

**EFFECTO DEL LIXIVIADO DEL RELLENO SANITARIO ANTANAS EN LA
DIVERSIDAD DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE
POLIHIDROXIALCANOATOS EN SUELOS CONTAMINADOS**

CAROLINA OBANDO MERA

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2009**

**EFFECTO DEL LIXIVIADO DEL RELLENO SANITARIO ANTANAS EN LA
DIVERSIDAD DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE
POLIHIDROXIALCANOATOS EN SUELOS CONTAMINADOS**

CAROLINA OBANDO MERA

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Bióloga**

**Asesor:
Ph.D. PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2009**

“Las ideas y conclusiones aportados en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de su autora”

“Artículo 1 del acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966, emanada por el honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño”.

Nota de aceptación

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto Noviembre de 2009

AGRADECIMIENTOS

A mi madre porque gracias a ella, este sueño se hace posibilidad.

Al profesor Pablo Fernández, por toda su orientación en este trabajo y por ser mi maestro el cual me formo a lo largo de mi carrera como bióloga.

A la profesora Luz Estella Lagos, directora de departamento, por su apoyo incondicional

A las profesoras Milena Guerrero y Dolly Revelo, por su apoyo, colaboración y sus explicaciones que llegaron oportunamente.

A mi amigas: Melissa, Marian, Analu, Natalia & Caro, gracias por haberme brindado su amistad y confianza por estar en la buenas y en las malas por darme un consejo o una palabra de aliento.

Y a todas aquellas personas de una u otra manera me colaboraron a lo largo del trabajo :

A Silvia, Sandra ,Maria Fernanda ,Guido e Ivan por toda su colaboración

A Derly & Diana por su compañía en los procesos de fermentación

Y a ti mi Juancho aunque la vida te haya separado de mi lado , donde quiera que este estoy segura que tu me das esa fuerzas para seguir luchando y nunca desfallecer

CONTENIDO

	PAG.
INTRODUCCION	16
1. OBEJETIVOS	18
1.1 Objetivo general	18
1.2 Objetivos Específicos	18
2. MARCO REFERENCIAL	19
2.1 LIXIVIADOS	19
2.1.1 Composición de los Lixiviados	19
2.2 TRATEMIENTO DE LOS LIXIVIADOS	20
2.3 PROPIEDADES DEL SUELO	20
2.3.1 Propiedades físicas	20
2.3.1.1 Color	20
2.3.1.2 Textura	20
2.3.1.3 Estructura	21
2.3.2 Propiedades físico químicas	21
2.3.2.1 Cambio iónico	21
2.3.2.2 pH	21
2.3.3 Propiedades químicas	21
2.4 COMUNIDADES MICROBIANAS	21
2.4.1 Comunidades predominantes en la actividad del suelo	22

2.4.2 Factores ambientales bióticos y a abióticos que influyen en la abundancia de organismos del suelo	23
2.4.2.1 Factores abióticos	23
2.4.2.1.1 Factores climáticos	23
2.4.2.1.2 Factores hidrográficos	23
2.4.2.1.3 Factores edáficos	23
2.4.2.2 Factores bióticos	23
2.4.2.2.1 Competencia	23
2.4.2.2.2 Predación	23
2.4.3 Factores que limitan el crecimiento microbiano	24
2.5 BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS	24
2.5.1 Generalidades	24
2.5.2 Síntesis de PHA'S	24
2.5.3.1 Ruta biosintetica de <i>Ralstonia eutrophus</i>	25
2.5.3.2 Ruta biosintetica de <i>Pseudomonas oleovorans</i>	25
2.5.3.3 Ruta biosintetica de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	25
2.5.3.4 Ruta biosintetica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
3. MATERIALES Y METODOS	27
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	28
3.2 FASE DE LABORATORIO	
3.2.1 Caracterización físico química del suelo	29
3.2.2 Diversidad y abundancia de Bacterias Productoras de PHA's	29

3.2.2.1 Aislamiento de bacterias productoras de polihidroxicanoatos	29
3.2.3 Estimación de la producción de polímero en los morfotipos aislado	29
4. RESULTADOS Y DISCUSION	30
4.1 CARACTERISTICAS FISICO QUIMICAS DEL SUELO	30
4.2 DIVERSIDAD Y ABUNDANCIA DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIACANOATOS (PHAs)	34
4.3 ESTIMACION DE LA PRODUCCION DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN CEPAS AISLADAS DE SUELOS ASPERJADOS CON LIXIVIADOS	42
5. CONCLUSIONES	46
6. RECOMENDACIONES	47
7. LITERATURA CITADA	48
8. ANEXOS	54

LISTA DE TABLAS

	PAG.
Tabla 1: Descripción de los experimentos realizados	27
Tabla 2: Caracterización físico química antes de la aspersión del lixiviado y después de 120 días de aspersión de lixiviado	30
Tabla 3: Abundancia de morfotipos productores de polihidroxicarboxilatos durante la aspersión de lixiviado.	37
Tabla 4: Descripción de los morfotipos aislados de suelos asperjados con lixiviados.	38
Tabla 5: Abundancia total y relativa de los morfotipos aislados de suelos asperjados con lixiviados.	39

LISTA DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1: forma de aspersión de lixiviado en la camas de los tratamientos	27
Figura 2: Valores de las bases intercambiables, al inicio y al final de experimento de aspersión de lixiviado.	31
Figura 3: Relación carbono/nitrógeno al inicio y a al final del experimento de aspersión de lixiviado	32
Figura 4-5 Fluorescencia de los morfotipos positivos a la prueba de azul nilo	33
Figura 6-7 Forma macroscópica y microscópica del morfotipo 2MP1	33
Figura 8-9 Antibiograma de la cepa 1MP5	34
Figura 10 Abundancia de bacterias productoras de polihidroxicanoatos en el experimento de aspersión de lixiviado y en el tratamiento control sin riego de lixiviado	35
Figura 11 Diversidad de bacterias productoras de polihidroxicanoatos experimento de aspersión de lixiviado y en el tratamiento control sin riego de lixiviado	36
Figura 12. Forma microscópica del aislamiento 1MP5 <i>Bacillus laterosporus</i>	42
Figura.13 Perfil Cromatografico obtenido de la cepa 1MP5	43

LISTA DE ANEXOS

- 1** Tabla ANOVA, Parámetro pH
- 2 Tabla ANOVA parámetro fosforo
- 3.** Tabla ANOVA capacidad de intercambio cationico
4. Tabla ANOVA Calcio de cambio
5. Tabla ANOVA Magnesio de cambio
6. Tabla ANOVA potasio de cambio
7. Tabla ANOVA porcentaje de nitrógeno
8. Tabla ANOVA porcentaje de carbono

GLOSARIO

ASPERSION: Esparcimiento de agua u otro líquido en forma de pequeñas gotas

API 50: Sistema miniaturizado para la identificación de microorganismos basados en los perfiles bioquímicos.

COMUNIDAD: Unidad biológica superior en una jerarquía ecológica que se compone de poblaciones interactivas.

CLIMAX: Etapa final estable hacia la cual evolucionan la biota y el suelo sometido a unos determinados factores ambientales.

DIVERSIDAD: Heterogeneidad de un sistema; variedad de tipos diferentes de organismos que pueden encontrarse juntos en una comunidad biológica.

LIXIVIADOS: es el líquido que se ha filtrado a niveles inferiores de un suelo y que ha extraído, disuelto o suspendido materiales. Denominación que se le da a los constituyentes sólidos tras haber sufrido el proceso de lixiviación.

POLIHIDROXIALCANOATOS: son polímeros producidos como material de reserva de diferentes grupos microbianos que tienen utilidad industrial.

RESUMEN

La diversidad de bacterias, en suelos asperjados con lixiviados fue estudiada para identificar las bacterias productoras de Polihidroxialcanoatos (PHA'S), y evaluar el efecto del lixiviado generado en el relleno sanitario Antanas sobre estas. Se tomo una muestra de suelo compuesta proveniente del corregimiento de Daza, para realizar los dos experimentos. El tratamiento uno el cual se le hizo una aspersión diaria de 2 litros de lixiviado y el tratamiento dos que fue el testigo. Las poblaciones microbianas cultivables fueron aisladas en un medio selectivo e identificadas utilizando pruebas API 50 CHB. Se aisló un total de 30 morfotipos productores de PHAs, a lo largo de un periodo 90 días, durante el cual se observa un aumento asintótico en la acumulación de morfotipos y un remplazamiento en los mismos. Al cabo se este tiempo curva se estabiliza y la diversidad disminuye considerablemente. El morfotipo mas abundante durante el muestreo fue el SM1 perteneciente al grupo de las bacterias Gram - con un total de 113 observaciones. Entre los aislados con mayor producción de polímero se encuentra el 1MP3 identificado como *Brevibacillus laterosporus* capaz de sintetizar poli-hidroxiburitato con un rendimiento de 0,114 gr/L.

ABSTRACT

The diversity of bacteria in soil sprayed with leachate was studied to identify the bacteria producing polyhydroxyalkanoates (PHA's), and evaluate the effect of the leachate generated at the landfill Antanas on these. It took a composite soil sample from the village of Daza, to perform the two experiments. Treating one of which he made a daily spray of 2 liters of leachate and treatment two was the witness. Cultivable microbial populations were isolated on selective media and identified using API 50 CHB tests. Was isolated from a total of 30 morphotypes producing PHAs, over a period of 90 days, during which there was an increase in the accumulation of asymptotic morphotypes and a replacement in them. After this time is curve flattens and diversity decreases significantly. The most abundant morphotype during sampling was the SM1 of the group of Gram - a total of 113 observations. Among isolates with increased production of the polymer is identified as *Brevibacillus laterosporus* 1MP5 able to synthesize poly-hidroxiburitato with a yield of 0.114 g / L

INTRODUCCION

En Colombia, al igual que muchos países del mundo se genera una gran cantidad de residuos sólidos, municipales, industriales y biológicos (Pineda 2001). Los rellenos sanitarios a nivel nacional y mundial, constituyen el sistema de tratamiento que ofrece las mejores soluciones técnicas económicas y sanitarias. Los procesos de degradación de los residuos sólidos presentan algunas consecuencias como la generación de biogás y líquidos “lixiviados”. Si la producción de lixiviados es muy elevada y si el relleno sanitario no tiene un revestimiento adecuado, los lixiviados pueden escapar y pueden derivar en escurrimientos que contaminan aguas y suelos aledaños. (Semarnat 2001)

La disposición actual de los residuos sólidos generados en el municipio de Pasto se hace en el relleno sanitario de Antanas, (RSA), bajo la empresa metropolitana de aseo EMAS. Este fue diseñado y es operado de forma técnica adecuada, siendo los lixiviados generados tratados antes de su descarga hacia los suelos aledaños. (Burbano 2001)

Se cree que los lixiviados han modificado las propiedades físicas y químicas de los suelos y esto ha repercutido en las poblaciones microbianas las cuales son sensibles a las perturbaciones en el equilibrio de factores biótico y abióticos lo que pueden ocasionar un cambio temporal en la población, que quizás con el tiempo se establezca de nuevo un equilibrio (Pineda 2001).

