

Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia

Bioremediation in soil contaminated with hydrocarbons in Colombia

María Alejandra Trujillo Toro¹ y Juan Fernando Ramírez Quirama²

¹Ingeniera Agroforestal, ²Ingeniero Forestal. Magister en bosques y conservación ambiental.
¹ Constructora Divecon S.A. Área de Gestión Ambiental. Cali. Colombia.

²Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente (ECAPMA). Medellín. Colombia

¹artemisa1@gmail.com, ²juan.ramirez@unad.edu.co

Resumen

Se revisan los procesos de Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia, como una alternativa sostenible frente al deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente por el derrame de hidrocarburos. En la legislación ambiental en Colombia y en el mundo, todo residuo contaminado con hidrocarburos es considerado un residuo peligroso; por lo tanto, no puede ser dispuesto en suelo, aguas o incinerado a cielo abierto, lo que ha motivado a empresas del país en el mundo a implementar procesos de tratamiento de lodos contaminados. En Colombia las empresas petroleras, han venido implementando la biorremediación de lodos contaminados con hidrocarburos como alternativas, para el manejo de residuos resultantes de los derrames que se presentan en las actividades de explotación, refinación, transporte y distribución del producto. Estas prácticas deben ser consideradas sostenibles por su fácil implementación, por los bajos costos que generan la operación y aplicación del proceso y por el beneficio para el medio ambiente. Entre los impactos positivos que estas prácticas han generado, se puede considerar las siguientes: solución a la problemática de generación de lodos contaminados con hidrocarburos, alternativas

de disposición final de los mismos sin afectar los recursos suelo, agua y aire, el bajo costo en la operación y experiencia técnica de desarrollo sostenible que puede continuar implementándose en empresas similares donde se presenten este tipo de residuos peligrosos.

Palabras clave: bioaireación, bioaumentación, biodegradación, bioestimulación, inoculación.

Abstract

This study analyzes bioremediation processes of hydrocarbon contaminated soils in Colombia as a sustainable alternative to the deterioration of environmental quality by hydrocarbon spillage. According to national and international environmental law, all waste contaminated with hydrocarbons is considered dangerous waste, and therefore it cannot be released in the ground, water or be incinerated. Such legislation has motivated companies around the world to implement treatment processes for contaminated soils. Within Colombia, oil companies have been implementing the bioremediation of hydrocarbon contaminated soils in order to manage the waste coming from activities of oil drilling, refinement, transport and distribution.

These practices must be considered viable for their ease of implementation, their low overhead costs, and for the benefits they provide towards environmental quality. Among the positive impacts that these practices have generated, it may consider the following: a solution for the problem of hydrocarbon contaminated soils, alternatives for the ultimate disposal of said waste without

affecting ground, water or air resources, the low cost of the operation, and the technical experience of sustainable development which can continue to be implemented in companies dealing with dangerous waste.

Keywords: bioaugmentation, biodegradation, biostimulation, bioventing, inoculation.

Introducción

La alta demanda energética en el mundo moderno ha determinado el uso intensivo del petróleo y sus derivados como su principal fuente. Muchos de sus componentes son empleados como materias primas básicas en las industrias químicas y petroquímicas. Este aumento en la explotación del petróleo ha determinado la aparición de crecientes fuentes de contaminación. Por ejemplo, derrames accidentales desde buques petroleros, extracción, y procesamiento del petróleo y sus derivados, etc. De ahí la trascendencia de encontrar herramientas que permitan aumentar la velocidad de biodegradación de este tipo de compuestos (Benavidez *et al.* 2006, Aranda, 2003).

En la naturaleza, los hidrocarburos son eliminados del suelo por procesos de biodegradación, volatilización, percolación y drenaje superficial, por esto en los últimos años se ha prestado mucha atención a los métodos biológicos tanto para el tratamiento de residuos industriales como en la recuperación de sitios contaminados. Estos métodos se conocen genéricamente como procesos de biorremediación y tienen como objetivo el aprovechamiento y optimización de las capacidades biodegradadoras naturales (Vecchioli, 1998, Vecchioli *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1983).

En la presente revisión se analiza la biorremediación como alternativa saludable frente al deterioro pro-

gresivo de la calidad del medio ambiente por el derramamiento de crudos, ya que esta problemática genera una amenaza real a la salud pública, así como el deterioro de los suelos, las aguas y la extinción de especies vegetales y animales.

Biorremediación

La Biorremediación es cualquier proceso que utiliza organismos vivos como microorganismos, hongos y plantas, por medio de agentes o compuestos derivados de cualquiera de ellos, para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural ya sea en el suelo o en las aguas (Liu *et al.*, 1989). También se define como el proceso de aceleración de la tasa de degradación natural de hidrocarburos por adición de nutrientes (Ercolli y Gálvez, 2001).

Biorremediación de suelos

La Biorremediación en suelos es empleada para atacar o sustraer agentes contaminantes específicos del suelo, se realiza por medio de degradación o transformación de diferentes compuestos nocivos en otros de menor toxicidad o materia orgánica en descomposición. Estas degradaciones o cambios ocurren usualmente en la naturaleza y una adecuada manipulación de los sistemas biológicos puede aumentar la velocidad de cambio o

degradación (Rojas, 1999, Cárdenas *et al.*, 1996; Menezes *et. al.*, 2003).

La biorremediación, es eficiente en el momento de la limpieza de suelos contaminados (si las condiciones de biodegradación son óptimas), en contraste con alternativas más costosas, económica y ambientalmente como la incineración (Álvarez, 2001; Belloso, 1998; Cursi y Calleja, 2000). Este tipo de remediación se puede acelerar por adición de nutrientes como nitrógeno y fósforo, la modificación de variables operacionales como humedad, pH y oxígeno, y la inoculación con microbiota (Ercolli y Gálvez, 2001). Con las anteriores variables se puede alterar la actividad de los microorganismos presentes en el suelo acelerando sus procesos metabólicos y, de esta manera, retornar las condiciones naturales de los suelos (Infante, 2001).

Estos métodos tienen ventajas y desventajas. *Las potencialidades del método* están en que generalmente solo origina cambios físicos menores sobre el medio; cuando se usa correctamente no produce efectos adversos significativos, puede ser útil para retirar algunos de los compuestos tóxicos del petróleo, ofrece una solución más simple y completa que las tecnologías mecánicas y es menos costosa que otras tecnologías. *Dentro de las dificultades se encuentran que* para muchos tipos de vertidos su efectividad no ha sido determinada, es de difícil aplicación en el mar, el tiempo necesario para su actuación es largo, su implementación es específica para cada lugar contaminado y su optimización requiere información sustancial acerca del lugar contaminado y de las características del vertido. (Corona e Iturbe, 2004)

Dentro de este tipo de procesos en los suelos deben tener claros cuatro términos: el primero, la

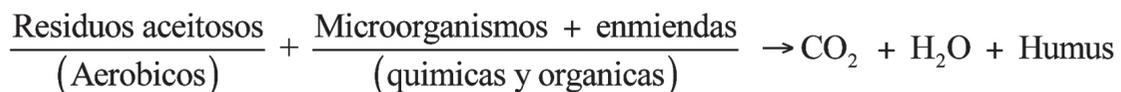
Biodegradación, que se refiere al proceso natural mediante el cual bacterias u otros microorganismos alteran y convierten moléculas orgánicas en otras sustancias, como ácidos grasos y CO₂. El segundo, es la *Biorremediación*, que es la adición de materiales a ambientes contaminados para producir una aceleración del proceso natural de biodegradación. El tercero, es la *Fertilización*, que es la adición de nutrientes, como N o P a un medio contaminado para estimular el crecimiento de microorganismos nativos. El cuarto, es la *Inoculación*, que se da como la adición de microorganismos a un sitio contaminado, los cuales pueden adicionarse junto con nutrientes (Lú Chau, 2000).

Proceso de biorremediación de lodos contaminados con hidrocarburos

El principio básico de la biorremediación consiste en aumentar la velocidad de degradación natural de los hidrocarburos contaminantes de los suelos, puede ser mediante la mezcla del residuo con la capa superficial del suelo (material orgánica en forma de humus) y abonos orgánicos naturales, los cuales contienen microorganismos facultativos que se adaptan al consumo y degradación de los hidrocarburos. En el proceso también se dan reacciones físico-químicas, por exposición a agentes naturales, como la radiación solar, la humedad y viento de cada zona (Fonseca y Vargas, 2006; Lugo y Mesa, 2001; Chirinos y Pereira, 1999).

HC saturados > aromáticos ligeros > aromáticos de alto peso molecular > asfaltenos, resinas.

Las bacterias, hongos y otros microorganismos se encargan de transformar los componentes orgánicos del hidrocarburo en: CO₂, H₂O y humus, de la siguiente manera:



Los subproductos del proceso son metales y otros componentes inorgánicos, estos quedan inmovilizados en el ambiente aeróbico (oxigenado) debido al intercambio iónico natural que se produce en el suelo, por lo que queda ligado química y físicamente a las partículas de este, previniéndose así la contaminación del agua. El material que queda remanente se denomina TPH, total petroleum hydrocarbon (hidrocarburos totales de petróleo) (Ercoli, 2001; Dibble *et al.*, 1979).

Principales microorganismos degradadores de HC

Los suelos contaminados contienen gran cantidad de microorganismos que pueden incluir un número de bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos (Cañas y Jerez, 2003). Los suelos contaminados con hidrocarburos contienen más microorganismos que los suelos no contaminados, pero su diversidad microbiana es más reducida (Tabla 1).

Tabla 1. Organismos degradadores de petróleo

Bacterias			Hongos		
Achromobacter	Leumthrix	Xanthomyces	Allescheria	Oidiodendrum	Gonytrichum
Acinetobacter	Moraxella	Lactobacillus	Aspergillus	Paecylomyces	Hansenula
Actinomyces	Nocardia	Erwinia	Aureobasidium	Phialophora	Helminthosporium
Aeromonas	Peptococcus	Flavobacterium	Botrytis	Penicillium	Torulopsis
Alcaligenes	Pseudomonas	Klebsiella	Candida	Rhodosporidium	Trichoderma
Arthrobacter	Sarcina	Coryneforms	Cephalosporium	Rhodotorula	Trichosporon
Bacillus	Spherotilus	Vibrio	Cladosporium	Saccharomyces	Fusarium
Beneckea	Spirillum		Cunninghamella	Saccharomyco- pisis	Sporobolomyces
Brevebacterium	Streptomyces		Debaromyces	Scopulariopsis	

Fuente: Castillo y Roldán (2005)

Principales factores que afectan la biorremediación

La *inoculación*, es el proceso de agregar o adicionar microorganismos al suelo, cuando se aplica mayor diversidad se puede aprovechar las especies de microorganismos más eficientes en la degradación de estos compuestos (Martín *et al.*, 2004; Narváz y Martínez, 2008). *El ambiente* también modifica este proceso al alterarse variables como la temperatura, el oxígeno y los nutrientes; para optimizar la biodegradación la temperaturas debe estar en un rango de 5–35 °C, porque la degradación se comporta de manera directa a la temperatura; a menor temperatura menor degradación, menor volatilidad y mayor viscosidad, por lo que es aconsejable temperaturas de medias a altas.

