



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

ISSN: 1909-8758

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

Pantoja Guerra, Manuel; Mendoza Reyes, Sandra; Valero Valero, Nelson
Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Microbacterium*
sp. (BSC3) para la generación de materia orgánica humificada a partir de lignito
Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XX, núm. 1, 2018, Enero-Junio, pp. 31-41
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia

DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.62764>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77658702004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

UAEH
redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Microbacterium sp.* (BSC3) para la generación de materia orgánica humificada a partir de lignito

Design of culture medium for biomass production of *Microbacterium sp.* (BSC3) to the humified organic matter generation from lignite

Manuel Pantoja Guerra*, Sandra Mendoza Reyes**, Nelson Valero Valero***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.62764

RESUMEN

Se diseñó un medio de cultivo para la multiplicación de una cepa bacteriana solubilizadora de carbón (BSC3). Como sustratos se utilizaron tres residuos agroindustriales: melaza de caña, lactosuero y cabecilla de arroz. Mediante diseños de superficie de respuesta Box-Behnken se evaluaron dos rangos de concentraciones para cada sustrato (2–10% y 0–6%). De esta forma se obtuvo la combinación adecuada para la producción de biomasa de BSC3. Se construyeron curvas de crecimiento bacteriano para determinar algunos parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento μ , tiempo de duplicación [Td] y producción final de biomasa), que fueron comparados con el crecimiento de la cepa en un medio de cultivo control, también se caracterizó elementalmente (CHN) el medio optimizado. Las concentraciones óptimas para la obtención de biomasa de BSC3 fueron: 6% melaza, 2,5% lactosuero más un contenido mínimo de sales, con un pH de 6,5. Los parámetros cinéticos en este medio fueron: biomasa final=3,2 g.L⁻¹, $\mu=0,0206$ h⁻¹, Td=33,64 h, y en el medio control: biomasa final=3,4 g.L⁻¹, $\mu=0,0139$ h⁻¹, Td=49,85 h, lo cual muestra que el medio permitió un incremento en la velocidad de crecimiento y un menor tiempo de duplicación de BSC3, de esta forma el medio optimizado permitió la multiplicación de BSC3 y le permitió conservar su actividad solubilizadora de carbón.

Palabras clave: Lactosuero, melaza, *Microbacterium sp.*, solubilización de carbón.

ABSTRACT

A culture medium for the multiplication of a coal solubilizing bacterial strain was designed (BSC3); were used three agroindustrial wastes: cane molasses, whey and crushed rice. Through Box-Behnken surfaces responses designs, two concentration ranks (2–10% y 0–6%) were evaluated, so the adequate combination to BSC3 biomass production was found. Bacterial growth curves were constructed to determine some kinetics parameters (growth specific rate μ , duplication time [Dt] and biomass final production), that were compared with the strain growth in a control culture medium; the optimized culture medium was also elementally characterized. The optimal concentrations to BSC3 biomass obtaining were: 6% molasses cane, 2,5% whey plus a salts minimum medium, with pH of 6,5. The kinetics parameters in this medium were: final biomass = 3,2 g.L⁻¹, $\mu=0,0206$ h⁻¹, Dt=33,64 h, and in the control medium: final biomass = 3,4 g.L⁻¹, $\mu=0,0139$ h⁻¹, Dt=49,85 h, this shows that the optimized medium allows the increase of the specific growth rate and a less duplication time of BSC3, so the optimized medium allowed to conserve its coal solubilizing activity.

Key words: Whey, cane molasses, *Microbacterium sp.*, coal solubilizing

Recibido: noviembre 18 de 2017 **Aprobado:** mayo 21 de 2018

* Microbiólogo M.Sc. Grupo de Investigación Microbiología Agrícola y Ambiental. Universidad Popular del Cesar. Colombia. manelpantojag@unicesar.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0485-7605>.

** Microbióloga. Grupo de investigación Microbiología Agrícola y Ambiental. Universidad Popular del Cesar. Colombia. sandramendozareyes@gmail.com.

*** Biólogo M.Sc. Ph.D. Facultad de Ciencias. Universidad de La Guajira. Colombia. nvalerov@uniguajira.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9186-6245>.

Tabla 1. Combinaciones con concentraciones de los sustratos en los rangos 0 – 6 % y 2 – 10 % para la producción de biomasa de BSC3.

FACTORES (0 - 6%)				FACTORES (2 - 10%)			
Corrido	A: melaza	B: lactosuero	C: arroz	Corrido	A: melaza	B: lactosuero	C: arroz
	%	%	%		%	%	%
1	0	0	0	1	0	0	0
2	-1	0	+1	2	0	+1	-1
3	0	0	0	3	+1	0	-1
4	-1	+1	0	4	0	-1	+1
5	0	0	0	5	-1	-1	0
6	-1	-1	-1	6	0	0	0
7	0	+1	+1	7	-1	0	-1
8	0	+1	-1	8	0	+1	+1
9	0	0	0	9	+1	-1	0
10	+1	0	-1	10	0	0	0
11	+1	0	+1	11	0	-1	-1
12	-1	0	-1	12	0	0	0
13	0	0	0	13	+1	0	+1
14	-1	-1	0	14	-1	+1	0
15	+1	+1	0	15	-1	0	+1
16	-1	-1	+1	16	0	0	0
17	+1	-1	0	17	+1	+1	0
Dónde: +1 mayor concentración (6%) 0 concentración media (3%) -1 menor concentración (0%)				Dónde: +1 mayor concentración (10%) 0 concentración media (6%) -1 menor concentración (2%)			

INTRODUCCIÓN

Los inoculantes biológicos son productos que contienen cepas o consorcios microbianos como principio activo, los cuales, al ser aplicados al suelo o las plantas, promueven el desarrollo vegetal por diferentes mecanismos, especialmente facilitando la absorción de nutrientes por parte de las plantas (Owen *et al.*, 2015), este concepto define a los productos conocidos como biofertilizantes (ICA, 2011). De otro lado, las enmiendas orgánicas son insumos ricos en sustancias húmicas, utilizados para compensar la pérdida de la materia orgánica humificada en el suelo, lo que está asociado al incremento de algunos índices edafológicos físicos, químicos y biológicos (Valero *et al.*, 2016). Las sustancias húmicas (SH) son de gran importancia en la conservación del suelo, debido a que están directamente relacionadas con la formación de agregados, la disponibilidad de nutrientes por aumento en la capacidad de intercambio catiónico, la capaci-

dad de retención de humedad y la estimulación del desarrollo de las plantas por efectos de tipo hormonal (Piccolo *et al.*, 1997; Canellas & Olivares, 2014).

