



REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA

Colombian Journal of Biotechnology

VOLUMEN 27 - NÚMERO 2 JULIO - DICIEMBRE 2025, BOGOTÁ D.C., COLOMBIA



El potencial biotecnológico del microbioma en la agricultura: fortaleciendo capacidades regionales desde el curso CABBIO COL12-2025

MERCADOS | INVESTIGACIÓN | AVANCE CIENTÍFICO | DESARROLLO EN TECNOLOGÍA

Instituto de Biotecnología
Sede Bogotá

www.ibun.unal.edu.co



Publicado: 2025-12-01

Editorial



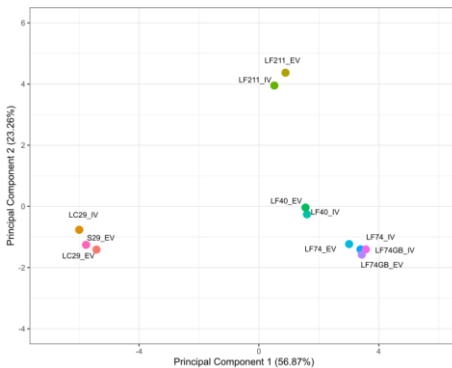
El potencial biotecnológico del microbioma en la agricultura: fortaleciendo capacidades regionales desde el curso CABBIO COL12-2025

Paula Alejandra Díaz Tatis

4-8

PDF

Artículos de Investigación

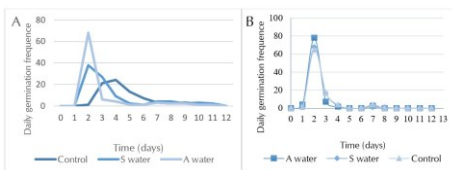


ISSR markers as a tool to differentiate genotypes of Cinchona hybrids propagated in vitro and ex vitro Marcadores ISSR como herramienta para distinguir genotipos de híbridos de Cinchona propagados in vitro y ex vitro

Juan David Saavedra Correa, Ibonne Aydee Garcia Romero, Robert Theiler

9-17

PDF (English)

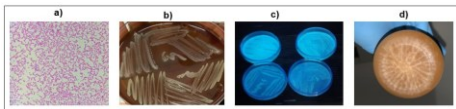


Stress responses induced by pre-germination treatments and their identification based on seed germination patterns Respuestas al estrés inducidas por tratamientos pre-germinación y su identificación basada en patrones de germinación de semillas

Guillermo Carrillo Castañeda

18-29

• [PDF \(English\)](#)

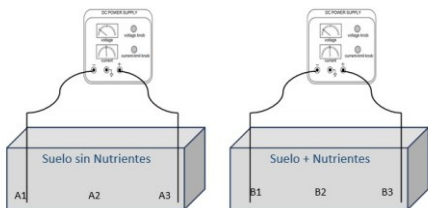


Evaluación de Soportes Alternativos para la Formación de Biopelículas en Humedales Artificiales de Flujo Subsuperficial*Evaluation of Alternative Supports for Biofilm Formation in Subsurface Flow Constructed Wetlands*

Diana Patricia Rodriguez Zuniga, María Elena González Duque , Deicy Andrea Rios Sánchez , Mateo Montes Vanegas , Kelly Leani Quintero García, Faber Esneider Villa Cardona

30-41

• [PDF](#)

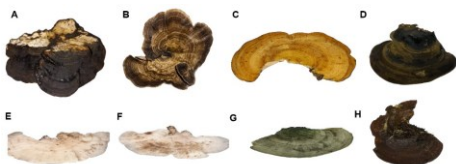


Electrobiorremediación de suelos contaminados con HAP*Electrobioremediation of HAPs contaminated soil*

Adrián J. Acuña, Maximiliano Gutierrez, German Tomas, Graciela Natalia Pucci

42-51

• [PDF](#)

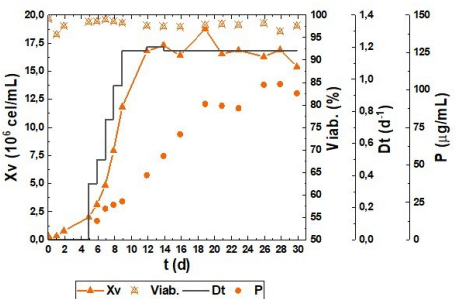


Ensayo in vitro para remoción de mercurio en aguas, utilizando el hongo del género Trametes sp.*In vitro studies for removal of mercury in water, using fungus genera Trametes sp.*

Elsy Karenth Figueroa Mosquera, Luis Alejandro Carmona Jiménez, Susana Ochoa Agudelo

52-62

• [PDF](#)



Desescalado del proceso de fermentación de la proteína recombinante sL22 a un biorreactor de 50 L

Scale down of the fermentation process of sL22 recombinant protein in a 50 L bioreactor

Roberto Rafael Núñez Ortiz, Jennifer de la Caridad Quesada Rodríguez, José Antonio Fernández de la Vega Velázquez, María Caridad Duarte Castro, Julio César Dustet Mendoza

63-73

PDF



Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo de plántulas in vitro de *Cyrtopodium schargellii* (G. A. Romero, Aymard & Carnevali)

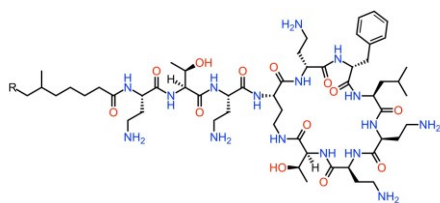
*Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium schargellii* (G. A. Romero, Aymard & Carnevali)*

Daniel José Hernández Rosales, Luis Carlos Rodrigo Ortega Macareno, Luisa Marcela Martínez Oviedo, Javier Darío Beltrán Herrera

74-82

PDF

Artículos de Revisión



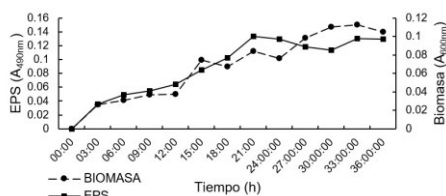
Microbial Resistance as a Challenge: Therapeutic and Biotechnological Applications of Metabolites Produced by Bacteria of the Bacillus Genus. A descriptive review *La resistencia microbiana como desafío: aplicaciones terapéuticas y biotecnológicas de metabolitos producidos por bacterias del género Bacillus. Una revisión descriptiva*

Juan Bautista Romero, Nicolás Amaya Zambrano, Abigail Martínez Torres, Luis Ramiro Caso Vargas, Candelario Vázquez Cruz, María Patricia Georgina Sánchez Alonso, Norma Elena Rojas Ruiz

83-94

[PDF \(English\)](#)

Artículo Corto



Evaluación de la producción de exopolisacáridos a partir de Lactobacillus fermentum L14 *Evaluation of the production of exopolysaccharides from Lactobacillus fermentum L14*

Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza, Diana Carolina Villan Larios, Harold Yesid Bermon Bayona

95-103

[PDF](#)

El potencial biotecnológico del microbioma en la agricultura: fortaleciendo capacidades regionales desde el curso CABBIO COL12-2025

The biotechnological potential of the microbiome in agriculture: strengthening regional capacities through the CABBIO COL12-2025 course

Paula Alejandra Díaz Tatis*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.124617

En la década de los años treinta se descubrieron los suelos supresivos, aquellos capaces de evitar el establecimiento de enfermedades incluso en presencia de patógenos. No fue sino hasta los años ochenta cuando comenzamos a comprender que este fenómeno estaba asociado a la actividad de comunidades microbianas. Desde entonces, los avances en el campo de la microbiología agrícola han permitido identificar las funciones ecológicas de varios microorganismos del suelo que pueden cultivarse con relativa facilidad en condiciones de laboratorio. Esto ha contribuido no solo al conocimiento de las complejas interacciones y mecanismos moleculares que los microorganismos emplean para coexistir en un mismo nicho, sino también a su aprovechamiento como bioinsumos agrícolas. En la actualidad, se utilizan distintos gremios microbianos del suelo con el fin de controlar patógenos fúngicos y bacterianos, así como para mejorar la adquisición de macronutrientes, contribuyendo tanto a la nutrición vegetal como a la fertilidad del suelo.

En las últimas dos décadas, y gracias a los avances en la generación y análisis de datos genómicos, se ha logrado describir con mayor detalle la composición y estructura de las comunidades microbianas que habitan diferentes espacios de la planta: la rizósfera (asociada a la raíz), la filósfera (superficies aéreas) y la endósfera (interior de los tejidos). La secuenciación del ADN de muestras provenientes de estos ambientes ha permitido conocer el repertorio génico de los microorganismos sin necesidad de su cultivo en laboratorio. Este enfoque ha acelerado la comprensión de la ecología microbiana, al revelar la composición, estructura, interacciones y posibles roles de la microbiota bajo diversos tipos de estrés biótico y abiótico.

Más recientemente, el estudio de la microbiota tanto de la rizósfera como de la filósfera en cultivos de interés agrícola ha permitido identificar grupos taxonómicos clave que contribuyen a la resiliencia de las plantas frente a altas temperaturas, sequías y condiciones de salinidad

* PhD., MSc., Profesora Asistente, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 No. 45-03, Bogotá D.C., Colombia, padiazta@unal.edu.co, <https://orcid.org/0000-0001-8334-966X>.

elevada, entre otros factores. Por ello, ante las crecientes amenazas climáticas sobre los cultivos, se hace imperativa la búsqueda de nuevas alternativas que mitiguen estas limitaciones y aseguren la sostenibilidad de la producción agrícola.

Esta necesidad fue el punto de partida para la formulación del curso teórico-práctico “Potencial biotecnológico del microbioma en la agricultura: hacia el diseño e implementación de comunidades sintéticas para mitigar los efectos del cambio climático en cultivos” desarrollado del 8 al 19 de septiembre en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. El curso fue organizado y coordinado por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia y contó con la participación de diez docentes nacionales de la Sede Bogotá, junto con dos profesores invitados de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina) y del INTA (Argentina). Participaron dieciséis estudiantes provenientes de distintos países latinoamericanos: ocho de Colombia, dos de Brasil, dos de Argentina, dos de Uruguay, uno de Perú y una estudiante de Paraguay. El curso, con una intensidad de 80 horas en modalidad presencial, tuvo como propósito fortalecer las capacidades de jóvenes investigadores y profesionales latinoamericanos, brindándoles fundamentos teóricos y prácticos para el estudio y la aplicación de tecnologías basadas en el potencial de los microbiomas con el fin de fortalecer la investigación y promover el desarrollo de sistemas agrícolas más sustentables frente a los efectos del cambio climático en la región.



Con el propósito de alcanzar los objetivos del curso, se definieron cuatro resultados de aprendizaje que guiaron el desarrollo de las actividades teóricas y prácticas. El primero de ellos

buscó que los participantes reconocieran y aplicaran técnicas de aislamiento, cultivo, caracterización funcional y edición genética de inoculantes microbianos, incorporando además los principios de bioseguridad necesarios para el trabajo con microorganismos del suelo y de la rizósfera. Este componente incluyó aspectos fundamentales en microbiología agrícola como el manejo microbiológico básico, la caracterización de microorganismos del suelo, la producción y formulación de bioinoculantes, su aplicación en cultivos y las estrategias de edición genética aplicadas a estos. El desarrollo de este bloque estuvo a cargo de las profesoras Ibonne García, Nubia Moreno y Paula Díaz, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, junto con los docentes invitados Antonio Lagares (Universidad Nacional de La Plata) y Nicolás Ayub (INTA, Argentina).

El segundo resultado de aprendizaje estuvo enfocado en el análisis de datos de metagenómica y en la aplicación de enfoques de redes metabólicas para comprender la estructura, función y complementariedad de las comunidades microbianas, con miras al diseño racional de consorcios orientados a una agricultura más sustentable. Durante este módulo, los estudiantes aprendieron a extraer ADN metagenómico de rizósfera, construir librerías metataxonómicas y realizar la identificación taxonómica mediante el análisis del gen 16S rRNA. Posteriormente, abordaron el análisis de abundancia y diversidad bacteriana, el ensamblaje y binning de genomas a partir de datos metagenómicos, así como la asociación de genes con rutas metabólicas y su

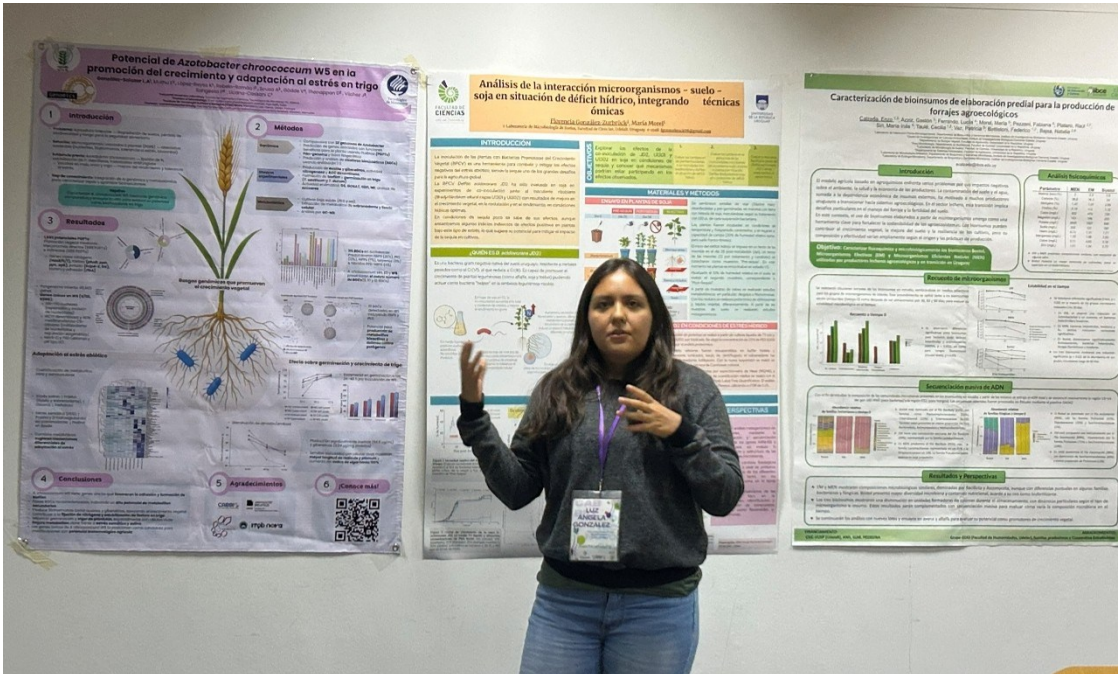




representación en redes metabólicas de escala genómica. Finalmente, se introdujeron los principios de la ingeniería de microbiomas y el diseño racional de consorcios microbianos como herramientas para el aprovechamiento biotecnológico de las comunidades microbianas del suelo. Este bloque fue liderado por los profesores Ibonne García, Johan Alcántara y Luis Miguel Serrano, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, junto con Maryam Chaib de Mares y Alejandro Caro, del Departamento de Biología de la misma institución.

El tercer resultado de aprendizaje se centró en el diseño y la ejecución de experimentos orientados a evaluar el impacto de biofertilizantes y bioestimulantes microbianos sobre la fisiología vegetal y la respuesta de las plantas frente a condiciones de estrés, tanto en invernadero como en campo. Durante este módulo, los participantes realizaron evaluaciones fisiológicas de plantas sometidas a estrés hídrico, mediante la medición de variables morfológicas y fisiológicas, y desarrollaron ensayos in vitro de biocontrol para analizar la efectividad de microorganismos frente a patógenos fúngicos y bacterianos. Asimismo, se llevaron a cabo pruebas en condiciones de invernadero para evaluar el desempeño de diferentes bioinoculantes y su potencial en la promoción del crecimiento vegetal y la mitigación del estrés. Este componente del curso fue liderado por las profesoras Paula Díaz y Luz Adriana Pedraza, del Instituto de Biotecnología, junto con la profesora Luz Marina Melgarejo, del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia.

El cuarto resultado de aprendizaje buscó fortalecer la colaboración científica entre los participantes del curso, promoviendo la creación de redes de trabajo internacionales orientadas al desarrollo de proyectos conjuntos en microbiomas y agricultura sustentable. Para ello, se organizaron sesiones de socialización de los proyectos de investigación de los participantes en formato de póster, en las que se presentaron sus líneas de trabajo y discutieron posibles



sinergias con colegas de otros países. Estas actividades culminaron con un conversatorio en el que se reflexionó sobre los retos y oportunidades para impulsar investigaciones colaborativas en América Latina, consolidando así los primeros vínculos de una comunidad regional en biotecnología microbiana aplicada a la agricultura.

Invitamos a la comunidad científica latinoamericana a continuar fortaleciendo estos espacios de formación y colaboración que nos permiten avanzar hacia desarrollos biotecnológicos con impacto regional. La realización de este curso fue posible gracias al apoyo de MinCiencias y CABBIO (Centro Latinoamericano de Biotecnología), cuyo respaldo reafirma la importancia de invertir en la formación de talento humano y en la cooperación científica entre nuestros países. Desde el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, renovamos nuestro compromiso con la generación de conocimiento y con la construcción de una agricultura más sostenible, resiliente e inclusiva para América Latina.

ISSR markers as a tool to differentiate genotypes of *Cinchona* hybrids propagated *in vitro* and *ex vitro*

Marcadores ISSR como herramienta para distinguir genotipos de híbridos de *Cinchona* propagados *in vitro* y *ex vitro*

Juan David Saavedra-Correa*; Ibonne Aydee García-Romero**; Robert Theiler***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.119087

RESUMEN

La diferenciación de genotipos híbridos de *Cinchona* spp. es un desafío debido a sus orígenes compartidos y similitudes morfológicas. En este estudio se utilizaron marcadores ISSR para distinguir entre los genotipos de *Cinchona* spp.: LF40, LC29, LF74, LF74GB y LF211, mantenidos en condiciones *in vitro* y *ex vitro* en Colombia. Se extrajo ADN genómico de los materiales vegetales y se utilizaron ocho cebadores ISSR para la amplificación por PCR. En total, se amplificaron 61 loci, de los cuales 37 (60,92%) fueron polimórficos. El número total de loci por cebador varió de 5 a 12, con un promedio de 7,62, y los loci polimórficos variaron de 3 a 6, con un promedio de 4,62 por cebador. El análisis de conglomerados basado en el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) agrupó los genotipos en distintos clusters, mostrando diferencias genéticas. El análisis de coordenadas principales (PCA) confirmó los patrones de agrupamiento, distinguiendo aún más los genotipos a pesar de sus orígenes compartidos. El cebador ISSR4 fue el más efectivo, con la mayor tasa de polimorfismo (75%) y valor PIC (0.473), seguido del ISSR6 que tuvo una tasa de polimorfismo del 71% y un valor PIC de 0.426, ambos cebadores permitieron la identificación de un grupo de plantas en condiciones de campo a partir de cultivos *in vitro*, con origen genotípico desconocido. Como resultado, fue posible confirmar un grupo de plantas pertenecientes al genotipo LF40 utilizando sólo dos cebadores. Los resultados demuestran la distinción genética de los genotipos de *Cinchona* seleccionados y subrayan la utilidad de los marcadores ISSR como una herramienta confiable para identificar diferencias genéticas de selecciones de plantas de *Cinchona* *in vitro* y *ex vitro*.

Palabras clave: *Cinchona*, ISSR, Identificación Molecular, Marcadores Moleculares.

ABSTRACT

The differentiation of *Cinchona* spp. hybrids genotypes are challenging due to their shared origins and morphological similarities. This study utilized ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers to distinguish between genotypes of *Cinchona* spp.: LF40, LC29, LF74, LF74GB, and LF211 maintained *in vitro* and *ex vitro* in

* MSc - Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1527-0428> Mail: jusaavedrac@unal.edu.co

** PhD - Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-8834-0899>. Mail: iagarcia@unal.edu.co

*** PhD - Formerly Horticultural Department, Agroscope Changins-Wädenswil, Wädenswil, Switzerland. <https://orcid.org/0009-0003-3705-6542>. Mail: theiler.robert.colombia@gmail.com

Colombia. Genomic DNA was extracted from the plant materials, and eight ISSR primers were used for PCR amplification. In total 61 loci were amplified, of which 37 (60.92%) were polymorphic. The total number of loci per primer ranged from 5 to 12, with an average of 7.62, and polymorphic loci varied from 3 to 6, averaging 4.62 per primer. Cluster analysis based on the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) grouped the genotypes into distinct clusters, showing genetic differences. Principal coordinate analysis (PCA) confirmed the clustering patterns, further distinguishing the genotypes despite their shared origins. The primer ISSR4 was the most effective, with the highest polymorphism rate (75%) and PIC value (0.473), followed by ISSR6 which had a polymorphism rate of 71% and a PIC value of 0.426, both primers allowed the identification of a group of plants under field conditions from *in vitro* cultures, with unknown genotype origin. As a result, it was possible to confirm a cluster of plants belonging to the LF40 genotype using only two primers. The results demonstrate the genetic distinctiveness of the selected *Cinchona* genotypes and underscore the utility of ISSR markers as a reliable tool for identifying genetic differences of *in vitro* and *ex vitro* *Cinchona* plant selections.

Keywords: Cinchona, ISSR, Genotype differentiation, Molecular identification, Molecular markers.

Recibido: febrero 27 de 2025

Aprobado: 15 de septiembre de 2025

INTRODUCTION

Plants of the genus *Cinchona* (family *Rubiaceae*) native from South America, have been recognized for centuries thanks to their therapeutic properties, particularly in the treatment of malaria, which is related to different alkaloids, including quinine, quinidine, cinchonine and cinchonidine, present in the bark of the tree (Andersson, 1998; Aslam *et al.*, 2023; Jaramillo-Arango, 1949). The use of cinchona bark began with indigenous Andean people and was recognized and valued by Europeans in the 16th century, driving global demand for cinchona bark in the following centuries and the subsequent establishment of plantations in European colonies located in South Asia and Africa (Jaramillo-Arango, 1949; Schaepmeester, 2021). In addition, cinchona alkaloids are used today in the food and beverage industry, representing about 40% of global alkaloid production, while the remaining 60% are used for medicinal purposes (Schaepmeester, 2021). The most commonly cultivated species are *Cinchona ledgeriana*, *Cinchona pubescens* and *Cinchona calisaya*, each known for their high quinine content, growth characteristics and environmental adaptability. These species exhibit variable ploidy levels, with diploid forms common in wild populations, and polyploid forms found among cultivated hybrids and selections (Aslam *et al.*, 2023; Canales *et al.*, 2020; Holland, 1932; Taylor, 1943). Hybrids between these species were selected to combine the desirable traits of different parent plants, resulting in plant selections with greater disease resistance, faster growth rates, and higher alkaloid production (de Swiet, 2023; Ku, 2016; Steere, 1945; Theiler, 2014; Veale, 2010).

However, in the last 50 years *Cinchona* plantations in the Kivu area of the Democratic Republic of the Congo in Africa, were affected by the soil-borne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*, which causes severe losses in the productivity of plantations. Therefore, efforts were undertaken to select *P. cinnamomi* tolerant genotypes, in order to reduce the impact of the disease and were propagated through *in vitro* culture and established *ex vitro* for propagation purposes (Theiler, 2014). Subsequently, the identification of the genetic stability of the selected genotypes is necessary to ensure that they retain the desired characteristics over generations.

Tools for the identification of variations in the genotype of plants include molecular markers, which are DNA sequences used to detect and select specific traits in the plant genome (Amom & Nongdam, 2017; Hussain & Nisar, 2020). For *Cinchona spp.* different molecular markers have been used to assess their genetic diversity, including RAPD markers, nuclear microsatellite loci, the chloroplast rps16 intron, along with studies using *or* rbcL, ITS and matK genes (Perez Ocampo, 2021; Sasongko *et al.*, 2021). Additionally, ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers have been used to evaluate somaclonal variation in *Cinchona officinalis* regenerated through different *in vitro* protocols, together, these approaches provided valuable insights into the genetic variability and stability of cinchona species, supporting conservation, breeding, and propagation efforts by enabling precise monitoring of genetic fidelity and diversity (Cueva-Agila *et al.*, 2019; Armijos-González *et al.*, 2021). Furthermore, the use of codominant SSR markers—transferred from related species such as *Coffea arabica*, *Psychotria tenuinervis*, *Galium catalinense*, and *Antirhea borbonica* has provided valu-

able information on genetic variability within the genus (Aranha Trelles & León Piedra, 2013).

Additionally, genomic resources for *Cinchona* genus are limited, as only partially complete genomes of *C. calisaya* and *C. pubescens* have been published (Arbizu *et al.*, 2021; Canales *et al.*, 2022; Du *et al.*, 2025). Given this, alternative molecular markers are ISSR, which are 100–3000 bp DNA sequences amplified by polymerase chain reaction (PCR) using a single primer made from genomic microsatellite sequences, generating multilocus markers that are highly polymorphic and informative for various genetic studies (Zietkiewicz *et al.*, 1994). ISSR markers have been broadly used due to their cost-effectiveness characteristics, reproducibility, and capacity to identify polymorphisms throughout the genome in plant populations (Arya *et al.*, 2022; Godwin *et al.*, 1997).

While ISSR have been extensively applied to various plant species (Amruthakumar *et al.*, 2024; Arya *et al.*, 2022; Raji & Siril, 2021), their use in *Cinchona* hybrids remains underexplored, offering an opportunity to apply ISSR markers to *Cinchona* plant selections, which can provide a powerful tool to evaluate genetic differences and confirm the distinctiveness of selected genotypes. The main objective of this study was to assess the potential of ISSR markers for identifying four genotypes of *Cinchona* spp. maintained *in vitro* and grown *ex vitro* under field conditions, due to the difficulty of distinguishing phenotypic differences among them, for the accurate maintenance of these genotypes in the establishment of a *Cinchona* plantation in Colombia.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Four different genotypes of *Cinchona* spp. seedlings were selected based on their tolerance against *P. cinchonae*, derived from hybrids between *Cinchona calisaya* (formerly known as *C. ledgeriana*) and *Cinchona pubescens* (formerly known as *C. succirubra*) (Theiler, 2014). These genotypes were labeled as LC29, LF211, LF40, LF74, and LF74GB (*in vitro* selection of LF74 characterized by larger leaf blades). The LC29 genotype shares phenotype traits with *C. pubescens*, while LF211, LF40, LF74 and LF74GB exhibit morphological characteristics resembling *C. calisaya*.

Through multiple *in vitro* subcultures spanning decades, the selected cinchona genotypes were initially established *in vitro* at Agroscope Changins-Wädenswil ACW (Switzerland), and subsequently transferred to the Plant Tissue Culture laboratory at the Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia

(Theiler, 2014; Saavedra, *et al.*, 2025), where they have been maintained and propagated *in vitro*, then transferred to soil and planted in the field (*ex vitro*), providing a reliable source of plant material for genetic analysis and stock for plantation development. For the ISSR analysis, a total of fourteen samples were taken from genotypes grown *in vitro* and *ex vitro*, including the genotype S29, obtained from seed progeny derived from a LC29 *ex vitro* plant under field conditions (Table 1). A plant of *Coffea* sp. (a related genus to *Cinchona* within the Rubiaceae family), was added as a control as it differs taxonomically with *Cinchona* species. Additionally, a group of plants (10 samples) under field conditions derived from *in vitro* plants of unknown *in vitro* genotype origin was included, as we aimed to confirm their genotype. The experimental design consisted of three main groups: (i) *in vitro* maintained genotypes, (ii) *ex vitro* genotypes propagated from known *in vitro* lines, and (iii) *ex vitro* plants of unknown genotype. For the ISSR analysis, leaf samples were collected from each genotype, with each sample representing an experimental unit and analyzed in triplicate.

Table 1. Plant samples of *Cinchona* hybrids under *in vitro* and *ex vitro* conditions, and the plant sample used as a control.

Genotype Name	In vitro / Ex vitro
LC29_IV	In vitro
LF74_IV	In vitro
LF74GB_IV	In vitro
LF211_IV	In vitro
LF40_IV	In vitro
S29_EV	Ex vitro
LC29_EV	Ex vitro
LF74_EV	Ex vitro
LF74GB_EV	Ex vitro
LF211_EV	Ex vitro
LF40_EV	Ex vitro
Coffea_Control	Plant of <i>Coffea</i> sp from field conditions used as a control.
Group of plants with unknown genotype origin	Ex vitro

DNA Extraction

For genomic DNA extraction of the cinchona genotypes, 100 mg of fresh leaves from *in vitro* and *ex vitro* plants of each genotype was placed into a 2 mL extraction tube

Table 2. List of used inter simple sequence repeat (ISSR) primers, their sequence and annealing temperature.

Primer Name	Primer Sequence 5'-3'	Annealing Temperature (°C)	Reference
ISSR1	AGAGAGAGAGAGAGAGT	52 °C	Armijos-González, R., Espinosa-Delgado, L., & Cueva-Agila, A. (2021)
ISSR2	AGAGAGAGAGAGAGAGC	54 °C	
ISSR3	AGAGAGAGAGAGAGAGG	56 °C	
ISSR4	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	56 °C	
ISSR5	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	54 °C	
ISSR6	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	51 °C	
ISSR7	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52 °C	Yan L., Ogutu, C., Huang, L. et al., 2019
ISSR8	ACACACACACACACACG	51 °C	

containing eight zirconia beads (0.5 mm), the tissue was ground and homogenize at 5.000 rpm for 2 minutes in a lab-built bead beater. Then total DNA was isolated using the modified CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) protocol defined by Inglis *et al.* (2018), with the inclusion of proteinase K (0.2 mg) during the initial incubation step. DNA integrity was assessed by electrophoresis on a 1% agarose gel, run at 100V/cm for 20 minutes. In addition, quality was checked with a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). All DNA samples were diluted to a final concentration of 20 ng/μL and stored at -20°C until further ISSR PCR amplification.

ISSR molecular markers and analysis

A total of 10 ISSR primers were chosen based on previous reports of ISSR profiling in Rubiaceae family plants, however only 8 of them showed polymorphism (Table 2). The PCR amplification reactions were performed in a volume of 10 μL, which contained 1X PCR buffer, 0.5 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 μM of each primer, 1 U of Taq DNA polymerase and 40 ng of genomic DNA. The conditions for PCR amplification was 94 °C for 4 min (Initial denaturation), followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min (Denaturation), 51-56 °C for 1 min (Annealing), 72 °C for 2 min (Extension) and 72 °C for 7 min (Final extension), for each primer PCR conditions were standardized, and the corresponding annealing temperatures are shown in Table 2. Amplified DNA samples with all the 8 ISSR primers were run in 1.5% agarose gel at 80 V/cm for 60 min, and ISSR fragments generated in this experiment were documented using gel documentation (Bio-Rad, USA), molecular weights of the DNA fragments were determined using a DNA ladder between 500 and 5000 bp (Bioline - HyperLadderTM 500bp) (Supplementary Material).

For data analysis, reproducible clear amplified bands in the gel profiles were recorded as present (1) and absent (0), resulting in a binary matrix. Each primer was evaluated with regard to the total number amplified loci (NAL), total number of polymorphic loci (NPL), rate of polymorphism (RP) $(RP) = (NPL / NAL) \times 100$ and the value of the content of polymorphic information (PIC) according to the equation proposed by (Roldán-Ruiz *et al.*, 2000): $PIC_i = 2fi(1-fi)$

where PIC_i is PIC for primer i , f_i is the frequency of amplified fragments and $1 - f_i$ is the frequency of non amplified fragments. A dendrogram indicating the association between the genotypes was created by using the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) based on Jaccard's similarity coefficients (Sneath & Sokal, 1973). Besides, principal component analysis (PCA) was conducted to examine the existing genetic variation between cinchona hybrid genotypes, all of the analysis were performed in the software R Language V4.4.2 (R Core Team, 2021).

RESULTS AND DISCUSSION

A total of ten ISSR primers were used to reveal genetic polymorphism in different genotypes of cinchona grown *in vitro* and *ex vitro*. Among these, eight primers successfully amplified reproducible DNA band profiles. A total of 61 loci were amplified, of which 37 loci (60.92%) were polymorphic (Table 3). The total number of amplified loci (NAL) per primer ranged from 5 (ISSR5) to 12 (ISSR3), with an average of 7.62 loci per primer. The total number of polymorphic loci (NPL) varied from 3 (ISSR2 and ISSR5) to 6 (ISSR3, ISSR4, and ISSR6), with an average of 4.625 polymorphic loci per primer. The rate of polymorphism (RP%) ranged from 50.0% (ISSR2)

Table 3. Total number of loci, number of polymorphic loci, rate of polymorphism and value of the polymorphic information content of eight ISSR primers in the *Cinchona* hybrids individuals.

ISSR PRIMER	Total number amplified loci (NAL)	Total number of polymorphic loci (NPL)	Rate of Polymorphism (RP %)	Content of polymorphic information (PIC)
ISSR1	7	4	57,1	0,229
ISSR2	6	3	50,0	0,369
ISSR3	12	6	50,0	0,399
ISSR4	8	6	75,0	0,473
ISSR5	5	3	60,0	0,142
ISSR6	7	5	71,4	0,426
ISSR7	9	6	66,7	0,260
ISSR8	7	4	57,1	0,408
Average	7,62	4,62	60,92	0,338
Total	61	37	NA	

NA: Not Applicable

to 75.0% (ISSR4), with an overall average of 60.92%. The polymorphic information content (PIC), a measure of primer informativeness that takes into account the relative frequency of the allele, ranged from 0.142 (ISSR5) to 0.473 (ISSR4), with an average PIC value of 0.338.

The moderate level of polymorphism detected is consistent with the expectations for hybrids genotypes, which typically exhibit intermediate variability due to their mixed parental origin and the monophyletic nature of the genus confirmed using molecular markers (Andersson & Antonelli, 2005). Notably, the primers ISSR4 followed by ISSR6 emerged as most informative, with the highest RP% and PIC values, making them useful for detecting genetic differences in *cinchona* genotypes. High polymorphism rates and PIC values mean that these primers can detect subtle genetic differences between closely related genotypes. This is consistent with studies in *Coffea* species (Kumar *et al.*, 2023; Mishra *et al.*, 2022), which demonstrated that certain primers can differentiate hybrids even when morphological differences are minimal.

In this study, it was included a plant of coffee as a control, which allowed for a comparative analysis with the *Cinchona* genotypes, offering a baseline to evaluate the genetic profiles of *Cinchona* samples in relation to a related genus within the *Rubiaceae* family. The results showed a clear difference in the DNA profile between the genus *Coffea* and *Cinchona*. Besides, the Cluster

analysis using the UPGMA method and Jaccard coefficient, placed the 11 *cinchona* hybrid genotypes in two groups (Figure 1). The first group includes a cluster consisting of genotypes LC29_IV, S29_EV and LC29_EV. Group two consists of three sub-clusters: the first containing LF211_EV, LF211_IV, the second with LF40_IV, LF40_EV, and the third consisting of LF74EV, LF74GB_EV, LF74_IV and LF74GB_IV (Figure 1).

The PCA results revealed that the first two principal components (PC1 and PC2) explained a substantial proportion of the total variance, with PC1 accounting for 56.87% and PC2 contributing 23.26% (Fig. 2). Together, these two components explained 80.13% of the total variance in the dataset, suggesting that they capture the majority of the genetic variation among the genotypes. Specifically, the *cinchona* hybrids (LC29_IV, S29_EV, and LC29_EV) were grouped in the PCA plot, indicating their genetic similarity and reflecting their shared ancestry. It is important to note that the S29_EV genotype, which was derived from seeds produced by an LC29_EV under field conditions, was grouped in the same group.

In contrast, the separation of the remaining genotypes into three distinct sub-clusters indicates a greater degree of genetic differentiation compared to the LC29 hybrid group. Within this group, the first sub-cluster (LF211_EV, LF211_IV) represents a set of genotypes with closer genetic similarity. The second sub-cluster (LF40_EV, LF40_IV) and the third sub-cluster (LF74_EV, LF74GB_EV, LF74_IV, LF74GB_IV) are positioned closer

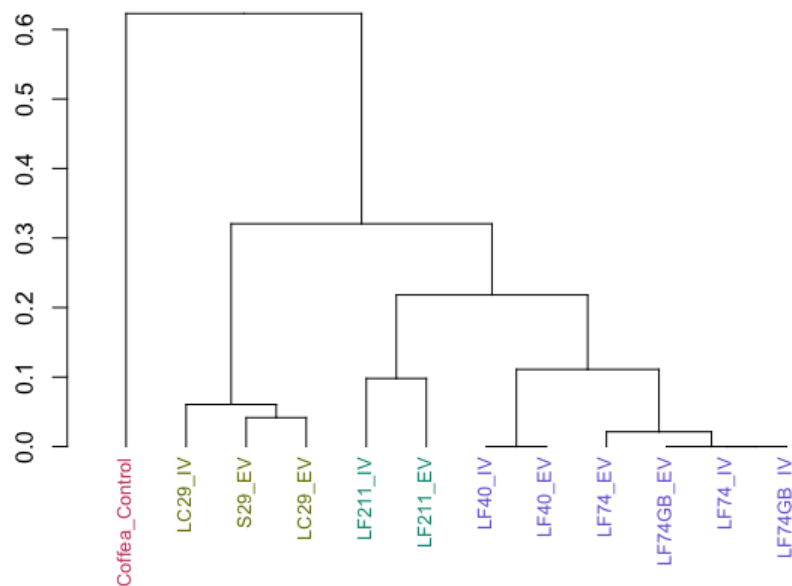


Figure 1. UPGMA Dendrogram of Cinchona genotypes *in vitro* and *ex vitro* based on jaccard similarity index.

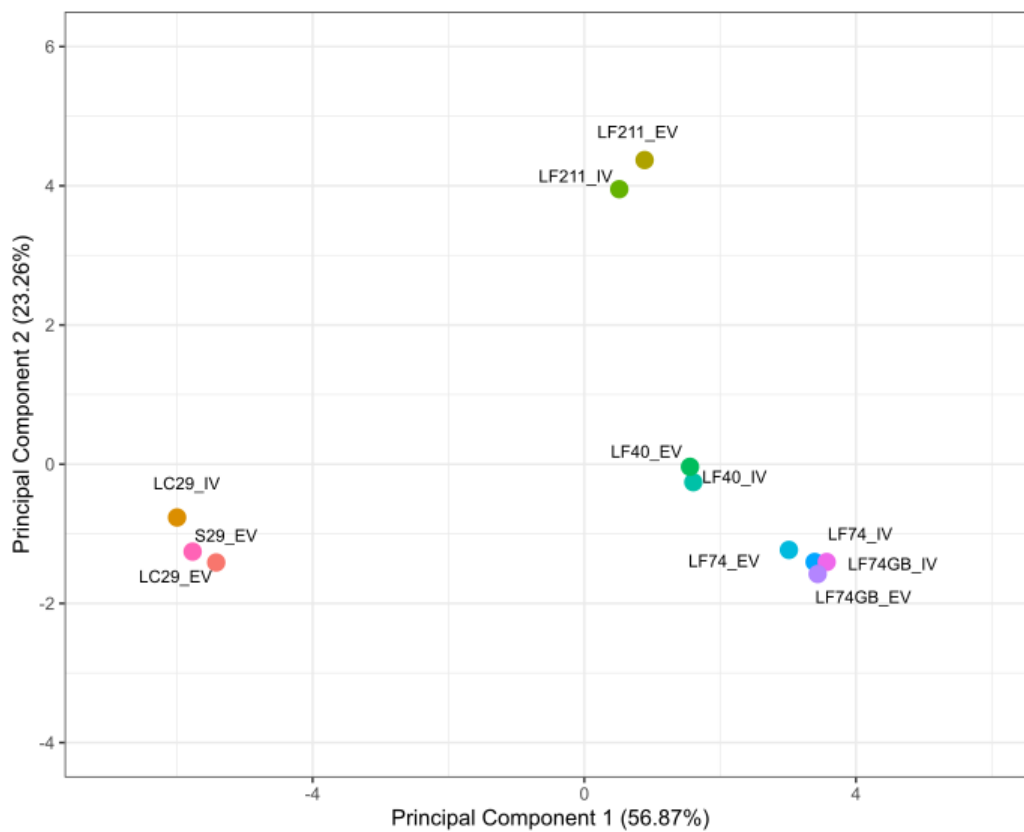


Figure 2. Principal component analysis (PCA) of Cinchona hybrids ISSR data, PC1 accounted for 53.43% and PC2 for 31.29% of variance.

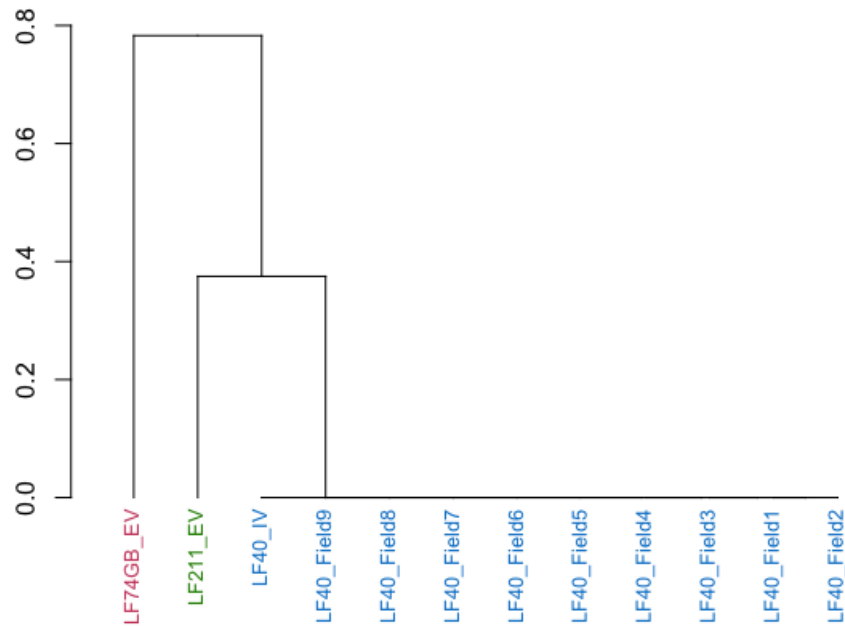


Figure 3. UPGMA Dendrogram of *Cinchona* genotypes from field based on Jaccard similarity index, using only the primers ISSR4 and ISSR6.

to each other, suggesting that these genotypes share a distinct genetic profile with only minor differences. Furthermore, the grouping of LF74 and LF74GB underscores the particularly close genetic relationship between these genotypes, reflecting their shared genetic origin. The overall clustering patterns confirm that the genotypes within each node or sub-cluster share a common ancestry and maintain a high level of genetic consistency under *in vitro* and *ex vitro* conditions.

The clustering pattern among the clones may reflect the morphological characteristics of the genotypes, and their genetic relation with *C. calisaya* and *C. pubescens*. Moreover, a previous study using RAPD markers found that *C. calisaya* is the most genetically distinct species among a collection of *Cinchona* accessions including *C. pubescens*, and *Cinchona sp.* from the Junghuhn Nature Reserve in Indonesia, detecting polymorphism levels as high as 75% (Sasongko *et al.*, 2021). Similarly, in this study ISSR markers revealed a separation between the genotype LC29 genotype which shares phenotypic traits with *C. pubescens*, and the LF211, LF40, LF74, and LF74GB genotypes related with *C. calisaya*, which could explain the genetic divergence found between the evaluated genotypes.

Furthermore, we selected the ISSR4 and ISSR6 primers based on their high level of polymorphism, to identify 9 field-grown plants (6–12 years old) derived from *in vitro* cultures of unknown genotype origin, since it was unclear whether they belonged to the genotypes LF40, LF211, or LF74. Using these primers, it was possible to classify all field plants belonging to the LF40 genotype and therefore labeled as LF40_Field (Fig. 3). Moreover, based on their genetic profiles, a clear genetic distinction from the LF211 and LF74 genotypes was observed. The ISSR markers evaluated in this study provide a useful tool for assessing the genetic diversity of native tree species *Cinchona calisaya* and *C. pubescens*, both distributed across different regions of Colombia (Aymard, 2019). Additionally, these markers could facilitate the development of genetic improvement programs involving these two species, given their ability to discriminate hybrids, this also opens the possibility of using them to certify plant material intended for propagation in commercial plantations.

Finally, the overall similarities found between the different *Cinchona* genotypes under *in vitro* and *ex vitro* conditions, demonstrates a genetic consistency through the plant acclimatization process. Which is important for detecting the desirable traits of the genotypes. However, the detec-

tion of minor genetic differences between clones of the same genotypes, might potentially be attributable to somaclonal variation (Armijos-González *et al.*, 2021), caused by spontaneous and uncontrolled genetic changes in plants during long-term *in vitro* propagation and different factors such as the exposure to plant growth regulators, and the stress associated with *in vitro*, manifesting changes as small polymorphisms, chromosomal rearrangements, alterations in gene expression or epigenetic changes (Armijos-González *et al.*, 2021; Duta-Cornescu *et al.*, 2023). However, to conclusively confirm the presence of somaclonal variation in the genotypes evaluated in this study, further research is required.

CONCLUSIONS

This study demonstrates the utility of ISSR markers to identify and differentiate *Cinchona* spp. genotypes under *in vitro* and *ex vitro* conditions. The ISSR analysis revealed moderate genetic polymorphism and allowed the identification of the different genotypes: LC29, LF211, LF40, and LF74. The primers ISSR4 and ISSR6 with the highest rate of polymorphisms are capable of detecting subtle genetic differences between closely related genotypes, identifying a group of field-grown plants of unknown genotype origin, within the LF40 genotype group. In addition, minor genetic variations within clones of the same genotype are likely attributable to somaclonal variation due to the long-term *in vitro* subculturing practices, however further investigation is needed to assess the genetic stability of *Cinchona* spp. genotypes. The findings presented here enable more accurate genetic verification of *Cinchona* genotypes, facilitating improved quality assurance, certification, also contributing to the management and conservation of *Cinchona* spp. genetic resources through accurate genotype identification

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Instituto de Biotecnología of the Universidad Nacional de Colombia (IBUN), particularly the Laboratory of Plant Tissue Culture, and the Laboratory of Molecular Characterization for the technical assistance, infrastructure, and equipment provided for this research.

REFERENCES

Amom, T., & Nongdam, P. (2017). The use of molecular marker methods in plants: A review. *International Journal of Current Research and Review*, 9(17), 1–7.
 Amruthakumar, S., Manivel, B., Sivamani, K., Sethuraman, T., Rao, N. S. P., & Ganesh, D. (2024). Molecular identity for commercially important inter-specific

hybrids of *Coffea* using ISSR-DNA marker: Implication on genetic improvement. *Plant Biotechnology Reports*, 18(3), 425–436.
 Andersson, L. (1998). A revision of the genus *Cinchona* (Rubiaceae–Cinchoneae). *Memoirs of The New York Botanical Garden*, 80: 1–75.
 Andersson, L., & Antonelli, A. (2005). Phylogeny of the Tribe Cinchoneae (Rubiaceae), Its Position in Cinchonoideae, and Description of a New Genus, *Ciliosemia*. *Taxon*, 54(1), 17. <https://doi.org/10.2307/25065299>.
 Aranha Trelles, K. A., & León Piedra, A. G. (2013). *Evaluación de la transferencia de microsatélites *ssr's* loci provenientes de otras Rubiáceas a Cinchona officinalis L* [Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/7867>
 Arbizu, C. I., Ferro-Mauricio, R. D., Chávez-Galarza, J. C., Guerrero-Abad, J. C., Vásquez, H. V., & Maicelo, J. L. (2021). The complete chloroplast genome of the national tree of Peru, quina (*Cinchona officinalis* L., Rubiaceae). *Mitochondrial DNA Part B*, 6(9), 2781–2783.
 Armijos-González, R., Espinosa-Delgado, L., & Cueva-Agila, A. (2021). Indirect Shoot Regeneration Using 2,4-D Induces Somaclonal Variations in *Cinchona officinalis*. *Floresta e Ambiente*, 28, e20210017. <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2021-0017>
 Arya, L., Narayanan, R., Kak, A., Pandey, C., Verma, M., & Gupta, V. (2022). ISSR marker based genetic diversity in *Morinda* spp. For its enhanced collection, conservation and utilization. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01321-2>
 Aslam, S., Jabeen, T., Ahmad, M., & AL-Huqail, A. A. (2023). *Cinchona*. In *Essentials of Medicinal and Aromatic Crops* (pp. 221–248). Springer.
 Aymard, G. A. (2019). Breve reseña de los aspectos taxonómicos y nomenclaturales actuales del género *Cinchona* (Rubiaceae-Cinchoneae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43, 234–241.
 Canales, N. A., Hansen, T. N. G., Cornett, C., Walker, K., Driver, F., Antonelli, A., Maldonado, C., Nesbitt, M., Barnes, C. J., & Rønsted, N. (2020). Historical chemical annotations of *Cinchona* bark collections are comparable to results from current day high-pressure liquid chromatography technologies. *Journal of Ethnopharmacology*, 249, 112375.
 Canales, N. A., Pérez-Escobar, O. A., Powell, R. F., Töpel, M., Kidner, C., Nesbitt, M., Maldonado, C., Barnes, C. J., Rønsted, N., Przelomska, N. A., & others. (2022). A highly contiguous, scaffold-level nuclear genome assembly for the fever tree (*Cinchona pubescens* Vahl) as a novel resource for Rubiaceae research. *Giga-Byte*, 2022.

- Cueva-Agila, A., Vélez-Mora, D., Arias, D., Curto, M., Memberg, H., & Brinegar, C. (2019). Genetic characterization of fragmented populations of *Cinchona officinalis* L. (Rubiaceae), a threatened tree of the northern Andean cloud forests. *Tree Genetics & Genomes*, 15(6), 81. <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1393-y>
- de Swiet, M. (2023). Cinchona: The source of quinine and quinidine. In *Modern Medicines from Plants* (pp. 93–102). CRC Press.
- Du, C., Xiao, Y., Liu, J., He, Q., Li, W., & Xie, W. (2025). A near-complete genome assembly of *Cinchona calisaya*. *Scientific Data*, 12(1), 122.
- Duta-Cornescu, G., Constantin, N., Pojoga, D.-M., Nicuta, D., & Simon-Gruita, A. (2023). Somaclonal Variation—Advantage or Disadvantage in Micropropagation of the Medicinal Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 838. <https://doi.org/10.3390/ijms24010838>
- Godwin, I. D., Aitken, E. A., & Smith, L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18(9), 1524–1528.
- Holland, J. (1932). Ledger bark and red bark. *Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Botanic Gardens, Kew)*, 1932(1), 1–17.
- Hussain, H., & Nisar, M. (2020). Assessment of plant genetic variations using molecular markers: A review. *J. Appl. Biol. Biotechnol*, 8(5), 99–109.
- Inglis, P. W., Pappas, M. de C. R., Resende, L. V., & Gratapaglia, D. (2018). Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. *PLOS ONE*, 13(10), e0206085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206085>
- Jaramillo-Arango, J. (1949). A Critical Review of the Basic Facts in the History of Cinchona. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 53(352), 272–311. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1949.tb00419.x>
- Ku, Y. (2016). The Development of Cinchona Cultivation and ‘Kina Gaku’in the Japanese Empire, 1912–45. In *Environment, Modernization and Development in East Asia: Perspectives from Environmental History* (pp. 157–181). Springer.
- Kumar, D., Nanthini, B., Rao, S. P., Krishnan, Y., Sethuraman, T., & Doss, G. (2023). Inheritance of RAPD and ISSR markers in hybrid derivatives of inter-specific coffee hybrid (*Coffea canephora* Froehner x *Coffea arabica* Pierre): Implications on genetic improvement and plant variety protection. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3057978/v1>
- Mishra, M. K., Huded, A. K. C., Jingade, P., & Bychappa, M. (2022). Molecular characterization and genetic structure analysis of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* cultivars from India using SCoT markers. *Ecological Genetics and Genomics*, 23, 100117. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2022.100117>
- Perez Ocampo, J. (2021). *Diversidad y distribución de las quinas (Cinchona, Rubiaceae) usando DNA barcoding para su conservación en Amazonas*.
- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing* [Computer software]. <https://www.R-project.org/>
- Raji, R., & Siril, E. (2021). Genetic diversity analysis of promising Ceylon olive (*Elaeocarpus serratus* L.) genotypes using morphological traits and ISSR markers. *Current Plant Biology*, 26, 100201.
- Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., & De Loose, M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrass (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding*, 6(2), 125–134. <https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>
- Saavedra Correa, J. D., Bustamante Rodríguez, S. L., & Theiler, R. (2025). Optimizing ex vitro acclimatization of *Cinchona* spp.: Towards the establishment of an industrial crop in Colombia / Optimización de la aclimatación ex vitro de *Cinchona* spp.: Hacia el establecimiento de un cultivo industrial en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 27(1), 70–78. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.118377>
- Sasongko, N., Yuniati, A., & Billmora, L. G. (2021). Genetic profiles of three Cinchona species in Junghuhn Natural Reserve, Indonesia. *SABRAO Journal of Breeding & Genetics*, 53(4).
- Schaepmeester, D. H. (2021). *Trees Against Malaria: Alkaloid Concentrations And Management Of Cinchona Trees In Peru And The Dr Congo* [Ghent University]. https://libstore.ugent.be/fulltxt/RUG01/003/012/931/RUG01-003012931_2021_0001_AC.pdf
- Sneath, P. H. A., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. W. H. Freeman and Co.
- Steere, W. C. (1945). The cinchona-bark industry of South America. *The Scientific Monthly*, 61(2), 114–126.
- Taylor, N. (1943). Quinine: The Story of Cinchona. *The Scientific Monthly*, 57(1), 17–32.
- Theiler, R. (2014). *Cinchona a journey around the world* [Seminar]. Seminario de investigación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, National University of Colombia, Bogotá. <https://www.ibun.unal.edu.co>
- Veale, L. (2010). *An historical geography of the Nilgiri Cinchona plantations, 1860-1900* [PhD Thesis]. University of Nottingham.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176–183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>

Stress responses induced by pre-germination treatments and their identification based on seed germination patterns

Respuestas al estrés inducidas por tratamientos pre-germinación y su identificación basada en patrones de germinación de semillas

Guillermo Carrillo Castañeda*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.114694

ABSTRACT

Tomato is an important vegetable crop in the world and the fruit is widely known as food and as a protector of health. Seed priming improves its germination potential, better seedling establishment, and vigorous growth. Seed priming in water or chemical solutions is a pre-germination treatment that induces mild or stressful stress during the early phases of germination. The primed seed builds a 'priming memory' necessary to configure an "acquired stress response" and upon subsequent stress exposures, they respond more quickly and robustly. The tomato seeds were primed in water (20 h at 20-21 °C) and in 200 mM NaCl and KNO₃ solutions (10 days at 28-29 °C) (stressful condition) to induce stress responses which were characterized in terms of their patterns of germination and velocity of germination, expressed as the time (hours) to 50 per cent germination (T₅₀), when primed seeds were set to germinate in water and wastewater (stressful conditions). Four replicates of 25 seeds on sheets of filter paper in Petri dishes were moistened with 4 mL of distilled water or wastewater and set to germinate (28-29 °C). KNO₃ induced the fastest and strongest stress response. The T₅₀ of germination in water (15 h) and wastewater (27 h) and the patterns of germination were different from those induced by the NaCl solution. T₅₀ of seeds germinated in water (41 h) and wastewater (39 h) required more time for the seeds primed in the NaCl solution. The induced stress responses did not affect the total germination.