En cuanto a los niveles de oxígeno, no debe ser limitante porque los procesos deben ser aerobios; la biodegradación aerobia es más eficiente que la anaerobia, por esto en los suelos con alto contenido de arena puede tener mayor poder de degradación y volatilidad por mayor cantidad de oxígeno (Holliger y Zehnder, 1996). Respecto con los nutrientes su disponibilidad suele ser más limitante que la de O₂, para mayor eficiencia y efectividad los suelos deben tener nutrientes esenciales como N, P o Fe; y relaciones 120:10:1 de C/N/P (Alexander, 1999, Eweis *et al.*, 1999, Atlas y Unterman 1999; Glazer y Nikaido, 1995).

Métodos de biorremediación en suelos

La biorremediación puede llevarse a cabo *In Situ*: excavando el terreno y tratándolo a pie de excavación, o bien *Ex Situ*, en instalaciones aparte. La técnica apropiada para llevar a cabo este proceso, debe ser el resultado de la valoración de una serie de variables y de características del sitio o del contaminante por tratar (Torres y Zuluaga, 2009; Morelli, 1999).

Biorremediación in situ

Este tipo de tratamiento normalmente es la opción más adecuada para la recuperación de suelos, ya que no es necesaria la preparación y excavación del material contaminado. No obstante, antes de decidir el tipo de tratamiento deben valorarse numerosos factores entre los que se destacan el impacto ambiental en la zona, las actividades industriales que pueden verse afectadas, los costos comparativos con otros tratamientos, las dificultades de acceso a la zona contaminada para proveer de oxígeno y nutrientes, la determinación del porcentaje de tratamiento, la velocidad del proceso y, por último, el potencial peligro de extensión de la contaminación. Entre las técnicas más utilizadas se tienen: bioaireación o bioventeo, inyección de aire a presión, atenuación natural, bioestimulación, bioaumentación. (Torres y Zuluaga, 2009; Atlas y Unterman 1999; Heider *et al.*, 1999; Alexander, 1999; Walter, 1997; Matthews, 1993).

Biorremediación ex situ

Se lleva a cabo cuando el procedimiento se realiza fuera del lugar donde está la contaminación (Torres y Zuluaga, 2009; Atlas y Bartha, 2006). Entre las técnicas más utilizadas se tienen la disposición sobre el suelo (Landfarming), Bioceldas o biopilas, Tratamiento de biosuspensión (Torres y Zuluaga, 2009; Atlas y Bartha, 2006; Torres, 2003; Plaza, 2001; Pozzo, 2000; Romero, 2000; Ercoli, 1998, 1999).

Fitorremediación

La fitorremediación constituye una variación de las técnicas de biorremediación, que se basa en el uso de plantas y los microorganismos asociados a ellas así como las enmiendas del suelo y técnicas agronómicas dirigidas a liberar, contener, o transformar en compuestos inocuos a los contaminantes del suelo (Torres y Zuluaga, 2009). Hoy, las investigaciones en fitorremediación se encaminan no sólo al tratamiento de contaminantes inorgánicos (metales, metaloides, haluros y radionucleidos), sino también al tratamiento de contaminantes orgánicos; algunas especies de plantas probadas con éxito en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo son *Zea mays* L., *Panicum maximum* Jacq., *Paspalum virgatum* L., *Echinochloa polystachya* H.B.K., *Sorghum vulgare* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L., *Chamaecrista nictitans* (L.) Moench., *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf., *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L., entre otras (Vasquez *et al.*, 2010; Messarch y Messarch, 1997).

Otros agentes biorremediadores

Otros agentes biorremediadores son los animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener metales pesados; tal es el caso de la lombriz de tierra (*lumbricus terrestris*) que absorbe los contaminantes a través de los tejidos y los acumula en las vías digestivas. Por último, como se describe en el numeral 2.3, se encuentran las bacterias, que son las más empleadas en el proceso de biorremediación, otros microorganismos como hongos, algas, Cianobacterias y Actinomicetes son también empleados en la degradación de compuestos tóxicos en el suelo (Sutherland, 1992; Bossert y Compeau, 1995).

Biorremediación en Colombia. Técnica y normatividad

Durante los últimos quince años el oleoducto Caño Limón-Coveñas ha sufrido más de novecientos atentados, con el derramamiento de más de 450 millones de litros de petróleo. El impacto ambiental por los derrames de crudo, ha dejado más de 2.600 kilómetros entre ríos y quebradas, y alrededor de 1.600 hectáreas de ciénagas afectadas. Dadas estas circunstancias los daños a las fuentes hídricas, suelos, aire, fauna y vegetación son prácticamente irremediables, pues los procesos de descontaminación no alcanzan a cubrir todas las áreas afectadas y se realizan mucho tiempo después de que el crudo ha penetrado el ecosistema (Vargas *et al.*, 2004).

También se debe tener en cuenta que no todos los lodos aceitosos son causados por atentados contra la infraestructura petrolera, también son resultado de la actividad de la broca durante la perforación en busca de yacimientos, que genera un lodo acompañado de hidrocarburo que se extrae hasta la superficie, otros son los producidos por las actividades en la industria de los hidrocarburos, talleres de carros, lavaderos de carros o las mismas actividades productivas donde se utilicen motores de que funcionan con combustibles fósiles. De allí la necesidad que se ha generado en el país, de apoyar desde la microbiología para remediar los pasivos ambientales que genera la extracción y uso de los hidrocarburos.

Política ambiental colombiana enfocada a la biorremediación

El 16 de diciembre de 2005 fue aprobada por el Consejo Nacional Ambiental, la Política Ambiental para la Gestión Integral de los Residuos o Desechos Peligrosos. El 30 de diciembre de 2005 entró en vigencia el Decreto 4741: “Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de

los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral”. El país también cumple la normatividad internacional que regula el tema de biorremediación, del protocolo de Louisiana 29 B.

Dentro de las estrategias que plantea la política para prevenir y minimizar la generación de residuos o desechos peligrosos (Respel), se encuentra la reducción de la generación en la fuente, mediante la formulación e implementación de planes de gestión integral de Respel. Esta estrategia busca el desarrollo de acciones por parte del generador, tendientes a la gestión integral de estos residuos y a la adopción de compromisos dirigidos, principalmente a la prevención de la generación y reducción de la cantidad y peligrosidad de los mismos (UN. National Reports, 2009). Para este fin, los generadores deben formular e implementar Planes de Gestión Integral de Respel, mitigación y remediación según sea el caso.

El Plan como herramienta de gestión, ha permitido a los generadores conocer y evaluar sus Respel (tipos y cantidades) y las diferentes alternativas de prevención y minimización. El Plan ha permitido también el mejorar la gestión y asegurar que el manejo de estos residuos se realice de una manera ambientalmente razonable, con el menor riesgo posible, procurando la mayor efectividad económica, social y ambiental, en concordancia con la Política y las regulaciones sobre el tema. Igualmente, su implementación ha permitido avanzar en la optimización de actividades, procesos y en la reducción de costos de funcionamiento y operación (UN. National Reports, 2009).

Las limitantes frente a estas estrategias se encuentran en la falta de recursos, dado que llevar experiencias piloto demostrativas de técnicas y tecnologías suelen ser costosas y los nodos de producción más limpia cuentan con recursos limitados. Sin embargo, ya se tienen empresas

comprometidas en el país, tales como ECOPE-TROL, TERPEL, EXXON MOBIL, PERENCO, PETROBRAS, ENAP SIPETROL. Igualmente, a partir de la expedición de la política, el número de empresas autorizadas por las Autoridades Ambientales para el aprovechamiento y valorización de residuos peligrosos se ha incrementado. Actualmente ya se tienen empresas que han obtenido licencia ambiental para el tratamiento y valorización de residuos contaminados con hidrocarburos.

Tratamiento ecoeficiente de residuos contaminados con Hidrocarburos en Colombia

En la actualidad, la capacidad de eliminación con que cuenta el país comprende las siguientes instalaciones autorizadas para el tratamiento y eliminación de desechos peligrosos (residuos contaminados con hidrocarburos) como alternativas:

- PETROLABIN LTDA: Manejo de residuos propios de la industria del petróleo (bio-remediación de lodos, estabilización de lodos petroleros, lavado químico de lodos, des-adsorción térmica, recuperación de crudos partiendo de lodos residuales petroleros, asesorías sobre manejo de residuos especiales).
- ATP Ingeniería LTDA: Biorremediación y/o Landfarming estimulado.
- TOTAL waste management LTDA–TWM: Biorremediación de suelos contaminados.
- GEOAMBIENTAL LTDA: Biorremediación de suelos contaminados.
- PUJAR LTDA: Biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos.

En la actualidad, la biorremediación enfrenta un nuevo reto, el de convencer a las compañías y a los organismos oficiales de su alto potencial. En algunos países, la biorremediación fue una técnica poco reconocida y marginada, hoy se ha convertido en una verdadera industria.

Experiencias de investigación en biorremediación en Colombia

Las experiencias en biorremediación que tiene Colombia, se han realizado en forma experimental por centros académicos y de investigación, buscando crear o importar nuevas tecnologías para la remediación de lugares contaminados por lodos, a continuación algunas experiencias:

- *Proyecto liderado por la Universidad de Santander: biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados* (Rev. colombiana biotecnol., 2010).
- *Proyecto liderado por el centro de investigaciones microbiológicas – CIMIC: biorremediación de residuos del petróleo* (Vargas, Cuéllar y Dussán *et al.*, 2004).

Normatividad aplicable

La Constitución Política de Colombia de 1991 elevó a norma constitucional la consideración, manejo y conservación de los recursos naturales y el medio ambiente, a través de los siguientes principios fundamentales, entre ellos incluye o tiene relación directa a la contaminación de hidrocarburos (Tabla 2):

Tabla 2. Normas y principios ambientales contenidos en la Constitución Política de Colombia.

