ESTUDIO DE LA RELACIÓN ADHESIÓN/TAMAÑO DE PARTÍCULA, UTILIZANDO DOS BACTERIAS Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Ing. Yudyt Díaz Saez[1], Yandy Repilado Delgado[1]

1. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos", Vía Blanca Km.3, Matanzas, Cuba.

CD de Monografías 2011
(c) 2011, Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos"

Resumen

La inmovilización celular es una de las técnicas empleadas para la investigación y desarrollo de procesos biotecnológicos, bajo la premisa de mejorar rendimiento, efectuar procesos continuos y disminuir pasos de purificación. Un grupo de metodologías pueden ser implementadas para el logro de uno o varios de los objetivos anteriores, como son la encapsulación, el atrapamiento en gel y la adsorción sobre matrices o soportes porosos. Dentro de la diversidad de materiales utilizados para la inmovilización se encuentran polímeros naturales y sintéticos, compuestos minerales y materiales celulósicos como el bagazo de caña de azúcar. El estudio de la relación de adhesión de dos bacterias, *Bacillus subtilis* y *Azospirillum brasilense* sobre diferentes tamaños de partículas de bagazo, como primer paso en la investigación sobre inmovilización celular, permitió la selección de las dimensiones del soporte. En ambos casos se evidenció que un tamaño entre 1,6 a 3,14 mm permite una adhesión máxima.

Palabras claves*: adhesión, inmovilización celular, Azospirillum, Bacillus subtilis.*

Monografía

La utilización de microorganismos en la obtención de productos beneficiosos para el hombre es un campo en desarrollo, a pesar de tener sus inicios hace miles de años con la producción de vino, vinagre, pan y queso. Las modificaciones continuas en el proceso tecnológico y la implementación de técnicas para el trabajo con el material genético, han determinado mejoras en la eficiencia y diversidad de características para un mismo producto. Dentro de las estrategias utilizadas para la disminución de los costos está la inmovilización de las células en soportes, lo que permite un funcionamiento continuo del proceso, la reducción de pasos de purificación ulteriores y el incremento de la eficiencia; aunque está asociado a desventajas como la disminución de la viabilidad celular, el envejecimiento del cultivo y dificultades en los mecanismos de transporte de masa (Ramakrishna and Prakasham, 1997).

Dentro de las técnicas más estudiadas se encuentra el atrapamiento en matrices poliméricas, las más utilizadas han sido agar, alginato, celulosa, colágeno, poliacrilamida, poliestireno y poliuretano. Dentro de esta modalidad destaca la encapsulación de las células en perlas, que utilizan con frecuencia alginato de sodio en cloruro de calcio, combinado con diferentes estrategias de operación y con amplias aplicaciones en la obtención de antibióticos (Ramakrishna and Prakasham, 1997). Investigaciones de Konsoula y Liakopoulou-Kyriakides (2006), donde inmovilizaron la bacteria *Bacillus subtilis* para la producción de la enzima α-amilasa, lograron incrementos en la capacidad de producción enzimática, sin evidencias de barreras difusionales grandes ni afectaciones en la transferencia de oxígeno, reportadas en investigaciones anteriores. Uno de los parámetros que determina los resultados obtenidos es la disminución del tamaño de la esfera, siendo las más pequeñas las que permiten un mejor trasporte de sustancia y una mayor superficie de contacto (Betancur et. al, 2003).

La adhesión a superficies ha sido investigada intensamente utilizando como material de soporte madera, vidrio, plástico, resinas de intercambio, etc. Además, se ha evaluado su ocurrencia como fenómeno natural, García y colaboradores (2008) estudiaron la composición de los glucanos extracelulares bacteriano que intervienen en el mecanismo de formación de la placa dental, en función de jugar un importante papel en el mecanismo de infección de varias enfermedades (An and Friedman, 1997). La adsorción se ha explicado a partir de interacciones electrostáticas entre la superficie del soporte y la célula (Rijnaarts et al., 1995**)**, por lo que se mejoran las propiedades del soporte al enlazarle partículas cargadas como polisacáridos (Zhao et al., 2007).