Keywords: Germination kinetics, germination speed, induced stress memory, mild stress.

RESUMEN

El jitomate, hortaliza importante en el mundo como fruto ampliamente conocido como alimento y protector de la salud. Mediante el remojo de semillas su potencial de germinación y su establecimiento se mejoran y las plántulas crecimiento vigorosamente. El remojo de semillas en agua o soluciones químicas es un tratamiento previo a la germinación que induce un estrés leve o estresante durante las primeras fases de la germinación. La semilla tratada construye una "memoria" necesaria para configurar una "respuesta de estrés adquirida" y, ante exposiciones de estrés posteriores, responde más rápidamente y contundente. Las semillas se trataron en agua (20 h a 20-21 °C) y en soluciones 200 mM de NaCl y KNO₃ (10 días a 28-29 °C) (condición estresante) para inducir respuestas de estrés que se caracterizaron por sus patrones y velocidad de germinación, expresada como el tiempo (horas) requerido para el 50% de germinación (T₅₀), al germinar las semillas en agua y aguas residuales (condición estresante). Muestras de 25 semillas (4/

* Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. REGEP-Genética. Km 16.5 Carretera México Texcoco, Montecillo, Texcoco 56264, México. <https://orcid.org/0000-0003-3444-3902>, carrillo@colpos.mx

condición experimental) sobre papel filtro en cajas Petri, humedecidas con 4 mL de agua o agua residual y germinadas a 28-29 °C. KNO₃ indujo la respuesta de estrés más rápida y fuerte. El T₅₀ de germinación en agua (15 h) y aguas residuales (27 h) y los patrones de germinación fueron diferentes a los inducidos por la solución de NaCl. El T₅₀ de semillas germinadas en agua (41 h) y aguas residuales (39 h) requirió más tiempo para estas semillas. Las respuestas de estrés inducidas no afectaron sensiblemente la germinación total.

Palabras clave: Cinética de germinación, estrés leve, memoria de estrés inducida, velocidad de germinación.

Recibido: diciembre 12 de 2024

Aprobado: 15 de octubre de 2025

INTRODUCTION

Tomato crop, cultivated in almost every country of the world is quite important regarding both income and nutrition (Quinet *et al.*, 2019). Tomato is used for the fresh market and tomatoes are grown outdoors and mechanically harvested for the canning industry. The fruit is widely known as food and as a protector of health due to its content and outstanding nutritional value (it is an excellent source of organic acids, essential amino acids, vitamins A and C, minerals such as iron, phosphorus, lycopene, beta-carotene pigments, and dietary fiber) (Shi and Le Maguer, 2010; Kheyrodin, *et al.*, 2017). Tomato has been bred to improve yield, fruit quality, and resistance to biotic and abiotic stresses and the most common strategy widely applied to improve this crop is the traditional plant breeding procedures (Moose and Mumm, 2008). Due to its agronomical and fruit-important features, tomato is becoming a model organism for developmental and stress biology and food science issues (Kimura and Sinha, 2008; Quinet *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2022a). Plants have always coped with changing abiotic conditions. Their subsistence, growth, and productivity have been disturbed by environmental abiotic stresses throughout their approximately 500 million years of evolution, but they have generated and diversified defense response strategies to the different types of environmental stresses (Chen and Soltis, 2020). Seeds and plants have evolved multiple mechanisms to perceive environmental threats and make, in response, suitable adjustments to improve their physiologic and biochemical functions to survive, germinate and grow, known as a "molecular stress memory" (Yuan *et al.*, 2024). The molecular stress memory is used to develop the "acquired stress response" based on strategies that have been developed throughout their evolutionary process (Sani *et al.*, 2013; Hilker *et al.*, 2016). Such response is based on a set of epigenetic adjustments, regulated through signaling pathways and modulated by DNA methylation, histone modification, and alterations of the chromatin structure and regulation of physiological, metabolic, developmental, cellular, and molecular processes in response to future reoccurring environmental stress events

(Lamers *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023). As plants quickly respond forcefully, consequently, they have a better chance of surviving (Hilker *et al.*, 2016). For example, a treatment that causes a non-lethal heat stress condition directs the processing of the primary transcription unit of the mRNA (pre-mRNA), whose products are expressed and act as an acquired stress response, upon a second exposure to heat stress (Mauch-Mani *et al.*, 2017).

Seed priming is a practical and secure approach to improve seed germination potential (Ramírez *et al.*, 2022), better seedling establishment, vigorous growth, and high yields (Adhikari *et al.*, 2022; Granata *et al.*, 2024). This process activates the metabolism that occurs along the phases of germination before the root emergence, followed by drying near the original moisture content. Seed priming in water or chemical solutions is a pre-germination treatment that induces mild or stressful stress during the early phases of germination (Borromeo *et al.*, 2025).

The positive impacts of pre-germination treatments also play a critical role in boosting tolerance to environmental stress conditions. This ultimately results in improved crop quality and yield. Seed priming is a practical but powerful treatment to improve seed germination potential (Ramírez, *et al.*, 2022) and according to several authors (McDonald, 1999; Farooq *et al.*, 2019; Sen and Puthur, 2020) "it consists of soaking the seeds in water or a solution of any agent, followed by drying the seeds, that have started the processes related to germination, but without the appearance of the radicles". Several authors (Powell and Matthews, 1978; Chen and Arora, 2013; Srivastava *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022; Noble *et al.*, 2023) indicate that this procedure "imparts a moderate abiotic stress to seeds while soaking during the early phases of germination and, depending upon the priming agent, stress effects occur in seeds and finally stimulate stress responses". The primed seed develops more orchestrated the last remaining physiological events for germination to occur and thus is capable of a) greater germination capacity and in a more synchronized manner (Harris and Jones, 1997; Reed *et al.*, 2022; Adhikari

et al., 2022), b) better seedling establishment, c) vigorous growth (Omid, et al., 2009; Shabbir et al., 2013; Sofo et al., 2014; O'Callaghan, 2016; Liu et al., 2022). Secondly, priming establishes improved abiotic stress responses in seeds, they respond quickly and forcefully and therefore, exhibit greater stress tolerance (Chen and Arora, 2013; Sher et al., 2019; Marthandan et al., 2020; Arun et al., 2022; Louis et al., 2023). Authors (Liu et al., 2022b; Kambona et al., 2023) indicate that "Stress memory responses and seed priming correlate with drought tolerance in plants". Farooq et al., (2019) indicated, that "Seed priming represents a versatile approach for mitigating stress-induced damage in widely cultivated local crop varieties". In the imbibition of water by seeds, fast water uptake occurs in phase I, phase of great metabolic activity in phase II, and uptake of water and germination in phase III (Bewley and Black, 1978; Heydecker and Gibbins, 1978). Water uptake triggers the "germinative metabolism" (e. g. respiration, translation of RNAs and synthesis of germination-associated early proteins, mitochondrial, cell membranes and DNA repair, the breakdown of storage reserves, endosperm weakening, etc.) which takes place from the beginning and along phase II of the imbibition process (Forti et al., 2021; Diya et al., 2024). The objective of this work has been to study the impact of mild (seeds exposed to pre-germination treatments in water) and severe stress conditions (seeds exposed to pre-germination treatments in salty solutions) on the expression of stress responses. The differentiation of the seed responses was based on the speed of germination (T_{50}) and patterns of germination when seeds were set to germinate in water and under stressful conditions (wastewater). The second objective was to identify the pre-germination treatment that ensures the fastest stress response.

It is considered that seeds acquire molecular stress memory through an initial pre-germination treatment of mild stress. The objective of this research is to investigate the variations in the expression of molecular stress memory when it is induced in seeds by the application of pre-germination stress treatments. After soaking-drying the seeds, determine the acquired stress response by comparing the patterns of germination kinetics and speed of germination as criteria when germinating the seeds in water and under stressful conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. *Solanum lycopersicum* L. (Tomato) seeds variety Río Grande from Hortaflor stored for 6 years (aged seed) and 2 years (unaged seeds), at room temperature. Residual sludge resulting from the treatment and cleaning of wastewater station located in the munic-

ipality of Atlacomulco, State of Mexico. Determination of the weight of absorbed water by 1.5 g of seed soaked in water at 21-22 °C throughout the 54-hour period. Two samples of 1.5 g of seed were placed inside a plastic cloth bag, soaked for 1 sec in the water, shaken vigorously to determine its wet weight at T_0 , and immediately submerged into 1000 mL of water at 21-22 °C. Every hour, the two samples of seed were weighed to determine the weight of water absorbed by them. The results presented were the average of the two samples. Preparation of a wastewater mud sample. 100 grams of sludge were mixed with 100 mL of sterile distilled water and, after shaking very well for 5 min, it was settled for half an hour to recover the supernatant. The supernatant was mixed 1:1 with sterile distilled water and sterilized in an autoclave at 1.02 kg/cm² for 18 min. Pre-germination treatments. Seed imbibition in static distilled water. The seed was imbibed for 20 h in 1000 mL of static distilled water at 20-21 °C. Seed imbibition in aerated distilled water. Seed was imbibed for 20 h in 1000 mL of aerated distilled water using a fish tank pump and a Biozon Frigor diffuser stone, at 19-20 °C. Then, all the seed was dried (75 min) in front of a fan. The dried seed was kept in the dark. Seed imbibition in 200 mM of KNO₃ and NaCl solutions was carried out by dispersing the seed on 3 sheets of sterile paper towels, in Petri dishes, moistened with 5 mL of the KNO₃ or NaCl solution. The dishes were placed in a germination chamber (28-29 °C) in the dark for 10 days. Then, the seed was washed with running tap water (30 seconds) and placed in Petri dishes to dry (75 min) in front of a fan. The dry seed was kept in the dark. The control seed did not receive pre-germination treatment.

Seed germination. Samples of 25 seeds (4 per experimental condition) were dispersed on triple sheets of sterile filter paper into Petri dishes, the paper was moistened with 4 mL of sterile distilled water or wastewater, as the case may be. The seeds were placed in a germination chamber (28-29 °C) in the dark. The quantification of the germinated seed was carried out on the indicated days (Coolbear et al., 1984).

Statistical analysis. The experiments were laid out in a completely randomized block design.

RESULTS AND DISCUSSION

Seed vigor is a trait that involves: seed dormancy, high viability, fast and synchronized germination, tolerance to aging, and optimal seedling establishment, particularly under stressful conditions. As seeds age, they progressively lose their vigor condition, and they become increasingly sensitive to priming stress that occurs between the start of priming and radicle emergence

(Bewley *et al.*, 2013). Priming is a transient environmental cue condition, that induces a process to generate adaptive responses expressed usually more rapidly and stronger when exposed to subsequent stress events (Sharma *et al.*, 2022). Since imbibition of seeds in water is a method commonly used to improve their functions (Artola *et al.*, 2003), it was relevant to define the pattern of water absorption by tomato seeds until the moment of germination. The hygroscopic properties of seeds are associated with their seed coat and internal structure and constitution (Miano and Augusto, 2018; Saleh *et al.*, 2018). The water absorption rate can be understood as moisture diffusion, and as the seed absorbs water, increases its moisture content, a rate that decreases as the process progresses. The tomato seeds (1.5 g) after 8, 24, and 54 h of imbibition in water absorbed 36, 55, and 61% respectively of their original dry weight (Figure 1). After 54 h of imbibition, ~1% of the seeds had already germinated. After 54 hours of imbibition, the seed should have carried out phases I and II of the pre-germination processes. The degree of hydration of the seed is an important requirement that is combined with time for the seed to reach germination capacity. The critical moisture content has been examined by several researchers (Chachalis *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2013; Asomaning and Sacandé, 2019) and also by studying soil moisture (Hou *et al.*, 2022).

Seeds, after a few minutes of hydration, reestablish respiration (oxygen consumption and CO₂ release) to generate energy to carry out metabolic activity before germination. For this reason, providing O₂ to the imbibition

medium should cause a considerable increase in germination (Al-Ani and Pradet, 1985; Al-Ani *et al.*, 1995; Bewley *et al.*, 2013). Oxygen is also a key signaling factor in the control of seed germination and dormancy (Corbineau, 2022), and with it, the reactivation and establishment of metabolism during seed imbibition, which leads to the production of reduction power and energy (ATP). Liu *et al.*, 2012 demonstrated that oxygen improved the metabolism of seeds, and high oxygen availability in the medium increased the vigor and germination of stored tomato seeds, since the presence of 0.15% H₂O₂ caused the best seed germination. Yasin and Andreassen, 2016 demonstrated that reduced oxygen concentrations can change both the proportion of seeds that germinate and the germination speed (T₅₀). The germination rate of *S. lycopersicum* seeds decreased if the O₂ concentration was below 10%. Seeds of most species fail to germinate with restriction or lack of oxygen. Tomato seeds germinate 50% in 7 days in water at 25 °C with around 5% oxygen (Corbineau, 2022). The sensitivity to lack of oxygen decreases with decreasing temperature, probably because the solubility of oxygen in water increases with decreasing temperature (Smok *et al.*, 1993). Artola *et al.*, (2003, 2003a) demonstrated that, by imbibing the seed in water, it is possible to increase the vigor condition of the *Lotus corniculatus* L. seed and developed a vigor test based on the reduction of O₂ in the germination medium (Artola *et al.*, 2004). Vidal-Lezama *et al.*, (2018) found differences in daily germination due to the effect of O₂ and the average germination speed (T₅₀) was much shorter when the seed was soaked in water with high oxygenation. Based on this

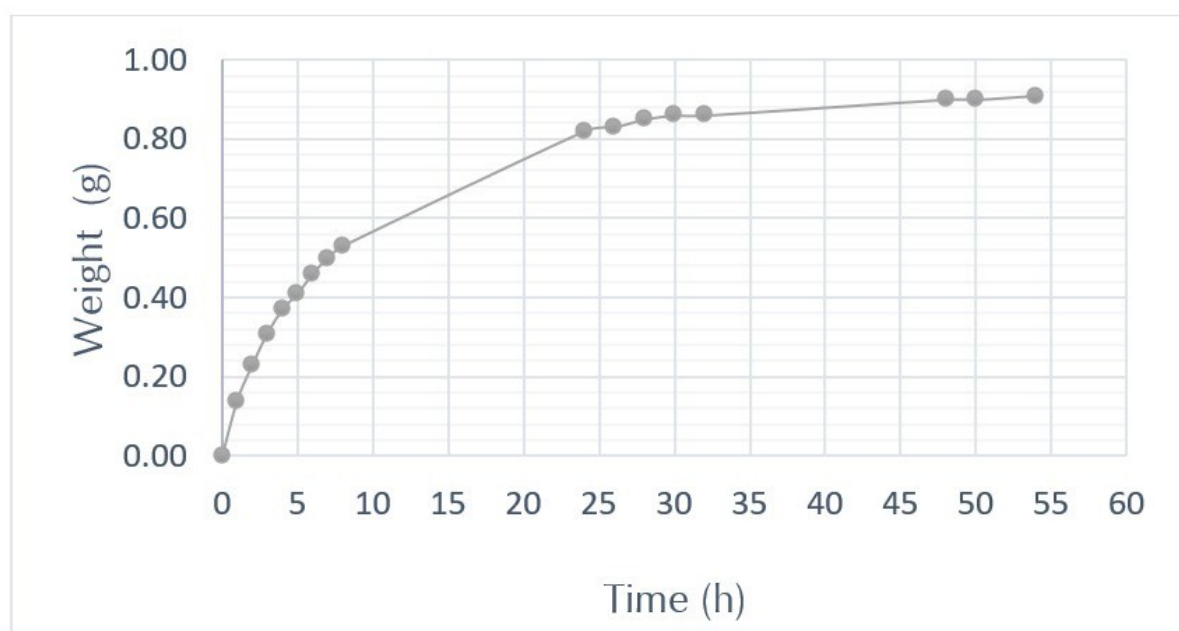


Figure 1. The weight of absorbed water by 1.5 g of seed soaked in water at 21-22 °C throughout 54 hours.

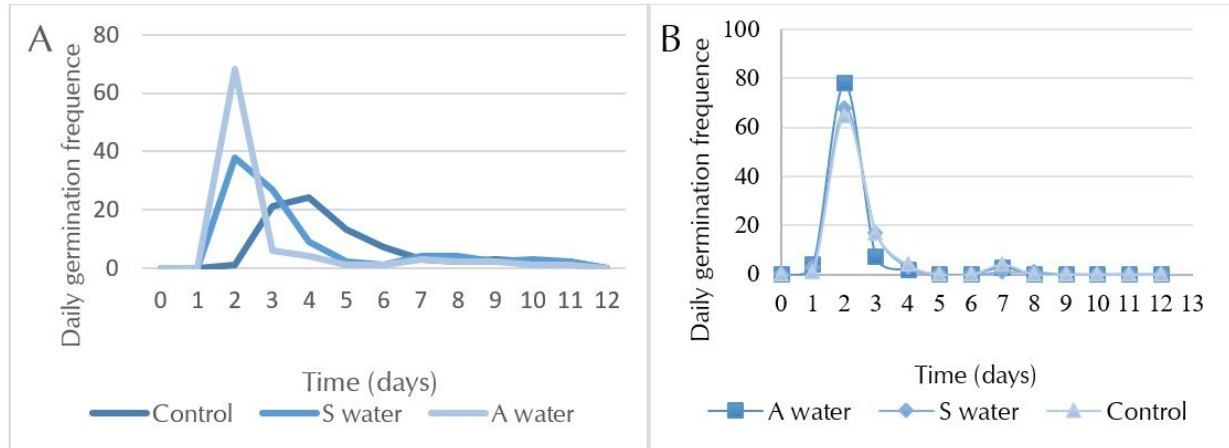


Figure 2. Patterns of germination exhibited by tomato aged seeds (A) and unaged seeds (B) Rio Grande variety, which had previously received a pre-germination treatment of imbibition in water for 20 h at 21-22 °C with aeration (A-water) and in static water without aeration (S-water).

information, it was pertinent to determine how this phenomenon is expressed in aged and unaged seeds of the Rio Grande variety. It can be seen (Figure 2A) that the degree of synchronization exhibited by aged seeds treated with high oxygen content was higher because of the moment at which the maximum frequency of germination was reached at 48 h and the degree of synchronization of the seed keeping in static water was 30% less. Unaged seeds under the three conditions show a high degree of synchrony (Figure 2B). These results have shown that the pattern and degree of synchronization depend on the physiological condition and potentiality of seeds to germinate earlier. The procedure applied in this work to considerably increase the synchronization of the seed was practical, fast, and safe and was only based on the oxygenation of the water. Other methods that have been described to improve seed synchronization are time-consuming and labor-intensive (Heydecker and Beryl, 1978). For example, increases in the synchronization of germination of celery seeds were obtained by treating the seeds with a solution of the salt mixture of c.-10 bar potential at 15 °C for 21 days. This treatment resulted in 50% germination of viable seeds in 1 to 4 days at 20 °C, compared to 13 to 7 days for untreated seeds (Salter and Darby, 1976). Another developed method consists of subjecting a seed population to a complex plurality of hydration and dehydration periods (Berrie and Drennan, 1971).

In the next part of this work, the response of seeds was determined when they were subjected to pre-germination treatments during 1, 5, and 10 days of imbibition in 200 mM solutions of KNO_3 or NaCl . After priming treatment, seeds were germinated in water to ana-

lyze their germination patterns. The impact of the duration of imbibition in water on the emergence (Ghassemi-Golezani *et al.*, 2016), the development of the crop (Ghassemi-Golezani *et al.*, 2010) and, in yield (Ghassemi-Golezani *et al.*, 2010a) has been studied. The seed primed in the KNO_3 by 10 days exhibited the fastest germination and the final germination was 89% (Figure 3A) followed by the seed treated 5 days; however, the seed primed 5 days in the NaCl solution germinated at the second day 75.9% and the final germination was 86.6%, while the seed primed for 10 days germinated 64% and the final germination was 81.3% (Figure 3B).

According to several researchers, the intensity and duration of environmental stimuli influence the acquired stress response of the plant, mediated by stress-associated molecules and metabolites, including phytohormones (Hilker *et al.*, 2016) and molecular stress memory remains as a somatic memory for the long term (Ling *et al.*, 2018; Srivastava *et al.*, 2021; Nair *et al.*, 2022).

Patterns of germination of seeds that did not receive pre-germination treatment, which were germinated in mild (water) and stressful (wastewater) conditions.

The seed, that did not receive priming treatment, managed to germinate in water after 4 days, 56 % (Figure 4A), and in wastewater (a stressful condition), only 13 % (Figure 4B).

These results give an idea of the time required for the seed to germinate under stress conditions. The total germination registered on day 10 was similar in both kinds of seeds, in water 75.3 and in wastewater at 72.0 %.

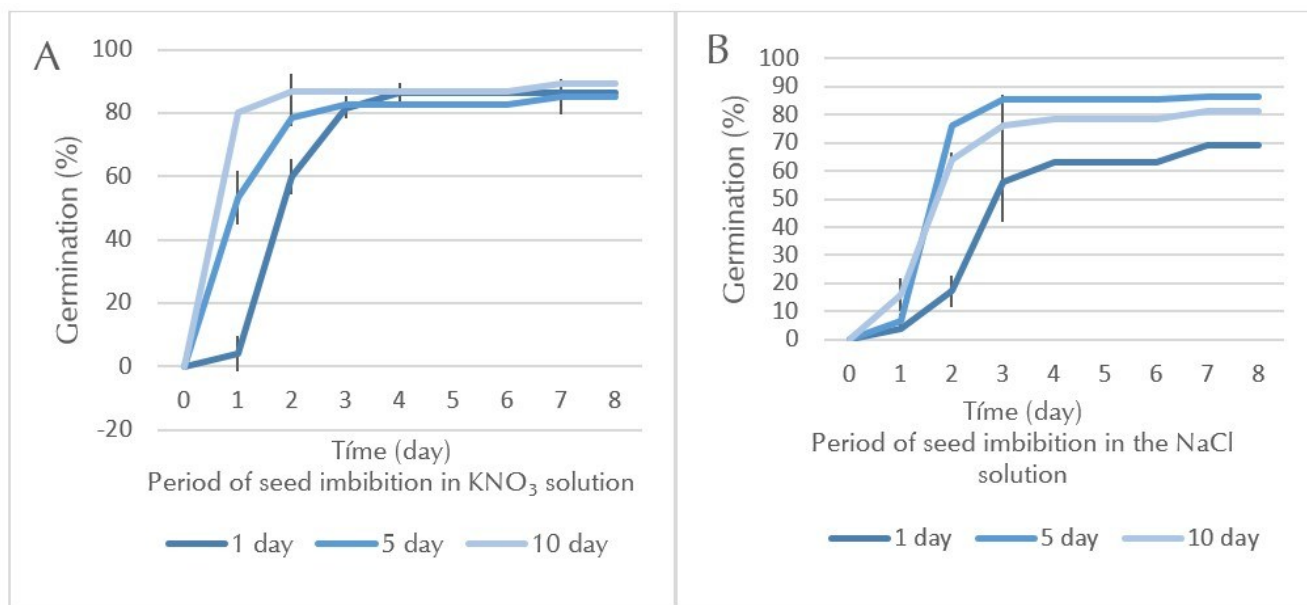


Figure 3. Germination kinetics of seeds exposed to pre-germination treatments in 200 mM KNO₃ (A) and 200 mM NaCl solution (B) for 1, 5, and 10 days. Seeds were germinated in distilled water.

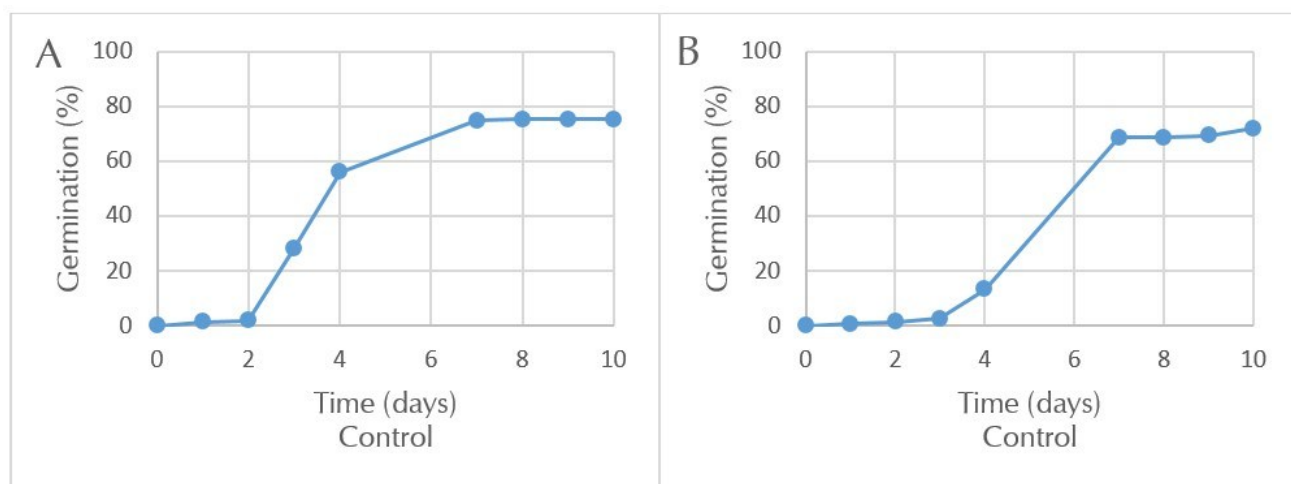


Figure 4. Germination pattern of seeds in water (A) and in wastewater (a severe stressful condition) (B). Seeds did not receive priming treatment.

Patterns of seed germination of seeds that were exposed to a mild pre-germination treatment (imbibition for 20 h in aerated distilled water) which were germinated in mild (water) and stressful (wastewater) conditions.

Seeds that received pre-germination treatment in aerated water on day 4 germinated 80% in water (Figure 5A) and 68% when germinated in the presence of wastewater (Figure 5B). These results demonstrate the effect of pre-germinative treatments on the expression of the induced response, according to the germination patterns of the seeds. The purpose was to test whether it is

possible to differentiate the expression of the induced stress response in seeds when they germinate in water and under stressful conditions. When comparing the germination patterns of seeds that did not receive priming treatment shown in Figures 4A and 4B and the corresponding patterns of seeds that were exposed to a mild pre-germination treatment shown in Figures 5A and 5B, great differences resulted, which demonstrate the positive effect of the pre-germinative treatment. It also positively affected total germination. Germination of seeds under mild and stressful conditions was 86% and 80%, respectively, which is higher compared to seeds that did

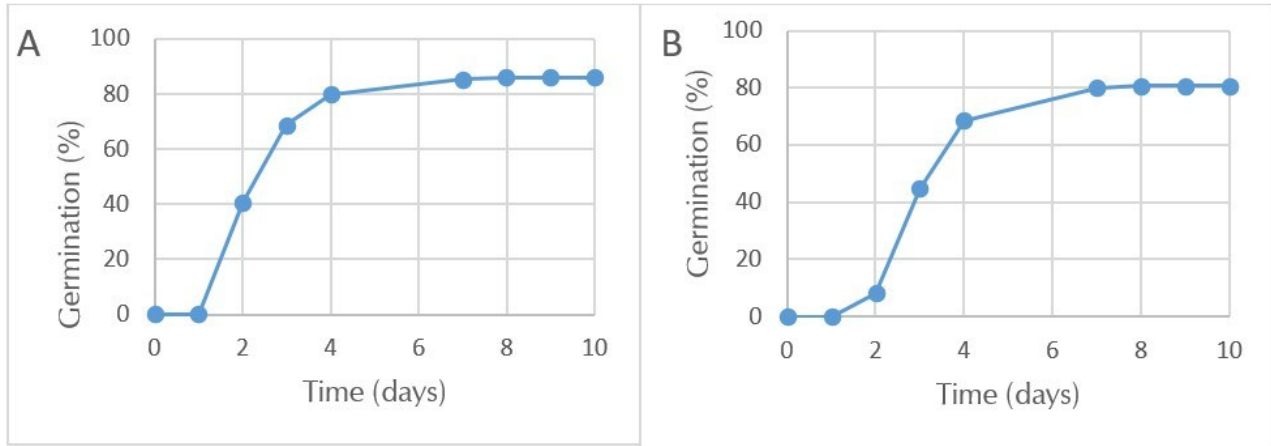


Figure 5. Germination patterns in water (A) and in wastewater (a stressful condition) (B) of seeds that had previously been subjected to pre-germination treatment in aerated water.

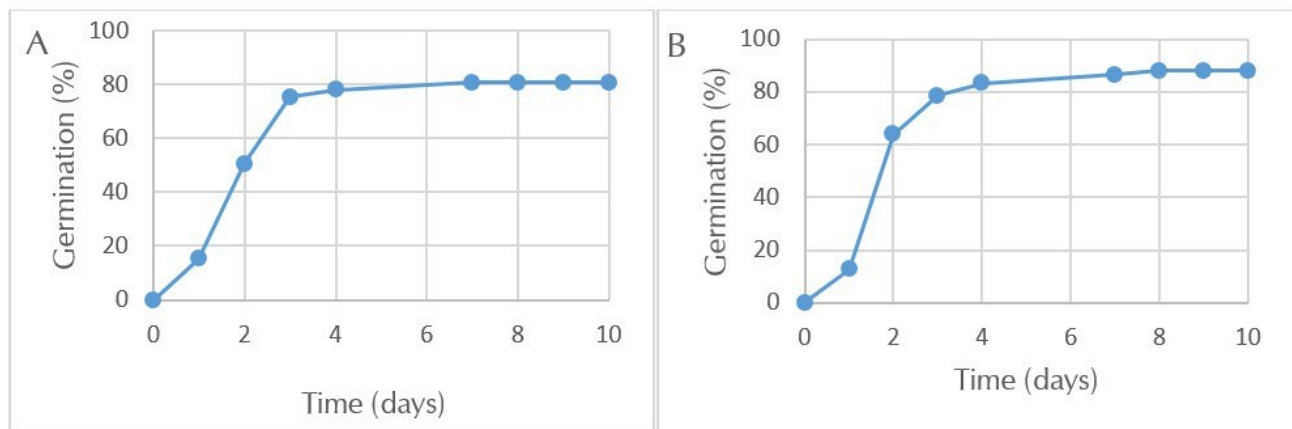


Figure 6. Seed germination pattern in water (mild stress condition) (A) and in wastewater (stressful condition) (B). The seeds had been previously exposed to a stressful pre-germinative treatment in 200 mM NaCl solution.

not receive pre-germination treatment. It is well-studied that priming seeds in water improves germination under stress (Khalequzzaman *et al.*, 2023).

Patterns of seed germination of seeds that were exposed to a pre-germinative treatment in NaCl 200 mM solution which were germinated in mild (water) and stressful (wastewater) conditions.

Seeds primed in the 200 mM solution of NaCl germinated much faster (Figures 6A and 6B) than seeds primed in water. In 3 days, these seeds germinated in water 75 % and under stressful conditions 78 %. The induced stress response was expressed similarly by seeds germinated under both conditions.

Patterns of seed germination of seeds that were exposed to a pre-germinative treatment in KNO₃ 200 mM solu-

tion which were germinated in mild (water) and stressful (wastewater) conditions.

The primed seed in the 200 mM KNO₃ solution (a stressful condition) was able to germinate 70% in water after 24 hours, with a final germination rate of 84.6%. In wastewater (a stressful condition), germination barely reached 37%, and the final germination rate was 80.6%. Again, the most important difference observed was the germination kinetics. The induced stress response expressed by seeds primed with NaCl and KNO₃ solutions differed when seeds were germinated under stressful conditions. This may be due to the chemical differences between the compounds NaCl and KNO₃, since the concentration of both priming solutions was the same. Several researchers have already demonstrated why seeds that have received pre-germination treatments are able to germinate in less time, and they explain that it is

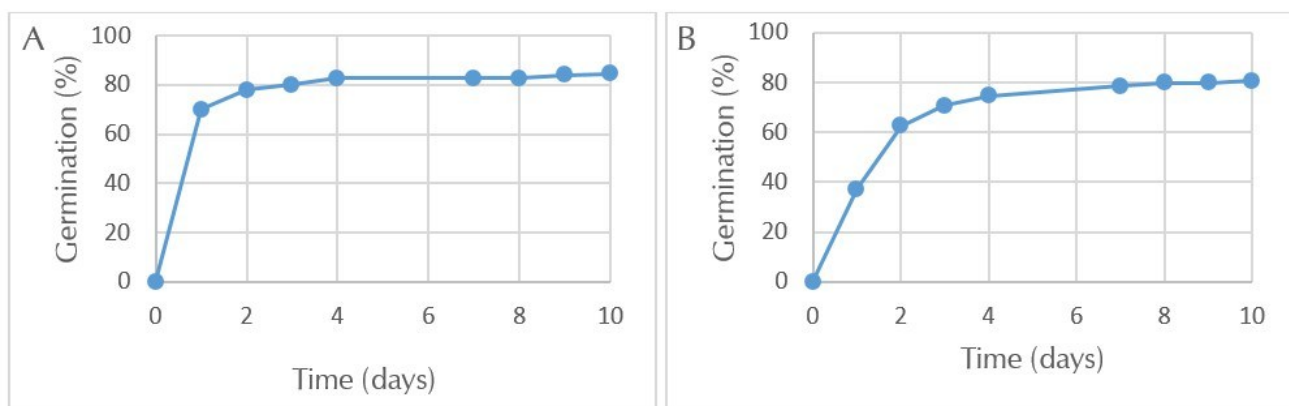


Figure 7. Seed germination pattern in water (mild stress condition) (A) and in wastewater (stressful condition) (B). The seeds had been previously exposed to a stressful pre-germinative treatment in 200 mM KNO₃ solution.

Table 1. T₅₀ and total germination values for seeds exposed to various pre-germination treatments and germinated in different media.

Pre-germination treatment	Germination media	T ₅₀ (hours)	Germination (%)	Standard deviation
Untreated	H ₂ O	80	75.3	4.71
	Wastewater	125	72.0	4.32
Aerated water	H ₂ O	50	86.0	1.63
	Waste water	69	80.7	4.71
NaCl 200 mM solution	H ₂ O	41	80.7	4.71
	Waste water	39	88.0	1.63
KNO ₃ 200 mM solution	H ₂ O	15	84.7	6.80
	Waste water	27	80.7	6.18

due to variations in the expression of the molecular memory of stress. Sani *et al.*, (2013) and Hilker *et al.*, (2016) have shown that the seed before the second stress event, the molecular stress memory was ready to respond more quickly and forcefully. Mauch-Mani *et al.* (2017) demonstrated that the responses, as well as the level of tolerance expressed for the plants facing up to the second and subsequent stress conditions, differed between primed and unprepared plants. There are variations in the extent of the induced stress response. It is possible to consider that these variations are due also to the degree of the stress condition of the stimulus that induces the molecular stress memory, so the stress responses may be less or more forceful. Sani *et al.* (2013), also consider that the pre-germination treatment can cause mild or severe stress and they indicate that "Plants can acquire tolerance to lethal levels of stress, by establishing a memory of molecular stress induced by previous exposure to mild or severe transient stress". Bruce *et*

al. (2007) have shown that, after brief exposure to the stress condition, a new cellular state is established, different from the state of the non-exposed plants. Rutanarungboworn *et al.* (2017), investigated the effect of priming seeds with different concentrations of potassium nitrate on rice germination. They demonstrated that priming with 1% KNO₃ showed greater seed germination than priming with 2%. Based on the germination patterns, seeds expressed the fastest induced stress response when germinated in water (Figures 6B and 7B). Therefore, KNO₃ was responsible for the faster germination in seeds set to germinate in water and seeds primed in the solution of NaCl germinated much faster under stressful conditions. The induced stress response induced in seeds by a stressful priming treatment is stronger than that induced by a mild stress priming treatment. Higher germination was observed in treated seeds than in control seeds (Table 1).

It is proposed in this work to evaluate the stress response exhibited by seeds in terms of the rapidity of their expression. According to the data shown in Table 1, there are differences in the results of the T_{50} , between the primed seed in water and germinated in stressful conditions (wastewater), the time to 50% germination was 69 h. When seeds are primed under stress conditions (in NaCl or KNO_3 solutions), these events can be recorded by the seeds and stored as "molecular stress memory," which is necessary to configure stress responses to future environmental challenges, which can be rapid and intense. Therefore, under these conditions, the time to 50% germination in wastewater was 39 and 27 h, when the induced stress response was induced by NaCl and KNO_3 solutions, respectively. In this case, the stress response induced by the NaCl solution caused germination to be faster than that of the KNO_3 solution.

Alivia *et al.*, (2025) indicate the advantages of treating the seed with NaCl and textually indicate that "seed priming with NaCl boosted the antioxidant responses in primed chickpea seedlings to stabilize the PS-II function and facilitates the flow of electrons for PS-II, indispensable for energy generation, thus reducing the need of starch degradation and maintaining better starch-sugar equilibrium in primed seedlings".

The benefits of treated seeds extend beyond the germination stage, since they generally generate plants with optimal establishment in the field, with greater vigor and growth. (Omidi *et al.*, 2009; Shabbir *et al.*, 2013; Sofo *et al.*, 2014; O'Callaghan, 2016; Fu *et al.*, 2024; Hasanović *et al.*, 2025; Habibi *et al.*, 2025).

CONCLUSION

In conclusion, germination patterns and T_{50} are informative indicators of induced stress responses. Both NaCl and KNO_3 priming induced responses, with KNO_3 generally producing the fastest kinetics. Germination of primed seeds was faster and more uniform than that of unprimed seeds, without compromising total germination.

BIBLIOGRAPHY

Adhikari, B., Olorunwa, J.O., Barickman, C.T. 2022. Seed priming enhances seed germination and morphological traits of *Lactuca sativa* L. under salt stress. *Seeds*. 1 (2): 74-86; <https://doi.org/10.3390/seeds1020007>

Al-Ani, A., Bruzau, F., P Raymond, P., Saint-Ges, V. Cleblanc, J., Pradet, A. 1995. Germination, Respiration, and Adenylate Energy Charge of Seeds at Various Oxygen Partial Pressures. *Plant Physiology* 79(3):885-890. DOI:10.1104/pp.79.3.885

Al-Ani, A., Pradet, A. 1985. ATP production by respiration and fermentation, and energy charge during aerobiosis and anaerobiosis in twelve fatty and starchy germinating seeds. *Plant Physiology*. 79 (3): 879-884. <https://www.jstor.org/stable/4269623>

Alivia P., Subhankar M., Debasis M., Koushik C., Asok K.B. 2025. Seed priming with NaCl boosted the glutathione-ascorbate pool to facilitate photosystem-II function and maintain starch in NaCl-primed chickpea under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. Volume 222, 2025, 109746, ISSN 0981-9428, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109746>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942825002748>)

Artola, A., Carrillo-Castañeda, G., García de los Santos, G. 2003. Hydropriming: a strategy to increase *Lotus corniculatus* L. seed vigor. *Seed Science Technology*. 31 (2): 455-463.

Artola, A., García de los Santos, G., Carrillo-Castañeda, G. 2003a. A seed vigor test for birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Seed Science Technology*. 31: 753-757.

Artola, A., Carrillo-Castañeda, G., García de los Santos, G. 2004. A seed vigor test for *Lotus corniculatus* L. based on vacuum stress. *Seed Science Technology*. 32 (2): 573-581.

Arun, M.N., Hebbar, S.S., Senthivel, T., Nair, A. K., Padmavathi, G., Pandey, P., Singh, A. 2022. Seed priming: The way forward to mitigate abiotic stress in crops (Vol. 11, p. 173). London, UK: IntechOpen.somaning, J.M., Sacandé, M. 2019. Desiccation, germination and water sorption isotherm of *Garcinia afzelii* Engl. (Clusiaceae) seeds. *Research Journal of Seed Science*, 12: 1-9. <https://scialert.net/abstract/?doi=rjss.2019.1.9>

Asomaning, J.M., Sacandé, M. 2019. Desiccation, germination and water sorption isotherm of *Garcinia afzelii* Engl. (Clusiaceae) seeds. *Research Journal of Seed Science*, 12: 1-9. <https://scialert.net/abstract/?doi=rjss.2019.1.9>

Berrie, A.M.M., Drennan, D.S.H. 1971. The effect of hydration-dehydration on seed germination. *New Phytologist*. 70:135-142.

Adhikari, B., Olorunwa, J.O., Barickman, C.T. 2022. Seed priming enhances seed germination and morphological traits of *Lactuca sativa* L. under salt stress. *Seeds*. 1(2): 74-86; <https://doi.org/10.3390/seeds1020007>

Bewley, J.D., Black, M. 1978. Imbibition, germination, and growth. In: *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66668-1_4

Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki, H. (2013) *Seeds: Physiology of development, germination, and dormancy*. 3rd Edition, Springer, New York. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>

- Borromeo, I., Del Gallo, M., Forni, C. 2025. Salt stress and tomato resilience: From somatic to intergenerational priming memory. *Horticulturae* 2025, 11, 236. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11030236>.
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A., Pickett, J.A. 2007. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Science*. 173: 603–608.
- Chachalis, D., Darawsheh, M., Khah, E. M. 2008. Effects of initial seed moisture content, imbibition temperature and seed vigour on germination, electrolyte leakage and seedling growth in plum tomatoes. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 6 (3-4): 299-304.
- Chen, K., Arora, R. 2013. Priming memory invokes seed stress-tolerance, *Environmental and Experimental Botany*. 94: 33-45. ISSN 0098-8472, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.03.005>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009884721200069X>)
- Chen, Z.H., Soltis, D.E. 2020. Evolution of environmental stress responses in plants. *Plant Cell and Environment*. 43(12):2827-2831. doi: 10.1111/pce.13922. PMID: 33103798.
- Coolbear, P., Francis, A., Grierson, D. 1984. The effect of low temperature pre-sowing treatment on the germination performance and membrane integrity of artificially aged tomato seeds. *Journal of Experimental Botany* 35, 1609–1617. doi:10.1093/jxb/35.11.1609.
- Corbineau, F. 2022. Oxygen, a key signalling factor in the control of seed germination and dormancy. *Seed Science Research* 1–11. <https://doi.org/10.1017/S096025852200006X>.
- Diya, A., Beena, R., Jayalekshmy, V.G. 2024. Physiological, biochemical and molecular mechanisms of seed Priming: A review. *Legume Research*. 47(2): 159-166. doi: 10.18805/LR-4638).
- Farooq, M., Usman, M., Nadeem, F., ur Rehman, H., Wahid, A., Basra, S. M., Siddique, K.H. 2019. Seed priming in field crops: potential benefits, adoption and challenges. *Crop and Pasture Science* 70(9): 731-771.
- Forti, C., Ottobriano, V., Doria, E., Bassolino, L., Laura Toppino, L., Rotino, G.L., Pagano, A., Macovei, A., Balestrazzi, A. Hydropriming applied on fast germinating *Solanum villosum* Miller seeds: Impact on pre-germinative metabolism. *Frontiers in Plant Science*. 25 March. 2021. Volume 12 - 2021 | <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.639336>
- Fu, Y., Ma, L., Li, J., Hou, D., Zeng, B., Zhang, L., Liu, C., Bi, Q., Tan, J., Yu, X., Bi, J., Luo, L. Factors influencing seed dormancy and germination and advances in seed priming technology. *Plants (Basel)*. 2024 May 10;13(10):1319. doi: 10.3390/plants13101319. PMID: 38794390; PMCID: PMC11125191.
- Ghassemi-Golezani, K., Chadordooz-Jeddi, A., Nasrollahzadeh, S., Moghaddam, M. 2010. Influence of hydro-priming duration on field performance of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *African Journal of Agricultural Research*. 5 (9): 893-897. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJAR>. ISSN 1991-637X © 2010
- Ghassemi-Golezani, K., Chadordooz-Jeddi, A., Nasrollahzadeh, S., Moghaddam, M. 2010a. Effects of hydro-priming duration on seedling vigour and grain yield of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 38: 109.
- Ghassemi-Golezani, K., Yaghoubian, I., Raei, Y. 2016. The impact of hydro-priming duration on seed invigoration and field emergence of milk thistle. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*. 9 (2): 229-234. ISSN: 2220-6663 (press) 2222-3045 (online) <http://www.innspring.net>.
- Granata, A., Capozzi, F., Gaglione, A., Riccardi, R., Spigno, P., Giordano, S., Sorrentino, M.C., Spagnuolo, V. 2024. Seed priming enhances seed germination and plant growth in four neglected cultivars of *Capsicum annuum* L. *Peer Journal*. 12:e18293 DOI 10.7717/peerj.18293.
- Habibi, N., Parneel, Terada, N., Pachakkil, B., Sanada, A., Kamata, A., Koshio, K. Effect of priming treatment on improving germination and seedling performance of aged and iron-coated rice seeds aiming for direct sowing. *Plants* 2025, 14, 1683. <https://doi.org/10.3390/plants14111683>
- Harris D., Jones, M. 1997. On-farm seed priming to accelerate germination in rainfed, dryseeded rice. *International Rice Research Notes*. 22(2):129-178.
- Hasanović, M., Durmić-Pašić, A., Karalija, E. Seed priming beyond stress adaptation: Broadening the agronomic horizon. *Agronomy* 2025, 15, 1829. <https://doi.org/10.3390/agronomy15081829>
- Heydecker, W., Beryl M.G. 1978. Attempts to synchronise seed germination. *Acta Horticulturae*. 72 DOI 10.17660/ActaHortic.1978.72.8.
- Hilker, M., Schwachtje, J., Baier, M., Balazadeh, S., Bäurle, I., Geiselhardt, S., Hinch, D.K., Kunze, R., Mueller-Roeber, B., Rillig, M.C., Rolff, J., Romeis, T., Schmülling, T., Steppuhn, A., van Dongen, J., Whitcomb, S.J., Wurst, S., Zuther, E., Kopka, J. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2016 Nov;91(4):1118-1133. doi: 10.1111/brev.12215. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26289992.
- Hou, D., Bi, J., Ma, L., Zhang, K., Li, D., Rehmani, M.I.A., Tan, J., Bi, Q., Wei, Y., Liu, G., et al. Effects of soil moisture content on germination and physiological characteristics of rice seeds with different specific

- gravity. *Agronomy*. 2022, 12, 500. <https://doi.org/10.3390/agronomy120205>.
- Kambona, C.M., Koua, P.A., Léon, J. Ballvora, A. 2023. Stress memory and its regulation in plants experiencing recurrent drought conditions. *Theoretical and Applied Genetics*. 136:26 <https://doi.org/10.1007/s00122-023-04313-1>
- Khalequzzaman, Ullah, H., Himanshu, S.K., Islam, N.-E-T., Tisarum, R., Cha-um, S., Datta, A. 2023. Seed priming improves germination, yield, and water productivity of cotton under drought stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 23: 2418–2432 <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01196-5>
- Kheyroodin, H., Kheyroodin, S. 2017. Importance of the Tomato as such as medical plant. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 4 (4): 106-115. DOI: <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.04.015>.
- Kimura, S., Sinha, N. Emerging model organisms tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harb Protocols*; 2008; doi:10.1101/pdb.emo105
- Lamers, J., van der Meer, T., Testerink, C. 2020. How plants sense and respond to stressful environments. *Plant Physiology*. 182(4):1624-1635. doi: 10.1104/pp.19.01464. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32132112; PMCID: PMC7140927.
- Ling, Y., Serrano, N., Gao, G., Atia, M., Mokhtar, M., Woo, Y.H., Bazin, J., Veluchamy, A., Benhamed, M., Crespi, M., Gehring, C., Reddy, A.S.N., Mahfouz, M.M. 2018. Thermoprimer triggers splicing memory in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 69 (10):2659–2675. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery062>
- Liu, G., Porterfield, D.M., Li, Y., Klassen, W. 2012. Increased oxygen bioavailability improved vigor and germination of aged vegetable seeds. *HortScience* horts, 47(12): 1714-1721. Retrieved Oct 13, 2023, from <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.12.1714>
- Liu, H., Able, A.J., Able, J.A. 2022. Priming crops for the future: rewiring stress memory. *Trends in Plant Science*. 27 (7): 699-716. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.015> (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)
- Liu, W., Liu, K., Chen, D., Zhang, Z., Li, B., El-Mogy, M.M., Tian, S., Chen. T. 2022a. *Solanum lycopersicum*, a model plant for the studies in developmental biology, stress biology and food science. *Foods*. 2022, 11(16), 2402; <https://doi.org/10.3390/foods11162402>
- Liu, X., Quan, W., Bartels, D. Stress memory responses and seed priming correlate with drought tolerance in plants: an overview. *Planta*. 2022b Jan 23;255(2):45. doi: 10.1007/s00425-022-03828-z. PMID: 35066685; PMCID: PMC8784359.
- Louis, N., Dhankher, O.P., Puthur, J.T. 2023. Seed priming can enhance and retain stress tolerance in ensuing generations by inducing epigenetic changes and trans-generational memory. *Physiologia Plantarum*. 2023 Mar;175(2):e13881. doi: 10.1111/ppl.13881. PMID: 36840678.
- Marthandan, V., Geetha, R., Kumutha, K., Renganathan, V.G., Karthikeyan, A., Ramalingam, J. Seed priming: a feasible strategy to enhance drought tolerance in crop plants. *International Journal of Molecular Science*. 2020;21:8258. doi: 10.3390/ijms21218258.
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., Flors, V. 2017. Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*. 68: 485–512.
- McDonald, 1999 McDonald, M.B. 1999. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*. 27: 177-237.
- Miano, A.C., Augusto, P.E.D. 2018. The Hydration of Grains: A critical review from description of phenomena to process improvements. *Food Science and Food Safety*. 17 (2): 352-370. DOI: 10.1111/1541-4337.12328.
- Moose, S. P., Mumm, R. H. 2008. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*. 147: 969–977. www.plantphysiol.org
- Nair, A.U., Bhukya, D.P.N., Sunkar, R., Chavali, S., Allu, A.D. 2022. Molecular basis of priming-induced acquired tolerance to multiple abiotic stresses in plants. *Journal of Experimental Botany*. 73 (11): 3355–3371. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac089>
- Noble, L., Dhankher, O.P., Puthur, J.T. 2023. Seed priming can enhance and retain stress tolerance in ensuing generations by inducing epigenetic changes and trans-generational memory. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/ppl.13881>
- O'Callaghan, M. 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100 (13): 5729–5746. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7590-9>
- Omid, H., Khazaei, F., Hamzi Alvanagh, S., Heidari-Sharifabad, H. 2009. Improvement of seed germination traits in canola (*Brassica napus* L.) as affected by saline and drought stresses. *Plant Ecophysiology*. 3:151-158.
- Powell, A. A., Matthews S. 1978. The damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition. *Journal of Experimental Botany*. 29 (5): 1215–1229. <https://doi.org/10.1093/jxb/29.5.1215>
- Quinet M., Angosto T., Yuste-Lisbona F.J., Blanchard-Gros R., Bigot S., Martinez J. -P., Lutts S. 2019. Tomato fruit development and metabolism. *Frontiers in Plant Science*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/>

- ppls.2019.01554 DOI=10.3389/fpls.2019.01554
-
- ISSN=1664-462X
- Ramírez, E., Chaâbene, Z., Hernández-Apaolaza, L., Re-
kik, M., Elleuch, A., de la Fuente, V. Seed priming to
optimize germination in *Arthrocnemum* Moq. BMC
Plant Biology. 22, 527 (2022). [https://
doi.org/10.1186/s12870-022-03893-2](https://doi.org/10.1186/s12870-022-03893-2)
- Reed, R.C., Bradford, K.J., Khanday, I. Seed germination
and vigor: ensuring crop sustainability in a changing
climate. Heredity (Edinb). 2022 Jun;128(6):450-459.
doi: 10.1038/s41437-022-00497-2. Epub 2022 Jan
10. PMID: 35013549; PMCID: PMC9177656.
- Ruttanaruangboworn, A., Chanprasert, W., Tobun-
luepop, P., Onwimo, D. 2017. Effect of seed priming
with different concentrations of potassium nitrate on
the pattern of seed imbibition and germination of
rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Integrative Agricul-
ture. 16(3): 605–613.
- Saleh, M., Akash, M., Ondier, O. 2018. Effects of tempera-
ture and soaking durations on the hydration kinetics of
hybrid and pureline parboiled brown rice cultivars. Jour-
nal of Food Measurement and Characterization. 12 (2):
1369-1377. DOI: 10.1007/s11694-018-9751-2).
- Salter, P.J., Darby, R.J. 1976. Synchronization of germina-
tion of celery seeds. Annals of Applied Biology. 84
(3):415-424.
- Sani, E., Herzyk, P., Perrella, G., Colot, V., Amtmann, A.
2013. Hyperosmotic priming of Arabidopsis seed-
lings establishes a long-term somatic memory accom-
panied by specific changes of the epigenome. Ge-
nome Biology 14, R59.
- Sen, A., Puthur, J.T. Seed priming-induced physiochemical
and molecular events in plants coupled to abiotic stress
tolerance: an overview. In: Hossain MA, Liu F, Burritt
D, Fujita M, Huang B, editors. Priming-mediated stress
and cross-stress tolerance in crop plants. Amsterdam:
Elsevier; 2020. pp. 303–316. [https://doi.org/ 10.1016/
B978-0-12-817892-8.00018-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817892-8.00018-0).
- Shabbir, I., Shakir, M., Ayub, M., Tahir, M., Tanveer, A.,
Shahbaz, M., Hussain, M. 2013. Effect of seed prim-
ing agents on growth, yield and oil contents of fennel
(*Foeniculum vulgare* Mill.). Advances in Agriculture &
Biology. 1:58-62.
- Sharma, M., Kumar, P., Verma, V., Sharma, R., Bhargava,
B., Irfan, M. 2022. Understanding plant stress memory
response for abiotic stress resilience: Molecular in-
sights and prospects. Plant Physiology Biochemistry.
179:10-24. doi: 10.1016/j.plaphy.2022.03.004. Epub
2022 Mar 15. PMID: 35305363.
- Sher, A., Sarwar, T., Nawaz, A., Ijaz, M., Sattar, A., Ahmad, S.
Methods of seed priming. In: Hasanuzzaman M,
Fotopoulos V, editors. Priming and pretreatment of seeds
and seedlings. Singapore: Springer; 2019. pp. 1–10.
- Shi, J., Le Maguer, M. 2010. Lycopene in tomatoes:
chemical and physical properties affected by
food processing. Crit. Rev. Biotech., 20(4): 293-334.
- Singh, P., Ibrahim, H., Flury, M., Schillinger, W., Knap-
penberger, T. 2013. Critical water potentials for ger-
mination of wheat cultivars in the dryland Northwest
USA. Seed Science Research, 23(3): 189-198.
doi:10.1017/S0960258513000172.
- Smok, M.A., Chojnowski, M., Corbineau, F., Côme, D.
1993. Effects of osmotic treatment on sunflower seed
germination in relation with temperature and oxygen,
pp. 1033–1038 in Côme, D. and Corbineau, F. (Eds)
Fourth international workshop on seeds. Basic and
applied aspects of seed biology, vol. 3. Paris, ASFIS.
- Sofo, A., Nuzzaci, M., Vitti, A., Tataranni, G., Scopa, A.
2014. Control of biotic and abiotic stresses in culti-
vated plants by the use of biostimulant microorgan-
isms. In: Improvement of crops in the era of climatic
changes, eds P. Ahmad, M. R. Wani, M. M. Azooz,
and L. S. Phan Tran (New York, NY: Springer Sci-
ence+Business Media), 107–117.
- Srivastava, A.K., Kumar, J.S., Suprasanna, P. 2021. Seed
'primeomics': plants memorize their germination un-
der stress. Biological Reviews. 96: 1723–
1743.1723doi: 10.1111/brv.12722
- Vidal-Lezama, E., Carrillo-Castañeda, G., Pérez-Mendoza,
C. Ortiz-García, E. 2018. Tomato seeds increase its
germination speed by oxygenation of imbibition wa-
ter. Acta Horticulturae. 1205: 299-304 DOI:
10.17660/ActaHortic.2018.1205.35
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1205.35>
- Yasin, M., Andreassen, C. 2016. Effect of reduced oxygen
concentration on the germination behavior of vege-
table seeds. Horticulture Environment and Biotech-
nology. 57: 453–461 (2016). [https://
doi.org/10.1007/s13580-016-0170-1](https://doi.org/10.1007/s13580-016-0170-1).
- Yuan, Y., Tan, M., Zhou, M., Hassan, M. J., Lin, L., Lin, J.,
Zhang, Y., Li, Z. 2024. Drought priming-induced stress
memory improves subsequent drought or heat toler-
ance via activation of α -aminobutyric acid-regulated
pathways in creeping bentgrass. Plant Biology. [https://
doi.org/10.1111/plb.13636](https://doi.org/10.1111/plb.13636)
- Zhang H., Zhu J., Gong Z., Zhu J.-K. 2022. Abiotic stress re-
sponses in plants. Nature Reviews Genetics 2022;23:104
–119. doi: 10.1038/s41576-021-00413-0
- Zhang, H., Liu, S., Ren, T., Niu, M., Liu, X., Liu, C., Wang,
H., Yin, W., Xia, X. 2023. Crucial abiotic stress regula-
tory network of NF-Y transcription factor in
plants. International Journal of Molecu-
lar Science. 2023;24:4426. doi: 10.3390/
ijms24054426. PMID: 36901852; PMCID:
PMC10002336

Evaluación de Soportes Alternativos para la Formación de Biopelículas en Humedales Artificiales de Flujo Subsuperficial

Evaluation of Alternative Supports for Biofilm Formation in Subsurface Flow Constructed Wetlands

Rodriguez Zúñiga Diana Patricia^{***}, González Duque María Elena*,
Quintero García Kelly Leani^{**}, Ríos Sánchez Deicy Andrea*,
Mateo Montes Vanegas*, Villa Cardona Faber^{**}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.119648

RESUMEN

Los humedales artificiales son ecotecnologías que se utilizan para la eliminación de contaminantes de las aguas residuales, lo cual permite mitigar el impacto ambiental de estas en los ecosistemas acuáticos, por ello, en este estudio evaluamos la formación de biopelículas de tres materiales de soporte, resina epóxica catalizada (RE), concreto reciclado (GR) y grava natural (GN) y la remoción de contaminantes. Se construyeron seis humedales utilizando *Heliconia psittacorum* como macrofitas. Se evaluó remoción de turbidez, oxígeno disuelto, conductividad, potencial de óxido-reducción y bioindicadores de contaminación fecal. El concreto reciclado presentó la mayor eficiencia en la remoción de coliformes totales (99.9 %) y mesófilos (94.9 %), además de ser el único material donde todas las cepas identificadas formaron biopelícula. La grava natural, aunque tradicional, logró la mayor remoción de coliformes fecales (100 %) y albergó la mayor diversidad microbiana. En contraste, la resina epóxica mostró baja eficiencia en la remoción microbiana, pero favoreció condiciones fisicoquímicas estables y oxigenadas. Estos resultados evidencian la importancia del material de soporte en los humedales artificiales, tanto en parámetros microbiológicos como fisicoquímicos.