Art.	Tema	Contenido
8	Riquezas culturales y naturales de la Nación	Establece la obligación del Estado y de las personas para con la conservación de las riquezas naturales y culturales de la Nación.
9	Atención de la salud y saneamiento ambiental	Consagra como servicio público la atención de la salud y el saneamiento ambiental y ordena al Estado la organización, dirección y reglamentación de los mismos.
58	Función ecológica de la propiedad privada	Establece que la propiedad es una función social que implica obligaciones y que, como tal, le es inherente una función ecológica.
79	Ambiente sano	Consagra el derecho de todas las personas residentes en el país de gozar de un ambiente sano
80	Planificación del manejo y aprovechamiento de los recursos naturales	Establece como deber del Estado la planificación del manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución.
95	Protección de los recursos culturales y naturales del país	Establece como deber de las personas, la protección de los recursos culturales y naturales del país, y de velar por la conservación de un ambiente sano.

Fuente: Trujillo y Ramírez (2011)

En general, se usan como referencia los parámetros consignados en las distintas normas, leyes o decretos, y se generalizan para el territorio Colombiano, soportados en legislación nacional y tratados internacionales vigentes y que comparati-

vamente, se puede considerar una legislación exigente en cuanto a parámetros de limpieza y bioremediación. Otras normatividades en la que se basa la aplicación, protección y manejo ambiental hidrocarburos son: (Tabla 3).

Tabla 3. Normas generales que sustentan la normatividad ambiental por contaminación con hidrocarburos.

Norma	Objetivos de la norma
Decreto ley 2811 de 1974	Código nacional de los recursos naturales renovables RNR y no renovables y de protección al medio ambiente.
Ley 99 de 1993	Se crea el Ministerio del Medio Ambiente y Organiza el Sistema Nacional Ambiental (SINA).
Decreto 1753 de 1994	Define la licencia ambiental LA: naturaleza, modalidad y efectos; contenido, procedimientos, requisitos y competencias para el otorgamiento de LA.
Decreto 2150 de 1995 y sus normas reglamentarias.	Reglamenta la licencia ambiental y otros permisos. Define los casos en que se debe presentar Diagnóstico Ambiental de Alternativas, Plan de Manejo Ambiental y Estudio de Impacto Ambiental. Suprime la licencia ambiental ordinaria.

Fuente: Trujillo y Ramírez (2011)

A continuación se ve la normatividad ambiental, que deben cumplir las empresas que contaminan con hidrocarburos: (Tabla 4)

Tabla 4. Normatividad específica ambiental concerniente al derrame con hidrocarburos

Ley 2 de 1959	Reserva forestal y protección de suelos y agua
Decreto 622 de 1977	Sobre Parques Nacionales Naturales PNN
Ley 29 de 1986	Regula áreas de reserva forestal protectora
Decreto 1449 de 1977	Disposiciones sobre conservación y protección de aguas, bosques, fauna terrestre y acuática
Decreto 1594 de 1984	Normas de vertimientos de residuos líquidos
Decreto 2655 de 1988	Código de Minas
Ley 388 de 1997	Ley de ordenamiento territorial, que reglamenta los usos del suelo
Directiva Presidencial 33 de 1989	Responsabilidades de los organismos y entidades descentralizadas del orden nacional del sector público, en el desarrollo y operación del Sistema Nacional para la Prevención y Atención de Desastres
Decreto 969 de 1995	Crea la Red nacional de reservas para el caso de desastres
Decreto 321 de 1999	Por el cual se adopta el plan nacional de contingencias contra derrame e hidrocarburos, derivados y sustancias nocivas.
Decreto 1874 de 1979	Protección y prevención de la contaminación del medio marino
Decretos 1875/76 1979	Se define el concepto de contaminación marina y se dictan normas de protección
Decreto 2721 de 1991	Reglamenta el manejo, transporte, descargue y almacenamiento de productos químicos en puertos
Resolución 930 de 1996	Reglamenta la recepción de desechos generados por los buques en los puertos, terminales, muelles y embarcaderos

Fuente: Trujillo y Ramírez (2011).

Normatividad ambiental internacional acogida por Colombia: (Tabla 5)

Tabla 5. *Normatividad internacional ambiental acogida por Colombia*

<p>Protocolo de Louisiana 29 B Convenio internacional sobre responsabilidad por daños causados por la contaminación de aguas del mar con hidrocarburos (1969) y protocolo “CLC 69/76 (1976).</p>
<p>Convenio para la protección del patrimonio mundial, cultural y natural. París, 1972.</p>
<p>Convenio Internacional para prevenir la contaminación por buques, 1973. Protocolo relativo a la contaminación del mar (MARPOL) por buques 1978.</p>
<p>Convenio sobre la constitución de un fondo internacional de indemnización de daños causados por la contaminación del mar con hidrocarburos (1971) y su protocolo “El Fondo 71/76” (1976).</p>
<p>Acuerdo sobre la cooperación regional para el combate de la contaminación del Pacífico Sudeste por hidrocarburos y otras sustancias nocivas, en caso de emergencia. Lima, 1981.</p>
<p>Convenio de las Naciones Unidas sobre el derecho del Mar. Jamaica, 1982.</p>
<p>Protocolo de cooperación para combatir derrames de hidrocarburos en la región del Gran Caribe. Cartagena, 1983.</p>
<p>Protocolo complementario del Acuerdo sobre la cooperación regional para el combate de la contaminación del Pacífico Sudeste por hidrocarburos y otras sustancias nocivas, en caso de emergencia. Quito, 1983.</p>
<p>Protocolo relativo a las zonas protegidas del Convenio para la protección y desarrollo del medio marino de la región del Gran Caribe. 1990.</p>
<p>Convenio relativa a los humedales de importancia internacional especialmente como hábitat de aves acuáticas - RAMSAR (acogido por Colombia en 1997).</p>

Fuente: Trujillo y Ramírez (2011).

Conclusiones

La biorremediación es un proceso de descontaminación que emplea una serie de reacciones bioquímicas por una población o consorcios de microorganismos inoculados en la zona contaminada, para convertir la estructura de los hidrocarburos en componentes menos tóxicos. Una de las ventajas del proceso es que no generan corrientes de residuos y que inclusive después de suspendido el tratamiento, dadas las condiciones en que se efectúa, se espera un proceso de atenuación natural en el que además de la reducción de hidrocarburos, se reducen las poblaciones bacterianas.

A partir de la expedición de la política ambiental, el número de empresas autorizadas por las Autoridades Ambientales para el aprovechamiento y valorización de residuos peligrosos y para el caso

específico de suelos contaminados con hidrocarburos se ha incrementado. Actualmente ya se tienen empresas que han obtenido licencia ambiental para el tratamiento y valorización de residuos contaminados con hidrocarburos en el país.

En Colombia las empresas del sector petrolero y las multinacionales comercializadoras de hidrocarburos, han venido implementando este tipo de prácticas de Biorremediación de lodos contaminados con hidrocarburos como alternativas de saneamiento de campos contaminados por hidrocarburos, para el manejo de residuos resultantes de los derrames que se presentan en las actividades de explotación, refinación, transporte y distribución del producto; en este sentido y como solución a la problemática de disposición final de los lodos

contaminados, en Colombia se ha visto viable la implementación de procesos de Biorremediación.

Entre los impactos positivos que estas prácticas han generado, se pueden considerar las siguientes: solución a la problemática por generación de lodos contaminados con hidrocarburos, la alternativa de disposición final de los mismos sin afectar los recursos suelo, agua y aire, el bajo costo en la operación y la experiencia en una técnica de desarrollo sostenible que puede continuar implementándose en empresas similares donde se presenten este tipo de residuos peligrosos.

La Biorremediación es la vía más efectiva para la remediación de suelos contaminados, en contraste a alternativas más costosas como la incineración. Sin embargo, la contaminación queda en el agente descontaminador.

Recomendaciones

Las líneas de investigación o los esfuerzos en investigación deben responder las siguientes preguntas ¿Cómo acelerar las tasas de biorremediación según especies animales, vegetales, hongos, virus, y bacterias? Además, ¿Cómo estas tasas se optimizan con la alteración de variables ambientales? Por último, ¿Qué hacer con el vector descontaminador después de la descontaminación?

Literatura citada

- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. (2da Ed.). London : Academic Press.
- Álvarez, J. A., E. Ramos, B. Fernández & A. Núñez. (2001). *Gestión de residuos sólidos petrolizados*. EUA: Petróleo Internacional (en imprenta).
- Aranda, N. Berté, G. & Quesada I. (s.f.). *Estudio para determinar opciones de bioremediación en suelos óleo-contaminados*. s. d
- Atlas, R & Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Madrid: Ed. Addison Wesley.
- Atlas, R.M. y Unterman, R. (1999). *Bioremediation*. In: *Demain AL & Davies JE (Eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. (2da Ed) Washintong D. C.: ASM Press.
- Belloso, C. (1998). *XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Biodegradación de Suelos Contenidos en Terrarios*.s. d.
- Benavides, L. J., Quintero, G. & Ostos, O. (2006). Aislamiento e identificación de diez Bacterias desnitrificantes a partir de un suelo Agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla. *Nova - Publicación Científica* 4 (006): 50-54.
- Benavides, L. J., Quintero, G., Guevara, V. A. & Jaimes, D. C. (2006) *Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo*. Colombia. *Nova*. 4 (5): 1-116.
- Benavides, L. J.; G. Quintero, V. A. Guevara, C. D. Jaimes, R. S. Gutiérrez & G. J. Miranda. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados de petróleo. *Nova* 4 (5): 82-90.
- Bossert, I. D. and Compeau, G. C. (1995). *Cleanup of petroleum hydrocarbon contamination in soil*, in L. Young and C. E. Cerniglia (eds), *Microbial Transformation and degradation of Toxic Organic Chemicals*.
- Brown K. W. & Associates, Inc. (1983). *Hazardous Waste Land Treatment Office of Research and Development*. Washington, USA: US Environmental Protection Agency.
- Cañas, J. & Jerez, T. (2003). *Aislamiento e identificación de hongos con capacidad degradadora de hidrocarburos. Biorremediación fase III*. Bucaramanga: Universidad de Santander.
- Cárdenas, C., Vílchez, I., Bohórquez, M., Gómez, K., Angulo, N. & Gómez A. (1996). *Influencia de la fertilización en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando lodos residuales estabilizados*. Centro de Investigación del Agua, Facultad de Ingeniería. Estado Zulia: Universidad del Zulia, Ciudad Universitaria Maracaibo.–
- Castillo, F., Roldán, M.D., Blasco, R., Huertas, M.J., Caballero, F.J., Moreno, C. & Martínez, M. (2005). *Biotecnología ambiental*. Madrid, España: Editorial Tébar.
- Chirinos, I. & Pereira N. (1999). Parcelas de lodo: Una alternativa de uso y manejo de lodos petroquímicos provenientes de sistemas de tratamiento de efluentes. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, vol. 16, 1, 206-212.
- Corona, L. & Iturbe, R. (2004). Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería Investigación y Tecnología* 2, 119-126.
- Cursi, E. & Calleja, C. (2000). *Biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos*. Mendoza, Argentina: U.E.
- Dibble, J. T. & Bartha, R. (1979). Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. Apr. p. 729-739.
- Ercoli, E., Galvéz, J., Videla, C., Cursi, E. & Calleja, C. (1999). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Lima. Perú: INGEPET 99.
- Eweis, J., Ergas, S., Chang, D., & Schroeder E. (1999). *Principios de Biorrecuperación*. España Mac Graw Hill.
- Fonseca, A. & Vargas, F. (2006). *Evaluación de consorcios microbianos con capacidad degradadora de residuos de hidrocarburos y su aplicación en biorremediación de suelos contaminados con aceites lubricantes usados*. Bucaramanga: Universidad de Santander.

