciones agrícolas, mejorando el crecimiento de las plantas utilizándose como elicitores contra estreses bióticos (Hossain et al., 2024), como cobertura de fertilizante (Santamaría et al., 2019) y como acondicionador de suelo gracias a su gran capacidad de absorber agua (Aydinoğlu et al., 2021; Wang et al., 2012).

La gelificación de las carrageninas es un proceso complejo que depende del tipo y concentración de carragenina, la especie y concentración del catión y la temperatura (Geonzon et al., 2020). La técnica de extrusión es más antigua y común para la formación de partículas con hidrocoloides, destacada por su simplicidad, bajo costo y condiciones de formulación (Krasaekoopt et al., 2003), cuyos instrumentos para el goteo pueden ser una jeringa, pipeta, boquilla, vibrador, jet cutter o disco atomizador, destacando el JetCutter como el equipo más adecuado para aplicaciones industriales (Rani and Kamble, 2024). Es por

esto que en este capítulo se presentan los ensayos realizados con diferentes carrageninas para evaluar su comportamiento en la producción de partículas bajo diferentes concentraciones del polímero, concentraciones de la solución entrecruzante y métodos de extrusión (goteo por jeringa y JetCutter).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el goteo por jeringa se utilizaron tres diferentes tipos de carrageninas: kappa carragenina semi-refinada (κ -I), kappa carragenina refinada (κ -II) y iota carragenina (I). Como compuesto entrecruzante se utilizó KCl a diferentes concentraciones y KOH como solución alternativa. Inicialmente se prepararon soluciones de las diferentes carrageninas al 1, 2 y 3 % p/p (4 % p/p excepcionalmente) con agua destilada a altas temperaturas y una vez frías se gotearon con una jeringa en una solución de KCl al 10 % p/p en agitación.