Palabras claves: Humedales artificiales, biopelículas, remoción de contaminantes y material de soporte.

ABSTRACT

Constructed wetlands are ecotechnologies used for the removal of pollutants from wastewater, helping to mitigate their environmental impact on aquatic ecosystems. In this study, we evaluated biofilm formation on three support materials catalyzed epoxy resin (ER), recycled concrete (RC), and natural gravel (NG) as well as their effectiveness in contaminant removal. Six wetlands were constructed using *Heliconia psittacorum* as the macrophyte. We assessed the removal of turbidity, dissolved oxygen, conductivity, oxidation-reduction potential, and fecal contamination bioindicators. Recycled concrete showed the highest efficiency in removing total coliforms (99.9 %) and mesophilic bacteria (94.9 %) and was the only material on which all identified strains formed biofilms. Although traditional, natural gravel achieved the highest removal of fecal coliforms (100 %) and supported the greatest microbial diversity. In contrast,

* Facultad de Ciencias de la Salud, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia.

** Facultad de Arquitectura e Ingeniería, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia.

*** Departamento de biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, México
Correo de correspondencia: d-zuniga@uadec.edu.mx

epoxy resin demonstrated low efficiency in microbiological removal but promoted stable and oxygenated physico-chemical conditions. These results highlight the importance of the support material in constructed wetlands, influencing both microbiological and physicochemical parameters.

Key words: Constructed wetlands, biofilms, contaminant removal and support material.

Recibido: enero 4 de 2025

Aprobado: 12 de octubre de 2025

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, aproximadamente el 70 % del agua dulce extraída se destina a la agricultura, cerca del 20 % se emplea en la industria y alrededor del 12 % al uso doméstico o municipal. Lo cual evidencia como el crecimiento en la demanda hídrica ha sido impulsado, principalmente por el desarrollo socioeconómico y los cambios en los patrones de consumo (UNESCO, 2024). Este aumento en la demanda de recursos hídricos se concentra especialmente en ciudades, países y regiones con un rápido crecimiento económico, particularmente en economías emergentes. En la gran mayoría de países en desarrollo, más del 80 % del agua utilizada es vertida en fuentes receptoras sin tratamiento previo, lo que contamina las fuentes de agua dulce y representa una grave amenaza para la salud pública (UNESCO, 2024).

Esta problemática demanda la búsqueda de tecnologías emergentes para el tratamiento de las aguas residuales, que sean económicas y eficientes. En este contexto los humedales artificiales, se han consolidado como una alternativa prometedora especialmente en comunidades descentralizadas, debido a su bajo costo de operación y alta eficiencia en la remoción de contaminantes (Ross *et al.*, 2023).

En los humedales artificiales, la remoción de materia orgánica e inorgánica depende en gran medida de las comunidades microbianas que colonizan el sistema. Estas comunidades forman biopelículas adheridas a los materiales de soporte del humedal y a la rizosfera de las plantas (Ji *et al.*, 2022). Por tanto, la eficiencia de estos sistemas está estrechamente ligada con el tipo de material de soporte, por cuanto este influye en la retención de contaminantes, la actividad microbiana y el desarrollo de la vegetación, factores clave en el proceso de depuración del agua residual (Cui *et al.*, 2023).

Si bien, la grava y la arena son los materiales comúnmente utilizados, se han identificado limitaciones que han motivado la búsqueda de materiales alternativos y más eficientes. Actualmente se exploran materiales naturales, residuos agrícolas e industriales y materiales sintéticos (Wang *et al.*, 2020). La selección de materiales de soporte para los humedales artificiales debe considerar

no solo la remoción de nutrientes y la formación de biopelículas, sino también su viabilidad económica. Teniendo en cuenta los criterios de gasto de capital (CAPEX), que contempla los costos de adquisición, traslado, triturado y gastos operativos (OPEX), relacionados con el mantenimiento del material en el humedal, reemplazo y durabilidad (Rizzo *et al.*, 2021).

En su trabajo Khalifa *et al.*, (2020) evaluaron una mezcla de grava, plástico y caucho con la adición de espuma de poliestireno como medio de soporte para un humedal artificial, observando un aumento en la eficiencia de remoción de demanda química de oxígeno (DQO) del 71 % al 88 % y de sólidos suspendidos totales (SST) del 83 % al 88 %. También se registraron mejoras en la remoción de amoníaco del 66 % al 78 %, para fosfatos del 78 % al 85 % y para coliformes totales del 97 % al 99 %.

Por su parte Sandoval Herazo *et al.*, (2023) encontraron como el uso de tereftalato de polietileno (PET) como medio de soporte en humedales artificiales; permite alcanzar eficiencias de remoción para DQO del 87 %, para demanda biológica de oxígeno (DBO) del 81 %, para SST del 65%, para fósforo total (PT) del 85 % y para nitrógeno total (NT) del 52 %.

Dado que los materiales convencionales presentan una superficie limitada para la formación de biopelículas. Se ha propuesto el uso de sustratos con mayor área superficial y propiedades hidrofílicas que mejoren la adhesión de los microorganismos y, en consecuencia, mejorar la eficiencia del tratamiento mediante el aumento de la asimilación de nutrientes (Zaboon *et al.*, 2022).

En este contexto el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia de tres tipos de materiales de soporte en humedales artificiales de flujo subsuperficial (RE, GR y GN) en la formación de biopelículas y la remoción de contaminantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio.

El experimento se realizó en la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, en Medellín, Colombia.

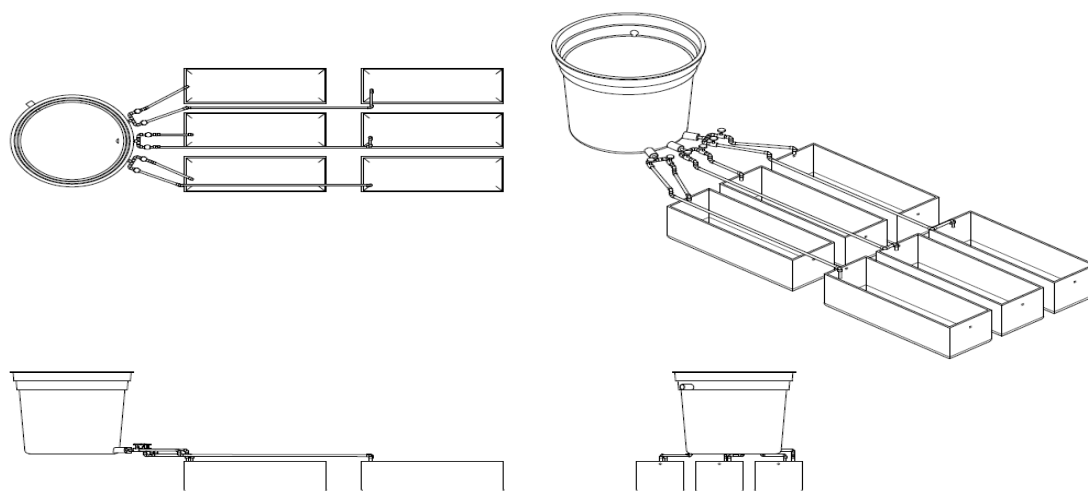


Figura 1. Configuración del sistema de humedales artificiales.

Características del agua residual.

Los humedales artificiales fueron alimentados dos veces por semana con aguas residuales domésticas, recolectadas de una caja de inspección conectada a los desagües de los baños de la zona administrativa y de la cafetería principal de la institución. Las aguas residuales fueron previamente tratadas mediante sedimentación primaria, posteriormente fueron diluidas, adicionando 10 % de agua residual y 90 % de agua potable; esto con el fin de simular bajas concentraciones de carga orgánica.

Para la caracterización del agua residual, se evaluaron parámetros físico-químicos y microbiológicos como turbidez (NTU), conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH, potencial redox (mV), oxígeno disuelto (mg/L), DQO (mg/L) y bioindicadores de contaminación fecal (NMP/100 mL).

Construcción del sistema de humedales.

Se construyeron humedales artificiales de flujo subsuperficial horizontal, empleando estructuras de concreto con dimensiones internas de 93 cm de largo, 35 cm de ancho y 23 cm de alto (Figura 1). Cada humedal fue impermeabilizado adecuadamente para evitar filtraciones y garantizar el control del flujo hidráulico (Figura 2a). El volumen operativo del agua dentro de los humedales fue ajustado a una altura de 18 cm.

El sistema fue diseñado para operar con un caudal constante de $253 \pm 5 \text{ mL}/\text{min}$, equivalente a un volumen diario de aproximadamente 364 L/día. Este caudal fue distribuido de forma controlada mediante un sistema de tuberías de PVC conectado a un tanque de almacenamiento de 500 L, el cual permitió el almacenamiento, pretratamiento y distribución del agua residual doméstica, la cual había pasado por procesos de sedimentación primaria. Para el ensayo, se utilizaron diluciones del

afluente para alcanzar una concentración de DQO de $80 \text{ mg}/\text{L O}_2 \pm 5$.

Se instalaron dos humedales por cada tipo de material soporte, (GN, GR y RE). Desde el punto de vista hidráulico, cada humedal presentó un volumen efectivo de tratamiento de aproximadamente 59 L, lo que permitió estimar un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 4 horas. Además, considerando una concentración media de DQO en el afluente de $80 \text{ mg}/\text{L O}_2 \pm 5$, se calculó una carga orgánica superficial de aproximadamente $90 \text{ g DQO}/\text{m}^2/\text{día}$ (Yu et al., 2022).

Como macrofitas se utilizó en este experimento *Heliconia psittacorum*, plantada en los humedales con una densidad de 10 plantas en cada humedal, las plantas contaban con $20 \text{ cm} \pm 3$ de alto. Durante la experimentación, se realizaron observaciones del buen estado de las plantas.

Formación de Biopelículas.

La capacidad de formación de biopelículas se evaluó mediante dos métodos. El primer método evaluado fue la adhesión a placas de poliestireno con cristal violeta y el segundo fue el crecimiento en caldo de Papa Dextrosa (PDC) (ver Figura 7 y Figura 8d). Se tomaron muestras de la biopelícula formada directamente de cada soporte del humedal con la ayuda de un hisopo de algodón estéril y se pasó a un Erlenmeyer con 25 mL de solución salina estéril al 0.85 %. Se mezcló por 20 minutos a 80 rpm con el fin de eliminar las células no adheridas; se descartó el sobrenadante y se procedió a la siembra de las muestras realizando diluciones seriadas de las muestras en agua destilada estéril desde 10^{-1} hasta 10^{-6} (esto depende de la concentración de la biopelícula en muestra), posteriormente se sembraron las diluciones en medios selectivos y diferenciales; para realizar la caracterización fenotípica de



Figura 2. Construcción de los humedales artificiales: a) Construcción de humedales en concreto e impermeabilización. b) Sistema de humedales con materiales de soporte.

las bacterias formadoras de biopelícula (Restrepo Sierra *et al.*, 2021).

Caracterización morfológica y bioquímica de los aislamientos bacterianos.

La caracterización microbiológica de los aislamientos bacterianos se realizó mediante análisis macroscópico de las colonias, análisis microscópico, pruebas bioquímicas y finalmente VITEK® 2. Para la caracterización macroscópica, se evaluaron aspectos como forma, tamaño, elevación, superficie, textura y color de las colonias (Funari & Shen, 2022). En el análisis microscópico, se empleó la tinción de Gram para determinar la morfología celular, su agrupación y la presencia de esporas; esta coloración se verificó con la prueba de KOH al 3 %. Para determinar en las colonias la relación con el oxígeno, se realizó la incubación en agar sangre bajo condiciones aerobias y anaerobias; para estas últimas, se usó una jarra de anaerobiosis con sobres generadores e indicadores de la ausencia de oxígeno, manteniendo las muestras en incubación durante 8 días (Yang *et al.*, 2023).

La identificación bioquímica incluyó pruebas enzimáticas para detectar catalasa y oxidasa, así como análisis bioquímicos en medios selectivos y diferenciales: Sulfuro-Indol-movilidad (SIM), tripe azúcar hierro (TSI), urea, citrato Simmons y reducción de nitratos a nitritos. Estas pruebas fueron incubadas a 35 ± 2 °C, con lecturas a las 18, 48 y 72 horas. Finalmente, se empleó el sistema VITEK® 2 para la identificación de bacterias mediante tarjetas para cocos Gram positivos (GP), bacilos Gram negativos (GN) y bacilos Gram positivos esporulados (BCL) (Tunlid & White, 2021).

Métodos analíticos. El muestreo de la calidad del agua se realizó de acuerdo con las instrucciones para el muestreo

de aguas residuales del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM, 2007). Se realizaron mediciones de parámetros fisicoquímicos como turbidez, medida con turbidímetro portátil HF Scientific Micro Tpw, las mediciones de conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$), pH, potencial redox (mV), oxígeno disuelto (mg/L) se realizaron con multiparámetro HACH. Los análisis microbiológicos de indicadores de contaminación fecal y de proceso, se cuantificaron mediante el método de filtración por membrana y número más probable (NMP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Turbidez.

En el humedal con grava natural (Figura 3), se observó una disminución de la turbidez desde 2.3 NTU en el primer muestreo hasta 1.3 NTU en el segundo, lo que sugiere una mejor estabilización del sistema con el paso del tiempo. Aunque la grava es un material tradicionalmente empleado en sistemas de tratamiento, puede presentar limitaciones en su capacidad de adsorción y filtración en comparación con otros materiales (Rizzo *et al.*, 2021).

Por su parte, el humedal con resina epóxica catalizada mostró una tendencia opuesta. La turbidez aumentó de 1.1 NTU en el primer muestreo a 5.0 NTU en el segundo, lo que indica una disminución en la eficiencia del sistema. Este comportamiento podría estar relacionado con problemas operativos, como colmatación, desprendimiento de biopelícula o alteraciones en el flujo hidráulico, que afectaron el desempeño del humedal.

Con respecto al humedal con concreto reciclado, se observó una estabilidad en los niveles de turbidez en ambos muestreos, con valores de aproximadamente 1.4 y 1.2

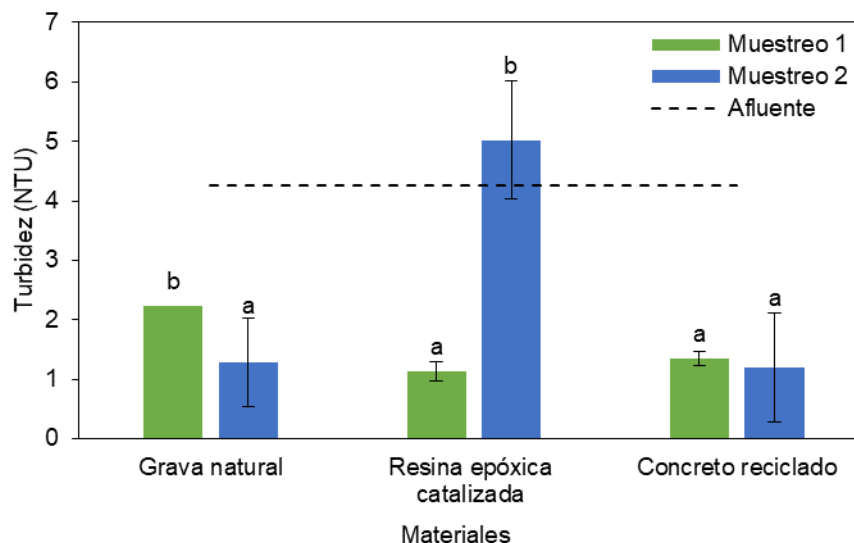


Figura 3. Remoción de turbidez de los humedales artificiales con los diferentes materiales de soporte en los dos muestreos realizados.

NTU, sin diferencias significativas. Este comportamiento refleja un desempeño consistente del sistema, lo que posiciona al concreto reciclado como una alternativa eficiente y confiable para la remoción de turbidez en aguas residuales. Este material, proveniente de residuos de construcción, puede ofrecer una mayor superficie específica y características fisicoquímicas favorables que mejoran la adsorción y retención de partículas. Su textura rugosa y porosa facilita estos procesos, y además puede influir positivamente en fenómenos como la coagulación y floculación, contribuyendo a una mayor eficiencia en la remoción de sólidos suspendidos (Fluet-Chouinard *et al.*, 2023).

En general, todos los materiales evaluados lograron una reducción considerable de la turbidez en comparación con el afluente. Sin embargo, el análisis comparativo de medias ($p < 0.05$) muestra como los humedales con grava natural y concreto reciclado presentaron mejores resultados, a diferencia de la resina epóxica catalizada, cuyo desempeño fue variable.

Parámetros fisicoquímicos.

Los resultados de la Figura 4, muestran cómo los diferentes materiales de soporte en los humedales artificiales influyen en los parámetros fisicoquímicos del agua residual tratada; en cuanto a la conductividad eléctrica (Figura 4a) se muestra que el concreto reciclado presenta la mayor conductividad eléctrica, especialmente en el muestreo 2, superando los 22 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Esto podría deberse a la posible liberación de sales u otros compuestos iónicos desde el material hacia el agua.

En cambio, la resina epóxica catalizada mostró los valores más bajos de conductividad en ambos muestreos, por debajo del valor del afluente, lo cual sugiere una posible capacidad de retención de iones o una menor interacción iónica con el agua. La grava natural tuvo un comportamiento intermedio, con una ligera disminución respecto al afluente en el muestreo 1 y un leve aumento en el muestreo 2.

Con respecto al potencial redox (Figura 4b), la resina epóxica catalizada mantuvo el potencial redox más alto en ambos muestreos, incluso por encima del valor del afluente, lo que indica un ambiente más oxidante favorable para ciertos procesos aerobios. La grava natural mostró una reducción del potencial redox en el muestreo 2 respecto al afluente, aunque en el muestreo 1 se mantuvo relativamente cerca del valor del afluente y el concreto reciclado exhibe una notable disminución del potencial redox en el muestreo 2, lo que puede indicar condiciones más reductoras, posiblemente asociadas a acumulación de materia orgánica o menor oxigenación.

En la Figura 4c se puede observar que todos los materiales mostraron valores de pH ligeramente superiores al del afluente en el muestreo 1. En el muestreo 2, el pH se mantuvo constante o ligeramente por debajo del valor del afluente, especialmente en el caso de la grava natural y el concreto reciclado. La resina epóxica mostró una mayor estabilidad en los valores de pH entre los muestreos.

Con respecto al oxígeno disuelto (Figura 4d). Se observó en el muestreo 2, en todos los casos un aumento res-

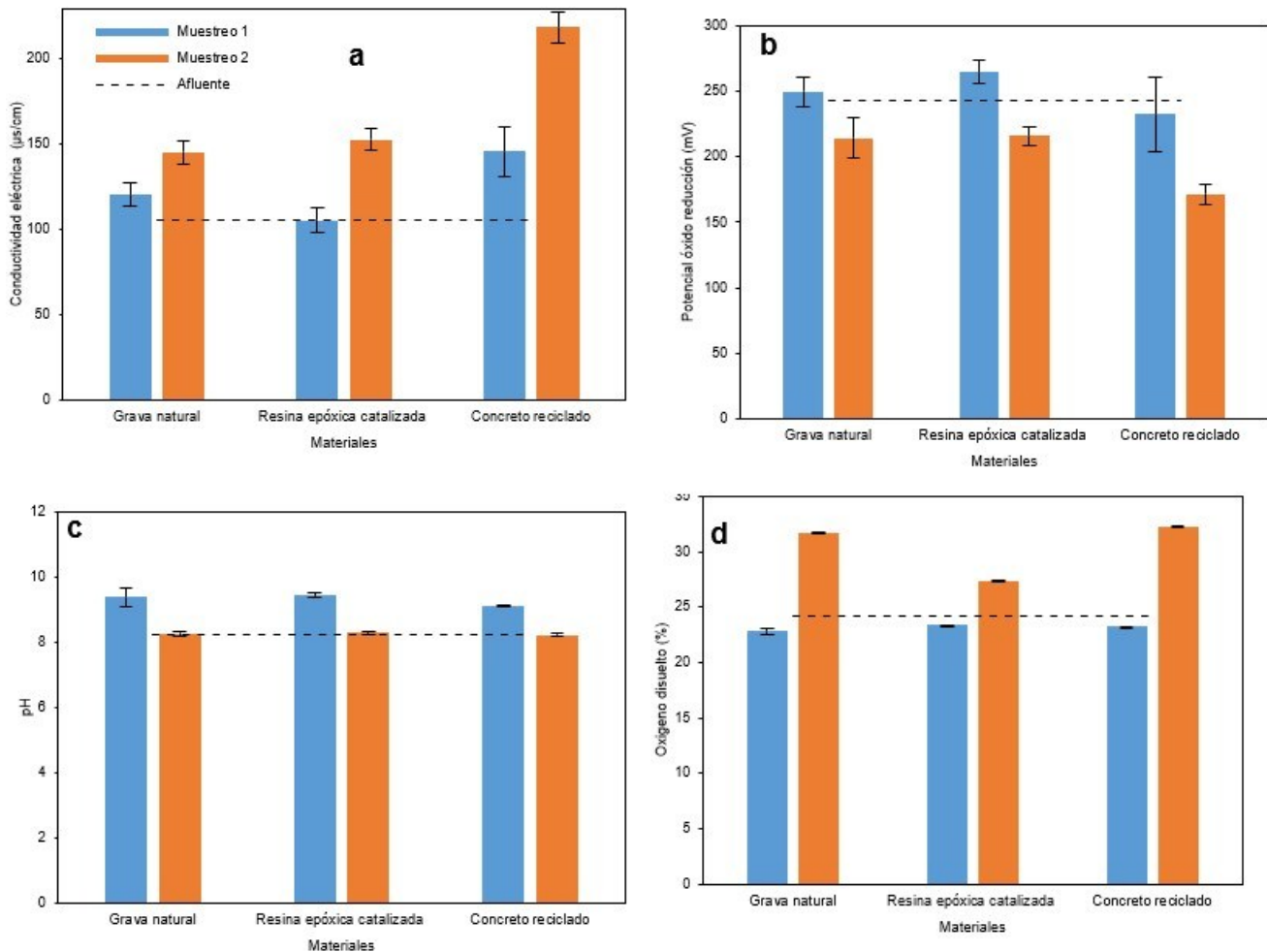


Figura 4. Parámetros fisicoquímicos evaluados en los humedales artificiales con los diferentes materiales de soportes: a) conductividad eléctrica, b) potencial de óxido reducción, c) pH y d) oxígeno disuelto.

pecto al afluente, siendo el concreto reciclado el que logró el mayor valor. En el muestreo 1, los valores de oxígeno disuelto fueron menores en todos los materiales, lo que puede estar relacionado con la etapa de adaptación del sistema o menor actividad microbiana. La resina epóxica catalizada y el concreto reciclado mostraron una recuperación importante del oxígeno disuelto en el muestreo 2.

Estos resultados evidencian que el tipo de material de soporte influye en los parámetros fisicoquímicos del agua tratada. La resina epóxica catalizada parece favorecer condiciones más estables y oxigenadas, mientras que el concreto reciclado aumenta significativamente la conductividad eléctrica y reduce el potencial redox. La grava natural, aunque es el material tradicional, mostró un comportamiento intermedio en la mayoría de los parámetros.

Eficiencia de remoción de bioindicadores de contaminación fecal y de proceso.

La mayor eficiencia de remoción para coliformes totales, se observa en el humedal con concreto reciclado (99.9 %), seguido por el humedal con grava (99.7 %) y humedal con resina epóxica (56.9%). Los residuos de concreto reciclado parecen ser más efectivos en la remoción de coliformes totales comparados con la grava y los residuos de resina epóxica.

En cuanto a la remoción de coliformes fecales (*E. coli*), los humedales con resina epóxica y concreto reciclado presentaron una eficiencia de remoción igual del 98.3% y el humedal con grava natural logró remover el 100 % de coliformes fecales, lo cual sugiere que la grava convencional es más eficiente para los procesos de remoción de coliformes fecales (Zhong *et al.*, 2024). Para mesófilos el humedal con concreto reciclado remueve un 94.88 % logrando las mayores eficiencias, seguido del humedal

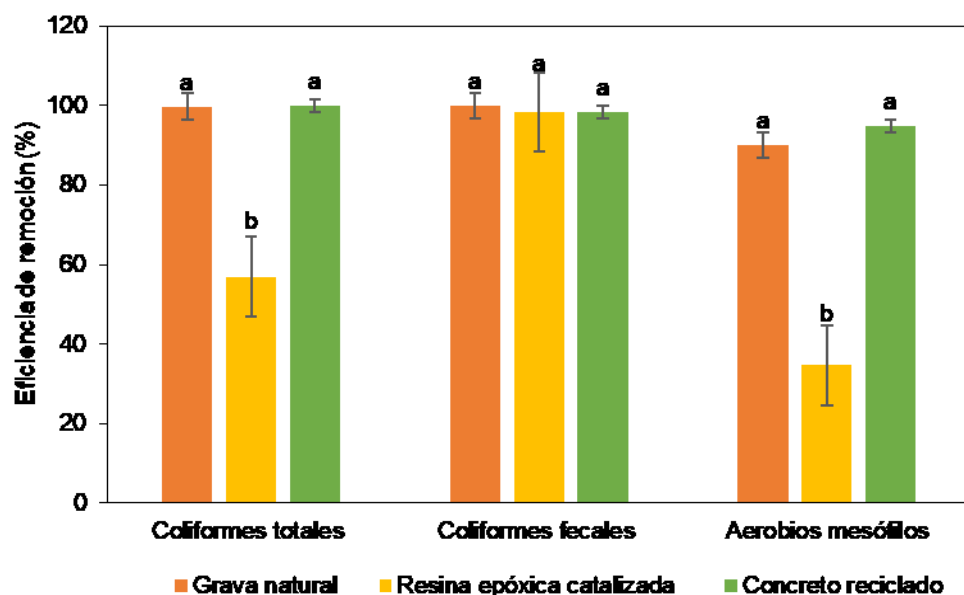


Figura 5. Eficiencia de remoción de bioindicadores en los humedales con los diferentes materiales de soporte.

con grava natural con un 90 % y por último el humedal con resina epóxica con un 34.6 %. Según el análisis estadístico de varianzas no hay diferencias significativas entre la grava natural y el concreto reciclado para la remoción de coliformes totales y aerobios mesófilos.

La elección del material de soporte en humedales artificiales debe considerar el tipo específico de microorganismos que se desea remover; para remoción en general de coliformes y mesófilos, los residuos de concreto pueden ser la mejor opción (Suárez *et al.*, 2023).

Identificación de microorganismos y formación de biopelículas. Durante el análisis microbiológico de los humedales con distintos materiales de soporte, se logró la identificación de un total de 21 cepas microbianas. La distribución de estas cepas mostró una variabilidad asociada al tipo de material utilizado en los humedales artificiales. El humedal con grava natural fue el que albergó la mayor diversidad microbiana, con un 29 % de las cepas identificadas; por su parte, la resina epóxica catalizada presentó un 24 % de las cepas identificadas y el material con menor cantidad de microorganismos identificados fue el concreto reciclado con un 14 % (Figura 7).

Estos resultados sugieren que la grava natural favorece una mayor colonización microbiana, posiblemente debido a su estructura porosa. La resina epóxica, a pesar de ser un material sintético, también mostró una capacidad intermedia para soportar crecimiento microbiano (Jiang

et al., 2024). En contraste, el concreto reciclado presentó una menor diversidad de cepas, lo que podría deberse a características fisicoquímicas menos favorables para la fijación y desarrollo microbiano, como su alcalinidad o textura superficial.

En la Tabla 1 se presentan las cepas microbianas aisladas de los diferentes materiales de soporte utilizados en los humedales artificiales. En el afluente se identificaron dos cepas *Klebsiella pneumoniae* (algunas cepas no forman biopelícula) y *Acinetobacter radioresistens* (formadora de biopelícula). Esto muestra que ya existen bacterias con potencial para colonizar los sistemas antes del ingreso al humedal, algunas de las cuales pueden establecerse en los materiales de soporte.

En el humedal que contiene concreto reciclado se identificaron seis cepas, entre las cuales destacan *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus* y una muestra sin identificación (NO ID). Todas las cepas aisladas en este material mostraron capacidad para formar biopelícula, lo que indica que el concreto reciclado proporciona condiciones favorables para la adherencia y crecimiento microbiano. Esta propiedad podría estar asociada a su textura rugosa y porosidad, que favorecen la colonización bacteriana.

En el humedal con grava natural, se aislaron siete cepas, entre ellas *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas mendocina*,

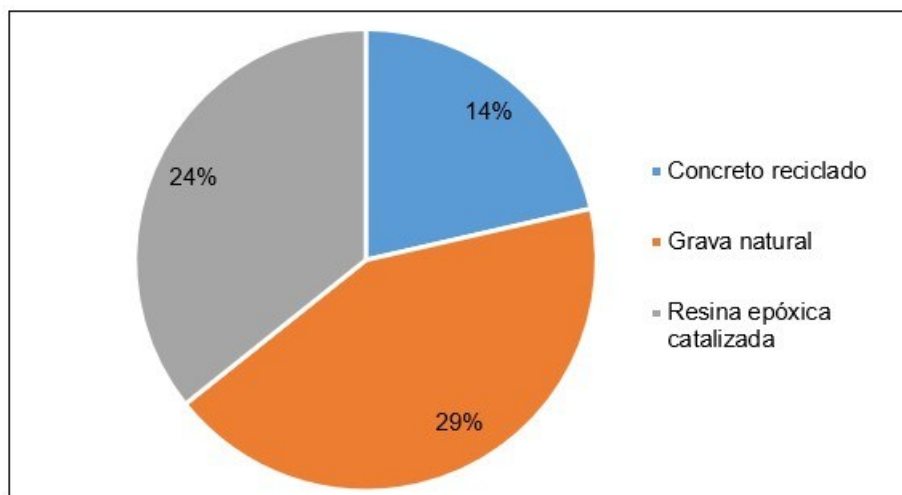


Figura 6. Porcentaje de microorganismos en los humedales con los diferentes materiales de soporte.

Tabla 1. Microorganismos identificados en los humedales artificiales con diferentes materiales de soporte.

Muestra	Microorganismo	Formación de biopelícula
Afluente	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
	* <i>Acinetobacter radioresistens</i>	+
Concreto reciclado	* <i>Bacillus cereus</i>	+
	<i>Bacillus anthracis</i>	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+
Grava natural	<i>Bacillus anthracis</i>	+
	NO ID	+
	<i>Bacillus cereus</i>	+
	* <i>Enterobacter aerogenes</i>	+
	* <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
	* <i>Aeromonas sobria</i>	-
	* <i>Rautella planticola</i>	-
	* <i>Pseudomonas mendocina</i>	-
	NO ID	+
	* <i>Rautella planticola</i>	-
Resina epóxica catalizada	* <i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
	* <i>Pantoea agglomerans</i>	-
	* <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
	* <i>Enterobacter asburrae</i>	+
	* <i>Rautella planticola</i>	+
	* <i>Pseudomonas putida</i>	+

* Microorganismos identificados mediante VITEK® 2.

+ Cepas formadoras de biopelículas,

- Cepas que no tienen la capacidad de formación de biopelículas.

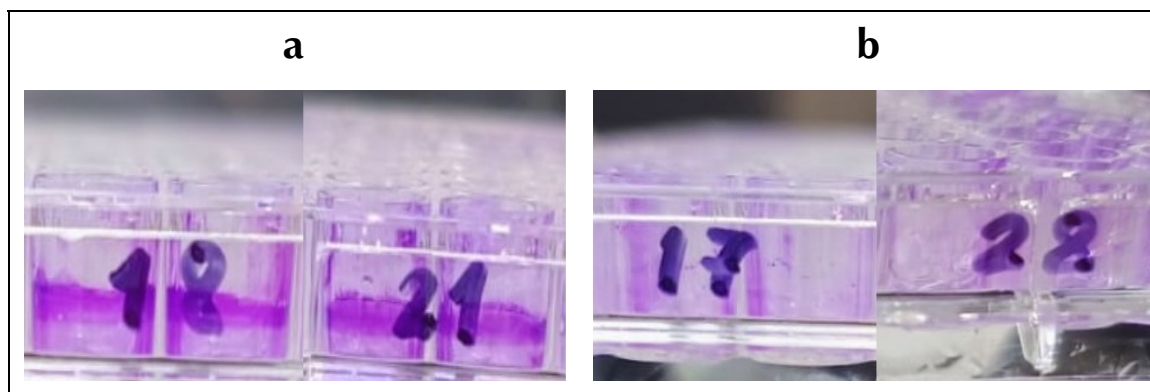


Figura 7. Placa de poliestireno teñida con cristal violeta al 0.25 %: a) aislados productores de biopelículas, b) aislados no productores de biopelículas. Se señala con flecha de color negro en la imagen 7a la adhesión del colorante a las células formadoras de biopelícula.

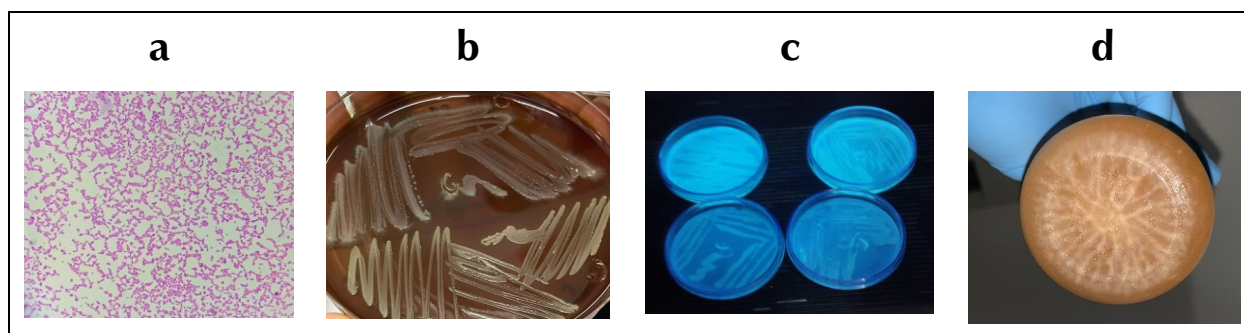


Figura 8. Cepa de *Pseudomonas putida* aislada del humedal con concreto reciclado: a) Tinción de Gram, b) crecimiento en agar sangre, c) crecimiento en agar selectivo para *Pseudomonas* sp., (agar cetrímide) y d) formación de biofilm en agar papa dextrosa.

Raoultella planticola y una muestra sin identificación. A diferencia del concreto reciclado, solo dos cepas formaron biopelícula, mientras que cinco no lo hicieron (Tabla 1). Este resultado sugiere que, aunque la grava natural permite la colonización por una diversidad de microorganismos, no todos presentan capacidad para formar estructuras adheridas en este sustrato, posiblemente debido a características superficiales menos propicias.

Del humedal que contenía como material de soporte resina epóxica catalizada, se aislaron seis cepas, incluyendo *Pantoea aglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Raoultella planticola* y *Enterobacter asburrae*. De estas, cuatro cepas mostraron capacidad de formar biopelícula. La resina epóxica, a pesar de ser un material sintético, parece ofrecer una superficie adecuada para la adhesión bacteriana, especialmente en los géneros *Pseudomonas* y *Raoultella*.

El concreto reciclado fue el único material donde todas las cepas aisladas formaron biopelícula, lo cual puede representar una ventaja para procesos de tratamiento

biológico. La grava natural, a pesar de presentar una mayor diversidad de cepas, mostró la menor proporción de cepas formadoras de biopelícula y la resina epóxica catalizada presentó un equilibrio entre diversidad microbiana y formación de biopelícula, con una predominancia de bacterias del género *Pseudomonas*, comúnmente asociadas a biofilms activos en ambientes acuáticos.

La presencia de cepas potencialmente patógenas, como *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus* y *Bacillus anthracis*, resalta la importancia de monitorear los riesgos microbiológicos en estos sistemas, especialmente si se busca una aplicación en ambientes expuestos o reutilización del agua. De las 21 cepas identificadas solo 14 mostraron capacidad de formación de biopelícula en laboratorio, para esta identificación, la micro titulación con cristal violeta demostró ser altamente efectiva en la detección de biopelículas bacterianas (Figura 7). Mediante este método, se observó una marcada formación de biopelículas, evidenciando la capacidad de ciertas cepas bacterianas para desarrollar estas estructuras microbianas en condiciones de laboratorio, este método se muestra eficiente

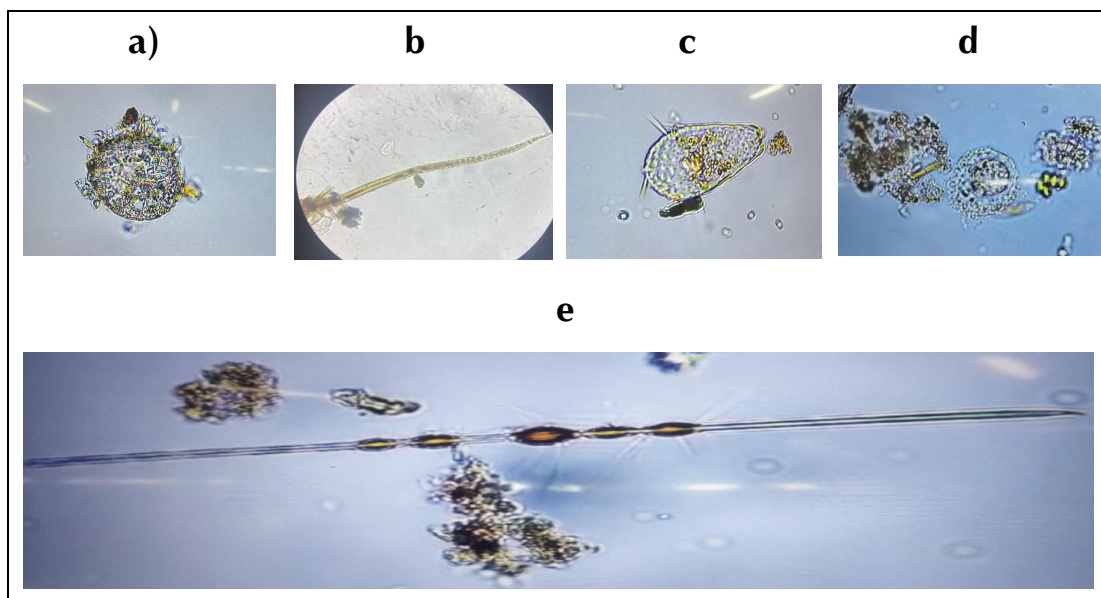


Figura 9. Algas y protozoos identificados en los humedales artificiales mediante microscopía a 40x: a) *Centropyxis* sp., b) Nematodo., c) *Euglypha* sp, d) algas y huevo de *Áscaris lumbricoides* y e) Algas.

debido a su simplicidad, bajo costo y alta reproducibilidad, proporcionando resultados consistentes en todas las réplicas. El caldo papa dextrosa (Figura 8d) también resultó ser un medio efectivo, económico y fácil de usar, mostrando una correlación positiva con los resultados obtenidos con cristal violeta.

Las biopelículas proporcionan a las células microbianas una mayor tolerancia contra condiciones ambientales adversas, patógenos y antimicrobianos, y productos químicos dañinos. Las comunidades de biopelículas bacterianas son más robustas y presentan mayor resistencia a los contaminantes orgánicos, debido a la alta proporción de biomasa microbiana y la capacidad de inmovilización (Mishra et al., 2022); por lo tanto, estas comunidades de biopelículas pueden participar en la sorción y metabolización de contaminantes orgánicos y metales pesados, mediante la producción de enzimas extracelulares a través del patrón de expresión bien controlado de genes gobernado por el sistema de señalización de comunicación celular, conocido como detección de quórum sensing (Rizzo et al., 2021).

Identificación de algas y protozoos.

En la Figura 9 se presentan una serie de imágenes capturadas al microscopio óptico de campo claro con aumento de 40x, correspondientes a distintos microorganismos observados en las muestras tomadas de los humedales artificiales con diferentes materiales de soporte. Estos organismos reflejan la diversidad biológica del sistema y su posible rol en los procesos de depuración.

En la Figura 9a se identificó *Centropyxis* sp. un protozoo amebóide con forma irregular y prolongaciones o pseudópodos. Su presencia indica actividad microbiológica asociada a la descomposición de materia orgánica. En la imagen 9b se observó un nematodo, organismos multicelular, alargado, de movimientos activos. Su presencia sugiere un ecosistema maduro con niveles tróficos más desarrollados, donde los nematodos participan en la regulación de poblaciones bacterianas.

En la Figura 9c se identificó a *Euglypha* sp., ameba testácea con una cápsula silíceo externa en forma de concha, con aberturas terminales. Este organismo es bioindicador de ambientes bien oxigenados y participa activamente en el consumo de bacterias.

En la Figura 9d se aprecian estructuras algales, junto a una forma ovalada compatible con un huevo del helmineto o *Áscaris lumbricoides*. La presencia de algas evidencia actividad fotosintética dentro del sistema, mientras que los huevos parasitarios sugieren contaminación fecal en el afluente. Y en la figura 6d se observan estructuras consistentes con algas.

Estos microorganismos cumplen roles ecológicos clave como la degradación de materia orgánica, el reciclaje de nutrientes y la regulación de poblaciones microbianas. Además, la presencia de huevos de helmintos resalta la necesidad de un monitoreo continuo de contaminantes biológicos en aguas residuales.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio resaltan la importancia de una adecuada selección del material de soporte en humedales artificiales, ya que este factor influye significativamente en la eficiencia de remoción de diversos contaminantes. En particular, el concreto reciclado mostro mayores tasas de remoción de coliformes totales, aerobios mesófilos y turbidez. De hecho, fue el único material donde todas las cepas aisladas presentaron capacidad para formar biopelícula, lo que representa una ventaja potencial en sistemas de tratamiento biológico.

Aunque la grava natural mostró una mayor diversidad microbiana, su proporción de cepas formadoras de biopelícula fue menor. La resina epóxica, podría considerarse una opción viable en escenarios donde se priorice la remoción de material particulado y contaminantes microbiológicos específicos como los coliformes fecales. En conjunto, estos hallazgos aportan información valiosa para el diseño y la optimización de sistemas de tratamiento de aguas residuales mediante humedales construidos.

Se identifica la necesidad de profundizar en la caracterización fisicoquímica de los materiales de soporte utilizados en humedales artificiales, enfocados en analizar propiedades como la porosidad, rugosidad superficial, composición química y capacidad de intercambio iónico.

Declaración de intereses en conflicto

Los autores declaran que no tienen intereses económicos ni relaciones personales que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia por la financiación de este proyecto, así como a los estudiantes del curso de Microbiología I durante el semestre 2024-1 y 2024-2 por sus valiosos aportes al desarrollo de este.