Un consorcio bacteriano el cual puede utilizar como hábitat este tipo de suelos son el grupo de las bacterias productoras de polihidroxicanoatos.

Los polihidroxicanoatos son poliésteres sintetizados por numerosas especies bacterianas en condiciones de escasa nutricional caracterizado por un exceso en la fuente de carbono y una limitación en otros elementos tales como el fósforo y el nitrógeno. Estos tipos de polímeros son de gran interés tecnológico y comercial ya que a partir de estos se pueden procesar gran variedad de bienes de consumo y de material médico, ya que poseen características físicas similares a las exhibidas por poliésteres y cauchos sintéticos a diferencia que estos son biodegradables. Puesto que los organismos productores de PHAs son de origen biológico se los puede encontrar en una amplia gama de ambientes, tales como suelo, agua y aguas residuales y pueden sintetizar el PHA a partir de las fuentes renovables del carbono derivadas de basuras agrícolas e industriales. Muchos trabajos se han encaminado en la parte de producción, características de los materiales, y la biodegradabilidad de PHAs. Conjuntamente con estos esfuerzos, de modo que se han ayudado considerablemente al conocimiento sobre la producción de PHAs en laboratorio. Sin embargo, poco se sabe sobre el papel ecológico de PHAs en las poblaciones bacterianas nativas en ecosistemas naturales. El conocimiento de las condiciones que afectan la estabilidad es necesaria para determinar los efectos de parámetros externos sobre hábitats y es valioso para la gestión ambiental y aplicaciones biotecnológicas.

Dado lo anterior es esta investigación se propuso evaluar el efecto que tiene el lixiviado generado en el Relleno Sanitario Antanas sobre la diversidad de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos , para ello se calculo la diversidad y abundancias de estas bacterias en suelos expuestos a la contaminación por lixiviados , se identificaron cepas bacterianas (cultivables) Productoras de PHA's para su posible uso como inoculantes biológicos en procesos de biorremediación y se estimo la producción de PHAs para posibles aplicaciones biotecnológicas.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del lixiviado del relleno sanitario de Antanas sobre la diversidad de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos en los suelos de esta zona.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.2.1 Analizar las características físico químicas de los suelos antes y después de la aspersión de lixiviados.

1.2.2 Determinar la diversidad y abundancia de bacterias productoras de polihidroxicanoatos del relleno sanitario de Antanas

1.2.3 Estimar la producción de Polihidroxicanoatos, en bacterias aisladas de suelos asperjados con lixiviados

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 LIXIVIADOS

Los lixiviados son los líquidos que brotan a la superficie o se filtran en la masa de los residuos sólidos urbanos terreno donde esta instalado una relleno sanitario o un vertedero de basura , como consecuencia del agua lluvia que cae sobre el área de influencia, o de la descomposición de los compuestos orgánicos y la humedad de las basuras que drenan y percolan a través de los intersticios y capas de basura proporcionando a su paso toda serie de reacciones y procesos físico-químicos y biológicos. (Agudelo 1994). Los residuos sólidos urbanos que son dispuestos sobre el suelo quedan expuestos a ser arrastrados por aguas pluviales hacia cuerpos de agua y corrientes superficiales. Esto favorece a la generación de lixiviados moviéndose tanto horizontal como verticalmente, principalmente en el subsuelo, en aquellos sedimentos granulares o rocas fracturadas con permeabilidad mayores a 1×10^{-5} cm. / seg. Donde llegan a contaminar los mantos acuíferos (García 2003). Cuando el agua percola a través de la basura, arrastra químicos, metales y demás productos resultantes de la descomposición de un residuos sólidos. La cantidad y calidad del lixiviado depende del sitio y está determinada; régimen hidrológicos y de temperatura, composición de los residuos sólidos, altura del enterramiento, naturaleza de la superficie de cobertura, y parámetros específicos operacionales. (Marinheiro et.al 2003)

2.1.2 Composición de los lixiviados: Los lixiviados generados en los Rellenos Sanitarios no son homogéneos, dependen del tipo de residuo, estos varían de una región a otra e incluso con la época del año (Cotoras 1995). Los lixiviados de los rellenos sanitarios presentan altas concentraciones de contaminantes tales como amonio, contaminantes orgánicos medidos como demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO), hidrocarburos halogenados y metales pesados. Por lo general los lixiviados presentan altas concentraciones de sales inorgánicas, principalmente cloruro de sodio, carbonatos y sulfatos. En general se consideran desechos peligrosos y deben ser colectados y tratados antes de su descarga. (Burbano 2003). Además presentan características físicas como turbiedad, color que suele ser grisáceo y en condiciones anaerobias es negro, el olor es desagradable debido a la descomposición de compuestos orgánicos como aminas, amoniaco, sulfuros, mercaptanos, entre otros (González 1998). El plomo, el cadmio y mercurio son metales pesados presentes en los lixiviados. Estos metales pesados son bioacumulativos, es decir se acumulan en los tejidos de los organismos sin poder ser eliminados y por tanto su concentración ira aumentando en los niveles tróficos superiores. El plomo procede principalmente de las bacterias de carros, vidrios, plásticos, cerámica etc. Las fuentes de cadmio y mercurio son fundamentalmente las pilas, el cadmio también se encuentra en los aparatos electrónicos (García 2003)

2.2 TRATAMIENTO DE LO LIXIVIADOS

Los diferentes tipos de tratamientos de lixiviados de los rellenos sanitarios varían en cada uno de los países y aun dentro de cada país dependiendo del tipo de desecho depositado (municipal y/o industrial) y en la edad del relleno. (Contoras 1995). Una de las soluciones provisionales adoptadas en los vertederos es el envío de los lixiviados a plantas de tratamientos de aguas residuales, lo que plantea varios inconvenientes: con frecuencia las características de los lixiviados sobrepasan las posibilidades de tratamiento de las plantas; por otros lados en determinadas épocas las plantas de tratamiento se encuentran en el límite de capacidad. La solución mas adecuada para el tratamiento de lixiviados es un tratamiento integral, preferentemente en las instalaciones del vertedero, reduciendo la carga del contaminante a los valores que se exigen por la legislación.

2.3 PROPIEDADES DE LOS SUELOS

Según Campell (2001) el suelo es un medio muy complejo compuesto de tres fase principales (sólido, líquido y gas) los cuales se encuentran dispersos en diferentes formas tanto a nivel microscópico como macroscópico, para formar los cientos tipos de suelos dispuestos en el mundo. Los cinco principales factores que participan en la formación de suelo son el material original, el clima, la topografía, la actividad biológica y el tiempo. El suelo contiene unas comunidades microbianas de gran diversidad y por definición soportan el crecimiento de las plantas. Los microorganismos contribuyen de gran manera a la fertilidad del suelo, es decir a su capacidad de sostener el crecimiento vegetal. (Meeting 1993)

2.3.1 Propiedades Físicas: Las principales propiedades físicas del suelo son el color, la textura, la estructura y las relacionadas con la capacidad de retención de agua en el suelo (Brissio 2005)

2.3.2 Color: Esta propiedad permite deducir rasgos importantes en el suelo: un color oscuro o negro indica contenido alto en materia orgánica, color blanuzco presencia de carbonatos y/o yesos, colores grises/verdes/azulados hidromorfía permanente. El color se caracteriza por tres parámetros que son (matriz, brillo, intensidad)

2.3.3 Textura: El suelo está constituido por partículas de diferente tamaño. Definimos textura del suelo como la pueden agruparse en unas pocas clases de tamaño de partículas o clases textuales (fuentes 2003). La determinación del contenido de las arenas se hace mediante tamices de diferentes tamaños. La del limo y arcilla mediante el método de la pipeta de Robinsón que se basa en la velocidad de sedimentación de estas partículas. En general se puede decir que los suelos arenosos tienen buena aireación, son fáciles de labrar, son deficientes en nutrientes para las plantas, con baja retención de agua ya que se desecan con facilidad y son muy permeables. En los suelos limosos se producen efectos de impermeabilidad y mala aireación, carecen de propiedades coloidales y no tienen apenas la posibilidad de formar agregados. Los suelos arcillosos son ricos en nutrientes, pero si hay un exceso de arcilla (>30%) son impermeables, las labores agrícolas son difíciles debido a

su fuerte plasticidad en estado húmedo o a una excesiva compactación en estado seco. Los suelos con textura franca (equilibrada) es la ideal para el cultivo, aunque hay que tener en cuenta otros factores como el contenido en materia orgánica, régimen de humedad del suelo, clima, etc. (Unigarro et.al 2005)

2.3.1.3 Estructura: Las partículas no se suelen presentar en el suelo de un modo totalmente independiente, sino que se encuentran más o menos ligadas unas a otras, constituyendo los agregados. Así, la estructura de un suelo se puede definir como el modo de agregación o unión de los constituyentes del suelo (Callejas 2003, Navarro 2005)

2.3.2 Propiedades físico-químicas

2.3.2.1 Cambio Iónico: Se define el cambio iónico como los procesos reversibles por los cuales las partículas sólidas del suelo, adsorben iones de la fase líquida liberando al mismo tiempo otros iones en cantidades equivalentes, estableciéndose el equilibrio entre ambos. Es un proceso dinámico que se desarrolla en la superficie de las partículas. Como los iones adsorbidos quedan en posición asimilable constituyen la reserva de nutrientes para las plantas. Las causas que originan el intercambio iónico son los desequilibrios eléctricos de las partículas del suelo. (Jaramillo 2002)

2.3.2.2 pH: La acidez del suelo mide la concentración en hidrogeniones (H^+). En los suelos los hidrogeniones están en la solución, pero también existen en el complejo de cambio. Así hay dos tipos de acidez: una la activa o real (debida a los H^+ en solución) y otra de cambio o de reserva (para los H^+ adsorbidos). Ambas están en equilibrio dinámico. Si se eliminan H^+ de la solución se liberan otros tantos H^+ adsorbidos. Como consecuencia el suelo muestra una fuerte resistencia a cualquier modificación de su pH. Los factores que hacen que el suelo tenga un determinado valor de pH son diversos, fundamentalmente: naturaleza del material original, factor biótico, precipitaciones, complejo adsorbente (saturado en cationes ácidos o básicos).

2.3.1 Propiedades químicas: Corresponden fundamentalmente a los contenidos de diferentes sustancias importantes como macronutrientes (N, P, Ca, K, Mg, S) y micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, B, Mo, Cl) para las plantas, o por dotar al suelo de determinadas características (Carbono orgánico, Carbonato cálcico, Fe en diferentes estados).

2.3 COMUNIDADES MICROBIANAS EN EL SUELO.

Según Dendooven el suelo es una estructura dinámica y compleja cuyas características; atmósfera interna, régimen hídrico particular, fauna y flora determinadas y elementos minerales van cambiando desde sus inicios hasta adquirir un equilibrio con el entorno.