Para la adsorción celular el tamaño de partícula resulta un parámetro crítico, que determinará el comportamiento de la transferencia de masa dentro del fermentador. Betancur y colaboradores (2003) proponen para la inmovilización de *Lactobacillus helveticus* la utilización de partículas distribuidas entre 1 a 3 mm, tal que resultaran comparables con las dimensiones de la colonia de este microorganismo, que oscila entre 1 a 2 mm. En **un** estudio sobre tratamiento de aguas residuales Warren y colaboradores (1992) utiliza**n** perlas de vidrio de 3 mm de diámetro para la inmovilización de *Pseudomonas fluorescens* and *Xanthomonas maltophilia*. Para estudios de inmovilización de una fotobacteria en láminas de vidrio Tsygankov y colaboradores (1994) utilizan poros de 0,5 mm de diámetro, logrando 11,2 mg de bacteria en eso seco por ml de poro disponible para la producción de hidrógeno. También Kinoshita y colaboradores utilizan 0,5 mm como diámetro de partículas de sílica como soporte de una columna con lecho fijo para la inmovilización de *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus subtilis* (Kinoshita, 1993). Mientras Tsuneda y colaboradores (2006) utilizan esferas de vidrio de 0,1 mm de diámetro.

Objetivo

Seleccionar el tamaño de partícula de bagazo de caña de azúcar, que garantice una adsorción celular máxima.

Métodos

Se evaluó la adsorción celular en tres rangos de tamaño de partículas de bagazo de caña de azúcar: 5-3,14 mm; 3,14-1,16 mm y 1,16-0,33 mm.

Tubos plásticos de 50 ml de capacidad con 1 g de partículas de bagazo y 29 ml de agua destilada, después de autoclavear por 20 min y 121 ºC a 1 atm, se inocularon con 1000 µl de cultivo bacteriano en fase exponencial. Se incubaron a 37 ºC y 100 rpm por 4 h, luego se separaron las partículas de bagazo con filtro de tela de 0,1 mm.

Las partículas de bagazo fueron lavadas con 30 ml de agua destilada y sometidas a agitación a 200 rpm en zaranda ROTABIT 0351426 por 1 minuto, separándose nuevamente las partículas del líquido por filtración; atendiendo a lo reportado por Silva y colaboradores (2006) quienes evalúan el desprendimiento de células después de una fermentación de 24 horas con una agitación de 180 rpm por 30 minutos. Se determinó la absorbancia a 560 nm al líquido de incubación y al lavado en espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro.

Cada tamaño de partícula fue evaluado por triplicado, con control de agua destilada sin inocular y un control general del inóculo sin partículas de bagazo. Además se estableció un punto combinado con un 40 % de las partículas de mayor tamaño, y 30 % de los otros dos rangos.

Las cantidades de células adsorbidas se determinaron a partir de la diferencia entre las células sin bagazo y las células en el líquido de incubación. Las células adsorbidas irreversiblemente se estimaron de la diferencia entre las células adsorbidas y las células en el lavado.

El inóculo se preparó en medio Dygs para *Azosopirillum,* conteniendo extracto de levadura 2 g/l; peptona 1,5 g/l; K_2HPO_4 0,38 g/l; $MgSO_4*7H_20$ 0,5 g/l; ácido málico 2 g/l; ácido glutámico 1,5 g/l, glucosa 2 g/l a pH 6,8. Para Bacillus se utilizó peptona 5 g/l; extracto de levadura 3 g/l, sacarosa 50 g/l, NaCl 5 g/l; $Mg_2SO_4*7H_2O$ 0,5 g/l, KH_2PO_4 1 g/l a pH 7.

Azospirillum brasilense

Azospirillum es un género de bacterias bioestimulantes que fijan el nitrógeno libre atmosférico a las raíces de las plantas donde se encuentran asociadas (Bahat-Samet, 2004), dentro de las cuales se encuentra la especie *A. brasilense* (Rivera, 2008). *Azospirillum* se corresponde con bacterias Gram negativas, con forma de bacilos y tamaño que oscila entre 2,1 a 3,8 μm, con presencia de material fibrilar al crecer a bajas concentraciones de oxígeno (Rivera, 2008). El rango de temperatura óptimo para el crecimiento es de 28-30 ºC, aunque encuentran hábitats en regiones tropicales, templadas, frías y desérticas (Tyler, 1979). Su mejor desarrollo lo logra cercano a la neutralidad entre pH 6,0 y 7,8 no pudiendo aislarse en medios con pH inferior a 4,5 (Döbereiner, 1976). En su metabolismo posee las vías Embden-Meyerhof-Parnas, Entner-Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, pudiendo crecer de forma autotrófica con dihidrógeno y dióxido de carbono; además de utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono como azúcares y ácidos. En la mayoría de los casos el microorganismo se ve favorecido por bajas concentraciones de oxígeno, especialmente para el desarrollo de su actividad nitrogenasa, (Reiner, 1986). Steenhoudt y Vanderleyden (2000) refieren que como fuente de nitrógeno puede utilizar amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular.