REFERENCIAS

- Cui, E., Zhou, Z., Gao, F., Chen, H., & Li, J. (2023). Roles of substrates in removing antibiotics and antibiotic resistance genes in constructed wetlands: A review. *Science of The Total Environment*, 859, 160257. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.160257>
- Fluet-Chouinard, E., Stocker, B. D., Zhang, Z., Malhotra, A., Melton, J. R., Poulter, B., Kaplan, J. O., Goldewijk, K. K., Siebert, S., Minayeva, T., Hugelius, G., Joosten, H., Barthelmes, A., Prigent, C., Aires, F., Hoyt, A. M., Davidson, N., Finlayson, C. M., Lehner, B., ... McIntyre, P. B. (2023). Extensive global wetland loss over the past three centuries. *Nature*, 614(7947), 281–286. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05572-6>
- Funari, R., & Shen, A. Q. (2022). Detection and Characterization of Bacterial Biofilms and Biofilm-Based Sensors. *ACS Sensors*, 7(2), 347–357. https://doi.org/10.1021/ACSSENSORS.1C02722/ASSET/IMAGES/LARGE/SE1C02722_0003.JPEG
- Ji, Z., Tang, W., & Pei, Y. (2022). Constructed wetland substrates: A review on development, function mechanisms, and application in contaminants removal. *Chemosphere*, 286, 131564. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131564>
- Jiang, X., Wang, M., He, D., Zhu, J., Yang, S., Fang, F., & Yang, L. (2024). Submerged macrophyte promoted nitrogen removal function of biofilms in constructed wetland. *Science of The Total Environment*, 914, 169666. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.169666>
- Khalifa, M. E., El-Reash, Y. G. A., Ahmed, M. I., & Rizk, F. W. (2020). Effect of media variation on the removal efficiency of pollutants from domestic wastewater in constructed wetland systems. *Ecological Engineering*, 143, 105668. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLENG.2019.105668>
- Mishra, S., Huang, Y., Li, J., Wu, X., Zhou, Z., Lei, Q., Bhatt, P., & Chen, S. (2022). Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants. *Chemosphere*, 294, 133609. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.133609>
- Restrepo Sierra, A., Rodríguez Loaiza, D. C., & Peñuela Mesa, G. A. (2021). Eficiencia de un reactor SBR para la remoción de la materia orgánica presente en el agua residual de una industria de teñido de flores. *Revista ION*, 34(1). <https://doi.org/10.18273/revion.v34n1-2021005>
- Rizzo, A., Conte, G., & Masi, F. (2021). Adjusted Unit Value Transfer as a Tool for Raising Awareness on Ecosystem Services Provided by Constructed Wetlands for Water Pollution Control: An Italian Case Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(4), 1531. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18041531>
- Ross, T. A., Zhang, J., Wille, M., Ciesielski, T. M., Asimakopoulou, A. G., Lemesle, P., Skaalvik, T. G., Atkinson, R., Jessop, R., Jaspers, V. L. B., & Klaassen, M. (2023). Assessment of contaminants, health and survival of migratory shorebirds in natural versus artificial wetlands – The potential of wastewater treatment plants as alternative habitats. *Science of The Total Environment*, 904, 166309. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.166309>
- Sandoval Herazo, L. C., Marín-Muñiz, J. L., Alvarado-Lassman, A., Zurita, F., Marín-Peña, O., & Sandoval-

- Herazo, M. (2023). Full-Scale Constructed Wetlands Planted with Ornamental Species and PET as a Substitute for Filter Media for Municipal Wastewater Treatment: An Experience in a Mexican Rural Community. *Water* 2023, Vol. 15, Page 2280, 15(12), 2280. <https://doi.org/10.3390/W15122280>
- Suárez, F., Sarabia, A., Sanzana, P., Latorre, C., & Muñoz, J. F. (2023). The Quebrada Negra wetland study: An approach to understand plant diversity, hydrology, and hydrogeology of wetlands. *WIREs Water*. <https://doi.org/10.1002/wat2.1683>
- Tunlid, A., & White, D. C. (2021). Biochemical Analysis of Biomass, Community Structure, Nutritional Status, and Metabolic Activity of Microbial Communities in Soil. *Soil Biochemistry*, 229–262. <https://doi.org/10.1201/9781003210207-7>
- UNESCO. (2024). *Agua para la prosperidad y la paz Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2024*. www.unesco.org/es/open
- Wang, Y., Cai, Z., Sheng, S., Pan, F., Chen, F., & Fu, J. (2020). Comprehensive evaluation of substrate materials for contaminants removal in constructed wetlands. *Science of The Total Environment*, 701, 134736. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.134736>
- Yang, L. Y., Huang, X. R., Neilson, R., Zhou, S. Y. D., Li, Z. L., Yang, X. R., & Su, X. X. (2023). Characterization of microbial community, ecological functions and antibiotic resistance in estuarine plastisphere. *Science of The Total Environment*, 866, 161322. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.161322>
- Yu, Q., Duan, X., Gu, Y., Li, J., Zhang, X., Chen, C., & Zhao, D. (2022). Increasing chemical oxygen demand and nitrogen removal efficiencies of surface-flow constructed wetlands in macrophyte-dominant seasons by adding artificial macrophytes. *Bioresource Technology*, 348, 126755. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2022.126755>
- Zaboon, B. H., Al-Abbawy, D. A. H., & Yaseen, D. A. (2022). Improving Wastewater Reclamation Using Constructed Wetlands by Artificial Plastic Biofilm Carriers. *Journal of Ecological Engineering*, 23(11), 241–253. <https://doi.org/10.12911/22998993/153459>
- Zhong, H., Jiang, C., He, X., He, J., Zhao, Y., Chen, Y., & Huang, L. (2024). Simultaneous change of microworld and biofilm formation in constructed wetlands filled with biochar. *Journal of Environmental Management*, 349, 119583. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2023.119583>

Electrobiorremediación de suelos contaminados con HAP

Electrobioremediation of HAPs contaminated soil

Adrián J. Acuña^{}; Maximiliano Gutierrez^{**}; German Tomas^{***}; Graciela N. Pucci^{****}*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.118774

RESUMEN

El consumo de combustibles a nivel mundial ha provocado un aumento en los derrames de petróleo impactando negativamente el medio ambiente, especialmente en el suelo. La contaminación por hidrocarburos, particularmente los HAPs, es una preocupación debido a su toxicidad. Este estudio se centró en evaluar la electrobiorremediación combinada con bioestimulación para degradar HAPs en un suelo de la Patagonia crónicamente contaminado por una explotación petrolera convencional. La investigación fue por un periodo de 60 días, utilizando 600 g de suelo provenientes de un sitio impactado con hidrocarburos, en cubas con y sin campo eléctrico constante (0,5 V/cm, con inversión de polaridad cada 4 días), y con o sin la adición de nutrientes específicos (urea y fósforo monopotásico en una relación C:N:P de 100:10:1). Se monitoreó pH, la conductividad eléctrica, humedad, bacterias degradadoras de hidrocarburos y concentración de HAPs por HPLC y metales pesados. Los resultados mostraron que la aplicación del campo eléctrico mejoró la biodegradación de HAPs, logrando hasta un 67,88% de reducción en los sistemas sin nutrientes, en contraste con el 38,59% observado en los controles. La mayor degradación se observó en HAPs de 2 y 3 anillos aromáticos, coincidiendo con un incremento en el número de bacterias en los sistemas electroestimulados. No obstante, la adición de nutrientes no generó el impacto positivo esperado, e incluso en ciertos casos, el aumento del pH por la urea afectó negativamente la actividad microbiana. Esto destaca el potencial de esta técnica para la recuperación de ecosistemas de suelos contaminados con petróleo.

Palabras clave: campo eléctrico, bacterias, hidrocarburos poliaromáticos.

ABSTRACT

Global fuel consumption has led to an increase in oil spills, negatively impacting the environment, especially the soil. Hydrocarbon contamination, particularly PAHs, is a concern due to its toxicity. This study focused on evaluating elec-

* Grupo de Estudios Ambientales - UTN-Facultad Regional Santa Cruz - Río Gallegos - Santa Cruz -Argentina. <https://orcid.org/0000-0002-0382-3681> adrianjacuna@yahoo.com.ar. Autor de la correspondencia G. Pucci puccigraciela@gmail.com

** CEIMA- Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco - Comodoro Rivadavia - Chubut - Argentina. <https://orcid.org/0000-0002-9834-7226> maxi.gutierrez.gutierrez.me@hotmail.com

*** Centro de Investigación y Transferencia de la Provincia de Santa Cruz - CONICET - Río Gallegos - Santa Cruz -Argentina. German Javier Tomas. <https://orcid.org/0000-0001-7836-4005> germanjaviertomas@frsc.utn.edu.ar

**** CEIMA- Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco - Comodoro Rivadavia - Chubut - Argentina. <https://orcid.org/0000-0002-0238-2394>. puccigraciela@gmail.com

trobioremediation combined with biostimulation to degrade PAHs in a Patagonian soil chronically contaminated by conventional oil exploitation. Experiments lasted 60 days, using cubes with and without a constant electric field (0.5 V/cm, with polarity reversal every 4 days), and with or without the addition of specific nutrients (urea and monopotassium phosphate in a C:N:P ratio of 100:10:1). pH, electrical conductivity, humidity, hydrocarbon-degrading bacteria, and PAH concentrations were monitored by HPLC and heavy metals. The results showed that the application of the electric field enhanced PAH biodegradation, achieving up to 67.88% reduction in systems without nutrients, in contrast to the 38.59% observed in the control systems. The greatest degradation was observed in PAHs with two and three aromatic rings, coinciding with an increase in the number of bacteria in the electrostimulated systems. However, the addition of nutrients did not have the expected positive impact, and in some cases, the increased pH caused by urea negatively affected microbial activity. This highlights the potential of this technique for the recovery of ecosystems in oil-contaminated soils.

Key words: electric field, bacteria, polyaromatic hydrocarbons.

Recibido: febrero 10 de 2025

Aprobado: 20 de octubre de 2025

INTRODUCCIÓN

Las necesidades de combustible debido a la expansión demográfica han provocado un aumento masivo de su consumo en todo el mundo. El proceso de la extracción de petróleo y de su transporte tanto dentro como fuera de los yacimientos, genera incidentes que tienen como consecuencias un gran impacto en el ambiente, más precisamente en el suelo. Estos derrames de petróleo tienen un impacto significativo en los elementos socio-económicos (Fu *et al.*, 2021). Específicamente, la contaminación por hidrocarburos de petróleo ha sido una preocupación ambiental crucial que contamina el suelo, el agua y la atmósfera. Implementar métodos de control adecuados es esencial para recuperar los recursos petroleros y también para cumplir con los estándares de protección ambiental (Li *et al.*, 2023; Jagaba *et al.*, 2022).

El petróleo crudo es una mezcla heterogénea constituida por diferentes componentes orgánicos de tipo alifáticos y aromáticos, cicloalcanos, asfaltenos y resinas, algunos pueden contener también metales pesados (Sancho *et al.*, 2020). Los metales pesados, junto con los hidrocarburos del petróleo crudo, generan contaminación (Karbassi *et al.*, 2015). Una mezcla de hidrocarburos aromáticos y alifáticos procedentes de productos del petróleo crudo se ha definido utilizando el término “hidrocarburos totales del petróleo” (TPH), y ambos pueden ser tóxicos para los microorganismos del suelo, además de beneficiosos como fuente de carbono (Maliszewska-Kordybach y Smreczak, 2013). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), el petróleo y sus derivados representan las principales fuentes de contaminación del suelo (Krzyszczak y Czech, 2021). Estos grupos de contaminantes orgánicos figuran como prioritarios y reciben considerable atención debido a sus pro-

piedades tóxicas, genotóxicas, mutagénicas y potencialmente cancerígenas (Aravind *et al.*, 2022).

La contaminación del suelo con petróleo crudo se ha convertido en un grave problema para el ambiente. El impacto de este genera un cambio en las comunidades bacterias aumentando el número de las que pueden biodegradar los hidrocarburos en decrecimiento de las bacterias que no lo utilizan como fuente de carbono y energía. Siempre hay que considerar las interacciones que se presentan, la actividad microbiana puede verse restringida debido a tensiones abióticas como la baja porosidad de suelo, su elevada salinidad y la presencia de metales e hidrocarburos tóxicos (Abdul Rahman *et al.*, 2021).

Las técnicas biológicas son un proceso de remediación eficaz, accesibles en costos y respetuosos con el ambiente que se han implementado ampliamente en áreas contaminadas por petróleo. Existen muchas técnicas disponibles para remediar hidrocarburos, incluidos métodos *in situ* y *ex situ*, como tratamientos biológicos, químicos y electroquímicos (Widera *et al.*, 2024).

En el proceso de biorremediación, los microorganismos utilizan naturalmente los hidrocarburos del petróleo como fuente de energía, convirtiéndolos así en compuestos no peligrosos. La bioestimulación implica la adición de sustancias estimulantes, como nutrientes o biopolímeros, que favorecen el crecimiento de microorganismos y su naturaleza enzimática en el ambiente contaminado. Durante la técnica de bioestimulación, se puede lograr una composición microbiana más abundante que conduzca a una mejor remediación (Behera *et al.*, 2021).

La electrobiorremediación surgió como una alternativa prometedora hace varias décadas, que combina la capa-

cidad de degradación de las bacterias y los procesos que tiene el campo eléctrico sobre los suelos y contaminantes, con el objeto de superar las limitaciones inherentes de la biorremediación. La aplicación del campo eléctrico mejora la biodisponibilidad de los contaminantes del suelo proporcionando las condiciones necesarias para el desarrollo microbiano (Gill *et al.*, 2014; Cameselle & Reddy, 2022). El transporte electrocinético es especialmente apropiado en suelos de baja permeabilidad como las arcillas, donde otros métodos para suministrar oxígeno y nutrientes no son efectivos. La electrobiorremediación se fundamenta en tres procesos, electromigración, electroósmosis y electroforesis. La electroósmosis es el movimiento del agua a través del suelo desde el ánodo hasta el cátodo en una celda electrolítica. Esto genera un movimiento de arrastre de los hidrocarburos y una distribución de la humedad. La electromigración es el transporte de iones y complejos iónicos al electrodo de carga opuesta. La concentración de sales tiene un impacto en el microbiota presente en el suelo. La electroforesis es el transporte de partículas cargadas o coloides bajo la influencia de un campo eléctrico. Diversos autores están aplicando estos sistemas, pero generalmente los realizan sobre suelos saturados en agua, elemento que es difícil en los suelos donde las precipitaciones anuales son muy bajas.

El objeto de este trabajo fue evaluar la técnica de electrobiorremediación y estimulación por el agregados de nutrientes para la degradación de hidrocarburos poliaro-

máticos (HAPs), de un suelo proveniente de la explotación hidrocarburífera convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suelo. La muestra de suelo utilizada fue colectada de un área de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos por la tecnología de biopilas perteneciente a una empresa petrolera de la Región Patagónica Cuenca del Golfo San Jorge (CSJB). Las muestras fueron tomadas a profundidades entre 10 y 30 cm tamizadas previamente al armado de las experiencias.

Experiencia de electrobiorremediación. Se llevaron a cabo experimentos electrocinéticos a potencial constante utilizando una cuba de vidrio para pruebas electrocinéticas cuyas dimensiones fueron de 38 cm de largo, 15 cm de profundidad y 15 cm de ancho (Figura 1). Para las pruebas con aplicación de campo eléctrico se realizaron dos sistemas denominados cuba A y cuba B, sin y con agregado de nutrientes para bioestimulación, respectivamente. En cada cuba se colocaron 600 g de suelo con humedad del 12% y a la cuba B se fertilizó con urea y fosfato monopotásico para lograr una relación C:N:P de 100:10:1. La experiencia fue realizada por duplicado durante 60 días, a 28°C, con aplicación de un campo eléctrico constante de 0,5 V/cm con inversión de su polaridad cada 4 días. Por otro lado, se confeccionaron dos sistemas control sin aplicación de campo eléctrico, uno fertilizado con nutrientes (SN) y otro sin la

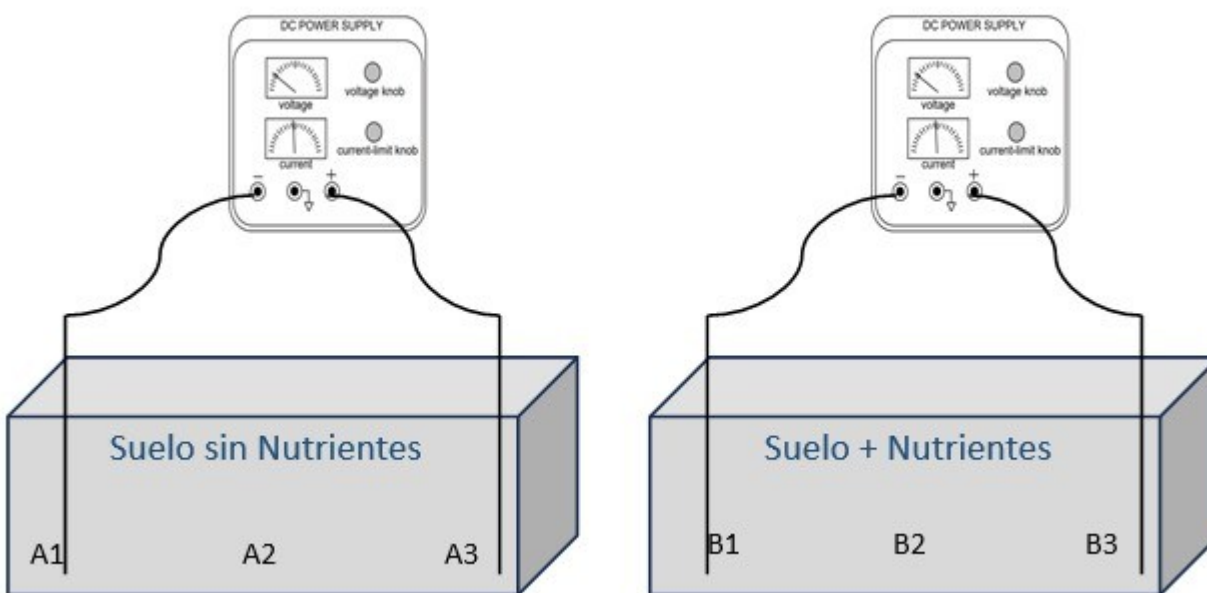


Figura 1. Celda de electrobiorremediación utilizada para el desarrollo de las experiencias en las que se aplicó el campo eléctrico con rotación de la polaridad cada 4 días.

incorporación de fertilizantes (SH). La humedad se controló semanalmente mediante un método gravímetro y se mantuvo en aproximadamente el 12 %. El monitoreo de los sistemas se realizó al comienzo y final de la experiencia, teniendo la precaución de tomar muestras de los sistemas con aplicación de campo eléctrico (cuba A y B) en los sitios del compartimento central denominados A1, A2 y A3 de la cuba sin nutrientes; y B1, B2 y B3 de las cubas con agregado de nutrientes como se muestra en la Figura 1. En los sistemas sin aplicación de campo eléctrico solo fue tomada una muestra compuesta para su análisis en los tiempos antes descritos.

Conteo de bacterias. Se realizó una suspensión de 10 g de suelo en 90 mL de solución fisiológica. Se homogeneizó durante 30 minutos en agitador orbital a 150 rpm. A partir de allí, se realizaron diluciones decimales. Los recuentos bacterianos se determinaron por diseminación en superficie incubándose 20 días a 28°C. Se utilizó el medio R2A (Reasoner & Geldreich, 1985) (extracto de levadura 0,5 g, peptona proteasa 0,5 g, caseamino ácido 0,5 g, glucosa 0,5 g, almidón 0,5 g, piruvato de sodio 0,3 g, K_2HPO_4 0,3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g, agar 15 g, agua destilada 1000 mL) para microorganismos aerobios totales. El medio mineral MM-PGO ($NaCl$ 5 g, K_2PO_4H 0,5 g, $NH_4PO_4H_2$ 0,5 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g, $MgSO_4$ 0,2 g, KNO_3 3 g, $FeSO_4$ 0,05 g, SL 10 B (HCl (25 %) 7,7 mL, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g, $ZnCl_2$ 0,07 g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,1 g, H_3BO_3 0,3 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,19 g, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,002 g, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,024 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,036 g, agua destilada 1000 mL) 10 mL, agar-agar 15 g, agua destilada 1000 mL suplementado con 0,1 % de una mezcla de petróleo y gasoil 1:1) se utilizó para determinar el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos (Pucci y Pucci, 2003).

Análisis fisicoquímico. Las determinaciones de aniones y cationes solubles y pH fueron realizadas con un extracto de suelo que se obtuvo a partir de 40 g de muestra suspendida en 100 mL de agua destilada, que fue homogenizada en un agitador orbital a 180 rpm durante 30 minutos, que finalmente fue centrifugada a 3500 rpm. La determinación de pH fue realizada potenciométricamente con electrodo de vidrio por la norma EPA 9040C (2004) y el contenido de agua fue medido gravimétricamente mediante desecación a 105 °C. La determinación de cationes y aniones se realizó de acuerdo a los siguientes métodos estándar: sulfato por la norma SM 4500-E (1992), calcio y magnesio por la norma ASTM D-511 (2021), amonio por la norma EPA 350.1 (1993), nitrato por la norma EPA 352.1 (1971), nitrito por la norma SM 4500 NO_2 (1992), fosfato por la norma SM 4500-C (1992) y sodio y potasio por la norma ASTM D 1428 (1982).

Análisis de hidrocarburos poliaromáticos. La extracción de TPH se llevó a cabo en Soxhlet colocando las muestras de suelo en dedales confeccionados de papel de filtro de tipo Whatman No.1 y refluendolas con hexano durante 16 horas de acuerdo a lo propuesto por la norma EPA 1664 (2010). Finalizada la extracción, el solvente se evaporó hasta sequedad en rotavapor. Posteriormente el TPH obtenido se fraccionó mediante cromatografía en columna (Mishra *et al.*, 2001) de gel de sílice pre-activado (24 horas a 100°C; columnas, 45 × 2 cm; tamaño de malla, 60-120) eluyendo inicialmente con 200 mL de n-hexano para separar la fracción de hidrocarburos alifáticos, seguido de 150 mL de benceno para separar la fracción de hidrocarburos aromáticos utilizando una velocidad de flujo de 90 gotas por minuto. Finalmente se tomó la fracción aromática obtenida y se concentró en rotavapor para ser sometida a la técnica de HPLC para cuantificación de los hidrocarburos poliaromáticos. Para la identificación y cuantificación de los HAPs, se utilizó un HPLC marca Shimadzu modelo LC10A VP utilizando la mezcla de referencia estándar HAP M/S Dr. Ehrenstofer, Supelco, EE.UU, con un detector UV-VIS a 254 nm y con una columna HAPs (4 µm 250 x 3,0 mm) utilizando agua:acetonitrilo (50:50) como fase móvil con un flujo de 1mL/minuto.

Análisis de metales pesados totales. Con el fin de evaluar un posible desplazamiento de estos contaminantes por la influencia del campo eléctrico, para la cuantificación de metales pesados en los sistemas con aplicación de corriente directa, 0,5 g de suelo fueron sometidos a una extracción con ácido nítrico según lo establecido en la norma EPA 3050B. Los metales, arsénico, bario, cadmio, cinc, cobre, cromo, mercurio, níquel, plata, plomo y selenio se cuantificaron por espectrometría de absorción atómica según la norma EPA 7000B (2007).

RESULTADOS

Los efectos de la electrobiorremediación en las propiedades fisicoquímicas del suelo se observan en la Tabla 1. Al comparar el comportamiento del pH y la conductividad eléctrica en los sistemas sometidos al campo eléctrico (A y B), se pudo observar que en el sistema con incorporación de nutrientes estos parámetros aumentaron. Tanto el pH como la conductividad eléctrica del suelo sometido al campo eléctrico mostraron un aumento en dirección al sitio B1 en el sistema con incorporación de nutrientes, observándose que los compuestos químicos que más se concentraron en este sitio de la celda fueron fosfato, nitrito, amonio y sodio. Respecto de los metales pesados determinados en ambos sistemas con aplicación del campo eléctrico (Tabla 1), se observó en el bario un aumento en sentido de los pun-

Tabla 1. Análisis químico inicial y final de las experiencias realizadas.

	Inicial	A1	A2	A3	B1	B2	B3	SH	SN
Humedad (%)	5,18	11,95	4,93	10,01	15,02	14,26	13,9	12,8	4,94
pH	7,45	7,23	7,29	7,65	9,45	8,89	7,39	7,38	9,18
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1371	2660	2780	2740	4700	4610	3470	3150	2410
Sulfato (ppm)	1193	743	480	419	380	692	549	580	790
Fosfato (ppm)	230	26,9	18,3	29,9	112,5	103,1	101,2	58,1	28,5
Nitrito (ppm)	3,7	1,9	0,3	0,6	41,5	27,6	16,6	1,9	2,5
Nitrato (ppm)	13,5	9,1	9,1	8,9	98,6	36,5	110,4	11,7	46,7
Amonio (ppm)	1,11	22,62	22,32	8,92	564,91	804	375,91	11,70	628,90
Sodio (ppm)	460	595	330	414	486	428	169	488	104
Potasio (ppm)	13,10	11,47	11,57	13,33	25,89	24,49	33,68	5,75	5,26
Arsénico	2,1	3	3,2	2,2	2,7	2,6	2,2		
Bario	1157,6	359,2	495,6	632,2	632,2	695	735,4		
Cadmio	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1		
Cinc	38,8	40,8	42	42	39	41,6	40,4		
Cobre	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20		
Cromo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10		
Mercurio	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2		
Níquel	6,2	5,6	5,6	6,2	5,6	6,2	8,2		
Plata	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2		
Plomo	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10		
Selenio	< 0,8	< 0,8	< 0,8	< 0,8	< 0,8	< 0,8	< 0,8		

Cuba de electrobiorremediación sin nutrientes (A) sitio 1, 2 y 3. Cuba de electrobiorremediación con nutrientes (B) sitio de muestreo 1, 2 y 3. Suelo con humedad (SH). Suelo con nutrientes (SN).

tos A3 y B3. El arsénico, que es propio de los suelos patagónicos, se mantuvo sin modificaciones y el cinc, en las cubas sin nutrientes agregados, presentó la misma tendencia que el bario, pero en las celdas con incorporación de nutrientes la mayor concentración de cinc se observó en el centro de esta.

La urea adicionada como fuente de nitrógeno produjo un aumento del amonio en los sistemas fertilizados (SN), posiblemente por desdoblamiento microbiano, lo que pudo haber impactado en el aumento del pH del suelo de los mismos que puede afectar a la población microbiana presente disminuyendo su número. El fosfato añadido

como fertilizante, como el que ya contenía el suelo naturalmente (0,13 ppm), se concentró en cercanía de los electrodos en los sistemas con aplicación del campo eléctrico con una tendencia mayor en el sitio B1 en el sistema con agregados de nutrientes. El nitrato se consumió en 1,8 ppm en el sistema SH, observándose que en el sistema A su utilización como nutriente fue de 4,4 ppm. El nitrito se utilizó el 50% del presente inicialmente en los sistemas sin incorporación de nutrientes (A y SH).

Los cambios en el contenido de humedad del suelo a lo largo del tiempo fueron diferentes de acuerdo al tratamiento aplicado. Los valores medios de los contenidos

Tabla 2. Valores de los hidrocarburos poliaromáticos en el inicio al final de las experiencias realizadas.

	Inicial	A1	A2	A3	B1	B2	B3	SH	SN
1-Metil naftaleno (ppm)	6,60	2,10	8,70	3,10	2,70	2,50	1,90	6,80	2,80
2-Metil naftaleno (ppm)	2,70	<0,1	<0,1	3,30	1,00	0,30	0,30	2,60	0,30
Acenafteno (ppm)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Fluoreno (ppm)	70,60	7,10	38,90	6,80	11,40	5,60	5,50	38,60	7,30
Fenantreno (ppm)	7,20	5,60	10,90	5,00	5,90	1,80	1,90	7,10	2,20
Antraceno (ppm)	133,00	81,50	103,00	74,30	73,10	52,50	40,80	32,10	65,20
Fluorantreno (ppm)	272,80	77,70	93,30	94,40	280,50	227,10	169,20	276,40	226,10
Pireno (ppm)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Benzo(a)antraceno (ppm)	158,90	92,50	68,20	97,40	106,90	146,50	190,50	143,90	141,10
Criseno (ppm)	390,80	173,40	126,20	145,10	340,60	462,80	377,70	121,30	366,50
Benzo(b)fluorantreno (ppm)	490,40	193,40	464,70	63,90	289,10	310,90	141,30	249,60	172,00
Benzo(k)fluorantreno (ppm)	248,80	80,90	182,20	82,10	136,80	136,20	73,00	173,80	159,60
Benzo(a)pireno (ppm)	198,10	104,50	187,40	75,20	<0,1	29,40	0,80	168,50	113,70
Dibenzo(a,h)antraceno (ppm)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Benzo(ghi)pireno (ppm)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Indol(1.2.3.cd)pireno (ppm)	52,80	<0,1	<0,1	<0,1	39,20	84,70	31,50	21,10	35,40
HAPs total (ppm)	2032,70	818,70	1283,50	650,60	1287,20	1460,30	1034,40	1241,80	1292,20
% Biodegradación	-	59,60	36,70	67,90	36,50	27,90	48,90	38,60	36,20

Cuba de electrobiorremediación sin nutrientes (A) sitio 1, 2 y 3. Cuba de electrobiorremediación con nutrientes (B) sitio de muestreo 1, 2 y 3. Suelo con humedad (SH). Suelo con nutrientes (SN).

de humedad del suelo en experimentos con un campo eléctrico fueron más altos que los del experimento sin campo eléctrico (Tabla 1), principalmente en los sistemas fertilizados. Los resultados muestran que la intensidad del campo eléctrico influyó en el contenido de humedad del suelo dado que se observaron mayores contenidos de agua en cercanías de los electrodos. El campo eléctrico afectó la distribución espacial del contenido de humedad por influencia de la electroósmosis (Virkytyte *et al.*, 2002), observándose luego de 60 días un 4,93 % en el centro de la celda del sistema sin fertilización, valor inferior a lo observado en cercanías de los electrodos (entre 10 y 12%). Por otro lado, en el sistema con aplicación de campo eléctrico y de nutrientes el contenido de humedad fue similar en los tres puntos evaluados, con una tendencia a aumentar hacia el sitio B1. Estos hallazgos respaldan los estudios realizados por Hamed y Bhadra (1997), que demostraron que la aplicación de un campo eléctrico en un suelo produce a un mayor flujo de agua por electroósmosis entre sus poros (Li *et al.*, 2020).

En la Tabla 2 y la Figura 2 se presentan los resultados de la degradación de los HAPs. Independientemente de la incorporación de nutrientes o no al suelo, la aplicación del campo eléctrico mejoró el porcentaje de biodegradación de este tipo de contaminantes. Esto pudo observarse de forma más marcada en los sistemas sin fertilización, ya que en el sistema con aplicación de campo eléctrico (A) se evidenció un porcentaje de biodegradación de HAPs, máximo de 67,88% en el sitio A3 y solo del 38,59% en el sistema SH. En los sistemas fertilizados esta diferencia no fue tan marcada, observándose un porcentaje de biodegradación de HAPs máximo de 48,97% en el sitio B3, mientras que en el sistema SN fue de 36,25%, encontrándose que en los sistemas sin fertilización la biodegradación fue mejor independientemente de la aplicación del campo eléctrico.

Los HAPs poseen una estructura de anillo estabilizada por resonancia que influye directamente en la capacidad de degradación por parte de los microorganismos debido a su naturaleza compleja. La Figura 2 muestra el grado de degradación acumulada de los HAPs durante el

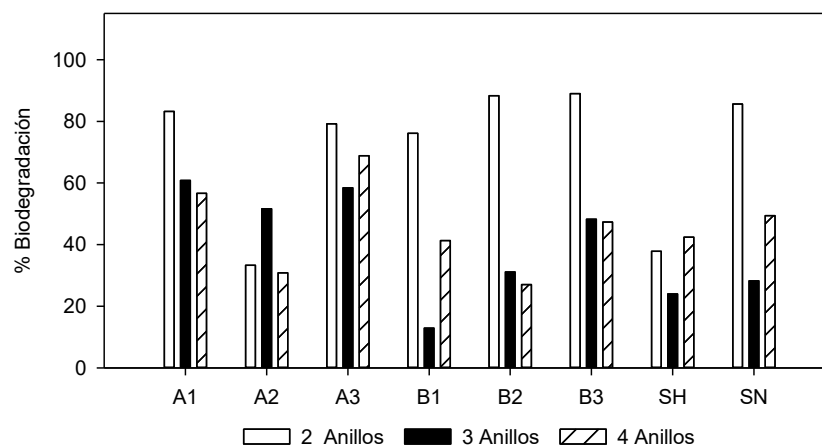


Figura 2 . Porcentaje de degradación de hidrocarburos poliaromáticos discriminados por cantidad de anillos en su estructura química a los 60 días del proceso estudiado. Cuba de electrobiorremediación sin nutrientes (A) sitio 1, 2 y 3. Cuba de electrobiorremediación con nutrientes (B) sitio de muestreo 1, 2 y 3. Suelo con humedad (SH). Suelo con nutrientes (SN).

periodo experimental en función de su número de anillos aromáticos y al tratamiento aplicado. La mayor degradación ocurrió con los HAPs que poseen 2 o 3 anillos aromáticos, los que fueron más biodegradados en los sistemas con aplicación del campo eléctrico comparados con sus respectivos controles sin aplicación de corriente continua. Este proceso de biodegradación fue acompañado por un aumento en el número de bacterias de los suelos (Figura 3) que presentaron su mayor número en los sistemas con aplicación de campo eléctrico.

DISCUSIÓN

En los casos de los suelos contaminados crónicamente, como en este estudio que se trabajó con muestras reales de campo, las interacciones entre los hidrocarburos y las partículas de suelo disminuyen la biodisponibilidad de estos para las bacterias (Chen *et al.*, 2019). Su contaminación se derivó de un derrame de petróleo accidental lo que presumiblemente condujo al envejecimiento de los contaminantes y adsorciones de estos por parte de las partículas del suelo. El suelo en estudio estaba contaminado por todas las fracciones del petróleo estudiadas (hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos) y presentó una alta abundancia bacteriana con microorganismos hidrocarburoclásticos (Figura 3) con valores óptimos para el desarrollo de procesos de biorremediación que se mantuvieron durante el tiempo de estudio. La electrobiorremediación es una tecnología emergente utilizada para remediar suelos contaminados con hidrocarburos por aplicación de un campo eléctrico (Ambaye *et al.*, 2023). La aplicación de un campo eléctrico de forma directa al suelo puede influir indirectamente en la actividad y composición microbiana al cambiar las condiciones ambientales del mismo,

siendo el pH, el contenido de humedad, la conductividad eléctrica y la temperatura del suelo los principales factores que determinan su composición y actividad microbiana (Xue *et al.*, 2018). Los resultados muestran a la electrobiorremediación favoreció la disminución de hidrocarburos por la movilización y aumento de la biodisponibilidad de estos. La aplicación del campo eléctrico evidenció mejores resultados en la biodegradación de los HAPs, el equilibrio del pH se mantuvo por las rotaciones cada 4 días de los polos, como la adopción de condiciones de tratamiento más suaves sin las modificaciones drásticas que produce la electrobiorremediación cuando estos se mantienen constantes en el tiempo (Gidudu, 2022).

Los sistemas controles presentaron una degradación de 38,6% en comparación de las cubas sin nutrientes que fue según el sitio entre 36,7 hasta 67,9%. La biorremediación de los HAPs suele estar limitada por su alta sorción en las partículas del suelo generando una elevada persistencia de estos compuestos en esta matriz ambiental. En este sentido, el proceso de electroósmosis generado por la electrobiorremediación favorece la desorción de los HAPs para que estén biodisponibles para ser degradados (Li *et al.*, 2020). Además, cuando se aplicó el campo eléctrico, en aquellos sistemas sin agregado de nutrientes se observó una mejor biodegradación de los HAPs. Esto pudo estar asociado a que el desdoblamiento microbiano de la urea en el suelo (Tabla 1) pudo ser responsable del aumento de pH en el sistema B. En el sitio B3 de este sistema se observó el mayor porcentaje de biodegradación cuando la fertilización fue aplicada, lo que se correlaciona con el sitio de la celda con mayor número de microorganismos, menor conductividad eléctrica y valores cercanos a la neutrali-

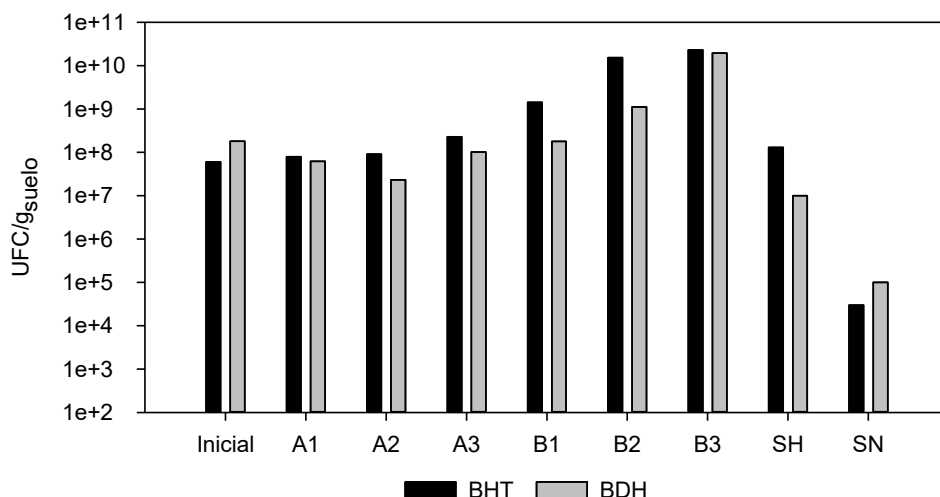


Figura 3. Desarrollo bacteriano en las placas de R2A y Medio mineral con Petróleo (MBM-PGO) al inicio y final de la experiencias.
Cuba de electrobiorremediación sin nutrientes (A) sitio 1, 2 y 3. Cuba de electrobiorremediación con nutrientes (B) sitio de muestreo 1, 2 y 3. Suelo con humedad (SH). Suelo con nutrientes (SN).

dad del pH. Aunque resultados similares sin la aplicación de campo eléctrico pero en sistemas deficientes de nitrógeno Acuña *et al.* (2012) y también Soghandi *et al.* (2024) obtuvieron también una mejor degradación de hidrocarburos aromáticos. Estos resultados fueron concordantes con lo propuesto por Haritash y Kaushik (2009), que demostraron que la degradación de los HAPs en suelos contaminados depende de las condiciones ambientales, la cantidad y el tipo de microorganismos y la naturaleza y estructura química del contaminante presente. De esta forma, la eficiencia de la electrobiorremediación prolonga la supervivencia de los microorganismos o mejora la actividad microbiana en suelos contaminados, lo que se logra realizando un correcto manejo de estas variables ambientales en la matriz contaminada (Locatelli *et al.*, 2013).

Si bien en general los HAPs de dos anillos fueron los más degradados en los sistemas con aplicación de campo eléctrico, esto pudo deberse a que estos hidrocarburos son los que más fácilmente pueden volatilizarse de los sistemas. Por otro lado, en estos sistemas sin fertilización se observó que la mayor degradación de los HAPs fue a expensas de los compuestos constituidos por 2 y 3 anillos bencénicos en todos los sitios de la celda estudiados. Estos resultados obtenidos son concordantes con lo observado por Budiyo *et al.* (2018) cuando demostraron que los HAPs de bajo peso molecular que contienen menos de cuatro anillos de benceno son fácilmente biodegradables. En este sentido Han *et al.* (2017) investi-

garon la aplicación de diferentes desechos agrícolas en la bioestimulación de la biodegradación de HAPs en microcosmos de suelo durante 90 días. La concentración inicial de HAPs totales en el suelo fue de 36,1 mg/kg, donde los HAPs de cuatro anillos comprendieron el 41,7 % del total de los HAPs. Los resultados que obtuvieron demostraron tasas de degradación más altas y comprendidas entre el 40 y 60 % para los HAPs con bajo peso molecular respecto de los de mayor peso molecular. De manera similar, Lukić *et al.* (2016) demostraron, en experiencias en suelos contaminados con hidrocarburos, una mayor resistencia a la degradación para los HAPs de alto peso molecular.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio, se observó que la aplicación de un campo eléctrico fue beneficioso para la obtención de mejores resultados en la eliminación de los hidrocarburos poliaromáticos, y la presencia de nutrientes en la relación C:N:P 100:10:1, no tuvo el impacto esperado de mejora en los resultados.

REFERENCIAS

- Abdul Rahman, N.S.N., Abdul Hamid, N.W., Nadarajah, K. (2021). Effects of abiotic stress on soil microbiome. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16), 9036.
- Acuña AJ, Pucci OH, Pucci GN. (2012). Effect of nitrogen deficiency in the biodegradation of aliphatic and

- aromatic hydrocarbons in Patagonian contaminated soil. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*.11 (3), 479-485.
- Ambaye, T. G., Vaccari, M., Franzetti, A., Prasad, S., Formicola, F., Rosatelli, A., ... & Rtimi, S. (2023). Microbial electrochemical bioremediation of petroleum hydrocarbons (PHCs) pollution: Recent advances and outlook. *Chemical Engineering Journal*, 452:139372.
- Aravind Kumar, J., Krithiga, T., Sathish, S., Annam Renita, A., Prabu, D., Lokesh, S., Geetha, R., Kartick, Raja Namasivayam, S., Sillanpaa, M. (2022). Persistent organic pollutants in water resources: Fate, occurrence, characterization and risk analysis. *Science Total Environmental*. 831:154808.
- ASTM D 1428. (1982). Tentative Methods of Test for Sodium and Potassium Ions in Industrial Water and Water-Formed Deposits by Flame Photometry. 1 de Agosto del 2000
- ASTM D-511 (2021) Standard Test Methods for Calcium and Magnesium In Water. 6 de diciembre del 2021
- Behera, I.D., Nayak, M., Biswas, S., Meikap, B.C., Sen, R. (2021). Enhanced biodegradation of total petroleum hydrocarbons by implementing a novel two-step bio-augmentation strategy using indigenous bacterial consortium. *Journal of Environmental Management*, 292:112746.
- Budiyanto, F., Thukair, A., Al-Momani, M., Musa, M. M., & Nzila, A. (2018). Characterization of halophilic bacteria capable of efficiently biodegrading the high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene. *Environmental Engineering Science*, 35 (6), 616-626.
- Cameselle, C., Reddy, K. R. (2022). Electrobioremediation: Combined electrokinetics and bioremediation technology for contaminated site remediation. *Indian Geotechnical Journal*, 52 (5)1205-1225.
- Chen, C. H., Liu, P. W. G., & Whang, L. M. (2019). Effects of natural organic matters on bioavailability of petroleum hydrocarbons in soil-water environments. *Chemosphere*, 233, 843-851.
- EPA 1664 (2010). U.S. Environmental Protection Agency. N-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated N-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-Polar Material) by Extraction and Gravimetry. Febrero del 2010
- EPA 350.1 (1993) U.S. Environmental Protection Agency. EPA Method 350.1: Determination of Ammonia Nitrogen by Semi-Automated Colorimetry
- EPA 352.1 (1971) U.S. Environmental Protection Agency. Nitrogen, nitrate (colorimetrics, Brucine) by spectrophotometer.
- EPA 7000B,2007. U.S. Environmental Protection Agency. SW-846 Test Method 7000B: Flame Atomic Absorption Spectrophotometry. Febrero del 2007
- EPA 9040C (2004) U.S. Environmental Protection Agency. Test Method 9040C: pH Electrometric Measurement. Noviembre del 2004
- Fu, X. G., Shi, K., Xue, J. L., Chen, C., Bai, Y., Qiao, Y. L., Yu, H. (2021). Systematic adsorption process of petroleum hydrocarbon by immobilized petroleum-degradation bacteria system in degradation pathways. *Petroleum Science*, 18(5), 1543-1550.
- Gidudu, B., & Chirwa, E. M. (2022). The role of pH, electrodes, surfactants, and electrolytes in electrokinetic remediation of contaminated soil. *Molecules*, 27 (21), 7381.
- Gill, R.T., Harbottle, M.J., Smith, J.W.N., Thornton, S.F. (2014). Electrokinetic-enhanced bioremediation of organic contaminants: a review of processes and environmental applications. *Chemosphere*, 107(1), 31-42.
- Hamed, J. T., & Bhadra, A. (1997). Influence of current density and pH on electrokinetics. *Journal of Hazardous materials*, 55 (3), 279-294.
- Han, X., Hu, H., Shi, X., Zhang, L., He, J. (2017). Effects of different agricultural wastes on the dissipation of PAHs and the PAH-degrading genes in a PAH-contaminated soil. *Chemosphere*, 172 (2), 286-293.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169 (1-3), 1-15.
- Jagaba, A.H., Kutty, S.R.M., Lawal, I. M., Birniwa, A.H., Affam, A.C., Yaro, N.S.A., Usman, A.K., Umaru, I., Abubakar, S., Noor, A., Soja, U.B., Yakubu, A.S. (2022). Circular economy potential and contributions of petroleum industry sludge utilization to environmental sustainability through engineered processes-A review. *Cleaner and Circular Bioeconomy* 3:100029.
- Karbassi, A.R., Tajziehchi, S., Afshar, S. (2015). An investigation on heavy metals in soils around oil field area. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 1 (4), 275-282.
- Krzyszczak, A., Czech, B. (2021). Occurrence and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons derivatives in environmental matrices. *Science of The Total Environment*, 788:147738
- Li, C., Cui, C., Zhang, J., Shen, J., He, B., Long, Y., Ye, J. (2023). Biodegradation of petroleum hydrocarbons-based pollutants in contaminated soil by exogenous effective microorganisms and indigenous microbiome. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253:114673.
- Li, F., Guo, S., Wang, S., Zhao, M. (2020). Changes of microbial community and activity under different electric fields during electro-bioremediation of PAH-contaminated soil. *Chemosphere*, 254:126880.
- Locatelli, A., Spor, A., Jolivet, C., Piveteau, P., Hartmann, A. (2013). Biotic and abiotic soil properties influence

- survival of *Listeria monocytogenes* in Soil. *PLoS One Journal*. Pone. 8 (10), 75969
- Lukiaë, B., Panico, A., Huguenot, D., Fabbicino, M., van Hullebusch, E.D., Esposito, G. (2016). Evaluation of PAH removal efficiency in an artificial soil amended with different types of organic wastes. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 15 (1), 1-11
- Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak, B., Klimkowicz-Pawlas, A. (2013). The levels and composition of persistent organic pollutants in alluvial agriculture soils affected by flooding. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (12), 9935–9948.
- Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. C., & Lal, B. (2001). In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium. *Current microbiology*, 43: 328-335.
- Pucci, G.N., Pucci, O.H. (2003). Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburos previamente sometidas a Landfarming. *Revista Argentina de Microbiología*, 35 (2), 62-68.
- Reasoner, D. J., Geldreich, E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology*, 49 (1), 1-7.
- SM 4500 NO₂ (1992) Standart method. Turbidimetrics method.
- SM 4500-C (1992) Standart method. Turbidimetrics method.
- SM 4500-E (1992) Standart method. Turbidimetrics method.
- Soghandi, B., & Salimi, F. (2024). Study on amendment of rapeseed meal, soybean meal, and NPK fertilizer as biostimulants in bioremediation of diesel-contaminated soil by autochthonous microorganisms. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 33(4), 430-450.
- Virkutyte, J., Sillanpää, M., & Latostenmaa, P. (2002). Electrokinetic soil remediation—critical overview. *Science of the total environment*, 289 (2), 97-121
- Widera, B., Tyszkiewicz, N., Truu, J., Rutkowski, P., M³ynarz, P., & Pasternak, G. (2024). Relationship between biodiversity and power generated by anodic bacteria enriched from petroleum-contaminated soil at various potentials. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 194:105849.
- Xue, P. P., Carrillo, Y., Pino, V., Minasny, B., & McBratney, A. B. (2018). Soil properties drive microbial community structure in a large scale transect in Southeastern Australia. *Scientific reports*, 8 (1), 11725.

Ensayo *in vitro* para remoción de mercurio en aguas, utilizando el hongo del género *Trametes* sp.

In vitro studies for removal of mercury in water, using fungus genera *Trametes* sp.

Elsy Karenth Figueroa Mosquera*, Luis Alejandro Carmona Jiménez**, Susana Ochoa Agudelo***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.116390

RESUMEN

El mercurio es un contaminante altamente tóxico, su dispersión afecta la salud humana, animal y el equilibrio ambiental, debido a los diferentes derivados que produce y su alta biodisponibilidad. El mercurio orgánico, particularmente el metilmercurio (MeHg), se acumula en alimentos como el pescado, mientras que el etilmercurio puede ingresar al cuerpo humano por medio de conservantes de vacunas y algunos antisépticos. De esta manera, se evidencia la importancia de encontrar mecanismos eficaces que permitan minimizar la presencia de iones metálicos del mercurio, siendo la biorremediación un mecanismo alternativo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de *Trametes* sp. para la remoción del mercurio en medio acuoso. El material fúngico recolectado cumplió con características morfológicas macroscópicas y microscópicas para el género *Trametes* sp. Cuatro hongos fueron seleccionados para continuar con el ensayo de tolerancia al metal, el cual se analizó a partir del crecimiento radial en medio sólido. Para el ensayo de remoción de mercurio en solución acuosa, los hongos se expusieron en una concentración de 15 mg/L de mercurio, para lo cual se logró una remoción de 2.40 mg/L del metal. La secuenciación de la región ITS del material fúngico, confirma la identidad (99.13 %) de un hongo correspondiente a *Trametes* sp. Se propone al hongo *Trametes* sp. como material fúngico promisorio en el proceso de remoción de mercurio, teniendo en cuenta que es indispensable profundizar en el mecanismo que esta emplea, con la finalidad de optimizar su aplicación en procesos de biorremediación.

Palabras clave: metal pesado, biorremediación, biosorción, biomasa fúngica, tolerancia al mercurio.

ABSTRACT

Mercury is a highly toxic pollutant. Its dispersion affects human and animal health and environmental balance due to the different derivatives it produces and its high bioavailability. Organic mercury, particularly methylmercury (MeHg), accumulates in foods such as fish, while ethylmercury can enter the human body through vaccine preservatives and some antiseptics. This highlights the importance of finding effective mechanisms to minimize the presence of mercury metal ions, with bioremediation being an alternative mechanism. The objective of this study was to evaluate the capac-

* Biotecnóloga, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, IUCMA

** Estudiante de Biología, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, IUCMA

*** MSc Biología, Docente Investigador, Grupo Biociencias, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, IUCMA

ity of *Trametes* sp. to remove mercury in an aqueous medium. The fungal material collected had the macroscopic and microscopic morphological characteristics for the genus *Trametes* sp. Four fungi were selected to continue with the metal tolerance test, which was analyzed based on radial growth in solid medium. For the mercury removal test in aqueous solution, the fungi were exposed to a concentration of 15 mg/L of mercury solution, achieving a removal of 2.40 mg/L of the metal. Sequencing of the ITS region of a fungal material confirms the identity (99.13%) of the fungus corresponding to *Trametes* sp. The fungus *Trametes* sp. is proposed as a promising fungal material in the mercury removal process, bearing in mind that it is essential to further investigate the mechanism it uses in order to optimize its application in bioremediation process.

Key words: heavy metal, bioremediation, biosorption, fungi biomass, mercury tolerant.

Recibido: septiembre 25 de 2024

Aprobado: 20 de octubre de 2025

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los metales pesados no esenciales constituyen un problema importante a nivel de diferentes ecosistemas. El agua potable y otros efluentes de agua natural, aguas residuales y el suelo, son espacios donde los metales pesados tienen un impacto negativo (Upadhyay *et al.*, 2023). Los metales pesados son altamente venenosos, cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos para los humanos, animales, plantas y su entorno (Londoño, 2020). Uno de los problemas más graves asociados a la persistencia de estos elementos en el ambiente, es la bioacumulación y la biomagnificación en la cadena trófica, resultando así en problemas para la salud, aumentando el daño en los ecosistemas (Lizarazo *et al.*, 2020). Los metales pesados se dispersan en el medio ambiente a través de efluentes industriales, desechos orgánicos, quema de basura, transporte, generación de energía, explotación minera; pueden ser transportados a kilómetros de distancia desde la fuente a través del viento, la tierra o por la superficie, y/o vías fluviales (Molina *et al.*, 2021).

El término metal pesado aplica a un grupo de metales y metaloides con una densidad atómica superior a 4 g/ml, o al menos 5 veces mayor que la densidad del agua. La exposición humana a metales pesados como el arsénico puede ser a través del agua potable, cultivos, alimentos procesados, verduras, hongos y productos animales (Lizarazo *et al.*, 2020). Se han identificado altas concentraciones de metales pesados y metaloides, como mercurio (Hg), arsénico (As), plomo (Pb), cadmio (Cd), zinc (Zn), níquel (Ni) y cromo (Cr) en diferentes fuentes alimentarias (L. Chen *et al.*, 2022), siendo la causa principal el uso de agua contaminada con metales, para su riego (Lucero Rincón *et al.*, 2023). Por ejemplo, la acumulación excesiva de metales pesados en cuerpos de agua puede causar daño oxidativo en plantas acuáticas, reducir la absorción de nutrientes y afectar el desarrollo de los animales acuáticos (L. Chen *et al.*, 2022). La acumulación de metales pesados en los animales terrestres puede reducir su competitividad,

viabilidad y el tamaño de las poblaciones, resultando en un desequilibrio ecológico (Molina *et al.*, 2021). Los metales pesados pueden ingresar a los tejidos vivos a través de la exposición a la contaminación atmosférica o del agua, y la biomagnificación, a través de la cadena alimentaria, lo que lleva al desarrollo de una serie de enfermedades como: defectos neurológicos y efectos dermatológicos, daño renal, tumores y cánceres, en diferentes organismos vivos (Lizarazo *et al.*, 2020).

Dentro de estos metales pesados, se encuentra el mercurio, el cual puede ser identificado en el ambiente en diferentes formas, incluyendo el mercurio metálico (Hg), el mercurio inorgánico, al que las personas pueden estar expuestas de acuerdo a su actividad laboral, así como el mercurio orgánico, en forma de metilmercurio (Me-Hg), que puede ingresar al cuerpo humano a través de los alimentos como el pescado, y el etilmercurio (Et-Hg) que puede ingresar al cuerpo por medio de conservantes de vacunas y algunos antisépticos (Londoño, 2020). Según los registros históricos de contaminación por metales pesados, Colombia es el tercer consumidor de mercurio a nivel mundial con fines de minería artesanal para la extracción de oro lo cual facilita procesos de amalgamación (L. Chen *et al.*, 2022). Esta actividad se ha convertido en la principal fuente de exposición a este metal, a nivel global y nacional (Sarria-Villa *et al.*, 2020). También es usado para la liberación de otros metales del material madre por diferentes procesos físicos y químicos llevados a cabo durante la extracción.

Por otro lado, la remediación ambiental de metales pesados, implementa estrategias de carácter físico, químico y/o biológico. La remediación física incluye principalmente métodos como el uso de resinas de intercambio iónico, separación por membranas y extracción con fluidos supercríticos (Kumar *et al.*, 2021). La remediación química incluye procesos como la precipitación química, coagulación, oxidación, redox químico y electrolisis (N. Chen *et al.*, 2023). Generalmente, los enfoques físicos y químicos

son capaces de eliminar un amplio espectro de contaminantes, pero las desventajas de estos métodos radican en alto consumo de energía, escalado del tratamiento, la necesidad de productos químicos adicionales y la contaminación secundaria (Londoño, 2020).

Dentro de los métodos de origen biológico para remover metales pesados en el ambiente, ha sido reportado el uso de las plantas (fitorremediación) y la biorremediación utilizando bacterias, hongos (micorremediación), algas (ficorremediación), entre otros microorganismos (Upadhyay *et al.*, 2023). Estos métodos, han resultado ser estrategias eficientes y amigables con el medio ambiente. La micorremediación es una estrategia económica, eficiente y ecológicamente sólida para contrarrestar la creciente crisis de contaminación acuática y terrestre (Kumar *et al.*, 2021). Las ventajas de usar hongos en procesos de biorremediación se deben principalmente a las características que presenta el material fúngico como biomasa (viva o muerta), la inmensa red de hifas, además de la basta producción de enzimas extracelulares multipropósito. Su principal efecto ha sido reportado alrededor de la relación entre el área de superficie que pueden colonizar sus hifas, y el volumen en masa que pueden generar su micelio, para la interacción con contaminantes complejos. La adaptación de este material biológico a diferentes condiciones ecológicas, entre ellas la fluctuación del pH y la temperatura en ambiente, permite la expresión de proteínas que intervienen en procesos de unión a metales de manera eficiente (Firinčá *et al.*, 2024). Los hongos pueden bioacumular metales tóxicos de aguas y suelos contaminados de manera estable y eficiente (Meyer *et al.*, 2023).