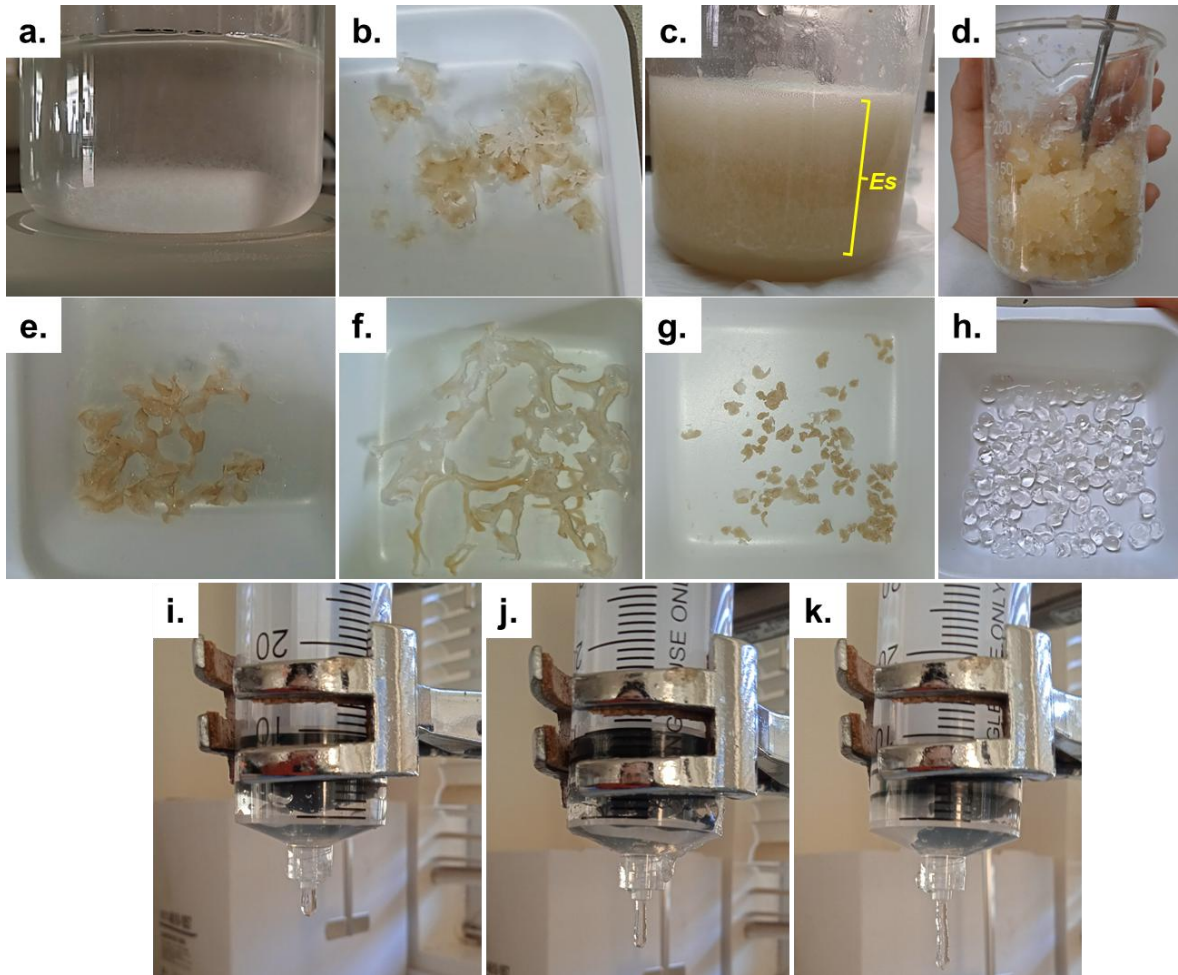
3. RESULTADOS

Para κ -I al 1 % p/p, la gota no gelificó y se mezcló con la solución entrecruzante (Figura 1.a). Al 2 % p/p las gotas formadas se deformaban y una vez secas las partículas eran quebradizas y de forma irregular (Figura 1.b). Al 3 % p/p la solución generó mucha espuma, por lo que no fue posible gotearla (Figura 1.c). Finalmente, al 4 % p/p la mezcla quedó muy dura e imposible de gotear (Figura 1.d). Para I al 1 y 2 % p/p las partículas tuvieron forma irregular y planas (Figura

1.e y f). Al 3 % p/p las partículas tuvieron una forma más redonda pero con superficie irregular (Figura 1.g). Para κ-II al 1 % p/p las gotas formadas tuvieron una forma redonda y regular (Figure 1.h), por lo que se evaluaron porcentajes cercanos a este y con diferentes concentraciones de solución entrecruzante. Se evaluaron concentraciones de 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 y 1.75 % p/p de κ-II y concentraciones de 7.5 y 10 % p/p de KCl y 10 % p/p de KOH. Las concentraciones de κ-II mayores a 1 % p/p no pudieron gotearse, debido a la alta viscosidad de las soluciones (Figura 1.i, j y k)

En la Figura 2 se pueden ver las diferentes partículas formadas por goteo con jeringa , húmedas y secas, observando que en las partículas secas para una formulación de 1 % p/p de κ-II y 10 % p/p de KCl (Figura 2.e) poseen una forma regular y redonda superior a las otras, por lo que esta formulación se escogió como la mejor e inicial para utilizar en JetCutter. Las gotas entrecruzadas con KOH formaron partículas de forma aplastada (Figura 2.f y g), no redondas, por lo que su uso como solución entrecruzante fue descartado.

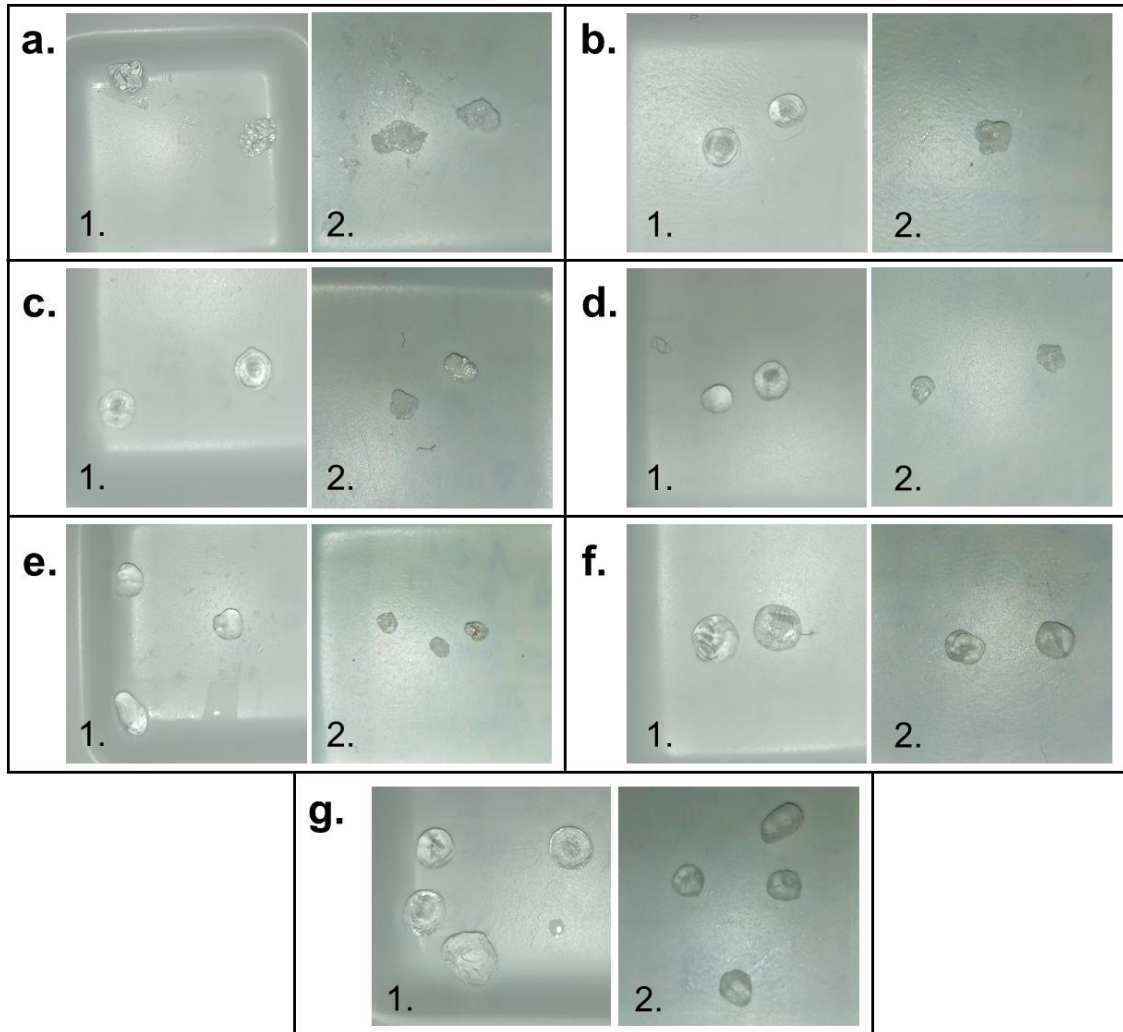
Figura 1. Comportamiento de los diferentes tipos de carragenina a diferentes concentraciones. a) solución al 1 % p/p κ-I, b) partículas secas de 2 % p/p κ-I, c) solución al 3 % p/p KI, d) mezcla de 4 % p/p κ-I, e) partículas secas de 1 % p/p I, f) partículas secas de 2 % p/p I, g) partículas secas de 3 % p/p I, h) partículas húmedas de 1 % p/p κ-II, i) solución en jeringa de 1.25 % p/p κ-II, j) solución en jeringa de 1.5 % p/p κ-II y k) solución en jeringa de 1.75 % p/p κ-II.