Se ha reportado que Azospirillum coloniza la parte interna de las raíces a través de los espacios intercelulares en algunas especies vegetales (Levanony, 1991) y más comúnmente la parte externa, donde forman agregados y se recubren de una capa mucilaginosa. (Bilal, 1993). Colonizan también superficies abióticas incluidas raíces muertas, en estudios realizados por Bashan y Holguin (1993) se comprobó que existe una disminución de la adhesión a superficies como el poliestireno, ante la presencia de manganeso y elevadas concentraciones de carbonato de calcio. Las posibilidades de colonización están muy relacionadas con la producción de agregados que tienen la capacidad de adherirse a las células vegetales (Bahat-Samet, 2004).

Un grupo de autores informan la existencia de dos fases dentro del mecanismo de colonización, consistentes en una adhesión rápida y débil, seguida de un anclaje fuerte con formación de fibrillas en forma de red que ha sido observado por microscopía electrónica de barrido (Del Gallo and Haegi, 1990; Castellanos et al., 1998; Caballero-Mellado, 2002). La primera etapa de adsorción alcanza su valor máximo a las 2 horas de incubación y pudiera estar controlado por la producción de compuestos proteicos según Bashan y Levanony (1988). El segundo proceso, con carácter irreversible comienza luego de las 8 horas de incubación y tiene un máximo luego de 16 h; vinculado a la producción de polisacáridos extracelulares (Michiels et al., 1991). En el caso de la superficie del suelo, Azospirillum se encuentra adherido de manera irreversible a la arcilla y la materia orgánica a través de interacciones electrostáticas, aunque la fortaleza de la unión varía según el material, encontrándose para el cuarzo una adsorción ligera (Bashan y Vazquez 2000; Chotte et al. 2002). En investigaciones realizadas por Fallik y colaboradores (1988) la adhesión a turba superó la lograda en la vermiculita, el polvo de talco, los gránulos de basalto y la bentonita.

Levanoy y Bashan (1991) reportan el papel de los agregados fibrilares en el anclaje a las superficies, producidos por A. brasilense. Al estudiar una mutante incapacitada de producir material fibrilar que en arena llega a la desorción parcial de las células con un lavado de 10 segundos, y un incremento pequeño para un tiempo de lavado de 2 minutos; mientras la agitación provocó una desorción de las células en más de un 80 %. Estos mismos autores estudiaron la colonización interna de las raíces de gramíneas donde la bacteria ocupa los espacio intercelulares del vegetal. Importante papel conceden estos autores y otros investigadores a las características electrostáticas de la superficie, así como a la hidrofobicidad, señalando la existencia de diferencias entre el medio sólido y líquido.

El conocimiento de estos mecanismos ha influido en los estudios agronómicos para el mejoramiento de cultivos al lograrse aumentos de la masa radicular con inóculos de la bacteria. Como consecuencia se han desarrollados biofertilizantes conservados en medio líquido y sólido, obteniéndose en los segundos valores superiores de viabilidad de la bacteria en períodos relativamente largos de tiempo. En este sentido se estableció que la turba es un soporte que mejora la conservación y las potencialidades de la bacteria como biofertilizante (Díaz et al., 2003)

Los estudios realizados se muestran en la figura 1a), donde se observa un aumento del número de células adsorbidas al bagazo con el aumento del tamaño de partículas, pero donde existe un valor máximo intermedio.

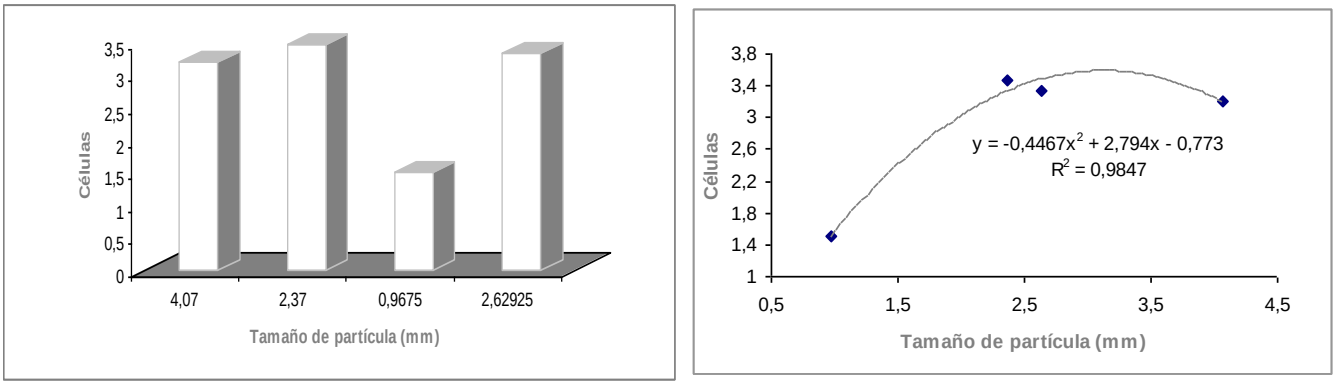

Figura 1 a) Adsorción de células a partículas de bagazo, b) ajuste del comportamiento a un modelo polinomial.