El hongo *Trametes sp.* ha sido contemplado como una alternativa para procesos de biorremediación de metales pesados. *Trametes versicolor* es uno de los hongos basidiomicetos más conocidos, apreciados y utilizados tanto en medicina tradicional como en prácticas clínicas modernas (principalmente en países asiáticos (Torreggiani *et al.*, 2023). Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en toda la geografía global, ya que crece sobre troncos secos y árboles débiles o muertos (Tišma *et al.*, 2021). Se ha documentado que este hongo posee un potencial biorremediador especialmente en medios acuosos, principalmente con capacidad para adsorber iones metálicos de cadmio (Arica *et al.*, 2003). De esta manera, este estudio se enfoca en evaluar la tolerancia del hongo *Trametes sp.* para crecer en presencia de mercurio, y posteriormente analizar la capacidad para remover el mercurio en soluciones acuosas, utilizando la biomasa del hongo, con la finalidad de contemplar el uso promisorio de esta estructura fúngica como alternativa que asistir procesos de biorremediación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras e identificación morfológica

La recolección de las muestras de cada hongo se realizó en Medellín – Antioquia (6°16'03.1"N 75°36'02.1"W), San Pablo adentro – Chocó (5°11'48.7"N 76°39'58.3"W) y Río claro– Antioquia (5°35'20.8" N 75°51'55.9" W). El muestreo se llevó a cabo bajo el permiso marco para la recolección de material biológico de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia (IUCMA). Los puntos de muestreo se caracterizaron por ser húmedos, de temperatura templada, y contar con estructuras que sostenían el material fúngico asociado a troncos de madera, o troncos de árbol secos, sustrato específico para su desarrollo (Tišma *et al.*, 2021). Posteriormente, se procedió a secar y guardar de manera independiente para su transporte al laboratorio de Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia (IUCMA). Una vez en el laboratorio, el material fúngico se almacenó a 4°C, hasta su procesamiento. El material fúngico se encuentra depositado en el cepario CEMBIO, Reg.291 - IUCMA.

Identificación morfológica macroscópica y microscópica

La identificación morfológica del carpóforo se comparó con la descripción encontrada en la literatura para el género *Trametes sp.*: cuerpo fructífero que generalmente es de forma semicircular, disposición en abanico, con una superficie porosa y de textura coriácea. Las especies de este género tienden a tener colores como blanco, beige, diferentes tonalidades de café y marrón, según el sustrato se reconocen colores vibrantes como verde o rojo por la presencia de microalgas (Tišma *et al.*, 2021). Para todos los casos, cada material fúngico se lavó y desinfectó. En primera instancia, todos los especímenes se lavaron con agua jabonosa (jabón de pH neutro) para quitar restos de tierra, luego se procedió a obtener fragmentos de carpóforos con una dimensión de 1 mm². Para la desinfección, los trozos cortados se sometieron en soluciones desinfectantes en el siguiente orden, aplicando los respectivos tiempos: alcohol al 70% (1 min), glutaraldehído al 5% (30 seg) e hipoclorito al 5% (30 seg). Al final, los trozos se sumergieron en agua destilada durante 1 min para posteriormente secarlos con toallas estériles y proseguir a sembrar en tres medios de cultivo sólido de sustrato definido: papa-zanahoria-panela (PDZPA), agar ogy (Oxoid ®), y agar papa (Merck®) para observar en cuál de los tres se evidenciaba mayor crecimiento radial (Krupodorova *et al.*, 2021).

Ensayo en medio sólido con diferentes concentraciones de mercurio

La exposición al mercurio en medio sólido se realizó siguiendo la metodología de (Krupodorova *et al.*, 2021) con algunas modificaciones. Se tomó una muestra de

cada hongo de 0.5 mm de diámetro de cada medio sólido previamente incubado 15 días en agar papa. La inoculación se realizó en el medio sólido seleccionado, suplementado con diferentes concentraciones de mercurio (15 mg/L, 50mg/L, 100mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 500 mg/L). Se incluyó un medio sin adición de metal, como control de crecimiento normal para cada hongo. Posterior a 15 días de exposición, se tomó la medida del crecimiento radial en caja petri. A partir de este ensayo se seleccionaron los hongos que presentaron mayor crecimiento radial durante el tiempo de exposición en las diferentes concentraciones del metal.

Preparación de inóculo y ensayo de remoción de mercurio en solución acuosa

Los hongos aislados que presentaron mayor tolerancia al mercurio en medio sólido, se utilizaron para determinar la cantidad de remoción del mercurio, a partir de un ensayo en medio líquido, descrito por (Hernández-Sáenz *et al.*, 2020), con algunas modificaciones. La producción de biomasa de cada hongo se obtuvo a partir de un cultivo previo del hongo en medio sólido (15 días de incubación, a temperatura ambiente), en el cual se realizó un raspado de conidias las cuales se suspendieron en 10 ml de agua destilada estéril con tween 80 para obtener una concentración de 3×10^6 conidias/ml. Se transfirieron 250 μ l de la suspensión de conidias al medio de cultivo líquido papa-zanahoria-panela (PDZPL) suplementado con 15 mg/L de mercurio (Hg^{2+}), se incubó en una temperatura de 37°C, a una velocidad de agitación de 150 rpm, durante 14 días (Z. Wu *et al.*, 2015). Se tuvo en cuenta un control negativo del medio sin hongo y sin metal, otro control del medio solo con hongo sin metal, y un control del medio solo con metal sin inóculo. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Detección de mercurio (Hg^{2+}) en medio líquido

Posterior al tiempo de incubación, se midió la cantidad de metal removido por el hongo a partir de la técnica espectrofotométrica UV/VIS utilizando ditizona como agente de color, descrita por (Z. Wu *et al.*, 2015) con algunas modificaciones. Se elaboró una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de Hg^{2+} (0.2 mg/L a 1.2 mg/L), la cual se utilizó como referencia para la detección del metal en cada muestra tratada. Brevemente, se centrifugó 1 ml de la muestra acuosa que contenía Hg^{2+} , tratada y no tratada, se le adicionaron 7 ml de una solución saturada de ditizona solubilizada en el surfactante Tritón x-100 al 5%, amortiguada en un buffer de fosfato (pH 2). Posteriormente, se aforó a 10 ml con la solución surfactante, se agitó suavemente para facilitar la reacción y se midió la absorbancia por espectrofotometría UV/VIS en una longitud de onda de

502 nm. La detección de mercurio (Hg^{2+}) se interpretó mediante el cambio de color que se evidenció en cada muestra al adicionar la ditizona, ya que esta reacciona con los iones metálicos, generando un color rojizo cuando está complejada con el Hg^{2+} .

Identificación molecular

Para lograr una aproximación a la identidad del material fúngico, se llevó a cabo una identificación por métodos moleculares. El material fúngico fue entregado a un laboratorio externo, quienes realizaron la extracción de ADN, verificaron la calidad del material extraído, y posteriormente, realizaron un envío a Macrogen (Korea) para secuenciar los fragmentos que codifica para las regiones ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') previamente reportadas por (Lucero Rincón *et al.*, 2023) y facilitar el análisis de la identidad de los hongos. Los datos de las secuencias se analizaron con la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Las secuencias fueron sometidas y depositadas en el Banco de secuencias (GenBank, National Center for Biotechnology Information – NCBI).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de la morfología de los hongos recolectados, con el fin de buscar la mayor aproximación descrita para el género de *Trametes* sp. Posteriormente, en el ensayo para determinar la capacidad de los hongos recolectados, para tolerar diferentes concentraciones de mercurio en medio sólido, se realizó un análisis ANOVA de una sola vía (nivel de confianza del 95%) para identificar el efecto en el crecimiento del hongo por cada concentración del metal en un tiempo determinado. Posteriormente, un análisis de medias (Prueba Tukey) entre los valores registrados del crecimiento micelial, permitió determinar el efecto de la concentración del metal sobre el desarrollo de cada hongo, y cual de las concentraciones del metal tuvo menor afectación sobre el desarrollo del micelio, determinando así su tolerancia. A partir de este ensayo se seleccionó el o los hongos más tolerantes para el siguiente experimento. Por último, para el ensayo de remoción del metal en medio acuoso, se utilizaron los hongos más tolerantes, se analizaron diferentes puntos en el tiempo, para determinar la cantidad de mercurio en el medio, y en el punto final, se realizó un análisis ANOVA de una sola vía (nivel de confianza del 95%), con la finalidad de determinar cuál de los hongos presentó una mayor remoción de Hg^{2+} , posterior a 14 días de exposición. Para todos los casos, el cumplimiento de los supuestos de homocedasticidad y normalidad confirmaron el análisis de los datos por pruebas paramétricas. Los datos fueron analizados con Python 3.10 (Garrote, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recolección de muestras e identificación morfológica

Ocho hongos fueron recolectados en campo, los cuales fueron seleccionados de acuerdo con la morfología descrita y compatible con las principales características morfológicas seleccionadas por revisión teórica (ver Tabla 1), lo cual permitió agrupar los hongos de acuerdo a la forma de su cuerpo fructífero: forma semicircular o en abanico, con una superficie porosa y de textura coriácea; algunas especies pueden presentar colores brillantes como el blanco, beige, café, marrón y café claro como lo describe (Tišma et al., 2021) (ver Figura 1). A nivel de laboratorio, el análisis morfológico en diferentes medios de cultivo, permitió identificar al sustrato papa - zanahoria - azúcar morena como el mejor medio donde se observó el desarrollo miceliar característico del género *Trametes* descrito por (Torreggiani et al., 2023), el cual se caracteriza por poseer en principio un crecimiento circular, micelio algodonoso y de color blanco a beige. Este medio permitió la obtención de los resultados ya descritos debido a la alta carga de carbohidratos, minerales, y otros nutrientes que posee, permitiendo el desarrollo de micelio algodonoso de manera más rápida y efectiva. De acuerdo con los hallazgos, los aislamientos C, D, G y H fueron seleccionados por presentar similitudes con las características descritas para el hongo del género *Trametes* sp., descritas anteriormente (ver Figura 1 y Tabla 1). En el caso del hongo H, posterior a 8 días de incubación, el micelio presentó un cambio en la coloración, con una tonalidad grisácea más pronunciada. Todos los ensayos a partir de este momento, fueron realizados con el sustrato sustrato papa - zanahoria - panela (PDZPA).

Estudios previos han determinado que los hongos pertenecientes al género *Trametes* crecen satisfactoriamente en muchos tipos de hábitats en el mundo, pero se observa una mayor proliferación de este hongo en zonas arbóreas, templadas y húmedas debido a su abundancia en todo tipo de sustratos como madera, la cual le permite un mejor crecimiento (Torreggiani et al., 2023). Los lugares de muestreo, cumplieron con la característica de ser húmedos, y poseer ramas de árboles viejas, lo cual ayudaría en gran manera su proliferación (Tišma et al., 2021). Los diferentes hongos fueron sometidos a claves dicotómicas para poder seleccionar los hongos que cumplieran con las características asociadas al género *Trametes*, donde se incluyó el análisis del carpóforo, el desarrollo de micelio en medio sólido *in vitro*, y también, se observaron diferentes estructuras en el microscopio (Arce-torres et al., 2020). A partir de lo anterior, cuatro hongos C, D, G y H presentaron las características del género *Trametes* sp., en los cuales se logró evidenciar que su sistema hifal es trimítico, con hifas generativas hialinas y fibuladas; las hifas esqueléticas identificadas se describieron rectas, de pared gruesa, pudiéndose observar claramente las fíbulas desarrolladas, características relacionadas al género de estudio (Habtemariam, 2020).

Ensayo en medio sólido con diferentes concentraciones de mercurio

De los cuatro aislamientos expuestos en las diferentes concentraciones (desde 15 hasta 500 mg/L), ninguno desarrolló micelio en los medios suplementados con 300 mg/L y 500 mg/L de mercurio, por lo tanto, solo se analizaron los resultados obtenidos en las concentraciones 15, 50, 100 y 200 mg/L. Cabe resaltar que el aislamiento D, aunque creció, presentó mayor inhibición a medida que la cantidad de mercurio aumento en el me-

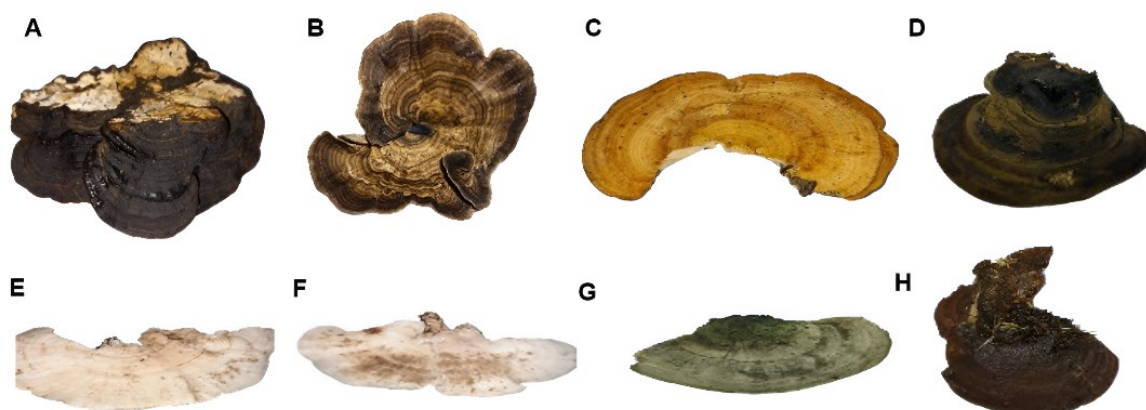


Figura 1. Representación gráfica de hongos recolectados en campo. (A, B, C y D) Colecta en Río claro- Antioquia (5° 35'20.8"N 75°51'55.9"W); (E y F) Colecta de San Pablo adentro - Chocó (5°11'48.7"N 76°39'58.3"W); (G y H) Colecta en Medellín- Antioquia (6°16'03.1"N 75°36'02.1"W). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 1. Descripción de las características morfológicas para hongos recolectados, relacionadas a las reportadas para el género *Trametes* sp.

Características descriptivas del hongo <i>Trametes</i> sp.				
Código Hongo	Crecimiento radial	Micelio blanco y algodonoso	Esporas ovaladas y transparentes	Hifas trimíticas con presencia de fíbulas
A	-	+	-	-
B	-	-	-	-
C	+	+	+	+
D	+	+	+	+
E	+	-	-	-
F	+	-	-	-
G	+	+	+	+
H	+	+	+	+

dio, en comparación con los demás aislamientos. Se identificó una diferencia estadísticamente significativa en cada concentración del metal al que fueron expuestos los hongos, con relación al desarrollo del micelio en el medio. El análisis de diferencia de medias, por el Test de Tukey, permitió identificar que los aislamientos C, G y H fueron los que presentaron mayor tolerancia a las diferentes concentraciones del metal, los aislamientos desarrollaron micelio en todas las concentraciones, siendo la

concentración de 200 mg/L en la que se presentó mayor inhibición en el desarrollo del micelio (ver figura 2). Cabe resaltar que el desarrollo del micelio en caja de los hongos G y H, presentaron mayor abundancia y homogeneidad a medida que la concentración del metal aumento en el medio.

Adicionalmente, la prueba de Tukey (nivel de confianza del 95%), determinó que el crecimiento radial más esta-

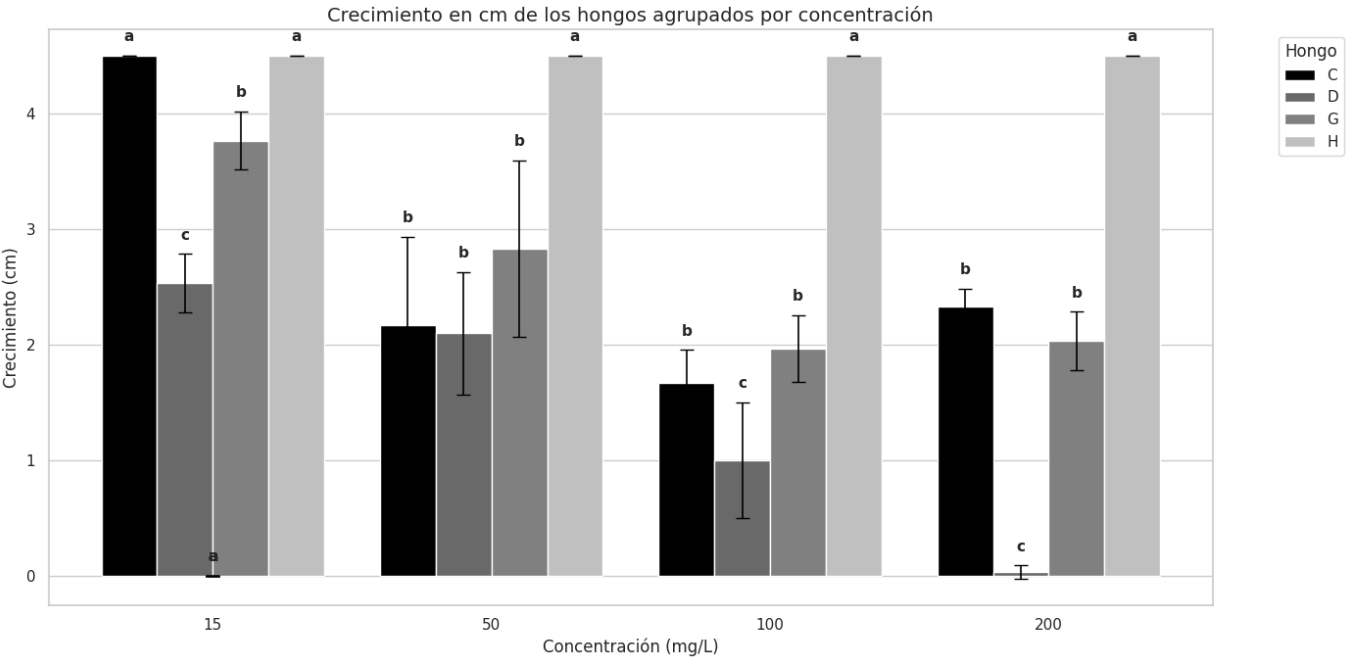


Figura 2. Comportamiento de cuatro hongos seleccionados, en medio PDZPA suplementado con diferentes concentraciones de mercurio. Las letras diferentes en cada concentración, se refieren al efecto de la concentración del metal sobre el desarrollo del micelio.

ble para todos los hongos se presentó en la concentración de 15 mg/L para todos los aislamientos, por lo tanto, el siguiente ensayo se realizó en esa concentración.

La concentración de 15 mg/L fue la que promovió el mayor desarrollo micelial. Sin embargo, en la mayoría de los hongos, a medida que la concentración del metal aumentó, el desarrollo del micelio disminuyó. Este fenómeno podría estar relacionado con la alta toxicidad del mercurio en los organismos vivos, siendo uno de los efectos más notables la peroxidación lipídica, que induce trastornos metabólicos, lo cual, a su vez, reduce la producción de biomasa y afecta negativamente al desarrollo y crecimiento micelial (Ghosh *et al.*, 2023). Además, se observó desde el inicio un desarrollo micelial ralentizado, seguido de un crecimiento normal a medida que transcurrían los días. Este comportamiento podría explicarse como un proceso de adaptación a la presencia del mercurio en el medio, lo que demuestra la capacidad de los hongos para tolerar la presencia de este metal.

Los hongos de la podredumbre blanca poseen una notable capacidad para tolerar la toxicidad de iones metálicos, incluso después de haberlos asimilado en su sistema. Esta adaptación ha sido documentada por estudios como el de Priyadarshini y colaboradores (Priyadarshini *et al.*, 2021), donde se demostró que *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma lucidum* toleraron concentraciones de 20 a 50 mg/L. Dicho estudio también reportó desarrollo

micelial en una concentración superior de 330 mg/L durante 20 días, subrayando así el potencial de este grupo de hongos. Enayatizmir y colaboradores también identificaron que hongos del género *Trametes* en concentraciones por encima de 200 mg/L de metales como Níquel (Ni) y plomo (Pb), inhiben el crecimiento de este material fúngico (Enayatizmir *et al.*, 2020).

Ensayo para el análisis de la remoción de mercurio en solución acuosa

La figura 3 muestra el comportamiento de la cantidad de metal detectada en medio líquido contaminado con mercurio (15 mg/L), tratado con los hongos G y H durante 14 días. En el caso del hongo G, se puede observar que posterior a 48 horas de exposición del hongo en el medio, se detectó una disminución media de 0.63 mg/L de mercurio. Al término del tratamiento, el medio expuesto con el hongo G, disminuyó hasta 2.40 mg/L la cantidad de mercurio en el medio, con relación a su concentración inicial. Respecto al hongo H, se puede observar que posterior a 48 horas de exposición del hongo en el medio, hubo una disminución media de 1.35 mg/L de la concentración de mercurio. Al finalizar el ensayo, se evidenció una disminución media final de 2.54 mg/L a los 14 días de tratamiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la disminución de la concentración de mercurio entre los dos hongos utilizados ($p > 0.05$), durante el tiempo final de exposición, por tanto, se identifica que ambos hongos

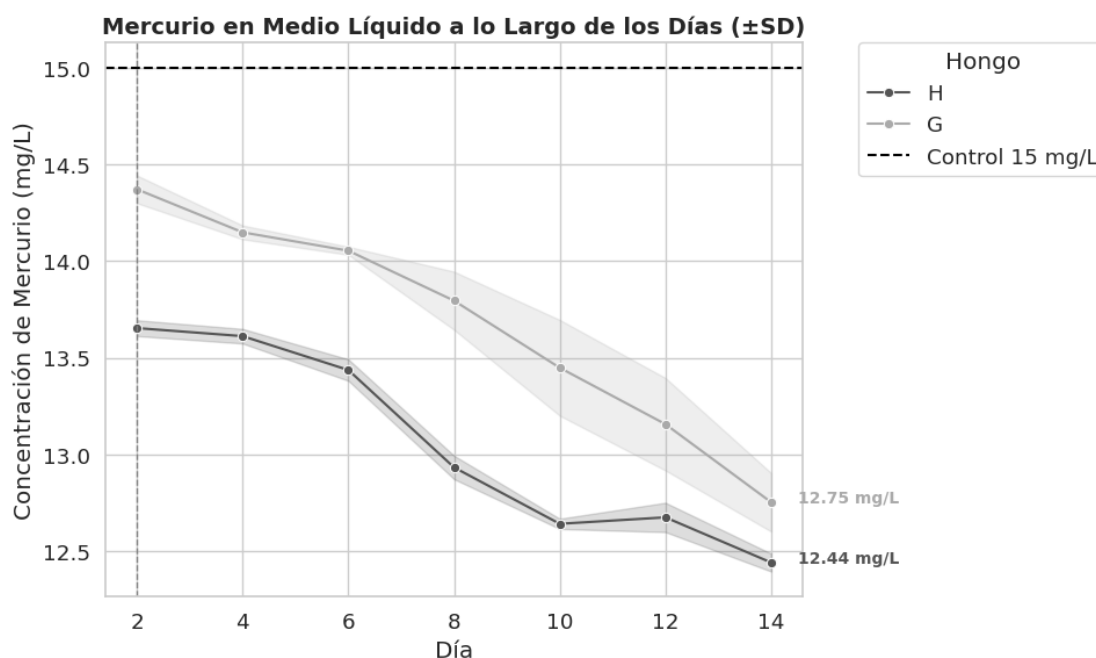


Figura 3. Comportamiento de la cantidad de mercurio en medios acuosos tratados con hongos H y G, para determinar la capacidad de remoción.

poseen la una capacidad media para remover aproximadamente un 17% el mercurio en medio acuoso. Cabe resaltar que en el medio de cultivo donde se adicionó el mercurio, sin adición de material fúngico, la cantidad del metal no se modificó durante el tiempo de incubación.

Las directrices de la OMS recomiendan una concentración máxima de Hg inorgánico de 6 µg/L en agua potable y establecen una ingesta diaria tolerable de Hg inorgánico de 2 µg/kg de peso corporal (OMS, 2017), valores que se encuentran por encima de las antes mencionadas, y se consideran tóxicos para un organismo vivo. Para el caso de los hongos, se ha evidenciado que estos tienen suficientes estrategias para sobrevivir en presencia de metales pesados, entre ellas se describen mecanismos tales como: la unión de iones metálicos a grupos funcionales de alta afinidad presentes en el hongo, acumulación de metales en la biomasa, complejación con diferentes biomoléculas microbianas y eflujo activo o exclusión de metales (Beltrán-Flores *et al.*, 2022). Por ejemplo, *Penicillium* spp. DC-F11, una cepa de hongo aislada de un área minera, mostró un potencial de biorremediación en suelos contaminados con mercurio mediante volatilización, disminuyendo este metal hasta en un 85% (Chang *et al.*, 2020).

Por otro lado, especies como *Penicillium* spp. han demostrado la capacidad de remover hasta 60 mg/L de mercurio (Hg) en medio sólido. Asimismo, se ha reportado un alto potencial de biosorción en especies como *Fusarium oxysporum*, *Sarocladium kiliense*, *Didymella glomerata*, *Phoma costaricensis* y *Cladosporium* sp., las cuales han alcanzado valores de remoción de hasta 54,9 mg/g (Văcar *et al.*, 2021).

Para el caso específico de hongos basidiomicetos, particularmente los que causan la podredumbre blanca, exhiben una notable capacidad para la remoción de metales pesados. Este proceso se atribuye principalmente a la composición proteica de su pared celular, la cual facilita que los iones metálicos se adhieran a la superficie fúngica mediante diversas uniones moleculares (L. Chen *et al.*, 2022).

Entre los mecanismos más reportados para proceso de remoción de metales, la biosorción es uno de ellos, considerado tanto mecanismo de tolerancia, como de remoción, empleado por una amplia diversidad de hongos. Particularmente, el género *Trametes* spp., perteneciente a los hongos basidiomicetos, ha sido ampliamente documentado en la literatura científica por su destacada capacidad en procesos de biorremediación. Su sistema enzimático ligninolítico, especialmente el uso de lacasas y peroxidasas, le confiere un alto potencial para la degradación de compuestos recalcitrantes y la inmoviliza-

ción o transformación de contaminantes inorgánicos, posicionándolo como un agente fúngico eficaz en la mitigación de diversos contaminantes ambientales (Beltrán-Flores *et al.*, 2022; Tišma *et al.*, 2021). Estudios reportan la remoción de hasta 400 mg/L de Cu utilizando *Trametes versicolor* (Upadhyay *et al.*, 2023). Por otro lado, la investigación de Bayramoğlu y colaboradores (Bayramoğlu *et al.*, 2003) demostró que *Trametes versicolor* posee la habilidad de remover hasta el 73% del metal respecto a la cantidad del compuesto inicial, resultado que dependió de la inmovilización del material fúngico desactivado por calor, y de esta manera se demostró la eficiencia en el proceso de biorremediación del metal. De acuerdo a estos hallazgos, se resalta que un pretratamiento de la masa fúngica, tanto si es obtener biomasa inactiva e inmovilizada, podría favorecer los tratamientos de remoción de metales en medios acuosos. Es importante resaltar que en otros estudios como los reportados por Tang y colaboradores, identificaron que, a la hora de evaluar la remoción de metales en medios acuosos, procesos como la inmovilización en perlas de carboximetilcelulosa, la inactivación por calor, entre otros (Tang *et al.*, 2024; Mathur & Gehlot, 2021), son diferentes metodologías que favorecen una mayor efectividad, en especial, para la remoción de mercurio (Hg). En este estudio, se encontró que hongos basidiomicetos, entre ellos, el género *Trametes* sp., tiene la capacidad para remover mercurio en medios acuosos, utilizando biomasa viva sin pretratamiento del micelio, logrando una remoción del 17%. Cabe resaltar que los hongos provienen de ambientes sin antecedentes de contaminación con metales pesados, razón por la cual, se evidencia un alto potencial para proyectar la actividad del hongo y optimizar su capacidad como material promisorio dentro del grupo de basidiomicetos para la biorremediación de metales pesados.

Identificación molecular

El análisis de las regiones ITS de los hongos G y H permitió establecer su identidad taxonómica. El hongo G mostró un 99,66 % de similitud con especies del género *Trametes* sp., mientras que el hongo H presentó un 99,13 % de similitud con *Endomelanconiopsis* sp. Las secuencias nucleotídicas obtenidas en este estudio fueron depositadas en el GenBank del NCBI, bajo los códigos de acceso PQ221215 y PQ252684, respectivamente.

Durante el ensayo de biorremediación, ambos aislados fúngicos demostraron una capacidad relevante para remover mercurio del medio líquido. Material fúngico asociado al género *Trametes* spp. ha sido reportado en estudios para la remoción de diferentes metales, entre ellos cadmio (Cd), plomo (Pb), Níquel (Ni), entre otros. Por ejemplo, Enayatizamir y colaboradores repor-

tan a *Trametes pubescence* con capacidad para crecer y remover Pb y Ni, tanto por mecanismos de biosorción con biomasa viva y muerta, removiendo más del 90% con biomasa seca durante 14 días de exposición (Enayatizamir et al., 2020); su estudio resalta la capacidad de los grupos funcionales intracelulares para la remoción de metales pesados, sin alterar su capacidad para la síntesis de enzimas como la lacasa. Por su parte, no se encontraron estudios donde utilicen aislamientos de *Endomelanconiosis* en procesos de biorremediación, pero si para aprovechar la producción de enzimas como las lipasas, y posterior uso para la producción de biodiesel a partir de aceites de desechos (Rodrigues et al., 2024), lo que permite identificar la capacidad metabólica de este aislamiento y su respuesta a diferentes ambientes. Para ninguno de los hongos se encontraron estudios donde analicen el comportamiento de estos en presencia de mercurio y su potencial uso en proceso de bioremediación. Estos hallazgos se alinean con reportes recientes en la literatura que evidencian la eficacia de ciertos hongos utilizados para la eliminación de compuestos mercuriales. Por ejemplo, *Metarhizium* spp. logró remover eficientemente MeHg y Hg²⁺ (0,5 mg/L) en agua dulce en tan solo 48 horas (C. Wu et al., 2022), mientras que *Mucor hiemalis* alcanzó tasas de remoción superiores al 81 % y hasta el 99 % (Ghosh et al., 2023). En este contexto, los aislamientos nativos estudiados podrían representar una alternativa biotecnológica prometedora para la remediación de ambientes contaminados con mercurio.

CONCLUSIÓN

La recolección del material biológico correspondiente a hongos basidiomicetos, permitió identificar diferencias entre ellos, los cuales presentaron una capacidad de respuesta diferente en exposición a mercurio hasta en concentraciones cercanas a 200 mg/L en medios sólidos. Un hongo identificado dentro del género *Trametes* creció en un medio acuoso contaminado con mercurio, y removió hasta el 17%, utilizando biomasa viva. Se requieren más estudios que permitan precisar el mecanismo por el cual este hongo, como biomasa viva, interactúa con el mercurio para disminuir su cantidad en medios acuosos, y definir la cantidad que puede llegar a remover en diferentes condiciones ambientales, inclusive si esta biomasa fuera pretratada. De esta manera, se establece que el hongo tiene capacidad para remover mercurio, y que este podría ser utilizado como parte del mecanismo que asiste la remoción de metales pesados, mejorar el rendimiento, por medio de su inmovilización. Este estudio aporta conocimientos iniciales para utilizar una alternativa de origen biológico en la remoción de mercurio, un metal altamente tóxico, utilizando el hongo

Trametes sp. que crece fácilmente en sustratos de bajo costo, considerando este una alternativa sustentable, amigable para el ambiente, y de alto impacto para disminuir la diseminación ambiental del metal. Se cuentan con reportes de alto valor relacionados al género *Trametes* sp., que ha sido objeto de estudio en diferentes ensayos utilizando biomasa viva o muerta en procesos asistidos para la remoción de metales pesados como el cadmio, níquel, plomo, y este estudio demuestra que el mercurio es uno más de los metales pesados que puede biorremediar.

AGRADECIMIENTOS

Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, financiador del proyecto por Convocatoria Interna 2020, Grupo de investigación Biociencias y semillero SIFACS de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, y al Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET), UdeA.

REFERENCIAS

- Arce-torres, L. F., Gómez-díaz, I., Monge-artavia, M., & Prado-cordero, J. (2020). *Metabolitos secundarios con actividad medicinal extraídos de hongos provenientes de Centroamérica Secondary metabolites with medicinal activity extracted from fungi found in Central America*. 33, 80–89.
- Arica, M. Y., Arpa, Ç., Kaya, B., Bektaş, S., Denizli, A., & Genç, Ö. (2003). Comparative biosorption of mercuric ions from aquatic systems by immobilized live and heat-inactivated *Trametes versicolor* and *Pleurotus sajor-caju*. *Bioresource Technology*, 89(2), 145–154. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00042-7)
- Bayramoğlu, G., Bektaş, S., & Arica, M. Y. (2003). Biosorption of heavy metal ions on immobilized white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00178-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00178-X)
- Beltrán-Flores, E., Pla-Ferriol, M., Martínez-Alonso, M., Gaju, N., Blánquez, P., & Sarrà, M. (2022). Fungal bioremediation of agricultural wastewater in a long-term treatment: biomass stabilization by immobilization strategy. *Journal of Hazardous Materials*, 439. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129614>
- Chang, J., Shi, Y., Si, G., Yang, Q., Dong, J., & Chen, J. (2020). The bioremediation potentials and mercury (II)-resistant mechanisms of a novel fungus *Penicillium* spp. DC-F11 isolated from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 396. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122638>
- Chen, L., Zhang, X., Zhang, M., Zhu, Y., & Zhuo, R. (2022). Removal of heavy-metal pollutants by white rot fungi: Mechanisms, achievements, and perspectives.

- ves. *Journal of Cleaner Production*, 354, 131681. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.131681>
- Chen, N., Chen, S. W., Qiu, S. Y., Lu, S. M., Wei, J. R., Yang, F. W., Geng, H. C., & Zhou, M. (2023). Ganodermasides E-H, four new ergosterol derivatives from the endophytic fungus *Epicoccum poae* DJ-F associated with *Euphorbia royleana*. *Fitoterapia*, 168. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105562>
- Enayatizamir, N., Liu, J., Wang, L., Lin, X., & Fu, P. (2020). Coupling Laccase production from *Trametes pubescens* with heavy metal removal for Economic Waste Water Treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101357>
- Firincă, C., Zamfir, L. G., Constantin, M., Răut, I., Capră, L., Popa, D., Jinga, M. L., Baroi, A. M., Fierăscu, R. C., Corneli, N. O., Postolache, C., Doni, M., Gurban, A. M., Jecu, L., & Şesan, T. E. (2024). Microbial Removal of Heavy Metals from Contaminated Environments Using Metal-Resistant Indigenous Strains. *Journal of Xenobiotics*, 14(1), 51–78. <https://doi.org/10.3390/jox14010004>
- Garrote, M. F. (2020). Use of microorganisms as bioremediators of textile effluents contaminated by azo dyes. *Universidade Da Coruña*, 1–17.
- Ghosh, S., Rusyn, I., Dmytruk, O. V., Dmytruk, K. V., Onyeaka, H., Gryzenhout, M., & Gafforov, Y. (2023). Filamentous fungi for sustainable remediation of pharmaceutical compounds, heavy metal and oil hydrocarbons. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2023.1106973/FULL>
- Habtemariam, S. (2020). *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: Targets and efficacy. In *Biomedicines* (Vol. 8, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8050135>
- Hernández-Sáenz, D., Puentes-Morales, C. S., Mateus-Maldonado, J. F., Pedroza-Camacho, L. D., Ramírez-Rodríguez, J., Rivera-Hoyos, C. M., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2020). Evaluación del consorcio entre *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y bacterias aeróbicas para remoción de colorantes sintéticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 45–59. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.82735>
- Krupodorova, T. A., Barshteyn, V. Y., & Sekan, A. S. (2021). Review of the basic cultivation conditions influence on the growth of basidiomycetes. *Current Research in Environmental and Applied Mycology*, 11, 494–531. <https://doi.org/10.5943/CREAM/11/1/34>
- Kumar, A., Yadav, A. N., Mondal, R., Kour, D., Subrahmanyam, G., Shabnam, A. A., Khan, S. A., Yadav, K. K., Sharma, G. K., Cabral-Pinto, M., Fagodiya, R. K., Gupta, D. K., Hota, S., & Malyan, S. K. (2021). Mycoremediation: A mechanistic understanding of contaminants alleviation from natural environment and future prospect. In *Chemosphere*, Vol. 284. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131325>
- Lizarazo, M. F., Herrera, C. D., Celis, C. A., Pombo, L. M., Teherán, A. A., Piñeros, L. G., Forero, S. P., Velandía, J. R., Díaz, F. E., Andrade, W. A., & Rodríguez, O. E. (2020). Contamination of staple crops by heavy metals in Sibaté, Colombia. *Heliyon*, 6(7). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2020.E04212>
- Londoño, P. (2020). Biorremediación como estrategia para la recuperación de suelos mineros contaminados con mercurio, cadmio y plomo (Hg, Cd, Pb). In *Universidad de Córdoba, Facultad de ciencias básicas, Departamento de química, programa de química*.
- Lucero Rincón, C. H., Peña Salamanca, E. J., Cantera Kintz, J. R., Lizcano, O. V., Cruz-Quintana, Y., & Neira, R. (2023). Assessment of mercury and lead contamination using the bivalve *Anadara tuberculosa* (Arcidae) in an estuary of the Colombian Pacific. *Marine Pollution Bulletin*, 187. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2022.114519>
- Mathur, M., & Gehlot, P. (2021). Mechanistic evaluation of bioremediation properties of fungi. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Recent Advances in Application of Fungi and Fungal Metabolites: Current Aspects*, 267–286. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821005-5.00020-X>
- Meyer, L., Guyot, S., Chalot, M., & Capelli, N. (2023). The potential of microorganisms as biomonitoring and bioremediation tools for mercury-contaminated soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115185>
- Molina, D. A. R., Vargas, J. H. L., Gutierrez, J. A. B., Gallo-Ortiz, A., & Duarte-Correa, Y. (2021). Residues of veterinary drugs and heavy metals in bovine meat from Urabá (Antioquia, Colombia), a promising step forward towards international commercialization. *Veterinary and Animal Science*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100192>
- Priyadarshini, E., Priyadarshini, S. S., Cousins, B. G., & Pradhan, N. (2021). Metal-Fungus interaction: Review on cellular processes underlying heavy metal detoxification and synthesis of metal nanoparticles. In *Chemosphere* (Vol. 274). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129976>
- Rodrigues, J. G. C., Cardoso, F. V., Duvoisin Junior, S., Machado, N. T., & Albuquerque, P. M. (2024). Endomelanconiopsis endophytica Lipase Immobilized in Calcium Alginate for Production of Biodiesel from Waste Cooking Oil. *Energies*, 17(22). <https://doi.org/10.3390/en17225520>
- Sarria-Villa, R. A., Gallo-Corredor, J. S., & Benítez-Benítez, R. (2020). Tecnologías para remover metales pesados presentes en aguas. Caso Cromo y Mercurio.

- Journal de Ciencia e Ingeniería*, 12(1), 94–109. <https://doi.org/10.46571/JCI.2020.1.8>
- Tang, H., Xiang, G., Xiao, W., Yang, Z., & Zhao, B. (2024). Microbial mediated remediation of heavy metals toxicity: mechanisms and future prospects. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1420408>
- Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Šelo, G., Tolj, I., Šperanda, M., Bucić-Kojić, A., & Planinić, M. (2021). *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 330. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.124997>
- Torreggiani, A., Beccaccioli, M., Verni, M., Cecchetti, V., Minisci, A., Reverberi, M., Pontonio, E., & Rizzello, C. G. (2023). Combined use of *Trametes versicolor* extract and sourdough fermentation to extend the microbiological shelf-life of baked goods. *LWT*, 189. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115467>
- Upadhyay, S. K., Rani, N., Kumar, V., Mythili, R., & Jain, D. (2023). A review on simultaneous heavy metal removal and organo-contaminants degradation by potential microbes: Current findings and future outlook. In *Microbiological Research* (Vol. 273). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127419>
- Văcar, C. L., Covaci, E., Chakraborty, S., Li, B., Weindorf, D. C., Frențiu, T., Părvu, M., & Podar, D. (2021). Heavy metal-resistant filamentous fungi as potential mercury bioremediators. *Journal of Fungi*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/jof7050386>
- Wu, C., Tang, D., Dai, J., Tang, X., Bao, Y., Ning, J., Zhen, Q., Song, H., St. Leger, R. J., & Fang, W. (2022). Bio-remediation of mercury-polluted soil and water by the plant symbiotic fungus *Metarhizium robertsii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(47). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2214513119>
- Wu, Z., Sun, M., & Zou, L. (2015). *Colorimetric Detection of Mercury in Aqueous Media Based on Reaction with Dithizone*. 111–116. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48354-2_11i

Desescalado del proceso de fermentación de la proteína recombinante sL22 a un biorreactor de 50 L

Scale down of the fermentation process of sL22 recombinant protein in a 50 L bioreactor

*Roberto Rafael Núñez Ortiz **, *Jennifer de la Caridad Quesada Rodríguez***,
*José Antonio Fernández de la Vega Velázquez****, *María Caridad Duarte Castro*****
*Julio César Dustet Mendoza******

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.116793

RESUMEN

Los estudios de un proceso a escala de producción no son económicamente factibles, por tanto, el desarrollo de modelos a pequeña escala que representen el desempeño del proceso de la escala comercial es esencial para lograr una caracterización robusta y un mejor entendimiento de este. En el Centro de Inmunología Molecular (CIM) se obtiene la proteína recombinante sL22 a partir del cultivo a escala comercial de la línea celular NS0. Con el objetivo de evaluar nuevas condiciones en el proceso para su optimización, en la presente investigación se desarrolla un modelo de desescalado de un biorreactor de 50 L que opera en modo continuo desde un biorreactor comercial de 2 000 L que opera en modo perfusión. Se seleccionan como criterios mantener constante el tiempo de mezclado y el coeficiente de transferencia de masa entre ambas escalas. Se realizan tres corridas experimentales y se evalúa el desempeño del cultivo celular a partir de los parámetros cinéticos y del estrés hidrodinámico aportado por las condiciones operacionales propuestas de velocidad de agitación de 100 min^{-1} y un flujo de aire por unidad de volumen de $0,0017 \text{ min}^{-1}$; que implicó operar una potencia por unidad de volumen inferior de los valores que provocan daño celular. El tamaño de los remolinos que genera esta condición de agitación es superior al diámetro de las células de mamíferos, condición que no tiene impacto en el daño celular. La zona de operación permitió una alta viabilidad celular y parámetros cinéticos típicos de las células de mamíferos.

Palabras claves: cultivos celulares; reactor biológico; hidrodinámica; escalado.

ABSTRACT

Studies of a production-scale process are not economically feasible; therefore, the development of small-scale models that represent the performance of the commercial-scale process is essential to achieve a robust characterization and a better understanding of it. At the Center for Molecular Immunology (CIM), recombinant sL22 protein is obtained from

* MSc. Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0009-8714-9644>; robertikinnunez95@gmail.com (Autor de correspondencia)

** MSc. Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0002-5075-3759>

*** MSc. Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0004-5726-7440>

**** MSc. Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba; <https://orcid.org/0009-0006-2984-8592>

***** PhD. Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, Cuba; <https://orcid.org/0000-0002-2044-0383>

commercial-scale culture of the NS0 cell line. In order to evaluate new conditions in the process for its optimization, a model of scale down of a 50 L bioreactor operating in continuous mode from a commercial 2 000 L bioreactor operating in perfusion mode is developed in the present investigation. The mixing time and mass transfer coefficient between the two scales are selected as criteria to be kept constant. Three experimental runs were performed, and the performance of the cell culture was evaluated from the kinetic parameters and the hydrodynamic stress provided by the proposed operational conditions of agitation speed of 100 min⁻¹ and an air flow per unit volume of 0.0017 min⁻¹. These implied operating a power per unit volume lower than the values that cause cell damage. The size of the eddies generated by this agitation condition is larger than the diameter of mammalian cells, a condition that has no impact on cell damage. The zone of operation allowed for a high level of cell viability and kinetic parameters that are typical of mammalian cells. It was found that the operational zone facilitated elevated levels of cell viability and kinetic parameters that are characteristic of mammalian cells.

Keywords: cell culture; biological reactor; hydrodynamics; scaling.

Recibido: noviembre 23 de 2024

Aprobado: 25 de octubre de 2025

INTRODUCCIÓN

El cultivo de células animales constituye una de las ramas de la biotecnología de gran interés en los últimos años; originalmente se desarrolló para la producción de vacunas virales y un número limitado de proteínas naturales. Este tipo de cultivo es una tecnología cara, pero única en el sentido que las proteínas que se obtienen a partir de ella no pueden ser sintetizadas por otros organismos más simples, debido a los requerimientos de glicosilación que necesitan muchas proteínas para ser biológicamente activas (Zhang, 2020). Las células de animales son los hospederos por excelencia para más del 70 % de los productos farmacéuticos en el mercado.

El desarrollo de un proceso productivo implica varias etapas que van desde la identificación de la cepa productora del producto de interés, su mejora, la optimización del proceso y el escalado del mismo. Una vez establecido a escala comercial, continúa la caracterización del mismo para comprenderlo en detalle, estudiar la relación entre los parámetros claves de operación y el rendimiento, así como los atributos de calidad del producto final.

Uno de los aspectos más difíciles de caracterizar es la hidrodinámica de los sistemas y la interacción de esta con los mecanismos de transferencia en la escala de producción. Existen dos maneras de resolver los problemas que surgen durante los procesos de escalado:

- Adquirir más conocimientos sobre la hidrodinámica y la interacción con otros mecanismos para obtener una descripción completa de lo que ocurre en el interior de los biorreactores a gran escala.
- Desarrollar procedimientos de escalado que proporcionen una estimación adecuada del rendimiento de los biorreactores a escala de producción basándose en investigaciones a pequeña escala.

El primero de estos métodos no es factible en la práctica debido a los elevados costos operacionales y la limitada disponibilidad de biorreactores a gran escala para la experimentación; por esta razón se utilizan por lo general los modelos de desescalado. Existen diversos métodos para realizar estos estudios, cada uno con sus ventajas y desventajas; entre los que se pueden destacar: Regla del pulgar, tanteo y error y a partir de la modelación matemática (Hall, 2017).

El modo de operación continuo es ampliamente utilizado para la caracterización de cultivos celulares (Tang *et al.*, 2020; Castilho *et al.*, 2008), en la determinación e identificación de variables cinéticas y estequiométricas. En este modo no se alcanzan altas concentraciones celulares como en la perfusión, y no se puede operar a velocidades de dilución por encima de la velocidad específica de crecimiento. Es de gran utilidad en el estudio de factores ambientales y físicos en el desempeño del cultivo celular, debido a la capacidad de establecer estados estacionarios por tiempos elevados de operación, a diferencia de los cultivos discontinuos. La influencia de estos factores puede ser fácilmente estudiada en estos sistemas (González Álvarez, 2024; Castilho *et al.*, 2008). En algunos casos se ha empleado como modelo para el estudio de fermentaciones a escala industrial en modo perfusión. González Álvarez (2024), obtuvo un modelo matemático a partir de una relación lineal entre la velocidad específica de perfusión por célula (CSPR) y la velocidad específica de crecimiento (μ) en el estado pseudoestacionario (ee) para determinar la zona de operación estable y condiciones de mayor productividad en los cultivos de las líneas celulares NS0 y CHO en un biorreactor de 1 500 L que opera en modo perfusión. Para ello desarrolló corridas a escala de 80 L en modo continuo y obtuvo que, al operar al mismo valor de velocidad específica de crecimiento en el estado pseudoestacionario, obtiene el mismo valor de velocidad específica de

perfusión por célula que en el biorreactor de 1 500 L, con un error inferior al 20 %. El autor usó el modelo de 80 L para determinar el valor de CSPR mínimo que puede mantenerse en el cultivo en el estado estacionario con un valor de alta viabilidad para lograr el mismo resultado en el biorreactor de la escala comercial.

En Cuba, la única institución que realiza el cultivo de células animales a escala industrial es el Centro de Inmunología Molecular, dirigido principalmente a la investigación básica, desarrollo y fabricación de productos novedosos para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades autoinmunes. En un biorreactor tipo tanque agitado a escala comercial se obtienen dos proteínas recombinantes, la sL22 empleada en la formulación de un Ingre-diente Farmacéutico Activo contra diferentes tipos de cáncer y la proteína recombinante rC21, materia prima biológica empleada en la formulación de una vacuna viral (Quesada-Rodríguez *et al.*, 2025). Ambos productos se obtienen a partir del cultivo de las líneas celulares NS0 y CHO-K1, respectivamente, bajo similares condiciones de operación. En los últimos años se ha hecho necesario la evaluación de nuevas condiciones en el proceso de fermentación para el desarrollo y optimización del mismo. Para ello es preciso realizar diferentes experimentos de forma tal que se reproduzca el proceso con la mayor similitud posible. Es importante tener en cuenta aspectos como la transferencia de oxígeno, el daño por estrés, así como otros factores hidrodinámicos. Por ello el objetivo de la presente investigación es obtener un modelo de desescalado, tomando como referencia el proceso de fermentación de la proteína recombinante sL22. Los resultados de la presente investigación constituirían una valiosa herramienta para la optimización de ambos procesos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Línea celular

La línea celular empleada fue NS0, un mieloma murino transfectado con el gen que codifica para la proteína recombinante sL22. Se empleó el medio de cultivo comercial libre de proteínas y de suero animal, M1 similar al utilizado por (Boggiano-Ayo *et al.*, 2023).

Biorreactores

La experimentación se desarrolló en un biorreactor de producción comercial, que tiene un volumen de trabajo de 2 000 L (*Bioengineering AG*; Suiza), cuyo diámetro (D_T) es de 1,28 m y la altura del líquido (H_L) es de 1,66 m. Este cuenta con dos impelentes acoplados al mismo eje, una turbina Rushton de seis paletas (impelente inferior) y una propela marina con tres aspas (impelente superior) ambos con un diámetro (D_i) de 0,45 m. Ade-

más, se empleó un biorreactor de 50 L de volumen efectivo (*Bioengineering AG*; Suiza) con igual cantidad y disposición de los impelentes y cuyas dimensiones son: $D_T = 0,39$ m; $D_i = 0,15$ m y $H_L = 0,44$ m.

En ambos biorreactores la temperatura se controló en $36,50 \pm 0,50$ °C, mediante un sistema de dos intercambiadores de calor de placas que enfrían o calientan el volumen de agua contenido en la chaqueta. Además, se alimentó una corriente de aire para mantener una presión constante en los biorreactores. Los niveles de oxígeno disuelto en los cultivos celulares por lo general se controlan entre el 20 y 100 % de saturación de aire; en particular en las corridas en cuestión se alimentó una mezcla de oxígeno y aire a través del distribuidor de gases para que este valor se mantuviera alrededor del 50 %. El biorreactor de 2 000 L presenta un distribuidor de gases con diámetro de orificio de 2,0 mm, mientras el de 50 L tiene un micro burbujeador tipo tubo perforado con diámetro de orificio de 20,0 μ m. El biorreactor de 2 000 L se operó en modo continuo con recirculación de biomasa, con una velocidad de agitación de 80 min^{-1} y un flujo total a través del distribuidor de gases de 7,0 L/min.

Criterios para el desescalado del proceso de fermentación

Existen varios métodos para el escalado de un proceso productivo, en este caso se empleó la regla del pulgar por su amplia utilización en la práctica (Halls, S., 2017). En este las variables del proceso se concentran en tres grupos: variables químico-físicas, variables geométricas y variables de operación. Las primeras se mantuvieron constantes en todas las escalas, como las propiedades del medio de cultivo, la temperatura de operación, el pH, entre otras. En el grupo de las variables geométricas se tienen las dimensiones de los biorreactores, en forma de diferentes relaciones. Las variables de operación se determinaron a partir de aplicar los diferentes criterios de escalado (Aiba *et al.*, 1973).

Se aplicó la siguiente metodología para realizar el desescalado del proceso de fermentación:

1. Selección de la variable objetivo;
2. Selección de la combinación de criterios de escalado a probar;
3. Cálculo de las variables de operación velocidad de agitación (N) y flujo total de gases (Q) en la escala de 50 L, partiendo de los valores que tienen en la escala de referencia;
4. Estudio del proceso en la nueva escala con la aplicación de los criterios seleccionados;
5. Comprobación de la validez del procedimiento aplicado.