No obstante, la aplicación directa de SH (obtenidas generalmente por solubilización alcalina) en suelos de zonas cálidas como el trópico seco es poco provechoso, puesto que estas son fácilmente mineralizadas (Kleber, 2003). Por lo tanto, deben desarrollarse estrategias que permitan la aplicación de fuentes más conservadas de materia orgánica humificada en el suelo (Valero *et al.*, 2016; Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2015, 2017). En ese sentido, no se han realizado avances en el desarrollo de bioproductos que contemplen el uso de microorganismos y materia orgánica con el fin de aumentar el contenido SH en el suelo.

Valero *et al.* (2014), describieron la capacidad de la cepa bacteriana solubilizadora de carbón (BSC3) *Microbacte-*

rium sp. para producir SH mediante la solubilización de carbones de bajo rango (CBR), lo que permitió plantear la posibilidad de desarrollar un inoculante que contemplara el uso de carbón tipo lignito inoculado con BSC3, para usarlo como fuente de materia orgánica humificada en suelos degradados por la minería (Cubillos-Hinojosa *et al.*, 2015, 2017). El género bacteriano *Microbacterium* sp., pertenece al grupo de las actinobacterias y ha sido descrito como un organismo endófito o asociado a la rizosfera de plantas en zonas áridas y salinas, con actividad promotora de crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos (Kaur *et al.*, 2011; Rashid *et al.*, 2012; Shrivastava y Kumar, 2013; Alves *et al.*, 2014).

Para la elaboración de bioproductos se requiere de la multiplicación de las células microbianas que constituyen el principio activo del producto. Los medios de cultivo utilizados para multiplicar la biomasa microbiana, durante la elaboración de inoculantes biológicos, deben desarrollarse a partir de sustratos económicos, residuales, de amplia disposición y garantizar la conservación de la actividad biológica por la que el organismo fue seleccionado (Angulo-Cortés *et al.*, 2012). De esta forma, resulta muy útil el aprovechamiento de residuos agrícolas o agroindustriales, para la producción biotecnológica de productos biotransformados, con alto valor agregado, tales como metabolitos y biomasa microbiana (Domínguez-Espinosa *et al.*, 2002).

La optimización de los factores relacionados con la producción de biomasa microbiana, tales como concentración de nutrientes y el pH, en medios de cultivo complejos, es un proceso largo y costoso, por lo tanto se requiere el uso de diseños estadísticos que permitan la interacción de varios factores a la vez (Angulo-Cortés *et al.*, 2012). Los diseños de superficie de respuesta, tales como el Box Behnken, se basan en modelos matemáticos que permiten observar el resultado de las interacciones entre los factores, al tiempo que reduce el número de combinaciones en el diseño, por eso son muy utilizados en la optimización de medios de cultivo (Gómez y Batista, 2006; Angulo-Cortés *et al.*, 2012).

En este trabajo se diseñó un medio de cultivo para la multiplicación de biomasa de la cepa bacteriana *Microbacterium* sp. (BSC3), con el fin obtener el ingrediente activo para desarrollar un inoculante biológico que contribuya a la reposición de la materia orgánica en suelos degradados en el Departamento del Cesar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustratos utilizados para la elaboración del medio de cultivo. Se utilizaron como materias primas tres residuos

agroindustriales típicos en el departamento del Cesar: Melaza de caña, lactosuero dulce y extracto acuoso de cabecilla de arroz. La melaza de caña fue empacada en recipientes plásticos con tapa y conservada a temperatura ambiente, el lactosuero fue almacenado en botellas plásticas y conservado en congelación y los residuos fragmentados de arroz (cabecilla de arroz) fueron empacados en bolsas plásticas y conservados a temperatura ambiente hasta su uso.

Diseño experimental. Para la optimización de las concentraciones de sustratos se utilizó un diseño de superficie de respuesta tipo Box Behnken, en el cual se evaluaron dos rangos de concentraciones de (0 – 6% y 2 – 10%), con cinco repeticiones del punto central (tabla 1). Para el experimento, se utilizaron tubos de ensayo con un volumen de trabajo de 10 ml. El diseño estuvo constituido por tres factores (A: melaza; B: lactosuero; C: extracto acuoso de cabecilla de arroz) y tres niveles (+1: mayor concentración; 0: concentración media; -1: menor concentración), como variable de respuesta se tuvo en cuenta la obtención de biomasa del microorganismo en términos de peso seco. Todas las combinaciones resultantes del diseño, se prepararon con un medio mínimo de sales (MMS), con la siguiente composición en g/L: K_2HPO_4 , 1.73; KH_2PO_4 , 0.68; NH_4SO_4 , 1.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.02; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.03 y $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.03. (Carrillo *et al.*, 2004). Los cultivos se incubaron a 30 ± 2 °C en agitación orbital a 250 rpm por 72 horas. Se seleccionaron las combinaciones en las que se obtuvo mayor producción de biomasa.

Determinación del efecto del pH sobre la producción de biomasa de BSC3: Se desarrolló un experimento completamente al azar, con cinco repeticiones. Se evaluaron 3 valores de pH [5,6 (inicial del medio de cultivo); 6,0 y 6,5], el pH fue modificado con HCl (0,1N) o NaOH (0,1N) según fuera necesario. Estos valores de pH fueron seleccionados según los requerimientos reportados por Park *et al.*, 2008 para *Microbacterium* sp.

Curva de crecimiento de BSC3

- **Preparación del inoculo:** La cepa BSC3 fue sembrada en agar nutritivo, e incubada por 72 horas a 37° C, a partir de este cultivo se obtuvo un inoculo líquido en solución salina estéril, el cual fue estandarizado mediante espectrofotometría (D_{600nm} : 0,1). Se tomaron 3 mL de esta suspensión bacteriana y fueron sembrados en 27 mL de un medio de cultivo constituido por 30% del medio optimizado y 70% caldo nutritivo (Oxoid®), los frascos con el inóculo fueron incubados a 30 ± 2 °C a 250 rpm por 72 horas.