Es = espuma

Fuente: Elaboración propia.

Figura 2. Partículas obtenidas por el método de extrusión con jeringa a diferentes concentraciones de kappa carragenina refinada y solución entrecruzante. a) partículas de 0.5 % p/p κ -II y 10 % p/p KCl, b) 0.75 % p/p κ -II y 7.5 % p/p KCl, c) 0.75 % p/p κ -II y 10 % p/p KCl, d) 1 % p/p κ -II y 7.5 % p/p KCl, e) 1 % p/p κ -II y 10 % p/p KCl, f) 0.75 % p/p κ -II y 10 % p/p KOH, g) 1 % p/p κ -II y 10 % p/p KOH.



Fuente: Elaboración propia.

En el JetCutter se inyectaron soluciones al 1, 2 y 3 % de las diferentes carrageninas a diferentes velocidades de la bomba: 300, 600, 900 y 1200 rpm. Utilizando una probeta de 100 mL y un cronómetro, se midió el tiempo en fluyen 100 mL de la solución. Con las ecuaciones 1 y 2 se calculó la velocidad del fluido y el rendimiento para cada concentración. Los valores obtenidos se pueden observar en la Tabla 1, donde a medida que aumenta la concentración del

polímero, la velocidad de la bomba necesaria para que el fluido alcance una velocidad de 10 m s^{-1} es mayor, al igual que el rendimiento. κ -II al 3 % p/p no se pudo inyectar en el JetCutter ya que la solución una vez fría quedó gelificada, como se puede ver en la Figura 3.a. Con los valores anteriores, se obtuvieron las curvas de correlación entre la velocidad de la bomba, velocidad del fluido y caudal, curvas con un $R^2 > 0.9$, indicando que el modelo representa de manera significativa el comportamiento de las soluciones (Figura 4).

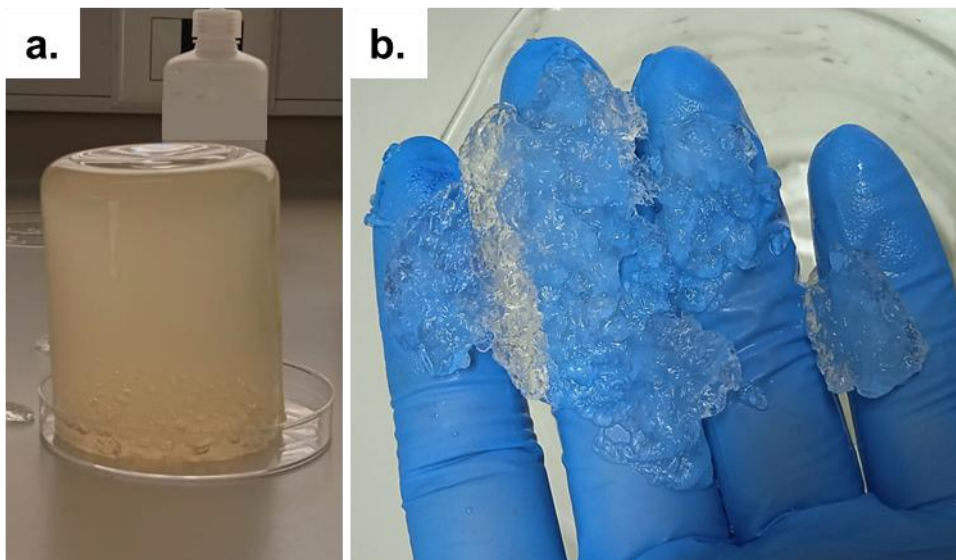
Tabla 1. Parámetros de funcionamiento de JetCutter para las distintas carrageninas a diferentes concentraciones. ρ = densidad, V_{b10} = velocidad de la bomba para que la velocidad del polímero alcance los 10 m s^{-1} y R = rendimiento.