En el comportamiento de las células adsorbidas, descrito por una ecuación polinomial en la figura 1b, se presenta un estado de saturación del soporte a partir del segundo rango de tamaño de partículas. Tal fenómeno podría responder a dificultades en la formación y estabilidad de los agregados y biopelículas con características macroscópicas como se ilustra en la figura 2, en un medio líquido y agitado. Negativa la adsorción con la agitación (Levanony and Bashan, 1991)

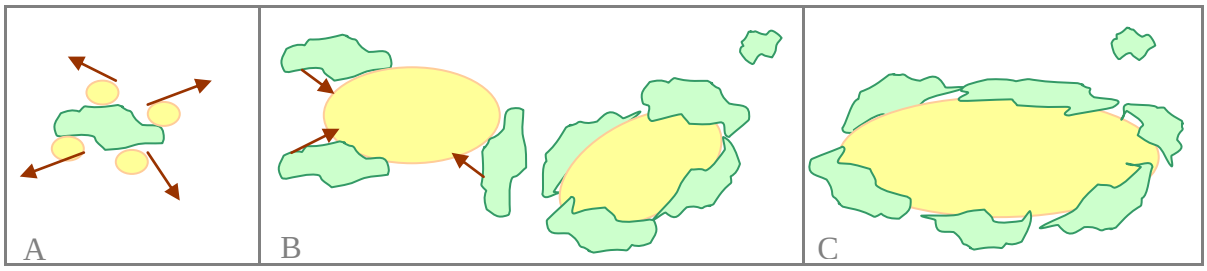

Figura 2 Posible comportamiento de agregados celulares para el aumento del tamaño de partículas

En el estado A el tamaño de partículas compite con el tamaño de los agregados y biopelículas, con fuerzas originadas por la agitación que toman distintas direcciones y resultan negativas para la estabilidad del agregado celular. En el estado B los agregados en formación tienen tamaño inferior a las partículas y una tendencia a la adhesión para aumentar la estabilidad y cubrir el área superficial disponible. En el estado C un mayor tamaño de partícula incrementa el número de células adheridas por partícula, pero diminuye el número de partículas, es decir el área superficial total disponible.

Aún cuando se reporta la fase de adhesión irreversible a partir de las 8 horas de incubación, según lo comentado anteriormente, luego de las 2 horas en que la primera fase de adhesión se verifica en toda su magnitud, deberá existir un aumento en la fuerza de anclaje que pudiera estar regido por diversos factores, al registrarse sólo un número de células apreciables en el lavado de las partículas más pequeñas. Los factores propuestos para la rápida desorción de las células en partícula pequeñas son: direccionalidad de las partículas

en movimiento y número de partículas adheridas a la biopelícula. Mientras el peso de las partículas superiores disminuye los efectos de la turbulencia en el líquido.

Los trabajos consultados no reportan la influencia de la edad del cultivo en el desarrollo de la adherencia a superficies sólidas, sin embargo, el desarrollo de polisacáridos extracelulares se ha sugerido como respuesta a condiciones desfavorables de elevada ocurrencia en la fase estacionaria del crecimiento. Ello determina que el estudio estuviera condicionado por un inóculo que se encontraba en el final de la fase exponencial y principio de la fase estacionaria; obteniéndose resultados diferentes si el cultivo se hubiese encontrado en el inicio de la fase exponencial.

Un factor no evaluado por el corto tiempo del ensayo fue la utilización del bagazo como fuente de carbono, aunque Ooijkaas y colaboradores (2000) reporta que es un soporte inerte para microorganismos, esta afirmación no es posible generalizarla, debido a la existencia en algunas especies de enzimas capaces de degradar los materiales celulósicos y lignocelulósicos. Además de encontrarse pequeñas cantidades de azúcares no extraídos de los procesos industriales que pueden ser hidrolizados y/o utilizados por el microorganismo.

En el estudio con bagazo se tuvo en cuenta la aparición de turbulencia en el medio (absorbancia a 560 nm) debido a la propia naturaleza del soporte, figura 3.