- **Determinación de la producción de biomasa de BSC3:** El inóculo fue depositado en frascos cilíndricos con capacidad de 500 mL, con 270 mL del medio optimizado, hasta completar un volumen de 300 mL; estos fueron mantenidos a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación orbital 250 rpm. Se tomaron muestras de 10 mL cada cuatro horas, durante 72 horas, estas fueron centrifugadas (5000 rpm) por 10 minutos, posteriormente se determinó la producción de biomasa por peso seco. El experimento se hizo por triplicado y como medio control se utilizó peptona 1% + extracto de levadura 1% + sacarosa 1%.
- **Determinación de parámetros cinéticos:** A partir de los datos obtenidos de la curva de crecimiento microbiano se determinó la producción final de biomasa, la velocidad específica de crecimiento $\mu(\text{h}^{-1})$ y el tiempo de duplicación $t_d(\text{h})$.

Se utilizaron las siguientes fórmulas matemáticas:

Velocidad específica de crecimiento: $\mu = (1/x) dx/dt = (\ln X_f - \ln X_i)/(t_f - t_i)$ (Doran, 1995).

Dónde: x: Concentración de la biomasa en el instante t (g L^{-1})

dx/dt : Rata volumétrica de crecimiento de la biomasa ($\text{gL}^{-1} \text{h}^{-1}$)

μ : Rata específica de crecimiento (h^{-1}). Es la rata de crecimiento por unidad de biomasa presente (Doran, 1995).

Tiempo de duplicación (t_d): $t_d = \ln 2/\mu = 0.693/\mu$ (Doran, 1995)

Caracterización elemental del medio de cultivo: Se adaptó la técnica analítica ASTM D5373 para la determinación instrumental de carbono, hidrógeno y nitrógeno utilizando, en un analizador elemental EAI CE-440.

Conservación de la actividad productora de SH por BSC3 a partir de CBR, después de ser cultivada en el medio optimizado: BSC3 fue sembrada en agar nutritivo a partir de un cultivo líquido con el medio diseñado; después se preparó una suspensión bacteriana 0,5 escala de McFarland en solución salina estéril mediante espectrofotometría. 1 mL de esta suspensión fue inoculado en tubos con 10 mL de caldo nutritivo, suplementado con 0.003 % de Humus Alfa®; los tubos fueron incubados a 37°C durante 48 horas. Después de este tiempo se adicionó a cada tubo 0,1g de CBR, con un tamaño de partícula 0 - 300 μm previamente esterilizado en autoclave a 121°C /15 lb por 15 minutos. Posteriormente los tubos se incubaron a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación orbital a 360 rpm. Después de 7 días el cultivo bacte-

riano con el carbón fue centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos. La absorbancia del sobrenadante se midió por espectrofotometría a 465 nm (Valero *et al.*, 2014); los datos fueron interpolados en una curva de calibración con concentraciones conocidas de SH desde 500 hasta 4000 mg.L^{-1} . El experimento se realizó con diez repeticiones. Se utilizó un medio con CBR y sin inóculo como control.

Análisis estadístico: Para el diseño del medio de cultivo se aplicó un diseño experimental de superficie de respuesta, tipo Box- Behnken, con tres niveles y tres factores, utilizando el software Statgraphics Centurion XVI. Para determinar la producción de SH por las cepas, los experimentos complementarios al diseño experimental y la determinación del efecto del pH en la producción de biomasa se utilizó un análisis ANOVA, utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño con concentraciones de 2-10 % de los sustratos para cultivo de BSC3: La interacción de melaza y lactosuero ejerce un efecto positivo y significativo sobre la producción de biomasa (figura 1A). Sin embargo, la melaza por sí misma no influye en la producción de biomasa, y el lactosuero por sí mismo no influye positivamente en el crecimiento del microorganismo. Las interacciones: lactosuero - extracto acuoso de cabecilla de arroz y melaza - extracto acuoso de cabecilla de arroz, influyeron positivamente en la producción de biomasa microbiana, pero no mostraron significancia estadística, mientras que las concentraciones del extracto acuoso de cabecilla de arroz no provocan efectos positivos ni significativos sobre la producción de biomasa de BSC3.

Se obtuvo la mayor concentración de biomasa ($3,4 \text{ mg.mL}^{-1}$) (figura 1B), con la menor concentración de todos los sustratos (2%). Algunos autores han descrito la producción de biomasa y metabolitos de actinobacterias con concentraciones de melaza de 2 y 3%, (Fusconi *et al.*, 2005), sin embargo, este resultado no fue tenido en cuenta debido a la alta variabilidad de los datos que muestran a la menor concentración de melaza (2%) como óptima para la producción de biomasa de BSC3 (material suplementario 1). Por otro lado, el diagrama de Pareto (figura 1A) permite inferir que en este rango de concentraciones ningún factor influye individualmente sobre la producción de biomasa de BSC3, lo que contrasta con el valor óptimo obtenido de biomasa.

Estos resultados muestran la reducción de la producción de biomasa con la utilización de la concentración más alta de melaza (10%), esto puede ser explicado por la