Polímero	Concentración (% p/p)	ρ (g mL⁻¹)	V_{b10} (rpm)	R (g s⁻¹)
κ -carragenina refinada	1	0,9850	447	6.25
	2	1,0049	477	6.37
κ -carragenina semirrefinada	1	0,9822	468	6.26
	2	0,9915	482	6.28
	3	0,9952	494	6.32
I-carragenina	1	0,9954	482	6.33
	2	0,9968	496	6.34
	3	1,0200	496	6.50

Fuente: Elaboración propia.

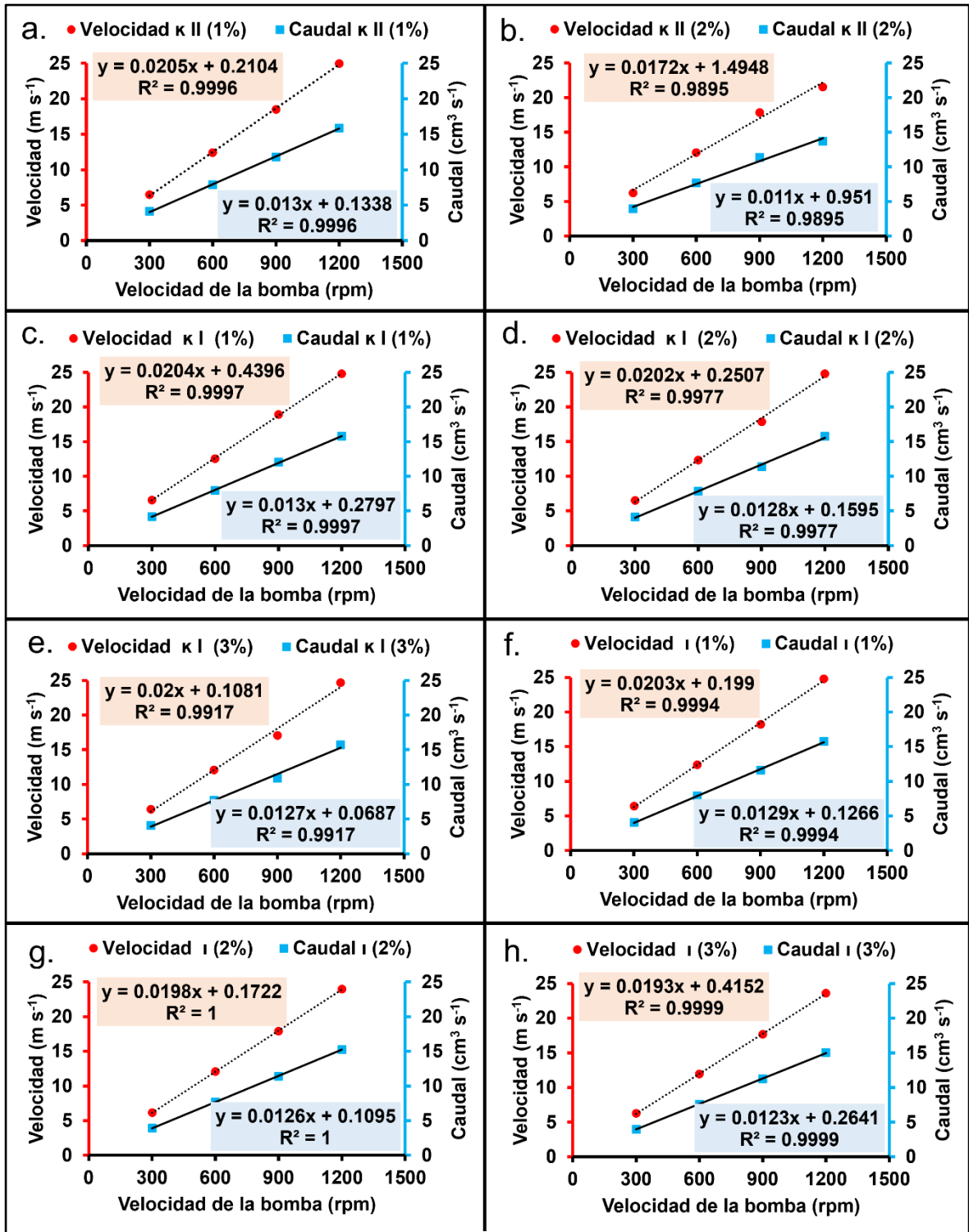
Finalmente, se formaron partículas con κ -II, ya que fue la carragenina que gelificó más uniforme y se obtuvo partículas más esféricas. Sin embargo, los segmentos al caer en la solución gelificante (10 % p/p de KCl) se deformaban y se unían unos con otros, generando una masa gelificada sin partículas individuales y uniformes (Figura 3.b).