Para la aplicación de esta metodología se comprobó si existe similitud geométrica entre las escalas, mediante el

cálculo de diferentes relaciones: D_T/D_i , H_L/D_T y el factor geométrico (f) de acuerdo a la ecuación 1.

$$f = \frac{1}{3} \left(\frac{D_T}{D_i} \cdot \frac{H_L}{D_i} \right)^{0.5} \quad 1$$

Una vez calculado el factor geométrico se analizaron diferentes criterios para determinar la velocidad de agitación (N) en el biorreactor de 50 L, a partir de conocer la velocidad de agitación en el biorreactor 2 000 L y el factor lineal de escala (relación entre los diámetros de impelentes) (Quintero, 1990). Los criterios analizados fueron:

Número de Reynolds (Re) constante (ecuación 2)
Velocidad tangencial (v_{tip}) constante (ecuación 3)
Tiempo de mezclado (t_m) constante (ecuación 4)
Potencia por unidad de volumen (P/V) constante (ecuación 5).

$$\frac{N_2}{N_1} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}} \right)^2 \quad 2$$

$$\frac{N_2}{N_1} = \frac{D_{i1}}{D_{i2}} \quad 3$$

$$\frac{N_2}{N_1} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}} \right)^{1/4} \quad 4$$

$$\frac{N_2}{N_1} = \left(\frac{D_{i2}}{D_{i1}} \right)^{2/3} \quad 5$$

donde: el subíndice 1 se refiere a la escala de 50 L y el subíndice 2 a la escala de 2 000 L.

La selección de la velocidad de agitación, mediante los criterios estudiados se realizó a partir de evaluar algunas de las características hidrodinámicas en el biorreactor, ecuaciones 6-8.

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D_i^2}{\eta} \quad 6$$

$$v_{tip} = \pi \cdot N \cdot D_i \quad 7$$

$$\frac{P}{V} = \frac{N_p \cdot \rho \cdot D_i^5 \cdot N^3}{V} \quad 8$$

donde:

ρ - densidad de líquido

N_p - número de potencia, es función del tipo de impelente y del régimen de trabajo

η - viscosidad dinámica.

El flujo de aire Q se calculó mediante el criterio recomendado por (Aiba *et al.*, 1973) basado en mantener constante el coeficiente de transferencia de masa (ecuación 9). Aunque este método fue desarrollado inicialmente para los casos en que no existe agitación mecánica y por tanto la transferencia de masa se produce

por la acción de las burbujas de aire que salen del distribuidor de gases, también se ha utilizado como una buena aproximación para el escalado en los biorreactores del tipo tanque agitado, con resultados superiores a los que se alcanzan con los métodos de mantener constante el flujo de aire por unidad de volumen (vvm) o la velocidad superficial (Aiba *et al.*, 1973).

$$\frac{vvm_1}{vvm_2} = \frac{Q_1/V_1}{Q_2/V_2} = \left(\frac{H_{L2}}{H_{L1}} \right)^{-2/3} \quad 9$$

donde:

vvm- flujo de aire por unidad de volumen

Q- flujo de gases al distribuidor de gases.

Este parámetro se evaluó a partir de observar el comportamiento del oxígeno disuelto en el cultivo para el flujo de gases determinado por la ecuación 9.

Las condiciones hidrodinámicas influyen directamente en el desempeño de las células, pues se pueden generar efectos de cizallamiento en los cultivos celulares. Un indicador potencial del daño celular es la microescala de turbulencia o número de Kolmogorov (Nienow, 2021; García-Ochoa *et al.*, 2020). Este identifica al remolino más pequeño o "eddy" en función de la velocidad de disipación de energía y de la viscosidad del fluido. Se determinó el tamaño de los remolinos mediante la ecuación 10.

$$l = \left(\frac{\eta^3}{P/(\rho \cdot V)} \right)^{1/4} \quad 10$$

donde:

l- tamaño de los remolinos.

Condiciones experimentales

Se desarrollaron tres corridas experimentales a partir de las condiciones de agitación y aireación, seleccionadas para estudiar el proceso en la escala de 50 L. Los parámetros cinéticos que, constituyen las variables objetivos del desescalado se compararon con los de una corrida típica de la escala de 2 000 L en modo continuo con recirculación celular y una corriente de purga. En la fermentación en la escala de 50 L se empleó el modo de operación continuo, utilizado por lo general en las actividades de investigación y desarrollo, y en la caracterización del cultivo celular (Castilho *et al.*, 2008).

En cada corrida el biorreactor fue muestreado con una frecuencia no superior a 4 días. La concentración celular (X_v) y la viabilidad celular fueron determinadas por observación al microscopio mediante el método de exclusión con tripán azul (Sutedjo, 2022). La concentración de producto extracelular P se determinó mediante el ensayo inmunoenzimático ligado a enzima ELISA (Hayrapetyan *et al.*, 2023).

Se determinaron los parámetros cinéticos velocidad específica de crecimiento celular (μ) y velocidad específica de producción del anticuerpo (q_p). Para ello se aplicaron los balances de biomasa y producto, teniendo en cuenta el modo de operación y la etapa de crecimiento del cultivo celular.

El cálculo de la velocidad específica de crecimiento en el cultivo por lote incrementado quedó expresado mediante la ecuación 11.

$$\ln\left(\frac{X_v}{X_{v0}}\right) = \mu \cdot (t - t_0) - \int_{t_0}^t \frac{F}{V} dt \quad 11$$

donde:

F- flujo de adición de medio de cultivo durante el incremento

V- volumen del biorreactor

X_{v0} y t_0 - concentración de células vivas y tiempo de corrida, al inicio del cultivo por lote incrementado.

En el estado pseudoestacionario se determinaron μ y q_p a partir de las ecuaciones de balances de masa para la biomasa y el producto en modo continuo y en modo continuo con recirculación celular (ecuaciones 12 y 13).

$$\mu = \alpha \cdot D_p + D \quad 12$$

$$q_p = \frac{P \cdot Dt}{X_v} \quad 13$$

donde:

D- velocidad de dilución en cultivo continuo

D_p - velocidad de dilución de perfusión

D_t - velocidad de dilución total

α - factor de pase del dispositivo de retención celular.

En el caso del cultivo continuo sin retención de biomasa en la ecuación 12 el término $\alpha \cdot D_p$ se anula y en el cálculo de q_p la velocidad de dilución total es D.

La velocidad específica de dilución por célula en el cultivo de 50 L (CSDR, por sus siglas en inglés) se determinó

mediante la ecuación 14. Esta representa el volumen de medio de cultivo empleado diariamente para sostener cada célula en el cultivo celular, y da una medida de la profundidad nutricional del medio de cultivo para la línea celular en las condiciones de cultivo; provee un microambiente consistente para las células en el cultivo.

$$CSDR = \frac{D}{X_v} \quad 14$$

Esta ecuación se empleó también para determinar la velocidad específica de perfusión por célula (CSPR, por sus siglas en inglés), sustituyendo la D por la velocidad de dilución total en el cultivo de 2 000 L.

Procesamiento estadístico de los datos

Se realizó la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis para medianas con el objetivo de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores calculados de los parámetros cinéticos que caracterizan la línea celular NSO productora de la proteína recombinante sL22 en ambas escalas. La prueba se llevó a cabo en el programa *Minitab 18*, donde se tuvo en cuenta que para todo valor p mayor que el nivel de significancia de 0,05 no existían diferencias estadísticas significativas entre las medianas.

RESULTADOS

Proceso de fermentación a gran escala

La figura 1 muestra el comportamiento de la concentración celular, la viabilidad, la velocidad de dilución total y la concentración de producto en una corrida desarrollada en el biorreactor de 2 000 L, que es representativa de esta escala de trabajo, donde en el cultivo de la línea celular NSO en

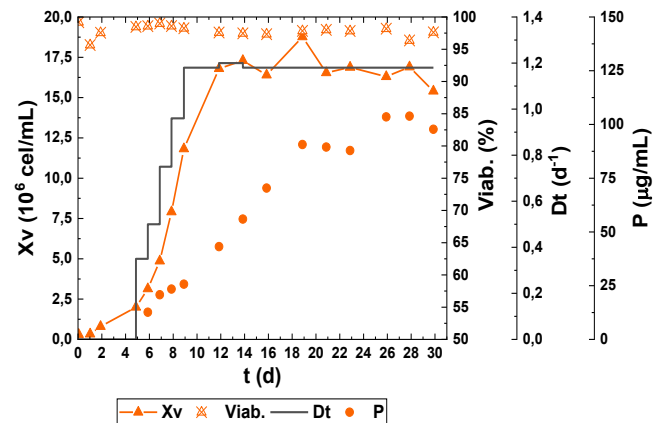


Figura 1. Concentración celular, viabilidad, velocidad de dilución y concentración de producto en el medio de cultivo M1, en el biorreactor de 2 000 L; temperatura $36,50 \pm 0,50$ °C, velocidad de agitación 80 min^{-1} , vvm de $0,004 \text{ min}^{-1}$, pH $6,85 \pm 0,10$.

la obtención de proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales se obtienen concentraciones celulares en el orden de $2,00 \cdot 10^7$ cel/mL para velocidades de dilución hasta $1,20 \text{ d}^{-1}$ (Núñez Ortiz *et al.*, 2023).

La corrida se inoculó a una concentración de células vivas de $3,05 \cdot 10^5$ cel/mL y una viabilidad celular de 99,20 % y presentó una fase de adaptación corta. La adición de medio de cultivo para completar el volumen de trabajo ocurrió entre el segundo y quinto día de fermentación, a un flujo de 20 L/h. Al finalizar el cultivo incrementado se inició la perfusión, con una concentración celular de $2,00 \cdot 10^6$ cel/mL a una velocidad de dilución de $0,35 \text{ d}^{-1}$, la cual aumentó en función del incremento de la concentración celular, para mantener una CSPR alrededor de 0,08 nL/cel/d. El día 12 de corrida se alcanzó un estado pseudoestacionario con X_v de $1,70 \cdot 10^7$ cel/mL, la cual se mantuvo hasta el final de la corrida. La concentración del producto presentó un incremento y alcanzó los valores máximos en el estado pseudoestacionario en el orden de 100 µg/mL.

La velocidad específica de crecimiento en el cultivo por lote incrementado fue $0,035 \text{ h}^{-1}$ y en el estado pseudoestacionario $0,010 \text{ h}^{-1}$ y la velocidad específica de formación de producto fue 6,50 pg/cel/d. Estos se encuentran en el intervalo informado para el cultivo de células de mamíferos (Quesada-Rodríguez *et al.*, 2025; González Álvarez, 2024; Castilho *et al.*, 2008).

Desescalado del proceso de fermentación a 50 L

Se determinó el factor geométrico de acuerdo a la ecuación 1; esta relación entre ambos biorreactores fue 0,88 y evidencia que existe un 88 % de similitud geométrica entre los biorreactores de 50 L y 2 000 L. De acuerdo a Aiba *et al.*(1973) cuando el factor es superior a 0,80 se puede afirmar que los biorreactores son geoméricamente similares.

Quintero (1990) planteó que cuando existe similitud geométrica se pueden emplear diferentes criterios para el cambio de escala. En este trabajo se analizaron los criterios de velocidad de agitación, Re, velocidad tan-

gencial y potencia por unidad de volumen constantes (ecuaciones 2 a 5), a partir de los cuales se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 1.

Se descartó el criterio de mantener el número de Reynolds constante pues la velocidad de agitación necesaria supera los 300 min^{-1} , velocidad máxima que permite el biorreactor de 50 L *Bioengineering* por diseño original. El criterio de velocidad tangencial constante se descartó pues implicaba una potencia por unidad de volumen de $579,44 \text{ W/m}^3$, valor superior a 250 W/m^3 , informado por Nienow (2006), para el cual se recomienda trabajar en estos sistemas sin observar daño en el cultivo celular.

La velocidad de agitación máxima que se debe trabajar en este sistema para no exceder una P/V de 250 W/m^3 (Nienow, 2006) es de 200 min^{-1} ; Hall (2017) plantea que la velocidad de agitación se debe mantener un 20 % alejada de la velocidad crítica. Se debería trabajar a velocidades de agitación inferiores a 160 min^{-1} para cumplir el criterio de Hall (2017); de ahí que se descartó el criterio de mantener constante la potencia por unidad de volumen que supone trabajar a una velocidad de agitación de 165 min^{-1} .

A partir de las consideraciones anteriores se decidió emplear como criterio de desescalado para el cálculo de la velocidad de agitación el tiempo de mezclado constante entre ambas escalas. Este tiempo es una de las características más importantes de los biorreactores para el estudio de los procesos de transferencia, la dinámica de fluidos y en general para la caracterización y entendimiento del proceso. Además, de garantizar la homogeneidad del sistema, es importante para evitar gradientes en las concentraciones de nutrientes y el oxígeno, así como oscilaciones en el pH que puedan afectar la productividad del proceso.

El flujo de gases totales determinado por la ecuación 9 fue de 0,085 L/min con lo cual la relación de flujo de aire por unidad de medio fue de $0,0017 \text{ min}^{-1}$. Este flujo es relativamente bajo; de acuerdo a Langheinrich *et al.* (1998) se

Tabla 1. Criterios de escalado analizados para determinar la velocidad de agitación del biorreactor de 50 L.

Criterio constante	Velocidad de agitación (min ⁻¹)	Re	Velocidad tangencial (m/s) ≤ 2,5 m/s	P/V (W/m ³) ≤ 250 W/m ³
Re	720	387 013	5,65	15 644,84
V _{tip}	240	129 004	1,88	579,44
t _m	100	53 751	0,79	41,92
P/V	165	86 003	1,26	171,69

puede plantear que la potencia es similar a la potencia gaseada, lo que simplifica los cálculos de la potencia.

Se determinó además el tamaño de los remolinos mediante la ecuación 10. Mientras menor sea el tamaño del remolino, mayor es la cantidad de energía concentrada y por tanto mayor daño puede ocasionar a la célula. Si la célula es más pequeña que la microescala de turbulencia, no será dañada en el momento de la explosión del remolino, ya que puede acomodarse en su interior (Nienow, 2006). A partir de la relación de P/V para la velocidad de agitación de 100 min^{-1} y la viscosidad dinámica del agua a la temperatura de trabajo, se determinó que el tamaño de la microescala de turbulencia de Kolmogorov es de $53 \text{ }\mu\text{m}$; las células de mamíferos tienen diámetros de $10\text{--}20 \text{ }\mu\text{m}$ (Nienow, 2021), por esta razón se pudiera descartar daño celular bajo esta condición.

Resultado del desescalado en 50 L

La figura 2 muestra el comportamiento de la concentración celular, la viabilidad y la velocidad de dilución de la línea celular NS0 en las corridas de fermentación 1, 2 y

3 desarrolladas en el biorreactor de 50 L; en el caso de las corridas 2 y 3 se muestra además la concentración de producto. En todas las corridas se utilizó el medio de cultivo M1, para la obtención de la proteína recombinante sL22, a partir de las condiciones de velocidad de agitación del impelente y flujo de aeración propuestos.

La corrida 1 (Figura 2a) se inoculó a una concentración de células vivas de $4,73 \cdot 10^5 \text{ cel/mL}$ y una viabilidad celular de $97,22 \%$; y los dos primeros días transcurrieron en modo discontinuo y se comenzó la adición de medio de cultivo a $0,52 \text{ L/h}$ hasta completar el volumen de trabajo, el cuarto día de comenzar la corrida. A partir de este momento, con una concentración celular de $1,53 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$, se inició el cultivo continuo a una velocidad de dilución de $0,25 \text{ d}^{-1}$. A las 48 horas de comenzar el cultivo continuo se aumentó la velocidad de dilución a $0,35 \text{ d}^{-1}$ en función de la concentración celular, con el objetivo de trabajar a velocidad específica de dilución por célula en el orden de $0,1 \text{ nL/cel/d}$. En estas condiciones se alcanzó un estado pseudoestacionario a partir del séptimo día, con una concentración promedio de

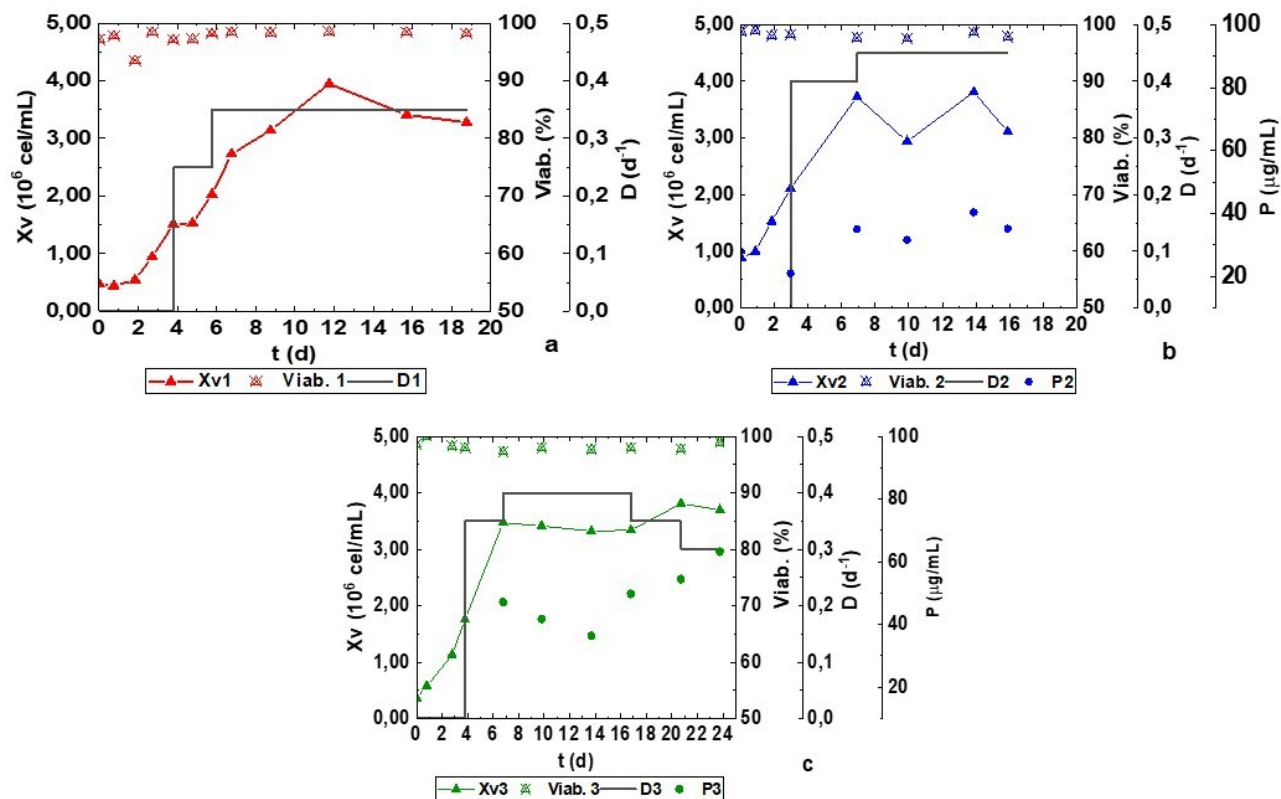


Figura 2. Concentración celular, viabilidad, velocidad de dilución y concentración de producto con el medio de cultivo M1, en el biorreactor de 50 L; temperatura $36,50 \pm 0,50 \text{ }^\circ\text{C}$, velocidad de agitación 100 min^{-1} , vvm de $0,0017 \text{ min}^{-1}$, pH $6,85 \pm 0,10$: a-fermentación 1; b-fermentación 2; c- fermentación 3.

$3,30 \cdot 10^6 \pm 4,43 \cdot 10^5$ cel/mL; el CSDR en esta etapa fue de $0,11 \pm 0,01$ nL/cel/d.

La corrida 2 (Figura 2b) inició con una concentración de células vivas de $1,01 \cdot 10^6$ cel/mL y una viabilidad celular de 99,03 % y la fase de adaptación fue imperceptible. Se comenzó la adición de medio de cultivo a las 24 horas de corrida a un flujo de 0,52 L/h hasta completar el volumen de trabajo durante 48 horas. Al día siguiente, con una X_v de $2,11 \cdot 10^6$ cel/mL se inició el cultivo continuo a una velocidad de dilución de $0,40$ d⁻¹, la cual se incrementó hasta $0,45$ d⁻¹ conforme al crecimiento celular. El final de la etapa de crecimiento e inicio del estado pseudoestacionario ocurrió el séptimo día de corrida hasta el fin de la misma; se alcanzó a una concentración celular de $X_{v2} = 3,40 \cdot 10^6 \pm 4,37 \cdot 10^5$ cel/mL, en esta etapa se obtuvo un CSDR de $0,13 \pm 0,02$ nL/cel/d.

La corrida 3 (Figura 2c) comenzó con una concentración de células vivas de $3,60 \cdot 10^5$ cel/mL y una viabilidad celular de 98,63 %. Al día siguiente se comenzó la adición de medio de cultivo a un flujo de 0,52 L/h hasta aproximadamente las 72 horas de iniciada la corrida, momento en que se llega al volumen de trabajo. El cuarto día se comenzó el cultivo continuo a $0,35$ d⁻¹; el séptimo día de corrida la velocidad de dilución se incrementó a $0,40$ d⁻¹; se alcanzó un estado pseudoestacionario en $3,51 \cdot 10^6 \pm 2,00 \cdot 10^5$ cel/mL hasta el final de la corrida. A partir del día 16 de corrida se implementó la estrategia descrita por (Konstantinov et al., 2006) de buscar el cambio incremental en el proceso del cultivo celular hacia un CSDR más bajo, pues suele comenzar con valores más altos; esto permitió disminuir este parámetro de $0,11$ nL/cel/d a $0,08$ nL/cel/d, similar a la velocidad específica de perfusión por célula a la cual se trabaja en el biorreactor de 2 000 L.

La concentración de producto en el estado pseudoestacionario alcanzó valores entre 30 y 50 µg/mL, sin embargo, en la corrida 3 se pudo observar en las últimas mediciones un ligero incremento, superando los 60 µg/mL. Esto puede estar asociado a la estrategia de la fermentación, donde el día 20 se disminuyó la velocidad de dilución. De acuerdo a Konstantinov et al. (2006), es posible lograr mayores concentraciones de producto disminuyendo la velocidad específica de dilución/perfusión por célula, ya sea por disminución de la velocidad de dilución o aumento de la concentración celular.

Parámetros cinéticos

Los valores de los parámetros cinéticos y la CSDR de los estados pseudoestacionarios se muestran en la tabla 2 junto a los parámetros en la escala comercial.

Las concentraciones celulares de los estados pseudoestacionarios informados en la tabla 2 en las tres corridas de fermentación desarrolladas en el biorreactor de 50 L son superiores a las planteadas por diversos autores (Fernandez-de-Cossio-Diaz et al., 2017; Castilho et al., 2008) para cultivos continuos, a velocidades de dilución similares a las de este estudio. Estas no son comprobables a las obtenidas en el cultivo a gran escala, ya que en el modo perfusión es donde se alcanzan las mayores concentraciones celulares (Konstantinov et al., 2006).

Las velocidades específicas de crecimiento en el cultivo por lote incrementado y en el estado pseudoestacionario, así como las velocidades específicas de formación de producto, son típicas en las células de mamíferos de acuerdo a lo informado en la literatura para líneas celulares similares (Quesada-Rodríguez et al., 2025; González Álvarez, 2024; Núñez Ortiz et al., 2023; Pérez-Rodríguez et al., 2020; Castilho et al., 2008). La velocidad específica de crecimiento es comparable en el cultivo incrementado en ambas escalas sin diferencias estadísticas significativas con un valor p de 0,39, sin embargo, en el estado pseudoestacionario se observan mayores valores en las fermentaciones en el biorreactor de 50 L, por las diferencias entre los modos de operación en ambas escalas. La velocidad específica de producción fue reproducible con el cambio de escala con una diferencia inferior al 30 %, lo cual es aceptable si se toma en cuenta los errores que se introducen en el conteo celular y en la cuantificación de la concentración de producto (Sutedjo, 2022). Los valores determinados de q_p no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ambas escalas (valor p de 0,31).

La velocidad específica de crecimiento en el estado pseudoestacionario y la CSDR coinciden con las observaciones realizadas por González Álvarez (2024), para un cultivo continuo en un biorreactor de 80 L para una línea celular NS0, donde observó que para menores valores de ambos parámetros se manifiesta una tendencia a la muerte del cultivo celular. Si se tiene en cuenta que las velocidades específicas de perfusión/dilución por célula en los cultivos de células de mamífero se encuentran entre $0,05$ y $0,5$ nL/cel/d (Konstantinov et al., 2006), los resultados en la escala de 50 L logran reproducir con bastante similitud los valores de la escala comercial (valor p de 0,17).

La figura 3 muestra el comportamiento de la dispersión de aire en el sistema a partir de la condición de operación propuesta para el modelo de desescalado. En la figura 3a se puede observar el comportamiento del porcentaje de oxígeno disuelto (DO) durante las tres corridas de fermentación para flujo de aire por unidad de volumen de $0,0017$ min⁻¹. En el caso de la figura 3b se

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la línea celular NS0 en el medio de cultivo M1, temperatura $36,50 \pm 0,50$ °C, pH $6,85 \pm 0,10$ en el biorreactor de 50 L: velocidad de agitación 100 min^{-1} ; vvm de $0,0017 \text{ min}^{-1}$; en las tres corridas de fermentación y en el biorreactor de 2000 L: velocidad de agitación 80 min^{-1} ; vvm de $0,004 \text{ min}^{-1}$.

Variables	Corrida- 1	Corrida- 2	Corrida- 3	Corrida 2000 L
$Xv_{ee} \text{ (cel/mL)}$	$3,30 \cdot 10^6 \pm 4,43 \cdot 10^5$	$3,40 \cdot 10^6 \pm 4,37 \cdot 10^5$	$3,51 \cdot 10^6 \pm 2,00 \cdot 10^5$	$1,68 \cdot 10^7 \pm 9,07 \cdot 10^5$
$\mu_{\text{lote incrementado}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,031	0,030	0,032	0,035
$\mu_{ee} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,015	0,019	0,017	0,010
$q_p \text{ (pg/cel/d)}$	-	4,61	5,02	6,50
CSDR/CSPR (nL/cel/d)	$0,11 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,02$

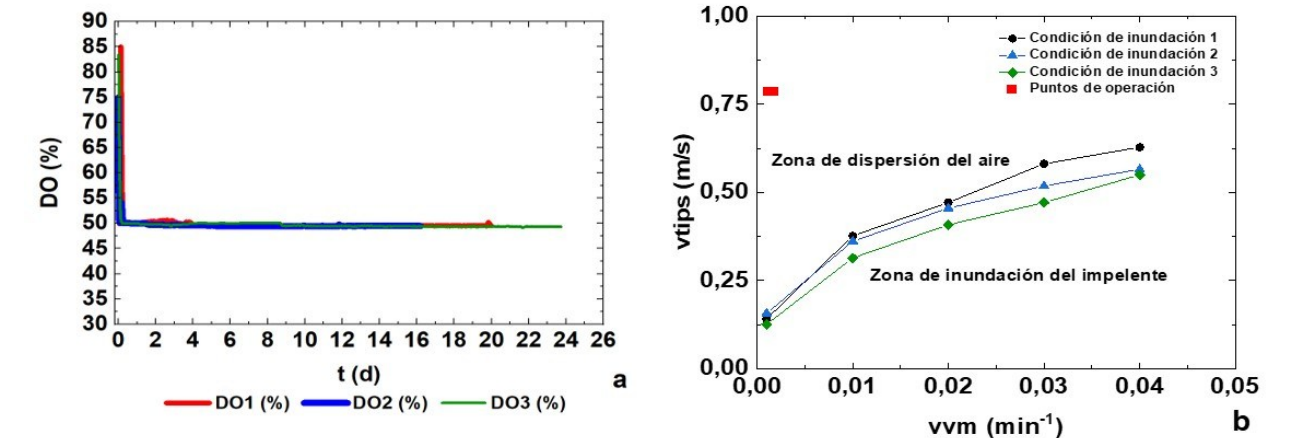


Figura 3. Comportamiento de la dispersión de aire en las tres corridas de fermentación en el biorreactor de 50 L, de la línea celular NS0, con el medio de cultivo M1, temperatura $36,50 \pm 0,50$ °C, velocidad de agitación 100 min^{-1} , vvm de $0,0017 \text{ min}^{-1}$, pH $6,85 \pm 0,10$: a- Porcentaje de oxígeno disuelto; b- Velocidad de agitación necesaria para lograr la dispersión del aire en función del flujo de gases totales en el biorreactor (adaptado de Raffo-Durán *et al.* (2014)).

comparó la zona de operación establecida en las tres fermentaciones desarrolladas con la zona de operación estudiada por Raffo-Durán *et al.* (2014), de curvas empíricas obtenidas para diferentes condiciones de inundación, con el objetivo de verificar si las condiciones de agitación y aireación propuestas se encuentran en una zona adecuada para la dispersión de aire en el sistema.

La figura 3a muestra que las tres corridas comenzaron con valores altos del porcentaje de oxígeno disuelto debido a la saturación del medio de cultivo previo a la inoculación; estos valores disminuyeron rápidamente producto del consumo de oxígeno por parte de las células. Esta variable se estabilizó alrededor del 50 %, lo que indica un buen control de la transferencia de oxígeno hacia el cultivo a partir de la condición de aireación determinada por la ecuación 9.

La zona de operación de la fermentación en el biorreactor de 50 L fue comparada con la adaptación de las curvas empíricas referidas por Raffo-Durán *et al.* (2014). La combinación de las condiciones de agitación y aireación

propuestas fue capaz de garantizar una adecuada dispersión de aire en el sistema, como se observa en la figura 3b, alejada de la condición de inundación del impelente.

DISCUSIÓN

El estudio de las mejoras en los procesos de cultivo celular, por ejemplo, la formulación del medio de cultivo, las condiciones del proceso, así como cambios en la línea celular son habituales durante el ciclo de vida y desarrollo de un producto biotecnológico. De ahí que la utilización de modelos a escalas de laboratorio y piloto hayan cobrado relevancia en las últimas décadas, al permitir la evaluación de diferentes condiciones experimentales e identificar patrones y comportamientos a costos mucho menores que si se realizara la experimentación en la escala industrial. Sin embargo, hasta el momento no existe una única directriz universal sobre como diseñar, operar y escalar estos bioprocesos. En la presente investigación se empleó como modelo de desescalado un cultivo continuo en un biorreactor de 50 L de volumen efectivo. Se realizó una caracterización de la cinética del

cultivo en esta escala a partir de las velocidades específicas de crecimiento y de formación de producto, así como la velocidad específica de dilución/perfusión por célula, y los resultados son comparables con los de la fermentación a gran escala (González Álvarez, 2024).

En los cultivos celulares de biorreactores tipo tanque agitado el mezclado es un parámetro crítico para una operación exitosa; permite la homogenización de la temperatura, el pH y la concentración de nutrientes; además previene la formación de productos tóxicos del metabolismo (García-Ochoa *et al.*, 2020). Las células de mamíferos son consideradas muy sensibles a los efectos de cizallamiento (Nienow, 2021; García-Ochoa *et al.*, 2020), altas velocidades de agitación pueden provocar efectos cortantes que afecten la población celular; sin embargo, bajas velocidades provocan un pobre mezclado del cultivo y en ocasiones agregados celulares. En el presente estudio se empleó como criterio el tiempo de mezclado como regla empírica para determinar la velocidad de agitación. De acuerdo a la metodología de Van't Riet y Van der Lans (2011) el tiempo de mezclado estimado en los biorreactores es de 25 segundos; este es despreciable frente al tiempo de duplicación de las células, el cual es de 24 a 48 horas. Esto es importante pues garantiza una homogeneidad instantánea del sistema de cultivo, frente al tiempo de reacción, a la vez que permite hacer consideraciones en los patrones de flujo que simplifiquen el análisis de fenómenos de transferencia de masa y otros procesos hidrodinámicos. El criterio de escalado empleado para mantener el tiempo de mezclado constante implica un aumento en la potencia ya que el cultivo requiere una mayor velocidad de agitación, no obstante, esto no constituye un problema al tratarse de un desescalado.

La relación de flujo de aire por unidad de medio al distribuidor de gases en los biorreactores de pequeña escala es usualmente superior que en los de mayor volumen, esto se realiza para mantener igual demanda de oxígeno disuelto y bajas concentraciones de CO₂ (Xie *et al.*, 2003); por ello al disminuir de escala el criterio más utilizado es mantener constante la velocidad superficial. En el estudio se utilizó el criterio de mantener constante el coeficiente de transferencia de masa pues los requerimientos de oxígeno en el cultivo para cada biorreactor son diferentes; el biorreactor de 2000 L opera en modo continuo con recirculación de biomasa, alcanza concentraciones celulares cercanas a los $2,00 \cdot 10^7$ cel/mL; sin embargo, el biorreactor de 50 L opera en modo continuo donde las concentraciones celulares son mucho menores (Castilho *et al.*, 2008). Los criterios utilizados para el desescalado a partir de mantener el tiempo de mezclado y el coeficiente de transferencia de masa constantes permitió el desarrollo de tres corridas experi-

mentales reproducibles con una buena viabilidad y concentraciones celulares altas para cultivos continuos (Fernandez-de-Cossio-Diaz *et al.*, 2017; Castilho *et al.*, 2008), aunque se observa que los valores de CSDR son elevados de acuerdo los valores mínimos informados en la literatura (Mayrhofer *et al.*, 2021; Wolf *et al.*, 2019).

Algunos autores no comparten el criterio de utilizar la microescala de turbulencia de Kolmogorov como indicador del daño celular y utilizan otros criterios. Kaur Gill (2013) refiere que el esfuerzo cortante se considera proporcional a la velocidad de punta del impelente y que el daño celular se produce a velocidades superiores a 3,2 m/s; aunque está afectado por diversos factores como la reología del cultivo. La velocidad tangencial determinada para los criterios de potencia por unidad de volumen y de velocidad tangencial constantes para el desescalado se encuentran alejados del valor planteado por Kaur Gill (2013), por lo que se pudieran tomar en cuenta estos criterios para futuras condiciones experimentales.

El desarrollo de un modelo de fermentación a escala de 50 L permitirá la exploración de diferentes espacios operacionales, a fin de evaluar nuevas formulaciones de medio de cultivo, lo que a su vez será de gran importancia para el desarrollo de estrategias de alimentación orientadas a mejorar el rendimiento y la productividad de los cultivos celulares.

CONCLUSIONES

El desescalado a partir de mantener constante el tiempo de mezclado y el coeficiente de transferencia de masa es factible para el biorreactor de 50 L; con una velocidad de agitación de 100 min⁻¹ y un flujo de gases totales de 0,085 L/min. Las condiciones de velocidad de agitación y aeración en el biorreactor de 50 L propuestas generan remolinos de aproximadamente 53 µm, superiores al diámetro de las células de mamíferos, se puede afirmar que no tiene impacto en el daño celular a partir del criterio de la microescala de turbulencia de Kolmogorov. Los parámetros operacionales propuestos en el modelo de desescalado permiten alcanzar concentraciones celulares estables superiores a los $3 \cdot 10^6$ cel/mL en cultivo continuo, con velocidades específicas de crecimiento y de producción en el orden de las referenciadas en la literatura para el cultivo de células de mamífero, sin diferencias estadísticas significativas respecto al cultivo a gran escala. La condición de operación del biorreactor se encuentra en la zona de dispersión de aire, fuera de la inundación del impelente. Esta combinación de criterios puede ser utilizada para intentar comprender fenómenos que se presenten a diferentes escalas productivas y en modos operacionales diferentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiba, S., Humphrey, A. E., & Millis, N. F. (1973). *Biochemical engineering*: Academic press.
- Boggiano-Ayo, T., Palacios-Oliva, J., Lozada-Chang, S., Relova-Hernandez, E., Gomez-Perez, J., Oliva, G., . . . Mora, O. (2023). Development of a scalable single process for producing SARS-CoV-2 RBD monomer and dimer vaccine antigens. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1287551.
- Castilho, L., Moraes, A., Augusto, E., & Butler, M. (2008). *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*: Taylor & Francis.
- Fernandez-de-Cossio-Diaz, J., Leon, K., & Mulet, R. (2017). Characterizing steady states of genome-scale metabolic networks in continuous cell cultures. *PLoS computational biology*, 13(11), e1005835.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., & Santos, V. E. (2020). Fluid dynamic conditions and oxygen availability effects on microbial cultures in STBR: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 164, 107803.
- González Álvarez, A. (2024). *Metodología para determinar las condiciones de mayor productividad volumétrica en los procesos de fermentación del CIM*. (Tesis de maestría). Universidad Tecnológica de La Habana "José Antonio Echeverría",
- Hall, S. (2017). *Rules of thumb for chemical engineers*: Butterworth-Heinemann.
- Hayrapetyan, H., Tran, T., Tellez-Corrales, E., & Madiraju, C. (2023). Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications. *ELISA: methods and protocols*, 1-17.
- Kaur Gill, N. (2013). *Design and characterisation of parallel miniature bioreactors for bioprocess optimisation and scale-up*. (Tesis de doctorado). Biochemical Engineering.
- Konstantinov, K., Goudar, C., Ng, M., Meneses, R., Thrift, J., Chuppa, S., . . . Naveh, D. (2006). The "push-to-low" approach for optimization of high-density perfusion cultures of animal cells. *Cell culture engineering*, 75-98.
- Langheinrich, C., Nienow, A., Eddleston, T., Stevenson, N., Emery, A., Clayton, T., & Slater, N. (1998). Liquid homogenization studies in animal cell bioreactors of up to 8 m³ in volume. *Food and Bioproducts Processing*, 76(2), 107-116.
- Mayrhofer, P., Castan, A., & Kunert, R. (2021). Shake tube perfusion cell cultures are suitable tools for the prediction of limiting substrate, CSPR, bleeding strategy, growth and productivity behavior. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(10), 2930-2939.
- Nienow, A. W. (2006). Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 50(1), 9-33.
- Nienow, A. W. (2021). The impact of fluid dynamic stress in stirred bioreactors—the scale of the biological entity: a personal view. *Chemie Ingenieur Technik*, 93(1-2), 17-30.
- Núñez Ortiz, R. R., Pérez Pérez, D., Duarte Castro, M., Fernández de la Vega Velázquez, J., Fernández Oliva, O., Fernandez-de-Cossio-Diaz, J., . . . Chico, E. (2023). Kinetic modeling of NS0 cell line growth impairment in perfusion. *Biotechnol Apl.*, 40(2), 2201-2207.
- Pérez-Rodríguez, S., Ramírez-Lira, M. d. J., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2020). Nutrient supplementation strategy improves cell concentration and longevity, monoclonal antibody production and lactate metabolism of Chinese hamster ovary cells. *Bioengineered*, 11(1), 463-471.
- Quesada-Rodríguez, J. d. I. C., Núñez-Ortiz, R. R., Fernández de la Vega-Velázquez, J. A., Duarte-Castro, M. C., & Chico-Véliz, E. (2025). Establecimiento de la zona de operación para el cultivo a gran escala de células de ovario de hámster chino en la obtención de una vacuna viral. *VacciMonitor*, 34.
- Quintero, R. (1990). Escalamiento de fermentaciones. *Ingeniería Bioquímica: Teoría y aplicaciones*. Ed. Alhambra Mexicana, México, 87.
- Raffo-Durán, J., Dustet-Mendoza, J., & Figueredo-Cardero, A. (2014). Características de la hidrodinámica de un biorreactor industrial tipo tanque agitado. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13(3), 823-839.
- Sutedjo, R. (2022). Cell culturing and preparation in biomanufacturing Handbook V1. 0.
- Tang, P., Xu, J., Louey, A., Tan, Z., Yongky, A., Liang, S., . . . Liu, S. (2020). Kinetic modeling of Chinese hamster ovary cell culture: factors and principles. *Critical reviews in biotechnology*, 40(2), 265-281.
- Van't Riet, K., & Van der Lans, R. (2011). 2.07 Mixing in Bioreactor Vessels. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press, Burlington, 63-80.
- Wolf, M. K., Pechlaner, A., Lorenz, V., Karst, D. J., Souquet, J., Broly, H., & Morbidelli, M. (2019). A two-step procedure for the design of perfusion bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 151, 107295.
- Xie, L., Metallo, C., Warren, J., Pilbrough, W., Peltier, J., Zhong, T., . . . Aunış, J. G. (2003). Large-scale propagation of a replication-defective adenovirus vector in stirred-tank bioreactor PER. C6™ cell culture under sparging conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 83(1), 45-52.
- Zhang, L. (2020). *Development of mathematical modelling for the glycosylation of IgG in CHO cell cultures*. (Tesis de doctorado). KTH-Royal Institute of Technology.

Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo de plántulas *in vitro* de *Cyrtopodium schargellii* (G. A. Romero, Aymard & Carnevali)

Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium schargellii* (G. A. Romero, Aymard & Carnevali)

Hernández-Rosales Daniel J*, Ortega-Macareno Luis C**, Martínez-Oviedo Luisa***, Beltrán-Herrera Javier****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.121102

RESUMEN

Cyrtopodium schargellii, conocida en ciertas zonas como “lluvia dorada”, es una orquídea nativa de América Central, cuya distribución incluye Venezuela y Colombia, donde habita principalmente en ecosistemas de bosque seco tropical. Esta especie, de interés ornamental y ecológico, enfrenta desafíos que justifican la búsqueda de alternativas para su propagación y conservación. El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo de germinación asimbiótica y evaluar la formación de plántulas *in vitro* de la orquídea *C. schargellii*. Para ello, se hizo uso de dos cápsulas maderas de dicha especie, recolectadas en el departamento de Sucre, para posteriormente cultivar las semillas en tres tratamientos: T1 (sales MS al 100%), T2 (sales MS al 50%) y T3 (sales MS al 25%). Para la formación de raíces, T3 fue el mejor tratamiento, mientras que T1 y T2 favorecieron la generación de brotes y la elongación del tallo; sin embargo, T1 fue el mejor tratamiento para la germinación de las semillas. Estos hallazgos evidencian la viabilidad del protocolo propuesto para la obtención de vitroplántulas de la orquídea *C. schargellii*.

Palabras clave: Biotecnología, bosque seco tropical, cultivo de tejidos, orquídea, vitroplántulas.

ABSTRACT

Cyrtopodium schargellii, known in certain areas as “golden rain,” is an orchid native to Central America, whose distribution includes Venezuela and Colombia, where it mainly inhabits tropical dry forest ecosystems. This species, of ornamental and ecological interest, faces challenges that justify the search for alternatives for its propagation and conservation. The objective of this research is to establish an asymbiotic germination protocol and evaluate the formation of *in vitro* seedlings of the orchid *C. schargellii*. For this, two wood capsules of the species were collected in the department of Sucre, to later cultivate the seeds in three treatments: T1 (MS salts at 100%), T2 (MS salts at 50%) and T3 (MS salts at 25%). For root formation, T3 was the best treatment, while T1 and T2 favored the generation of shoots and the elongation of the stem; however, T1 was the best treatment for seed germination. These findings evidence the viability of the proposed protocol for the obtention of vitroplantlets of the orchid *C. schargellii*.

* Estudiante de Biología, Universidad de Sucre, Sincelejo. dhernandezrosales@hotmail.com

** Dr. Ecología y Biotecnología, Universidad Veracruzana, México. <https://orcid.org/0000-0002-1253-489X>. luisr.ortega1@gmail.com

*** Bióloga, Universidad de Sucre, Sincelejo. <https://orcid.org/0000-0002-6933-045X>. Luisa.martinez@unisucra.edu.co

**** Dr. Fitopatología, Universidad de Sucre, Sincelejo. <https://orcid.org/0000-0002-2366-9335>. javier.beltran@unisucra.edu.co

vitro seedlings of the orchid *C. schargellii*. To this end, seeds were extracted from two mature capsules of this species, collected in the department of Sucre. These seeds are then cultivated in three treatments: T1 (100% MS salts), T2 (50% MS salts), and T3 (25% MS salts). For root formation, T3 is the best treatment, while T1 and T2 favor shoot generation and stem elongation; however, T1 is the best treatment for seed germination. These findings demonstrate the viability of the proposed protocol for obtaining *in vitro* seedlings of the orchid *C. schargellii*.

Keywords: Biotechnology, tropical dry forest, tissue culture, orchid, vitroplantlets.

Recibido: junio 24 de 2025

Aprobado: 5 de noviembre de 2025

INTRODUCCIÓN

C. schargellii es una planta epífita de la familia Orchidaceae, nativa de América Central y distribuida en países como Colombia y regiones como el occidente-noroeste de Venezuela, donde habita principalmente en ecosistemas de bosque seco tropical (Hernández y Ortega, 2025) (Figura 1). Se diferencia de otras especies del género porque esta presenta hábito de crecimiento exclusivamente epífita (Romero *et al.*, 2005).

Por otro lado, el estado de conservación actual de esta especie, junto con el de otras especies de orquídeas, se está viendo afectado por la fragmentación del hábitat, derivado de la contaminación del suelo y demás actividades antropogénicas, lo que ha provocado una disminución en el número de las poblaciones silvestres (García *et al.*, 2024). Además, factores como los efectos del cambio climático, la extracción ilegal y el aprovecha-

miento tradicional también compromete el riesgo de extinción (Baider y Florens, 2021; Castillo *et al.*, 2021). Todos estos aspectos traen consigo repercusiones negativas sobre la ecología de las orquídeas y explican su presencia en listas rojas nacionales e internacionales de especies amenazadas o en peligro.

En ese orden de ideas, la técnica de propagación *in vitro* a partir del cultivo de tejidos vegetales se ha considerado como una herramienta crucial para la conservación de especies de importancia ornamental, ecológica o comercial (Vásquez *et al.*, 2021; Ramírez-Mosqueda e Iglesias-Andreu, 2015).

La propagación *in vitro* ha sido implementada exitosamente en especies terrestres, epífitas y litófitas en diversos lugares de todo el mundo, abarcando desde la germinación de semillas hasta la siembra de explantes a partir de diversos órganos de la planta (Beltrán y Solór-



Figura 1. Flor de la especie *C. schargellii* (Autoría propia).

zano, 2022). En el caso de las orquídeas, el proceso germinativo puede darse por vías simbióticas o asimbióticas. El método simbiótico *in vitro* consiste en realizar la siembra de las semillas junto con un inóculo de hongo micorrícico que tenga afinidad con la orquídea (Pujasatria *et al.*, 2020). De igual manera, el método asimbiótico, propuesto por Knudson (1922), mostró ser un avance trascendental, al demostrar que las semillas tenían la capacidad de germinar en medios enriquecidos con sales y azúcares bajo condiciones axénicas y controladas en un laboratorio (Mamani *et al.*, 2022). Posteriormente, se ha señalado que, una vez alcanzada la germinación, las orquídeas desarrollan una estructura conocida como protocormo, una masa de células embrionarias que se caracterizan por presentar divisiones celulares activas, junto con la diferenciación del meristemo apical, con una expresión génica distinta a la del embrión inicial (Hernández *et al.*, 2023); los protocormos presentan un alto grado de totipotencialidad, siendo capaces de regenerar plantas completas, bajo las condiciones adecuadas (Ruíz, 2020).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo eficiente de germinación y evaluar la formación de plántulas *in vitro* de la orquídea *C. schargellii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y recolección del material vegetal

Se hizo uso de 2 cápsulas maduras de *C. schargellii* (Figura 2), las cuales fueron recolectadas en el municipio de Sampues, Sucre, en las coordenadas: 9.21939 de latitud y -75.34243 de longitud del meridiano de Green-

wich. Se conservaron las mismas en papel periódico y bolsas ziploc y se transportaron hacia el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Sucre.

Desinfección del material vegetal

Las cápsulas se desinfectaron mediante el lavado por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2%, durante 3 minutos con dos gotas de Tween 20 (Sigma®), posteriormente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril para eliminar el exceso de detergente.

Medios de cultivo

Se realizó un total de 60 frascos con medios de cultivo, distribuidos en 3 tratamientos (T1, T2 y T3), donde cada tratamiento estuvo conformado por 20 repeticiones, siendo cada frasco una unidad experimental. Los tratamientos estuvieron compuestos por sales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100% para T1, para T2 se adicionó sales MS (1962) al 50% y para T3 sales MS (1962) al 25%, y para todos los tratamientos sacarosa al 3%, Myo-inositol, tiamina HCl, Gelrite al 0,2%, y se ajustó el pH a 5,7. Luego se disolvió el Gelrite durante 10 minutos en una plancha de calentamiento y se distribuyó a razón de 20 ml por frasco. Finalmente se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 psi y 121° C. Los medios de los diferentes tratamientos se sembraron en condiciones de asepsia en cabina de flujo laminar horizontal.

Siembra del material vegetal, germinación de las semillas y condiciones del medio

Las cápsulas se abrieron longitudinalmente con la ayuda de un bisturí previamente desinfectado dentro de la cá-



Figura 2. Cápsula madura de *C. schargellii* (Autoría propia).



Figura 3. Siembra de las semillas de *C. schargellii*.



Figura 4. Semillas germinadas *in vitro* (protocormos) de *C. schargellii* después de aproximadamente 20 días post-siembra.

mara de flujo laminar, se extrajo un cúmulo de semillas y se sembró en los diferentes medios de cultivo distribuyéndolas en cinco puntos dentro del frasco con la ayuda de una asa de aro (Figura 3). Posteriormente, se colocaron en un cuarto de incubación a una temperatura de 28 ± 5 °C, humedad relativa de 65 % y un fotoperiodo de 12 horas luz con una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Evaluación del material vegetal

Se evaluó el desarrollo germinativo de las semillas en cada uno de los medios a las 24, 48 y 72 horas, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70 y 90 días con el objetivo de generar una cinética de crecimiento. Al mismo tiempo, se evaluaron parámetros cuantitativos y cualitativos, tales como el número de semillas germinadas, longitud del vástago, número de raíces, número de brotes y presencia o ausencia de contaminación.

Diseño y análisis estadístico

Esta investigación se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA). A los datos que se obtuvieron se les aplicaron las pruebas de normalidad (ShapiroWilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett), tras lo cual, aquellas variables distribuidas de forma normal y homogénea fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiples de medias Tukey ($\alpha: 0.05$), mientras que en caso contrario se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis estadísticos se procesaron en los programas Excel, R Project y R Studio para Windows (de Mendiburu, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados muestran que al transcurrir aproximadamente 20 días después de la siembra de las semillas, fue posible observar inicios de germinación en los medios de cultivo, observándose así una estructura conocida como protocormo globular en diferentes réplicas de los distintos tratamientos implementados (Vargas *et al.*, 2023; Utami *et al.*, 2017) (Figura 4).

Los resultados obtenidos sugieren que el porcentaje de germinación de semillas en T1 fue del 75%, en T2 del 29% y en T3, el porcentaje se dio en la menor proporción, es decir, del 25%. Estos hallazgos se relacionan con los obtenidos en trabajos anteriores sobre germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Ruíz (2020) estableció las bases para la micropropagación de la flor de un día (*Sobralia macrantha*), alcanzando un porcentaje superior al 70% de germinación una vez transcurridos 18 días post-siembra, demostrando la eficiencia de la germinación asimbiótica en este tipo de plantas. De igual manera,

Apolo (2021) analizó la viabilidad de semillas de la especie *Epidendrum nocturnum* bajo diferentes condiciones de almacenamiento, evidenciando que, alcanzados los 15 días después de la siembra de las semillas, la germinación sobrepasó el 1,5% en todos los tratamientos implementados; aunque el porcentaje de germinación reportado fue menor que el de Ruíz (2020), la investigación resalta la influencia de las condiciones de almacenamiento en la germinación favorable de las semillas.

Por otro lado, Mamani *et al.* (2022) detallaron el proceso ontogénico y germinativo de *Epidendrum secundum*, registrando así que, a los 21 días después de la siembra, las semillas comenzaron a germinar en los medios implementados, reafirmando la relevancia de la composición de los medios (incluyendo suplementos como el agua de coco) en el desarrollo germinativo de las semillas.

Todos estos antecedentes resaltan que, si bien los tiempos y porcentajes de germinación pueden presentar variaciones entre especies y tratamientos, la formulación de protocolos de germinación *in vitro* de semillas de orquídeas pone en manifiesto la importancia de esta herramienta clave para la micropropagación y conservación de este tipo de plantas.

Dando continuidad a lo mencionado, el análisis de varianza para el número de semillas germinadas demuestra que hay diferencias significativas entre el número de semillas germinadas y los tratamientos ($p\text{-valor}=8.09\text{e}^{-14}$, $GL=2$, $\alpha=0.05$, $p<\alpha$), siendo T1 (300 semillas germinadas aproximadamente) el tratamiento que presenta mayor diferencia con T2 (110 a 120 semillas germinadas) y T3 (100 semillas germinadas) en cuanto a esta variable (Figura 5).

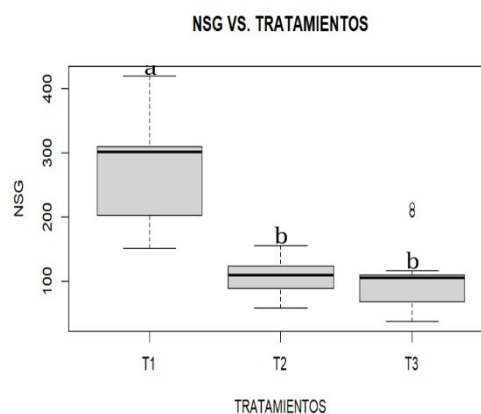


Figura 5. Boxplot del número de semillas germinadas con respecto a los tratamientos.

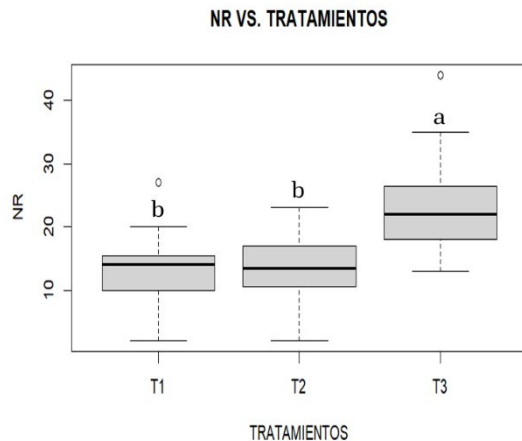


Figura 6. Boxplot del número de raíces con respecto a los tratamientos.