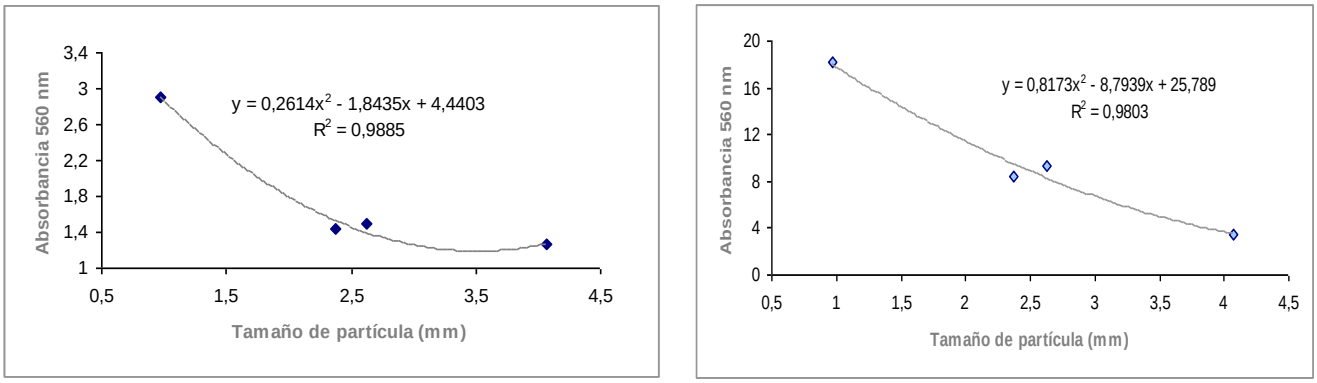

Figura 3: Aporte del bagazo a la turbulencia en dos momentos.

El comportamiento mostrado es consecuencia de la tendencia al aporte a la solución de partículas de diferente naturaleza que contribuyen a la lectura en el espectro visible. La exposición de una mayor superficie para las partículas pequeñas incrementa la transferencia de masa del sólido al líquido, pero con una significativa disminución del efecto a partir de la distribución intermedia del tamaño de partícula.

Bacillus subtilis

Es una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, no patógena que se encuentra generalmente en el suelo como hábitat natural (Cariello, 2007). Puede encontrarse en

simbiosis con las plantas al inducir una resistencia sistémica natural contra patógenos bacterianos y fungosos, debido a la secreción de antibióticos como la subtilisina; además de actuar sobre la solubilización del fósforo del suelo (Ortuño, 2003). Tiene la capacidad de utilizar como fuente de carbono azúcares, caseína, almidón, ácidos grasos y alcoholes (Lisboa, 2003). Como mecanismo de defensa ante las condiciones medioambientales adversas produce endosporas y secreta enzimas hidrofílicas que le permiten sobrevivir y alimentarse. Se conoce que crece hasta temperaturas de 70ºC y pH extremos de 3 (Lisboa, 2003); aunque el mayor crecimiento se desarrolla a temperaturas cercanas a los 37ºC y pH entre 6 y 7.

La obtención de productos extracelulares a partir de esta bacteria ha sido estudiada en diversos sistemas, ejemplo de ello son los estudios de obtención de surfactina en fermentadores discontinuos (Giro, 2009); las investigaciones en reactor fluidizado por flujo de aire en modo continuo (Noah, 2002); la fermentación discontinua en presencia de soportes libres de carbón activado que incrementaron significativamente la producción del metabolito (Yeh, 2005) y fermentación en estado sólido sobre residuos de producción del requesón de soya (Ohno, 1995)

Los resultados alcanzados con esta bacteria se muestran en la figura 4a, donde se observa un aumento del número de células adsorbidas al bagazo con el aumento del tamaño de partículas.