Figura 3. Partículas obtenidas por método de extrusión con los diferentes polímeros. a) mezcla al 3 % p/p de κ -II y b) partículas de κ -II al 2 % p/p en 10 % p/p de KCl formadas en JetCutter.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 4. Curvas de correlación entre el caudal y velocidad del fluido con la velocidad de la bomba para κ -carragenina refinada al 1 y 2 % (a y b), κ -carragenina semirrefinada al 1, 2 y 3 % (c, d y e) y λ -carragenina al 1, 2 y 3 % (f, g y h).



Fuente: Elaboración propia.

Mediante el método por goteo, una solución polimérica a 10 cm de la solución gelificante, puede alcanzar una velocidad de caída de 1.2 m s^{-1} , donde a medida que aumenta la distancia entre la boquilla y la solución gelificante, aumenta la probabilidad de deformarse la partícula (Davarci et al., 2017). En el método de JetCutter la velocidad del fluido fue de 10 m s^{-1} a una altura de 1 m aproximadamente, por lo que la posibilidad de que la partícula se deformara era muy alta, observándose en matriz gelificada de la Figura 3.b. Además, el tiempo en que una gota cae después de otra en la solución gelificante es mayor en el método por goteo que en el JetCutter, por lo que el tiempo que tiene una gota para gelificarse y no unirse con la siguiente parece ser insuficiente en este último método, provocando una unión de las partículas. Los cambios de temperatura de la solución de kappa carragenina, de calor a frío, provocan una rápida gelificación es esta (Sen and Erboz, 2010), pero como el JetCutter no cuenta con una manera de mantener la temperatura de la solución, esto no fue posible. Luego de esto, factores a considerar a futuro para evaluar una producción de esferas de carragenina en el JetCutter podrían ser una disminución de la velocidad del fluido, acortar la distancia entre la boquilla y la solución gelificante, y la temperatura de las soluciones.

4. CONCLUSIONES

Los diferentes tipos de carrageninas tuvieron distintos comportamientos en la formación de partículas de gel. Si bien, la kappa-carragenina es la que forma geles más fuertes, su formato de semirrefinada resultó no óptimo para la formulación de hidrogeles. Esto se puede deber a que el proceso de refinación permite eliminar impurezas, así como otros tipos de carrageninas del proceso de extracción, las que estarían presentes en la kappa-carragenina semirrefinada. También, kappa-carragenina refinada presentó una mayor viscosidad comparada con los otros tipos de carrageninas a una misma concentración, demostrando que es posible trabajar a menores concentración que las otras.

Mediante el método de extrusión por goteo, si bien iota-carragenina dio forma a partículas redondas al 3 % p/p, kappa-carragenina refinada fue la mejor para dar forma a partículas redondas y uniformes a concentraciones bajas. La proyección al JetCutter demostró que es posible estimar los parámetros de funcionamiento del equipo para las diferentes carrageninas a distintas concentraciones, pero al caer en la solución gelificante no se logró obtener partículas individuales del gel. Este acercamiento permite extrapolar a la modificación de parámetros establecidos para lograr la formación de micropartículas de carrageninas en el JetCutter, demostrando la gran variedad

de parámetros que se pueden encontrar entre distintos polímeros y polímeros de un mismo tipo.

5. REFERENCIAS

- Aydinoğlu, D., Karaca, N., and Ceylan, Ö. (2021). Natural Carrageenan/Psyllium Composite Hydrogels Embedded Montmorillonite and Investigation of Their Use in Agricultural Water Management. *Journal of Polymers and the Environment*, 29(3), 785–798. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01914-5>
- Campbell, R. and Hotchkiss, S. (2017). Carrageenan Industry Market Overview. In *Tropical Seaweed Farming Trends, Problems and Opportunities* (pp. 193–205). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63498-2_13
- Davarci, F., Turan, D., Ozcelik, B. and Poncelet, D. (2017). The influence of solution viscosities and surface tension on calcium-alginate microbead formation using dripping technique. *Food Hydrocolloids*, 62, 119-127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.029>
- Geonzon, L., Descallar, F., Du, L., Bacabac, R., and Matsukawa, S. (2020). Gelation mechanism and network structure in gels of carrageenans and their mixtures viewed at different length scales – A review. *Food Hydrocolloids*, 108, 106039. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106039>
- Hossain, M., Sultana, F., Khan, S., Nayeema, J., Mostafa, M., Ferdus, H., Phan, L., and Golam, M. (2024). Carrageenans as biostimulants and bio-elicitors: plant growth and defense responses. *Stress Biology*, 4(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s44154-023-00143-9>
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., and Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- Necas, J. and Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: a review. *Veterinárni Medicína*, 58(4), 187–205. <https://doi.org/10.17221/6758-VETMED>

