

ABUNDANCIA DE BACTERIAS ACUMULADORAS DE
POLIHIDROXIALCANOATOS EN SUELOS DE BOSQUE NATURAL
SECUNDARIO, PLANTACION DE PINO (*Pinus patula Schlech et Cham.*) Y
PASTOS EN LA VEREDA DE PINASACO, DEPARTAMENTO DE NARIÑO

ANA LISSETTE GUERRA CABRERA.
TERESA DE JESÚS ROSERO ORTEGA.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2008

ABUNDANCIA DE BACTERIAS ACUMULADORAS DE
POLIHIDROXIALCANOATOS EN SUELOS DE BOSQUE NATURAL
SECUNDARIO, PLANTACION DE PINO (*Pinus patula Schlech et Cham.*) Y
PASTOS EN LA VEREDA DE PINASACO, DEPARTAMENTO DE NARIÑO

ANA LISSETTE GUERRA CABRERA.
TERESA DE JESÚS ROSERO ORTEGA.

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogo

Director
Dr. PABLO FERNANDEZ IZQUIERDO.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2008

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”.

Artículo 1ro del acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación:

PABLO FERNANDEZ I.
Director

JACKELINE MENA HUERTAS
Jurado

GUILLERMO CASTILLO
Jurado

San Juan de Pasto, 29 de Febrero de 2008.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan sus agradecimientos a todos los trabajadores del Centro ambiental Chimayoy, en especial a la entidad de COORPONARIÑO, y a los señores Javier Chicaiza y Julio Naspiran, por habernos facilitado los contactos y permitir que podamos realizar nuestro trabajo de campo en este lugar.

A la UNIVERSIDAD DE NARIÑO por creer en nuestro trabajo y brindarnos el apoyo financiero parcial, para los análisis físico-químicos de suelo y de esta manera otorgarnos la oportunidad de obtener las herramientas necesarias para seguir conociendo acerca del fascinante mundo del microcosmos del suelo.

Al Doctor Pablo Fernández Izquierdo, director de la investigación por sus valiosas orientaciones y recomendaciones, y su apoyo fundamental en la ejecución de este proyecto.

A todos los profesores que nos guiaron y compartieron sus experiencias y conocimientos en el transcurso de nuestra carrera, en especial a nuestros jurados Jackeline Mena y Guillermo Castillo, por su tiempo y colaboración para culminar con este trabajo.

A los profesores: Dolly Revelo; Martha Sofía Gonzales, Milena Guerrero, Walter Vallejo y Álvaro Timaran, por toda la colaboración prestada en el desarrollo de esta investigación.

A Dari Rosero por facilitarnos información muy valiosa para la construcción del documento, por sus sugerencias y aportes que permitieron un mejor desarrollo del trabajo.

A Guido Villota por sus valiosos aportes, su tiempo y colaboración en el desarrollo de la fase de laboratorio de nuestro proyecto.

A todos aquellos que trabajan en los laboratorios de suelos y en el herbario (PSO) de la Universidad de Nariño, por su ayuda y colaboración en la ejecución de esta investigación.

A nuestros compañeros: Galo, Natalia, Sandra, Diana, Analu, Marian, Melisa y Zaida, cómplices de este maravilloso viaje por el fascinante mundo de la naturaleza. También a nuestras amigas y amigos de la universidad, por sus palabras de aliento, su ánimo, y por compartir momentos que hicieron de esta carrera una gran e inolvidable experiencia.

Y en general a todas las personas que de una u otra manera nos apoyaron para que podamos llevar a cabo todas las actividades concernientes a este trabajo.

A todos ellos, ¡MUCHAS GRACIAS!

Lado seas, mi Señor, por la madre naturaleza
La cual nos sustenta y gobierna
Y produce diversos frutos, con coloridas flores y hierbas.
San Francisco

Bendice, ¡Oh alma mía! al Señor, y bendigan todas mis entrañas, su Santo Nombre. Salmos 103,1. Por ser la luz de mi vida y fuente de inspiración que me ayudan a ser mejor.

A mi madre querida, Anita Cabrera por darme la vida, por ser mi amiga, compañera y confidente incondicional. A mi padre querido, José Guerra, por ser mi amigo y por todos sus sacrificios para que en la vida no me faltara nada. A mi hermano Fernando, por su apoyo y por su retoño Ana Isabel quien con sus sonrisas me llena de alegría. A mi hermano Ricardo, por su preocupación, colaboración y consejos para ser de mi vida una obra de arte.

A mi amiga Tere, por su compañía y comprensión durante todos estos hermosos años universitarios. A Galo, Natalia, Sandra, Diana, Analu, Marian, Melisa y Zaida, cómplices de este maravilloso viaje por el fascinante mundo de la naturaleza. A mis amigas y amigos de la universidad por su sincera amistad y por los buenos momentos que dejan recuerdos inolvidables. A mis profesores por haber compartido conmigo su sabiduría que me llevaron a cumplir una de mis etapas. A mis familiares por estar presentes en todos los momentos de mi vida y por ser partícipes de este triunfo.

Y todos aquellos que con su presencia me enseñaron que cada día es una nueva oportunidad.

ANITA LISSETTE GUERRA CABRERA

“Everything is everywhere and the milieu selects”
“Todo está por todas partes y el entorno selecciona”

Martinus Beijerinck

A Dios por darme la vida, iluminar mi camino y guiar mis pasos y por darme la oportunidad de culminar una meta más y estar conmigo siempre.

A mi mamá Elva Luz Angélica Ortega Benavidez: por demostrarme en cada instante cuán grande es su amor por mí; y en especial por ser mi consejera, por estar conmigo en los momentos de alegría y ayudarme a soportar los momentos de tristeza.

A mi papá Luis Guillermo Rosero Sánchez: por su apoyo constante, por estar pendiente de mí y por querer hacer de mí una gran persona, con sus consejos y palabras de aliento me hacen una persona fuerte y con ganas de seguir adelante.

A mis hermanos: Lucí quien ha sido mi ejemplo y mi apoyo constante; Sofí, por ser mi amiga incondicional y compartir conmigo cada momento de mi vida y Juli por ser mi alegría y la inspiración de mi vida

A Aní, mi amiga y compañera con la que compartí momentos tristes y alegres, que por siempre los llevare en mi corazón.

A todos los que me apoyaron y estuvieron conmigo, les dedico este triunfo.

TERESA DE JESÚS ROSERO ORTEGA.

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características físico-químicas del suelo en bosque natural secundario, plantación de pino y pastos bajo tres coberturas vegetales.	53
Tabla 2. Morfotipos acumuladores de PHA encontrados en suelo bajo tres coberturas vegetales.	66
Tabla 3. Abundancia relativa de los morfotipos acumuladores de PHA encontrados en suelo bajo tres coberturas vegetales en el Centro Ambiental Chimayoy del Departamento de Nariño, colectadas en los meses de Octubre - Noviembre del 2005.	67
Tabla 4. Índices de diversidad alfa para las bacterias PHAs en suelos bajo tres coberturas vegetales en el Centro Ambiental Chimayoy del Departamento de Nariño, colectadas entre los meses de Octubre - Noviembre del 2005.	68
Tabla 5. Factores de carga de las variables edáficas y parcelas analizadas mediante el análisis de coordenadas principales.	69

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Prueba piloto	91
Anexo B. Tinciones utilizadas y preparación del medio de cultivo	92
Anexo C. Tablas de análisis físico-químicos del suelo	93
Anexo D. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para el contenido de materia orgánica en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	95
Anexo E. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para el contenido de Nitrógeno en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	96
Anexo F. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para el contenido de Carbono en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	97
Anexo G. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para la relación Carbono/Nitrógeno en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	98
Anexo H. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para el pH en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	99
Anexo I. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para la capacidad de intercambio cationico en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	100
Anexo J. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para el contenido de Fósforo en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	101
Anexo K. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para el contenido de Calcio en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	102
Anexo L. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para el contenido de Magnesio en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	103
Anexo M. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para el contenido de Potasio en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	104
Anexo N. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para el contenido de Aluminio en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	105
Anexo O. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para el contenido de Zinc en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	106
Anexo P. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para la densidad aparente en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	107
Anexo Q. Análisis de varianza y Test Kruskall-Wallis para la abundancia de bacterias acumuladoras de PHAs en el suelo bajo las tres coberturas vegetales	108
Anexo R. Descripción de las características culturales de los morfotipos productores de PHAs del suelo bajo las tres coberturas vegetales	109
Anexo S. Matriz de análisis de coordenadas principales (características físico- químicas de los suelos vs abundancia de bacterias acumuladoras de PHA; en las tres zonas de estudio).	112

RESUMEN

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son biopolímeros de reserva de Carbono y energía sintetizadas por algunas bacterias cuando se encuentran sometidas a factores de estrés. Este tipo de bacterias se han aislado de diferentes ambientes como agua, suelo y vegetación. En estos ecosistemas muchos investigadores consideran que la síntesis del polímero es una estrategia adaptativa a los ambientes adversos. En suelos del Centro Ambiental Chimayoy, la abundancia de bacterias PHAs se encuentra influenciado por el tipo de cobertura vegetal; en la plantación de Pinos (*Pinus patula*) aunque presento la mayor abundancia de bacterias PHAs, tiene el menor número de aislados bacterianos, en la zona de pastos presento el mayor número de morfotipos acumuladores de PHAs pero menor abundancia y en el Bosque Natural Secundario se encontró una baja abundancia de bacterias PHAs. Además existe una relación inversa con el pH del suelo pero también se observa una relación directa con la Capacidad de Intercambio Cationico, Carbono, Nitrógeno y relación C/N. Bajo estas características se podría pensar que este tipo de bacterias pueden ser utilizadas como futuras bioindicadoras del estado del suelo.

ABSTRACT

The polyhydroxyalcanoates (PHAs) are Carbon and energy reserve biopolymers synthesized by some bacteria when they are submitted to factors of stress. These types of bacteria have been isolated of different environments as water, soil and flora. In these ecosystems many researchers consider that the synthesis of the polymer is an adaptative strategy against the adverse environments. In soils of the Chimayoy Environmental Center, the abundance of bacteria PHAs is influenced by the type of vegetal coverage; in the plantation of Pines (*Pinus patula*) it show the major abundance of bacteria PHAs, and it has the minor number of bacterial isolated, in the zone of pastures it present a major number of PHA accumulated morpho-types in minor abundance, and it found a low abundance of PHA bacteria in the Natural Secondary Forest. Besides an inverse relation exists with the pH of the soil but also a direct relation is observed with the Capacity of Cationic Interchange, Carbon, Nitrogen, and C/N relation. Under these characteristics, it might think that this type of bacteria can be used as future bio-indicators of the status of the soil.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Composición del suelo	30
Figura 2. Ubicación del Centro Ambiental Chimayoy en el departamento de Nariño	46
Figura 3. Áreas de estudio del Centro Ambiental Chimayoy que corresponden a: bosque natural secundario (a), plantación de pino (b) y zona de pastos (c)	47
Figura 4. Parcelas de recolección de muestras de suelo	48
Figura 5. Organigrama	52
Figura 6. Porcentajes de materia orgánica, Carbono y Nitrógeno de suelos bajo tres coberturas vegetales del Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005	54
Figura 7. Porcentaje de la relación C/N en las diferentes áreas de estudio en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.	55
Figura 8. pH del suelo bajo tres coberturas vegetales en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.	56
Figura 9. Capacidad de intercambio catiónico en suelos de bosque natural secundario, plantación de pino y pastos en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.	57
Figura 10. Contenido de bases intercambiables en suelos con diferente cobertura vegetal en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005	58
Figura 11. Contenido de Fósforo, Zinc y Aluminio en suelos de bosque natural secundario, plantación de pinos y pastos en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.	59
Figura 12. Densidad aparente obtenida bajo tres coberturas vegetales en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.	60
Figura 13. Fotografías en donde se indica la fluorescencia de las colonias acumuladoras de polímero, mediante los rayos ultravioleta, en donde a y b, son aislamientos de bacterias del suelo en la zona de Pastos; c, aislamiento de bacterias del suelo de la plantación de pino.	61
Figura 14. Porcentaje de morfotipos con diferente respuesta la prueba	

de Rojo Nilo para PHAs en suelos de bosque natural secundario, plantación de pino y pastos en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005	63
Figura15.Abundancia de bacterias acumuladoras de polihidroxicanoatos y bacterias totales en muestras de suelo colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005, bajo tres coberturas vegetales en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño.	64
Figura 16. Caracterización microscópica de los aislados bacterianos en muestras de suelo bajo las diferentes coberturas vegetales del Centro Ambiental Chimayoy colectadas entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.	66
Figura 17. Análisis de coordenadas principales	70

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	25
1. OBJETIVOS	28
1.1 Objetivo General	28
1.2 Objetivos Específicos	28
2. REVISIÓN DE LITERATURA	29
2.1 EL SUELO	29
2.1.1 Origen y factores formadores	29
2.1.2 Composición	30
2.1.2.1 Fase sólida	30
2.1.2.2 Fase líquida	31
2.1.2.3 Fase gaseosa	31
2.1.3 Perfiles del suelo	31
2.1.4 Propiedades del suelo	31
2.1.4.1 Propiedades físicas	31
2.1.4.1.1 Color	32
2.1.4.1.2 Textura	32
2.1.4.1.3 Estructura	32
2.1.4.1.4 Densidad aparente	32
2.1.4.2 Propiedades químicas	32
2.1.4.2.1 pH	33

2.1.4.2.2	Contenido de humedad	33
2.1.4.2.3	Iones asociados a coloides	33
2.1.4.2.4	Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	34
2.1.4.2.5	Nutrientes del suelo	34
2.1.4.2.5.1	Fósforo (P)	34
2.1.4.2.5.2	Potasio (K)	34
2.1.4.2.5.3	Calcio (Ca)	34
2.1.4.2.5.4	Magnesio (Mg)	34
2.1.4.2.5.5	Aluminio (Al)	35
2.1.4.2.5.6	Zinc (Zn)	35
2.1.4.2.5.7	Nitrógeno (N)	35
2.1.4.2.5.8	Carbono (C)	35
2.1.4.2.5.9	Relación Carbono/Nitrógeno (C/N)	36
2.1.4.2.6	Materia orgánica	36
2.2	BACTERIAS DEL SUELO	37
2.2.1	Distribución y abundancia de bacterias del suelo	37
2.2.2	Análisis microbiológico del suelo	38
2.2.3.1	Técnica de la laminilla en contacto	38
2.2.3.2	Mineralización de sustratos orgánicos	38
2.2.3.3	Método de numero más probable (NMP)	39
2.2.3.4	Extracción y derivatización de ácidos grasos totales	39
2.2.3.5	Biomasa: Extracción y cuantificación de ácidos Desoxy-ribonucleicos (ADN) totales	39

2.2.3.6 Test de cutizina y celulosa	40
2.2.3.7 Método de diluciones sucesivas	40
2.3 BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)	40
2.3.1 Funciones del PHAs	42
2.3.2 Síntesis de PHA	42
2.3.3 Degradación de polihidroxicanoatos	43
2.3.4 Técnicas analíticas para la detección de PHAs	44
2.3.4.1 Métodos cualitativos	44
2.3.4.2 Métodos cuantitativos	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1 FASE DE CAMPO	46
3.1.1 Área de estudio	46
3.1.2 Toma de muestras	47
3.2 FASE DE LABORATORIO	48
3.2.1 Análisis físico-químico del suelo	48
3.2.2 Aislamiento de bacterias PHAs	49
3.2.3 Cuantificación y selección de bacterias de PHAs	49
3.2.4 Purificación de bacterias PHAs	49
3.2.5 Caracterización cultural de bacterias PHAs	49
3.2.6 Conservación de bacterias PHAs	49
3.3 ANÁLISIS DE RESULTADOS	50
3.3.1 Índices ecológicos de diversidad alfa	50

3.3.1.1 Riqueza de especies (S)	50
3.3.1.2 Índice de Simpson (λ)	50
3.3.1.3 Índice de Shannon - Weaver (H')	50
3.3.2 Análisis estadístico	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1 ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO DE SUELO	53
4.2 ANÁLISIS DE ABUNDANCIA DE BACTERIAS ACUMULADORAS DE PHAs	61
4.2.1 Caracterización cultural de las bacterias acumuladoras de polímero (PHAs)	65
4.2.2 Índices de diversidad alfa	66
4.3 RELACIÓN ENTRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICO DE SUELO Y LA POBLACIÓN DE BACTERIAS ACUMULADORAS DE PHAs	69
5. CONCLUSIONES	75
6. RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	77
ANEXOS	91

GLOSARIO

AERACIÓN: Exposición de oxígeno y agua de una superficie dando como resultado un incremento de la actividad biológica en el suelo.

ALOFANICA: Una mezcla amorfa de Aluminio y Silicatos que rápidamente forma complejos fosfatados, inmovilizando el fósforo de los suelos ricos en cenizas volcánicas de las regiones húmedas de las montañas tropicales.

APATITA: ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) Es un mineral con cristales hexagonales, de color entre parduzco o verdoso, generalmente se encuentra formando parte de sedimentos producidos a partir de depósitos orgánicos.

BIOMASA: Término acuñado por Transeau (1926) referido a la unidad de medida de la masa viva del ecosistema por unidad de tiempo determinado; se presenta en g/m^2 e indica la constante de peso seco (sin agua) de los compuestos orgánicos presentes en el ecosistema.

Se lo define también como el peso seco total de un organismo por unidad de superficie y por unidad de tiempo.

BIO-OXIDATIVO: Proceso de oxidación biológica en la cual intervienen agentes ambientales en el proceso de degradación de algún material biológico.