El análisis de varianza para el número de raíces demuestra que hay diferencias significativas entre el número de raíces y los tratamientos ($p\text{-valor}=1.14e^{-06}$, $GL=2$, $\alpha=0.05$, $p<\alpha$), siendo T3 (20 a 22 raíces obtenidas) el tratamiento que presenta mayor diferencia con T1 y T2 (10 a 15 raíces) en cuanto a esta variable (Figura 6).

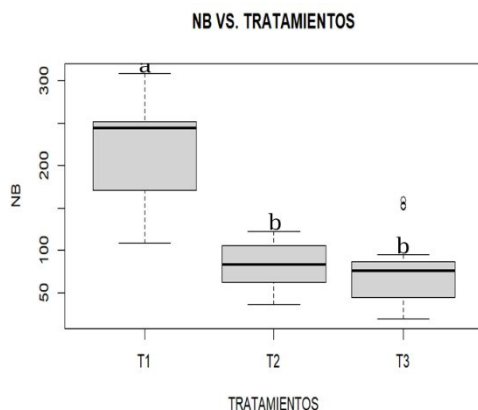


Figura 7. Boxplot del número de brotes con respecto a los tratamientos.

El análisis de varianza para el número de brotes demuestra que hay diferencias significativas entre el número de brotes y los tratamientos ($p\text{-valor}=5.62e^{-15}$, $GL=2$, $\alpha=0.05$, $p<\alpha$), siendo T1 (240 a 250 brotes aproximadamente) el tratamiento que presenta mayor diferencia con T3 (80 a 90 brotes) y T2 (60 a 80 brotes) en cuanto a esta variable (Figura 7).

El análisis de varianza para la longitud del vástago demuestra que hay diferencias significativas entre la longitud del vástago y los tratamientos ($p\text{-valor}=0.00532$, $GL=2$, $\alpha=0.05$, $p<\alpha$), siendo T3 (0,5 a 1 cm) el

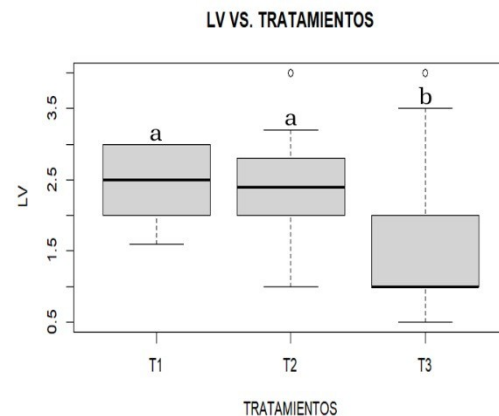


Figura 8. Boxplot de la longitud del vástago con respecto a los tratamientos.



Figura 9. A. Vitroplantas en T1, T2 y T3 respectivamente, después de 120 días post-siembra.

tratamiento que presenta mayor diferencia con T1 y T2 (2 a 2,5 cm) en cuanto a esta variable (Figura 8).

Por otro lado, después de aproximadamente 120 días realizada la siembra de las semillas, fue posible evidenciar diferencias significativas principalmente en cuanto al crecimiento y elongación de las vitroplantas y la formación de raíces (Figura 9).

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que la concentración de sales minerales en el medio de cultivo tiene una influencia decisiva sobre las distintas etapas del desarrollo *in vitro* de las orquídeas (Hwang *et al.*, 2024), incluyendo a *C. schargellii*. En términos de germinación, el medio MS al 100% (T1) fue el más eficiente, mientras que la disminución de sales al 25% (T3) inhibió considerablemente tanto la germinación como la formación de brotes. Este comportamiento observado puede ocurrir debido a la

baja disponibilidad de macro y micronutrientes en los medios de cultivo, componentes fundamentales en el proceso de división celular, metabolismo energético y síntesis/transporte de hormonas, tal como lo reportan Cadavid y Salazar (2008) para la especie *Cattleya quadricolor*, en donde el tratamiento 3 con sales MS $\frac{1}{4}$ (25%) arrojó un porcentaje de germinación de semillas bajo en comparación con los tratamientos 1 (100%) y 2 (50%), donde estos fueron de 88% y 64%, respectivamente. Según lo anterior, Martínez et al. (2015) afirman que la disminución de la concentración de sales puede afectar el potencial osmótico, dificultando la absorción de nutrientes y reduciendo la eficiencia de la actividad metabólica de las plántulas.

Sin embargo, los resultados obtenidos por Andrade et al. (2015) evidencian un efecto contrario en híbridos de *Brassolaeliocattleya*, donde la concentración de sales al 100% provocó un potencial osmótico negativo que inhibió la germinación. Estas diferencias dan cabida a la necesidad de implementar pruebas de susceptibilidad previas, variando la concentración de sales según la especie y su respuesta en fases críticas del proceso germinativo, como la imbibición y el desarrollo de protocormos.

La comparación entre resultados de estudios confirma que no existe un medio y/o concentraciones universalmente óptimas, sino que la respuesta depende considerablemente de los requerimientos fisiológicos y ecológicos de cada especie. Por ejemplo, *Cyrtopodium paludicolum*, especie adaptada a suelos hidromórficos pobres en nutrientes, arrojó mayores porcentajes de germinación en medios diluidos, como VW y MS $\frac{1}{2}$ (50%) (de melo et al., 2022), lo cual reafirma la relación existente entre condiciones ambientales naturales y desarrollo *in vitro*. De igual manera, Caramaschi (2001) registró que *Cyrtopodium punctatum* mostró mayores porcentajes de germinación en medio VW que en MS, mientras que Dutra et al. (2009) documentaron en la misma especie una mejor respuesta en VW en comparación con MS y KC. Por su parte, de Sousa et al. (2017) demostraron que *Cyrtopodium saintlegerianum* responde favorablemente tanto en medio MS como en medio Knudson C modificado, siendo este último más fácil de preparar y más económico, convirtiéndolo en una alternativa viable para la propagación *in vitro* de esta especie.

En este estudio, aunque la germinación se dio de una manera más eficiente en T1 (100%), la formación de tejido radicular fue considerablemente mayor en T3 (25%). Este comportamiento podría estar relacionado

con el efecto de la sacarosa, la cual tiene un papel determinante en el potencial osmótico del medio en comparación con las sales minerales (Pierik, 1990; Arditti, 2008). La hidrólisis de la sacarosa a glucosa y fructosa proporciona carbono disponible (Yoshida et al., 1973), promoviendo la organogénesis de raíces en medios con bajas concentraciones de sales, tal como se observó en T3. Este resultado afirma que, para etapas posteriores de desarrollo radicular, medios con bajas concentraciones de sales podrían ser favorables para esta especie.

En cuanto al número de brotes y la longitud del vástago, los mejores resultados se obtuvieron en T1 (100%) y T2 (50%). Estos hallazgos contradicen lo reportado por Dogan (2020), quien asegura que las altas concentraciones de sales limitan el crecimiento longitudinal del vástago, debido a un potencial osmótico reducido; en este caso en particular, la mayor disponibilidad de nutrientes parece haber favorecido un mejor desarrollo, evidenciándose así que *C. schargellii* presenta una tolerancia relativamente alta a concentraciones elevadas de sales MS. Esto coincide con lo observado por de Oliveira et al. (2023) en *Cyrtopodium aliciae*, donde el medio MS al 50% produjo plantas con mayor resistencia y mejor adaptación a la aclimatación.

Finalmente, se hace la aclaración de que, en este estudio, la contaminación no representó un inconveniente, ya que en ninguno de los medios de cultivo evaluados se presentó indicios de proliferación de hongos o bacterias durante el tiempo de evaluación estipulado, permitiendo que los ensayos se realizaran de manera satisfactoria y que los parámetros analizados reflejaran con mayor precisión las respuestas a los tratamientos implementados.

Los resultados de la presente investigación reafirman la idea de que la respuesta de las orquídeas a los cultivos *in vitro* depende de la especie y de las condiciones del medio, lo que impide el establecimiento de un protocolo de aplicación general. Mientras que para *C. schargellii* la germinación y formación de brotes se ven favorecidas en medios con altas concentraciones de sales, la formación de tejido radicular se da de una manera más eficiente en medios con bajas concentraciones.

CONCLUSIONES

La respuesta *in vitro* de *C. schargellii* está directamente relacionada con la concentración de sales del medio de

cultivo. Se concluye que el tratamiento más viable y efectivo para la formación de plántulas *in vitro* de *C. schargellii* es el que viene dado por sales MS al 100%.

REFERENCIAS

- Andrade, M., Vargas, J., Villegas, O., López, V., Guillén, D., Alia, I. (2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *Cattleya* (*Brassolaeliocattleya*) *in vitro*. *Interciencia*, 40 (8), 549-553.
- Apolo, K. (2021). Evaluación de procedimientos en la conservación y germinación *in vitro* de semillas de la orquídea *Epidendrum nocturnum* (Jacq). Guayaquil, Ecuador: Universidad Agraria del Ecuador, p 46.
- Arditti, J. (2008). Micropropagation of Orchids (2da edition). California, Estados Unidos: Blackwell Publishing, p 511.
- Baider, C., Florens, F. V. (2022). Diversity, Ecology, and Conservation of Mauritius Orchids. *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture: Fundamentals and Applications*. Springer Chams, p 1-27.
- Beltrán, D.; Solórzano, A. (2022). Estudio de la germinación y desarrollo temprano *in vitro* de una especie de orquídea del género *Cymbidium* cultivada entre diferentes tratamientos simbióticos y asimbióticos. Cuenca, Ecuador: Universidad del Azuay, p 1.
- Cadavid, I.; Salazar, S. (2008). Micropropagación de *Cattleya quadricolor*. Medellín, Colombia: Universidad EAFIT, p30-32.
- Caramaschi, G. (2001). Propagação *in vitro* de *Cyrtopodium* spp. (Orchidaceae). 110 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, p110.
- Castillo, L., Martínez, D., Fortanelli, J., Carranza, C. (2021). Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and symbiotic acclimatization of the Mexican threatened orchid *Stanhopea tigrina*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 146, 249-257.
- de Melo, W., Magno, A., Cavalcante, J., Mamoru, R., Gomes, J. (2022). Asymbiotic germination, initial development *in vitro* and acclimatization of *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne, a Brazilian Savanna orchid species. *Ciencia Rural*, 53 (5), 2023.
- De Mendiburu, F. (2012). Manual rápido de uso de la librería agrario-lae. Universidad Nacional Agraria La Molina. 60 p.
- de Oliveira, J., Moraes, M., Castilho, C. & Machado, N. (2023). *In vitro* development and acclimatization of *Cyrtopodium aliciae* L. Linden & Rolfe, an endemic species of the Chapada Diamantina. *Revista Ciencia Rural* 53 (5) 2023.
- de Sousa, C., Garcés, L., Inácio, K., Mota, D., Tadeu, S., Faria, P. (2017). Germinação e desenvolvimento *in vitro* de orquídea epífita do Cerrado. *Ornamental Horticultura*, 23 (1), 96-100.
- Dogan, M. (2020). Effect of salt stress on *in vitro* organogenesis from nodal explant of *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. and *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and their physio-morphological and biochemical responses. *Physiol Mol Biol Plants*, 26 (4), 803-816.
- Dutra, D., Kane, M., Richardson, L. (2009). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96, 235-243.
- García, G. F., Ramírez, M. A., Mata, H., López, A. V., López, R. (2024). *In vitro* conservation of *Notylia barkeri* Lindl. *Bio Ciencias*, 11, e1633.
- Hernández, F., Iracheta, L., Damon, A., Fernández, S., Guillén, K. (2023). Efecto del medio de cultivo y escotoperiodo en la germinación de semillas y crecimiento *in vitro* de *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E. Higgins (Orchidaceae). *Polibotánica*, 56 (28), 151-170.
- Hernández, D., Ortega, L. (2025). Muestreo y recolección de *Cyrtopodium schargellii* y *Trichocentrum nudum*, dos orquídeas epífitas presentes en el municipio de Sampués. Universidad de Sucre. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15472/rix1ig> accessed via GBIF.org on 2025-08-25.
- Hwang, J.E., Park, H.B., Jeon, D.Y., Park, H.J., Kim, S., Lee, C.W., Kim, Y.-J., Yoon, Y.-J. (2024). Effect of Different Basal Media and Organic Supplements on *In Vitro* Seedling Development of the Endangered Orchid Species *Dendrobium moniliforme* (L.) Swartz. *Plants*, 13 (19), 2721.
- Knudson, L. (1922). Non symbiotic germination of orchid seeds. *Bot Gaz* 73, 1-7.
- Mamani, B., Muriel, A., Maquera, A., Nova, M. (2022). Germinación *in vitro* de *Epidendrum secundum* con diferentes agentes gelificantes y concentraciones de agua de coco. *Acta Nova*, 10 (3), 345-359.
- Mamani, B., Nova, M., Espinal, J. (2022). Germinación *in vitro* de *Zigopetalum maculatum* con diferentes protocolos de desinfección y adición de agua de coco en el medio de cultivo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 9 (2), 26-36.
- Martínez, Y., Andrade, M., Colinas, M., Villegas, Ó., Castillo, A., Alia, I. (2015). Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (*Euphorbia leucocephala* L.) *Revista fitotecnia mexicana*, 38 (4), 369-374.

- Murashige, T., Skoog, F. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3), 473-497.
- Pierik, L. (1990). Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Madrid, España: Ediciones Mundiprensa, p45-82.
- Pujasatria, G., Miura, C., Kaminaka, H. (2020). *In Vitro* Symbiotic Germination: A Revitalized Heuristic Approach for Orchid Species Conservation. *Plants* 9 (12), 1742.
- Ramírez-Mosqueda, M., Iglesias-Andreu, L. (2015). Indirect organogenesis and assessment of somaclonal variation in plantlets of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Development Biology - Plant*, 51 (6), 683-692.
- Romero, G., Aymard, G., Carnevali, G. (2005). *Cyrtopodium schargellii* (cyrtopodiinae, orchidaceae), a new species from northern south america. *Harvard Papers in Botany*, 10 (1), 123-127.
- Ruíz, A. (2020). Germinación asimbiótica *in vitro* de *Sobralia macrantha* Lindl., una orquídea terrestre nativa de México. Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México, p 57.
- Utami, E, Setiti, A., Hariyanto, S., Manuhara, Y. (2017). *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm through mature seed culture. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7 (4), 329-335.
- Vargas, B., Corredor, J., Pescador, R., Montoya, F., Dal-Vesco, L., Mamoru, R. (2023). Morpho-anatomy of *in vitro* germination and cryopreservation of the orchid *Cattleya crispa* (Orchidaceae) Morfoanatomía de la germinación *in vitro* y criopreservación de la orquídea *Cattleya crispa* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical*, 71 (1), e52338.
- Vásquez, M., Morales, F., Rodríguez, P. (2021). Germinación y crecimiento *in vitro* de especies de orquídeas amenazadas en comunidades aledañas al Biotopo del Quetzal. Ciudad de Guatemala, Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, p6.
- Yoshida, F. Kobayashi, T., Yoshida, T. (1973). The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cells of tobacco I. Effects of salts, sucrose, Ca, Cl and B in the medium on the yield, friability, chlorophyll contents and mineral absorption of cells. *Plant Cell Physiol*, 14, 329-339.

Microbial Resistance as a Challenge: Therapeutic and Biotechnological Applications of Metabolites Produced by Bacteria of the *Bacillus* Genus. A descriptive review

La resistencia microbiana como desafío: aplicaciones terapéuticas y biotecnológicas de metabolitos producidos por bacterias del género *Bacillus*. Una revisión descriptiva

Juan Bautista Romero*, Nicolás Amaya Zambrano**, Abigail Martínez Torres***, Luis Ramiro Caso Vargas****, Candelario Vázquez Cruz*****, Patricia Sánchez Alonso*****, Norma Elena Rojas Ruiz *****,

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.113377

RESUMEN

Los procariotas fueron las primeras formas de vida que existieron en la Tierra hace 3500 millones de años y se cree que son los últimos organismos que quedaron tras la extinción de los organismos multicelulares. Las bacterias han establecido una estrecha relación con los seres humanos, que albergan el microbioma, donde estas interacciones pueden adoptar varias formas. Algunas son mutualistas, protegiendo al organismo de especies nocivas, produciendo metabolitos beneficiosos o estimulando el sistema inmunitario, mientras que otras pueden causar daño. Los antibióticos son los metabolitos microbianos más estudiados y utilizados por los seres humanos. Dado que la resistencia a los antibióticos se ha convertido en una preocupación mundial, la búsqueda de microorganismos capaces de producir nuevos antibióticos con potencial clínico ha cobrado cada vez más importancia. Se ha informado de que las bacterias pueden biosintetizar dos tipos de sustancias antimicrobianas: las bacteriocinas, que son de síntesis ribosómica, y los lipopéptidos, que son de síntesis no ribosómica. Los miembros del género *Bacillus* pueden producir lipopéptidos y otras sustancias antimicrobianas, como sideróforos, enzimas líticas, toxinas e inductores de resistencia sistémica en las plantas, lo que hace que este género sea de especial interés en la búsqueda de estos metabolitos. Este trabajo describe algunas especies del género *Bacillus* que producen metabolitos antimicrobianos relevantes para la salud y la biotecnología.

Palabras clave: *Bacillus*, antimicrobiano, resistencia, antibiótico, metabolito.

- * Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Biológicas. Licenciatura en Biotecnología. Puebla, Pue. México, <https://orcid.org/0009-0000-2809-2275>. juan.bauro@gmail.com
- ** Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Biológicas. Licenciatura en Biotecnología. Puebla, Pue. México, <https://orcid.org/0000-0002-5494-6972>. namayaz2400@alumno.ipn.mx
- *** Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Biológicas. Licenciatura en Biotecnología. Puebla, Pue. México, <https://orcid.org/0000-0003-2308-9397>. abigail.martinez@correo.buap.mx
- **** Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Ciencias Biológicas. Licenciatura en Biotecnología. Puebla, Pue. México, <https://orcid.org/0000-0002-4605-3170>. ramiro.caso@correo.buap.mx
- ***** Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Instituto de Ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Puebla, Pue. México, <https://orcid.org/0000-0002-9105-5669>. candelario.vazquez@correo.buap.mx
- ***** Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Instituto de Ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Puebla, Pue. México, <https://orcid.org/0000-0002-9313-3659>. maria.sanchez@correo.buap.mx
- ***** Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Instituto de Ciencias. Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Puebla, Pue. México, <https://orcid.org/0000-0001-6437-8078>. Autor por correspondencia: norma.rojasr@correo.buap.mx

ABSTRACT

Prokaryotes were the first living forms to exist on Earth 3.5 billion years ago and are believed to be the last organisms to remain after the extinction of multicellular organisms. Bacteria have established a close relationship with humans, who host microbiomes, where these interactions can take several forms. Some are mutualistic, protecting the body from harmful species, producing beneficial metabolites, or stimulating the immune system, while others can cause harm. Antibiotics are the most studied and widely used microbial metabolites by humans. As antibiotic resistance has become a global concern, the search for microorganisms capable of producing novel antibiotics with clinical potential has become increasingly important. It has been reported that bacteria can biosynthesize two types of antimicrobial substances: bacteriocins, which are of ribosomal synthesis, and lipopeptides, which are of non-ribosomal synthesis. Members of the genus *Bacillus* can produce lipopeptides and other antimicrobial substances such as siderophores, lytic enzymes, toxins, and inducers of systemic plant resistance, making this genus of particular interest in the search for these metabolites. This work describes some species of the genus *Bacillus* that produce antimicrobial metabolites relevant to health and biotechnology.

Keywords: *Bacillus*, antimicrobial, resistance, antibiotic, metabolite.

Recibido: septiembre 2 de 2024

Aprobado: 18 de octubre de 2025

INTRODUCTION

The *Bacillus* genus has been widely reported in the literature for its importance as a producer of various metabolites with antimicrobial activity against pathogenic bacteria, as well as its ability to synthesize compounds of biotechnological significance. Given the relevance of this genus, the objective of this review was to analyze the available information on *Bacillus* genus that synthesize compounds used in health and biotechnology.

In this work, a documentary review of scientific articles was conducted using PubMed, Google Scholar, Scopus, and Scielo, which are specialized search engines. The search query included keywords such as *Bacillus*, antimicrobial, resistance, antibiotic, and *Bacillus* metabolites. The articles reviewed mainly include those published within the past 10 years, but some highly cited older articles were also included.

Antibiotic resistance: definition, brief history and global impact

Antibiotic resistance is the ability of bacteria to survive and multiply despite exposure to antimicrobial agents designed to inhibit or kill them. Although it is a natural, evolutionary phenomenon, its prevalence and clinical significance have increased rapidly in recent decades due to the combined effects of inappropriate prescribing, incomplete treatment courses, widespread use in livestock farming and environmental pollution. Natural reservoirs in soil, water, and wildlife serve as a source of resistance genes that can be transferred to human pathogens through horizontal gene transfer. In ancient permafrost samples, β -lactamase genes have been found to predate human antibiotic use and illustrate the deep

evolutionary roots of resistance (Kochetkov, 2024; Larson & Flach, 2022).

The modern era of antibiotics began in the early 20th century with Paul Ehrlich's synthesis of Salvarsan for the treatment of syphilis, followed by Alexander Fleming's discovery of penicillin in 1928 and its mass production in the 1940s. This period, often called the golden age of antibiotics, saw the introduction of most major classes still in use today. These discoveries revolutionized healthcare, enabling complex surgical procedures and drastically reducing mortality from bacterial infections (Hutchings *et al.*, 2019; Laborda *et al.*, 2024).

However, resistance emerged soon after the introduction of each new antibiotic. Penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* was reported within two years of clinical use; methicillin-resistant strains appeared in 1960, tetracycline resistance in *Shigella* in the late 1950s and vancomycin-resistant enterococci in the late 1980s. This recurring pattern demonstrates the remarkable adaptability of bacterial populations (Uddin *et al.*, 2021).

Since the 1980s, the discovery and approval of entirely new classes of antibiotics with a broad spectrum of activity have become rare. Most recent approvals have been for derivatives of existing agents, with combinations of β -lactam and β -lactamase inhibitors comprising a large proportion of candidates. The lack of new agents, particularly those effective against multidrug-resistant Gram-negative bacteria, is due in part to the scientific challenges of identifying new drug targets and economic disincentives that have led many pharmaceutical companies to withdraw from antibiotic research (Iskandar *et al.*, 2022).

The global impact of resistance on health is significant. In 2019, resistant bacterial infections were responsible for approximately 1.27 million deaths and were associated with nearly 4.95 million deaths worldwide, surpassing mortality from HIV/AIDS and malaria. If current trends continue, annual deaths could reach 10 million by 2050. The burden is particularly high in low- and middle-income countries, where limited access to diagnostics, weaker surveillance systems, and higher levels of inappropriate antibiotic use contribute to rapid spread. High-risk pathogens include the ESKAPE group: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species, which cause multidrug-resistant hospital-acquired infections (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022; Church & McKillip, 2021).

The economic consequences are equally concerning. Drug-resistant infections are linked to longer hospital stays, more expensive treatments, higher mortality risk, and increased readmission rates. Poudel *et al.* (2023), reported that the additional cost per episode of resistant infection can be several times higher than for susceptible infections, with an average increase in hospitalization of 6–12 days. At the macroeconomic level, projections suggest that Antimicrobial Resistance (AMR) could reduce global Gross Domestic Product (GDP) by up to 3.8% by 2050, with low-income regions bearing the greatest economic burden.

Resistance is not confined to hospitals. Community-acquired resistant infections, driven by factors such as over-the-counter antibiotic sales and self-medication, are a growing concern. Environmental contamination from sewage, agricultural runoff, and pharmaceutical production can maintain selection pressure in natural ecosystems. In some cases, antibiotic concentrations in industrial effluents have been high enough to actively select for resistance (Larsson & Flach, 2022).

Addressing this crisis requires a coordinated One Health approach that integrates human, animal, and environmental health. This involves improving antibiotic stewardship, strengthening infection prevention, expanding surveillance, reducing environmental contamination, and investing in innovative therapeutic development. Among potential alternatives, bioactive metabolites from *Bacillus* species have attracted attention due to their structural diversity, unique mechanisms of action, and ability to bypass existing resistance pathways (Halawa *et al.*, 2024). Table 1 lists antimicrobial compounds produced by certain *Bacillus* species.

Characteristics of the genus *Bacillus*

Taxonomic Diversity

The genus *Bacillus* is a highly diverse group of rod-shaped, endospore-forming bacteria in the phylum Firmicutes (Turenne *et al.*, 2015). Historically, *Bacillus* served as a “catch-all” genus for aerobic spore-formers, but modern phylogenetic studies have redefined its scope. According

Table 1. Antibiotics produced by distinct species of the genus *Bacillus* are used in Medicine and Human Health.

Antibiotic produced	Used against	Species of the genus <i>Bacillus</i>	References
Bacitracin	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pantoea ananatis</i> , <i>Bacillus cereus</i> .	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Rukimi <i>et al.</i> , (2015)
Gramicidin	Gram-positive bacteria and certain Gram-negative bacteria	<i>AneuriniBacillus migulanus</i> (previously known as <i>Bacillus migulanus</i>)	Berditsch <i>et al.</i> , (2007)
Tyrocidine	<i>Salmonella typhi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , Gram-positive bacteria	<i>Bacillus aneurinolyticus</i>	Zhu <i>et al.</i> , (2021) Vosloo <i>et al.</i> , (2013)
Subtilin	<i>Listeria monocytogene</i> , Gram positive- and Gram-negative bacteria	<i>Bacillus.licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Halami (2019)
Polymyxin	Gram-negative bacteria	<i>PaeniBacillus polymyxa</i>	Stoica <i>et al.</i> , (2019)
Edeíne	<i>Conidia sp.</i> , Gram positive- and Gram-negative bacteria	<i>BreviBacillus brevis</i>	Yang <i>et al.</i> , (2023)
Butirosin	Gram-negative bacteria, molds, and yeast	<i>Bacillus circulans</i>	Kudo <i>et al.</i> , (2005)

to the most recent classifications, *Bacillus* comprises approximately 435 recognized species and 12 subspecies, although this number continues to grow as new species are described (Xu, 2025). Phylogenetically, the genus is divided into two main clades with no close evolutionary relationship to each other. The first is the “*Subtilis* clade,” often termed *Bacillus sensu stricto*, which includes the type species *Bacillus subtilis* and closely related species such as *B. licheniformis*, *B. pumilus*, and *B. amyloliquefaciens*. The second is the “*Cereus* clade,” also known as *Bacillus cereus sensu lato*, which encompasses *B. cereus* and several pathogenic or environmentally significant species, including *B. anthracis* (the anthrax *Bacillus*), *B. thuringiensis* (an entomopathogen), *B. mycoides*, *B. cytotoxicus*, and others. Notably, these two clades are sufficiently distinct that the genus *Bacillus* is polyphyletic unless additional related genera are included (Blanco Crivelli et al., 2024). Over the past few decades, many species formerly classified as *Bacillus* have been reassigned to separate genera as molecular data revealing deep divisions. For example, *PaeniBacillus* (Latin *paene*, “almost” a *Bacillus*) was established to include certain nitrogen-fixing and plant-associated bacilli (e.g. *PaeniBacillus polymyxa*) that diverged from the *Bacillus sensu stricto* lineage (Ash et al., 1991; Shida et al., 1997). Similarly, genera such as *BreviBacillus*, *GeoBacillus*, *LysiniBacillus*, and others were separated from the original *Bacillus* group following 16S rRNA analyses that identified at least five distinct clusters within the former genus (Patel & Gupta, 2020). In practice, *Bacillus sensu stricto* now refers to members of the *Subtilis* and *Cereus* clades, whereas organisms in the related genera (*PaeniBacillus*, *BreviBacillus*, etc.) differ in certain phenotypic and chemotaxonomic features despite sharing the ability to form endospores (Carroll, et al., 2022). For example, *PaeniBacillus* species are often Gram-variable (some even appear Gram-negative in older cultures) and typically ferment a broader range of sugars, distinguishing them from the most strictly aerobic profile of true *Bacillus* (Shida et al., 1997; Grady et al., 2016). Ongoing revisions of *Bacillus* taxonomy highlight the genus heterogeneity: recent phylogenomic proposals have introduced many new genera (e.g. *AlkalihaloBacillus*, *CytoBacillus*, *MesoBacillus*, *NeoBacillus*, *PeriBacillus*, *MetaBacillus*, *Evansella*, *Gottfriedia*, etc.) to separate genetically distant clades (Li, et al., 2024). Nonetheless, in practice, the name *Bacillus* still conventionally includes the two major clades mentioned, which together comprise many important species in medicine, industry, and agriculture (Harichi, 2022).

Common Microbiological Characteristics

The genus *Bacillus* includes a wide variety of Gram-positive, rod-shaped bacteria (a characteristic that gives them their name) that can be either strictly aerobic or facultative anaerobic. Their spores are refractive, meaning they reflect light, and can withstand high tempera-

tures due to their protective covering (Logan & Vos, 2015). They are generally motile by means of peritrichous flagella, enabling active movement in liquids and across surfaces; an exception is *B. anthracis* (and a few strains of *B. cereus*), which lack motility and instead form encapsulated, non-flagellated cells (Wales et al., 2023).

The optimal growth temperature for mesophilic *Bacillus* species is often in the 30–37°C range, though growth can occur from about 10°C up to approximately 45°C for many species. There are also extremophilic members: certain lineages (often reclassified into other genera) include thermophiles (e.g. *GeoBacillus* species) that grow at 55–75°C, as well as psychrotolerant strains isolated from permafrost or refrigerated foods that are capable of growth at approximately 4°C (Hassan, 2022).

Most *Bacillus* species prefer neutral pH, but some are remarkably alkalitolerant or acidtolerant. For instance, *B. alcalophilus* (now *AlkalihaloBacillus*) grows at around pH 9–10, while *B. coagulans* can produce lactic acid and tolerate pH below 5. Salt tolerance also varies: *Bacillus* species are generally not extreme halophiles but can cope with moderate salinity, with several species growing in up to 7–10% NaCl (Ibarra-Villarreal et al., 2021).

During sporulation, the cell divides asymmetrically into two parts: a small forespore and a large mother cell. The mother cell wraps around the forespore in a process called engulfment, enclosing it in a double membrane. The forespore then matures into a resistant, dormant spore, which is eventually released into the environment (Checinska et al., 2015). Sporulation is a multi-stage process: in stage 1, the genes involved are induced. At this point, endospore development can be interrupted if nutrients are supplied; however, once stage 2 begins, the process becomes irreversible and continues until the spore is fully formed (Fan et al., 2024; Tan & Ramamurthi, 2013).

Bacillus owes much of its ecological success to a rich array of biochemical capabilities shared among many of its species (Stülke et al., 2023). A prominent feature is the secretion of numerous hydrolytic enzymes into the environment. Soil-dwelling *Bacillus* use exoenzymes to degrade complex organic polymers; for example, *B. subtilis* and its relatives secrete proteases, amylases, cellulases, chitinases, lipases, and other enzymes that break down proteins, starch, plant cell walls, insect cuticle, and oils (Akinsemolu, 2024). This enzymatic versatility enables them to utilize diverse nutrients and positions certain *Bacillus* species as key industrial enzyme producers. Many *Bacillus* species are also known for producing secondary metabolites with bioactive properties. Genomic analyses show that *B. subtilis* devotes approximately 4–5% of its genome to genes involved in secondary me-

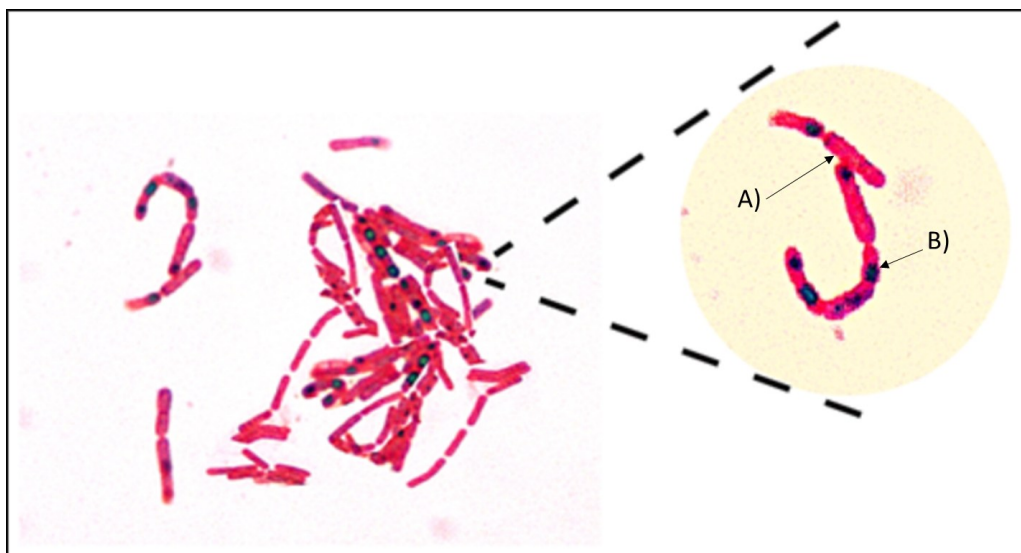


Figure 1. Illustrates the preparation of a *Bacillus subtilis* culture undergoing sporulation. The sample was stained using malachite green, whereby vegetative cells were stained red, and spores exhibited a green coloration. Malachite green staining of a sporulating *Bacillus subtilis* culture. A) Vegetative cell; B) Spore. Image by authors.

tabolite biosynthesis, reflecting dozens of different natural products (Blanco Crivelli *et al.*, 2024). Pigmentation in *Bacillus* is generally less conspicuous than in some other genera, but some species do form colony pigments. For example, *Bacillus subtilis* can produce yellow-brown carotenoids under certain conditions (Stannius *et al.*, 2025), *B. atrophaeus* (formerly *B. globigii*) forms a brown-black pigment (Kocak *et al.*, 2025), and *B. circulans* often shows orange colonies (Kao *et al.*, 2022). These pigments may play roles in protection against oxidative stress. More universally, *Bacillus* cells have robust stress responses: even in the vegetative (non-sporulated) state, they encode multiple DNA repair systems and antioxidant enzymes (catalases, superoxide dismutases) that confer tolerance to UV radiation and reactive oxygen species (Shrestha, 2025). Many *Bacillus* species also produce osmoprotectant compounds or adjust their membrane composition to withstand osmotic and temperature stresses (Valencia-Marin *et al.*, 2024).

Mobile genetic elements in *Bacillus* genomes – plasmids, transposons, insertion sequences, and bacteriophages – contribute significantly to strain-to-strain variation. Horizontal gene transfer is frequent among soil bacilli, which exchange plasmids and even chromosomal segments, rapidly spreading traits such as antibiotic production or resistance across species boundaries (Hinnekens *et al.*, 2008).

At the broader genus level, comparative genomics reveal an open pan-genome for *Bacillus*, especially when considering the full diversity of the genus. For example, in the *B. cereus* group (*sensu lato*), a recent pan-genomic

analysis of 114 genomes identified approximately 60,000 distinct genes in the pan-genome, of which only about 600 were core genes present in at least 99% of strains (Bazin, 2017).

Biotechnological and Ecological Importance

Bacillus species play diverse roles in biotechnology and ecology, making them among the most utilized and studied bacterial groups outside of medical pathogens. Ecologically, *Bacillus* functions as both beneficial symbionts and aggressive antagonists in various environments. Many *Bacillus* strains are prominent plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In soil and root environments, they benefit plants through several mechanisms (Miljaković *et al.*, 2020). *Bacillus* can enhance nutrient availability; for example, certain species fix atmospheric nitrogen symbiotically or solubilize insoluble phosphates, making these nutrients accessible to plants (Miljaković *et al.*, 2020). They also produce phytohormones such as indole-3-acetic acid (auxin) and cytokinins, which stimulate root growth. Additionally, *Bacillus*-colonized roots often exhibit induced systemic resistance (ISR), where the plant's innate defenses are primed by bacillar elicitors (siderophores, flagellin, lipopeptides, etc.), leading to enhanced resistance against pathogens (Linette Naveena, 2024). Because of these traits, formulations of *Bacillus* spp. are used as bio-fertilizers and biostimulants in sustainable agriculture. For instance, *B. velezensis* (formerly *B. amyloliquefaciens* FZB42) is a commercial inoculant known to improve crop vigor and suppress soil-borne diseases through its antimicrobial metabolites (Yang *et al.*, 2023).

Some notable members of the genus *Bacillus*

The genus *Bacillus* is one of the most widely distributed groups of bacteria in the biosphere. Gram-positive bacteria, including *Bacillus* species, have been isolated from nearly every environment studied by microbiologists (Zeigler & Perkins, 2021).

In medicine, species of the genus *Bacillus* gained prominence when Pasteur and Koch identified *B. anthracis* as the microorganism that causes anthrax at the end of the 19th century (Zeigler & Perkins, 2021). One of the *Bacillus* species with the greatest use and interest in fields such as industry, basic science, and medicine is *Bacillus subtilis*.

B. subtilis is a model organism frequently studied to gain insights into key metabolic processes, including cell division, sporulation, protein secretion, biofilm formation, and the synthesis of various secondary metabolites (Kovács, 2019).

B. subtilis was the first Gram-positive bacterium whose genome was sequenced. Its genome comprises 4,214,810 base pairs, including 4,100 protein-encoding genes (Kunst *et al.*, 1997); however, only 253 of these genes are required in vitro culture. The antimicrobial and antifungal properties are due to the bioactivity of secondary metabolites such as surfactin and plipastin (Kovács, 2019; Kunst *et al.*, 1997).

Another bacterium of the *Bacillus* genus important for the biological control of insect pests and vectors is *Bacillus thuringiensis*. This bacterium was first identified in 1901, when a microorganism infecting silkworms was reported

and initially named *Bacillus sotto*. Later, in 1915, it was isolated from diseased larvae of the moth *Ephesia kuehniella*, in the city of Thuringia, Germany, after which it was named *B. thuringiensis* (Sansinenea, 2012).

Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*.

A study published in The Lancet in 2022 analyzed 33 pathogenic bacteria associated with 11 types of infections across 204 countries for the year 2019. The results showed that these pathogens were responsible for 7.7 million deaths, representing 13.6% of all deaths worldwide, making them the second leading cause of mortality globally (Ikuta *et al.*, 2022). Many infectious pathogens, especially Gram-negative ones, have developed resistance to most conventional antibiotics; in some rare cases, they have even developed resistance to all available antibiotics (Davies & Davies, 2010; De Kraker *et al.*, 2016; World Health Organization: WHO, 2017). Among the options to address "superbugs" are antimicrobial peptides (AMPs), which are natural antibiotics encoded in the genome of some species of the genus *Bacillus* (Sumi *et al.*, 2015; Puan *et al.*, 2023). The synthesis of antimicrobial peptides by members of the genus *Bacillus* can be classified into two types: those synthesized by ribosomes and those produced independently of ribosomal activity (Stoica *et al.*, 2019; Sansinenea, 2012; Puan *et al.*, 2023).

B. subtilis produces three ribosomal antibiotics (TasA, subtilisin, and sublancin) and four non-ribosomal antibiotics (bacitracin, bacilisin, plipastatin, and surfactin) (Ikuta *et al.*, 2022; Stoica *et al.*, 2019; Sumi *et al.*, 2015).

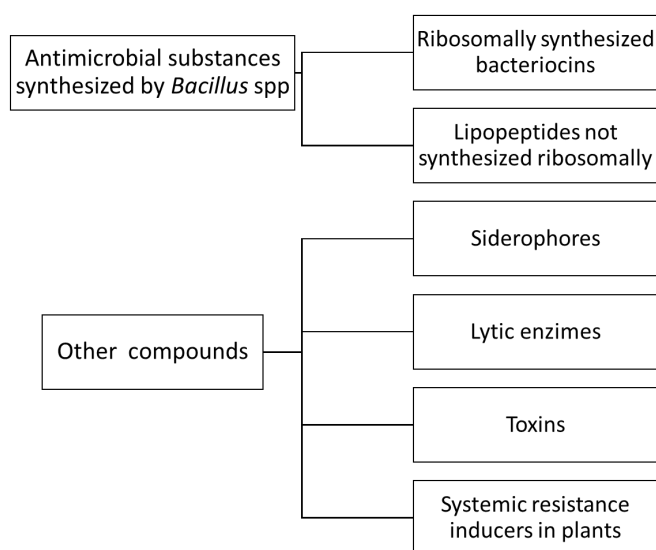


Figure 2. Metabolites are produced by the genus *Bacillus*. Image by authors

Members of the genus *Bacillus* also synthesize other compounds such as siderophores, lytic enzymes, toxins, and inducers of systemic plant resistance (Ikuta et al., 2022), Figure 2.

Antimicrobial compounds produced by ribosomal synthesis: Bacteriocins from *Bacillus* spp.

Bacteriocins are peptide toxins synthesized by ribosomes that inhibit bacterial growth. In Gram-positive bacteria such as *Bacillus* spp., they are encoded to release the toxin using specific bacteriocin transport systems, such as ABC transporters. They also have specific regulation of toxin production, preventing their metabolism from being affected by the excretion of this substance (Riley & Wertz, 2002).

Bacteriocins can be divided into two groups: those produced by ribosomal synthesis and bacteriocin-type inhibitory substances (SITB), which refer to antimicrobial compounds whose peptide nature has not been confirmed or that are produced by non-ribosomal synthesis (Abriouel et al., 2011). Although the latter have not been characterized, they can be quantified and replicated, which would allow the use of new substances produced by *Bacillus*.

One potential application of bacteriocins produced by *B. thuringiensis* is their use as additives in food preservation, due to their ability to inhibit the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Arenas & Melo, 2018).

Bacteriocins are polypeptide antibiotics, some of which are characterized by an amino acid chain that is sometimes circular, as in the case of polymyxin B, which is produced by *PaeniBacillus polymyxa* (formerly *Bacillus polymyxa*). The structure of polymyxin is shown in Figure 3.

Due to the toxicity of polymyxins, they are applied topically (Zeigler & Perkins, 2021). Some advantages of topically administered antibiotics are that they can be used on exposed wounds, maintain moisture at the injury site, and, by being administered directly at the site of infection, deliver a large amount of the active component directly to the pathogens, making the probability of generating drug resistance very low (Kovács, 2019).

The mechanism of action, depending on the drug concentration, is either bacteriostatic or bactericidal. It inhibits the incorporation of amino acids and nucleotides into the cell wall, blocks bacterial cell wall synthesis, inhibits the regeneration of phospholipid receptors involved in peptidoglycan synthesis, and can also damage already formed membranes, causing lysis and bacterial death (Sidek et al., 2018).

Antimicrobial compounds produced by non-ribosomal synthesis: Lipopeptides

Lipopeptides are cyclic or linear peptides with a lipophilic hydrocarbon tail at the N-terminus. *Bacillus subtilis* produces lipopeptides that exhibit antibiotic properties due to their toxic effects on organisms (Ajuna, 2024). Based on their length, these lipopeptides are classified as polypeptides. According to their structural characteristics, they can be further divided into categories, including polymyxins, polypeptides, and octapeptides.

Polymyxins exhibit strong antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. They exert their bactericidal effect by binding to the lipid A component of lipopolysaccharide (LPS), leading to disruption of the bacterial outer membrane (Ayoub, 2020).

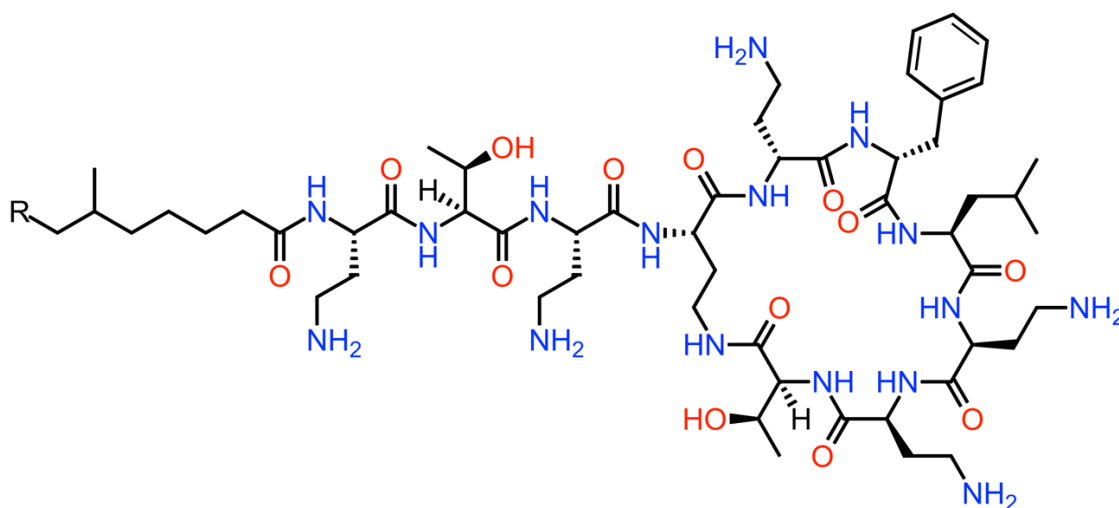


Figure 3. Polymyxin B structure. Image by authors.

Polypeptides demonstrate broad-spectrum antimicrobial activity, effective against Gram-negative, Gram-positive, and anaerobic bacteria (Bleam, 2012).

Octapeptides are cationic cyclic peptides produced by *Bacillus* spp. They also display a broad spectrum of activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria (Velkov *et al.*, 2017).

Some important lipopeptides

Bacitracin is the most important cyclic polypeptide antibiotic produced by *B. subtilis* and is active against Gram-positive bacteria. It is used as an anti-infective agent in various pharmaceutical preparations, including sprays, topical lotions, ointments, and skin creams. The bactericidal activity of bacitracin results from its ability to inhibit cell wall synthesis (Setlow, 2014).

Bacitracin was discovered in 1943 and is produced by the sporulated bacterium *B. subtilis*. This microorganism was isolated from an exposed tibial fracture suffered by a girl named Margaret Tracey. The name of bacitracin comes from combining "Baci," referring to the bacterium, and Tracey's last name. *B. subtilis* was found to produce an antibiotic substance that acted as a bacteriostat against various microorganisms. Experimental tests on mice inoculated with minimally lethal doses of bacterial agents (hemolytic *Streptococcus*) demonstrated that bacitracin inhibited the growth of these pathogens (Tan & Ramamurthi, 2013). The structure of bacitracin is shown in Figure 4.

Considering these findings and its low toxicity in animals, including humans, the development of bacitracin for production was initiated. Although the process faced several setbacks, large-scale manufacturing was eventually achieved. However, due to its nephrotoxic properties, this drug should not be applied to deep wounds, as there is a risk of systemic spread through the circulatory system (Saha *et al.*, 2015).

Bacillus siderophores

Siderophores are low molecular weight molecules (400–1000 kDa) secreted by microorganisms under iron-deficient conditions. They can sequester Fe^{3+} ions from their environment, forming ferri-siderophore metal complexes. This process is driven from the cytoplasm by the TonB transport protein system, which transduces the necessary energy from the cytosol to the outer membrane (Saha *et al.*, 2015).

Microorganisms can utilize siderophores depending on their membrane receptors, either by a) using the Fe^{3+} siderophore complex at the membrane or b) reducing Fe^{3+} complexes extracellularly. Based on this function, siderophores are classified into three main categories: hydroxamates, catecholates, and carboxylates (Mohamed *et al.*, 2018).

Bacillus lytic enzymes

It has been reported that species of the genus *Bacillus* are prolific producers of enzymes, and, due to their broad environmental distribution and ease of cultivation, they represent a potential source for the isolation of vari-

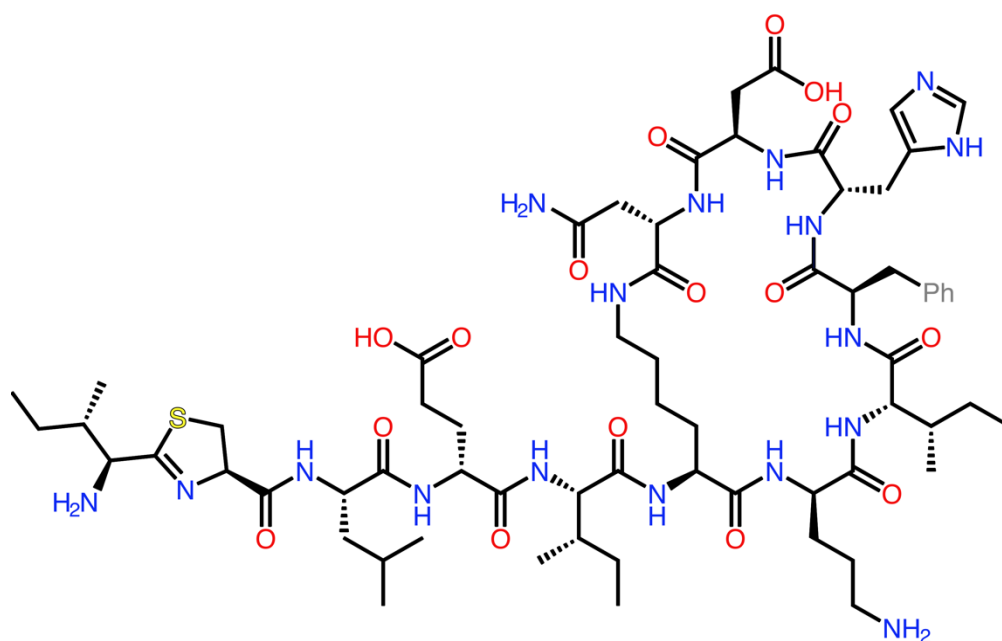


Figure 4. Structure of Bacitracin A. Image by authors.

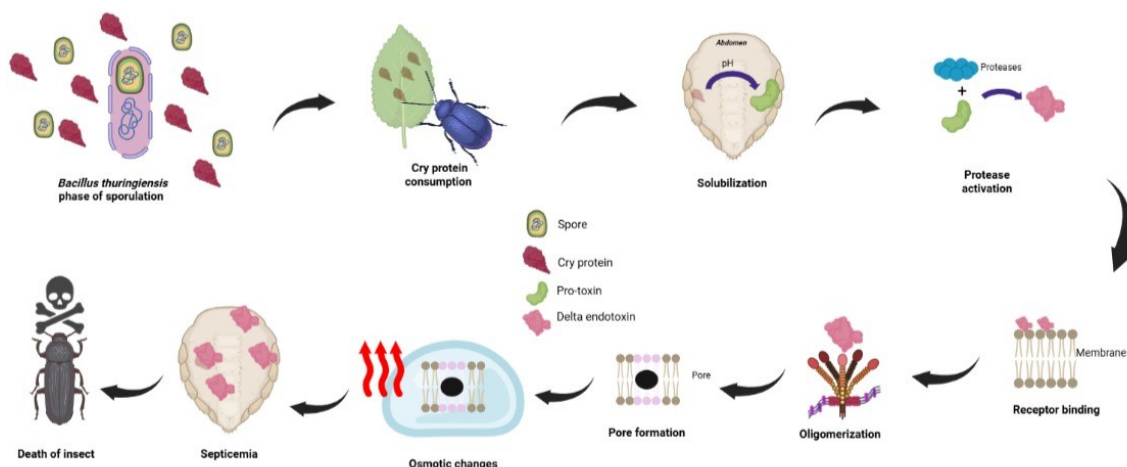


Figure 5. Process of toxins from *B. thuringiensis* against insects. Image by authors.

ous compounds of interest. Within the broad spectrum of enzymes, a group of special interest in the agronomic area is the lytic enzymes, which constitutes one of the most diverse groups of proteins in terms of possessing antimicrobial properties (Danilova & Sharipova, 2020).

Lytic enzymes such as chitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases, proteases, and lipases are natural antimicrobials that depolymerize the peptidoglycan of the cell wall of target bacterial cells and cause rapid cell lysis, in fungi they deteriorate their cell wall affecting the glycosidic bonds of its glycoproteins and polysaccharides, thus causing cell lysis and death, at the same time this action allows the release of chitin and glucan oligomers, which function as elicitors of plant defenses (Jha *et al.*, 2014)

Toxins

Bacillus cereus is an important microorganism in the food industry, as it is considered one of the main causative agents of food poisoning. It produces two types of toxins: enterotoxins and emetics (Jovanovic *et al.*, 2021).

B. thuringiensis is a bacterium commonly used as a biological control agent due to its ability to produce toxic protein crystals during the stationary growth phase and sporulation. These crystals, known as Cry proteins, are highly specific and effective against insect pests and vectors. Although primarily insecticidal, some Cry proteins have also been reported to exhibit activity against other organisms, including nematodes, gastropods, and even cancer cells, as illustrated in Figure 5. In the insect digestive tract, these proteins must first be solubilized; the resulting protoxins are then activated by proteases, producing the active form of the toxin (delta endotoxin),

which binds to specific receptors on the intestinal membrane. This interaction leads to pore formation, disrupts the osmotic balance, and ultimately causes cell lysis. *B. thuringiensis* also produces other toxins, such as cytolytic proteins (Cyt), which are synthesized during the stationary phase, and vegetative insecticidal proteins (Vip), which, unlike the former, are associated with the vegetative phase of the cell and are secreted in soluble form; therefore, they do not require proteolytic activation (Gupta & Kumar, 2021).