- Nurlaida, N., Saadatul, H., and Aswar, A. (2023). Synthesis Optimization and Characterization of κ -Carrageenans from *Eucheuma cottonii*. *Jurnal Akta Kimia Indonesia (Indonesia Chimica Acta)*, 13–16. <https://doi.org/10.20956/ica.v16i1.25487>
- Oyarzo, C., Otaíza, R., Bellorín, A., Vega, J., Tala, F., Lagos, N., Oyarzún, F., Estévez, R., Latorre, N., Mora, A., Figueroa, L., Jara, R., Bulboa, C., and Contreras, L. (2023). Seaweed restocking along the Chilean coast: History, present, and inspiring recommendations for sustainability. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1062481>
- Qamar, S., Junaid, M., Riasat, A., Jahangeer, M., Bilal, M., and Mu, B. (2024). Carrageenan-Based Hybrids with Biopolymers and Nano-Structured Materials for Biomimetic Applications. *Starch - Stärke*, 76(1–2). <https://doi.org/10.1002/star.202200018>
- Rahmawati, I., Liviawaty, E., Pratama, R., and Junianto, J. (2023). Carrageenan in Seaweed (*Eucheuma* sp.) and Use of Carrageenan in Fishery Food Products: A Review. *Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research*, 23(6), 1–10. <https://doi.org/10.9734/ajfar/2023/v23i6617>
- Rani, S. and Kamble, D. (2024). Extrusion Technology for Encapsulation: Principle, Method, and Application. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 7(1), 28–40. <https://doi.org/10.22059/jfabe.2024.373044.1165>
- Santamaría, J., Rozo, G., and Barreto, B. (2019). Characterization of a κ -Carrageenan Hydrogel and its Evaluation as a Coating Material for Fertilizers. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(4), 774–783. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01384-4>
- Sedayu, B., Cran, M., and Bigger, S. (2019). A Review of Property Enhancement Techniques for Carrageenan-based Films and Coatings. *Carbohydrate Polymers*, 216, 287–302. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.021>
- Sen, M. and Erboz, E. (2010). Determination of critical gelation conditions of κ -carrageenan by viscosimetric and FT-IR analyses. *Food Research International*, 43, 1361–1364. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.021>

- Wang, Y., Liu, M., Ni, B., and Xie, L. (2012). κ -Carrageenan–Sodium Alginate Beads and Superabsorbent Coated Nitrogen Fertilizer with Slow-Release, Water-Retention, and Anticompaction Properties. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(3), 1413–1422. <https://doi.org/10.1021/ie2020526>
- Westermeier, R., González, C., Murúa, P., Morales, J., Patiño, D., Fabres, N., Zamorano, J., and Müller, D. (2022). Seasonal variation of carrageenan yield, gel strength and viscosity in *Sarcopeltis (ex Gigartina) skottsbergii* from Southern Chile. *Phycological Research*, 70(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/pre.12467>

CONCLUSIONES GENERALES

Este estudio demuestra el escalamiento en la producción de un bioinsumo agrícola a base de polímeros de algas marinas. El estudio de los diversos parámetros en la herramienta JetCutter permitió formar partículas homogéneas, redondas y de tamaño pequeño para la matriz de alginato y almidón. También, la inmovilización de la rizobacteria *B. pumilus* fue exitosa, manteniendo una cantidad estable de UFC y una activa producción de AIA en el tiempo de almacenamiento. El bioensayo demostró que el formato de las micropartículas con la bacteria inmovilizada entrega mejores resultados en el desarrollo de las plántulas bajo condiciones de déficit de riego, orientado más a la presencia de la bacteria que la capacidad de retención de agua en el hidrogel, ya que en el suelo estudiado su retención de agua no variaba considerablemente respecto al control.

Los polímeros, al tener diferentes propiedades reológicas, se comportan de distinta manera en el JetCutter, como lo observado con las carrageninas. Los diferentes parámetros obtenidos demuestran que se debe estudiar el comportamiento de cada polímero a utilizar para lograr formar micropartículas de la matriz. Para futuros estudios se necesita evaluar la modificación de parámetros establecidos para obtener micropartículas individuales de otros polímeros, evaluar otras técnicas de encapsulación y aplicaciones en campo del bioinsumo.