BIOPOLÍMERO: Sinónimo: polímero biológico. Sustancia que consiste en grandes moléculas o macromoléculas formadas por muchas unidades pequeñas que se repiten, llamadas monómeros.

BIOTRANSFORMACIÓN: Todo proceso biológico mediante el cual una sustancia se transforma en otra diferente, el término de biotransformación se aplica a los procesos diseñados para la producción de compuestos mediante el empleo de un organismo completo o de un sistema enzimático

BOSQUE NATURAL SECUNDARIO: Comunidades complejas de seres vivos, microorganismos, vegetales y animales, que se influyen y relacionan al mismo tiempo y se subordinan al ambiente dominante de los árboles. Las especies que conforman esta comunidad dependen del clima en primer lugar, y en segundo término, del tipo de suelo.

CALCITA: (CaCO_3) mineral compuesto principalmente de carbonato de calcio y después del cuarzo, se encuentra en forma de estalactitas y tobas calcáreas, ambas formadas a partir de depósitos de aguas minerales.

COBERTURA VEGETAL: puede ser definida como la capa de vegetación natural que cubre la superficie terrestre, comprendiendo una amplia gama de biomásas con diferentes características fisonómicas y ambientales que van desde pastizales hasta las áreas cubiertas por bosques naturales. También se incluyen coberturas vegetales inducidas que son el resultado de la acción humana como las áreas de cultivos.

COLOIDE DEL SUELO: Se define como una mezcla de agua con varias sustancias minerales en disolución, de una composición muy compleja y con importancia primordial al ser el medio por el que los nutrientes son absorbidos por las raíces de las plantas y los organismos que se encuentran en el.

CONDENSACIÓN: proceso en el que la materia pasa a una forma más densa, como ocurre en la licuefacción del vapor. La condensación es el resultado de la reducción de temperatura causada por la eliminación del calor latente de evaporación; a veces se denomina condensado al líquido resultante del proceso.

COPOLIMERO: macromoléculas con diferentes unidades monoméricas.

DESECACIÓN: falta o escasez de agua en el suelo, ocasionadas por la absorción de la arena y la evaporación.

DOLOMITA: $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$, es un mineral compuesto de carbonato de calcio y magnesio, de origen hidrotermal y es un constituyente fundamental de las rocas sedimentarias carbonatadas (dolomías y calizas dolomíticas) formadas por la acción del agua de mar sobre fangos calcáreos o formaciones organógenas

ESPECIES CALCÍCOLA: Organismo que tiene afinidad de crecer y vivir permanentemente en suelos ricos con carbonato cálcico

ESPECIES CALCIGUGA: especies vegetales indicadoras de suelos pobres o sin caliza.

FELDESPATOS: KAlSi_3O_8 . se encuentran como cristales aislados o en masas, son grupos de minerales constituyentes fundamentalmente de las rocas ígneas aunque pueden encontrarse en cualquier tipo de roca.

FLUORESCENCIA: emisión de luz que se observa en ciertos tipos de sustancias según las características energéticas de su estructura, con una intensidad proporcional a la concentración de la muestra ocurre en respuesta a una excitación y que cesa casi inmediatamente al desaparecer su causa, se produce al ser iluminadas por luz de una determinada tonalidad, la absorben e irradian luz de otra tonalidad, cuya longitud de onda siempre es mayor.

GEN PLEIOTRÓPICO: gen que codifica para diferentes tipos de manifestaciones fenotípicas

HUMINA: Es una de las fracciones en las que se puede fraccionar el humus y se caracteriza por ser insoluble en pH básico o alcalino.

INMOVILIZACIÓN: proceso mediante el cual parte de los nutrientes, producto de la descomposición de la materia orgánica, no quedan disponibles para las plantas ya que son incorporados en la biomasa microbial para satisfacer necesidades de crecimiento y supervivencia.

IRRIGACIÓN: rociar la superficie de algo con agua y otra sustancia líquida.

LIXIVIACIÓN: proceso de lavado que realiza el agua que se infiltra en el suelo.

MATERIA ORGÁNICA: literalmente se refiere a algún material derivado de plantas o animales. Incluye cualquier cosa derivada de un organismo vivo o excretado por este.

METEORIZACIÓN: es el proceso de desintegración física y química de los materiales sólidos en o cerca de la superficie de la Tierra.

MICROBIOTA es el conjunto de microorganismos que habitan en un ecosistema y constituyen lo que se denomina el microcosmos (mundo microscópico) del ecosistema

MINERALIZACIÓN: es el proceso mediante el cual las bacterias convierten las moléculas orgánicas complejas de plantas y residuos de animales en dióxido de

carbono, agua, amonio y otros nutrientes inorgánicos simples, de manera que plantas y microorganismos del suelo pueden utilizarlos.

MORFOTIPOS: (colonias diferentes de bacterias Basándose en los recuentos viables en plato se puede determinar el número de morfotipos (colonias diferentes de bacterias) en las muestras estudiadas y concluir cual de las muestras es más diversa que la otra, lo que permite comparar el impacto que diferentes manejos agrícolas ejercen sobre la diversidad microbiana.

ORGANISMO DESCOMPONEDOR: es un organismo, generalmente una bacteria o un hongo, que transforma la materia orgánica en compuestos químicos más simples, devolviendo así los nutrientes al medio ambiente.

PERMEABILIDAD: capacidad de un material para permitir que un fluido lo atraviese sin alterar su estructura interna. Se dice que un material es permeable si deja pasar a través de él una cantidad apreciable de fluido en un tiempo dado, la velocidad con la que el fluido atraviesa el material depende del tipo de material, de la naturaleza del fluido, de la presión del fluido y de la temperatura.

PIROLISIS: La pirolisis o destilación destructiva es un proceso de descomposición química de residuos sólidos mediante calor en una atmósfera con poco oxígeno. Esto genera una corriente de gas compuesta por hidrógeno, metano, monóxido de carbono, dióxido de carbono, ceniza inerte y otros gases, según las características orgánicas del material

PLANTACIONES DE PINO: Son aquellas cuya especie predominante corresponde al género *Pinus*, en una presencia mayor al 95% en el rodal o unidad de plantación. Se caracterizan generalmente por no compartir su espacio de plantación con otras especies (ni nativas ni introducidas) por obstaculizar el paso de la luz hacia el suelo y por arrojar sus acículas secas al suelo, formando un colchón espeso y denso, de descomposición muy lenta denominado "Mull", el cual impide el crecimiento de otras especies tanto rastreras como formadoras de sotobosque

PLÁSTICO: La palabra plástico procede de la voz griega plásticos, que significa "capaz de ser moldeado" y que refleja la principal propiedad de los plásticos: su deformabilidad ante la aplicación de fuerzas relativamente débiles y a temperaturas no muy alejadas de la ambiental.

POLIESTERES: polímero de un éster que se obtiene por condensación de diácidos orgánicos con polialcoholes.

POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs): son cuerpos de inclusión acumulados por bacterias cuando el medio de cultivo de las mismas se encuentra desequilibrado. Dicho material es acumulado como fuente de carbono y energía para ser utilizado posteriormente. Estos polihidroxicanoatos son termoplásticos enantiomeros o elastómeros biodegradables.

POLIMERIZACIÓN: Es el proceso realizado en la formación de un polímero, mediante el cual se agrega un diferente número de unidades en una molécula grande.

ppm: Unidad de concentración de masa que se refiere a partes por millón y equivale a un miligramo por kilo. En una disolución acuosa equivale a un miligramo por litro de disolución

QUISTES: acumulación de material extraño al organismo en estado líquido o semisólido, dentro de una cápsula con una estructura en forma de saco que a veces puede estar abierta.

RIZOSFERA Zona de interacción entre las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo.

ROCAS IGNEAS: Uno de los tres tipos principales de rocas, considerados como la fuente primigenia de los materiales que constituyen la corteza terrestre, formadas por el enfriamiento y la solidificación de materia rocosa fundida, conocida como magma (plutónico o volcánico) y según ello pueden clasificarse en granito, basalto, diorita, riolita, etc.

SAPROFITOS: cualquier organismo que no puede obtener su alimento mediante la fotosíntesis, y en su lugar se nutre de restos de materia vegetal o animal en putrefacción.

SAPROLITOS: materiales producidos por la disgregación de las rocas

SEDIMENTOS NO CONSOLIDADOS: materiales que varían en cuanto a su naturaleza y composición

SOSTENIBILIDAD Se aplica a los ecosistemas que permanecen inalterables por largos espacios de tiempo.

SUSTANCIAS HÚMICAS: Es una de las fracciones en las que se puede dividir el humus y que se caracteriza por ser soluble mediante extracción con álcali.

TERMOPLASTICO: Formados por polímeros lineales o ramificados, impermeables al agua, con bajas densidades, capaces de ablandarse o derretirse con el calor y volverse a endurecer con el frío. Estas cualidades los hacen idóneos para fabricar distintos objetos y sustancias, entre los que se incluyen materiales moldeados, adhesivos y fibras textiles.

TRANSLOCACIÓN: Fragmento de ADN separado del cromosoma original que se une a uno distinto ocasionando alteraciones en un gen, las cuales pueden ser benéficas o perjudiciales para un organismo.

TURBAS: Tipo de suelo compacto altamente orgánico, más del 50% combustible, de color pardo oscuro y muy rico en carbono, hecho de restos vegetales cuyas estructuras son bien reconocibles, poco descompuestas debido a las condiciones anaeróbicas, frías, ácidas, embebidas en agua.

UREASA: enzima que cataliza la descomposición de la urea

INTRODUCCION

Los polihidroxicanoatos o PHAs son polímeros de reserva acumulados por un gran número de grupos bacterianos cuando en el ambiente próximo al microorganismo escasea algún nutriente esencial como el nitrógeno, el fósforo o el azufre y hay exceso en la fuente de carbono (Anderson and Dawes, 1990).

Existe una gran variedad de polihidroxicanoatos los cuales dependen de la posición del grupo hidroxilo y del grupo funcional, así como del número de monómeros y del grado de polimerización de los mismos (Steinbutchel, 1995). Toda esta gran diversidad de PHAs se debe a que como es bien conocido las bacterias pueden transformar una gran cantidad de sustratos en intermediarios de ácidos hidroxicanoicos mediante diferentes rutas bioquímicas entre las cuales se destacan la de β -oxidación y la de síntesis de Novo de los ácidos grasos (Rothermich y col., 2000).

Son varios los estudios acerca de este tipo de bacterias y a pesar que muchos autores consideran que la producción de este tipo de polímeros es una estrategia de las bacterias para incrementar su nivel de supervivencia, sin embargo, Barnard (1999) menciona en uno de sus estudios que la mayoría de investigaciones son realizadas a nivel de laboratorio y específicamente en el campo industrial en la búsqueda de mejores sistemas de fermentación y cepas recombinantes debido a que estos polímeros poseen propiedades físicas y químicas similares a los plásticos convencionales con la diferencia que sus componentes se degradan y penetran en el suelo formando parte del sedimento evitando de esta manera daños al medio ambiente.

En nuestro estudio hemos tomado como referente al suelo debido a que este es un ecosistema de enorme riqueza microbiana en donde las bacterias tienen un papel muy importante debido a que participan en los procesos de la descomposición de la materia orgánica, la formación del humus y la incorporación de los restos orgánicos a los ciclos biogeoquímicos, además gracias a su actividad metabólica pueden transformar las moléculas orgánicas complejas en nutrientes simples fácilmente aprovechables por los organismos del suelo (Dilly y col., 2004).

Sin embargo, Bures (1999) menciona que su número y actividad dependen en gran parte de los recursos disponibles en el suelo por cuanto estos varían según el uso y la cobertura vegetal ya que además de influir en propiedades físicas como la textura y la porosidad influyen en propiedades químicas como la actividad de intercambio catiónico determinando de esta manera la disponibilidad de elementos esenciales para los diferentes procesos vitales tales como el carbono y el nitrógeno; Romera y Guerrero (2006) proponen al pH como otro factor que determina la movilidad de elementos que pueden actuar como limitantes para el

crecimiento bacteriano como el Calcio, el Magnesio, el Fosforo y el Potasio y la movilidad de elementos que pueden ser tóxicos para la mayoría de microorganismos como el aluminio y el zinc.

En vista de que existen factores que pueden limitar al crecimiento bacteriano y que son susceptibles a variables ambientales tales como el clima o la actividad biológica, Almeida y col., (2004), mencionan que las bacterias han desarrollado sistemas bioquímicos de producción de polímero los cuales además de servir como material de reserva en ambientes donde hay una elevada relación C/N sirven como una estrategia de supervivencia en ambientes adversos, entre estos polímeros se encuentran los polihidroxicarboxilatos o PHAs.

Y aunque no se han realizado estudios acerca del papel de estos polímeros en suelos con diferente uso o cobertura vegetal, Steinbutchel (1999) y Stekolschik (2006), han encontrado en condiciones in vitro, que estos polímeros incrementan la capacidad de competencia y de supervivencia en comparación con otras bacterias que no pueden polimerizar ni degradar el PHA debido a que sirven como depósito energético cuando en el ambiente próximo al microorganismo escasea algún nutriente esencial, establece el balance hídrico y participa en los procesos de enquistamiento y esporulación que son mecanismos de resistencia al estrés nutricional que ocurre en el suelo.

Teniendo en cuenta los anteriores aspectos, se ha observado la necesidad de evaluar la abundancia de bacterias acumuladoras de polihidroxicarboxilatos del suelo bajo diferentes coberturas vegetales en el Departamento de Nariño.

Para ello se determinó las propiedades físico-químicas del suelo y se cuantificó el número de bacterias PHAs, haciendo uso de diluciones seriadas y siembra por superficie. Entre los resultados más relevantes de este trabajo de investigación se destaca que hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la abundancia de bacterias acumuladoras de polihidroxicarboxilatos; en suelo bajo la cobertura de pinos hay mayor abundancia de bacterias PHAs, menor en el bosque natural secundario y en la zona de pastos aunque la abundancia de bacterias es relativamente baja, la diversidad es la más alta en comparación con las diferentes áreas de estudio.

Por otra parte, entre los aportes teóricos realizados por el presente trabajo se encuentran:

- El tipo de vegetación influye en las propiedades físico-químicas del suelo del Centro Ambiental Chimayoy.
- Las propiedades físico-químicas del suelo influyen en la diversidad y abundancia de las bacterias acumuladoras de polihidroxicarboxilatos (PHAs).

- Se determinó que la abundancia de bacterias acumuladoras de PHAs varía en suelos con diferente cobertura vegetal
- La abundancia de bacterias PHAs del suelo está relacionada con: La acidez, la capacidad de intercambio catiónico y los contenidos de materia orgánica.
- En las diferentes zonas de estudio la mayoría de los aislados bacterianos del suelo son bacilos gram-negativos y hay un morfotipo con mayor abundancia relativa.

Entre los aportes prácticos de esta investigación tenemos:

- Se realizó la caracterización físico-química del suelo en tres zonas con diferente cobertura vegetal del Centro Ambiental Chimayoy.
- Se aportó con 38 colonias acumuladoras de polihidroxicanoatos al cepario de bacterias PHAs del laboratorio de Biotecnología microbiana de la Universidad de Nariño-Pasto-Colombia.
- Se contribuyó al conocimiento acerca de la ecología bacteriana del suelo en el Centro Ambiental Chimayoy

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la abundancia de bacterias acumuladoras de polihidroxicarboxilatos en función de las características físico-químicas de suelos bajo coberturas de bosque natural secundario, plantación de pino y pastos en la vereda de Pinasaco, Departamento de Nariño.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las características físico-químicas del suelo bajo las coberturas de bosque natural secundario, plantación de pino (*Pinus patula Schlecht et Cham.*) y pastos.
- Determinar la abundancia de bacterias acumuladoras de polihidroxicarboxilatos presentes bajo las tres coberturas vegetales estudiadas.
- Relacionar algunos parámetros físico-químicos del suelo con la abundancia de bacterias acumuladoras de polihidroxicarboxilatos en las diferentes áreas de estudio.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 EL SUELO

El suelo es un agregado de minerales no consolidados y de partículas orgánicas producidas por la acción combinada del viento, el agua y los procesos de desintegración orgánica. Estos cambian mucho de un lugar a otro ya que la composición química y la estructura física del suelo en un lugar dado están determinadas por el tipo de material geológico del que se origina, por la cubierta vegetal, por la cantidad de tiempo en que ha actuado la meteorización, por la topografía y por los cambios artificiales resultantes de las actividades humanas (Sandoval, 2003).

Por lo tanto, el suelo puede ser considerado como un sistema dinámico debido a que sus condiciones afectan la disponibilidad de agua y nutrientes que sirven de alimento para animales y microorganismos, además, por medio de las reacciones que ocurren en el, los productos minerales retornan al suelo en los ciclos de los elementos, otorgándole propiedades físicas, químicas y biológicas específicas (Smith y Smith, 2001; Sandoval, 2003).

2.1.1 Origen y factores formadores. Los suelos se han formado a expensas de rocas y depósitos de materiales transportados, los cuales sufren un conjunto de transformaciones de índole física, química y/o biológica que dan lugar a un nuevo material sobre el que se asienta multitud de formas de vida, desde los organismos más pequeños, virus, a los más evolucionados o desarrollados, como el hombre (Leiva, 2000; Fernández, 2003).