Este sistema complejo que constituye el suelo, característicamente heterogéneo espacial y temporalmente, alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas. El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). También encontramos virus y bacteriófagos. Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas y también contribuyen a las características propias del suelo por su papel en la modificación de las fases sólida, líquida y gaseosa antes mencionadas. Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el azufre, el fósforo, el hierro y otros metales; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos, etc. (Grant 1999)

Los organismos del suelo no se distribuyen al azar sino que siguen patrones espaciales de agregación, a escalas diferentes (desde nm a Km.) que se superponen. Esta estructuración obedece al efecto causado por diferentes factores de control y es totalmente dinámica (Ettema 2002). Utilizando técnicas de observación de secciones ultrafinas de suelo mediante microscopía electrónica, tomografía, análisis geoestadístico y la elaboración de modelos, especialmente basados en fractales, se ha demostrado que la distribución de las bacterias edáficas está altamente estructurada, y que esta estructuración es importante para la funcionalidad del suelo. Las bacterias se organizan en microcolonias compuestas de pocas células que pueden pertenecer a diferentes morfotipos (Nunan, et.al 2003). Factores como la presencia de raíces, pequeños agregados, nutrientes y poros parecen gobernar la distribución de bacterias en microhábitats (Nogales 2004)

2.4.1 Bacterias predominantes en la actividad microbiana del suelo: De todos los microorganismos del suelo, las bacterias son las que se encuentran en las más grandes poblaciones y son tal vez las más diversas en cuanto al número de especies y su comportamiento. Durante el crecimiento poblacional de las bacterias, una diversidad de ellas puede tener disponible una elevada cantidad de carbono, por su alta actividad de alimentación. (Atlas et al 2002)

En el suelo se desarrollan muchos géneros de bacterias (Alexander 1997). En los suelos predominan mas las bacterias Gram. negativas. Entre los géneros mas frecuentes de bacterias se encuentran: *Acitenobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arbrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulonomas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Mycrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Xantomonas*. Hay amplias diferencias en las proporciones relativas de géneros individuales encontrados en determinados suelos.

2.4.2 Factores ambientales bióticos y abióticos que influyen en la abundancia de organismos del suelo: Todos los organismos están expuestos a factores físicos y químicos del ambiente que influyen positivamente o negativamente en su crecimiento estas influencias pueden ser de dos tipos biótica o abióticas, se habla de bióticas cuando se refiere a las relaciones que se presenta en una población, ya que los individuos tanto si pertenecen a la misma especie como a especies diferentes, ejercen entre si una serie de influencias, precisamente por que no viven aislados en su entorno físico. Los aspectos abióticos se refieren a las características ambientales mínimas que necesitan los organismos para vivir, a la capacidad que tiene un organismo para adaptarse a las variaciones ambientales o al potencial que tienen los mismos para colonizar medios distintos (Atlas et al 2002)

2.4.2.1 Factores abióticos: En estos tenemos básicamente tres grupos; factores climáticos, factores hidrográficos y factores edáficos (Martin 1998)

2.4.2.1.1 Factores Climáticos: Son los condicionantes climáticos de un organismo para desarrollar su actividad, entre lo que encontramos la temperatura, la luz, agua, viento, pH y altitud.

2.4.2.1.2 Factores Hidrográficos: Son las condiciones de una organismo que tiene su origen en las características fisicoquímicas del agua y/o suelo.

2.4.2.1.3 Factores Edáficos: Son los condicionantes de un organismo que tienen su origen en las características fisicoquímicas del sustrato, como la estructura física (profundidad, inclinación, granulometría, estratos de suelo) y la composición química (agua, gases, sustancias orgánicas y sales minerales) entre las cuales tienen mayor importancia los estratos del suelo, la disponibilidad de nutrientes y materia orgánica.

2.4.2.2 Factores bióticos :Los individuos presentes en un ecosistema natural no son seres aislados que solamente deben de relacionarse con los factores inertes que se encuentran a su alrededor sino que estos por vivir en comunidad son influenciados por tanto si pertenece a la misma especie como a especies diferentes, presentando diferentes formas de interacciones que limitan en cierto sentido al potencial biológico que llevan consigo (Bull 1982) A estas influencias cuando se refiere a una población se le denomina factores intraespecificos, y cuando no lo son entre poblaciones se los conoce como factores interespecificos, algunas de estas relaciones se describan a continuación .

2.4.2.2.1 Competencia: La actividad de los microorganismos, durante una sucesión del sustrato hace que incremente la diversidad ambiental. Pero el sustrato y la diversidad de especies disminuyen a medida que son usados los nutrientes fácilmente utilizables y al

bajar el pH debido a la inmovilización de cationes, la población cambia lentamente a ascomicetos. (Bull 1982)

2.4.2.2.2 Predación: Los predadores microbianos son esencialmente necrótrofos, estos organismos han desarrollado modificaciones estructurales o de conducta para capturar o mejorar el contacto con sus fuentes vivas de nutrientes, los miembros del género *Bdellovibrio* constituyen el único ejemplo de bacterias que invaden otros procariotas aunque originalmente eran considerados predadores *bdellovibrio spp.* Encajan más entre las denominaciones de parásito a intramurales.

2.4.3 Factores que limitan el crecimiento bacteriano: El carbono es asumido como el factor limitante en el crecimiento microbiano del suelo aunque el nitrógeno y el fósforo también se han reportado como factores limitantes de algunos suelos. Es por lo tanto probable que diversas sustancias estén limitadas en diferentes suelos y que los factores podrían cambiar la limitación en un cierto plazo. Puede haber también una diferencia entre los factores que limitaban la actividad bacteriana y fúngica en el mismo suelo. (Smith et al 2001; Duah-Yentumi 1998; Atlas et al 1997)

2.5 BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

2.5.1 Generalidades: Los polihidroxicanoatos (PHA) son sintetizados por muchas especies de distintos géneros bacterianos en condiciones de crecimiento caracterizadas por exceso en la fuente carbonada y limitación de otros nutrientes como nitrógeno o fósforo. Estos polímeros se acumulan en gránulos intracitoplasmáticos y son utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez nutricional. (De Almeida et al 2004)

Según Ojumu, T.V et al (2003) & Steinbüchel (1991) en *Ralstonia eutropha* las células acumulan PHA cuando un nutriente esencial, tal como nitrógeno o fósforo, se encuentra limitado en su ambiente, mientras que al mismo tiempo hay un exceso de carbono. Los PHAs son polímeros biodegradables, que poseen características físicas similares a las exhibidas por poliésteres y cauchos sintéticos. Puesto que los organismos productores de PHAs son de origen biológico, estos también son capaces de utilizar el dióxido de carbono por lo que se los encuentra en una amplia gama de ambientes, tales como suelo, agua, y aguas residuales. Por otra parte, PHAs se pueden sintetizar de las fuentes renovables del carbono derivadas de basuras agrícolas o industriales. Según Doi Y et al (1992) La mayoría de PHAs son compuestos de R (-) -3-monómeros ácidos hidroxicanoicos de 3 a 14 átomos de carbonos con la variedad de saturado o insaturado de estructura recta o ramificadas la cadena alifática puede contener grupos aromáticos.

Según Byron (1994) citado por Ojumu et al (2003) El peso molecular de los polímeros está en el rango de 2×10^5 a 3×10^6 daltons basado en el tipo de microorganismo y condición de crecimiento. PHAs son acumulados en las células como los gránulos discretos, el tamaño y número por la célula varía dependiendo de las especies diferentes. Según Byron (1994), aproximadamente 8 a 13 gránulos por célula que tiene el diámetro el rango de 0.2 a 0.5 μm se observó en *Alcaligenes eutrophus*

2.5.2 Síntesis de polihidroxicanoatos: Según Steinbüchel pueden distinguirse tres fases metabólicas de la biosíntesis de PHA's en bacterias. Primero debe haber en el medio de cultivo una fuente de carbono apropiada. Esto se logra en cualquier caso, por un sistema de transporte específico localizado en la membrana citoplasmática, o por difusión del compuesto dentro de la célula. Segundo las reacciones anabólicas o catabólicas son la que convierten el compuesto interiorizado en un tioéster de hidroxiacil coenzima A, el cual es un sustrato de la enzima PHA sintetasa. Tercero la PHA-sintetasa, la cual es enzima clave para la síntesis de PHA, usa estos tioésteres como sustratos y cataliza la formación de enlaces ester con la consecuencia y liberación de coenzima A.

2.5.2.1 Síntesis de Polihidroxiacetato (PHA): Se ha caracterizado varias vías de producción de PHB, en varios grupos microbianos. La vía más común es la condensación de dos moléculas de Acetil-CoA a acetoacetil-CoA. La reducción secuencial y las relaciones de polimerización producen PHB. Estos productos pueden ser despolimerizados y finalmente se vuelven a convertir en Acetil-coA. De la misma manera que el ciclo de los ácidos tricarbónicos, el flujo de carbono a través de esta vía está influenciado por las condiciones de crecimiento y los dos ciclos pueden competir por un metabolito inicial común a Acetil-CoA, sin embargo la función del PHB, en el metabolismo celular en especies de *Rhizobium* no ha sido definida (Valentín et al 1995)

2.5.3 Rutas biosintéticas de los polihidroxicanoatos.

2.5.3.1 Ruta biosintética de *Ralstonia eutrophus*: Dos moléculas de acetil-CoA son condensadas por una β -cetiolasas. Luego una acetoacetil-CoA reductasa NADPH dependiente cataliza la reducción estereoselectiva de la molécula de acetoacetil-CoA formada en el paso anterior a D 3-Hidroxiacetil-CoA. En la última reacción de esta vía, una PHB sintetasa une este producto a una molécula polimérica ya existente, mediante un enlace ester (Schubert y Cols 1988)

2.5.3.2 Ruta biosintética de *Pseudomonas oleovorans*: Esta ruta se encuentra en la mayoría de las *Pseudomonas* pertenecientes al grupo 1 de homología de RNA ribosomal (RNAr). Estas bacterias acumulan PHA compuesto por ácido 3-hidroxicanoico de cadena media si son cultivadas en alcanos, alcoholes o ácidos alcanóicos. Por ejemplo durante el cultivo en octano o ácido octanoico, se acumula un poliéster que contiene 3-Hidroxiacetato como principal constituyente (alrededor del 90 mol %). (Timm et al 1990)

2.5.3.3 Ruta biosintética de *Rhodospirillum rubrum*: Las modificaciones de esta ruta consisten en que la molécula de acetoacetil-CoA formada por la β -cetiolasas, es reducida por la reductasa ADH- dependiente a L(+)-3-hidroxiacetil-CoA, el cual es convertido a D(-)-3-Hidroxiacetil-CoA por dos enoi-CoA hidratasa (con una molécula de coronil-CoA como intermediaria). La quinta reacción de la vía, de la polimerización, es catalizada por la PHA sintetasa. (Moscowitz et al 1989)

2.5.3.4 Ruta biosintetica de *Pseudomonas aeruginosa*: La mayoría de la *Pseudomonas* que pertenecen al grupo 1 de RNAr, poseen esta vía para la síntesis de copoliésteres compuestos por ácido 3-hidroxiácido de cadena media a partir de acetyl-CoA, *Pseudomonas oleovorans* carece de la misma. El principal constituyente del poliéster es hidroxidecanoato. (Anderson et al 1990)

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluó el efecto del lixiviado del relleno Sanitario Antanas (RSA) sobre la diversidad de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos, para lo cual se utilizó un diseño de bloques al azar con tres replicas por cada tratamiento.