22. Glazer, A.N. & Nikaido, H. (1995). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: W.H. Freeman and Company..
23. Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R. & Widdel, F. (1999). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 459-473.
24. Holliger, C. and Zehnder, A. J. B. (1996). Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnol.* 7, 326-330.
25. Infante, C. (2001). Comunicación Personal.
26. Liu, D. L., Chau, Y. K. & Dutka, B. J. (1989). Rapid Toxicity Assessment of Water Soluble and Water Insoluble Chemical Using A Modified Agar Plate Method. *Wat. Res.* 23, 3, 333-339.
27. Lopolito, M., Molina, L., Corbella, M., Kabbas, S., García, E., Lanfranchi, C. & Gómez, L. (1996). *Biodegradación de hidrocarburos de petróleo y compuestos relacionados*. AIDIS. Consolidación para el desarrollo. México, D.F, AIDIS. p. 1-4.
28. Lú, Chau. (2000). *T. Biorremediación*. Recuperado de <http://www.usc.es/uscmn/investigacion/documento/Prestige-Biorremediacion%F3n.pdf>
29. Lugo, G. & Mesa, Y. (2001). *Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos utilizando Lodos Residuales Domésticos Tratados*. (Trabajo Especial de Grado). Venezuela: LUZ.
30. Martín, C., Aldo González, A. & Blanco, M. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana Microbiología* 21, 103-120.
31. Mathehews, J. (1993). *Handbook of bioremediation*. Oklahoma: Lewis publishers.
32. Menezes, F., Oliveira, F., Okeke, B. & Frankenberger, W. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 34 (1), 65-68.
33. Messarch, M. B. and Messarch, L. (1997). Modification of heterothropic plate counts for assessing the bioremediation potencial of petroleum – contaminated soils. *Environ. Technol.*, 18, 639 - 646.
34. Messarch, M. B. and Nies, L. (1997). Modification of heterothropic plate counts for assessing the bioremediation potencial of petroleum – contaminated soils. *Environ. Technol.*, 18, 639 - 646.
35. Morelli I.S. (1999). *Caracterización de la toxicidad de residuos con hidrocarburos. Importancia de la aplicación de bioensayos en procesos de biorremediación en suelo*. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.
36. Morelli, I.S., Vecchioli, G.I., Del Panno, M.T., Garré, M.I., Costanza, O.R. & M.T. Pinceira (1995). Assessment of the Toxic Potential of Hydrocarbon Containing Sludges. *Environ. Pollut.* 89 (2), 131-135.
37. Narváez, M. & Martínez, M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, aisladas a partir de sedimentos del Caribe colombiano. *Bol Invest Mar Cost Colombia* 37 (1), 63-77.
38. Plaza, G., Lopez, R & Saca E. (2004). *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente. Vol. 8, N° 1. Impreso en la Argentina. ISSN 0329-5184*.
39. Plaza, G. & Otero, M. (2001). “*Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburo*”. Vol. 5 Pag. 63-67. AVERMA. ISSN 0329-5184
40. Plaza, G., Otero, M., Torres, N., Velásquez, M., Corbalán, E. & Rodríguez, T. (2001). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* 5, 1-5.
41. Pozzo-Ardizzi, MG, M. Ferrari & G. Calderon. (2001). Diseño y ejecución de un plan de biotratamiento para residuos (cortes) de perforación de la actividad petrolera, por la metodología de biodegradación con bioaumentación. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* 54,41-48
42. Vásquez, M., Thibisay, J., Guerrero, F. & Quintero, A. (2010). Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usado. *Rev.Colomb.Biotecnol.* Vol.XII No.1.
43. Rojas, N., Rodríguez, R., Enríquez, F., Martínez, J. & Poggi, H. (1999). Transformer oil degradation by an indigenous microflora isolated from a contaminated soil. *Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios avanzados*. 15-24.
44. Romero, J. (2000). *Tratamiento de aguas Residuales. Teoría de Principios de Diseño*. Colombia: Escuela Colombiana de Ingeniería.
45. Sutherland, J. B. (1992). Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J. Ind Microbiol.*, 9, 53-62.
46. Torres, D., K. & Zuluaga M., T. (2009). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Trabajo de Grado). Universidad Nacional de Colombia.
47. Torres, Nancy. (2003). *Bioremediación en suelos contaminados con petróleo – Escala laboratorio*. Tesis profesional. Universidad Nacional de Salta.
48. UN. National Reports (2009). Colombia: Waste management. Recuperado de: http://www.un.org/esa/dsd/dsd_aofw_ni/ni_pdfs/NationalReports/colombia/Gestion_de_Residuos-Waste_management.pdf
49. Vargas, P., Cuéllar, R. & Dussán, J. (2004). Biorremediación de residuos del petróleo. *Apuntes científicos uniandinos* 4, 43-49.
50. Vecchioli, G. I., Costanza, O. R., Giorgeri, S. A. & Remmler, M. (1997). Extent of Cleaning Achievable for Bioremediation of Soil Contaminated with Petrochemical Sludges. *Journal Tech. Biotechnol.* 70, 331-336.
51. Vecchioli, G. I. (1998). *Degradación de Mezclas Complejas de Hidrocarburos en Suelo*. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.
52. Walter, M.V. (1997). Bioaugmentation. In: *Hurst, CJ (Ed) Manual of Environmental Microbiology* (pp 753-765). ASM Press, Washington, D.C.

Sustancias utilizadas como agente gelificante alternativas al agar en medios de cultivo para propagación *in vitro*

Substances used as gelling agent alternative to the agar in culture media for in vitro propagation

Darío Alonso Martín Gordo¹, Oswaldo Cárdenas González² y José Constantino Pacheco³

¹Químico de Alimentos. ²Licenciado en Química y Biología, MSc en Ciencias Químicas, PhD en Ciencias Marinas y ³Licenciado en Biología y Química. Especialista en Edafología y Biología Vegetal. MSc y PhD en Ciencias Biológicas.

¹ Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia

²Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias. Escuela de Ciencias Químicas. Grupo de investigación Química-Física Molecular y Modelamiento Computacional (QUIMOL-UPTC). Tunja, Colombia. ³Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias.

Escuela de Ciencias Biológicas. Grupo de investigación Bioplasma UPTC. Tunja, Colombia.

¹dario.martin@uptc.edu.co, ²oe.cardenas10@gmail.com, ³jocpach@gmail.com

Resumen

El cultivo de tejidos vegetales comprende un conjunto de técnicas ampliamente usadas para propagación vegetal *in vitro*; sin embargo, una desventaja es el alto costo de componentes utilizados para el medio de cultivo, entre éstos, el agar (solidificante más utilizado), pues la demanda ha elevado su precio. En este artículo se recopilan algunas investigaciones sobre sustancias que se han utilizado como agentes solidificantes alternativos, entre los que se resaltan los almidones (nativos o modificados) y algunas gomas de plantas y exudados bacterianos, que han sido empleados en procesos de organogénesis, embriogénesis y proliferación vegetativa. Los almidones y las gomas reportadas presentaron resultados favorables en el cultivo *in vitro* de algunas especies vegetales. Se concluye que tanto las gomas como los almidones pueden ser potenciales sustitutos, parciales o totales del agar y logran una disminución de los costos con los almidones, y su posibilidad de modificarse químicamente para mejorar su capacidad gelificante.

Palabras clave: agar, agente gelificante, almidón, gomas, micropropagación

Abstract

The cultivation of plant fibers is achieved through the implementation of a group of techniques widely used for the propagation of plants *in vitro*. However, one disadvantage of these techniques is the high cost of components used for the crop's medium, among these, the agar (primary gelling agent), has seen a price increase due to high demand. This article consults several studies regarding substances that have been utilized as alternative gelling agents, among which highlight starches (native or modified) and several plant gums and bacterial excretions that have been used in processes of organogenesis, embryogenesis and vegetative proliferation. The starches and gums studied showed favorable results in the *in vitro* cultivation of some plant species. The study demonstrates that both gums and starches may be potential substitutes (either partial or total) for agar, achieve a decrease in costs associated with starches, and have an ability to be chemically modified to improve gelling capacity.

Key words: agar, gelling agent, starch, gums, micro-propagation

Introducción

Las técnicas de cultivo de tejidos tienen muchas aplicaciones prácticas y comerciales, principalmente en los sectores hortofrutícola, biotecnológico, de producción de especies libres de patógenos y agrícola, y constituyen una alternativa interesante a los métodos tradicionales de propagación, ya que permiten obtener una gran cantidad de material vegetal en un corto período de tiempo (Fasolo & Predieri, 1988).

A pesar de que las metodologías de cultivo de tejidos vegetales tienen más de cinco décadas desde que fueron desarrolladas, sus beneficios aún no llegan a los agricultores, especialmente a los países más necesitados, lugares donde la mayor parte de la población tiene déficit nutricional por lo que se requiere la optimización de la producción agrícola para mejorar la alimentación y los ingresos del núcleo familiar. El principal problema es la complejidad que presentan algunas de estas tecnologías y el alto costo de su implementación, mayoritariamente ocasionado por el alto precio del agente gelificante, comúnmente agar. Al parecer, la causa del alto precio de este último insumo es su sobreexplotación, consecuencia de una alta demanda, la cual ha hecho que sea cada vez más difícil su obtención, elevando así los precios (Romay *et al.*, 2006 y Mohamed *et al.*, 2010).

Durante los últimos 30 años se han efectuado esfuerzos para buscar sustitutos adecuados para el agar; en consecuencia, un gran número de sustancias han sido probadas por su capacidad de gelificación (Ozel *et al.*, 2008).