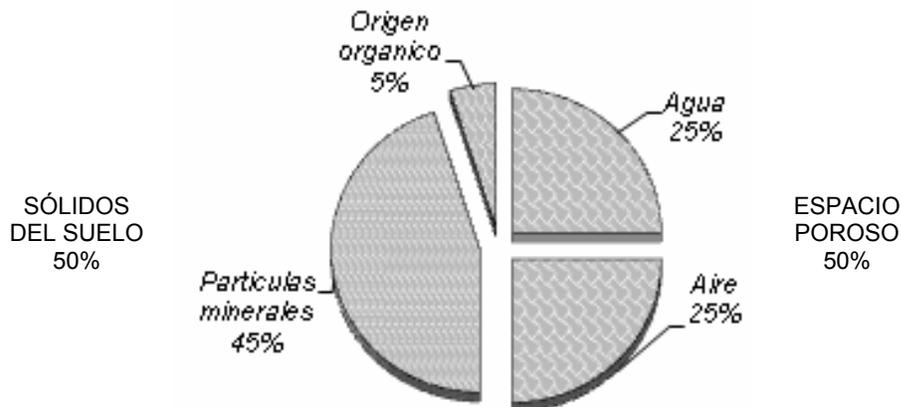
Sin embargo, aunque el proceso de formación del suelo es similar en todos los tipos, sus propiedades no son constantes debido a la acción del conjunto de factores formadores del medio con que son factores que influyen o pueden influir sobre el material original con el potencial de cambiarlo (Smith y Smith, 2001; Jaramillo, 2002). Entre ellos, se encuentran el material original que constituye un elemento pasivo en la formación del suelo porque representa el estado inicial del sistema y sobre el actúan la fragmentación de la materia orgánica, la formación de humus y procesos de meteorización (Jaramillo, 2002; Fernández, 2003). El clima, debido a que la temperatura regula o afecta agentes abióticos como las propiedades físico-químicas del suelo y la solubilidad de nutrientes, afectando notoriamente en la abundancia y diversidad de los organismos (Martín, 1998; Fuentes, 2003).

Otro agente formador es la actividad biológica en donde los micro y macro-organismos facilitan la desintegración de la roca madre y se encargan de las transformaciones bioquímicas que ocurren en el suelo además de que participan

en los procesos de meteorización física, química y biológica y la vegetación que constituye en sí misma un factor determinante en la estructura de las poblaciones microbianas, pues estas son las abastecedoras principales de las fuentes específicas de carbono y energía para todos los seres vivos (IGAC, 1993; Callejas, 2003). Finalmente, la variación de cualquier propiedad del suelo depende finalmente del tiempo que expresa el período durante el cual han actuado los factores formadores anteriormente mencionados (Jaramillo, 2002; Fernández, 2003).

2.1.2 Composición. El suelo es un cuerpo dinámico y viviente que juega un papel importante en los ecosistemas terrestres. Los componentes del suelo incluyen materiales minerales inorgánicos (arena, limo y arcilla), materia orgánica, agua, gases, y organismos vivos; se divide en tres fases: Sólida, líquida y gaseosa, las cuales intercambian constantemente iones y moléculas, otorgándole al suelo propiedades específicas, las cuales son factibles de medir mediante los diferentes procesos físicos, químicos, y biológicos que ocurren en la superficie terrestre (Callejas, 2003; Brissio, 2005) Figura 1.

Figura 1. Composición del suelo



Fuente: Jaramillo, (2002): Introducción a la ciencia del suelo.

2.1.2.1 Fase sólida: Esta fase es considerada como la más estable del suelo, de consistencia heterogénea, formada por constituyentes inorgánico y orgánico, en donde los minerales constituyen la base del armazón que soporta al suelo, integrada por las partículas de arcillas, limos y arenas, que constituyen el 90-99%, y el 10-1% restante corresponde a la materia orgánica a la cual hacen parte todos los residuos de origen vegetal y animal en proceso de descomposición y mineralización (Sandoval, 2003; Brissio, 2005).

2.1.2.2 Fase líquida: Esta fase se encuentra en constante competencia con la fase gaseosa y los cambios climáticos estacionales, básicamente se define como una solución compuesta por agua y solutos disueltos en ella, los cuales circulan a través del espacio poroso del suelo y ocupa cerca del 25% del volumen total del sistema, sin embargo, este porcentaje puede variar dependiendo de las precipitaciones atmosféricas (Jaramillo, 2002; Sandoval, 2003; Brissio, 2005).

2.1.2.3 Fase gaseosa: Conocida también como atmósfera del suelo, representa alrededor del 25% del volumen total, y comprende el espacio poroso que permite la circulación del aire y el agua para que las raíces de las plantas y los microorganismos puedan llevar a cabo diferentes procesos biológicos, tales como respiración, transpiración, procesos de mineralización y oxidación; los cuales están determinados por el consumo de Oxígeno y por la producción de CO₂ (Sandoval, 2003; Brissio, 2005).

2.1.3 Perfiles del suelo. El suelo está formado por una sucesión de capas superpuestas que se llaman estratos u horizontes y usualmente se reconocen cinco tipos: El horizonte O compuesto por restos orgánicos, el horizonte A que constituye el suelo mineral, el horizonte E donde se acumulan partículas de arena y limo, el horizonte B incluye las capas en las cuales tiene lugar la sedimentación de materiales provenientes de las capas anteriores y el horizonte C que constituye el material parental del que se originó el suelo (Carrillo, 2003; Fuentes, 2003; Navarro, 2005).

La descripción del perfil de suelo permite establecer su génesis, su clasificación taxonómica, la caracterización de sus propiedades e identificar limitantes del uso, cabe mencionar que como regla general el contenido de materia orgánica y la actividad biológica decrecen con la profundidad (Jaramillo, 2002; Smith y Smith, 2001).

2.1.4 Propiedades del suelo. En el suelo, conforme actúan factores y procesos formadores, va adquiriendo una amplia gama de propiedades que ejercen cierta influencia en el funcionamiento de su ecosistema y permiten conocer la manera óptima de manejar este recurso; dichas propiedades se pueden clasificar en físicas, químicas y biológicas (Jaramillo, 2002; Fernández, 2003; Dorronsoro, 2006).

2.1.4.1 Propiedades físicas: El suelo físicamente es considerado como una mezcla porosa de partículas inorgánicas, materia orgánica descompuesta, aire y agua; esta composición determina las propiedades físicas como el color, la textura, la estructura entre otras. Además están relacionadas con los procesos químicos y biológicos que ocurren constantemente en el sistema edáfico (Fuentes, 2003; Garveba, 2004).

Entre estas propiedades se encuentran:

2.1.4.1.1 Color: Esta propiedad nos permite tener una idea de las diferentes características del suelo, por ejemplo, colores oscuros se relacionan con altos niveles de descomposición de materia orgánica y una buena estructuración del suelo, los colores marrones se asocian con la presencia de materia orgánica ácida parcialmente descompuesta y combinaciones de óxidos de Hierro con materiales orgánicos, los colores grises indican que el suelo ha estado en contacto con agua durante largos periodos de tiempo, los colores entre rojos y pardos se asocian a procesos de alteración de los materiales parentales bajo diferentes condiciones como la temperatura alta, baja actividad del agua, rápida incorporación de materia orgánica, entre otros (Fernández, 2003; Fuentes, 2003; Ovalles, 2003).

2.1.4.1.2 Textura: Es la relación entre la proporción relativa y la distribución de los componentes minerales del suelo: Arcilla, limo y arena. Con respecto a la cantidad se divide en suelos arenosos en aquellos con mayor proporción de la fracción arena, arcillosos con mayor proporción de la fracción arcilla y francos los que contiene cantidades aproximadamente iguales de arena arcillas y limos (Fuentes, 2003; Fernández, 2003).

2.1.4.1.3 Estructura: Se refiere al aspecto que presenta el suelo de acuerdo a la forma, tamaño y distribución espacial de los agregados (Carrillo, 2003; Brissio, 2005). Tiene influencia directa en propiedades como: Porosidad, densidad aparente, régimen hídrico, régimen térmico, permeabilidad, aireación, distribución de la materia orgánica, intercambio gaseosa, desarrollo de las raíces, movimiento del agua y erosión del suelo, entre otra. Cabe destacar que cuando las propiedades anteriormente mencionadas están en una adecuada proporción, el suelo se vuelve macizo, sin grietas y la estructura no se ve afectada, pero cuando existe algún desequilibrio entre estas propiedades el suelo presenta un aspecto seco y se agrieta (Callejas, 2003; Navarro, 2005).

2.1.4.1.4 Densidad aparente: Se define como la masa por unidad de volumen y refleja la porosidad, el grado de compactación, el nivel de deterioro del suelo y la facilidad de circulación de agua y de aire, puesto que los residuos vegetales y animales reducen el valor de la densidad aparente, teniendo en cuenta que a medida que aumenta su valor, se está produciendo una degradación de la estructura del mismo, bien sea por compactación o por pérdida de la materia orgánica. La densidad aparente se tiene influencia directa en diversas propiedades, entre las cuales se encuentran: Textura, estructura, contenido de materia orgánica, humedad y grado de compactación (Jaramillo, 2002; Fernández, 2003; Callejas, 2003).

2.1.4.2 Propiedades químicas: Se refiere a los materiales circulantes del suelo y son afectados por el clima y el tiempo transcurrido desde la transformación de material original, influyen en la capacidad de los suelos para el almacenaje, filtraje

y descomposición de los compuestos químicos tóxicos o potencialmente tóxicos, igualmente afectan la disponibilidad de nutrientes para las plantas y otros organismos (Jaramillo, 2002).

Entre estas propiedades se encuentran:

2.1.4.2.1 pH del suelo: Es una característica que mide la concentración de hidrogeniones en el suelo y por presentar una fuerte resistencia a ser modificado, es considerada como una de las propiedades químicas más importantes, debido a que establece el grado de acidez o alcalinidad y tiene una gran influencia en muchas de las características físicas, químicas y biológicas del suelo, su importancia radica en que su valor produce diferentes efectos en los diferentes niveles de organización de la materia viva ya que influye en la actividad enzimática, la disponibilidad de nutrientes esenciales que pueden actuar como limitantes para el crecimiento microbiano y la movilidad de metales pesados tales como el cobre y el aluminio que son tóxicos para la mayoría de microorganismos entre otros (Jaramillo, 2002; Brissio, 2005; Agropec-Star, 2002).

Entre los factores naturales que influyen en el pH del suelo, se encuentran la velocidad de descomposición de la materia orgánica, la naturaleza de la roca madre, la profundidad del suelo, el tipo de vegetación presente, el clima de la región y la precipitación que produce la salida de nutrientes básicos (como las bases de cambio Calcio, Magnesio o Potasio) o ácidos (Cobre, Hierro, Manganeseo y Aluminio).

2.1.4.2.2 Contenido de humedad: Esta es una propiedad que presenta una alta variabilidad, debido a que depende de la composición del suelo, de la lluvia, del drenaje y de la cubierta vegetal. Su importancia radica en que contiene diversos materiales disueltos, cuya mezcla se conoce como solución del suelo. El agua puede encontrarse en el suelo de dos maneras: Por adsorción sobre las superficies y como agua libre formando láminas o películas entre las partículas del suelo (Madigan y col., 1998).

Cabe mencionar que los suelos neutros de bosque o pastos con alto contenido de humedad presentan recuentos de organismos bacterianos superiores a los suelos áridos y con alto contenido de sustancias alelopáticas, ya que estos suelos son los menos propicios para la proliferación de organismos quimio-organotrofos (Grant y Long, 1989).

2.1.4.2.3 Iones asociados a coloides: Son todos aquellos elementos y moléculas que no son parte constitutiva de las fracciones minerales u orgánicas, y pueden encontrarse como iones solubles en la solución del suelo o bien formando precipitados. Los cationes (iones con carga positiva) que se asocian a las arcillas minerales y a la materia orgánica humificada (Ej. complejo coloidal) se les denomina como "cationes de intercambio" (Ej. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) y los aniones,

tales como sulfatos, nitratos, cloruros y fosfatos, también pueden ser retenidos por el complejo coloidal aunque los mecanismos de retención son diferentes y algunas veces más complejos (Fuentes, 2003).

2.1.4.2.4 Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC): Se refiere a la capacidad que tiene el suelo a retener cationes intercambiables, cabe anotar que su valor varía según el tipo de suelo ya que depende básicamente del pH del suelo, el contenido de materia orgánica, de la cantidad y el tipo de arcilla presentes en el suelo, por lo tanto, en un suelo que tiene alto contenido de arcillas y materia orgánica humificada en el suelo, posee mayor capacidad de intercambio catiónico, en comparación a un suelo arenoso y con bajos contenidos de materia orgánica (Agropec-Star, 2002; Fuentes, 2003).

2.1.4.2.5 Nutrientes del suelo:

2.1.4.2.5.1 Fósforo (P): En el suelo se encuentra en forma orgánica y mediante la meteorización de los minerales debido a la descomposición de la materia orgánica se vuelve disponible reponiendo así el Fósforo de la solución del suelo y la forma inorgánica es una fuente de energía para los microorganismos y las plantas (Equipo del proyecto fertilizar - inta pergamino, 2006; Agropec-Star, 2002; Dorronsoro y García, 2006).

2.1.4.2.5.2 Potasio (K): Este elemento alcanza en la litosfera una concentración media de 1,58%; se ha encontrado que la cantidad de este elemento es relativamente alta en la mayoría de los suelos de clima frío a templado y sus existencias son bajas en suelos cálidos y tropicales debido al alto grado de meteorización, además presenta una relación directa con el pH y la disponibilidad de Fosforo orgánico en el suelo (Abocol, 2004; Delgado, 2005).

2.1.4.2.5.3 Calcio (Ca): En el suelo no se encuentra en forma natural, sino formando compuestos que constituyen el 3,63% de las rocas ígneas y 3,22% de la corteza terrestre, la principal fuente son los feldespatos, la apatita, la dolomita y la calcita. En el suelo se presenta como carbonato de Calcio o sulfato de Calcio, también se presenta como ión en la materia orgánica y como catión intercambiable Ca^{2+} en la solución del suelo y su cantidad fluctúa entre 0.1 - 25%, cabe resaltar que este nutriente está gobernado por los fenómenos de intercambio cationico al igual que los otros cationes, y se mantiene adherido como Ca^{2+} intercambiables en la superficie de los coloides cargados negativamente (Agropec-Star, 2002; Fernández, 2003; Abocol, 2004).

2.1.4.2.5.4 Magnesio (Mg): El contenido promedio de este elemento en la litosfera es de 2,68%, proviene de la meteorización de rocas que contienen minerales como biotita, dolomita y clorita, y varía según el origen geológico del suelo. En la naturaleza está presente bajo formas no intercambiables y solubles en agua, por su condición de catión, el Mg^{2+} está sujeto a intercambio catiónico, que

generalmente se encuentra en la solución del suelo y se absorbe en las superficies de las arcillas y la materia orgánica (Fernández, 2003; Agropec- Star, 2002).

2.1.4.2.5.5 Aluminio (Al): Generalmente se encuentra en estado libre por tener una consistencia reactiva, y en estado de combinación constituye cerca del 7.5 % en peso de la corteza terrestre, donde es el elemento metálico más abundante. En el suelo la mayor parte de este elemento se encuentra inmovilizado y en forma de óxidos y silicatos de Aluminio, compuestos que no pueden ser absorbidos por los vegetales, no obstante si las condiciones ambientales cambian, este Aluminio puede llegar a solubilizarse y ser incorporado a los ciclos bioquímicos (Driscoll, y col., 1988; Haug, 1984).

2.1.4.2.5.6 Zinc (Zn): Se concentra en los horizontes altos debido a que el Zinc presenta baja movilidad descendente en el perfil a diferencia de otros elementos, debido a que queda fijado por la materia orgánica, las arcillas, los óxidos e hidróxidos de Hierro y los residuos de las plantas que se depositan en la superficie, donde proporcionan pequeñas cantidades de este elemento. Su disponibilidad disminuye en suelos arenosos, pobres en materia orgánica y aumenta en suelos ácidos, de textura fina (Lucena, 2000; Fernández, 2003).

2.1.4.2.5.7 Nitrógeno (N): El suelo contiene una proporción relativamente alta de N orgánico (proteínas, en ácidos nucleicos, azúcares, etc.), no soluble que representa entre el 85 al 95% del total de N en el suelo y una pequeña proporción de N inorgánico que es disponible en el suelo (NH_4^{4+} , NO_3^{-} , NO_2^{-} , etc.), representa tan solo del 2 al 3 %. Sin embargo, estos porcentajes tienden a disminuir con la profundidad, las altas temperaturas de los suelos, la disponibilidad de materia orgánica y las precipitaciones atmosféricas (Dorrnsoro y García, 2006).

Existen dos procesos mediante el cual el nitrógeno puede ser aprovechado por las plantas y los organismos del suelo: Uno de ellos es la mineralización en donde se convierten las formas orgánicas no disponibles a formas disponibles para las plantas y demás organismos del suelo y la inmovilización, que es el proceso inverso a la mineralización en donde se convierte de una manera inorgánica del nitrógeno a formas orgánicas de manera que no quedan disponibles para los organismos del suelo, este proceso ocurre cuando el contenido de nitrógeno en los residuos es bajo y los microorganismos aprovechan el nitrógeno disponible para satisfacer sus necesidades vitales (Agropecstar, 2002)

2.1.4.2.5.8 Carbono (C): La captura de este elemento en el suelo, es mediante la transformación del carbono del aire en carbono orgánico, almacenado en el suelo. Los niveles del CO_2 atmosférico pueden reducirse en la medida que los niveles de carbono orgánico del suelo aumentan. El almacenamiento de este elemento depende de las variables climáticas (temperatura del suelo y precipitación) y del contenido de arcilla en el suelo (Espinoza, 2005; Zamorano, 2002).