PRODUCTIVIDAD

Publicaciones

Francisca Martin-Díaz, Jorge Baeza-Aranzaez, Juan David Giraldo, Mauricio Schoebitz, Homero Urrutia, María Dolores López-Belchí. Innovative JetCutter technology to scale the production of a solid *Bacillus pumilus* biofertilizer to transit to sustainable agriculture. 2024. Journal of agriculture and food chemistry (under review).

Participación en proyectos de investigación

Título del proyecto: Hidrobac: formulación de hidrogeles a base de biopolímeros y bacterias benéficas para mitigar el estrés hídrico en plantas. (ID21110050, FONDEF IDEA 2022. ANID, Chile). Investigador principal: Mauricio Schoebitz Cid.

Título del proyecto: Interactions of food bioactives from Brassica sprouts and gut microbiota ("SPROUTS4HEALTHYGUT) (1201950, FONDECYT REGULAR 2020. ANID, Chile). Investigador principal: María Dolores López Belchí.

Título del proyecto: Aplicación De Tecnologías Limpias Para La Obtención De Ingredientes Bioactivos, Seguros Y Sostenibles, Procedentes De Subproductos Vitivinícolas (FOVI230048, Fomento de Vinculación Internacional para Instituciones de Investigación, ANID). Investigador principal: María Dolores López Belchí

Asistencia a congresos:

J.E.C. Baeza, **F. Martin**, M.Schoebitz, R. Bastías, J.G. Pérez-Pérez, M.D. López. Respuestas agronómicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas de *Corylus avellana* L. frente a déficit hídrico. III Workshop de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agronómicas. Termas de Chillán, Chile, enero 2023.

F. Martin, J.E.C. Baeza, M.Schoebitz, J.D. Giraldo, H. Urrutia, M.D. López. Microencapsulación de bioestimulantes por hidrogeles como estrategias novedosas para mitigar el efecto del estrés abiótico. III Workshop de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agronómicas. Termas de Chillán, Chile, enero 2023.

Baeza Aranzáez, Jorge Ernesto Claudio; **Martin Diaz, Francisca Belén**; Schoebitz Cid, Mauricio Ivan Antonio; Bastías Ibarra, Richard Mauricio; Pérez-Pérez, Juan Gabriel y López Belchí, María Dolores. Respuestas agronómicas,

fisiológicas y bioquímicas de *Corylus avellana* L. frente a déficit hídrico. VIII Jornadas de Ciencia y Tecnología 2023 y II Reunión Argentina – Chile de Ciencias Agrarias, Rosario (Argentina)/Chillán (Chile)-Híbrido, junio 2023.

Martin Diaz, Francisca Belén; Baeza Aranzáez, Jorge Ernesto Claudio; Schoebitz Cid, Mauricio Iván Antonio; Giraldo Pedraza, Juan David y López Belchí, María Dolores. Microencapsulación de rizobacterias en hidrogeles utilizando nuevas herramientas. VIII Jornadas de Ciencia y Tecnología 2023 y II Reunión Argentina – Chile de Ciencias Agrarias, Rosario (Argentina)/Chillán (Chile)-Híbrido, junio 2023.

Jorge Baeza Aranzáez, **Francisca Martin-Díaz**, Rocío Carrasco Fernández, María Dolores López Belchí. Microencapsulados de *Bacillus pumilus* en una matriz de alginato y su impacto sobre la germinación y el contenido de antioxidantes en albahaca morada. 72º Congreso Agronómico de Chile, Iquique, Chile, 22-24 Noviembre 2023.

Francisca Martin-Díaz, Jorge Baeza Aranzáez, Rocío Carrasco Fernández, María Dolores López Belchí. Tecnología jetcutter para la formación de hidrogeles

agrícolas. 72º Congreso Agronómico de Chile, Iquique, Chile, 22-24 Noviembre 2023.

Jorge Baeza Aranzáez, **Francisca Martin-Díaz**, María Dolores López Belchí, Rocío Carrasco Fernández, Mauricio Schoebitz Cid, Richard Bastías Ibarra, Juan Gabriel Pérez-Pérez. Germination and antioxidant activity in purple basil. XVI Reunión de Biología Vegetal, Talcahuano, Chile, 28-30 Noviembre 2023.

Francisca Martin Díaz, Jorge Baeza Aranzáez, Juan Giraldo Pedraza, Mauricio Schoebitz Cid, Homero Urrutia Briones, María Dolores López Belchí. Jetcutter technology for the formulation of agricultural hydrogels and their effects on water deficit tolerance. XVI Reunión de Biología Vegetal, Talcahuano, Chile, 28-30 Noviembre 2023.

F. Martin, J. Baeza, JG. Giraldo, M. Schoebitz, H. Urrutia, M.D. López. Tecnología JetCutter para la formulación de hidrogeles agrícolas y sus potenciales efectos en la tolerancia al déficit hídrico. IV Workshop de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agronómicas. Termas de Chillán, Chile, enero 2024.