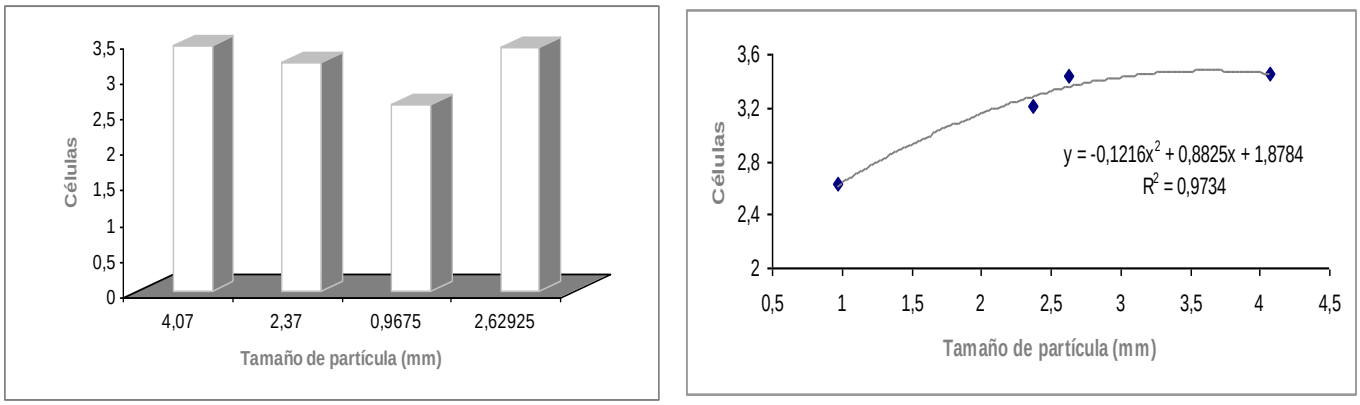

Figura 4: a) Adsorción de células a partículas de bagazo, b) ajuste del comportamiento a un modelo polinomial.

El comportamiento obtenido para esta bacteria tiene similitud con el del *Azospirillum brasilense*, pero no se llega a encontrar un valor máximo de tamaño de partícula. Lo anterior se relaciona con la naturaleza de los materiales extracelulares.

Bacillus subtilis cuenta con una amplia producción de enzimas extracelulares entre las que se encuentras proteasas, amilasas y celulasas; mientras que en la etapa estacionaria de crecimiento presenta producción de un homopolímero mucilaginoso en presencia de sacarosa, como respuesta a condiciones desfavorables en el medio, además de sugerírsele otras funciones, el cual llega a formar biopelículas y agregados macrosocópicos. Como

característica adicional la bacteria produce gran cantidad de esporas que le permite sobrevivir en condiciones extremas.

La disminución brusca de la fuente de nutrientes debió desencadenar, en el experimento, las vías de respuesta a condiciones desfavorables, pero la presencia de partículas de bagazo, ricas en materiales celulósicos y azucarados, pudo haber inducido además rutas vinculadas con la excreción de enzimas capaces de utilizar estos sustratos y de la polimerización de la fructosa presente y obtenida de la hidrólisis de la sacarosa. Sin embargo, luego de 4 horas de incubación una parte de las células pudo haber pasado a la fase de esporulación, perdiendo gran parte de la masa celular, y variando su capacidad para permanecer unida a la capa de polisacárido extracelular.

Un comportamiento significativamente diferente resulta la perdida de un 20 % de las células inicialmente retenidas al ser lavado el bagazo en tres de los tamaños ensayados. Aunque las cantidades fuertemente adheridas permanecieron casi constantes para el parámetro ensayado, figura 5.

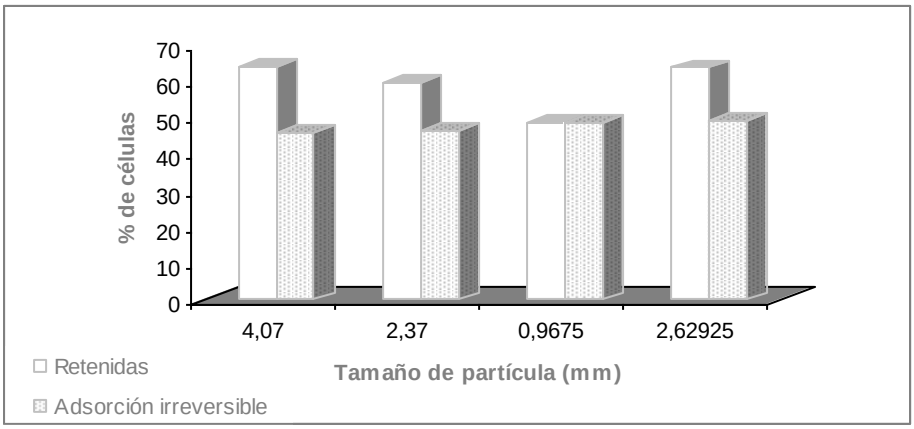

Figura 5 Retención celular en el bagazo

En este caso los resultados obtenidos pudieran estar vinculados con la cantidad de células que tienen la capacidad de adherirse, en función de la edad del cultivo, figura 6.