Cumple funciones específicas e importantes en el crecimiento poblacional de las bacterias; una abundante cantidad de carbono en el suelo puede desarrollar alta actividad metabólica, obteniendo por consiguiente un despliegue reproductivo, ya que este elemento actúa como reserva energética permitiendo a las bacterias sobrevivir en periodos de estrés ambiental (Zamorano, 2002).

2.1.4.2.5.9 Relación Carbono/Nitrógeno (C/N): Es un parámetro que evalúa la calidad de los restos orgánicos de los suelos. La importancia de la relación Carbono-nitrógeno radica en que la acción microbiana puede mineralizar o inmovilizar el nitrógeno. La cantidad de nitrógeno que necesita la población microbiana es proporcional a la cantidad de carbono que ingresa a él. La materia orgánica con una relación C/N amplia (mayor que 20:1) favorecen la inmovilización, pero si la relación C/N baja (inferior a 20:1) tienden a una más rápida mineralización. Las relaciones C/N entre 20 y 30:1 favorecen los dos procesos por igual, sin embargo, una relación C/N de alrededor de 32:1 constituye el punto de equilibrio para la descomposición de los materiales orgánicos en pocas semanas (Agropec- Star, 2002; Sandoval, 2003; Dorronsoro y García, 2006).

2.1.4.2.6 Materia orgánica: Las raíces, tallos, restos de hojas, flores, los materiales orgánicos lavados procedentes de la parte aérea de la planta, los exudados de las raíces, animales y microorganismos muertos conforman la materia orgánica del suelo; no obstante la principal fuente la constituyen los residuos vegetales, los cuales aportan energía y alimento a los organismos del suelo, al tiempo que son la materia prima para la formación de los coloides orgánicos (humus) que se acumulan en la capa superficial. La descomposición en mayor o menor grado de estos seres vivos, es provocada por la acción de los microorganismos o por factores abióticos que dan lugar a un abanico muy amplio de sustancias en diferentes estados que son los constituyentes principales de coloides del suelo (Bures, 1999; Romera y Guerrero, 2006; Dilly y col., 2004).

La materia orgánica es considerada como material dinámico termodinámicamente inestable, que se encuentra ligada a los ciclos del Carbono, Nitrógeno, Fósforo, Azufre, Hierro y Manganeseo en el suelo, y a otros muchos procesos que puede llegar a estabilizarse en función de los parámetros ambientales (temperatura, pH, humedad, contenido iónico, poblaciones de microorganismos, etc.) (Martín, 1998; Bures, 1999). Además influye en las propiedades físicas y químicas del suelo, por ejemplo: aumenta la porosidad, incrementa la humedad, limita el arrastre de partículas del suelo, aumenta la CIC, permitiendo que queden en posición de cambio varios nutrientes esenciales tales como el Nitrógeno (N), el Fósforo (P), el Azufre (S) y algunos elementos menores, como el Cobre (Cu) y el Boro (B), evitando por tanto que se produzcan pérdidas de nutrientes en el suelo (FAO, 2000; Nave y García, 1990; Giner, 2004; Sandoval, 2003).

Nave y García (1990), en su estudio sobre la dinámica de la materia orgánica con énfasis en suelos de Ando, recopiló varias teorías que en general tratan de

explicar la acumulación de la materia orgánica y su bajo grado de mineralización encontrando que la absorción de sustancias húmicas por las arcillas alofónicas, inducen una baja actividad enzimática por parte de los microorganismos del suelo, debido a que disminuyen la posibilidad de ataque microbiano y la consecuente mineralización ya que la formación de complejos insolubles, entre ellos los óxidos de hierro y aluminio y los compuestos orgánicos en procesos de transformación al igual que el material proveniente de pinos son relativamente difíciles de descomponer.

2.2 BACTERIAS DEL SUELO

Las bacterias son organismos procariotas unicelulares que se encuentran en el suelo en gran cantidad, ellas son más pequeñas que los organismos eucariotas y poseen una estructura celular mucho más simple. No obstante, su pequeño tamaño no impide que las bacterias sean extremadamente versátiles metabólicamente y utilicen diferentes sustratos en los diversos procesos involucrados en la obtención de energía, la mayoría de las bacterias de suelo son heterótrofas, es decir se alimentan de la materia orgánica o a través de la formación de asociaciones simbióticas, existen otras especies que son autótrofas y muchas otras son saprofitas ó endofíticas y un número limitado puede causar enfermedades a las plantas, a los animales y a los humanos (Sylvia y col., 1995; Zamorano, 2002).

A través de las actividades metabólicas que realizan las bacterias, es posible convertir las moléculas orgánicas complejas de plantas y residuos de animales en dióxido de Carbono, agua, amonio y otros nutrientes inorgánicos simples como el Azufre y el Fosforo, de esta forma retornan estos nutrientes al suelo de manera que plantas y microorganismos del suelo puedan utilizarlos. Pero no todos los nutrientes productos de la descomposición de la materia orgánica son liberados para que otros organismos puedan utilizarlos. Las bacterias utilizan algunos de estos nutrientes como reserva para su crecimiento y supervivencia. Como resultado de esto, las bacterias juegan un papel central en la descomposición de la materia orgánica, ciclaje de nutrientes y la formación del suelo (Sylvia y col., 1995).

2.2.1 Distribución y abundancia de bacterias del suelo. La cantidad y el tipo de bacterias están determinados en gran medida por el tipo y el uso del suelo; reportes indican que en áreas cultivadas y en zonas vírgenes el número de microorganismos es mayor que en gran parte de los diferentes sistemas forestales, como resultado de una alta densidad de raíces y una elevada cantidad de materia orgánica disponible (Mayer, 1992), también depende de los sustratos que compongan el suelo, mientras algunos microorganismos actúan sobre un sustrato, otros se desarrollan en los productos de la transformación. Cuando terminan su función sobre la degradación del sustrato, los grupos microbianos que estaban actuando principalmente disminuyen al máximo, se reproducen o entran

en latencia y se incrementa la población de otras bacterias que cumplirán funciones de transformación de los productos del metabolismo del grupo microbiano anterior. Por consiguiente las bacterias tienen especial importancia en la relación suelo-planta y son responsables del incremento o disminución en el suministro de nutrientes (Delgado, 2005).

Las bacterias y hongos son los organismos dominantes con respecto a la biomasa y la actividad metabólica en todos los suelos, pueden ser afectados de una o varias maneras por los factores químicos, físicos y biológicos, presentes en el ambiente en los que se encuentra como por ejemplo: el pH, humedad, fertilidad, disponibilidad de nutrientes, contenido de materia orgánica, contenido de residuos, temperatura, porosidad del suelo, entre otros (Acevedo, 1993; Zamorano, 2002). Normalmente se asume que el carbono es el factor que influye en el crecimiento microbiano en el suelo, aunque también se ha informado que el nitrógeno y el fósforo también pueden actuar como elementos limitantes. Por consiguiente es probable que diferentes sustancias actúen como inhibidores en diferentes suelos y que estas condiciones varíen con el tipo de organismo, el tiempo y las condiciones ambientales presentes en la zona (Alden, Demoling y Baath, 2001).

2.2.3 Análisis microbiológico del suelo. Las bacterias del suelo pueden estudiarse utilizando una batería de procedimientos de microbiología clásica que comprenden procesos de enriquecimiento para facilitar la detección de bacterias poco frecuentes, los estudios preliminares realizados permiten realizar predicciones simples sobre las dinámicas de las poblaciones microbianas del suelo y sobre su influencia en los procesos de descomposición de material orgánico (Grant y Long, 1989; Delgado, 2005).

Entre las técnicas más utilizadas para el estudio de bacterias de suelo se encuentran:

2.2.3.1 Técnica de la laminilla en contacto: es una manera sencilla de evaluar cualitativamente relaciones espaciales entre microorganismos del suelo. Aunque esta técnica no es confiable para la enumeración, es útil para ilustrar la orientación de unos microorganismos con otros en las partículas de suelo. La técnica consiste en el enterramiento de laminillas de cristal en el suelo por un periodo de tiempo definido. Luego de incubar la laminilla se fija con ácido acético, seguido de una tinción que proveerá suficiente contraste para ser examinadas bajo el microscopio (Fuentes y Massol-Deyá, 2002).

2.2.3.2 Mineralización de sustratos orgánicos: mide la actividad metabólica de microorganismos heterotróficos. La mineralización se define como la degradación completa de un compuesto a sus constituyentes minerales, en donde el Carbono orgánico es oxidado hasta CO_2 . Dado que la descomposición de un sustrato orgánico por medio del proceso de respiración aeróbica tiene como productos principales a CO_2 y H_2O , la evolución de CO_2 puede utilizarse como un indicador

bastante preciso de la actividad respiratoria de comunidades en agua y suelo. Dicho objetivo se cumple en la medida que el ensayo de mineralización es realizado bajo condiciones aeróbicas (Fuentes y Massol-Deyá, 2002).

2.2.3.3 Método de número más probable (NMP): es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia (pos o neg.) en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes. Por lo tanto, un requisito importante de este método es la necesidad de poder reconocer un atributo particular de la población(es) en el medio de crecimiento a utilizarse. El estimado de densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en diluciones seriadas y el uso de una tabla probabilística (Fuentes y Massol-Deyá, 2002).

Algunas de las ventajas del NMP son: la capacidad de estimar tamaños poblacionales basados en atributos relacionados a un proceso (selectividad); por ejemplo se puede determinar la densidad poblacional de organismos que pueden nodular leguminosas en una muestra de suelo usando el método de infección de plantas, provee una recuperación uniforme de las poblaciones microbianas de suelos diversificados, determina sólo organismos vivos y activos metabólicamente, y suele ser más rápido e igual de confiable que los métodos tradicionales de esparcimiento en platos de cultivo, entre otros (Olalde, 1998).

2.2.3.4 Extracción y derivatización de ácidos grasos totales: perfiles de ácidos grasos derivados de los fosfolípidos de membranas celulares de microorganismos pueden ser utilizados para estimar biomasa microbiana.

Además, estos perfiles proveen información sobre la estructura taxonómica, diversidad funcional y estatus nutricional de comunidades microbianas. Por ejemplo, perfiles de ácidos grasos han sido usados para distinguir entre comunidades microbianas de suelos sujetos a diferentes tratamientos agrícolas. La extracción y análisis de ácidos grasos de organismos puros cultivados bajo condiciones estándares proveen información suficiente para el reconocimiento e identificación a nivel de especies o subespecies (Fuentes y Massol-Deyá, 2002).

2.2.3.5 Biomasa: extracción y cuantificación de ácidos Desoxy-ribonucleicos (ADN) totales: Una forma rápida para estimar la biomasa total presente en una muestra es mediante la extracción y cuantificación de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) totales. Sólo organismos vivos y viables poseen ácidos nucleicos por lo que el análisis de este constituyente celular es representativo de la abundancia de organismos en un ambiente natural. En términos generales, las células son quebrantadas y homogenizadas con enzimas y detergentes. El ADN puede entonces ser precipitado, separado del debris celular y cuantificado por espectrofotometría (Fuentes y Massol-Deyá, 2002).

2.2.3.6 Test de cutizina y celulosa: Esta técnica es utilizada para evaluar la intensidad de la actividad celulolítica y proteolítica de los microorganismos en el suelo. En este Test, los sustratos de celulosa (papel filtro) y proteína (cutizina) son depositados en una bolsa de malla de PVC para luego ser enterrados a una profundidad de 100 mm. Después de un tiempo determinado de exposición, las pruebas son recuperadas del suelo, y los sustratos son procesados en laboratorio. La tasa de descomposición de celulosa y cutizina (mg/g/día) es calculada según la ecuación de Wiegert y Evans (Meneses, 2005. citado en Bello, 2006).

2.2.3.7 Método de diluciones sucesivas: Consiste en tomar una muestra de suelo, la cual se seca al medio ambiente y se diluye en agua destilada estéril de forma sucesiva hasta llegar a la más baja concentración. De esta última suspensión se toman alícuotas que se cultivan en medios de cultivos específicos para cada microorganismo (Bello, 2006).

Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo (UFC g⁻¹ de suelo), es una de las unidades en que se expresa la población de microorganismos encontrados en el suelo. Puede definirse como la cantidad de colonias que se desarrollan sobre un medio de cultivo sólido (agar, principalmente) provenientes de la siembra de un extracto de suelo con una determinada dilución, contadas en un plato de petrí en el que se puedan contar fácilmente entre 30 y 300 colonias individuales. El valor correspondiente a UFC es el número de colonias contadas multiplicado por la potencia de 10 positiva de la dilución en la que se hizo el conteo. Por ejemplo, si se contaron 8 colonias en la caja correspondiente a la dilución de 10⁻⁶, hay 8x10⁶ UFC (Jaramillo, 2002).

2.3 BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

En la dinámica de la tierra existen factores que restringen el crecimiento bacteriano que ha permitido que estos microorganismos evolucionen con el fin de poder sobrevivir en ambientes con deficiencia de nutrientes. Una de las características es la de almacenar en forma de inclusiones de reserva y gránulos de material orgánico o inorgánico. Estos se encuentran en la matriz citoplasmática y pueden ser visibles a menudo con el microscopio de luz. Algunos no están rodeados por una membrana y permanecen libres en el citoplasma por ejemplo, gránulos de polifosfato, cianoficina y de glucógeno. Otros están rodeados por una membrana unitaria de una sola capa de aproximadamente 2.0 a 4.0 nm de grosor por ejemplo, los gránulos de polihidroxicanoatos, Azufre, carboxisomas y vacuolas de gas. Debido a que algunos cuerpos de inclusión se utilizan como cuerpos de almacenamiento, su cantidad varía dependiendo del estado nutricional de la célula (Prescott y col. 1998; Alden, Demoling y Baath, 2001).

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros que se acumulan en forma de 8 y 12 gránulos intracitoplasmáticos, miden 0.2 - 0.7 µm de diámetro y están provistos de una monocapa de fosfolípidos de unos 3 a 4 nm de grosor. 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 Azufre, Nitrógeno o Fósforo (Barnard, 1999; Almeida y col., 2004). De esta manera si el Carbono se agota o se suministra el nutriente faltante, el PHAs es entonces utilizado como fuente de Carbono y energía en diferentes procesos vitales que contribuyen a la supervivencia de la bacteria y en los mecanismos de resistencia al estrés, como por ejemplo la esporulación, o la eliminación de compuestos tóxicos (Stekolschik, 2006).

Por lo tanto las bacterias ya sean aeróbicas, anaeróbicas, heterótrofas y fotosintéticas son capaces de acumular PHAs, incluso algunas acumulan hasta el 90 % de su peso seco (Kawaguchi y Doi, 1992). Según Rothermich y cols., (2000), los polihidroxicanoatos (PHAs) son compuestos lipídicos lineales de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo ester con el grupo hidroxilo del monómero siguiente y se producen en la entrada de la fase estacionaria. La determinación de diferentes condiciones para la síntesis de PHAs, permite comprender los mecanismos que emplean las bacterias para sobrevivir en ambientes cambiantes y brinda el conocimiento necesario para optimizar los métodos de producción de PHAs (Stekolschik, 2006).

Los recientes trabajos de investigación hacen pensar en una asociación del PHAs con la respiración y la fosforilación oxidativa, sin embargo poco es conocido sobre el papel ecológico de PHAs en las poblaciones bacterianas de ecosistemas naturales. Aunque se ha descubierto bacterias productoras de PHAs en varios ambientes, entre los cuales se destacan; los estuarios, sedimentos intermareales, acuíferos, arenas ricas en yeso del nuevo México, lodo de alcantarillado, ríos, lagos, nódulos de la raíz, esferas microbianas, los sedimentos del mar profundo y en depósitos hidro-térmicos de tierra. También se han analizado varios aspectos de la cubierta de PHAs, con el fin de entender mejor los procesos fisiológicos medioambientales de las procariotas como la esporulación, la resistencia a la inanición, la respuesta a condiciones de tensión, el metabolismo oscuro de bacterias de Azufre purpúreas, la fijación de Nitrógeno y la modulación asociada para reducir poder energético. En ecosistemas naturales complejos, sin embargo, la evidencia experimental para confirmar tales funciones es muy difícil de obtener y por consiguiente es bastante escaso (Rothermich, 2000).

El primer PHAs descubierto fue el poli (3-β-hidroxi butirato) (PHB), en 1925 por el microbiólogo francés Maurice Lemoigne, un homopolímero detectado en la especie *Bacillus megaterium* que era el polímero ubicuo en la naturaleza (Almeida y col., 2004). Posteriormente, se encontraron inclusiones de PHAs en una extensa variedad de especies bacterianas, Findlay y White (1983) citado por Rothermich (2000), informaron que el polihidroxi butirato (PHB) era el polímero de almacenamiento de lípidos que rutinariamente se ha descubierto en la naturaleza. Entre las técnicas de análisis más contemporáneas que emplean cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y las espectroscopias de

masa, generalmente revelan que la presencia de PHAs en la naturaleza se encuentra de forma compleja; Chia-Yin L. y col., (2000) menciona que en muestras medioambientales como en lodo del alcantarillado, biomasa cianobacterial, los sedimentos ricos en yeso, y sedimentos del estuario, las unidades repetidoras de 3-hidroxivalerato (HV) eran más prevalecientes que 3-hidroxibutirato (HB) como unidades repetidoras.