Plant resistance inducers

The induction of plant growth and resistance to pathogens by *Bacillus* species can occur directly or indirectly. The direct mechanism involves bacteria capable of biological nitrogen fixation, solubilization of essential minerals for plant development, production of regulatory hormones, and activation of plant defense mechanisms. These functions are performed by bacterial species found in the plant's rhizosphere. The indirect mechanism involves the production of endotoxins that act as pathogen antagonists, such as the Cry proteins produced by *B. thuringiensis* (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

Bacillus spp. is considered a plant growth-promoting bacteria due to its production of plant hormones such as gibberellic acid and indole-3-acetic acid, which are closely related to nutrient availability for plants. *B. subtilis* is known for inducing the synthesis of jasmonic acid, ethylene, and non-expressor of pathogenesis-related genes 1 (NRP1), which promotes defense and restricts cell death by forming condensates that target specific substrates to degrade them (Hashem & Tabassum, 2019; Zavaliev *et al.*, 2020).

CONCLUSION

Currently, the search for new drugs that effectively address antimicrobial resistance is of the utmost importance.

Members of the genus *Bacillus* are an important group of microorganisms that produce a wide range of bioactive metabolites, including several with antibiotic properties, such as bacitracin and polymyxin B. Other metabolites provide a competitive advantage to the microorganisms that synthesize them, as seen with siderophores, lytic enzymes, toxins, and resistance inducers in plants. Due to the broad diversity of metabolites produced by species of this genus and their widespread distribution in nature, they represent a promising alternative in the search for new antibiotics.

Acknowledgments

We thank VIEP-BUAP for supporting the research stay project of the Doing Science program at BUAP 2022 with the project "Secondary metabolites produced by bacteria of the genus *Bacillus* and their biotechnological application" and the Project BUAP VIEP-2025-100103133 (CA-323).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* Bacteriocins. *Fems Microbiology Reviews*, 35(1), 201-232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Akinsemolu, A. A., Onyeaka, H., Odion, S., & Adebajo, I. (2024). Exploring *Bacillus subtilis*: Ecology, biotechnological applications, and future prospects. *Journal of Basic Microbiology*, 64(6), 2300614.
- Ajuna, H. B., Lim, H. I., Moon, J. H., Won, S. J., Choub, V., Choi, S. I., & Ahn, Y. S. (2024). The prospect of antimicrobial peptides from *Bacillus* species with biological control potential against insect pests and diseases of economic importance in agriculture, forestry and fruit tree production. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 38(1), 2312115.
- Arenas, N. E., & Melo, V. M. (2018). Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: revisión sistemática. *Infectio*, 22(2), 110. <https://doi.org/10.22354/in.v22i2.717>
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., & Collins, M. D. (2008). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 13(4), 202-206. doi:10.1111/j.1472-765x.1991.tb00608.x
- Ayoub Moubareck, C. (2020). Polymyxins and bacterial membranes: a review of antibacterial activity and mechanisms of resistance. *Membranes*, 10(8), 181.
- Bazinet, A. Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. *BMC Evol Biol.*, 17, 176 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1020-1>
- Berditsch, M., Afonin, S., & Ulrich, A. S. (2007). The ability of *AneuriniBacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6620-6628.
- Bleam, W. F. (2012). Natural organic matter and humic colloids. *En Elsevier eBooks* (209-256). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415797-2.00006-6>.
- Carroll, L. M., Pierneef, R., Mathole, A., Atanda, A., & Matle, I. (2022). Genomic sequencing of *Bacillus cereus sensu lato* strains isolated from meat and poultry products in South Africa enables inter-and intranational surveillance and source tracking. *Microbiology Spectrum*, 10(3), e00700-22.
- Checinska, A., Paszczynski, A., & Burbank, M. (2015). *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annual review of food science and technology*, 6(1), 351-369.
- Church, N. A., & McKillip, J. L. (2021). Antibiotic resistance crisis: Challenges and imperatives. *Biologia*, 76(5), 1535-1550. doi:10.1007/s11756-021-00697-x
- Danilova, I. V., & Sharipova M.P. (2020). The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>
- De Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. J. (2016). Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLOS Medicine*, 13(11), e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
- Fan, L., Zhang, Y., Ismail, B. B., Muhammad, A. I., Li, G., & Liu, D. (2024). *Bacillus* spore germination: mechanisms, identification, and antibacterial strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(30), 11146-11160.
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *PaeniBacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 203. doi:10.1186/s12934-016-0603-7
- Gupta, M., Kumar, H., & Kaur, S. (2021). Vegetative insecticidal protein (Vip): a potential contender from

- Bacillus thuringiensis* for efficient management of various detrimental agricultural pests. *Frontiers in microbiology*, 12, 659736.
- Halami, P. M. (2019). Sublentin, a new subtilin-like lantibiotics of probiotic bacterium *Bacillus licheniformis* MCC 2512T with antibacterial activity. *Microbial Pathogenesis*, 128, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.044>
- Halawa, E. M., Fadel, M., Al-Rabia, M. W., Abdo, M., & Others. (2024). Antibiotic action and resistance: Updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1305294. doi:10.3389/fphar.2023.1305294
- Harirchi, S., Sar, T., Ramezani, M., Aliyu, H., Etemadifar, Z., Nojoumi, S. A., & Taherzadeh, M. J. (2022). Bacillales: from taxonomy to biotechnological and industrial perspectives. *Microorganisms*, 10(12), 2355.
- Hashem, A., & Tabassum, B. (2019). *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291-1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hassan, Z. H. (2022). Psychrotolerant *Bacillus cereus*: An emerging pathogen from foodborne diseases. *International Food Research Journal*, 29(3).
- Hinneken, P., Fayad, N., Gillis, A., & Mahillon, J. (2022). Conjugation across *Bacillus cereus* and kin: A review. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1034440.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008
- Ibarra-Villarreal, A. L., Gándara-Ledezma, A., Godoy-Flores, A. D., Herrera-Sepúlveda, A., Díaz-Rodríguez, A. M., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2021). Salt-tolerant *Bacillus* species as a promising strategy to mitigate the salinity stress in wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum). *Journal of Arid Environments*, 186, 104399.
- Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Aguilar, G. R., Sharara, F., Meštrović, T., Gray, A. P., Weaver, N. D., Wool, E., Han, C., Hayoon, A. G., Aali, A., Abate, S. M., Abbasi-Kangevari, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abd-Elsalam, S., Abebe, G., Abedi, A., Abhari, A. P., Abidi, H., Naghavi, M. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10369), 2221-2248.
- Iskandar, K., Murugaiyan, J., Hammoudi Halat, D., El Hage, S., Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., Van Dongen, M. (2022). Antibiotic discovery and resistance: The chase and the race. *Antibiotics*, 11(2), 182. doi:10.3390/antibiotics11020182
- Jang, S., Choi, S. K., Zhang, H., Zhang, S., Ryu, C. M., & Kloepper, J. W. (2023). History of a model plant growth-promoting rhizobacterium, *Bacillus velezensis* GB03: from isolation to commercialization. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1279896.
- Jha S, Kumar C, Modi H. (2014). Microbial chitinases: Manifestation and prospective. En: Garg N, Aeron A, editor(s). Microbes in Process. Portland, ME, USA.: Nova Science publisher. p. 151-162.
- Jovanovic, J., Ornelis, V. F., Maddar, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719-3761.
- Kao, H. J., Balasubramaniam, A., Chen, C. C., & Huang, C. M. (2022). Extracellular electrons transferred from honey probiotic *Bacillus circulans* inhibits inflammatory acne vulgaris. *Scientific Reports*, 12(1), 19217.
- Kocak, K., Altin Yavuz, A., Berberler, S., & Filik Iscen, C. (2025). Optimisation of Laccase Activity From *Bacillus atrophaeus* Using Response Surface Methodology: A Proof-Of-Concept Dye Decolourisation Study. *Environmental Microbiology Reports*, 17(4), e70138.
- Kochetkov, S. N. (2024). Antibiotic resistance: Threats and search for solution. *Molecular Biology*, 58(6), 971-979. doi:10.1134/S0026893324700511
- Kovács, Á. T. (2019). *Bacillus subtilis*. Trends in Microbiology, 27(8), 724-725. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>
- Kudo, F., Numakura, M., Tamegai, H., Yamamoto, H., Eguchi, T., & Kakinuma, K. (2005). Extended sequence and functional analysis of the butirosin biosynthetic gene cluster in *Bacillus circulans* SANK 72073. *The Journal of antibiotics*, 58(6), 373-379.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B. E., Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249-256. <https://doi.org/10.1038/36786>
- Laborda, P., Gil-Gil, T., Martínez, J. L., & Hernando-Amado, S. (2024). Preserving the efficacy of antibiotics to tackle antibiotic resistance. *Microbial Biotechnology*, 17(7), e14528. doi:10.1111/1751-7915.14528
- Larsson, D. G. J., & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257-269. doi:10.1038/s41579-021-00649-x
- Li, Y., Zhang, D., Bo, D., Peng, D., Sun, M., & Zheng, J. (2024). A taxonomic note on the order Caryophanales: description of 12 novel families and emended description of 21 families. *International*

- Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 74(11), 006539.
- Linnet Naveena, M. (2024). Plant growth-promoting traits of *Bacillus* and related genera. In Applications of *Bacillus* and *Bacillus* derived genera in agriculture, biotechnology and beyond (pp. 55-69). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Logan, N. A., & Vos, P. D. (2015). *Bacillus*. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, 1-163.
- Miljakoviæ, D., Marinkoviæ, J., & Baleševiæ-Tubiæ, S. (2020). The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, 8(7), 1037.
- Mohamed, E., Farag, A. G. A., & Youssef, S. A. (2018). Phosphate solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens*; isolated from tomato plant rhizosphere. *Journal of Environmental Protection*, 09(03), 266-277. <https://doi.org/10.4236/jep.2018.93018>
- Poudel, A. N., Zhu, S., Cooper, N., Roderick, P., & Else, H. (2023). The economic burden of antimicrobial resistance: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 873989. doi:10.3389/fcimb.2022.873989
- Puan, S. L., Erriah, P., Baharudin, M. M. A. A., Yahaya, N. M., Kamil, W. N. I. W. A., Ali, M. S. M., & Sabri, S. (2023). Antimicrobial peptides from *Bacillus* spp. and strategies to enhance their yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(18), 5569-5593.
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 117-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Rukmini, M., Sahoo, D., Dalei, J., & Ray, R. (2015). Production, purification and characterization of bacitracin from *Bacillus subtilis*. *The Pharma Innovation Journal*, 3, 77-82.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2015). Microbial siderophores and their Potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3984-3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>
- Sansinenea, E. (2012). Discovery and description of *Bacillus thuringiensis*. *En Springer eBooks* (pp. 3-18). https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2_1
- Setlow, P. (2014). Spore resistance properties. *Microbiology spectrum*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0003-2012>
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K., & Komagata, K. (1997). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *PaeniBacillus* and emended description of the genus *PaeniBacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 289-298. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-289>
- Shrestha, P., Kim, B., Han, S. R., Lee, H., & Oh, T. J. (2025). Unraveling the genetic mechanisms of UV radiation resistance in *Bacillus* through biofilm formation, sporulation, and carotenoid production. *Genomics*, 111066.
- Sidek, N. L. M., Halim, M., Tan, J. S., Abbasiliasi, S., Mustafa, S., & Ariff, A. (2018). Stability of Bacteriocin-Like inhibitory substance (BLIS) produced by *Pediococcus acidil*.

Evaluación de la producción de exopolisacáridos a partir de *Lactobacillus fermentum* L14

Evaluation of the production of exopolysaccharides from *Lactobacillus fermentum* L14

Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza*,

Diana Carolina Villán Larios**, Harold Yesid Bermon Bayona***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n2.93847

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la capacidad de producción de exopolisacáridos (EPS) que posee el aislado nativo *Lactobacillus fermentum* L14, cepa perteneciente al banco de cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander. Se emplearon como medios de cultivo residuos agroindustriales como el lactosuero-ácido y la harina de arroz paddy. Para ello se realizó un diseño factorial 2^2 con tres repeticiones donde se evaluó la temperatura (20 °C y 30 °C) y medio (lactosuero-ácido y la harina de arroz paddy) con una concentración de sustrato 10% (p/v), todos los experimentos fueron evaluados en volúmenes de 200 mL. Como resultado se logró obtener 20 g/L y 30 g/L de exopolisacáridos para los medios de cultivo de lactosuero y harina de arroz, respectivamente. El análisis de varianza ANOVA determinó que los factores “medios” y “temperatura” fueron significativos en la producción de EPS con un ($p < 0.05$). Además, se caracterizó la composición del polisacárido obtenido a través de metodología HPLC (sacarosa 60%, glucosa 11,72% y fructosa 3,03%). Se evidencia el gran potencial que tienen los residuos agroindustriales como sustratos ideales para la producción de exopolisacáridos (EPS) a través de bacterias ácido lácticas (BAL).

Palabras claves: *Lactobacillus fermentum* – exopolisacáridos – residuos agroindustriales – bacterias ácido lácticas (BAL).

ABSTRACT

In the present work the exopolysaccharide (EPS) production capacity of the native isolate *Lactobacillus fermentum* L14, a strain belonging to the Francisco de Paula Santander University strain bank, was studied. Agroindustrial residues such as acid whey and paddy rice flour were used as culture media. For this, a 2^2 factorial design was carried out with three repetitions where the temperature (20 °C and 30 °C) and medium (acid whey and paddy rice flour) were evaluated with a substrate concentration of 10% (p / v), all experiments were evaluated in volumes of 200 mL. As result, it was possible to

*, **, *** Universidad Francisco de Paula Santander. Departamento de Ciencias del medio ambiente, #0-a Av Gran Colombia No. 12E -96, CP:540003, Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-6748-4781>, e-mail: yanethamparomp@ufps.edu.co

** Universidad Francisco de Paula Santander. Departamento de Ciencias del medio ambiente, <https://orcid.org/0000-0002-9497-4521>, e-mail: carolarios.312@gmail.com, Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.

*** Universidad Francisco de Paula Santander. Departamento de Ciencias del medio ambiente, e-mail: <https://orcid.org/0000-0002-1529-8183>, e-mail: yessbermon@gmail.com, Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.

obtain 20 g/L and 30 g/L of exopolysaccharides for the culture media of acid whey and rice flour, respectively. The analysis of variance ANOVA determined that the factors “culture media” and “temperature” were significant in the production of EPS with a ($p < 0.05$). Also, the composition of the polysaccharide obtained was characterized through HPLC methodology (sucrose 60%, glucose 11.72%, and fructose 3.03%). The great potential of agro-industrial residues as ideal substrates for the production of exopolysaccharides (EPS) through lactic acid bacteria (LAB) is evidenced.

Keywords: *Lactobacillus fermentum* - exopolysaccharides - agro-industrial waste - lactic acid bacteria (BAL).

Recibido: febrero 27 de 2023

Aprobado: 15 de agosto de 2025

INTRODUCCIÓN

Los exopolisacáridos microbianos (EPS) comprenden un amplio grupo de polímeros secretados por la mayoría de los microorganismos que están unidos a la superficie celular (polisacáridos capsulares) o liberados como limo extracelular (polisacáridos extracelulares) (Nachtigall *et al.*, 2020). Este tipo de moléculas ofrece un amplio espectro de aplicaciones en la industria alimentaria, ya que son utilizados como espesantes, estabilizadores, emulsionantes y agentes gelificantes; mejorando la reología y la textura de los alimentos fermentados (Hassan *et al.*, 2003). Además, tienen la capacidad de mejorar la salud humana debido a sus actividades antioxidantes, antitumorales, antiulcerosas, inmunomoduladoras o reductoras del colesterol (Lee *et al.*, 2018). Los EPS también ayudan a los prebióticos a sobrevivir al ácido gástrico y a las sales biliares en el tracto gastrointestinal (Aa *et al.*, 2009; Hutchison *et al.*, 2019). Se ha visto que los EPS contribuyen a un aumento en el tiempo de residencia de la leche fermentada ingerida en el tracto gastrointestinal, apoyando así la colonización transitoria por bacterias probióticas (Angelin & Kavitha, 2020).

La producción de EPS en condiciones de laboratorio, se realiza usualmente empleando medios de cultivo definidos, con una elevada relación carbono / nitrógeno, donde la cantidad de nitrógeno induce a la limitación del crecimiento y el carbono estimula la producción de EPS (Song *et al.*, 2020). A escala industrial, se usa el mismo principio. Sin embargo, por motivos económicos, se emplean sustratos generalmente complejos, obtenidos a partir de subproductos de actividades agroindustriales. Por ejemplo, la producción de dextrano se realiza mediante fermentaciones bacterianas, donde el sustrato comúnmente empleado es la sacarosa en concentraciones aproximadas de 5%, y en fermentación enzimática puede ser la rededor del 20%, para obtener una concentración de dextrano de 20 g/L. Han sido pocos los estudios referidos al uso de otros sustratos para la producción de polisacáridos; el Centro de Investigación Biotecnológica de Irán, realizó una investigación sobre

la producción de dextrano a partir de fuentes económicas del país, como melazas de remolacha y extracto de salvado de trigo, con lo cual lograron una concentración de 9,44 g/L de dextrano (Behravan *et al.*, 2003).

El uso de suero ácido y harina de arroz paddy como sustratos de fermentación económicos para la producción de polisacáridos, contribuiría al empleo de estos subproductos agroindustriales ayudaría a disminuir la eliminación de estos productos. Teniendo en cuenta lo anterior, en la presente investigación, se evalúa el uso de lacto suero ácido y harina de arroz paddy, para la producción de exopolisacáridos (EPS).

MATERIALES Y METODOS

Mantenimiento de la cepa

La cepa empleada en esta investigación fue *Lactobacillus fermentum* L14, la cual fue aislada del fermento de masato (bebida autóctona tradicional de Norte de Santander-Colombia) e identificada genéticamente mediante la amplificación del ARN ribosomal 16S. La cepa fue conservada en viales por el método de ultra congelación utilizando glicerol a 3% como crioprotector y como base aislante solución salina al 0.85%, con una concentración del nivel 5 en el estándar de Macfarland a una temperatura de -80 °C. Para mantener el banco de trabajo de la cepa se utilizó agar nutritivo suplementado al 5 % de sacarosa, previamente esterilizado a 121° C/15minutos e incubadas a 37°C/5-7 días.

Control de calidad

Para asegurar la viabilidad del banco de células de trabajo, se realizaron ensayos de pureza microbiana tomando un vial de conservación y realizando pases en un medio de agar nutritivo suplementado con 5 % de sacarosa, también se realizaron pruebas bioquímicas como el agar hierro triple azúcar (TSI), agar indol sulfato motilidad (SIM) y caldo Voges-Proskauer (VP); con el fin de verificar la actividad biológica de la cepa. Finalmente, se realizaron pruebas de tinción de Gram para verificar la morfología de la cepa de *Lactobacillus fermentum* L14.

Condiciones de cultivo

Las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo con el fin de evaluar una muestra cero. Las fermentaciones se realizaron en volúmenes de 200 mL en recipientes de vidrio de forma cilíndrica con capacidad de 1 L. El inóculo empleado fue de 10% v/v proveniente de cultivos en medio de agar nutritivo suplementado al 5 % de sacarosa, donde se habían cultivado previamente las bacterias, la temperatura del cuarto de cultivo se mantuvo a 20 °C y 30 °C. Se tomaron muestras cada 3 h, con un tiempo total de fermentación de 48 h. De la misma manera, se realizaron las fermentaciones con los medios agroindustriales a base de lactosuero ácido y harina de arroz paddy. Durante el proceso de investigación se contó con lactosuero ácido suministrado por la microempresa DOS VENTANITAS de la ciudad de Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. El lactosuero fue sometido a un proceso de clarificación con el fin de eliminar trazas de lactosa en el medio. También se tomaron muestras de arroz paddy proporcionada por FEDEARROZ de la ciudad de Cúcuta, Norte de Santander, Colombia. El crecimiento de biomasa fue determinado por densidad óptica (OD) a 600 nm (Kieliszek *et al.*, 2016), y la cantidad de carbohidratos totales se determinó cualitativamente por el método fenol-ácido sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956).

Extracción y purificación del exopolisacárido (EPS)

Las muestras tomadas de las fermentaciones de *L. fermentum* L14 cultivadas en los medios alternativos, se centrifugaron (1030 rcf, 15 min, 4 °C), para eliminar las células es suspensión. Al sobrenadante se le añadió etanol 96% frío en una proporción 1:10 y se almacenó a 4 °C durante 24

h, para precipitar el EPS. Después, se centrifugó la solución homogenizada (800 rcf, 15 min, 4 °C) para eliminar el etanol. El sedimento se re-suspendió en agua destilada, agitando por 5 min y luego se centrifugó (2800 rcf, 15 min, 4 °C). Finalmente, el EPS fue sometido a 97 °C en mufla 1h con el fin de eliminar el máximo contenido de agua de la producción. La cuantificación de los niveles totales de carbohidratos se realizó utilizando el método de fenol-sulfuro (DuBois *et al.*, 1956). Se usó como estándar una solución purificada de carboximetilcelulosa de viscosidad media (López-Legarda *et al.*, 2017).

Caracterización del polímero

La caracterización del polímero producido se realizó mediante la técnica de HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia). Este procedimiento fue realizado en el laboratorio de análisis de alimento CICTA, de la Universidad Industrial de Santander (UIS) – Sede Bucaramanga. Donde se utilizó un cromatógrafo líquido HPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 equipado con desgasificador, inyector automático, columna ICE ICsep-COREGEL 107-H (300mm×7,8mm×10µm) acoplada a un horno con temperatura de 30 °C, empleando un detector UVVis en serie con un detector RI a 30 °C. Se utilizó como fase móvil H₂SO₄ 5mM en modo isocrático con un flujo de 0,6 mL/min (Zapata *et al.*, 2007).

Análisis estadístico

Con base en la literatura consultada y experimentaciones previas realizadas en el laboratorio, el diseño propuesto fue un modelo factorial con dos factores: “temperatura” (20°C y 30°C) y “medio de culti-

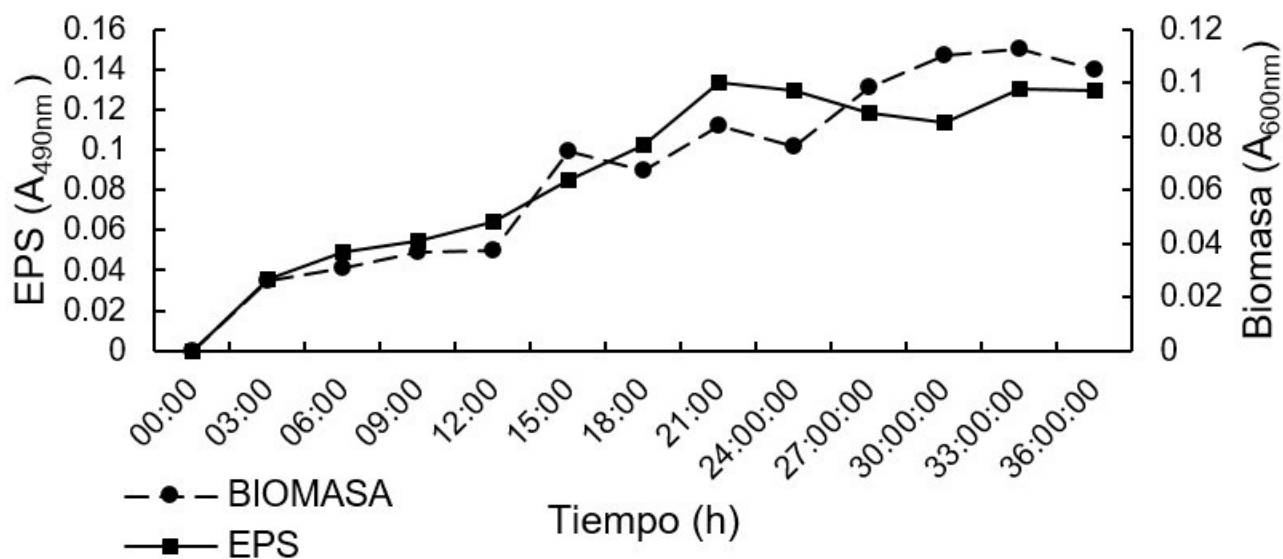


Figura 1. Crecimiento de *Lactobacillus fermentum* L14 en caldo nutritivo OD 600nm vs producción de exopolisacáridos OD 490nm. Los resultados presentados son el promedio de 2 repeticiones.

vo" (lactosuero-ácido y harina de arroz paddy), con la hipótesis planteada: ambos factores tienen efecto sobre la producción de biomasa y exopolisacáridos de *L. fermentum* L14 en condiciones de cultivo sumergido. Todos los experimentos se repitieron 3 veces. Y se realizó un ANOVA bidireccional utilizando el software SPSS. Las medias se compararon mediante la prueba Tukey a $P = 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Cinética de crecimiento de *Lactobacillus fermentum* L14 y producción de exopolisacáridos

A partir de los datos obtenidos de crecimiento de biomasa y producción de exopolisacáridos, durante el periodo de fermentación de 48 horas se puede observar en la Figura 1. que *Lactobacillus fermentum* L14 alcanzó su máximo crecimiento en biomasa microbiana entre las 30 – 33 horas de cultivo y luego disminuyó progresivamente; los valores de EPS fueron aumentando durante las primeras 21 horas de cultivo y fueron disminuyendo continuamente hasta poco después de que la fermentación entro en fase estacionaria en el crecimiento microbiano. Por otra parte, hubo poca variabilidad de los valores obtenidos entre las réplicas realizadas.

Los resultados obtenidos concuerdan con varias investigaciones que resaltan la capacidad que tienen las bacterias ácido lácticas para producir EPS, por ejemplo *Lactobacillus fermentum* MC3 el cual fue aislado de una fermentación de brotes de bambú, logro producir 88.776 mg/L de EPS en caldo MRS a 37 °C para una fermentación de 48 h (Do et al., 2020). Por otra parte, *Lactobacillus fermentum* MTCC 25067 produce un heteroexopolisacárido (HePS) cuando se cultiva en caldo MRS durante una fermentación de 144 h con temperatura de 30 °C

y en ausencia de agitación para estimular la actividad enzimática del microorganismo (MENGI et al., 2020). Además, son varios los esfuerzos que se han realizado para mejorar los rendimientos de producción de EPS en BAL ya que son bacterias con importancia por ser consideradas seguras (Torino et al., 2015), investigaciones han demostrado que tiempos de incubación muy largos pueden generar pérdidas de polímero debido a la actividad enzimática degradadoras de EPS (Pham et al., 2000). También, la calidad y cantidad producida de EPS está influenciada por la especie de microorganismo que se usa para el proceso. Especies como *Lb. fermentum* TDS030603 (Fukuda et al., 2010), *Lb. fermentum* F6 (Zhang et al., 2011) y *Leu. pseudomesenteroides* (Yang et al., 2018) fueron capaces de producir 97,1 mg / L, 33,05 mg / L y 12,5 g / L de EPS, respectivamente. Trabajos realizados con *L. delbrueckii* para evaluar la producción y composición de EPS en medios químicamente definidos revelaron que las condiciones de fermentación como fuente de carbono, tiempo de cultivo, temperatura y pH pueden afectar notablemente los rendimientos de producción y las proporciones relativas de los monosacáridos en el EPS (Petry et al., 2000). Además, investigadores aseguran que la síntesis de EPS producidas a partir de las BAL, precisan temperaturas de incubación inferiores a 30°C, ya que son bacterias mesófilas productoras de ácido láctico que exhiben una síntesis de su pared celular y crecimiento celular mucho más lento, lo que conlleva a un consumo menor de fosfato isoprenoide, que podría estar disponible para la producción de EPS por parte de este tipo de bacterias, cuando se encuentran en una fase estacionaria de la fermentación (Adesulu-Dahunsi et al., 2018; Petry et al., 2000).

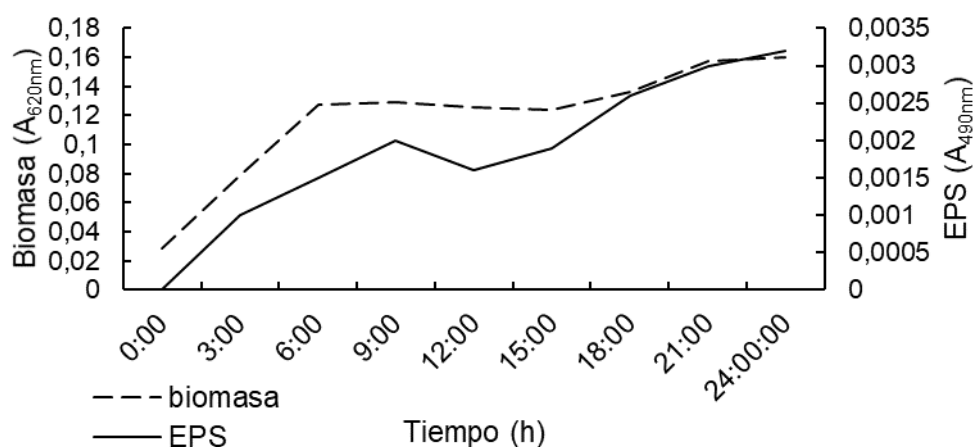


Figura 2. Cinética de crecimiento Vs producción de EPS en medio alternativo a partir de lactosuero ácido.

Fermentación a partir de lactosuero ácido

Como se observa en la Figura 2, el crecimiento para el microorganismo identificado como *Lactobacillus fermentum* L14, se mantiene en estado exponencial durante las primeras 6 horas de fermentación y luego tiende a tener un periodo estacionario, para después llegar a su punto máximo de producción de polímero entre las 21 – 24 horas de fermentación. También se observa que la producción de EPS en el medio tiende a mantenerse en estado creciente, pero en muy pequeñas cantidades. Sin embargo, en ningún momento el medio se tornó viscoso.

Algunos científicos consideran que los costos de producción de exopolisacáridos son elevados, debido al alto costo de las fuentes de carbono (azúcares) y a las fuentes de nitrógeno orgánico (Wang & Bi, 2008). Por lo tanto, la utilización de fuentes alternativas de carbono y nitrógeno de bajo costo, provenientes de residuos agroindustriales, es una alternativa económicamente atractiva (Z. Li et al., 2010). Por ejemplo, la lactosa de suero y agua de coco madura, que son subproductos de la producción de queso y leche de coco, respectivamente, contienen una gran cantidad de azúcares (lactosa, fructosa, glucosa y sacarosa) que se usan como buenas fuentes de carbono para los microorganismos (Cheirsilp et al., 2018; Kantachote et al., 2016), por lo que algunos investigadores han usado estas fuentes alternativas para la producción de kefiran por *L. kefiranofaciens*. En dichos estudios se demostró que la gran mayoría de bacterias prefieren el uso de glucosa como fuente primaria de energía y que son muy pocas las bacterias que prefieren la lactosa (Cheirsilp et al., 2018). En este estudio se demostró que la cepa *Lactobacillus fermentum* L14 es capaz de utilizar lactosa y sacarosa como fuente principal de carbono y así lograr la síntesis de mo-

léculas. En otra investigación, se estudiaron que efectos atribuyen el tipo de fuente de carbono en la producción de EPS, teniendo como resultado que la lactosa proporciona un aumento de biomasa en el medio con rendimientos de 4.3 % en la producción de EPS (Ghasemlou et al., 2012). Esto puede estar asociado al hecho de que la lactosa puede transportarse mediante sistemas de fosfotransferasa y la β -galactosidasa que descompone la lactosa en galactosa y glucosa (Zajšek et al., 2013). También, se ha demostrado que las fuentes de nitrógeno puede afectar considerablemente la producción, por lo que medios enriquecidos con proteínas, aminoácidos, minerales y vitaminas estimulan el crecimiento de los microorganismos (Dailin et al., 2016). Sin embargo, un medio con fuentes de nitrógeno/carbono muy elevadas afecta notablemente los rendimientos de la producción de EPS. Un ejemplo de esto es *L. kefiranofaciens* que alcanzó una concentración celular final ligeramente más baja de $2,13 \pm 0,07$ g / L y la tasa de crecimiento específico disminuyó levemente a $0,493 \pm 0,012$ h⁻¹ (Ghasemlou et al., 2012). Esto probablemente se debió a los efectos inhibidores del alta concentración de azúcares en el medio (Cheirsilp et al., 2018). Por otra parte, durante un estudio de fermentación con suero desproteínizado usando granos de kéfir se observó la producción de EPS después de 5 días, la cual fue aumentando alcanzando valores de hasta 103.4 mg/L. Sin embargo, en algunos ensayos se observó afectada la producción, ya que el medio favorece el crecimiento celular (Rimada & Abraham, 2001).

Fermentación a partir de harina de arroz paddy

En la Figura 3, se observa el crecimiento de *L. fermentum* L14 en medio de harina de arroz paddy, el cual mantiene una fase estacionaria desde las 6 h hasta las

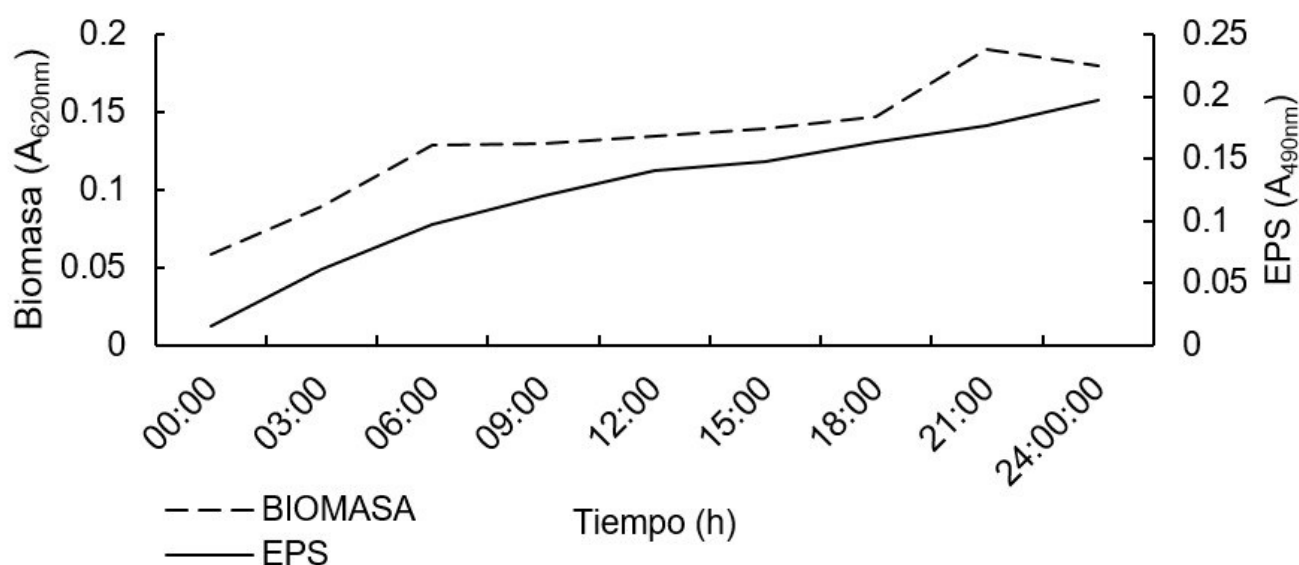


Figura 3. Cinética de crecimiento Vs producción de EPS en medio alternativo a partir de harina de arroz paddy.

Tabla 1. Análisis de varianza (ANOVA) para producción de EPS

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	,467 ^a	11	,042	0.012.	.000.
Interceptación	8,107	1	8,107	0.005.	.000.
MEDIOS	,058	1	,058	0.001.	.000.
Temperatura	,393	9	,044	0.015.	.000.
MEDIOS * Temperatura	,002	1	,002	0.006.	.000.
Error	,000	0	.		
Total	9,257	12			
Total corregido	,467	11			

18 h de fermentación y luego tiende a ir en aumento ya finalizando las 24 horas de inoculación. Su punto máximo de producción de polímero se obtuvo al final del proceso, por lo que se puede asumir que podría tener su máximo pico de rendimiento productivo pasando las 24 h de fermentación. También se logró observar en el medio una leve precipitación que proporcionaba viscosidad durante el proceso de fermentación. Además, se logró obtener un rendimiento productivo de 30 g /L.

Varios estudios realizados sobre la producción de EPS a partir de BAL, resaltan que este tipo de bacterias pueden producir altos niveles de EPS usando como medio de cultivo MRS. Sin embargo, son muy pocos los estudios que han evaluado la capacidad que posee las BAL para sintetizar moléculas a partir de la fermentación de cereales. Por ejemplo, una cepa de *L. plantarum* que no es capaz de producir EPS en medio de MRS, resultó tener la capacidad de sintetizar este tipo de moléculas en medios sumergidos a base de harina de trigo, quinua y amaranto (Valerio *et al.*, 2020), tales resultados concuerdan con la actividad productora de EPS en *L. fermentum* L14. Algunos investigadores sugieren que esta actividad bacteriana se debe a la producción de β -glucanos, que se encuentran naturalmente en harinas fermentadas como la avena y el arroz (Pérez-Ramos *et al.*, 2017), esto se pudo observar en el aumento de viscosidad que tenía el medio durante el proceso de fermentación.

No obstante, la producción de EPS puede ser afectada por el tipo de cereal presente en el medio de cultivo (Hu & Gänzle, 2018). Un estudio realizado en cepas de *W. cibaria* demostró que era posible producir 20,79 g / kg de EPS en masa madre, pero al cambiar el trigo por la harina de quinua se observó un descenso en la producción de EPS, además su punto máximo de producción fue 26 horas de fermentación en comparación a la harina de trigo (Wolter *et al.*, 2014). Varios estudios aseguran que para la producción de biomasa en cepas de *Lactobacillus* que son usados como cultivos iniciadores de alimentos seguros, es mejor usar como fuente de carbono sacarosa acompañada de medios complejos,

que faciliten el crecimiento celular y eficiencia en la síntesis de EPS (Chen *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2020; Luangsakul *et al.*, 2009).

Análisis estadístico

El análisis de varianza demostró que tanto el medio de cultivo como la temperatura influyen en la producción de EPS ($P < 0.05$). Además, muestra una interacción significativa entre los factores temperatura y medio ($p < 0.05$). En los anteriores resultados se puede observar que el mejor medio para la producción de EPS es el medio de arroz paddy, excepto cuando la temperatura está a 20 ° C. Sin embargo, cuando se observa la producción de EPS en ambos medios, el factor temperatura resulta ser significativo, presentándose en los mayores niveles con la temperatura de 30 °C. De acuerdo con el análisis estadístico realizado a los tratamientos, en aquellas fermentaciones suplementadas con harina de arroz paddy se obtuvo un efecto significativo ($p > 0,05$) sobre la producción de polisacáridos. Este fenómeno del efecto de la concentración de sacarosa fue notorio en los ensayos realizados con harina de arroz paddy en su nivel superior (30 g/L). Los análisis mostraron que los experimentos realizados con lactosuero ácido, aumentaban de igual forma el crecimiento celular y disminuían levemente la producción del polisacárido, siguiendo una tendencia lineal significativa; esto indica que la concentración de los productos no aumentó con la complejidad del sustrato en el rango establecido de trabajo; caso contrario ocurrió con la harina de arroz paddy, cuyo comportamiento presentó un ajuste satisfactorio, probablemente debido a su componentes naturales.

Caracterización del polímero

Como observamos en la Figura 4. el análisis de HPLC identificó que el polímero obtenido es un heteropolisacárido (HePS) debido a la presencia de varios picos cromatográficos, determinando que está compuesto por sacarosa 60%, glucosa 11,72% y fructosa 3,03% respectivamente. Este resultado concuerda con los obtenidos por otros autores, donde los EPS producidos por BAL pueden presentar una variación en su composición de

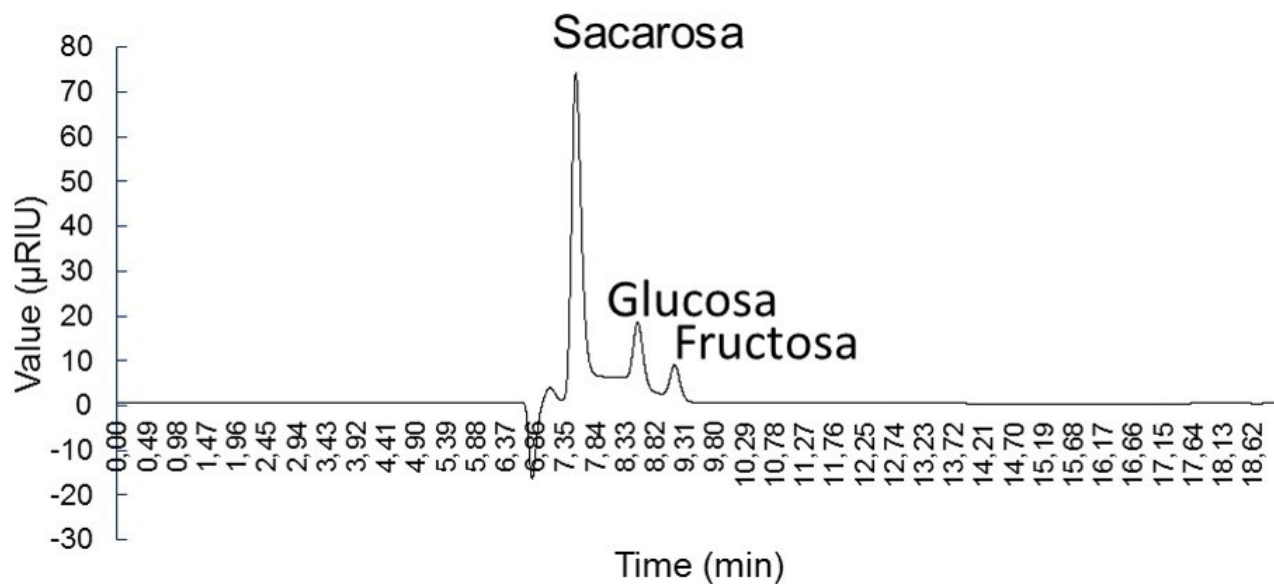


Figura 4. Resultado del análisis de HPLC del polímero producido en laboratorio. Identificado en el laboratorio de alimentos CICTA

monosacáridos. Por ejemplo, trabajos con *L. plantarum* EP56 (Adesulu-Dahunsi et al., 2018, *Lactobacillus plantarum* NTMI05 y NTMI20 (Imran et al., 2016, reportaron monómeros de glucosa, fructosa y galactosa en muestras de EPS. En un estudio con *Lactobacillus helveticus* MB2-1 donde se utilizó leche como medio basal, se detectó que el EPS producido era un HePS compuesto por galactosa, glucosa y manosa (W. Li et al., 2014. La detección alta de sacarosa puede corresponder a una incompleta hidrolización del EPS o al resultado de las funciones biológicas, que ayudan a la célula en la adaptación de sus entornos ecológicos (Broadbent et al., 2003)

Comparando estos resultados, podemos concluir que la composición del polímero es similar con los perfiles de dextrano, el cual es un polisacárido muy estudiado, para uso en diferentes aplicaciones industriales, farmacéuticas, agrícolas y alimentarias. Además, este tipo de polisacáridos extracelulares son sintetizados por las bacterias cuando son sometidas a crecer en medios de cultivo con fuente de carbono de sacarosa, esta excreción actúa como una cubierta protectora, compuesta de cadenas ramificadas de D-glucopironosa unidas a enlaces α -(1 $\rightarrow$ 6), y las ramas son formadas por enlaces α -(1 $\rightarrow$ 2), α -(1 $\rightarrow$ 3), α -(1 $\rightarrow$ 4) (Donnarumma et al., 2014).

CONCLUSIONES

Se lograron obtener EPS a partir de medios agroindustriales que fueron eficientes para el crecimiento de *L. fermentum* L14 usando como fuente de carbono la sacarosa, alcanzando su máxima concentración celular a las 27 horas de fermentación, evidenciando el alto poten-

cial que tienen los subproductos como sustratos para la producción de exopolisacáridos. Se consiguió la máxima producción de EPS total (30 g/L) en reactores de 5 litros, mediante una fermentación en el medio de cultivo a base de harina de arroz y utilizando sacarosa como fuente de carbono adicional, a una concentración de 10% (p/v), con una temperatura de incubación de 30°C. Además, se logró caracterizar el polisacárido producido en el laboratorio por mediante HPLC, determinando que está compuesto por monómeros de sacarosa 60%, glucosa 11,72% y fructosa 3,03%, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al grupo de Investigación Ambiente y Vida, al semillero de Biotecnología Industrial por todo el apoyo brindado durante el proceso de investigación. A la Universidad Francisco de Paula Santander (Cúcuta - Colombia) y al Ministerio de Ciencia y Tecnología (Colombia) por facilitar los procesos de financiamiento y así desarrollar conocimiento científico.

REFERENCIAS

- Aa, K., Ib, S., E, O., L, G., Jm, B., & Vj, V. (2009). Preservation of bacteria in natural polymers. *Journal of Microbiological Methods*, 78(2), 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.05.017>.
- Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., Sanni, A. I., & Banwo, K. (2018). Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage. *PeerJ*, 6. <https://doi.org/10.7717/peerj.5326>.

- Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853-865. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>.
- Behravan, J., Bazzaz, B. S. F., & Salimi, Z. (2003). Optimization of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38(Pt 3), 267-269. <https://doi.org/10.1042/BA20030084>.
- Broadbent, J. R.; Houck, K.; Johnson, M. E. y Oberg, C. J. (2003). Influence of adjunct use and cheese microenvironment on nonstarter bacteria in reduced-fat Cheddar-type cheese. *J. Dairy Sci.* 86:2773-2782.
- Cheirsilp, B., Suksawang, S., Yeesang, J., & Boonsawang, P. (2018). Co-production of functional exopolysaccharides and lactic acid by *Lactobacillus kefiranofaciens* originated from fermented milk, kefir. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 331-340. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2943-7>.
- Chen, Y.-S., Wu, H.-C., Liu, C.-H., Chen, H.-C., & Yanagida, F. (2010). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from jiang-sun (fermented bamboo shoots), a traditional fermented food in Taiwan. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12), 1977-1982. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4034>.
- Dailin, D. J., Elsayed, E. A., Othman, N. Z., Malek, R., Phin, H. S., Aziz, R., Wadaan, M., & El Enshasy, H. A. (2016). Bioprocess development for kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in semi industrial scale bioreactor. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(4), 495-502. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.003>.
- Das, S., Mishra, B. K., & Hati, S. (2020). Techno-functional characterization of indigenous *Lactobacillus* isolates from the traditional fermented foods of Meghalaya, India. *Current Research in Food Science*, 3, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.01.002>.
- Do, T. B. T., Tran, T. A. L., Tran, T. V. T., Le, T. H., Jayasena, V., Nguyen, T. H. C., Nguyen, C. C., Kim, S. Y., & Le, Q. V. (2020). Novel Exopolysaccharide Produced from Fermented Bamboo Shoot-Isolated *Lactobacillus Fermentum*. *Polymers*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/polym12071531>.
- DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Fukuda, K., Shi, T., Nagami, K., Leo, F., Nakamura, T., Yasuda, K., Senda, A., Motoshima, H., & Urashima, T. (2010). Effects of carbohydrate source on physico-chemical properties of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 in a chemically defined medium. *Carbohydrate Polymers*, 79(4), 1040-1045. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.037>.
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Jahanbin, K., Gharibzaheidi, S. M. T., & Taheri, S. (2012). Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefir production yield from a low-cost culture medium. *Food Chemistry*, 133(2), 383-389. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.046>.
- Hassan, A. N., Ipsen, R., Janzen, T., & Qvist, K. B. (2003). Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1632-1638. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73748-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73748-5).
- Hu, Y., & Gänzle, M. G. (2018). Effect of temperature on production of oligosaccharides and dextran by *Weissella cibaria* 10 M. *International Journal of Food Microbiology*, 280, 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.jifoodmicro.2018.05.003>.
- Hutchison, J. R., Brooks, S. M., Kennedy, Z. C., Pope, T. R., Kaiser, B. L. D., Victry, K. D., Warner, C. L., Oxford, K. L., Omberg, K. M., & Warner, M. G. (2019). Polysaccharide-based liquid storage and transport media for non-refrigerated preservation of bacterial pathogens. *PLOS ONE*, 14(9), e0221831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221831>.
- Imran, M. Y. M., Reehana, N., Jayaraj, K. A., Ahamed, A. A. P., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., Alharbi, N. S., & Muralitharan, G. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93(Pt A), 731-745. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.007>.
- Kantachote, D., Nunkaew, T., Ratanaburee, A., & Klongdee, N. (2016). Production of a Meat Seasoning Powder Enriched with γ -Aminobutyric Acid (GABA) from Mature Coconut Water Using *Pediococcus pentosaceus* HN8. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(4), 733-742. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12654>.
- Kieliszek, M., Błażej, S., & Płaczek, M. (2016). Spectrophotometric evaluation of selenium binding by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC MYA-2200 and *Candida utilis* ATCC 9950 yeast. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 35, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.01.014>.
- Lee, S., Stubelius, A., Hamelmann, N., Tran, V., & Almutairi, A. (2018). Inflammation-Responsive Drug-Conjugated Dextran Nanoparticles Enhance Anti-Inflammatory Drug Efficacy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(47), 40378-40387. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b08254>.
- Li, W., Ji, J., Rui, X., Yu, J., Tang, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Production of exopolysacchari-

- des by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics in vitro. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2, Part 1), 732-739. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.063>.
- Li, Z., Han, L., Ji, Y., Wang, X., & Tan, T. (2010). Fermentative production of l-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. *Biochemical Engineering Journal*, 49(1), 138-142. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.10.014>.
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., & Restrepo-Betancur, L. F. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cubana de Química*, 29(2), 180-198.
- Luangsakul, N., Keeratipibul, S., Jindamorakot, S., & Tanasupawat, S. (2009). Lactic acid bacteria and yeasts isolated from the starter doughs for Chinese steamed buns in Thailand. *LWT - Food Science and Technology*, 42(8), 1404-1412. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.007>.
- Mengi, B., Ikeda, S., Murayama, D., Bochimoto, H., Matsumoto, S., Kitazawa, H., Urashima, T., & Fukuda, K. (2020). Factors affecting decreasing viscosity of the culture medium during the stationary growth phase of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus fermentum* MTCC 25067. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 39(3), 160-168. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2019-051>.
- Nachtigall, C., Vogel, C., Rohm, H., & Jaros, D. (2020). How Capsular Exopolysaccharides Affect Cell Surface Properties of Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121904>.
- Pérez-Ramos, A., Mohedano, M. L., López, P., Spano, G., Fiocco, D., Russo, P., & Capozzi, V. (2017). In Situ β -Glucan Fortification of Cereal-Based Matrices by *Pediococcus parvulus* 2.6: Technological Aspects and Prebiotic Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071588>.
- Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M.-J., Cerning, J., & Desmazeaud, M. (2000). Factors Affecting Exocellular Polysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* Grown in a Chemically Defined Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3427-3431.
- Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., & Cerning, J. (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2302-2310. <https://doi.org/10.1128/aem.66.6.2302-2310.2000>.
- Rimada, P. S., & Abraham, A. G. (2001). Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *The Journal of Dairy Research*, 68(4), 653-661. <https://doi.org/10.1017/s0022029901005131>.
- Song, J., Jia, Y.-X., Su, Y., Zhang, X.-Y., Tu, L.-N., Nie, Z.-Q., Zheng, Y., & Wang, M. (2020). Initial Analysis on the Characteristics and Synthesis of Exopolysaccharides from *Sclerotium rolfsii* with Different Sugars as Carbon Sources. *Polymers*, 12(2), 348. <https://doi.org/10.3390/polym12020348>.
- Torino, M. I., Font de Valdez, G., & Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 6, 834. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00834>.
- Valerio, F., Bavaro, A. R., Di Biase, M., Lonigro, S. L., Logrieco, A. F., & Lavermicocca, P. (2020). Effect of Amaranth and Quinoa Flours on Exopolysaccharide Production and Protein Profile of Liquid Sourdough Fermented by *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00967>.
- Wang, M., & Bi, J. (2008). Modification of characteristics of kefir by changing the carbon source of *Lactobacillus kefirianofaciens*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5), 763-769. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3136>.
- Wolter, A., Hager, A.-S., Zannini, E., Galle, S., Gänzle, M. G., Waters, D. M., & Arendt, E. K. (2014). Evaluation of exopolysaccharide producing *Weissella cibaria* MG1 strain for the production of sourdough from various flours. *Food Microbiology*, 37, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.009>.
- Yang, Y., Feng, F., Zhou, Q., Zhao, F., Du, R., Zhou, Z., & Han, Y. (2018). Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 529-535. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.162>.
- Zajšek, K., Goršek, A., & Kolar, M. (2013). Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chemistry*, 139(1-4), 970-977. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.142>.
- Zapata, P., Rojas, D., Fernández, C., Ramírez, D., Restrepo, G., Orjuela, V., Arroyave, M., Gómez, T., & Atehortúa, L. (2007). Producción de biomasa y exopolisacáridos de *Grifóla frondosa* bajo cultivo sumergido utilizando fuentes de carbono no convencionales. *Revista EIA*, 7, 137-144.
- Zhang, Y. U., Li, S., Zhang, C., Luo, Y., Zhang, H., & Yang, Z. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(11), 2080-2091. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i11>.