JEC. Baeza, **FB Martin**, R. Carrasco, M. Schoebitz, R. Bastías, JG Pérez-Pérez, M.D. López Belchí. Mejora de las propiedades antioxidantes en albahaca morada mediante el uso de *Bacillus pumilus* microencapsulado en una matriz de alginato. IV Workshop de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agronómicas. Termas de Chillán, Chile, enero 2024.

Estadías de investigación

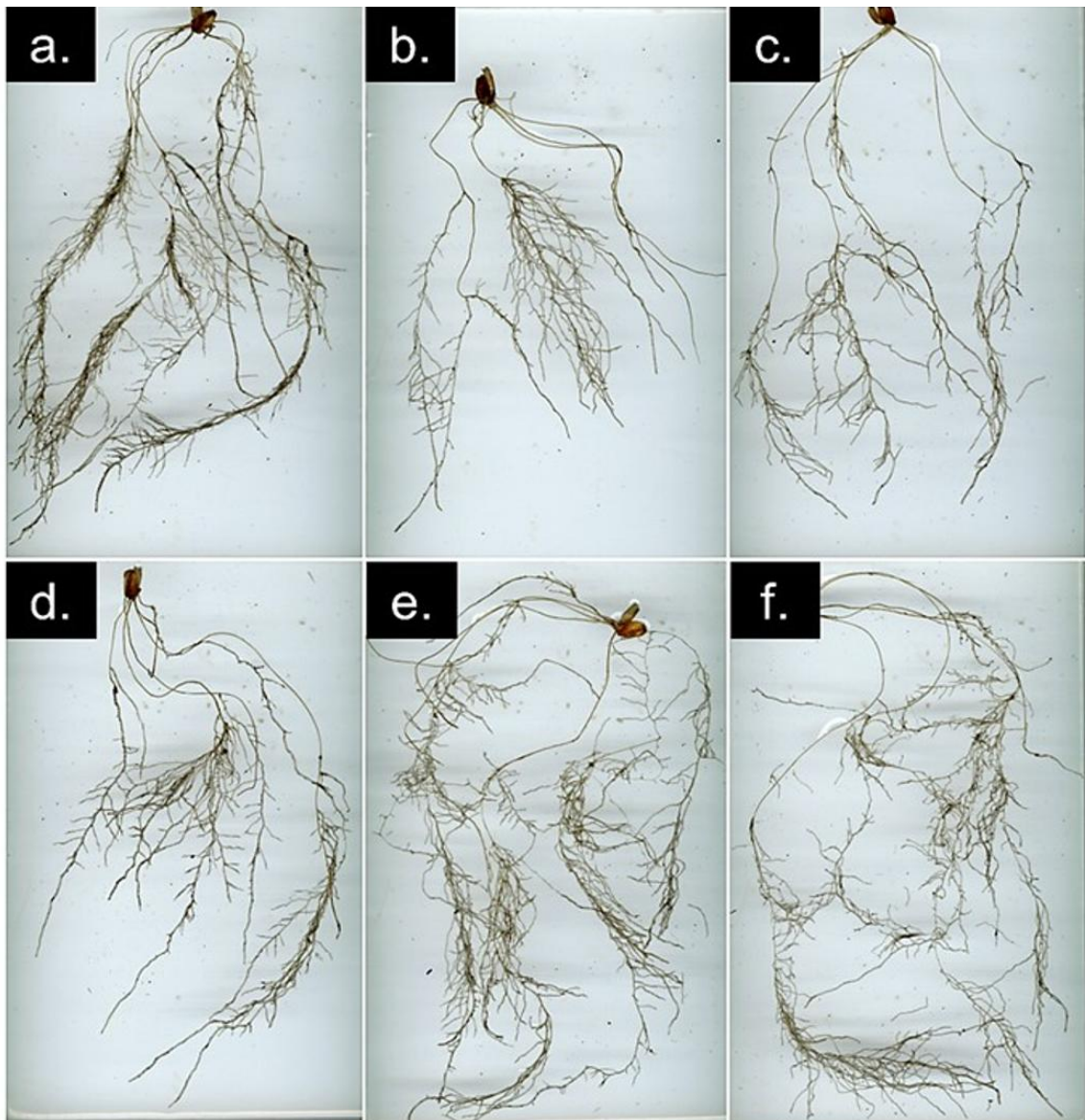
Centro de Edafología y Biología del Segura (CEBAS-CSIC), Murcia, España.
Desde el 21 de octubre de 2024 hasta el 5 de noviembre 2024.

Cursos y eventos

- Seminario de inocuidad Alimentaria
- Curso de Biopolímeros (ANID)
- Curso de Programación en R
- Primer Congreso de Salud Alimentaria

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figure S1. Images of roots taken in Whinrizo by treatment. a) Ck 100%, b) Ck 50%, c) Mx 50%, d) B.p.50%, e) w-Trp 50% and f) wt-Trp 50%.



Fuente: Elaboración propia.