2.3.1 Funciones del PHAs. Cuando en el ambiente próximo al microorganismo escasea algún nutriente esencial y hay exceso de carbono, las bacterias sintetizan PHAs como depósito energético, por lo tanto si el Carbono se agota, o se suministra el nutriente faltante, el PHAs es entonces utilizado como fuente de Carbono y energía en diferentes procesos vitales para la supervivencia de la bacteria como por ejemplo el enquistamiento y la esporulación (Stekolschik, 2006; Anderson y Dawes, 1990; Henrysson y McCarty 1993; Godoy y col., 2003).

La síntesis de PHAs está involucrada en procesos de diferenciación celular, por ejemplo, en algunas especies del género *Bacillus*, el PHA sirve como fuente de Carbono y energía para la formación de esporas. En *Azotobacter vinelandii* el metabolismo de PHA está ligado con el proceso de diferenciación que da como resultado la formación de quistes resistentes a la desecación (Segura, 1998).

Al analizar la supervivencia de *Bacillus megaterium* utilizando microcosmos de suelo se determinó que la síntesis y utilización del polímero aumentaba la supervivencia y la capacidad de competencia bacteriana en ambientes naturales (López y col., 1998).

Ruiz (2001), menciona que la expresión fenotípica de este polímero está regulada por un gen pleiotrópico que codifica para cambios en la morfología de la célula, desarrollar tolerancia a tensión y a la supervivencia de bacterias en estado de inanición. Sin embargo se piensa que su función primordial es básicamente actuar como reserva de almacenamiento en células procariotas (Steinbüchel, 1999; Chia-Yin, 2000).

En bacterias fijadoras de nitrógeno, estos gránulos son utilizados específicamente en la protección de la nitrogenasa ya que el PHA permite la protección contra el oxígeno en ausencia de una fuente de carbono exógeno, porque le provee a la célula una fuente de energía y carbono rápidamente oxidable, permitiendo mantener una tasa respiratoria adecuada para disminuir la concentración de oxígeno (Lee, 1996).

2.3.2 Síntesis de PHAs. Desde hace tiempo se sabe que las bacterias cuentan con sistemas que los protegen de las condiciones adversas del medio que los rodea; uno de estos mecanismos de protección, denominado “respuesta general al estrés”, se activa en determinado tipo de bacterias ante distintas situaciones de estrés ambiental, como cambios bruscos de temperatura o escasez de nutrientes.

Este sistema está dirigido por la proteína “sigma S”, cuya función es controlar la expresión de los genes involucrados en la respuesta al estrés. Otro método de protección bacteriana es la “respuesta estricta”, que se caracteriza por reaccionar al estrés mediante un aumento en la concentración intracelular de tetra fosfato de guanosina (ppGpp), una molécula que regula la expresión de varios genes, entre ellos el *rpoS*, que es el que codifica la síntesis de sigma S. Este conocimiento previo, sumado a los resultados de experimentos anteriores, confirma que los PHAs favorecen la supervivencia y la resistencia al estrés (Steinbüchel, 1999; Stekolschik, 2006).

En condiciones de laboratorio algunas bacterias crecen en medios con limitaciones de fuente de nitrógeno, pero con una relación abundante de las fuentes de carbono y energía. En esta situación se detiene prácticamente la síntesis de proteínas y ácidos nucleídos, la mayor parte del carbono asimilado se convierte rápidamente en estos materiales de reserva. Cuando estas células se pasan a un medio rico en nitrógeno, pero carente de fuente de carbono, las inclusiones se usan como fuente interna de este elemento para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Las bacterias nitro fijadoras, en particular, acumulan éstos polímeros como estrategia de supervivencia y de regulación del metabolismo energético, tanto en simbiosis como en vida libre (Steinbüchel, 1999; Martínez y col., 2004).

En la actualidad, se han caracterizado diferentes vías de producción de PHAs en varios grupos microbianos. La vía más común es cuando el polímero se sintetiza mediante un camino metabólico que involucra tres enzimas: una β -cetotiolasa, que condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, una acetoacetil-CoA reductasa, que convierte este compuesto en 3-hidroxi butiril-CoA, y una polimerasa. Este camino metabólico es el que utilizan la mayoría de las bacterias productoras de PHB, tales como *Ralstonia eutropha*. De la misma manera en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, el flujo de carbono está influenciado por las condiciones de crecimiento y los dos ciclos pueden competir por un metabolito inicial común, el acetil CoA. Sin embargo la función del PHA, en el metabolismo celular en especies de *Rhizobium* no ha sido definida (Encarnación, 1995; Almeida y col., 2004).

Henderson y Colen (1997), informaron que durante la producción de PHA a partir de glucosa por *Alcaligenes eutrophus*, el azúcar entra a la célula por un sistema de transporte aún no identificado, es catabolizada por la vía Entner-Doudoroff y el complejo piruvato-deshidrogenasa que genera dos moléculas de acetil-CoA, justificando la mayor producción con esta fuente carbonada

2.3.3 Degradación de polihidroxicanoatos. En la naturaleza los microorganismos son capaces de degradar los PHAs hasta CO₂ y agua, mediante la acción de PHAs despolimerasas y PHAs hidrolasas extracelulares (Almeida y col. 2004) La síntesis y degradación de PHAs, se debe gracias al ciclo de los ácidos

tricarboxílicos, en donde la coenzima acyl (acetyl-CoA) y los precursores son convertidos por sendas metabólicas en variedades diferentes de PHAs como por ejemplo el poli- β -hidroxibutirato (PHB), poli- β -hidroxibutirato-co-valerato (P(HB-co-HV)) y poli- β -hidroxihexanoato-co-octanoato (P(HHx-co-HO)), el copolímero (butirato-valerato) (poli(HB-co-11%HV)), entre otros. Con la acumulación de estos compuestos se incrementa la supervivencia bacteriana y en un determinado tiempo o periodo, se da la despolimerización o degradación de PHAs cuando la coenzima acyl-CoAs y acetyl-CoA se metabolizan y siguen su curso normal del ciclo obteniendo una fuente de carbono y energía (Ruiz, 2001).

2.3.4 Técnicas analíticas para la detección del PHAs.

2.3.4.1 Métodos cualitativos.

Son preparaciones convencionales de microscopía óptica, electrónica y tratamiento de imágenes con el fin de estudiar la ultra estructura de los PHAs y compuestos relacionados, brindando información valiosa referente a los aspectos citológicos del polímero como: Dimensión, localización dentro de la célula en varios estadios fisiológicos y condiciones de cultivo (Mayer, 1992).

Las técnicas de microscopía crioelectrónicas son apropiadas para una descripción confiable de la estructura, pero los resultados deben ser cuidadosamente interpretados, porque los compuestos que forman parte de los gránulos tienden a alterarse artificialmente durante el congelamiento de la muestra (Gerngross y Martín, 1995). La microscopía electrónica de alta resolución, ha permitido la visualización directa de los planos del enrejado que forma el copolímero (Revol, 1989).

Ostle y Holt (1982), mencionan que las inclusiones intracelulares pueden ser observadas en el microscopio como cuerpos brillantes o con una fluorescencia de color naranja, luego de haber sido teñidas con azul de nilo o rojo de nilo, aunque cabe mencionar que este último colorante es más específico para PHA debido a que el azul de nilo se disuelve fácilmente en los ácidos grasos coloreándolos de azul, mientras que el rojo nilo lipofílico se disuelve solo en grasas neutras, coloreándolas con las tonalidades que van desde el rojo hasta el amarillo, según reporta Lillie en 1969 (citado por Page, y col. 1992).

Las tonalidades adquiridas por los gránulos teñidos con el Rojo Nilo, permiten afirmar que este colorante tiene una mayor afinidad por el PHAs, que el Sudán Negro porque el polímero es observado con mucha mayor dificultad, debido a la interferencia de las partículas del colorante (Ostle y Holt, 1982).

La fluorescencia que manifiestan las inclusiones de PHA en células de *Azotobacter vinelandii* (UWD), luego de ser teñidas con Azul de Nilo, es proporcional con la concentración de PHA. Los resultados manifiestan que el Azul

de Nilo puede ser usado en una determinación cuantitativa de PHA en una gran variedad de células (Page y col., 1992).

A través de las técnicas de ácidos nucleicos, mediante la hibridación de colonias (evitando las técnicas que implican un elevado consumo de tiempo y método de tinción altamente inefectivos), es posible determinar la presencia de información genética para la síntesis de PHAs en el medio ambiente, en el cual el polímero no es detectado por técnicas tradicionales. De aquí se concluye que esta técnica genética pudiera ser un método opcional para obtener información acerca de la presencia de determinadas sustancias en las comunidades bacterianas, que son rápidamente metabolizadas, en respuesta a cambios ambientales (López y col., 1998).

2.3.4.2 Métodos cuantitativos.

Para determinar el contenido del polímero en la célula se han utilizado diferentes métodos: uno de los más usados es purificar la muestra por liofilización y extracción gravimétrica del PHAs en solución de cloroformo, aunque este tiene la dificultad de ser muy lento, específico y cuantitativo. El método permite determinar las propiedades de estos polímeros como son: punto de fusión, peso molecular, termo plasticidad y la composición de los elementos formadores de estos materiales por medio de la pirolisis (Basset, 1988). Un método clásico es disolver la célula que contiene el PHAs en hipoclorito y determinar la turbidez de la suspensión producida por los gránulos del polímero. Alternativamente el polímero puede ser extraído en solución de cloroformo y determinarlo cuantitativamente por medio de la absorbancia (Lageveen y col., 1988).

Otro método espectroscópico involucra la hidrólisis y deshidratación del polímero a ácido crotonico mediante ácido sulfúrico y su posterior análisis cuantitativo por luz ultravioleta a 235 nm, pero tiene el inconveniente de que hay interferencia de azúcares (se transforman a furfural, que absorbe la luz a esa longitud de onda) y nucleótidos (Karr y col., 1983). Por otra parte la Resonancia magnética nuclear (RMN), es un método analítico que permite cuantificar el PHAs luego de una extracción celular inicial del polímero y también pueden usarse para seguir la producción de este polímero de cadenas cortas, mientras que el análisis de cromatografía gaseosa (CG), después de una metanolisis ácida directa de las células, está restringida a determinar el total de PHAs, la masa celular y la localización en la célula (Fristche y col., 1990).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 FASE DE CAMPO

3.1.1 Área de estudio. Esta investigación se realizó en terrenos del Centro Ambiental Chimayoy (Figura 3), el cual, se encuentra ubicado en el Departamento de Nariño, vía panamericana Km 8, salida al aeropuerto de Pasto, ubicado en la vereda de Pinasaco, corregimiento de Morasurco, tiene una extensión territorial de 94 Ha aprox., con posicionamiento global de coordenadas 01°16' latitud norte, 77° 17' longitud oeste. Tiene una altura promedio entre 2200 y 3000 m.s.n.m. temperatura promedio anual de 11 °C, precipitación promedio anual de 1200 mm y un régimen de lluvias bimodal (meses de mayor precipitación entre Marzo - Mayo y Octubre - Enero), por otra parte, la época de verano se da entre los meses de Junio - Septiembre, acentuándose más en el mes de Agosto. Los suelos del área de estudio son de origen volcánicos, formados a partir de tobas, derrames fluvio-volcánicos, andesitas y arcillas. Son erosionables, superficiales y profundos, bien drenados, de textura arcillosa, fina y franco fina, ácidos a muy ácidos, de baja a muy baja saturación de bases y con altos porcentajes de materia orgánica (Benavides y Gómez, 1998).

Figura 2. Ubicación del Centro Ambiental Chimayoy en el departamento de Nariño



Fuente: BENAVIDES y GOMEZ, (1998): Plan de manejo de la microcuenca Tosoabi, Pasto, Nariño

En el Centro Ambiental Chimayoy se eligieron tres áreas con diferente cobertura vegetal teniendo en cuenta el grado de representatividad en la zona de estudio, para el aislamiento de bacterias productoras de PHAs, estas se describen a continuación:

Sector 1: Bosque natural secundario, con coordenadas geográficas 01° 15' 912'' latitud norte y 77° 17' 199'' longitud oeste, según el sistema de Holdridge (1987) pertenece a una zona de bosque seco montano, presenta un clima frío con 10 °C, con una extensión aproximada de 15 Ha. y con una vegetación dominante de las familias Rubiaceae, Mirtaceae, Ericaceae y Rosaceae y de los géneros: *Weinmania*, *Rubus*, *Acacia*, *Miconia*, *Mimopsis*, *Myrica*, *Cavendishia*, *Hyeronima*, *Freziera* entre otros (Benavides y Gómez, 1998) (Figura 3).

Sector 2: Zona de pastos, con plantas de la familia Poaceae (*Holcus lanatus*); con posicionamiento global de 01°15'816'' latitud norte, 77°16'952'' longitud oeste (Benavides y Gómez, 1998) (Figura 3).

Sector 3: Plantación de pino, se encuentra localizado entre las coordenadas 01° 15' 53.1'' latitud norte y 77° 17' 15.8'' longitud oeste. Tiene una extensión aproximada de cuatro hectáreas, cultivado con especie *Pinus patula Schlech et Cham.*, sembrada hace siete años con alturas promedio de ocho metros y una densidad aproximada de 3000 árboles/Ha (Benavides y Gómez, 1998) (Figura 3).

Figura 3. Áreas de estudio del Centro Ambiental Chimayoy que corresponden a: bosque natural secundario (a), plantación de pino (b) y zona de pastos (c)



a

b

c

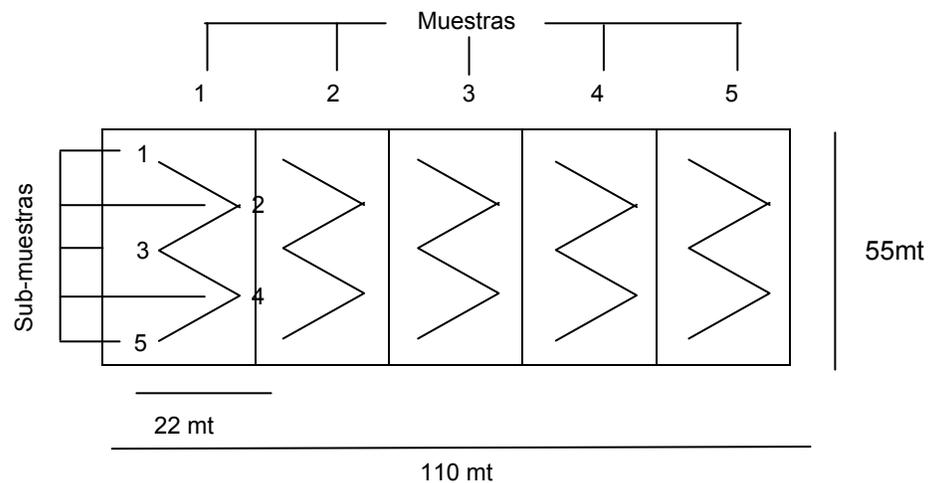
3.1.2 Toma de muestras. En cada una de las áreas de estudio se trazó un cuadrante de 110 m x 55 m, el cual fue dividido en 5 parcelas de 22 m x 55 m. en cada parcela se realizó un recorrido en zig-zag y en diferentes puntos se

colectaron muestras de suelo hasta completar una bolsa de 1 Kg de suelo (Figura 4).

Para coleccionar las muestras, se cavo un hoyo de aproximadamente 15cm x 30 cm de profundidad y de las paredes del hoyo a 20 cm del borde superior, haciendo uso de una espátula previamente esterilizada se coleccionaron las muestras del suelo en sentido horizontal a la superficie. En cada una de las zonas de estudio (bosque natural secundario, pastos y pinos) se coleccionaron 5 muestras compuestas para un total de 15.

Las muestras de suelo fueron transportadas al laboratorio de microbiología de la Universidad de Nariño – Pasto. Colombia, en donde fueron tamizadas y divididas en dos porciones iguales, la primera de estas se utilizó para el análisis físico - químico y la segunda se empleo para la caracterización microbiológica (Figura 5).

Figura 4. Parcelas de recolección de muestras de suelo



3.2 FASE DE LABORATORIO

3.2.1 Análisis físico-químico del suelo. Para determinar las propiedades físico - químicas del suelo se siguieron los procedimientos que se utilizan actualmente en los Laboratorios especializados de la Universidad de Nariño - Pasto. Colombia, y se determinaron las siguientes variables: Textura (hidrómetro de Bouyoucos), pH (potenciómetro relación suelo agua 1:1), Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC; acetato de amonio-1N, pH7), Fósforo extraíble (método Bray II), Zinc (método de extracción con DTPA), materia orgánica (digestión húmeda de Walkley y Black), Nitrógeno total (método de Kjeldahl), Carbono orgánico, K, Ca, Mg, Al de cambio y densidad aparente, para la interpretación de los datos se empleo el manual propuesto por Unigarro y Carreño en el 2005 (Anexo R).

3.2.2 Aislamiento de bacterias PHAs. En cada una de las muestras de suelo, se realizó el aislamiento de las bacterias acumuladoras de PHAs mediante la técnica de series de dilución seriada y siembra en placa en superficie (Parkinson y Coleman, 1991).

De cada muestra se pesó diez gramos de suelo se maceró y se colocó en un erlenmeyer con 90 ml de agua destilada estéril (dilución 10^{-1}), se agitó suavemente durante tres minutos para luego hacer diluciones consecutivas hasta 10^{-6} en tubos de ensayo con nueve mililitros de agua destilada estéril.

A partir de la última dilución se sembró por diseminación en superficie, una muestra de 0,1 ml sobre placas petri (por triplicado), que contenían Agar Plate Count, suplementado con sacarosa, extracto de suelo y el colorante selectivo Rojo Nilo al 0.01% (1 μ l/ml de medio de cultivo). Se incubaron a 20 °C por 72 horas y después de este tiempo se seleccionaron aquellas cajas con crecimiento bacteriano entre 30 y 300 unidades formadoras de colonia y se realizó un conteo total (Anexo B).