Al primer tratamiento se le realizó la aspersión de lixiviado, lo cual se hizo con una regadera que permitió distribuir de manera uniforme en la el líquido respectivo. El segundo tratamiento fue el tratamiento control en el cual se utilizó suelo sin contaminar. (Ver tabla 1). Estos tratamientos se tuvieron a temperatura ambiente, en camas por triplicado, cada cama de 50cm x 50 cm y una profundidad de 20cm, en las cuales se dispusieron aproximadamente 50kg de suelo. (Fig. 1)

Figura 1: Proceso de aspersión de lixiviado en las camas



Tabla 1. Descripción de los experimentos realizados

Sistema	Tratamiento	Descripción del tratamiento
T1	Aspersión de lixiviado	Suelo al cual durante 105 días se le hizo un riego de 1L lixiviado*.
T2	Tratamiento control	Suelo sin contaminar

* El lixiviado fue tomado de la piscina aerobia del relleno sanitario Anta

3.2 Fase de laboratorio

* El lixiviado fue tomado de la piscina aerobia del relleno sanitario Antanas

3.2.1 Caracterización físico química del suelo: De cada tratamiento se colecto dos muestras por triplicado: una inicial y una al finalizar el proceso de aspersión, las cuales se llevaron al Laboratorio de suelos de la Universidad de Nariño, en donde se determinaron las siguientes variables: pH, Humedad, Materia Orgánica, capacidad de intercambio cationico, densidad aparente, porcentaje de elementos (Fósforo, calcio, nitrógeno potasio, carbono). (Unigarro y Carreño 2005)

3.2.2 Diversidad y abundancia de Bacterias Productoras de PHA's: Para calcular la diversidad de bacterias productoras de PHA's se realizo la siguiente metodología:

3.2.2.1 Aislamiento de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos: Por un periodo de tres meses, cada 15 días se realizaba los muestreos para el aislamiento de bacterias productoras de PHAs. De cada replica por tratamiento se tomaban 10 gr. de suelo y se mezclaban 90 ml de agua destilada estéril, Luego se agitaba vigorosamente la muestra y se obtenía dilución del suelo 1/10 es decir 10^1 , de esta se tomaba 1ml, y se trasfería a otro tubo con 9ml de agua destilada y así sucesivamente hasta llegar dilución de 10^{-7} . De esta ultima dilución se tomaba 0.5 ml y se sembraba por triplicado, en un medio de cultivo selectivo el cual contenía agar plate count, sacarosa, extracto de suelo y azul nilo al 0.1% Las cajas fueron incubadas durante 72 hrs a una temperatura de 27 °C, La observación de crecimiento se realizo a las 24, 48 y 72 hrs respectivamente, las cajas petri se sometieron a radiación ultravioleta y se seleccionaron las colonias que florecieron de rojo-naranja.

Conservación de las cepas: Las cepas se purificaron hasta obtener colonias puras la cual fue verificada de forma macroscópica y microscópica. Para conservar las cepas se elaboraron stocks, para ello se tomaron colonias aisladas de un medio nutritivo y se sembraron en profundidad y en superficie en tubos inclinados que contenían agar nutritivo, estos preservados se usaron como cepas de trabajo y se incubaron durante 20 – 24 horas a 35 - 37°C y se almacenaron a 4°C.

Caracterización Fenotípica: La caracterización fue realizada en dos etapas: La primera consistió en una caracterización preliminar basada en forma, color, borde, elevación, superficie de las colonia, reacción de Gram., formación microscópica y resistencias a antibióticos; en el caso de las bacterias Gram positivas se utilizaron: ampicilina, lincomicina, acido fucínico, cefoxitin, cefaximide, novoviocina, tetraciclina, oxotetraciclina, ciprofloxacín.

Con las características nombradas anteriormente se realizaron análisis de agrupamiento, utilizando el programa (PAST3), el cual nos permitió confirmar si un morfotipo era similar a una ya descrito antes.La segunda etapa consistió, en la caracterización bioquímica de los aislados mediante el sistema API 50CH/B (Biomeriux)

3.2.3 Para estimar la producción de polímero en los morfotipos aislado se utilizo la siguiente metodología:

Se estimó la producción de PHA's de 30 morfotipos obtenidos anteriormente, los cuales fueron activados de los stocks ya conservados.

- Cultivo de Microorganismos

Para cada cepa se utilizaron 3 frascos de 250 ml, cada uno con 190 ml que contenían un medio fermentativo compuesto por sacarosa, peptona y extracto de levadura (ver anexo), y 10 ml del inoculo (representando el 5% del inoculo) hasta llegar a un volumen de 200 ml. El preinoculo se cultivo por 24 hrs a una temperatura de 37 C en el medio fermentativo, al cado de este tiempo se cuadraron los inoculos a una absorbancia de 0.05.

- Extracción de Polímero

A las 24 hrs se realizo el proceso de digestión el cual consistió en centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos en tubos todo el medio de cultivo y se desecho el sobrenadante, el pellet obtenido, se lavo y se centrifugo dos veces con dos mililitros de agua destilada en las mismas condiciones descritas anteriormente (desechando siempre el sobrenadante), El contenido se paso a un tubo eppendorf con tapa y se le agrego 2ml de hipoclorito, se tapo el tubo y se llevo a baño maría a 50°C durante 30 minutos, luego se realizaron 2 lavados con agua destilada y se centrifugara a 13000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se agrego 1 ml de metanol absoluto frio y se centrifugo a 13000 rpm durante 5 minutos, finalmente se desecho el sobrenadante, el pellet se lavo dos veces con agua destilada y el sólido obtenido se llevo a secar a una temperatura de 60°C durante 24 hrs y por el método de gravimetría. Se obtuvo el peso total del polímero obtenido.

- Caracterización del polímero

La cepa que presento mayor producción de PHA's, se caracterizo el tipo de polímero mediante la técnica de cromatografía de gases.

3.3 Análisis de resultados

Ho: La diversidad de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos no varía, cuando es asperjada con los lixiviados del relleno sanitario de Antanas.

Ha: La diversidad de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos varia, cuando es asperjada con los lixiviados del relleno sanitario de Antanas.

- Análisis para bacterias productoras de polihidroxicanoatos

Las bacterias aisladas en los tratamientos fueron analizadas y comparadas por medio de la prueba de análisis y varianza, y se obtuvieron los siguientes índices: riqueza, diversidad y abundancia

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Caracterización físico química del suelo.

En la Tabla 2 se muestra, la caracterización físico química de los suelos utilizados en esta investigación. Las mediciones de los parámetros físico-químicos se realizaron en dos tiempos: antes de la aspersión del lixiviado en el suelo, y después de 140 días de aspersión diaria de lixiviado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ver anexo 1) en cuanto a los valores de pH, esto puede deberse al poder buffer que tiene el suelo el cual le permite resistirse a los cambio de pH ya que el lixiviado posee un pH básico el cual no afecto el pH del suelo (INTA 2006) .

Tabla 2. Características físico químicas de los suelos antes de la aspersión de lixiviado y después de 140 días de aspersión diaria de lixiviados del relleno sanitario Antanas.

Parámetro	Experimento de Aspersión de lixiviado en suelos.			
	Antes de la aspersión de lixiviado		Después de 120 días de aspersión de lixiviado	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
Ph	5	0.081	5.53	0.40
Materia organica	8.2	0.78	9.83	1.5
Densidad aparente	0.825	0.21	0.83	0.05
Fósforo disponible	7.6	0.88	29.03	7.71
Capacidad de intercambio cationico	22.5	1.43	38	0.8
Calcio de cambio	5.72	0.72	16.46	3.04
Magnesio de cambio	0.94	0.174	2.79	0.72
Potasio de cambio	0.76	0.13	5.46	3.18
Acidez de cambio	0.15	0.05	0.2	0.15
Textura	Arcilloso		Arcilloso-Arenoso	
Nitrógeno total	0.52	0.29	0.38	0.070
Carbono organic	6.24	2.86	5.51	1.18

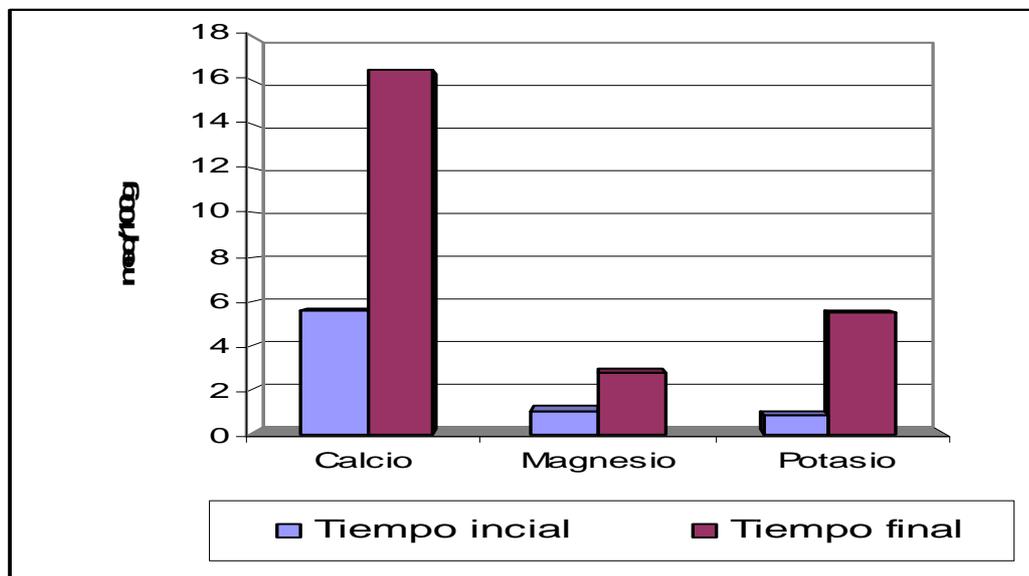
Al analizar la cantidad de fósforo en el suelo se encuentran diferencias en los valores de este antes y después de la aspersión del lixiviado en el suelo, con valores promedios de 7.6 y 29.03 respectivamente, con un ($P < 0.05$). (ver anexo 2). Estas diferencias pueden deberse a que los lixiviados contienen aproximadamente 27.74 mg/L de fósforo, el cual se acumuló

en el suelo durante el tiempo de aspersión del lixiviado, teniendo en cuenta que no todos los microorganismos tienen la capacidad de degradar el fósforo (Novelo 2001). La mayor parte del fósforo es transformado de fosfato inorgánico a orgánico o de forma insoluble a soluble (Atlas & Bartha 2002).