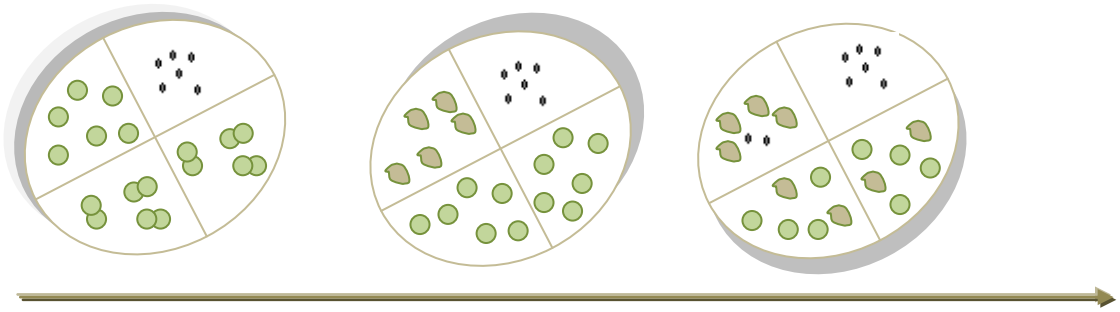

Figura 6: Desarrollo evolutivo del cultivo microbiano en el tiempo

Las proporciones disponibles a la adsorción son idénticas para todos los tamaños de partículas, las adherencia irreversible en este caso es una función de las células disponibles según la edad del cultivo mientras la adsorción ligera estará relacionada con las etapas más

tempranas que no han desarrollado todas las herramientas de adhesión y que están sujetas a los fenómenos de saturación de la superficie. Mientras un grupo de células puede haber disminuido la capacidad de formación de polisacáridos extracelulares a partir de su evolución a endosporas.

Conclusión

El proceso de adhesión es influenciado por gran número de factores que pueden variar a lo largo del tiempo, la naturaleza de la partícula define el potencial electrostático a interaccionar en la primera etapa de adherencia y ha sido establecido su papel por varios autores, mientras existe una influencia moderada del tamaño de partícula que actúa sobre la cantidad de células posibles a adsorberse. En el saco de las bacterias *A. brasilense* y *B. subtilis*, para partículas de bagazo de caña de azúcar, una distribución entre 1,6 a 3,14 mm permite una adhesión próxima a la máxima dentro del rango en estudio.

Bibliografía

An Y. and Friedman R. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods*, 1997, Vol. 30, No.2, 141-152 pp.

Bahat-Samet E. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense. FEMS Microbiology Letters*, 2004, Vol. 237, No. 2, 195–203 pp.

Bashan Y. and Holguin G. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *J. Gen. Microbiol*., 1993, Vol. 139, 379-385 pp.

Bashan, Y. and Levanony H. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense. Plant Soil*, 1991, Vol. 137, 99-103 pp.

Bashan Y. and Levanony H. Interaction between *Azospirillum brasilense* Cd and wheat root cells during early stages of root colonization. *In: Azospirillum IV, Genetics, Physiology, Ecology,* ed. W. Klingmüller, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988, 166-173 pp.

Bashan Y. and Vazquez P. Effect of calcium carbonate, sand, and organic matter levels on mortality of five species of *Azospirillum* in natural and artificial bulk soils. *Biol. Fertil. Soils*, 2000, Vol. 30, 450-459 pp. Disponible en: http://www.bashanfoundation.org/gmaweb/pdfs/ronaldpgpb8.pdf

Betancur J., Restrepo Y., Abad P. y Arias M. Inmovilización de *lactobacillus helveticus* en soportes vítreos obtenidos por tecnología sol-gel. Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidrio, 2003, Vol. 42, No. 2, 79-83 pp.

Bilal R., Rasul G., Arshad M. and Malik K. Attachment, colonization and proliferation of *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter* spp. on root surface of grasses. *World. J. Microbiol. Biotechnol*., 1993, Vol. 9, 63-69 pp.

Caballero-Mellado J. El género Azospirillum. Microbios en línea. Editores: Dra. Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero. Cuernavaca, Mor., México. ISBN 968-36-8879-9. 2002. Disponible en: http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html.

Cariello M., Castañeda L., Riobo I. y González J. Inoculante de microorganismos endógenos para acelerar el proceso compostaje de residuos sólidos urbanos. *R. C. Suelo Nutr. Veg.*, 2007, Vol. 7, No. 3, 26-37 pp.

Castellanos T., Ascencio F. and Bashan Y. Cell-surface lectins of *Azospirillum* spp. *Curr. Microbiol*., 1998, Vol. 36, 241-244 pp.

Chotte J., Schwartzmann A., Bally R., and Monrozier L. Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. *Soil Biol. Biochem.*, 2002, Vol. 34, 1083-1092 pp.

Del Gallo M. and Haegi A. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in Azospirillum brasilense and Azospirillum lipoferum. *Symbiosis 9*, 1990, 155-161 pp. ISSN 0334-5114

Díaz C., González E., Álvarez J. y Laurencio M. Estudio preliminar de diferentes técnicas de aplicación de un biofertilizante a base de *Azospirillum* sp. en el cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). Centro Agrícola, 2003, No.2, 18-22 pp.