3.2.3 Cuantificación y selección de bacterias de PHAs. Las colonias se evaluaron, observándolas a través del transiluminador de rayos ultravioleta a una λ 340 nm y se seleccionaron las cepas que presentaban fluorescencia de color rojo - naranja, por Spikermann, y col (1999) las consideran positivas para la producción de PHAs. Los datos fueron expresados como bacterias/gramo de suelo seco y en este momento a cada morfotipo seleccionado se le otorgó una nomenclatura relacionada con el sitio de muestreo.

3.2.4 Purificación de bacterias PHAs. Para la purificación se seleccionó cada aislado bacteriano de acuerdo a su similitud morfológica y se inoculó por separado en Agar Plate Count suplementado con sacarosa, extracto de suelo y colorante rojo nilo al 0,01 %.

3.2.5 Caracterización de bacterias PHAs. Para determinar parcialmente los morfotipos aislados, se realizaron descripciones de las características macroscópicas (colonias) y microscópicas (tinción de Gram), según las características descritas en el manual de Bergey's de taxonomía microbiana (Krieg, 1986) (Anexo B).

Como técnica complementaria para comprobar la presencia del polímero las cepas seleccionadas fueron teñidas con el colorante negro sudan (Martínez y col., 2004), el cual es empleado para observar la presencia del granulo de PHAs, además se sometieron a un proceso de fermentación mediante el cual se pudo extraer el polímero y por medio de cromatografía de gases se pudo caracterizar el PHA.

3.2.6 Conservación de bacterias PHAs. Las colonias aisladas y caracterizadas fueron conservadas en perlas de porcelana y en caldo Glicerol a -20°C

3.3 ANALISIS DE RESULTADOS

3.3.1 Índices ecológicos de diversidad alfa. Con el fin de poder calcular la estructura de las poblaciones bacterianas colectadas en cada área de estudio a los datos obtenidos se aplicaron los índices de: Riqueza, dominancia según Simpson (λ) y diversidad según Shannon – Weaver (H'), mediante el programa BIODAP (Moreno, 2001; Álvarez y col., 2006).

3.3.1.1 Riqueza de especies (S): Es el número de morfotipos por sitio de muestreo (Álvarez y col., 2006).

3.3.1.2 Índice de Simpson (λ): concede un valor a la probabilidad de seleccionar aleatoriamente dos organismos de especies diferentes, le da poca importancia a las especies no abundantes y mayor significancia a las especies que si lo son, asume valores en un rango entre 0, cuando hay uniformidad en los datos de las especies encontradas y 1 cuando la dominancia por un organismo es la máxima esperada (Moreno, 2001; Álvarez y col., 2006).

$$D = 1 - \sum (p_i)^2$$

Donde:
D = índice de Simpson
pi = proporción de individuos del morfotipo i en la comunidad.

3.3.1.3 Índice de Shannon - Weaver (H'): Relaciona los factores que influyen en la diversidad; abundancia y uniformidad; además este índice se aplica para estudiar poblaciones no finitas, la literatura menciona que sus valores oscilan entre 0 y Log (S); tiende a cero en comunidades poco diversas, y es igual al logaritmo de la riqueza específica en comunidades de máxima equitatividad (Moreno, 2001; Álvarez y col., 2006).

$$H' = - \sum (p_i \ln p_i)$$

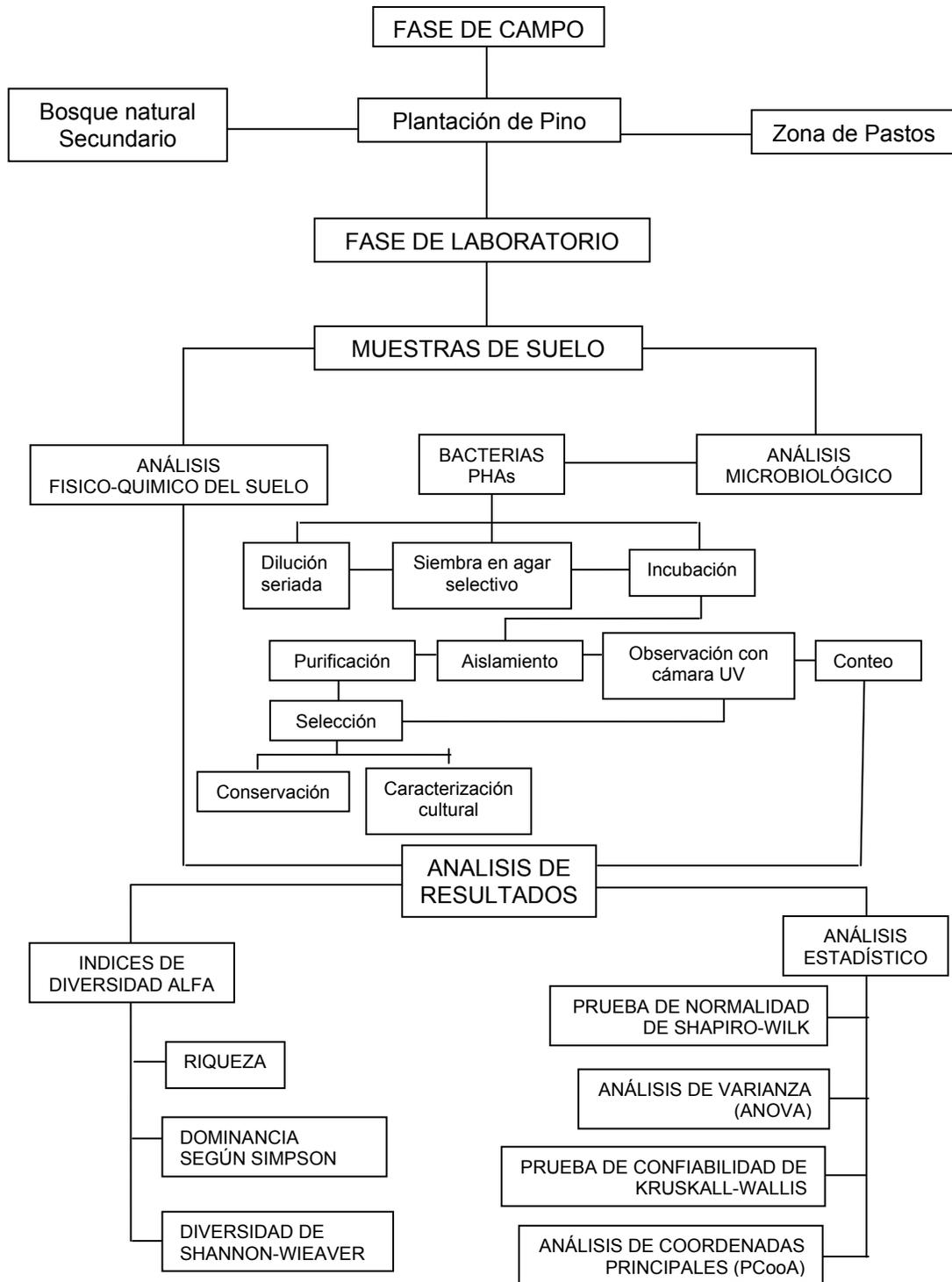
Donde:
H' = diversidad observada en la comunidad.
ln = Logaritmo natural
pi = abundancia proporcional del morfotipo.

3.3.2 Análisis estadístico. Con los resultados de abundancia de bacterias acumuladoras de PHAs, se analizó su normalidad a través de la prueba de Shapiro-Wilk y con el fin de que los datos se ajusten a una distribución normal se realizó una transformación de escala aplicando la fórmula: $1/\log N$; donde N es la abundancia de bacterias PHAs en cada una de las áreas de estudio.

Para establecer las diferencias que existen en los parámetros físico-químicos de suelo reportados en cada una de las áreas de trabajo y la abundancia de bacterias

acumuladoras de polihidroxicanoatos encontrada en el suelo de las diferentes coberturas vegetales, se realizó una prueba de ANOVA, para comprobar la confiabilidad de los datos se empleo el estadístico de Kruskal-Wallis, haciendo uso del programa Statgraphics, Versión 5.1 y para determinar el porcentaje de afinidad de las variables por cada sitio de muestreo se aplicó método multivariado de análisis de coordenadas principales (PCoA), por medio del programa NTSyS (Rohlf, 1997), Versión 2.00, utilizando para todas las pruebas un nivel de significancia de 0.05 (Figura 5).

Figura 5. Organigrama



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE SUELO

En la Tabla 1 se presentan los resultados de las características físico - químicas de los suelos de las tres áreas de muestreo en el Centro Ambiental Chimayoy. En términos generales puede afirmarse que en las muestras analizadas predominan suelos ácidos, de textura orgánica, con altos contenidos de materia orgánica superiores al 15%, con una CIC superior a 35 meq/100 g de suelo y densidad aparente en un rango comprendido entre 0.6 y 0.74 g/cc (Tabla 1).

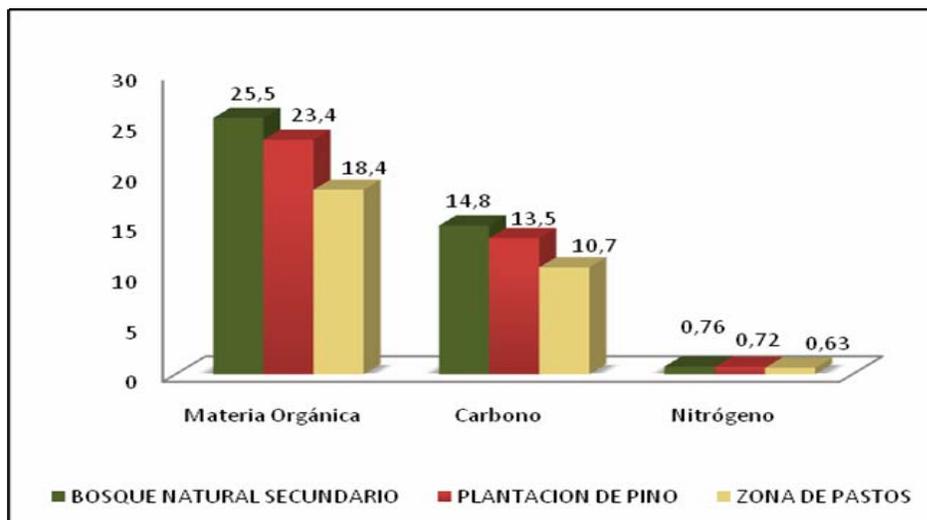
Tabla 1. Características físico-químicas del suelo en bosque natural secundario, plantación de pino y pastos en el Centro Ambiental Chimayoy, departamento de Nariño.

VARIABLES	ZONAS DE ESTUDIO					
	BOSQUE NATURAL SECUNDARIO		PLANTACION DE PINO		ZONA DE PASTOS	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
Materia Orgánica (%)	25,54	2,35	23,36	2,58	18,38	1,30
Nitrógeno (%)	0,76	0,03	0,72	0,04	0,63	0,03
Carbono (%)	14,81	1,37	13,55	1,51	10,65	0,76
Relación C/N (%)	19,48	1,02	18,67	1,01	16,81	0,42
pH	4,92	0,11	4,72	0,13	5,54	0,05
Capacidad de Intercambio Catiónico (cmol.Kg ⁻¹)	65,88	4,37	57,92	2,85	46,96	2,90
Fosforo (ppm)	5,00	1,00	4,60	2,30	6,60	2,51
Calcio (meq/100 g)	3,44	1,63	0,56	0,53	7,58	1,88
Magnesio (meq/100 g)	1,44	0,40	0,44	0,11	2,36	0,76
Potasio (meq/100 g)	0,65	0,11	0,25	0,05	1,36	0,21
Aluminio (meq/100 g)	3,14	0,66	2,20	0,35	0,05	0,08
Zinc(ppm)	1,21	0,37	1,05	0,19	3,76	0,93
Densidad Aparente (g/cc)	0,62	0,04	0,74	0,09	0,74	0,05
Textura	Orgánico		Orgánico		Arenoso	

Es de señalar, que los valores más altos en el contenido de materia orgánica se registraron en las muestras de suelo bajo la cobertura del bosque natural secundario (25.54%) seguido por la plantación de pino (23.3%) y la zona de pastos (18.38%) (Figura 6). Según el análisis de varianza, se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0,05$) en el contenido de materia orgánica en las tres coberturas vegetales. En este sentido el presente trabajo concuerda con los datos expresados en el estudio realizado por Rodríguez (2005), quien encontró en suelos de una sucesión natural y pinos en la vereda la Josefina (Pasto - Nariño), valores de materia orgánica entre 20,81% y 21,69% respectivamente, cercanos a los encontrados en la presente investigación (Anexo D).

Según, Rucks y col. (2004), las diferencias en la cantidad y distribución de la materia orgánica entre suelos forestales y de pradera, se relacionan con la diferencias en el crecimiento de las plantas y la manera como los residuos son incorporados dentro del suelo. En uno de sus estudios menciona que las raíces de los pastos son de corta vida y cada año la descomposición de raíces muertas contribuye a incrementar la materia orgánica humificada. Así también se ha verificado que la síntesis de humus se lleva a cabo en la rizósfera, la cual es más extensa en pasturas. Por el contrario, en los bosques las raíces son de larga vida y la adición anual de residuos de plantas es principalmente como hojas y madera muerta que cae sobre la superficie del suelo. Parte de los residuos se descomponen sobre la superficie, pero pequeños animales transportan y mezclan el manto superficial con los primeros centímetros de la capa superior del suelo mineral, observándose por consiguiente una acumulación de materia orgánica.

Figura 6. Porcentajes de materia orgánica, Carbono y Nitrógeno de suelos bajo tres coberturas vegetales del Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.

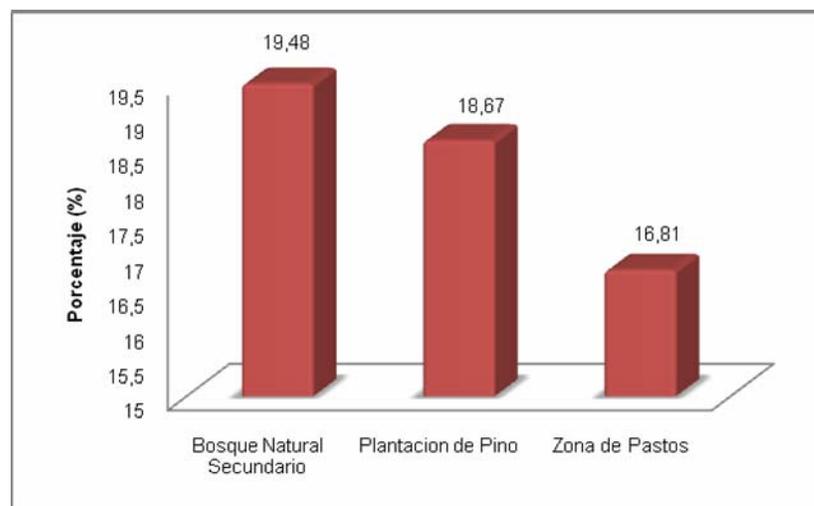


Cabe señalar que la elevada concentración de materia orgánica se relaciona con la acidez del medio, esta condición favorece indirectamente la absorción de algunos nutrientes por las plantas, porque los grupos funcionales de la materia orgánica proporcionan incremento en la capacidad de intercambio catiónico, en suelos con bajo contenido en arcilla (Bures, 1999).

En cuanto a los contenidos de Carbono y Nitrógeno en el suelo bajo las tres coberturas vegetales estudiadas en Chimayoy, se registran valores altos en el bosque natural secundario y la plantación de pino y los valores más bajos la zona de pastos. Al aplicar la prueba de ANOVA se estableció que existen diferencias significativas entre las áreas de estudio ($P < 0,05$) (Figura 6; Anexo E).

Estos valores probablemente se deban a la acumulación y transformación del material vegetal a partir de la acción de los factores climáticos, porque en zonas de pastos los residuos vegetales quedan expuestos directamente a la precipitación y temperatura que al incrementarse acelera los procesos oxidativos de compuestos orgánicos. Por lo tanto es posible mencionar que el cambio de bosques a pasturas inducen variaciones negativas en el contenido de Carbono y Nitrógeno en el suelo (Mahecha, 2002; Robert, 2002). (Figura 6; Anexo F).

Figura 7. Porcentaje de la relación C/N en las diferentes áreas de estudio en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.