Los valores de capacidad de intercambio catiónico también presentaron diferencias significativas (ver anexo 3) estas diferencias pueden explicarse teniendo en cuenta que la CIC es la capacidad de absorción de cationes por parte del suelo, y estos cationes intercambiables proceden de la meteorización del material originario de la mineralización de la materia orgánica y aportes externos superficiales y subterráneo (Porta. Et.al 2005). Este aporte pudo llegar del lixiviado, lo cual se relaciona con el aumento de los cationes potasio, calcio y magnesio, al encontrarse con mayor disponibilidad en el suelo, los cuales fueron absorbidos más fácilmente por lo cual los valores de CIC aumentaron significativamente.

Los datos obtenidos para las bases intercambiables (calcio, magnesio, potasio), muestran diferencias estadísticamente significativas en los valores antes y después de la aspersión de lixiviado (Fig. 2)

Figura2: Valores de bases intercambiables, al inicio y al final del experimento de aspersión de lixiviado

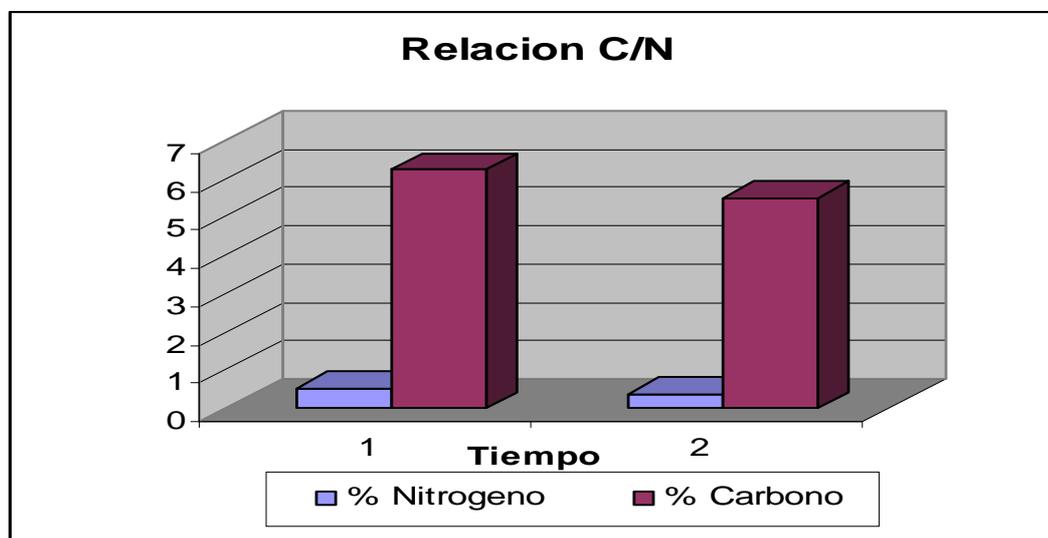


Según Méndez (2002), los lixiviados poseen cantidades de altas de potasio, calcio y magnesio los valores se encuentran entre (1100, 1200, 470) mg/L respectivamente.

En la grafica anterior observamos que los valores de calcio son superiores a los de magnesio y potasio. Burbano (2004) menciona que los contenidos de potasio son superiores

a los de Calcio y Magnesio en la mayoría de suelos de clima frío y templado y sus valores disminuyen en suelo tropicales y de clima cálido debido al alto grado de meteorización de la materia orgánica, no obstante sus fracciones intercambiables y solución son bajas ya que estos elementos es relativamente inmóvil ya que en suelo junto con el magnesio son elementos que se lixivian rápidamente. En cuanto a los valores de nitrógeno y carbono en el suelo no se presentaron diferencias significativas. Pero los valores promedios disminuyeron (ver Fig. 3) antes de la aspersión de lixiviado y después de la aspersión de lixiviado. Estos factores son de suma importancia ya que son utilizados por los microorganismos para su desarrollo, degradando, por consiguiente, el sustrato orgánico sobre el cual se desarrollan, lo cual puede estar relacionado con la disminución de estos valores. Según Alexander (1980), la mineralización de la materia orgánica produce cambios en la relación C/N, a lo largo del tiempo hasta que se llega a un valor de estado estacionario. Aunque es ampliamente conocido que el carbono y el nitrógeno son elementos fundamentales para el crecimiento de la microbiota del suelo, no es prudente atribuir el incremento de bacterias productoras de PHAs al efecto de estos parámetros. El efecto positivo del carbono y el nitrógeno sobre la presencia de bacterias productoras de PHAs se evidencia cuando además de las concentraciones elevadas, se genera una alta relación entre el carbono y el nitrógeno. (Fernández 2007)

Figura.3 Relación C/N al inicio y al final de el experimento de aspersión de lixiviado

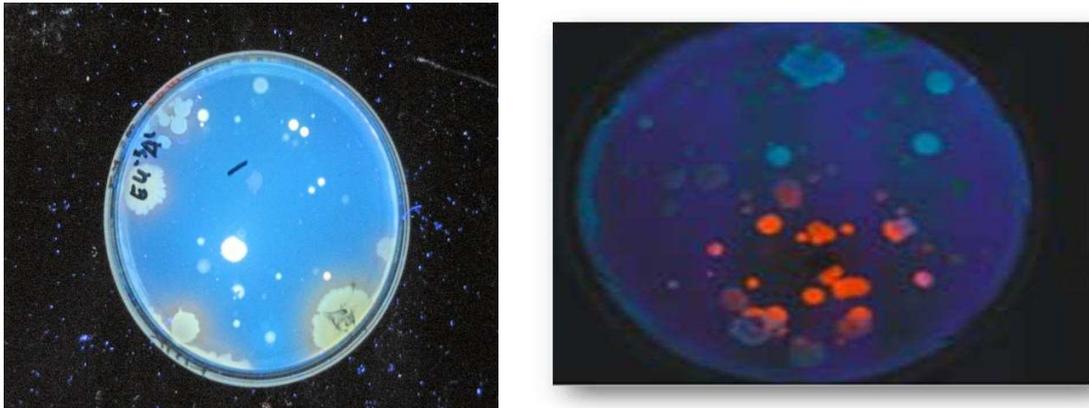


4.2 Diversidad y abundancia de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHA)

Se aislaron en total 29 morfotipos productores de PHAs en suelos asperjado con lixiviados del relleno Sanitario Antanas y 9 en el tratamiento control el cual no fue expuesto a ningún contaminante. Los morfotipos aislados dieron positivos a la prueba de azul nilo y estos fueron seleccionada ya que emitían fluorescencia de color rosado de diferentes

intensidades cuando fueron irradiadas con luz UV a 365 nm. Esto es debido a que el azul nilo es absorbido y acumulado en los gránulos de PHA, confiriéndole fluorescencia a la célula. (Carballo et.al 2003) (Fernández 2006)

Figura 4-5 Fluorecencia de los morfotipos seleccionados



Los morfotipos seleccionados fueron purificados en agar nutritivo hasta obtener colonias puras y aisladas, la verificación de pureza se realizo tinción de Gram. Cuando se constato la pureza de las cepas se describieron de forma macro y microscopica (Ver fig 6-7)

Fig 6-7, De izquierda derecha, forma macroscópica y microscópica del aislado 2MP1



Con estas características y la reacción de antibióticos (ver fig 8-9) se procedió a realizar un cladograma para agrupar las cepas y constatar o descartar que fueran un morfotipo anteriormente descrito

FIG. 8-9. Antibiograma de la cepa 1MP5, utilizando los siguientes antibioticos 1- Ampicilina, 2-Lincomicina, 3-Acido Fucínico, 4-Cefoxitin, 5-Cefaximide, 6-Novoviocina, 7-Tetraciclina, 8-Oxotetraclina, 9-Ciprofloxacina.



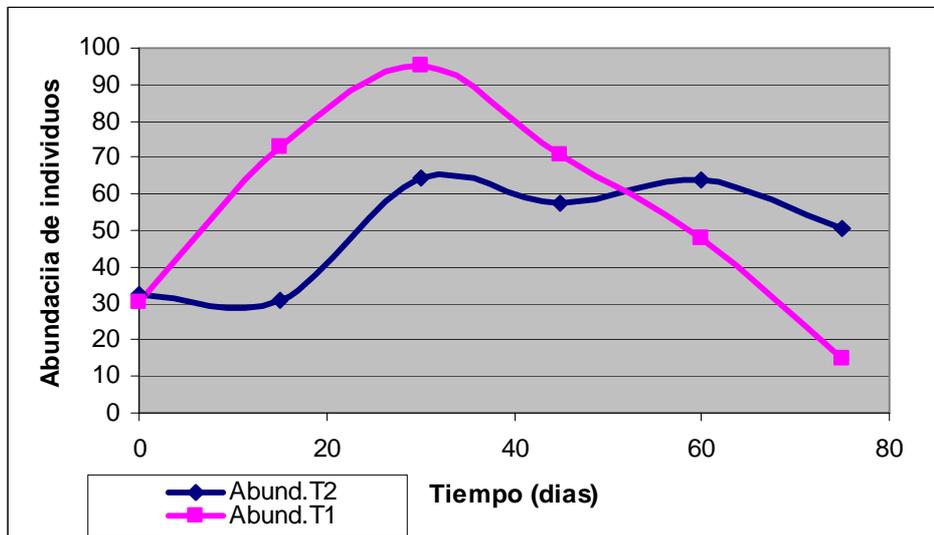
En el antibiograma se observo que la cepa 1MP5 es sensible y forma Alos de inhibición con la ampicilina (35mm), cefoxitin (23mm), Tetraciclina (26mm), Oxotetracilina (22mm), ciprofloxacina (33mm), a los demás antibióticos esta cepa presento resistencia.

Entre los estudios relacionado con el aislamiento de bacterias productoras de PHAs encontramos en suelos encontramos que: Suárez et.al 2004, hicieron aislamiento de bacteria en suelos del departamento de Nariño y Santander, los cuales muestrearon cultivos de caña y obtuvieron un total de 242 aislamientos utilizando, la técnica de rojo nilo y sudan negro. Fernández (2006) colecto 59 aislados bacterianos de 31 muestras se suelo de la región Andina del departamento de Nariño de la cuales 48 resultaron positivas a la prueba del rojo nilo.

Hidalgo y Zambrano aislaron 36 cepas nativas de los suelo del departamento de Nariño las cuales fueron positivas a la prueba del rojo nilo, de estas solo 25 presentaron picos cromatograficos correspondientes al biopolímero, considerando al nilo rojo como una técnica utilizada exclusivamente para el tamizaje cualitativo.

Guerra y Rosero (2008), en su estudio reportan mayor abundancia de bacterias acumuladoras de PHAs en la zona de pastos del 22 colonias aisladas 16 fueron positivas a la prueba de rojo nilo, seguida de la zona de bosque natural secundario de 24 morfotipos aislado el 50% de estas sintetizan PHAs, por último se encuentra la zona de pino de los cuales 10 de los 23 morfotipos aislados dieron positivos a la prueba de rojo nilo. En la siguiente grafica observamos el efecto que tiene el lixiviado sobre la abundancia de bacterias productoras de PHAs.