Debido a sus propiedades funcionales se ha reportado el uso de almidones y gomas como agentes gelificantes, polímeros naturales como almidones y gomas, que sintetizan las plantas y algunas bacterias. Los almidones están formados por 2 polímeros: la amilosa, compuesta de cadenas lineales de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos α 1-4, y la amilopectina, compuesta de cadenas con ramificaciones cada 7 o 10 unidades de D-glucosa. La amilopectina posee también enlaces glicosídicos α 1-4 en las cadenas lineales y las ramificaciones se unen mediante enlaces α 1-6 (Salinas *et al.*, 2003).

En términos generales, los almidones nativos se utilizan ampliamente en la industria alimentaria, ya que son sustancias inocuas capaces de regular y estabilizar la textura de los alimentos y por sus propiedades espesantes y gelificantes. Algunas dispersiones de almidón nativo, como aquellas obtenidas a partir de raíces y tubérculos, producen una textura gomosa y cohesiva en aquellos alimentos donde se utilizan como agentes espesantes (Pacheco de Delahaye & Techeira, 2009). Todos los almidones tienen los mismos constituyentes (Tabla 1), aunque difieren en el porcentaje de cada uno de ellos, dependiendo de la planta de la cual son extraídos (Daud *et al.*, 2011), por lo cual tienen distintas propiedades funcionales (Hernández *et al.*, 2008).

Por otra parte, las gomas, coloides hidrofílicos (o hidrocoloides), mucílagos, o aún polisacáridos solubles en agua, son algunas denominaciones dadas a las sustancias que tienen la capacidad de formar con agua geles o soluciones viscosas, esto es, que tienen la función de agentes espesantes o gelificantes, estabilizantes de emulsiones (Bobbio y Bobbio, 1992; Dziezak, 1991).

Tabla 1. Composición química de algunos almidones de distintas fuentes.

Componentes (%)	Makal	Camote	Yuca	Sagú	Maíz	Papa
Humedad	(8,99)	(9,83)	(9,48)	(10,5)	(9,9)	(19)
Proteína cruda	0,16	0,22	0,06	0,64	0,10	0,06
Grasa cruda	0,19	0,31	0,20	0,36	0,35	0,05
Fibra cruda	0,35	0,28	1,01	0,06	0,62	NR
Cenizas	0,12	0,26	0,29	0,22	0,06	0,40
ELN	99,28	98,93	98,44	98,72	98,93	99,49
Amilosa	23,6	19,6	17,0	22,7	28,3	21,0
Amilopectina	76,4	80,4	83,0	77,3	71,7	79,0

Fuente: Hernández *et al*, 2008

Las gomas pueden ser definidas en términos prácticos como moléculas de alto peso molecular con características hidrofílicas o hidrofóbicas que, usualmente, tienen propiedades coloidales, con capacidad de producir geles al combinarse con el solvente apropiado. Las gomas naturales son polisacáridos altamente hidrofílicos, compuestos de monosacáridos que se unen por enlaces glucosídicos. Se extraen de varios árboles (como exudados) y arbustos o ficocoloides (algas), y se diferencian de las resinas naturales por su composición (tabla 2) y solubilidad. Algunas contienen componentes ácidos y otras son neutras (Pasquel, 2001). Desde hace varios años, se han utilizados gomas, distintas al agar, en algunos productos comerciales tales como Phytigel, Gelrite, Natugel, entre otros, que aprovechan las propiedades funcionales de algunas de estas gomas como sustancias que aumenten la viscosidad y consistencia de los medios de cultivo para propagación vegetal *in vitro* (Tabla 2).

El presente documento tiene como objetivo la revisión sobre el uso de gomas y almidones en varias técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

Almidones en procesos de organogénesis

La embriogénesis es un proceso en el que a partir de una célula se generan embriones que pueden producir nuevas plántulas; comprende la embriogénesis cigótica y la embriogénesis somática o adventicia. La embriogénesis somática (asexual o adventicia), consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión gamética, en otras palabras, es un proceso por el cual se produce una estructura bipolar (embrión) a partir de una célula somática, mientras que la embriogénesis cigótica sí es el producto de la fusión gamética (Celestino *et al.*, 2005), mientras que el proceso involucrado en la transformación de una célula a una planta u órgano se denomina organogénesis. Cuando la regeneración de la plántula se realiza sin la formación de callo, se denomina organogénesis directa; primero se forman células no diferenciadas o callo y, posteriormente, se diferencian y forman una planta, se conoce como organogénesis indirecta (Calva y Pérez, 2005).

Tabla 2. Algunas gomas utilizadas como agentes gelificantes en medios de cultivo de propagación *in-vitro*.

GOMA	COMPOSICIÓN QUÍMICA	FUENTE
Guar	Galactosa (unida por α 1-6) y manosa (unidas por β 1-4)	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>
cassia	Galactosa (unida por α 1-6) y manosa (unidas por β 1-4)	endospermo de <i>Senna btusifolia</i>
xantana	cadena de D-glucopiranosilo unido enlace β 1-4. Ramificación de trisacáridos de D-manopiranosilo y de ácido D-glucopiranosilurónico	Exudado de la bacteria <i>Xanthomonas campestris</i> B-1459
Agar	Agarosa (galactosa) y agarpectina (anhidrogalactosa parcialmente esterificada con ácido sulfúrico)	<i>Gelidium cartilagineum</i> , <i>Gracilaria confervoides</i> y <i>Pteroclaia capillacea</i>
Gellan (gelrite y phytigel)	tetrasacárido, que consiste en dos residuos de D- glucosa y uno de cada uno de los residuos de L- ramnosa y D- ácido glucurónico	Exudado de la bacteria <i>Pseudomonas elodea</i>
Goma katira	D-galactosa, ácido D-galacturónico y L-ramnosa en proporción molar 2:1:3	exudado de <i>Cochlospermum religiosum</i>
natugel	-*	<i>Kappaphycu salvarezii</i>

Fuente: recopilación de los autores. -* no reportado en la literatura.

Algunos almidones han sido utilizados como gelificantes en medios de cultivo para organogénesis de plantas. Daud *et al.* (2011 a y 2011 b) cultivaron segmentos de tallos de *Celosia* sp. en medios de cultivo con la mitad de concentración de los componentes del medio Murashige y Skoog (1962) y otro sin tales suplementos, gelificados con harina de yuca, harina de arroz, harina de maíz y almidón de papa. No se encontraron diferencias significativas en la regeneración por vía de organogénesis directa en ninguno de los solidificantes probados.

En un estudio realizado en Irán, se probaron un medio líquido con sustrato de algodón y diferentes combinaciones de almidón, sémola o harina, polvo de patata y agar en dos etapas de la micropropagación (inducción de brotes y proliferación)

de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) (tabla 3). La mayor frecuencia de regeneración se encontró en medios que contienen agar (0,8%), combinación de almidón: sémola, polvo de patata (2:1:1) en 9 y el 12% y la combinación de almidón (6%) más agar (0,4%), pero el máximo número brotes se produjeron en medios que contenían agar (0,8%), combinación de almidón (6%) más agar (0,4%) y medio líquido con sustrato de algodón. La mejor proliferación de brotes tuvo lugar en medio líquido con sustrato de algodón. Los resultados mostraron que la combinación de almidón: sémola, polvo de patata (2:1:1) en 9% y almidón (6%) más de agar (0,4%) pueden ser alternativas, para sustituir al almidón, adecuadas en etapa de regeneración, pero el número de brotes es menor que en medios gelificados con solo agar (Sharifi *et al.*, 2011).

Tabla 3. Combinaciones de agentes gelificantes en medios de cultivo para propagación de violeta africana (*S. ionantha*)

Medio	Composición
A	12% (almidón 2: harina 1:polvo de papa 1)
B	9% (almidón 2: harina 1:polvo de papa 1)
C	9% (almidón 1: harina 1:polvo de papa 1)
D	6% (almidón 2: harina 1:polvo de papa 1)
E	6% (almidón 1: harina 1:polvo de papa 1)
F	6% (almidón 2: harina 1:polvo de papa 1) + 2g/L agar
G	6% (almidón 1: harina 1:polvo de papa 1) + 2g/L agar
H	6% (almidón 2: harina 1:polvo de papa 1) + 4g/L agar
I	3% (almidón 2: harina 1:polvo de papa 1) + 4g/L agar
J	3% (almidón 1: harina 1:polvo de papa 1) + 4g/L agar
K	9% almidón
L	6% almidón + 4g/L agar
M	3% almidón + 4g/L agar
N	9g/L agar
O	medio líquido con sustrato de algodón

Fuente: Sharifi *et al*, 2010.

Almidones en procesos de embriogénesis

El almidón de arroz y la fécula o harina de maíz, han sido probados como agentes gelificantes en micropropagación. Se reporta el cultivo de embriones cigóticos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en medios de cultivo gelificados con almidón de arroz y maicena, en concentraciones desde 4 hasta 8% en ambos casos, comparados con un testigo de agar en concentración de 0.8%. Gonzales y Silva (1999) encontraron que estos medios gelificados con almidón de arroz y maicena, en concentraciones bajas (4-6%) se oscurecían, por acción de fenoles provenientes del embrión cigótico, mientras que en concentraciones más elevadas, no se presentó tal comportamiento. Además,

en el cultivo aséptico de embriones cigóticos de cacao se puede emplear el almidón de arroz y la maicena en sustitución del agar, obteniéndose los mejores resultados, en cuanto a longitud de raíces, en el primer caso a concentraciones del 8%, y en el segundo caso del 5 y 8%, respectivamente.

Almidones en procesos de micropropagación o proliferación

Hay reportes sobre la utilización de almidones de distintas fuentes, como agentes gelificantes en medios de cultivo para proliferación vegetal. Se ha micropropagado segmentos nodales de papa (*Solanum tuberosum*) en medios gelificados con

almidón de yuca (Kuria *et al.*, 2008), sagú (Naik y Sarkar, 2001); banana (*Musa*) en medios con almidón de papa y yuca (Kodyn y Zapata, 2001); manzana (*Malus domestica* Borkh) en medios solidificados con almidón de maíz (Zimmerman *et al.*, 1995).

En un estudio hecho por Romay y colaboradores (2006) se sugiere la utilización de almidones modificados de yuca como sustitutos del agar. En el estudio cultivaron micro-esquejes de yuca (*Mahinot esculenta* Crantz) en medios solidificados con tres almidones modificados comparados con un blanco de Phytigel. De igual manera, analizaron el número de nudos y raíces para todos los tratamientos, y peso seco y húmedo para el mejor tratamiento con almidón y el blanco de Phytigel y encontraron diferencias significativas en los tratamientos AIM TF-352 y AIM TP-212 con respecto al control, pues disminuyeron el número de nudos y raíces. mientras el AIM TF-351 no. En el estudio se concluyó que el almidón AIM TF-351 no tuvo efectos significativos en ninguna de las variables analizadas y, por tanto, puede ser un sustituto del agar.