En la relación C/N de los suelos del área de estudio los valores fluctúan entre 16% - 20%, y a través de la prueba de ANOVA, se demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Según los datos obtenidos el suelo localizado en la zona de pastos presenta una baja relación C/N, esto indica una alta velocidad en la descomposición del material vegetal en comparación con los sistemas forestales que presentan una mayor acumulación de materia orgánica,

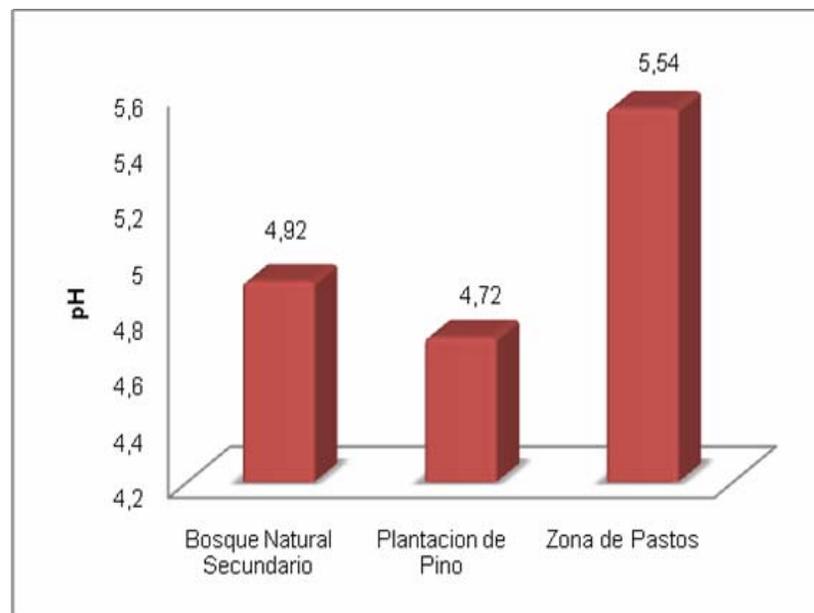
debido a la dinámica de transformación se hace más lenta aumentando los valores de la relación C/N y probablemente esto se debe a que la humedad actúa como un catalizador que impide la transformación rápida de los restos vegetales (Sandoval, 2003)(Figura 7; Anexo G).

Es de señalar que la relación C/N posee una relación directa con la capacidad de intercambio catiónico y depende en gran medida del contenido de materia orgánica presente; además por encontrarse en un rango comprendido entre 10:1 – 20:1, favorece la mineralización que es un proceso en donde transforman los nutrientes orgánicos no disponibles en sustancias inorgánicas simples para las plantas y los microorganismos del suelo (Agropec-Star, 2002; Sandoval, 2003).

En cuanto al pH, el valor más bajo se presentó en la plantación de pino con un valor de 4,72, seguido de bosque natural secundario (4,92) y por último la zona de pastos (5,54); al realizar el análisis de varianza es posible apreciar que existen diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) en las diferentes áreas de muestreo (Figura 8; Anexo H).

Coral y col. (2005), mencionan que en suelos con pH inferior a 5.0 hay una mayor acumulación de materia orgánica, por lo tanto determina que existe una relación inversa con estos dos parámetros evaluados. Esto se observa en los resultados obtenidos en bosque natural secundario y la plantación de pinos, que presentan valores bajos de pH en el suelo y con alto contenido de materia orgánica.

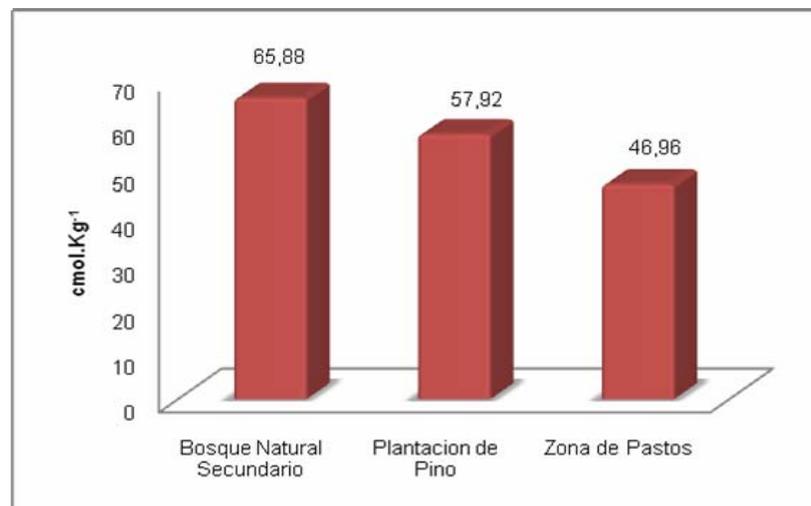
Figura 8. pH del suelo bajo tres coberturas vegetales en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.



La CIC, para las tres áreas de estudio es alta según Unigarro y Carreño (2005), puesto que en suelos andinos el promedio es superior a 20 y al realizar el análisis de varianza, se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0,05$). Cabe anotar que en el bosque natural secundario se detectó el valor más alto y la zona de pastizal presentó el valor más bajo en esta característica. Por otra parte, Martel (1978), menciona que existe una relación de la CIC con el contenido de Carbono orgánico, disponibilidad de materia orgánica y grado de compactación del suelo; este aspecto se puede comprobar en los resultados de esta investigación (Figura 9; Anexo I).

Según Sicard y Suarez (1998), la CIC tiene una relación inversa con la densidad aparente, esto se observa en los resultados obtenidos en bosque natural secundario en donde la densidad aparente es baja y los valores de CIC son mayores en comparación con los resultados de las otras dos coberturas vegetales en donde hay alta densidad aparente, a diferencia de la zona de pastos que presenta una densidad aparente alta y bajos valores en la CIC del suelo.

Figura 9. Capacidad de intercambio catiónico en suelos de bosque natural secundario, plantación de pino y pastos en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.

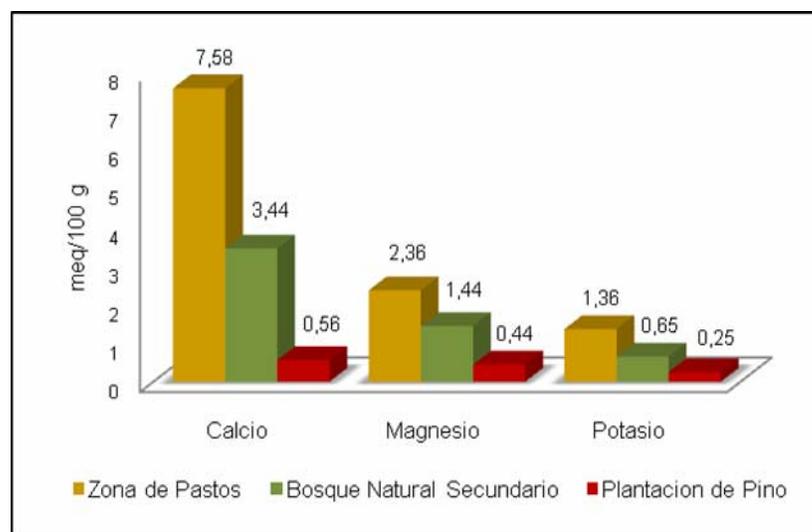


Al analizar el contenido de bases cambiables los valores de Calcio, Magnesio y Potasio, son altos en la zona de pastos en comparación con los reportados para las áreas de bosque natural secundario y la plantación de pino. Al aplicar la prueba de ANOVA se presentaron diferencias estadísticamente significativas para los diferentes lugares de trabajo (Figura 10).

Estudios presentados por Agropec-Star (2002), informan que la disponibilidad de los elementos Ca^{++} , Mg^{++} y K^{+} ; varía según el pH, la CIC y la textura del suelo;

siendo mayor en suelos básicos y disminuyendo en medios ácidos, con bajos valores en la CIC efectiva, debido a que a niveles altos estos nutrientes quedan adheridos como elementos no intercambiables en la superficie de los coloides cargados negativamente absorbiéndose en las superficies de las arcillas y la materia orgánica; y en cuanto a la textura, la disponibilidad de bases aumenta en suelos arcillosos, seguidos de aquellos con textura arenosa y por último en suelos orgánicos.

Figura 10. Contenido de bases intercambiables en suelos con diferente cobertura vegetal en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.



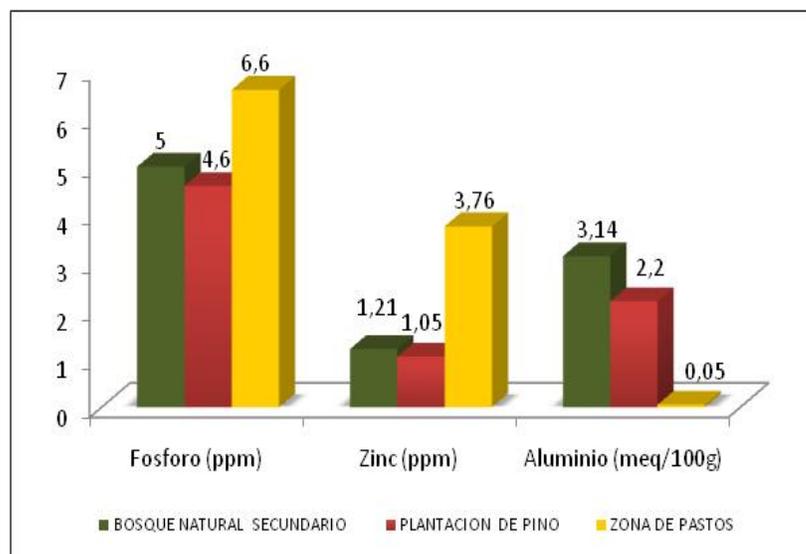
Sin embargo, Abocol (2004), menciona que los contenidos de Potasio son superiores a los de Calcio y Magnesio en la mayoría de los suelos de clima frío a templado y sus valores disminuyen en suelos cálidos tropicales, debido al alto grado de meteorización de material orgánico, no obstante, sus fracciones disponibles (intercambiable y solución) son bajas, ya que este elemento es relativamente inmóvil en el suelo y junto con el Magnesio son elementos que se lixivian rápidamente (Figura 10).

Según la ubicación geológica del terreno, el porcentaje de saturación de bases tiende a ser mayor en los suelos desarrollados en las posiciones planas, este comportamiento responde a la influencia de la precipitación y de la pendiente, las cuales sirven como medios para que exista un mayor lavado de bases por escorrentía, acumulándolas en las posiciones más bajas, razón por la cual en la zona de pastos se presentó el mayor contenido de bases intercambiables en comparación con las zonas de bosque natural secundario y plantación de pino (Velásquez, 1997) (Figura 10).

Por otra parte, según los parámetros establecidos por Unigarro y Carreño (2005), los valores reportados para Fosforo y Zinc son altos para la zona de pastos en comparación con aquellos reportados para las áreas de bosque natural secundario y plantación de pino, a diferencia del Aluminio cuyos valores son más altos en los últimos ecosistemas mencionados en comparación con la zona de pastos (Figura 11).

Según Favela y col., (2002), probablemente los anteriores resultados, se deba a que los contenidos de Fosforo y Zinc aumentan en medios con pH entre 5 – 7, rango en el cual se encuentra el suelo bajo cobertura de pastos; mientras que en suelos con pH fuertemente ácido tales como los que presentan las áreas de bosque natural secundario y plantación de pino, los fosfatos forman precipitados insolubles con el Hierro y el Aluminio, elementos que son altamente solubles en estas condiciones llegando a alcanzar niveles tóxicos para los organismos del suelo; por otra parte en suelos alcalinos el ión fosfato presenta afinidad con los iones de Calcio, Potasio y Magnesio, formando compuestos solubles (Jaimes, 1994; Altomore y col., 1999; Rodríguez y Fraga, 1999; Abocol, 2004) (Anexo N; Figura 11).

Figura 11. Contenido de Fósforo, Zinc y Aluminio en suelos de bosque natural secundario, plantación de pinos y pastos en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.

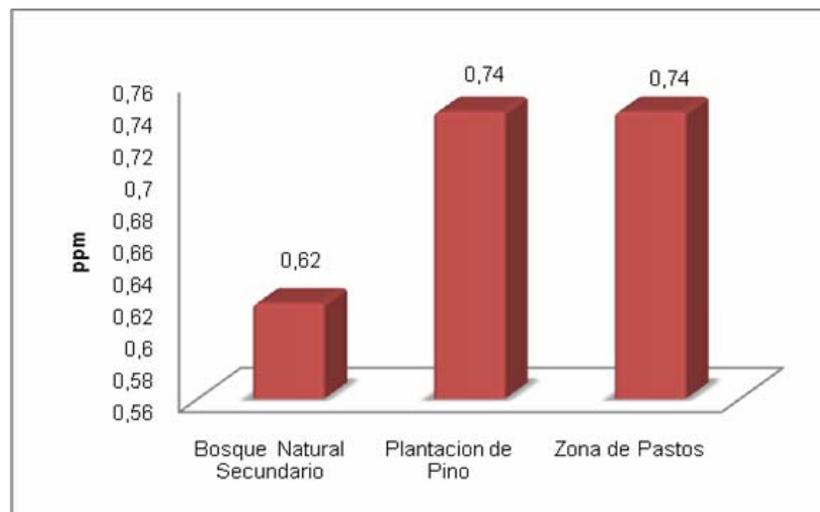


Dentro de las propiedades físicas, la densidad aparente en las diferentes áreas de estudio vario en un rango promedio de 0.62 y 0.74 g/cc, presentando los valores más bajos la zona de bosque natural secundario, no obstante los valores encontrados en la zona de plantación de pinos y pastos son iguales en promedio

(0,74 g/cc). Al realizar el análisis de varianza para la densidad aparente del suelo las tres coberturas vegetales hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las tres variables a un nivel de confianza del 95,0% (Figura 12; Anexo P).

Los resultados obtenidos concuerdan con los presentados por Rodríguez (2005), en el sentido que la densidad aparente parece estar asociado con el estado estructural del suelo y gobernados por el grado de agregación originado por la materia orgánica. Según Salinas y col., (1997), la reducción en los niveles de la materia orgánica y la destrucción de los agregados promueven el almacenamiento de agua lluvia en el perfil del suelo, lo que induce a un aumento en la densidad aparente y disminución en la disponibilidad de varios nutrientes en especial la del Nitrógeno orgánico. Estos aspectos se pueden apreciar en la zona de pastos, cuyos valores en densidad aparente son altos resultado del bajo contenido de materia orgánica.

Figura 12. Densidad aparente obtenida bajo tres coberturas vegetales en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.



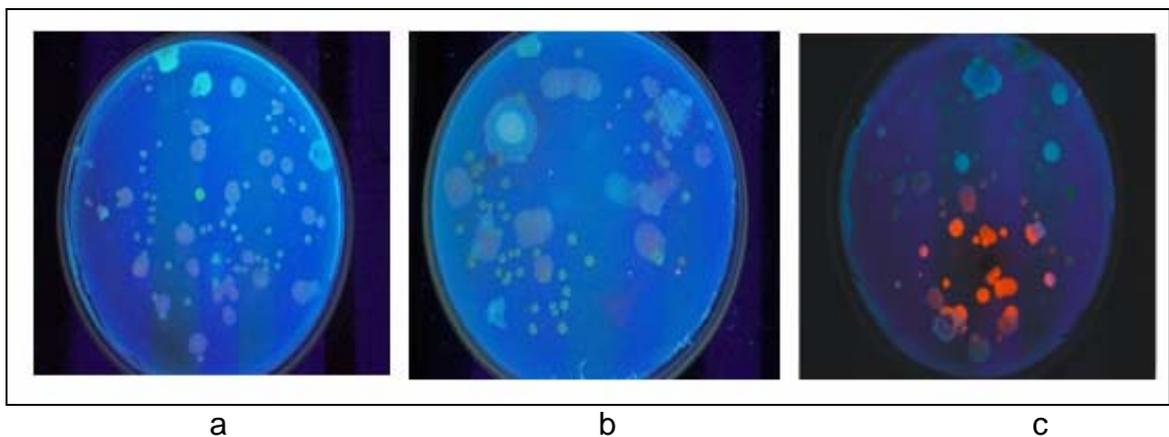
Sin embargo, en las plantaciones de pino se obtuvo mayor densidad aparente en comparación con los valores reportados para bosque natural secundario, esta característica se debe a que este tipo de plantaciones tienen un mayor uso de agua, el suelo tiende a secarse lo que ocasiona pérdida de la conexión entre partículas minerales y orgánicas, la disponibilidad de materia orgánica disminuye y los suelos se transforman de retenedores de agua a repelentes de agua ocasionando el agrietamiento severo y la prismatización de la estructura, la transformación del régimen de humedad edáfico hacia condiciones secas y la disminución apreciable de la actividad biológica (Cortés, 1990; Sicard y Suarez, 1998; Hofstede y Aguirre, 1999).

Lo anterior nos permite determinar que los factores físico-químicos de los suelos varían según las coberturas vegetales.

4.2 ANALISIS DE ABUNDANCIA DE BACTERIAS ACUMULADORAS DE PHA.

Con la técnica empleada para la detección y el aislamiento de bacterias productoras de PHAs (Madigan y col., 2000; Carballo y col., 2004; Hidalgo y Zambrano, 2005, Fernández, 2006), se encontraron 69 morfotipos bacterianos para las tres zonas de estudio, las cuales posteriormente fueron sometidos a radiación ultravioleta haciendo uso de un transiluminador UV, lográndose apreciar diferentes tonalidades de fluorescencia que van desde: verde fosforescente a beige ya que el colorante Rojo Nilo del medio de cultivo le confiere esta propiedad. Cabe anotar que en este estudio solo se tuvieron en cuenta las colonias con fluorescencia entre rojo y naranja (Spiekermann y col., 1999; Carballo, 2004; Fernández, 2006), por lo tanto en nuestro estudio el 55,1% del total de aislados resultaron positivos para esta prueba (Figura 13).

Figura 13. Fotografías en donde se indica la fluorescencia de las colonias acumuladoras de polímero, mediante los rayos ultravioleta, en donde a y b, son aislamientos de bacterias del suelo en la zona de Pastos; c, aislamiento de bacterias del suelo de la plantación de pino.