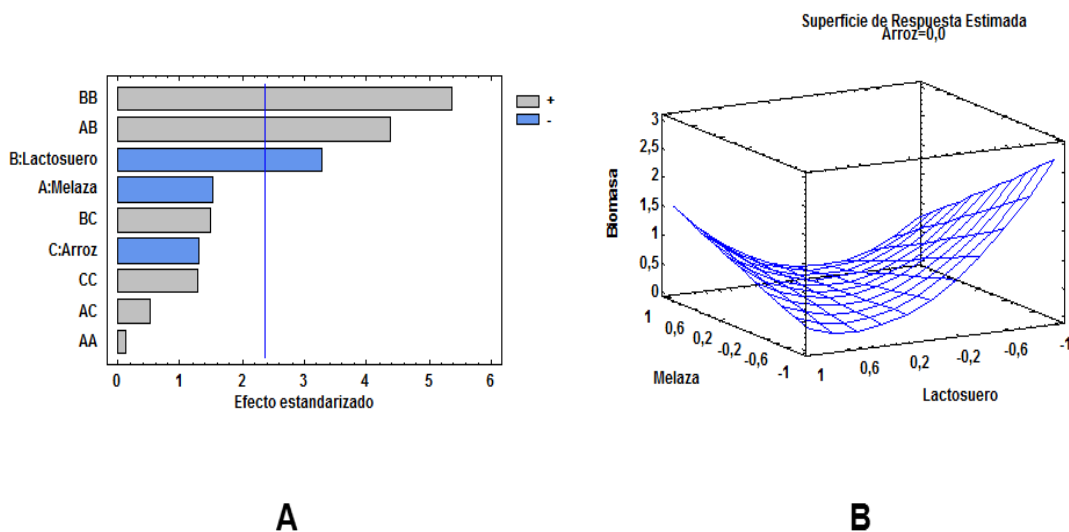


Figura 1. A) Diagrama de Pareto para el análisis de la significancia estadística de los factores. **B)** Superficie de respuesta de la producción de biomasa de BSC3 en el rango de concentraciones de 2-10 % de los sustratos.

saturación de los mecanismos enzimáticos y de transporte de nutrientes al interior de la célula, debido al exceso de nutrientes en el medio; concentraciones excesivas de azúcares como glucosa y sacarosa (presentes en la melaza) generan cambios en la osmolaridad, (Shimizu, 2014) y en el equilibrio electroquímico del entorno celular bacteriano, los cuales inhiben la actividad del complejo enzimático PTS (phosphotransferase sugar) dependiente de PEP (phosphoenyl pyruvate), lo cual reduce la captación de azúcares por parte de las células y la capacidad de crecimiento bacteriano, (Ellwood *et al.*, 1979). El sistema PTS también ha sido descrito en el género *Microbacterium* sp (Singh *et al.*, 1985; Sharma *et al.*, 2013).

Los resultados de la concentración óptima de lactosuero coinciden con los obtenidos por Guerra *et al.* (2001), quienes describieron mayor producción de biomasa y bacteriocinas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* CECT 539 y *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627, en concentraciones bajas de lactosuero.

De esta forma y basados en los resultados presentados en el material suplementario 1, se sugiere que la concentración óptima de melaza para la obtención de biomasa de BSC3 es 6%.

Diseño con concentraciones de 0-6% de los sustratos para cultivo de BSC3: El factor más influyente para la producción de biomasa de BSC3 en el rango de concentraciones de sustratos 0 – 6% fue la melaza, (figura 2A). La interacción melaza - lactosuero, así como el efecto individual del extracto acuoso de cabecilla de arroz y lactosuero, influyeron positivamente en la producción de biomasa, pero sin significancia estadística. Por otra

parte, las combinaciones de melaza - extracto acuoso de cabecilla de arroz, lactosuero - extracto acuoso de cabecilla de arroz generan efectos negativos sobre el crecimiento de BSC3.

La mayor producción de biomasa en el rango 0 – 6% ($1,16 \text{ mg.mL}^{-1}$) se obtuvo con concentraciones de 6% de melaza, 2,59% de lactosuero y 0% de extracto acuoso de cabecilla de arroz (figura 2B). Este resultado es consistente con los presentados en los materiales suplementarios 1 y 2, en los que se puede observar que la concentración óptima de melaza para la producción de biomasa de BSC3 es de 6%, con una baja variabilidad de los datos.

El factor menos significativo para el diseño 0 – 6% fue el extracto acuoso de cabecilla de arroz, hecho que concuerda con el diseño anterior. Aunque no hay reportes de la producción de biomasa de *Microbacterium* sp. en medios de cultivo diseñados a base de estos sustratos, si se ha reportado la optimización del cultivo de algunas actinobacterias, con fines de producción de biomasa y metabolitos de interés industrial en concentraciones de melaza de caña de 6 y 7%, (El-Enshasy *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009; Abdelwahed *et al.*, 2012), hecho que concuerda con lo reportado por este trabajo.

El medio de cultivo para la obtención de biomasa de BSC3 quedó constituido por: melaza de caña (6%) + lactosuero (2,5%) + MMS. Este resultado fue confirmado mediante otro ensayo en el que se comparó la producción de biomasa de BSC3 en los medios optimizados por cada diseño (material suplementario 3).

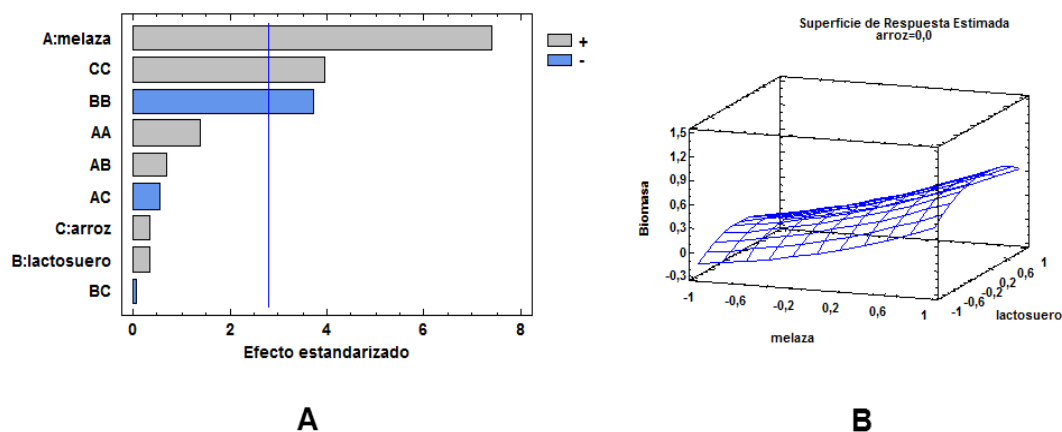


Figura 2. A) Diagrama de Pareto para el análisis de la significancia estadística de los factores. B) Superficie de respuesta de la producción de biomasa de BSC3 en el rango de concentraciones de 0-6% de los sustratos.