Mbanaso (2008) estudió el efecto de subcultivos consecutivos de 2 genotipos de *Musa*, cultivados en medios solidificados con almidón de yuca (cassava). No se encontraron diferencias significativas con el testigo de agar, en cuanto al porcentaje de brotes producidos, mientras que sí se presentaron diferencias en la robustez de las plántulas, mayoritariamente en los medios de cultivo con mayor concentración de almidón, posiblemente porque aumentaba la dureza del medio, lo que impidió la difusión de los nutrientes. También afectó la absorción de agua y algunos nutrientes que potenciaban la dureza de las plántulas. Pero al igual que Romay *et al.*, recomendó el almidón de yuca (cassava) como sustituto más económico del agar.

La harina de yuca es rica en almidón; por tal razón, se ha utilizado como agente gelificante

mezclada con agar o adicionada sola. Maliro y Lameck (2004) cultivaron plántulas de *F. albida* y *Uapaca kirkiana*. Encontraron que en las 2 primeras semanas no se presentaban diferencias significativas en número de brotes generados y altura de las plántulas en ninguna de las especies estudiadas, pero en las semanas 4^a y 5^a de incubación, se observaron resultados estadísticamente significativos. Los medios preparados solo con harina de yuca, después de 5 semanas perdieron la consistencia, lo que afectó el crecimiento y peso de los explantes en ambas especies.

La micropropagación de nodos de papa (*Solanum tuberosum*) se realizó en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) gelificado con mezclas de agar-almidón de maíz (CS) y agar-almidón de papa (PS). Mohamed *et al.* (2010) no encontraron diferencias significativas en la altura de las plántulas, pero sí un aumento significativo en el número de brotes/explante. El aumento más notable se encontró en medios solidificados con 60 g/L de PS + 1g/L de agar. Las plántulas desarrolladas en los medios de cultivo con 40 g/L de CS o PS tuvieron un mayor peso fresco y seco en comparación con los del control de agar. El medio con 50, 60 g /L de PS o 60 g /L de CS y 50 g /L de agar a CS + 1g/L aumentaron significativamente el porcentaje de peso seco. Se sugiere que la utilización de agar en bajas concentraciones mezclado con almidón de papa o de maíz puede disminuir los costos de los medios de cultivo para micropropagación in vitro (Mohamed *et al.*, 2010).

Rodríguez y Hechevarría (2006), cultivaron segmentos nodales de *Orthosiphon aristatus* Blumey *Artemisia absinthium* L., dos especies de plantas altamente demandadas por sus propiedades medicinales. Utilizaron harina de sagú (*Maranta arundinacea* L.) y un gel de Aloe vera (L.) N.L. Burm como solidificantes del medio de Murashige y Skoog (1962). Los resultados mostraron que medios solidificados con 0,8% (p/v) de agar (tratamiento 1), 0,4% (p/v) de agar más 0,4% (p/v) de harina de sagú

(tratamiento 2), 0,4% (p/v) de más 15% (p/v) de gel de *A. vera* (tratamiento 3) y 0,8% (p/v) de harina de sagú más 15% (p/v) de gel de *A. vera* (tratamiento 4) no arrojaron diferencias significativas en los índices de crecimiento vegetativo (altura, número de hojas y raíces) en ninguna de las dos especies cultivadas. Sin embargo, el tratamiento 4 presentó los mejores resultados en *O. aristatus*, mientras el tratamiento 2 lo fue para medios sembrados con *A. absinthium*.

En un estudio reciente realizado en Etiopía se evaluó la eficiencia del almidón de ensete (bulla) como agente gelificante alternativo para la micropropagación de *Vanilla planifolia*. Los resultados revelaron que el número de brotes y de peso fresco se mejoraron significativamente en los medios de multiplicación gelificados con bulla (8%). A pesar de todos los brotes producidos tuvieron un enraizamiento del 100%, se obtuvo un mayor crecimiento de los brotes en medios suplementados con bulla (8%), (10%) y agar. La sustitución de agar por bulla (8%) podría ahorrar alrededor de 72,5% del costo de agar. Un inconveniente detectado en los ensayos fue la opacidad de los medios, que dificulta la observación de contaminación temprana (Mengesha *et al.*, 2012).

La elaboración de medios de cultivo para micropropagación, sustituyendo parcial o totalmente el agar por almidones, es una opción rentable, que disminuye los costos, debido a que los tubérculos o cereales de donde se extraen, se encuentran en mayor cantidad, comparado con las algas rojas (*Rhodophyceae*) de donde se extrae el agar. El inconveniente de los almidones es la menor fuerza gelificante, pero puede ser resuelto agregando agar en bajas concentraciones, o aumentando la cantidad de almidón en el medio. También se pueden utilizar modificaciones químicas para mejorar las propiedades funcionales de los almidones, con el fin de incrementar el poder solidificante (Kuria *et al.*, 2008).

Gomas

Gomas como gelificantes en procesos de organogénesis

En un estudio de regeneración de brotes en segmentos foliares de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), realizado por Ozel *et al.*, (2008), se evaluó el efecto de los medios de cultivo gelificados con 7 a 1 g/L de agar y 0-6 isubgol g/L; 2,25 a 0,25 g/L Gelrite y 0-6 g / l isubgol; 5,25 a 0,25 g/L Phytigel y 0-5 g /L isubgol, y 1-15 g / L isubgol. Los resultados demostraron que, independiente de algunos problemas con los geles, el isubgol (7g/L) indujo un mayor número de brotes y de raíces; además, la longitud de los brotes fue mayor en medios gelificados con isubgol en concentración de 9 g/L. Para una cantidad determinada de medio de cultivo, las mezclas de agar-isubgol, Gelrite-isubgol son más baratas. Así mismo, las mezclas de agar-isubgol, Gelrite-isubgol gelificaron a bajas temperaturas, propicias para el uso seguro de estos geles cuando se emplean sustancias lábiles, en la transformación genética o experimentos de cultivo de tejidos.

En procesos de germinación y de organogénesis indirecta en hojas de arroz (*Oryza sativa* L.) realizados por Afrasiab y Rabia (2011), se utilizó phytigel como agente gelificante del MS (Murashige y Skoog 1962) y LS (Linsmaier y Skoog 1965). Los resultados demostraron que a pesar de que el porcentaje de germinación, la inducción de callo, y los índices de crecimiento evaluados fueron menores en los medios gelificados con phytigel, este gelificante es una alternativa al empleo de agar, pues contiene menos impurezas y el pH del medio es más estable a través del tiempo de cultivo.

Saglam y Cifici (2010) utilizaron isubgol como agente gelificante en medios para organogénesis indirecta en hojas de Woad (*Isatis tinctoria*), comparados con un blanco de agar. Encontraron mejor respuesta callogénica y de diferenciación en los medios solidificados con isubgol.

Gomas como solidificantes en procesos de embriogénesis

Jain-Raina y Babbar (2011) utilizaron mezclas de varios agentes gelificantes goma guar (2,6 a 2,9%) + Agar (0,1-0,4%); goma xantana (0,6-0,9%) + Agar (0,1-0,4%); Isubgol (2,6 a 2,9%) + Agar (0,1-0,4%); goma guar (1,5 a 2,9%) + goma xantana (0,1-1,5%); Isubgol (1,6 a 2,9%) + goma xantana (0,1-1,4%) y goma guar (2,6 a 2,9%) + Agar (0,1-0,4%). La concentración total de los agentes gelificantes mezclados con goma xantana fue 1%, mientras que en los demás fue 3%. Utilizaron estos medios para geminar e inducir embriogénesis somática en *Albizia lebeck*.

En los resultados encontrados fue evidente que la respuesta morfogénica fue apoyada por toda la mezcla de gelificación, en la mezcla que contenía 2,6% isubgol y 0,4% de agar. El porcentaje de germinación de semillas mejoró significativamente cuando el agar se mezcló con goma xantana o goma guar, ya que cuando se utilizaron solas, los resultados no fueron tan exitosos (tabla 4). La otra característica común es la reducción en la respuesta calogénica con un aumento de agar al 0,4% en mezclas de gelificación con la goma de guar e isubgol. Jain-Raina y Babbar concluyeron que las mezclas de goma xantana y guar, con agar, pueden ser sustitutos en los medios de cultivo, como agente gelificante, lo que disminuyó costos y mejoró resultados de crecimiento en las plántulas.

Tabla 4. Índices de crecimiento evaluados en explantes de *A. lebeck* inoculados en medios modificados.

Agente gelificantes	No. Explantes	Germinación (%)	Altura brotes (cm)	Longitud raíces (cm)
0,9% Ag	96	82,2 ^a	7,77 ±3,45bc	5,40 ±2,90bc
3% GG	92	47,9b	5,37± 2,72c	4,33 ±2,25c
2,9% GG + 0,1% Ag	96	81,2 ^a	8,57 ±2,98ab	5,98 ±1,97bc
2,8% GG + 0,2% Ag	96	73,9 ^a	9,21 ±3,04ab	6,77 ±2,46ab
2,7% GG + 0,3% Ag	96	80,2a	8,66± 2,63ab	5,83 ±2,50bc
2,6% GG + 0,4% Ag	96	85,4a	10,70± 1,30a	8,03 ±2,13a
1% Xan	96	52,0b	6,10 ±1,92c	4,05 ±1,76c
0,9 Xan + 0,1% Ag	96	71,8a	8,21± 2,88b	6,57 ±2,55ab
0,8 Xan + 0,2% Ag	96	86,4a	8,08 ± 2,42b	5,52 ±2,31bc
0,7 Xan + 0,3% Ag	96	76,0a	8,27± 2,12b	5,61 ±2,44bc
0,6% Xan + 0,4% Ag	96	89,5a	9,09 ±2,97ab	7,24 ±2,52ab
3% Is	96	83,3a	10,00± 2,97ab	6,61 ±2,68ab
2,9% Is + 0,1% Ag	96	81,2a	9,79 ±2,34ab	5,51 ±2,53bc
2,8% Is + 0,2% Ag	96	86,4a	10,79± 1,96a	5,62 ±1,82bc
2,7% Is + 0,3% Ag	96	87,5a	10,66 ±2,20a	6,39± 1,79b
2,6% Is + 0,4%Ag	96	82,1a	10,56 ±1,85a	6,71 ±1,59ab

Ag: agar GG: goma guar Xan: gomaxantana: isubgol

Fuente: Jain-Raina Y Babbar (2011).

Van Ark *et al.* (1991) no obtuvieron diferencias estadísticas en los resultados obtenidos, empleando medios de cultivo gelificados con agar y gelrite en procesos de embriogénesis somática indirecta en *Poa pratensis* L.