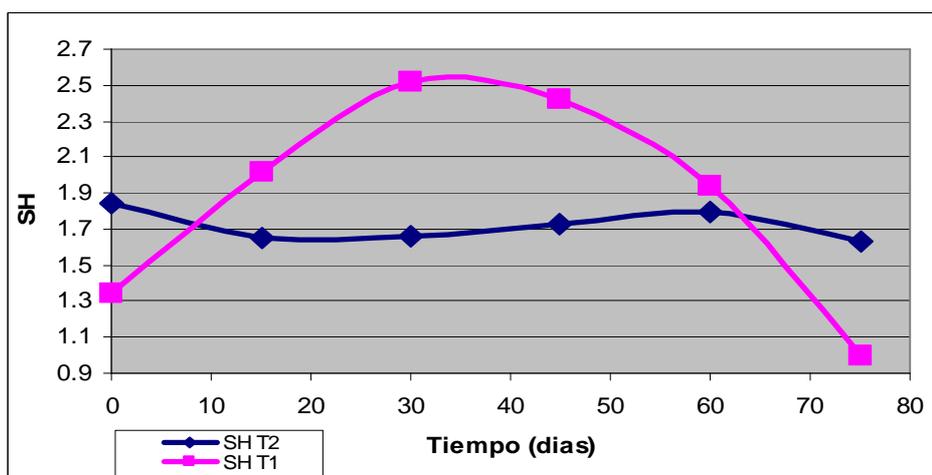
Fig. 10. Abundancia de bacterias productoras de polihidroxicanoatos en el experimento de aspersión de lixiviado y en el tratamiento control sin riego de lixiviado



En la anterior grafica podemos observar que la abundancia de bacterias productoras de PHAs al inicio de los tratamiento es igual para los dos tratamientos, en el tratamiento 1 se observa que la mayor abundancia se da aproximadamente a los 30 días de aspersión al cabo de este tiempo la abundancia empieza a descender. Según Fernández (2006), plantea que las propiedades del suelo influyen sobre el metabolismo bacteriano lo cual se ve reflejado en la abundancia de las poblaciones microbianas. Teniendo en cuenta que las propiedades físico químicas en el T1 fueron alteradas por la aspersión del lixiviado podría pensarse que este tiene un efecto sobre la abundancia de las bacterias productoras de PHAs. El tratamiento 2 se observan leves cambios en la abundancia de bacterias productoras de PHAs los cuales se estabilizan aproximadamente a los 25 días, en este caso no se dan cambios significativos ya que no hay condiciones adversas y tampoco se reportan cambios significativos en la estructura del suelo. Según los datos obtenidos en el Tratamiento 2; el fósforo aumento en más del 100% de los valores iniciales, Lee (2000) plantea que los genes involucrados en la biosíntesis de PHB en *Acinetobacter sp* se activan transcripcionalmente bajo limitaciones de fósforo o que bajo estas condiciones *Pseudomonas putida* convierte todo el carbono extracelular en materiales de reserva, respectivamente. Se puede decir que esta cepa al igual que otras bacterias productoras de PHB, el fósforo tiene una marcada influencia sobre la producción del polímero. Uno de los parámetros que inciden sobre la abundancia de bacterias productoras de PHAs es la capacidad de intercambio catiónico. Esta propiedad asegura un aporte adecuado de cationes como potasio, magnesio y calcio los cuales son utilizados por los microorganismos para los diferentes procesos metabólicos, en este trabajo se observaron aumentos significativos en estos parámetros, al encontrarse en grandes cantidades tienen efectos negativos los cuales pudieron haber inhibido el crecimiento celular bacteriano (Peña 1999)

Las comunidades biológicas suelen contener pocas especies con muchos individuos y numerosas especies con pocos individuos. Aunque normalmente el flujo de energía depende de unas pocas especies dominantes, las especies menos dominantes pueden determinar en gran parte la diversidad específica del nivel trófico correspondiente y de toda la comunidad. (Atlas & Bartha 2002; Huaiying et. al 2006; Bathnagar et.al 2007)

Fig. 11. Diversidad de bacterias productoras de polihidroxicanoatos experimento de aspersión de lixiviado y en el tratamiento control sin riego de lixiviado



En la anterior grafica observamos que los valores de diversidad se encuentran entre 0,9 y 2,5, el valor más alto de diversidad se da aproximadamente a los 30 días de las aspersión de lixiviado, estos valores concuerdan con el punto donde se presento mayor abundancia de bacterias, autores señalan que hay una relación directa entre la diversidad y abundancia de especies. Generalmente la diversidad disminuye cuando una o unas pocas poblaciones alcanzan densidades altas; los números elevados indican que una población individual ha superado con éxito la competencia y ha logrado dominar en la comunidad.

Uno de los factores que limitan la diversidad es la competencia entre poblaciones la cual se puede dar por la colonización de nichos a partir de microorganismos aloctonos que entran a competir y pueden desplazar a las bacterias autóctonas, en este caso las bacterias que llegaron de los lixiviados pudieron haber desplazado a la que se encontraban en el suelo y genero una competencia por los nutrientes que se encontraban en este hábitat. Otra de las causa puede ser que lo microorganismos no se adaptaron a estas nuevas condiciones. (Atlas Y Bartha 2002). Según Huaiying et.al (2006) plantea que una diversa comunidad microbiana del suelo es una medida importante de la utilización sostenible de la tierra, en el tratamiento 1 el suelo sufrió una degradación por efecto del lixiviado, lo cual puede haber originado la disminución de la diversidad.

En la tabla tres se observa la abundancia de cada morfotipo en los días de muestreos, igualmente se evidencia el remplazamiento de estos por efecto de la aspersión del lixiviado.

Se observa que el único morfotipo que prevaleció a través de los días del experimento fue el SM2.

Tabla 3. Abundancia de Morfotipos a través del tiempo de aspersión de lixiviado

CEPA	TIEMPO (DIAS)						
	0	15	30	45	60	75	90
SM1	48	33	35	0	0	0	0
SM2	4	20	28	15	5	2	0
SM3	8	0	0	0	0	0	0
SM4	2	13	0	0	0	0	0
SM5	17	26	28	7	0	0	0
SM6	7	4	8	0	0	0	0
SM7	5	8	9	0	0	0	0
1MP1	0	16	20	12	28	0	0
1MP2	0	11	0	0	0	0	0
1MP3	0	17	24	8	12	0	0
1MP4	0	5	6	0	0	0	0
1MP5	0	2	0	0	0	0	0
1MP6	0	28	24	0	0	0	0
1MP7	0	36	30	12	16	0	0
2MP1	0	0	14	20	28	4	0
2MP2	0	0	8	4	0	0	0
2MP3-	0	0	9	7	0	2	0
2MP4	0	0	6	0	0	0	0
2MP5	0	0	18	0	0	0	0
2MP6	0	0	4	0	0	0	0
2MP7	0	0	14	9	10	0	0
3MP1	0	0	0	19	8	0	0
3MP2	0	0	0	33	12	6	0
3MP3	0	0	0	4	0	0	0
3MP4	0	0	0	11	6	0	0
3MP5	0	0	0	25	0	15	0
3MP6	0	0	0	2	0	9	0
3MP7	0	0	0	7	5	0	0
3MP8	0	0	0	17	6	0	0
4MP1	0	0	0	0	8	4	0

Los datos obtenidos del perfil bioquímica aplicando el sistema API 50CHB, indica que la cepa SM2 corresponde a la especie *Bacillus subtilis*, una de las causas para que *B.subtilis* haya prevalecido a través del experimento de aspersión es que este tipo microorganismos es capaz de tolera condiciones adversas ya que este forma esporas y cuando las condiciones vuelven a ser favorables germinan como una semillas. (Brock 2004) De los 29 morfotipos

aislados para el tratamiento 1 (aspersión de lixiviado) el 76,87% son bacterias Gram + y un 27,13% pertenecen al grupo de las Gram -.

Tabla 4. Caracterización de los morfotipos aislados en suelos aspejados con lixiviados.

CEPA	Morfología de la colonia	Morfología celular	Agregación	Tinción de Gram	Api 50 CHB
SM1	Circular, blanca	Bacilo	Empalizada	-	
SM2	Irregular, blanca	Bacilo	empalizada	+	<i>Bacillus subtilis</i>
SM3	Circular, crema	Coco	Solos	+	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>
SM4	Circular, crema	Bacilo	Solos	+	<i>Bacillus subtilis</i>
SM5	Extension,crema	Bacilo	Empalizada	+	<i>Bacillus pumilus</i>
SM6	Circular, crema	Bacilo	Empalizada	-	
SM7	Circular, blanca	Bacilo	Empalizada	+	<i>Bacillus sp.</i>
1MP1	Circular, crema	Bacilo	Cadena	+	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>
1MP2	Ramificada,blanc	Bacilos	Solos	+	<i>Bacillus micoydes</i>
1MP3	Irregular, crema	Coco-bacilos	Empalizada	-	
1MP4	Circular, blanca	Bacilos	Empalizada	+	<i>Bacillus subtilis</i>
1MP5	Extensión	Bacilo	Empalizada	+	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
1MP6	Irregular	Bacilos	Solos		<i>Brevibacillus sp</i>
1MP7	Irregular, blanca	Bacilos	Empalizada	+	<i>Bacillus subtilis</i>
2MP1	Circular, blanca	Bacilos	Empalizada	+	
2MP2	Irregular, blanca	Bacilos	Empalizada	+	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>
2MP3	Extensión,crema	Bacilos	Empalizada	+	<i>Bacillus lentus</i>
2MP4	Irregular, crema	Bacilos	Empalizada	+	<i>Bacillus pumilus</i>
2MP5		Coco bacilo	Empalizada	-	
2MP6	Circular, blanca	Bacilos	Cortos	-	
2MP7	Irregular, crema	Bacilos	Solos	-	
3MP1	Irregular-crema	Bacilos	Solos	+	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>
3MP2	Circular, blanca	Bacilos	Empalizada	+	<i>Bacillus pumilis</i>
3MP3	Puntiforme,liso	Cocos	Solos	-	
3MP4	Circular, blanca	Bacilos	Parejas	+	
3MP5	Irregular, crema	Bacilos	Solos	+	
3MP6	Circular, crema	Bacilos	Empalizada	+	
3MP7	Irregular, blanca	Bacilos	Empalizada	+	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>
3MP8	Circular, blanca	Bacilos	Cadena	+	<i>Bacillus firmus</i>

En la tabla 5 observamos la abundancia total y relativa por cada morfotipo, el morfotipo mas abundante corresponde al aislamiento SM1 con una abundancia relativa del 11,64%, este prevaleció hasta el día 30 del experimento de aspersión de lixiviado, según sus características pertenece al grupo de la Gram -. Según Alexander en 1980 las bacterias Gram - son más abundantes en los suelos que las bacterias Gram +

Tabla 5. Abundancia total y relativa de morfotipos aislados de suelos asperjados con lixiviados

CEPA	Abundancia total	Abundancia Relativa
SM1	116	11.64
SM2	74	7.42
SM3	8	0.80
SM4	15	1.5
SM5	78	7.83
SM6	19	1.9
SM7	22	2.2
1MP1	76	7.63
1MP2	11	1.1
1MP3	61	6.12
1MP4	11	1.1
1MP5	2	0.2
1MP6	52	5.22
1MP7	94	9.43
2MP1	66	6.62
2MP2	12	1.2
2MP3	21	2.1
2MP4	6	0.6
2MP5	18	1.8
2MP6	4	0.4
2MP7	33	3.31
3MP1	27	2.71
3MP2	51	5.12
3MP3	4	0.4
3MP4	17	1.7
3MP5	40	4.01
3MP6	11	1.1
3MP7	12	1.2
3MP8	23	2.3
4MP1	12	1.2

Con los anteriores resultados puede evidenciarse el efecto del lixiviado del relleno sanitario Antanas sobre la diversidad y abundancia de bacterias productoras de PHAs ya la no hubo estabilidad de la comunidad a lo largo del experimento de aspersión, hasta llegar a un punto donde el lixiviado inhibió el crecimiento de bacterias

4.3 Estimación de la producción de Polihidroxialcanoatos en cepas aislada de suelos asperjados con lixiviados. En la tabla 6 se observan los peso promedios de polímero en las cepas aislada en suelos asperjados con lixiviados

Tabla 6. Estimación de la producción de PHAs en morfotipos aislados de suelos asperjados con lixiviados.