Determinación del efecto del pH sobre la producción de biomasa de BSC3: La mayor producción de biomasa se obtuvo con un pH de 6,5, mostrando diferencias estadísticas significativas con respecto a los otros valores (figura 3). Park et al. (2008), reportaron un rango óptimo para crecimiento de *Microbacterium* sp. entre 5 y 9. El incremento de la biomasa de BSC3 a pH 6,5 puede deberse al acercamiento de la cepa al pH 7, el cual ha sido descrito como óptimo para el desarrollo de este género bacteriano (Rivas et al., 2004; Bakir et al., 2008), puesto que en estas condiciones son más activos los sistemas enzimáticos relacionados con el metabolismo de fuentes de carbono complejas (Yamamoto y Asano, 2015).

Conservación de la actividad solubilizadora de carbón de BSC3 después de ser cultivada en el medio de culti-

vo diseñado. Se evidenció la producción de SH por BSC3 a partir de CBR, con diferencias significativas con respecto al control (figura 4), este fenómeno había sido descrito en esta cepa por Valero et al. (2014). Sin embargo, la producción de SH por parte de BSC3 fue menor a lo descrito previamente. Es posible que la elevada carga de nutrientes presentes en el medio de cultivo optimizado, haya funcionado como un activador, acelerando el consumo de sustrato de tal forma que los microorganismos pudieron metabolizar las SH generadas ("efecto priming") (Hamer et al., 2004). Este efecto también está relacionado con la saturación del metabolismo microbiano, debido a la elevada carga de nutrientes del medio, lo que se conoce como "efecto priming inverso" disminuyendo la capacidad biológica de la cepa (Hamer et al., 2004). No obstante, esta leve reducción

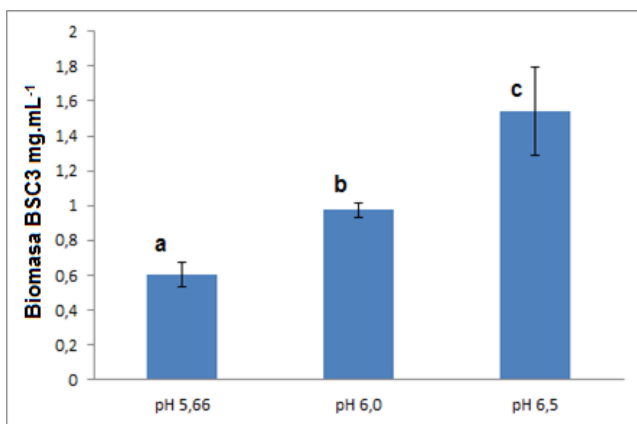


Figura 3. Efecto de pH sobre la producción de biomasa de BSC3. Letras comunes no difieren estadísticamente según el Test de Tukey ($p < 0,05$).

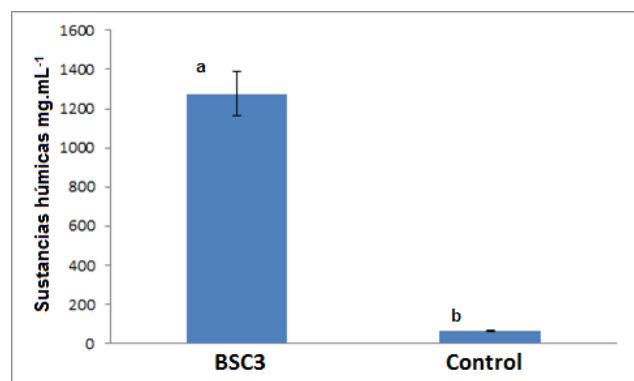


Figura 4. Producción de SH por BSC3 después de ser sembrada en el medio diseñado. Letras comunes no difieren estadísticamente según el Test de Tukey, ($p < 0,05$).

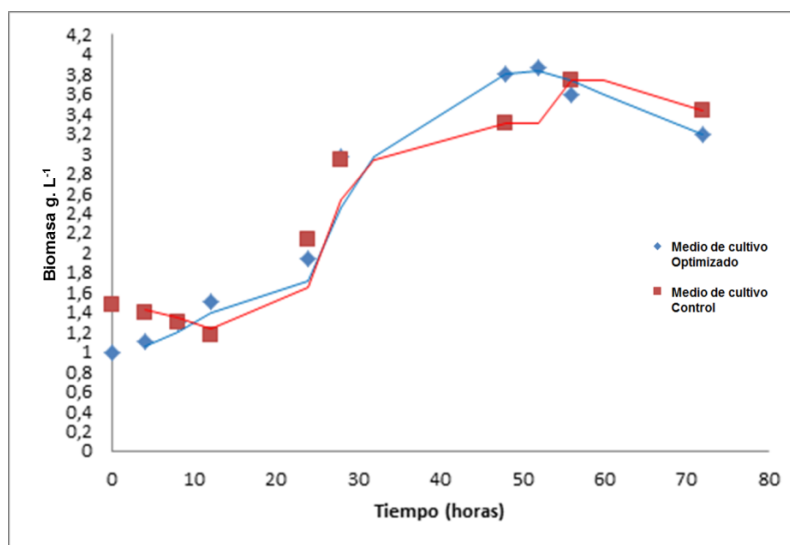


Figura 5. Curva de crecimiento BSC3. Producción de biomasa.

Tabla 2. Parámetros cinéticos para el cultivo de BSC3. Letras comunes no difieren estadísticamente según el Test de Tukey($p < 0,05$).

	<i>Microbacterium</i> sp.	
	Medio optimizado	Control
Biomasa final g/L	3,2 a	3,4 a
μ (h ⁻¹)	0,0206	0,0139
td (h)	33,64	49,85

en la actividad solubilizadora de carbón de BSC3, generada por su multiplicación en el medio de cultivo optimizado, no ha mostrado una reducción en su efectividad al ser inoculada en el suelo en conjunto con lignito, en experimentos a nivel de invernadero y de campo (Datos no mostrados – Grupo de Investigación Microbiología Agrícola y Ambiental).