Saglam y Cifici (2010) utilizando isubgol como agente gelificante en medios para embriogénesis de hipocótilos de Woad (*Isatis tinctoria*), comparados con un blanco de agar, encontraron mejor respuesta en los medios solidificados con agar. Moon *et al.* (2004) reportaron la siembra de proembriones somáticos de *Ceratozamia hildae* en medios gelificados con phytagar, Gel-Ro, Agar TC, agar-gel y consideraron mejor gelificante el agente de prueba al Gel-Ro.

Jain-Raina y Babbar en 2002 utilizaron la goma katira como agente gelificante en medios para inducir embriogénesis somática en *A. labbeck*. No encontraron diferencias significativas con el tratamiento control gelificado con agar. Posteriormente, en 2006 estudiaron el efecto de la goma xantana como agente gelificante en medios para inducir embriogénesis somática indirecta de *Calliandra tweedii*, encontrando mejores resultados en los medios en los que la concentración de goma xantana fue del 1%, en variables como respuesta callogénica y porcentaje de germinación. Babbar *et al.* (2005) encontraron diferencias significativas en el número de embriones formados de *C. tweedii* y el porcentaje de germinación de semillas de *Linum usitatissimum*, con goma guar y agar como agente solidificante de los medios utilizados.

Gomas en procesos de micropropagación o proliferación

En ensayos de micropropagación de brotes de manzano (*Malus prunifolia* Borkh) realizados por Lucyszyn *et al.* (2005) en medios de cultivo gelificados con mezclas de goma guar-agar y goma cassia-agar en proporción 3/3 g/L, comparadas con un testigo de agar de 6g/L, los resultados obtenidos indicaron una mayor proliferación de los brotes de manzano, así como una menor aparición

de brotes hiperhidratados en los medios de cultivo gelificados con gomas y agar. Las mezclas utilizadas para sustituir al agar no afectaron significativamente índices de crecimiento como cantidad y longitud de los brotes regenerados.

Posteriormente, Lucyszyn *et al.* (2006) también probaron la eficacia de la sustitución parcial de agar por galactomananos (GMS), obtenidos a partir de diferentes fuentes. Se ensayó la micropropagación de fresa (*Fragaria x ananassa* Duchesne) en los medios modificados. Las gomas guar y cassia se mezclaron con agar en la proporción de 0.3/0.3% (w / v) en medio MS (año), y el rendimiento se comparó con comportamiento de medio de agar que contenía sólo (0,6%, w / v) como agente gelificante. Los resultados obtenidos indicaron que el agar puede ser parcialmente remplazado por galactomananos, puesto que las mediciones reológicas confirmaron una buena interacción entre los polisacáridos. También se observaron un mejor rendimiento y mayor proliferación de brotes de fresa; se evidenció que las raíces fueron más largas en los medios modificados. Así, el comportamiento del gel de galactomananos y la rentabilidad comercial, que es menor para el medio modificado en comparación con el sistema solidificado con agar, mostró el uso potencial de estos galactomananos para su aplicación en cultivo de tejidos vegetales.

Chacón *et al.* (2000), utilizaron Phytigel para solidificar medios de cultivo para la propagación *in vitro* de yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). Ellos utilizaron un blanco que fue gelificado con agar, para comparar el comportamiento de los índices de crecimiento. Encontraron diferencias significativas en ambas especies entre los resultados obtenidos en altura, peso fresco y peso seco, que fueron superiores cuando los medios se gelificaron con phytigel, y porcentaje de materia seca obtenidos en los medios en donde se utilizó agar como solidificante. Además reportaron que al aumentar la concentración de agente gelificante, por encima del valor que confirió una consistencia óptima en los medios, los índices de crecimiento se afectaron negativamente, pues una

mayor consistencia y dureza de los medios impide la mejor absorción y movilidad de los nutrientes dentro de estos.

Capote Rodríguez *et al.* (2002) evaluaron el efecto de un agente gelificante cubano, Natugel, en el crecimiento de cultivos *in vitro* de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad Cuba C-2781. Utilizaron como explantes ápices y nudos cultivados *in vitro* en medio MS con sacarosa, y Natugel en dos formulaciones: I y II que se diferenciaron en la granulometría y en la densidad aparente. Compararon con cultivos control en las mismas condiciones anteriores pero con la adición de agar en sustitución del agente gelificante. La respuesta de los cultivos se evaluó en función del número de nudos y la altura de las plántulas en sucesivos subcultivos y no se encontraron diferencias significativas entre la respuesta obtenida en medio solidificado con agar y la obtenida en medio solidificado con la mezcla Natugel I/II.

Aunque se ha hecho ya un recuento de las sustancias que han sido utilizadas como agentes gelificantes alternativos, lo más importante es conocer el costo que tiene cada una de estas. En la tabla 5 se muestra una relación de las sustancias utilizadas, haciendo énfasis en las concentraciones empleadas, así como su costo. Se observa que el agar es el gelificante, que a pesar de que se usa en baja concentración, es el que más eleva el costo de un litro de medio de cultivo.

De acuerdo con los costos mostrados en la tabla 5 se recomienda como agentes gelificantes la goma guar y los almidones de papa y yuca, pues con ellos se han hecho un mayor número de investigaciones y se han cultivado una mayor cantidad de especies vegetales. En el caso colombiano, los almidones de papa, yuca y maíz son de fácil adquisición, pues el país produce estas materias primas de forma permanente. Las gomas son más caras que los almidones, pero al usarse en cantidades menores, tienen un precio equivalente por litro.

Los mejores resultados, ya sean fisiológicos y físicos, se han reportado con las mezclas entre agentes gelificantes, como mezclas de agar con algunas gomas y almidones. Estas mezclas presentan una menor disminución en el costo de los medios de cultivo, pero pueden ser más eficientes que los agentes alternativos. Con el uso de almidones y gomas como gelificantes se obtienen reducciones aproximadas desde el 30% al 70% en los costos, basados en el precio del solidificante, lo que permite una alternativa válida económicamente para implementar estas técnicas, así como la oportunidad de mejorar los mercados de productos como la papa, yuca, arroz, que tendrían una nueva línea de comercio, como materia prima para extracción de almidones, ayudando al sector agrícola colombiano.

Tabla 5. Relación de sustancias utilizadas como agentes gelificantes.

Sustancia	Concentración (g/l)	Especie cultivada	Costo kg sustancia (co\$)	Costo solidificante por litro (co\$)
Almidón de yuca	100	<i>S. tuberosum</i> L. (MP) <i>M. esculenta</i> (MP)		936.6
	60-70	<i>Musa</i> (MP) <i>U. kirkiana</i> (MP)	9326	560-653
Almidón de sagú	80	<i>Celosia</i> sp (OR)		746.08
	80	<i>S. tuberosum</i> L. (MP)	7000	560
Almidón de maíz	60	<i>S. tuberosum</i> L. (MP)		341,1864
	40-80	<i>Celosia</i> sp (OR)	5686,44	227,45-454,92
Almidón de papa	60-80	<i>Musa</i> (MP)		840-1120
	90	<i>Celosia</i> sp (OR) <i>S. ionantha</i> (OR)	14000	1260
Almidón de arroz	40-80	<i>T. cacao</i> L. (EC)	15400	616-1232
Almidón de ensete	80 y 100	<i>V. planifolia</i> (MP)	5980	478,4-598
Goma karaya	30	<i>Citrus jambhiri</i> Lush. (MP)	16608	498,24
Phytigel	20	<i>M. domestica</i> Borkh (MP)		10354,62
	25	<i>Robinia pseudoacacia</i> (MP) <i>D. trifida</i> y <i>D. alata</i> (MP)	517731	12943,275
	1,3; 1,8; 2,3	<i>O. sativa</i> L. (OR)		673,05-1190,78
Goma gellan (Gelrite)	2,4	<i>C. hildae</i> (ES)		750,1824 2500,608
	8	<i>P. pratensis</i> L. (ES)	312576	
Goma guar	3,4	<i>Aloe polyphylla</i> (MP) <i>S. Yoshimurae</i> (MP)		1062,7584
	20	<i>C. tweedii</i> (ES) <i>Crataeva nurvala</i> (MP)		843,18
	10	<i>Chlorophytum borivillianum</i> (MP)	42159	421,59
Goma katira	30	<i>A. Labbeck</i> (ES)		1264,77
	40	<i>L. usitatissimum</i> (EC)		1686,36
Goma cassia/agar	30	<i>S. cuminii</i>	70400	2112
Goma xantana	10	<i>P. communis</i> L. cv. Durondeau (MP)	54550	1636,5
		<i>F. ananassa</i> Duchesne (MP)		
Isubgol	7	<i>C. tweedii</i> (ES) <i>A. labbeck</i> (ES)	34998	349,98
	15	<i>N. tabacum</i> L. (OR)	47000-68000	402,5
Agar agar	6-9	<i>I. tinctoria</i> (ES) (MP)		862,5
		<i>A. labbeck</i> (ES)		1725
		Todas las anteriores	487664- 585600	2925-4515

ES: embriogénesis somática MP: micropropagación OR: organogénesis CO\$: pesos colombianos

Conclusiones

El avance de las investigaciones enfocadas a la sustitución parcial o total del agar como agente gelificante en los medios de cultivo *in vitro* para propagación, ha arrojado resultados prometedores, principalmente en lo que respecta al uso de almidones, ya que, aunque algunos resultados con gomas como solidificantes son muy buenos, los almidones tienen un menor costo y son de fácil adquisición y extracción; además, pueden ser modificados para conferir propiedades funcionales específicas, que les permitan ser utilizados con mayor eficiencia en micropropagación vegetal *in vitro*, ya sea como único agente gelificante, o mezclado con agar u otro tipo de goma.

La implementación de almidones o gomas como agentes gelificantes alternativos reporta una disminución en los costos de los medios de cultivo para tejido *in vitro* de hasta el 70% comparados con los del agar, aunque fisiológicamente hablando los mejores resultados se obtienen en las sustituciones parciales que se han estudiado.

Agradecimientos

La investigación fue posible gracias a la colaboración de los grupos de investigación BIOPLASMA-UPTC y QUIMOL, de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia UPTC, sede central.