Cepa	Promedio g-l	Desviación estándar
SM1	0,02	0.02
SM2	0,03	0.02
SM3	0.02	0.02
SM4	0.04	0.069
SM5	0.02	0.017
SM6	0.01	0.17
SM7	0.03	0.05
1MP1	0.031	0.033
1MP2	0.012	0.105
1MP3	0.094	0.091
1MP4	0.019	0.016
1MP5	0.148	0.05
1MP6	0.005	0.008
1MP7	0.011	0.019
2MP1	0.094	0.01
2MP2	0.004	0.002
2MP3	0.131	0.153
2MP4	0.005	0.008
2MP5	0.006	0.001
2MP6	0.002	0.003
2MP7	0.094	0.01
3MP1	0.002	0.003
3MP2	0.004	0.0069
3MP3	0.006	0.001
3MP4	0.004	0.0069
3MP5	0.008	0.006
3MP6	0	0
3MP7	0.133	0.068
3MP8	0.005	0.0008
4MP1	0	0

En las cepas 3MP6 y 4MP1, no se pudo cuantificar el polímero, lo que podría deberse a que la cantidad recuperada de este podría encontrarse en niveles trazas inferiores al nivel mínimo detectado por el método de gravimetría o también podría atribuirse a que las cepas no hayan sintetizado biopolímero, por lo cual la detección cualitativa con azul nilo no es una técnica muy apropiada y selectiva para este tipo de determinaciones ya que este colorante puede interactuar y fluorecer con sustancias de propiedades químicas similares a la de los biopolímeros, o puede reaccionar con otro tipo de ácidos grasos.

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza (ANOVA) se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la producción de PHAs por parte de los morfotipos estudiados. Para determinar cuáles de los morfotipos aislados presentan mayor producción de PHAs, se aplicó la prueba de contraste múltiple de rango con un nivel de confianza del 95 %.

Estos resultados indican que no hay una relación entre la producción de polímero y el tiempo de aspersión de lixiviado en el que fueron aislados, igualmente no hay una relación entre el grupo bacteriano al cual pertenecen, a diferencias de lo reportado por Hidalgo & Zambrano (2005) los que encontraron que las bacterias más productoras de biopolímero pertenecen al género *Bacillus* Gram (+), y superan de forma considerable a las concentraciones estimadas para las Gram (-). Chen et al. (1991) reporta que muchas especies de *Bacillus* producen PHAs, y desde entonces el gen de la PHA sintasa ha sido clonado a partir de *B. megaterium*. Es de interés para ver si sobre la base de la secuencia de los primers PHA sintasa podría permitir la identificación de otros productores de PHA de un tipo similar a la presente en *B. megaterium*.

Según Sabbeel et al. (2007) afirma que las bacterias Gram (+) y en especial las pertenecientes al género *Bacillus* y *Streptomyces* poseen un gran potencial industrial y pueden ser muy útiles en la industria de los PHAs.

En esta investigación de total de las cepas aisladas el 65.51% de estas pertenecen al género *Bacillus*. Más de 250 especies bacterianas se ha descrito como acumuladoras de diferentes tipos de PHAs (Ojumu 2003). Entre todos este grupo de bacterias el género *Bacillus* tales como *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. shaericus*, *B. circulans*, *B. brevis*, *B. licheniformes* han sido reconocidos como productores de PHAs (Shamala 2002; Fernández 2006).

En este estudio el aislamiento 1MP5 reportó la mayor producción de polímero con 0.1416 g/L. Los valores de este estudio son muy inferiores a los reportados por Barbosa et al. (2005) los cuales reportan un rendimiento de 5 g/L, usando como fuente de carbono glucosa, estas diferencias se deben a que estos investigadores utilizaron una cepa recombinante de *Ralstonia eutropha* (ATCC 17697). Según Kim et al. 1994 afirman que *Ralstonia eutropha* es capaz de acumular un 80% de polímero del total del peso seco de la bacteria a partir de fuentes de carbono económicas tales como la glucosa.

Fernández reporta un rendimiento para la cepa FBL2 identificada como *Bacillus mycoides* de 0.4 g/L en un medio (sin optimizar), 5.2 al optimizar el medio de cultivo, para este estudio el aislamiento 1MP2 presentó características de colonias filamentosas que se curvan hacia la derecha (fig.). De acuerdo con las descripciones del manual Bergey's y el perfil de oxidación de azúcares, este aislamiento se identifica como *B. mycoides* para este aislamiento se

reporta una producción de 0.12 g/L de biopolímero en un medio con sacarosa como fuente de carbono.

La cepa 1MP5 , a partir del perfil de oxidación de azúcares se identificó como *Bacillus laterosporus*, bajo el lente del microscopio (100x) se observaron bacilos solos, medianos, catalogados como Gram +. (Fig 12)

Figura 12. Forma microscópica del aislamiento 1MP5 *Bacillus laterosporus*



Bacillus laterosporus se ha utilizado en las últimas décadas como control biológico de plaga de insectos y hongos, pero no hay reportes se haya utilizado como una cepa potencialmente industrial para la producción de PHAs. En un estudio realizado por Shamala et.al 2002 no reportan producción de PHAs a partir de un aislado de *B.laterosporus* en un medio mineral, en contraste con lo reportado por Sabbeel et.al (2007) los cuales utilizan como fuente de carbono el propionato y obtiene un porcentaje del 29.5 del peso seco para 3-hidroxi butirato y 5% para la fracción 3-hidroxi butirato-hidroxi valerato.

4.3.1 Caracterización del polímero sintetizado por la cepa 1MP5: En la figura 13 se muestra el perfil cromatográfico de la cepa 1MP5. El patrón de copolímero P β (HB-co-HV), se observa un pico en el periodo de retención de 4.5 minutos El tiempo de retención obtenido para la cepa 1MP5 se encuentra en el rango de confiabilidad para la fracción butirato (PHB) con un tiempo de retención 4.566.

En el cromatograma obtenido del aislamiento 1MP5 en la fermentación con sacarosa como fuente de carbono se observaron otros picos diferentes al de la fracción butirato, lo que podría considerarse que este aislamiento también podría sintetizar otros tipos de polímeros blenda o copolímeros.

5. CONCLUSIONES

1. El lixiviado del relleno sanitario Antanas, afecta la estabilidad de las poblaciones microbianas lo que se vio reflejado en la diversidad y abundancia de bacterias productoras de PHAs.
2. Las propiedades fisicoquímicas (fosforo, capacidad de intercambio cationico, calcio, potasio y magnesio) de suelo se alteraron por acción del lixiviado de Relleno Sanitario Antanas.
3. Las características físico químicas del suelo influyen sobre la abundancia y diversidad de las bacterias productoras de PHAs.
4. La mayor abundancia de bacterias productoras de PHAs se da a los 30 días de aspersión de lixiviado y a los 90 días no se presento crecimiento microbiano
5. Mediante el sistema API 50 CHB se determino que la cepa que presento mayor producción de PHAs fue identificada como *Brevibacillus laterosporus*, con un rendimiento de 0,1416 g-L
6. El polihidroxicanoato sintetizado por el aislamiento 1MP5 corresponde al homopolímero polihidroxibutirato

6. RECOMENDACIONES

1. Identificar los morfotipos aislados hasta género y especie, utilizando métodos moleculares.
2. Los resultados obtenidos sugieren que existen efectos de las propiedades fisicoquímicas del suelo en la abundancia de poblaciones bacterianas productoras de PHAs, por lo que se recomienda realizar otras investigaciones encaminadas a considerar este tipo de bacterias como bioindicadoras del estado del suelo.
3. Optimizar un medio de cultivo para la síntesis de PHA por el morfotipo IMP5 aislado de suelos asperjados con lixiviados

7. BIBLIOGRAFIA

AGUDELO, Ruben Alberto (1994). Tratabilidad de los lixiviados producidos en Rellenos Sanitarios. Medellín.

ALDÉN. L , F. Demoling, & E. Bååth. 2001 Rapid Method of Determining Factors Limiting Bacterial Growth in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, April 2001, p. 1830-1838, Vol. 67, No. 4

ALEXANDER, M. 1977. *Introduction to soil Microbiology*. Ed 2. Wiley, New York

ANDERSON, A; & DAWES, E. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates; *Microbiology Rev.* Vol 67.

ATLAS, R.M; & D. PRAMER. 1990. Focus on Bioremediation *ASM News* 56:7

ATLAS, R.M. & Bartha, R (2002). *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Madrid

BARBOSA, M. Et. Al (2005). Produccion de Poli-b-Hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Revista Universidad Javeriana*

BURBANO, Hernán. El suelo una visión sobre sus componentes biorganicos. Serie de investigaciones No 1. Universidad de Nariño 1989.

BURBANO, Oscar (2003). Tratamiento biológico de lixiviados del relleno sanitario Antanas por filtros anaerobios. Universidad de Nariño.

BAVER, GARDNER, W.H y GARDNER, W. R. Física de suelos. México, CRAT, 1993. 52p p.

BRISSIO, Pedro. 2005, Evaluación preliminar del estado de contaminación en suelos de la provincia del Neuquén donde se efectúan actividades de explotación hidrocarburífera. Universidad Nacional del Comahue

BRAVO, Daniel (2008) Síntesis de polihidroxicarboxilatos por bacterias diazotrofas nodulantes aisladas de plantas Fabaceas nativas en bosques altoandinos del departamento de Nariño. Tesis Universidad de Nariño.