Curva de crecimiento y determinación de parámetros cinéticos: BSC3 inició su fase exponencial a las 24 horas, tanto en el medio diseñado, como en el medio control (figura 8). El valor más alto de producción de biomasa en el medio optimizado se presentó a las 52 horas (3,86 g.L⁻¹), mientras que para el medio control fue a las 56 horas (3,76 g.L⁻¹).

Después de 72 horas, en el medio optimizado se produjo menor biomasa, mayor velocidad específica de crecimiento ($\mu=0,0206$ h⁻¹) y menor tiempo de duplicación ($td=33,64$ h) en comparación con el medio control cuyos datos para μ y td fueron: 0,0139 h⁻¹ y 49,85 h, respectivamente (tabla 2). Los cultivos bacterianos líquidos en concentraciones altas de azúcares tienden a incrementar la velocidad o tasa específica de crecimiento y el tiempo de duplicación durante las primeras horas del

cultivo, pero al final del proceso suelen presentar valores inferiores en la producción de biomasa, esto se debe a que la saturación de nutrientes inducen cambios osmóticos que reducen la eficiencia de algunos sistemas enzimáticos implicados en la absorción y transformación de azúcares, esto se traduce en disminución de biomasa bacteriana (Shimizu, 2014); esta explicación concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, sin embargo, pese a que la biomasa obtenida en el medio diseñado estuvo por debajo de la obtenida en el medio control, no se prestaron diferencias estadísticas significativas entre ellas.

Caracterización elemental (CNH) del medio de cultivo

La tabla 3 muestra los resultados de la caracterización instrumental CHN del medio de cultivo optimizado, el contenido de carbono estuvo dentro del rango descrito previamente por Batista (1998) para este elemento en melaza, debe tenerse en cuenta que este trabajo presenta la caracterización del medio de cultivo con todos sus componentes, por lo tanto esta concentración de carbono está influenciada por el contenido de lactosuero y la dilución de la que fue objeto durante la optimización de la producción de biomasa de BSC3. De otro lado,

Tabla 3. Caracterización elemental del medio de cultivo optimizado. DE: desviación estándar.

Muestra	Medio Optimizado			Lactosuero		
	Especie elemental	%m/m	DE g/L (Aprox)	%m/m	DE g/L (Aprox)	
	C	1,87	0,06	18,7	2,07	0,03
	N	0,50	0,14	5,0	0,26	0,00
	H	3,98	0,08	39,8	0,47	0,00

Batista (1998) describe una concentración de N inferior ($0,1 - 1,5 \text{ g.L}^{-1}$) a la presentada en estos resultados (Aproximadamente $5,0 \text{ g.L}^{-1}$), por lo tanto, el incremento en la concentración de N puede ser efecto del contenido de lactosuero, ya que su caracterización elemental indica que este resulta una fuente importante de carbono y nitrógeno en la constitución del medio. El contenido de C y N en el medio de cultivo optimizado permiten la obtención adecuada de biomasa bacteriana de BSC3.

CONCLUSIONES

Se optimizó el diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de BSC3 a partir de melaza (6%) y lactosuero (2,5%), más un contenido mínimo de sales. No hubo diferencias entre la producción de biomasa de BSC3 obtenida en el medio de cultivo diseñado y el medio de cultivo elaborado a partir de componentes comerciales; en el medio de cultivo diseñado se obtuvo mayor velocidad de crecimiento bacteriano y menor tiempo de duplicación; estos resultados indican la utilidad del medio ensayado para la producción de biomasa de BSC3.

La cepa bactriana BSC3 conservó su capacidad de producir SH a partir de CBR después de ser cultivadas en el medio de cultivo optimizado, lo que indica posibilidad de elaborar la formulación de un inoculante bacteriano a partir de esta cepa cultivada en este medio. De esta manera se diseñó un medio de cultivo para la producción de biomasa de BSC3 a partir de residuos agroindustriales comunes en el Departamento del Cesar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelwahed, N. A., Abdallah, N. A., El-Ghawas, D. E., El-Din, S. M. B., & El-Diwan, A. I. (2012). Isolation, identification and optimization of antimicrobial metabolites produced by soil derived actinomycetes. *Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.)*, 8(2): 205 - 217.
- Alves, A., Correia, A., Igual, J. M., & Trujillo, M. E. (2014). *Microbacterium endophyticum* sp. nov. and *Microbacterium halimionae* sp. nov., endophytes isolated from the salt-marsh plant *Halimione portulacoides* and emended description of the genus *Microbacterium*. *Systematic and applied microbiology*, 37(7), 474-479.
- Angulo-Cortés, J. P., García-Díaz, A., Pedroza, A. M., Martínez-Salgado, M. M., & Gutiérrez-Romero V. (2012). Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. *Universitas Scientiarum*, 17(1), 43-52.
- Bakir, M., Kudo, T., Benno, Y. (2008). *Microbacterium hatanonis* sp. nov., isolated as a contaminant of hairspray. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 654-658.
- Batista, B. M. (1998). *Characterization and interaction of sugarcane industry residues with soil, kaolinite, and Fe-oxides* (Doctoral dissertation, University of Saskatchewan Saskatoon).
- Canellas, L. P., & Olivares, F. L. (2014). Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1(1), 3.
- Choi S, H., Son, M. J., Kim, S. H., Choi, S. Y., Lee, Y. H., Choi, J. E., & An, G. (2009). Isolation and Medium Development of the Actinomycetes, *Streptomyces griseofuscus* CNU-A91231, Inhibiting Phytopathogenic Fungi. *Korean journal of microbiology and biotechnology*, 37(4), 322-32.
- Cubillos-Hinojosa, J. G., Valero, N. O., & Melgarejo, L. M. (2015). Assessment of a low rank coal inoculated with coal solubilizing bacteria as an organic amendment for a saline-sodic soil. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2(1), 21.
- Cubillos-Hinojosa, J. G., Valero, N., & Peralta Castilla, A. D. J. (2017). Effect of a low rank coal inoculated with coal solubilizing bacteria for the rehabilitation of a saline-sodic soil in field conditions.