Döbereiner J., Marriel I. and Nery M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum Beijerinck*. *Can. J. Microbiol*., 1976, Vol. 22, 1464-1473 pp.

Fallik E., Okon Y. and Fischer M. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biol. Biochem*., 1988, Vol. 20, 45-49 pp.

García B., Saldaña A. y Basterrechea M. Glucanos extracelulares bacterianos: estructura, biosíntesis y función. 2008

Giro M., Martins J., Rocha M., Melo V. and Gonçalves L.. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. Biotechnol J., 2009, Vol. 4, No. 5, 738-47 pp.

Kinoshita T., Bales R., Yahya M. and Gerba Ch. Bacteria transport in a porous medium: Retention of bacillus and pseudomonas on silica surfaces. Water Research, 1993, Vol. 27, No. 8, 1295-1301 pp.

Konsoula and Liakopoulou-Kyriakides. Thermostable α-amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. Enzyme and Microbial Technology, 2006, No. 39, 690–696 pp.

Levanony H. and Y. Bashan. 1991. Enumeration and identification of rhizosphere bacteria by advanced immuno techniques. *In: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Progress and Prospects*. C Keel, B Koller G Défago, Zürich: IOBC/WPRS Bulletin, 1991, 231-237 pp.

Michiels K., Croes C. and Vanderleyde, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp 7 to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, 1991, *Vol.* 137, 2241–2246 pp.

Noah K., Fox S., Bruhn D., Thompson D. and Bala G. Development of continuous surfactin production from potato process effluent by Bacillus subtilis in an airlift reactor. Appl. Biochem Biotechnol., 2002, Vol. 98, No. 100, 803-813 pp.

Ohno A., Ano T. and Shoda M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant Bacillus subtilis in solid state fermentation. Biotechnol Bioeng., 1995, Vol. 47, No. 2, 209-14 pp.

Ooijkaas, L., Weber F., Buitelaar, R., Tramper J. and Rinzema A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Elsevier Science*., 2000, No. 18, 356-360 pp.

Ortuño N., Claros M., Angulo V., Navia O. y Meneses E. Biofertilizantes artesanales con microorganismos rizosfericos nativos para una produccion orgánica de Quinua en Bolivia. Investigadores Fundación PROINPA, 2005

Lisboa M. Efectividad de *Bacillus subtilis* y de uma cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (Botrytis cinerea) Em vid vinífera. Tesis por el título de ingeniero agrónomo. Talca, 2003, (Chile).

Ramakrishna S. and Prakasham R. (1997). Microbial fermentations with immobilized cells.

Reiner O. and Okon Y. Oxygen recognition in aerotactic behaviour of *Azospirillum brasilense Cd*. *Can. J. Microbiol*., 1986, Vol. 32, 829-834 pp.

Rijnaarts H., Norde W., Bouwer E., Lyklema J. and Zehnder A. Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. Colloids and Surface B: Biointerfaces, 1994, Vol. 4, No. 1, 5-22 pp.

Rivera, D. M. *Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en Azospirillum brasilense C16.* Proyecto de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero de Producción Biotecnológica. Universidad Francisco de Paula Santander, Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, Plan de Estudios de Ingeniería de Producción Biotecnológica, San José de Cucuta. (2008).

Silva E., Caicedo L., Pulido P. y Lentijo I. Biodesulfurización de queroseno con células inmovilizadas de *Pseudomonas* sp. No. 6 (aislado nativo) en un novedoso biorreactor de lecho de tubos con recirculación. [on-line]. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm., 2006, Vol. 35, No. 1, 33-46 pp. Disponible en: www.farmacia.unal.edu.co

Steenhoudt O. and Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, Vol. 24, 487 p.

Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, Vol 223, No. 2, 287-292 pp.

Tsygankov A., Hirata Y., Miyake M., Asada Y., and Miyake J. Photobioreactor with photosynthetic bacteria immobilized on porous glass for hydrogen photoproduction. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1994, Vol. 77, No. 5, 575-578 pp.

Tyler M., Milam J., Smith R., Schank S. and Zuberer D. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions. *Can. J. Microbiol*., 1979, Vol. 25, 693-697 pp.

Warren T., Williams V. and Fletcher M. Influence of solid surface, adhesive ability, and inoculums size on bacterial colonization in Microcosm studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, Vol. 58, No. 9, 2954-2959 pp.

Yeh M., Wei Y. and Chang J. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. Biotechnol Prog., 2005, Vol. 21, No. 4, 1329-34 pp.

Zhao Q., Wang C., Liu Y., Wang S. Bacterial adhesion on the metal-polymer composite coatings. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 2007, Vol. 27, No. 2, 85-91 pp.