BULL, A.T., J.H Slater. 1982. Microbial Interactions and community structure. Academic Press, Londres, pp. 13-14

BURBANO, Oscar Alberto (2003). Tratamiento biológico de lixiviados del relleno sanitario de Antanas por filtros anaerobios. Trabajo de pregrado2. Universidad de Nariño, Pasto

BURGUES, A. 1962. Introducción a la Microbiología del Suelo. Editorial Acribia

CAMPBELL, R. Microbial Ecology. Blackwell Scientific Publications. Unites States of North American. 2001

CONTORAS, Davor (1995). Los derrames incontrolados en biohidrica. No 3 (17). Pag 70-72

DUAH-YENTUMI, S., R. Rønn, and S. Christensen. 1998. Nutrients limiting microbial growth in a tropical forest soil of Ghana under different management. Appl. Soil Ecol. 8:19-24

DE ALMEIDA, Alejandra, RUIZ Jimena, LOPEZ Nancy, PETTINAN Julia; 2004. Bioplasticos una Alternativa Ecológica. Revista Química viva Número 3

DEARLOVE J., 1995, "Geochemical interaction processes between landfill clay liner materials and organo-metallic leachate", Waste Disposal by Landfill, Balkema, Rotterdam.

DENDOOVEN . L ; FUENTES, R; Actividad Microbiana En Los Suelos. Avance y Perspectiva. Bogotá. Vol 21: 328-332p

DO Y, KAWAGUCHI Y, KOYAMA N, NAKAMURA S, HIRAMITSU M, YOSHIDA Y, KIMURA U (1992). Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiology. Rev. 103: 103-108

DUAH-YENTUMI, S., R. Rønn, and S. Christensen. 1998. Nutrients limiting microbial growth in a tropical forest soil of Ghana under different management. Appl. Soil Ecol. 8:19-24

EHRIG H., 1999, "Cantidad y contenidos de lixiviados de rellenos de desechos domésticos", CEPIS/OPS

ENCARNACIÓN, S.Dunn, WILLIAMS K & MORA J. 1995. Fermentative and Aerobic Metabolism in Rhizobium, Journal bacteriology, Vol 177 (11)

ENRIQUEZ, Eduardo, Remediación de los Suelos. 2004

ETTEMA, C. H. y Wardle, D. A. 2002. Spatial soil ecology. Trends Ecol. Evol. 17: 177-183.

FERNANDEZ, P; Ortiz, F; España, J. Caracterización de poli(hidroxibutirato hidroxivaletato)

sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides*, FLB2. Revista Centro de Estudios en Salud 2005. pp. 72-76 Vol. 1 No. 6.

FERNÁNDEZ, P.; Ortiz, F.; Burbano, O.; Guerrero, M.; España, J. Influencia de Fuentes de Carbono y Nitrógeno en el Crecimiento Bacteriano y Síntesis de Polihidroxialcanoato de una Cepa de *Bacillus mycoides* FLB2. Revista Centro de Estudios en Salud 2006. pp. 34-42 Vol. 1 No. 7.

GARCIA, Neila Shirley; SOLARTE, Bismar Alveiro (2003). Efecto de los Microorganismos Heterótrofos en la Degradación In Vitro de Lixiviados del Antiguo Relleno Sanitario de la Ciudad de San Juan de Pasto. Trabajo de Pregrado. Universidad de Nariño Pasto.

GIRALDO Eugenio 2001. Tratamiento De Lixiviados De Rellenos Sanitarios: Avances Recientes, Revista de Ingeniería. Universidad de los Andes

GONZALES, German; Martinez Jairo (1998). Caracterización de Residuos sólidos Urbanos y Lixiviados en la Ciudad de Pasto. Facultad de Ingeniería, Universidad de Nariño.

GUERRA, Ana y Rosero, Teresa (2008). Abundancia de bacteria acumuladoras de polihidroxialcanoatos en suelos de bosque natural, secundario, plantaciones de pino y pastos en la vereda de Pinasaco, Municipio de Pasto, Departamento de Nariño. Universidad de Nariño

HIDALGO, W.; ZAMBRANO, J. Aislamiento de Bacterias Nativas Productoras de PHAs presentes en Suelos de la Región Andina del Departamento de Nariño (2005) Trabajo de Grado Departamento de Química. . pp. 96.

KENNEDY L. y Everett J., 2001, "Microbial degradation of simulated landfill leachate: solid iron/sulfur interaction", Elsevier Science Ltd,

KONOPKA.A,T. ZAKHAROVA, M. BISCHOFF, L. OLIVER, C. NAKATSU, and R. F. TURCO, 1999. Microbial Biomass and Activity in Lead-Contaminated Soil. Applied and Environmental Microbiology, May 1999, p. 2256-2259, Vol. 65, No. 5

KOVALICK, W. 1992. Perspectives on risks of soil pollution and experience with innovative remediation technologies, p. 281-295.

LEVIN, Morris & Michael GEATLTH. Biodegradación de residuos tóxicos peligrosos: Selección, Estimación, Modificación de Microorganismos Y Aplicaciones. España, Editorial Mc Graw Hill 1997

MARINHEIRO, Luis; OLIVEIRA, Rosario; RUSSO Mario (2003). Remocao de compostos de azoto em lixiviados de terros sanitanos por biodiscos anaerobios a escala piloto.

MARTIN A. 1998. Microbiología del Suelo. 1ª.Ed. Editorial libros y Editoriales, S.A. México D.F

MENDEZ R. *et. al.* (2002). Influencia del material de cubierta en la composición de los lixiviados de un relleno sanitario/ Ingeniería 6-2 7-12

METTING, F.B; Jr. 1993. Soil Microbiology ecology: Applications in agricultural and Environmental Management. Marcel Decker, New York

MISHUSTIN E, N 1995. Microbial associations of soil types. *Microbial Ecology* 2:97-118

MOSCOWITZ,G; MERRICK,M. (1989): Metabolism of poly- β -hydroxibutirate. Enzymatic synthesis of D-(-)- β Hydroxibutyryl Coenzyme A by an enoyl hydrase from *Rhodospirillum rubrum*; Biochemistry. Vol 8.

MULLER, J.G; D.P MIDDAUGH, & S.E LANTZ. 1991. Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater; Chemical and biological assessment. Applied and Environmental Microbiology ; 57:1277-1285

NOGALES, B; 2004 La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente Mallorca , España

NUNAN, N., Wu, K., Young, I. M., Crawford, J. W. y Ritz, K. 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-structure of soil. FEMS Microbiol. Ecol. 44: 203-215

N.S. SUBBA RAO. (2001). Soil Microbiology. Sciences Publishers, Inc. USA

OJUMU, T.V; Yu, J; Solomon, B.O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (1), pp. 18-24, January 2004. Academic Journals

OIDEMAN, L.R., Hakkeling, R.T.A. y Sombroek, W.G. (1991). World map of the status of human-induced soil degradation.

PINEDA, S.I. (1998) Manejo y Disposición de Residuos Sólidos. Bogotá: Panamericana . 351p.

PORTA, J; Lopez, M; Roquero, Carlos. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ediciones Mundi prensa. Madrid 1999

PWARD, Owen. Biotecnología de la Fermentación, España Editorial Acriba 1989

RAMOS-COMERZANA A. Y MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. (2000) Biopharmaceutica
Potencial of olive industrial wastes. Department of Microbiology. Granada. España

RANJARD , L., Richaume, A.S., 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. Res. Microbiol. 152, 707–716.

ROTERMICH, Mery; GUERRERO, Ricardo; LENZ, Robert & GOODWIN, Steve.
Characterization, Seasonal Occurrence, and Diel Fluctuation of Poly(hydroxyalkanoate) in Photosynthetic Microbial Mats. Applied and Environmental Microbiology, October 2000.

SEMARNAT 2001. Minimización y manejo de los Residuos Sólidos

SHI ,W; BECKER J; BISCHOFF,M; TURCO R.F & KONOPK,A.E (2002) Association of Microbial Community Composition and Activity with Lead, Chromium, and Hydrocarbon Contamination. Applied and Environmental Microbiology, August, p. 3859-3866, Vol. 68, No. 8

SCHUBERT, P ; STEINBÜCHEL, A; SCHLEGEL (1988). Synthesis of Poly- β -Hydroxybutyric acid in *Alcaligenes eutrophus*, its genetic localization and conjugational transfer of the genes; Nachr.Akad.Wissensch. Gotinguen, II Math-Physik. Klasee

SMITH , J. L., and E. A. Paul. 1990. The significance of soil microbial biomass estimations, p. 357-395. In J.-M. Bollag, and G. Stotzky (ed.), Soil biochemistry, vol. 6. Marcel Dekker, Inc, New York, N.Y.

SMITH, R.L.; Smith, T.M. 2001. Ecología. Cuarta Edición. Addison Wesley. Pearson Educación S.A. Madrid.

STEINBÜCHEL Alexander (1991). Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byron D (ed) Biomaterials: novel materials from biological sources. Stockton, New York, pp. 124-213.

TORO, Daniel 2004. La biodiversidad Microbiana un mundo por descubrir. Universidad de Caldas.

TORRES, P; Rodríguez Y, Barba L; Moran A; Narváez J (2005). Tratamiento anaerobio de lixiviados en reactores UASB.

TIMM, A; STEINBÜCHEL, A. (1990) Formation of polyesters consisting of medium chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonad*'s . Appl.Environ. Microbiology Vol 56(11)

UNIGARRO, Alberto; Carreño, Maria del Rosario. Metodos químicos para el análisis de suelos. Universidad de Nariño. 2005

VALDERRAMA, Brenda. Microbiología de los Petróleos Y sus Derivados.

VALENTIN, Henry E. & DOUGLAS Dennis. (1995) Metabolic Pathway for Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate). Formation in *Nocardia corallina*: Inactivation of *mutB* by Chromosomal Integration of a Kanamycin Resistance Gene. American Society for Microbiology

W.D.Grant & P.E. Long 1999. Environmental Microbiology. Editorial ACRIBIA, S.A, (España)

ANEXOS

1 Tabla ANOVA, Parámetro pH

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.426667	1	0.426667	4.92	0.0907
Intra grupos	0.346667	4	0.0866667		
Total (Corr.)	0.773333	5			

2 Tabla ANOVA PARAMETRO FOSFORO

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	678.407	1	678.407	22.44	0.0091
Intra grupos	120.913	4	30.2283		
Total (Corr.)	799.32	5			

3. Tabla ANOVA CIC

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	343.527	1	343.527	237.46	0.0001
Intra grupos	5.78667	4	1.44667		
Total (Corr.)	349.313	5			

4. Tabla ANOVA CALCIO DE CAMBIO

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	180.402	1	180.402	36.99	0.0037
Intra grupos	19.5067	4	4.87667		
Total (Corr.)	199.908	5			

5. Tabla ANOVA MAGNESIO DE CAMBIO

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	5.11527	1	5.11527	17.89	0.0134
Intra grupos	1.14387	4	0.285967		
Total (Corr.)	6.25913	5			

6. Tabla ANOVA POTASIO DE CAMBIO

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	32.3873	1	32.3873	6.36	0.0652
Intra grupos	20.3693	4	5.09233		
Total (Corr.)	52.7566	5			

7- Tabla ANOVA % NITROGENO

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.00326667	1	0.00326667	0.07	0.8009
Intra grupos	0.179933	4	0.0449833		
Total (Corr.)	0.1832				

8. Tabla ANOVA Porcentaje de carbono

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0.180267	1	0.180267	0.03	0.8751
Intra grupos	25.6991	4	6.42477		
Total (Corr.)	25.8793	5			