- tions. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 70(3), 8271-8283.
- Domínguez-Espinosa, R. M., Wang, R., & Pacho-Carrillo, J. D. (2002). Residuos agroindustriales como materia prima para la producción de compuestos químicos finos. *Tecnología Ciencia Ed.(IMIQ)* 17 (2), 77-83.
- Doran, P. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press Inc, San Diego, CA.
- El-Enshasy, H. A., Mohamed, N. A., Farid, M. A., & El-Diwany A. I. (2008). Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. *Bioresource technology*, 99(10), 4263-4268.
- Ellwood, D. C., Phipps, P. J., & Hamilton, I. R. (1979). Effect of growth rate and glucose concentration on the activity of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in *Streptococcus mutans* Ingbritt grown in continuous culture. *Infection and immunity*, 23(2), 224-231.
- Fusconi, R., Godinho, M. J. L., & Bossola, N. R. S. (2005). Characterization and culture on sugarcane molasses of *Gordonia polyisoprenivorans* CCT 7137, a new strain isolated from contaminated groundwater in Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8-9), 1425-1431.
- Galán, E., & Romero, A. (2008). Contaminación de suelos por metales pesados. *Macla*, 10, 48-60.
- Gómez, G., & Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, 27 (3), 17-24.
- Gómez, G., Nápoles, M., Núñez, R., & Martínez, J. (2008). Influencia de la concentración de melaza y extracto acuoso de soya sobre la velocidad específica de crecimiento de *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001. *Cultivos Tropicales*, 29(4), 21-26.
- Guerra, N. P., Rua, M. L., & Pastrana, L. (2001). Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology*, 70(3), 267-281.
- Hamer, U., Marschner, B., Brodowski, S., & Amelung, W. (2004). Interactive priming of black carbon and glucose mineralisation. *Organic Geochemistry*, 35 (7), 823-83.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2011). Resolución 000698 del 4 de febrero de 2011. Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos, de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola.
- Kaur, G., Kaur, J., Dadhich, S., & Cameotra, S. (2011). Phosphate solubilizing bacteria *Microbacterium paraoxydans* isolated from the rhizospheric system of wheat (*Triticum aestivum*). *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*, (12).
- Kleber, M. (2010). What is recalcitrant soil organic matter? *Environmental Chemistry*, 7(4), 320-332.
- Kumar, V., Bhalla, A., & Rathore, A. S. (2014). Design of experiments applications in bioprocessing: Concepts and approach. *Biotechnology progress*, 30 (1), 86-99.
- Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41-54.
- Park, M., Kim, M., Kim, H., Im, W., Yi, T., Kim, S., & Yang, D. (2008). *Microbacterium ginsengisoli* sp. nov., a β -glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 (2), 429-433.
- Piccolo, A., Pietramellara, G., & Mbagwu, J. S. C. (1997). Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. *Geoderma*, 75(3-4), 267-277.
- Rashid, S., Charles, T., & Glick B. (2012). Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied soil ecology*, 61, 217-224.
- Rivas, R., Trujillo, M., Sánchez, M., Mateos, P., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2004). *Microbacterium ulmi* sp. nov., a xylanolytic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of

Ulmus nigra. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(2), 513-517.

Sharma, P., Diene, S. M., Thibeaut, S., Bittar, F., Roux, V., Gomez, C., ...& Rolain, J. M. (2013). Phenotypic and genotypic properties of *Microbacterium yannicii*, a recently described multidrug resistant bacterium isolated from a lung transplanted patient with cystic fibrosis in France. *BMC microbiology*, 13(1), 1.

Shimizu, K. (2014). Regulation systems of bacteria such as *Escherichia coli* in response to nutrient limitation and environmental stresses. *Metabolites*, 4(1), 1-35.

Shivakumar, S. (2012). Accumulation of poly (3-hydroxybutyrate) by *Microbacterium barkeri* DSM 20145. *Turk J Biol*, 36, 225-232.

Shrivastava, U., & Kumar, A. (2013). Characterization and optimization of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase (ACCD) activity in different rhizospheric PGPR along with *Microbacterium* sp. strain ECI-12A. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 1(1), 11-15.

Singh, S. P., Bishop, C. J., Vink, R., & Rogers, P. J. (1985). Regulation of the glucose phosphotransferase system in *Brochothrix thermosphacta* by membrane energization. *Journal of bacteriology*, 164(1), 367-378.

Valero, N., Melgarejo, L. M., & Ramírez, R. (2016). Effect of low-rank coal inoculated with coal solubilizing bacteria on edaphic materials used in post-coal-mining land reclamation: a greenhouse trial. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 20.

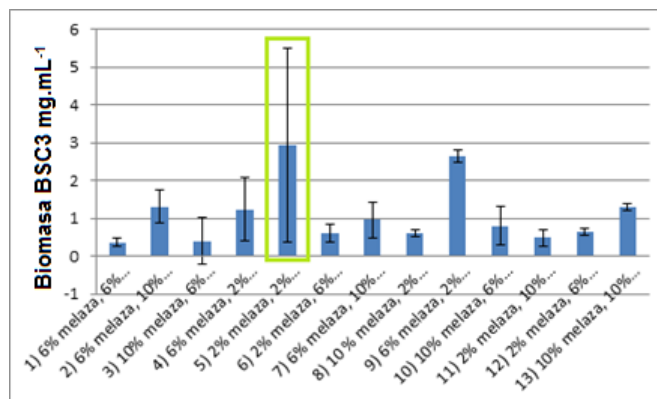
Valero, N., Gómez, L., Pantoja, M., & Ramírez, R. (2014). Production of humic substances through coal-solubilizing bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3): 911-918.