Literatura citada

1. Afrasiab, H. & Jafar, R. (2011). Effect of different media and solidifying agents on callogenesis and plant regeneration from different explants of rice (*Oryza sativa* L) varieties super basmati and IRRI-6. *Pakistan Journal of Botany* 43(1), 487-501.
2. Agrawal, A., Sanayaima, R., Tandon, R. & Tyagi, R. K. (2010). Cost-effective *in vitro* conservation of banana using alternatives of gelling agent (isabgol) and carbon source (market sugar). *Acta Physiol Plant* 32, 703-711.
3. Atici, T., Mahmood Khawar, K., Ozel, C. A., Katircioglu, H., & Alev Ates, M. (2008). Use of psyllium (isabgol) husk as an alternative gelling agent for the culture of prokaryotic microalgae (Cyanobacteria) *Chroococcus slimneticus* Lemmermann and eukaryotic green microalgae (Chlorophyta) *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brebisson. *African Journal of Biotechnology* 7 (8), 1163-1167.
4. Babbar, S. B., Jain, r., walia, A. (2005). Guar gum as a gelling agent for plant tissue culture media. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant* 41, 258-261.
5. Bobbio P.A.; Bobbio, F.O. (1992). Química do processamento de alimentos. (2ª Edición). São Paulo: Livraria Varela.
6. Calva, G. y Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria* 6 (11). 1-16.
7. Capote, A., Álvarez, F., Fundora, Z., Rodríguez S., Pérez, O. & Fonseca, D. (2002). Evaluación de un agente gelificante cubano, Natugel, en el cultivo *in vitro* de plántulas de tomate. *Biotecnología Aplicada* 19, 37-40.
8. Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D. & Toribio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria: Sistemas de Recursos Forestales* 14(3), 345-357.
9. Chacón, A., G. Saborío, F., Gómez, L., Torres, S. & Valverde, R. (2000). El tipo de gelificante en el desarrollo *in-vitro* y la aclimatización de plantas de yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía costarricense* 24 (002), 57-64.
10. Daud, N., Mat Tal, R., Mohd Noor, N. N. & Alimon, H. (2011a). Potential of alternative gelling agents in media for the *in vitro* micro-propagation of *Celosia* sp. *International Journal of Botany* 7(2), 183-188.
11. Daud, N., Mat Tal, R., Mohd Noor, N. N. & Alimon, H. (2011b). Provision of low cost media options for *in vitro* culture of *Celosia* sp. *African Journal of Biotechnology* 10(80), 18349-18355.
12. Dobranszki, J., Magyar-Tabori, K. & Tombacz, E. (2011). Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication. *Plant Biotechnology Reproduction* 5, 345-352.
13. Dziezak J.D. (1991). A focus on gums. *Food Technology* 45(3), 115.
14. Fasolo, F.M. & Predieri, S. (1988). *In vivo* rooting of gf 655-2 peach rootstock and kiwi cv. "Hayward" *Microcuttings*. *Acta Horticult.* 227, 500-503.
15. González, O. S. y Silva, J. J. (1999). Empleo de diferentes agentes gelificantes en el cultivo de tejidos vegetales. *Centro Agrícola* 26 (1), 84-85.
16. Jain, N. & Babbar, S. B. (2002). Gum katira – a cheap gelling agent for plant tissue culture media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71, 223-229.
17. Jain, R., Anjaiah, V. & Babbar, S. B. (2005). Guar gum: a cheap substitute for agar in microbial culture media. *Letters in Applied Microbiology* 41, 345-349.

18. Jain, R & Babbar, S. B. (2006). Xanthan gum: an economical substitute for agar in plant tissue culture media. *Plant Cellular Reproduction* 25, 81–84.
19. Jain, R. & Babbar, S. B. (2011). Evaluation of blends of alternative gelling agents with agar and development of xanthagar, a gelling mix, suitable for plant tissue media. *Asian Journal of Biotechnology* 3 (2), 153-164.
20. Joshi, N. & Purohit, S. D. (2012). Optimization of Factors Influencing Shoot Multiplication During Micropropagation of *Chlorophytum borivillianum* Sant. Et Fernand. Proceedings of the National Academy of Sciences India - Section B: *Biological Sciences* 82(3), 421–429.
21. Ivanova, M. & Staden, J. V. (2011). Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 104, 13–21.
22. Kodym, A. y Zapata, F. J. (2001). Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66, 67–71.
23. Kuria, P., Demo, P., Nyende, A. B. & Kahangi, E. M. (2008). Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology* 7 (3), 301-307.
24. Hernández, M., Torruco Uco, J. G., Chel, L. & Betancur, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28(3), 718-726.
25. Lee Espinosa, H. E., Laguna Cerda, A., Murguía González, J., Iglesias Andreu, L., García Rosas, B., Escobedo López, D., Martínez Ocampo, Y. M., Barredo Pool, F. A. & Santana Buzzy, N. (2010). Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización *in-vitro* de *Laelia anceps* ssp. *Dawsonii*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(4), 323-332.
26. Lucyszyn, N., Quoirin, Anjos, A. & Sierakowski, M.-R. (2005). Blends of Agar-Galactomannan for Marubakaido Apple Rootstock Shoot Proliferation. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15(2), 146-150.
27. Lucyszyn, N., Quoirin, M., Koehle, H.S., Reicher, F. & Sierakowski, M.R. (2006). Agar-galactomannan blends for strawberry (*Fragaria x ananassa Duchesne*) cv. Pelican micropropagation. *Scientia Horticulturae* 107, 358–364.
28. Lucyszyn, N., Quoirin, M., Ribas, L. F., Koehler, H. S. & Sierakowski, M. R. (2006). Micropropagation of 'Durondeau' pear in modified-gelled medium. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 42, 287–290.
29. Martínez, M., Alonso, A., Osorio, F., Gallardo, F., López, H. & Mata, M. (2009). Evaluación de diferentes fuentes de carbohidratos y medios de soporte, para la multiplicación *in vitro* de porta-injertos de cítricos tolerantes a la tristeza. *Agronomía Tropical* 59(3), 343-350.
30. Mateen, A. Hussain, S. Rehman, S. Mahmood, B. Aslam Khan, M. Rashid, A. Sohail, M. Farooq, M. & Ahmed Shah, S. J. (2012). Suitability of various plant derived gelling agents as agar substitute in microbiological growth media. *African Journal of Biotechnology* 11(45), 10362-10367.
31. Mbanaso, E.N.A. (2008). Effect of multiple subcultures on *Musa* shoots derived from cassava starch-gelled multiplication medium during micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 7 (24), 4491-4494.
32. Medina, M. A., Sepúlveda, N. I. & Murillo, M. V. (2008). Regeneración *in vitro* de plantas a partir de explantes foliares del lulo chochoano, *Solanum sessiliflorum* Dunal vía organogénesis. *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo* 27(1), 82-86.
33. Mengesha, A., Ayenew, B., Gebremariam, E. & Tadesse, T. (2012). Micro-Propagation of *Vanilla planifolia* Using Enset (*Ensete ventricosum* (Welw, cheesman)) Starch as a Gelling Agent. *Current Research Journal of Biological Sciences* 4(4), 519-525.
34. Mohamed, M. A. H., Alsadon, A. A. & Al Mohaidib, M. S. (2010). Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 9 (1), 012-016.
35. Moon, P. A., Litz, R. E. & Chavez, V. M. (2004). Effect of Gelling Agent on Growth and Development of *Ceratostylis hildae* Somatic Embryos. *The Botanical Review* 70(1), 47-53.
36. Moses F.A. & Maliro. Lameck, G. (2004). Potential of cassava flour as a gelling agent in media for plant tissue cultures. *African Journal of Biotechnology* 3 (4), 244-247.
37. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
38. Naik, P. S. & Sarkar, D. (2001). Sago: an alternative cheap gelling agent for potato *in vitro* culture. *Biologia Plantarum* 44(2), 293-296
39. Ocampo, F. & Núñez, V. M. (2007). Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8(1), 22-27.
40. Ozel, C. A., Khawar, K.A. & Arslan, O. (2008). A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on *in vitro* shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Scientia Horticulturae* 117, 174–181.
41. Pacheco de Delahaye, E. & Techeira, N. (2009). Propiedades químicas y funcionales del almidón nativo y modificado de ñame (*Dioscorea alata*). *Interciencia* 34(4), 280-285.
42. Pasquel, A. (2001). Gomas: Una Aproximación A La Industria De Alimentos. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria* 1(1), 1– 8.
43. Rodríguez, H. & Hechevarría, I. (2006) Gel de *Aloe vera* y harina de sagú como soporte sólido de medio de cultivo para plantas medicinales. *Revista Cubana Plantas Medicinales* 11(1), 1-5.
44. Romay, G., Matheus, J., Gerlts, A., Rueda, R. & Santana, M.A. (2006). Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales. *Interciencia* 3 (009), 686-689.

45. Saglam, S. & Cifici, C.Y. (2010). Effects of Agar and lsubgol on Adventitious Shoot Regeneration of Woad (*Isatis tinctoria*). *International Journal Of Agriculture & Biology* 12 (2), 281–285.
46. Salinas, Y., Pérez, P., Castillo, J. & Álvarez, L. A. (2003). Relación amilosa amilopectina en el almidón de harina nixtamalizada de maíz y su efecto en la calidad de la tortilla. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26(002), 115-121.
47. Santos, D. (2008). Propagación *in vitro* de orquídeas, usando medios de cultivo, soportes y sustratos de bajo costo. (Tesis pregrado) Trabajo presentado para optar al título de biólogo, en la universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
48. Sharifi, A., Moshtaghi, N. & Bagheri, A. (2010). Agar alternatives for micropropagation of African violet (*Saintpaulia ionantha*). *African Journal of Biotechnology* 9 (54), 9199-9203.
49. Singh, B. & Kaur, A. (2011). Comparison of Agar and Gum Karaya as Gelling Agent for *in vitro* Regeneration of Rough Lemon (*Citrus jambhiri* Lush.) Plantlets from Nodal Explants. *J. Crop Sci. BThe Korean Society of Crop Science* 14 (4), 297-303.
50. Tsay, H. S., Lee, c. Y., Agrawal, D.C. & Basker, S. (2006). Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 42, 445–449.
51. Van Ark, H.F., Zaal, M.A.C.M., Creemers-Molenaar, J. & Van der Valk, P. (1991). Improvement of the tissue culture response of seed-derived callus cultures of *Poa pratensis* L.: Effect of gelling agent and abscisic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27, 275-280.
52. Wetzstein, H. Y., Kim, C. & Sommer, H. E. (1994). Vessel Volume, Gelling Agent, and Basal Salts Affect pH and Gel Strength of Autoclave Tissue Culture Media. *Horticulture Science* 29(6):683-685.
53. Wu, Y., Geng, F., Chang, P. R., Yu, A. & Ma, X. (2009). Effect of agar on the microstructure and performance of potato starch film. *Carbohydrate Polymers* 76, 299–304.
54. Zimmerman, R. H., Bhardwaj, S.V. y Fordham, M. I. (1995). Use of starch-gelled medium for tissue culture of some fruit crops. *Plant Cell tissue and Organ Culture* 43: 207-213.