Yamamoto, K., & Asano, Y. (2015). Efficient production of lumichrome by *Microbacterium* sp. strain TPU 3598. *Applied and environmental microbiology*, 81(21), 7360-7367.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material suplementario 1

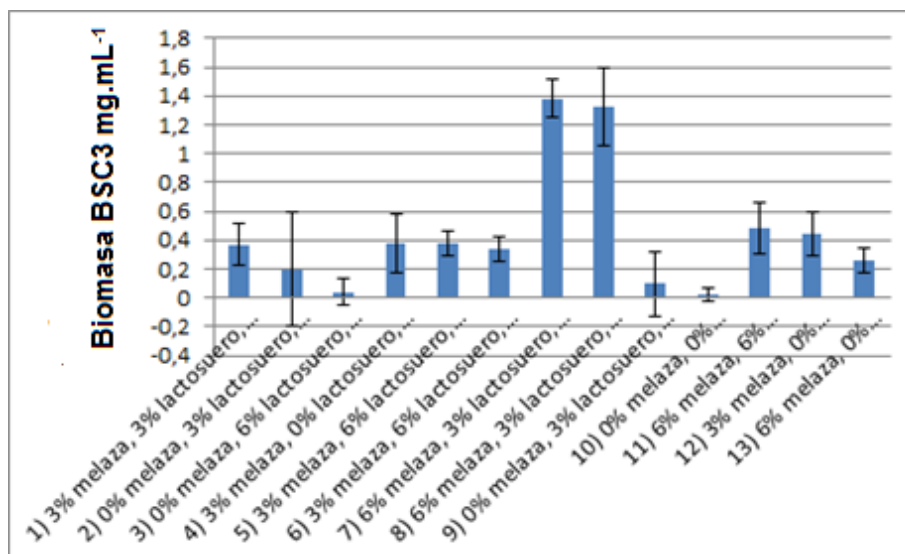
COMBINACIONES SUGERIDAS POR EL DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA EL RANGO DE CONCENTRACIÓN DE SUSTRATOS 2 – 10%
1) 6% melaza, 6% lactosuero, 6% cabecilla de arroz
2) 6% melaza, 10% lactosuero, 2% cabecilla de arroz
3) 10% melaza, 6% lactosuero, 2% cabecilla de arroz
4) 6% melaza, 2% lactosuero, 10% cabecilla de arroz
5) 2% melaza, 2% lactosuero, 6% cabecilla de arroz
6) 2% melaza, 6% lactosuero, 2% cabecilla de arroz
7) 6% melaza, 10% lactosuero, 10% cabecilla de arroz
8) 10 % melaza, 2% lactosuero, 6% cabecilla de arroz
9) 6% melaza, 2% lactosuero, 2% cabecilla de arroz
10) 10% melaza, 6% lactosuero, 10% cabecilla de arroz
11) 2% melaza, 10% lactosuero, 6% cabecilla de arroz
12) 2% melaza, 6% lactosuero, 10% cabecilla de arroz
13) 10% melaza, 10% lactosuero, 6% cabecilla de arroz



Resultados del experimento completamente al azar que determinó las desviaciones estándar de cada combinación sugerida por el diseño de superficie de respuesta para el rango de concentración de sustratos 2 – 10%.

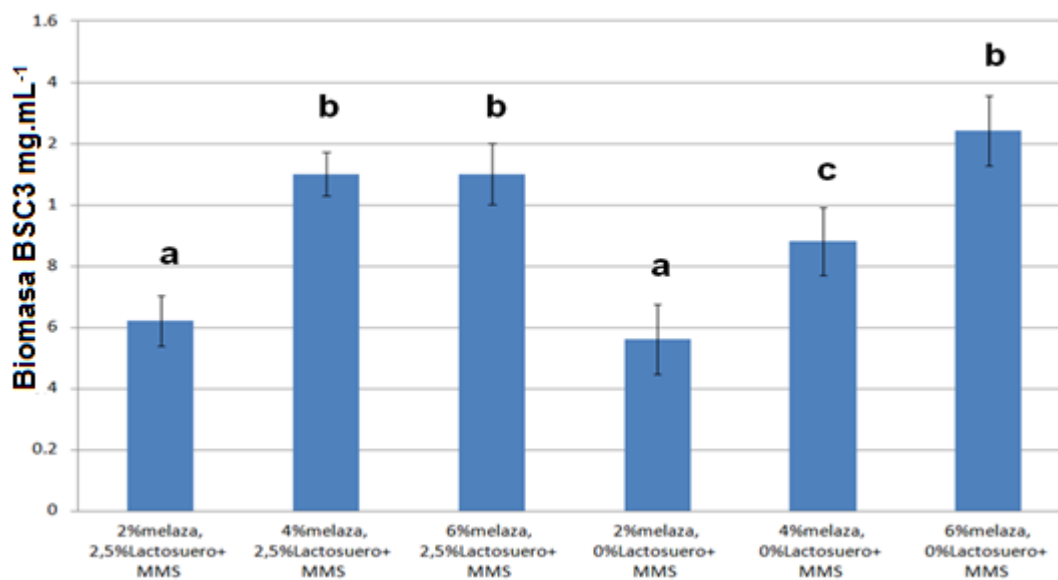
Material suplementario 2

COMBINACIONES SUGERIDAS POR EL DISEÑO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA EL RANGO DE CONCENTRACIÓN DE SUSTRATOS 0 – 6%
1) 3% melaza, 3% lactosuero, 3% cabecilla de arroz
2) 0% melaza, 3% lactosuero, 6% cabecilla de arroz
3) 0% melaza, 6% lactosuero, 3% cabecilla de arroz
4) 3% melaza, 0% lactosuero, 0% cabecilla de arroz
5) 3% melaza, 6% lactosuero, 6% cabecilla de arroz
6) 3% melaza, 6% lactosuero, 0% cabecilla de arroz
7) 6% melaza, 3% lactosuero, 0% cabecilla de arroz
8) 6% melaza, 3% lactosuero, 6% cabecilla de arroz
9) 0% melaza, 3% lactosuero, 0% cabecilla de arroz
10) 0% melaza, 0% lactosuero, 3% cabecilla de arroz
11) 6% melaza, 6% lactosuero, 3% cabecilla de arroz
12) 3% melaza, 0% lactosuero, 6% cabecilla de arroz
13) 6% melaza, 0% lactosuero, 3% cabecilla de arroz



Resultados del experimento completamente al azar que determinó las desviaciones estándar de cada combinación sugerida por el diseño de superficie de respuesta para el rango de concentración de sustratos 0 - 6%.

Material suplementario 3



Resultados del ensayo completamente al azar en el que se comparó la producción de biomasa de BSC3 en las combinaciones sugeridas por el diseño 2 - 10% y el diseño 0 - 6%. Letras comunes no difieren estadísticamente (Test de Tukey, $p < 0,05$).