Entre los estudios relacionados con el aislamiento de bacterias acumuladoras de PHAs de suelos de Colombia, se cuentan los trabajos realizados por Suárez y col., (2004), quienes evaluaron muestras de suelos de cultivo de caña en los Departamentos de Nariño y Santander; ellos reportaron que de 242 aislamientos evaluados, 132 resultaron positivos para inclusiones lipídicas con la coloración de Sudan Negro equivalente a 54.5 % del total, cabe señalar que el colorante Rojo Nilo tiene mayor afinidad por el PHA que el Sudan Negro, por cuanto es más específico para este tipo de determinaciones (Page y Tenove, 1996). Por otra parte en la investigación realizada por Gómez (2002), se menciona que de 69 aislamientos obtenidos en suelos del Valle del Cauca, Parque Natural Chicaque y

Amazonas, se logró identificar 25 aislamientos positivos a la producción de PHAs, que equivalen a 36.2 % de morfotipos detectados mediante la técnica de microscopía de fluorescencia, para lo cual los aislamientos fueron observados con la utilización de Azul de Nilo y Rojo de Nilo como colorantes específicos.

A diferencia de las publicaciones anteriormente citadas, en este estudio se utilizó un medio de cultivo con Rojo Nilo incluido a una concentración muy baja (0.01%) capaz de detectar el PHA, asegurando un medio transparente y sin interferencias. Esta técnica también fue empleada en las siguientes investigaciones: Fernández (2006); colectó 59 morfotipos bacterianos en 31 muestras de suelos de la región Andina del Departamento de Nariño, de los cuales 48 aislados que representan el 81.34 %, resultaron positivos en el medio de cultivo selectivo y el trabajo realizado por Hidalgo y Zambrano (2005), quienes en la obtención de bacterias nativas productoras de polihidroxialcanoatos en suelos de la región de Nariño, aislaron 36 morfotipos bacterianos productoras del polímero al ser evaluadas con el colorante Rojo Nilo y el transiluminador de UV.

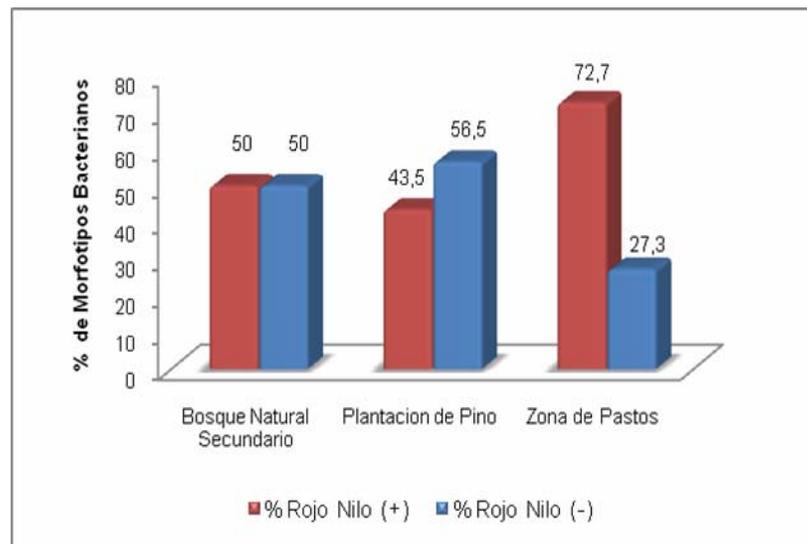
Al comparar nuestros resultados, en la zona de pastos se detectó el mayor número de morfotipos productores de PHA ya que de las 22 colonias aisladas; 16 de estos resultaron positivos a la prueba de Rojo Nilo, los cuales representan el 72.73 % del total de los aislados y el 27.3 % restante son bacterias no acumuladoras de PHA. En segundo lugar se encuentra el bosque natural secundario, en el cual de 24 morfotipos, solo 12 son sintetizadoras del polímero correspondiendo a un 50% y por último, en la plantación de pino (*Pinus patula*) 10 morfotipos fueron positivos para Rojo Nilo de las 23 encontradas, de manera que el 43.48% de los morfotipos corresponde a bacterias formadoras del polímero y el 56.52% de los aislados son bacterias no productoras (Figura 14).

De acuerdo con los datos anteriores, se puede deducir que las propiedades del suelo influyen sobre el metabolismo de las bacterias y esto se refleja en la abundancia de morfotipos de las poblaciones microbianas (Fernández, 2006). Además, diversos autores plantean que los principales factores que influyen en la estructura microbiana del suelo son: el tratamiento del suelo, el tipo y edad de las plantas presentes, y las características físico-químicas del suelo, por lo que se puede deducir que cada microhabitat es ocupado por los organismos que pueden colonizar mejor el lugar (Elsas y Trevors, 1997; Fenchel y col., 2000; Carrillo, 2003; Garbeva, y col, 2004). De allí que es probable observar las diferencias de los porcentajes de bacterias PHAs en los diferentes suelos evaluados.

Es de mencionar que en los primeros trabajos realizados por los investigadores del Laboratorio de Ecología y Genética Microbiana para descubrir el rol de los PHA en la célula bacteriana, demostraron que las colonias son capaces de sintetizar polímero de reserva, tenían mayor supervivencia y capacidad para competir con otras bacterias autóctonas en ambientes naturales (Stekolschik, 2006), esto se debe a que el PHA se acumula en el citoplasma del

microorganismo en forma de gránulos bajo condiciones de estrés nutricional, ocasionados por la deficiencia de nutrientes tales como: Nitrógeno, Fósforo, Azufre, Magnesio, Oxígeno, fuente de Carbono y energía, por lo tanto este mecanismo le permite al microorganismo permanecer en lugares que presenten condiciones adversas (Povolo, 1995; Quagliano, 1998).

Figura 14. Porcentaje de morfotipos con diferente respuesta la prueba de Rojo Nilo para PHAs en suelos de bosque natural secundario, plantación de pino y pastos en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.

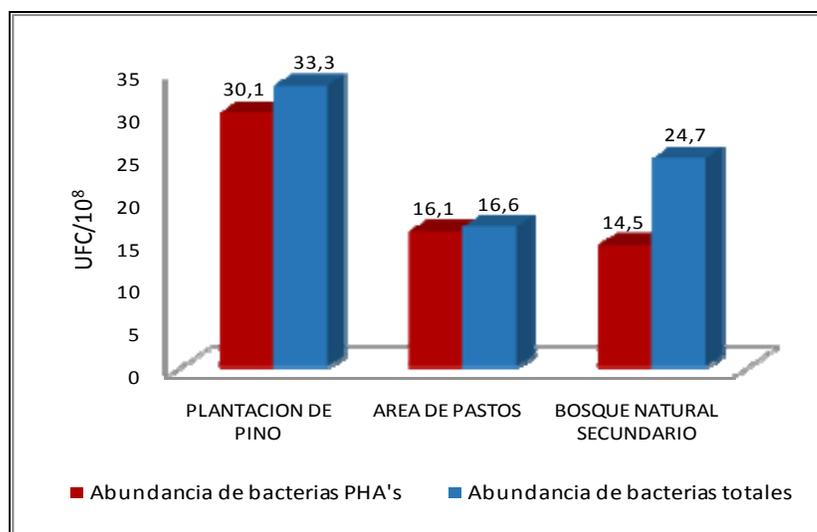


Al comparar las tres zonas de estudio, en la plantación de pino se registro mayor abundancia de bacterias con reacción positiva ante la prueba de Rojo Nilo, donde el número de bacterias PHA por gramo de suelo de este lugar es significativamente superior, aproximadamente dos veces con respecto al promedio obtenido de las muestras de suelo del bosque natural secundario y la cobertura de pastos. Esta afirmación se evidencia al aplicar la prueba de ANOVA, con la cual se encontró que las muestras de suelo analizadas en las diferentes áreas de estudio, presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el número de unidades formadoras de colonias bacterianas acumuladoras de PHA (Figura 15; Anexo P).

Es ampliamente conocido que en suelos cubiertos con pino la descomposición de la hojarasca que producen las coníferas es lenta, debido a que sus acículas tienen altos contenidos de lignina, la cual es de difícil degradación, esta condición implica un reciclaje deficiente de nutrientes en los suelos donde se cultivan estas especies vegetales (Villegas, 2004). Es probable que las poblaciones bacterianas en suelos con este tipo de vegetación necesiten mecanismos enzimáticos adecuados para hacer uso de estas fuentes de Carbono complejas, en consecuencia prevalecerán

solo las bacterias capaces de degradar este tipo de materia orgánica. Es de resaltar que la formación de polímeros de reserva como el PHA aumenta la capacidad de supervivencia ya que la acumulación, degradación y utilización de polihidroxicanoatos en condiciones de estrés bacteriano es un mecanismo que favorece su establecimiento, proliferación, supervivencia y competencia, en comparación con otras bacterias nativas que se encuentran en el mismo medio (Guerrero y Berlanga, 2001; Park y col., 2005; Fernández, 2006).

Figura 15. Abundancia de bacterias acumuladoras de polihidroxicanoatos y bacterias totales en muestras de suelo colectadas en el periodo comprendido entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005, bajo tres coberturas vegetales en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño.



En suelos de pastizales, se encontró una menor abundancia de bacterias acumuladoras de polímero en comparación con la zona de pino, pero se detectó un mayor número de morfotipos productores de polihidroxicanoatos (Figura 15). Este resultado se podría atribuir a la dinámica que presenta los suelos bajo cobertura de gramíneas debido a los aportes continuos de materia orgánica que conllevaría a un mayor establecimiento de morfotipos bacterianos (Toro, 2004).

Es de anotar que el suelo rizosférico de pastos manifiesta características bien diferentes al suelo distante de las raíces de árboles, debido que en la rizósfera hay mayor concentración de nutrientes orgánicos incluyendo el etileno, azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, polisacáridos, y las enzimas provenientes de las raíces, los cuales están disponibles para los microorganismos que viven en asociación con las raíces de la planta, asimismo que puedan aprovechar de diferentes maneras las sustancias que se encuentren en este medio natural. Además el volumen de suelo circundante a la raíz de una planta (rizósfera) es un espacio muy competido ya que en condiciones normales las

raíces secretan al suelo compuestos energéticos que estimulan el crecimiento de bacterias que tengan la mejor adaptación para colonizar estos lugares (Tisdall, 1996; Valencia y Peña, 2001; Garbeva y col., 2005).

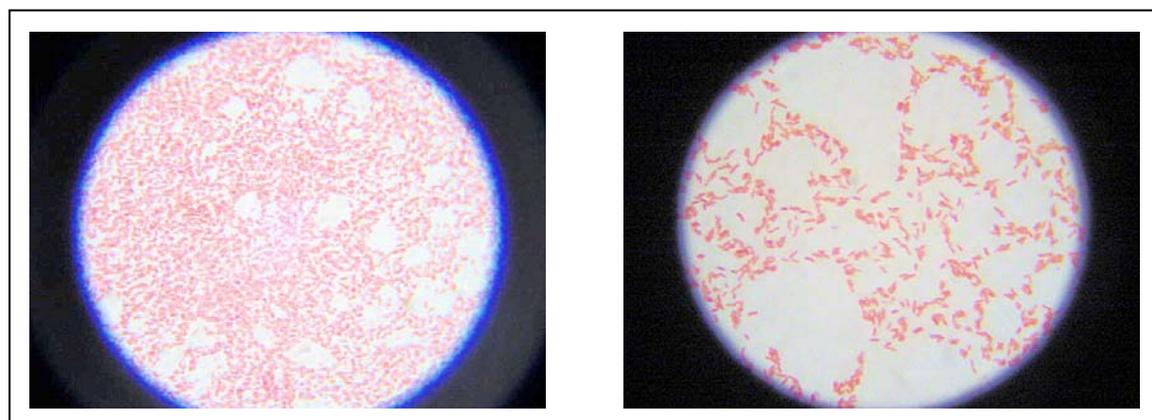
Esta última afirmación nos permite concluir que las bacterias que se encuentran en la zona de pastos poseen diferentes mecanismos para degradar los compuestos secretados por la raíz de la planta y se espera que así diversas composiciones de los exudados de la raíz seleccionen a diversas comunidades microbianas presentes (Garbeva y col., 2005).

En suelos bajo la cobertura de bosque natural secundario el número de bacterias productoras de polihidroxicanoatos de este lugar es inferior, con respecto al promedio obtenido de las muestras de suelo de la zona de pastos y la de la plantación de pinos. Este resultado probablemente dependa de la influencia que produce la diversidad estructural de la población vegetal que caracteriza este ecosistema, ya que según Kennedy (1999), la composición de la comunidad de plantas influye en el crecimiento, la proliferación y la diversidad de las bacterias y hongos a causa de la composición química de los diferentes exudados y además Vitousek (1994), menciona que la descomposición de la hojarasca constituye la vía de entrada principal de los nutrientes minerales en el suelo que sustentan las necesidades de las bacterias.

4.2.1 Caracterización cultural de las bacterias acumuladoras de polímero (PHAs). Al comparar las tres zonas de estudio, se observa que el mayor número de morfotipos PHA se encontró en suelos con cobertura de pastos a pesar que su abundancia es menor, en segundo lugar se encuentra el bosque natural secundario y por último la plantación de pino que presenta menor número de morfotipos bacterianos PHA pero su abundancia es elevada. En cada una de las áreas de estudio hay uno o dos morfotipos dominantes, reflejándose en la abundancia relativa y en la heterogeneidad de los datos obtenidos (Tabla 2; Anexo Q).

De los 38 morfotipos PHA aislados, el 60.5 % son bacterias gram negativos y un 39.5% son gram positivos; con respecto a la descripción microscópica (Figura 16), el 94.71% de las bacterias productoras de polihidroxicanoatos son bacilos y el 5.26% restante pertenecen a formas cocoides. Estos resultados se asemejan con los obtenidos por Hidalgo y Zambrano (2005), quienes determinaron que el 57,2 % corresponde a bacterias Gram-negativas y el 47,2 % a bacterias Gram-positivas. Lo anterior corresponde con los planteamientos de Mora (2005) y Dorronsoro (2006), quienes afirman que en la rizósfera las bacterias predominantes son Gram-negativas y las más abundantes en el suelo son pequeños bacilos cocoides de morfología variable (Tabla 2).

Figura 16. Caracterización microscópica de los aislados bacterianos en muestras de suelo bajo las diferentes coberturas vegetales del Centro Ambiental Chimayoy colectadas entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.



Morfotipo: BNS 1

Morfotipo: PI 1

Tabla 2. Morfotipos acumuladores de PHA encontrados en suelo bajo tres coberturas vegetales en bosque natural secundario (BNS); plantación de pino (PI) y zona de pastos (PA) en el Centro Ambiental Chimayoy, municipio de Pasto, Nariño, muestras colectadas entre los meses de Octubre y Diciembre de 2005.

Área de estudio	Respuesta a tinción de Gram	Morfotipos	Total	Total de morfotipos por zona
Bosque natural secundario	+	BNS 1; BNS 3; BNS 7; BNS 11; BNS 2; BNS 4; BNS 9	7	12
	-	BNS 5; BNS 6; BNS 8; BNS 10; BNS 12	5	
Plantación de pino	+	PI 2; PI 3; PI 6; PI 8	4	10
	-	PI 1; PI 4; PI 5; PI 7; PI 9; PI 10	6	
Área de pastos	+	PA 8; PA 10; PA 12; PA 14	4	16
	-	PA 1; PA 3; PA 5; PA 7; PA 11; PA 15; PA 2; PA 4; PA 6; PA 9; PA 13; PA 16.	12	

4.2.2 Índices de diversidad alfa. Para determinar la diversidad y el grado de dominancia de los morfotipos acumuladores de polímero por cada área de estudio, se tuvo en cuenta los índices de riqueza, diversidad de Shannon y de dominancia de Simpson; además se calculó la abundancia relativa de los morfotipos encontrados en cada área de estudio, tomando como referente el total de individuos encontrados en el suelo bajo diferentes coberturas vegetales (Tabla 3).

Tabla 3. Abundancia relativa de los morfotipos acumuladores de PHA encontrados en suelo bajo tres coberturas vegetales en el Centro Ambiental Chimayoy del Departamento de Nariño, colectadas entre los meses de Octubre - Noviembre del 2005.

BOSQUE NATURAL SECUNDARIO		PLANTACIÓN DE PINOS		ZONA DE PASTOS	
Morfotipos (BNS)	Porcentaje (%)	Morfotipos (PI)	Porcentaje (%)	Morfotipos (PA)	Porcentaje %
BNS 1	44,3	PI 1	81,6	PA 1	15,4
BNS 2	4,9	PI 2	0,1	PA 2	3,8
BNS 3	0,1	PI 3	0,7	PA 3	7,6
BNS 4	0,6	PI 4	4,1	PA 4	0,5
BNS 5	0,5	PI 5	1,6	PA 5	1,9
BNS 6	0,9	PI 6	10,6	PA 6	0,4
BNS 7	2,2	PI 7	0,2	PA 7	1,2
BNS 8	0,8	PI 8	0,8	PA 8	1,1
BNS 9	0,1	PI 9	0,2	PA 9	0,1
BNS 10	26,4	PI 10	0,2	PA 10	65,5
BNS 11	2,4			PA 11	1
BNS 12	6,7			PA 12	0,8
				PA 13	0,1
				PA 14	0,3
				PA 15	0,1
				PA 16	0,1

BNS (Bosque Natural Secundario); PI (Plantación de Pino); PA (Zona de Pastos).

A través de los índices de diversidad alfa, determinamos que en la plantación de plantación de pinos se presenta una marcada dominancia debido a que hay mayor número de individuos representados en un solo morfotipo y esto se observa en abundancia de bacterias totales en la plantación de pino fue de $33.3 \text{ UFC} \times 10^8$, de los cuales el 49.6% son acumuladoras de PHAs, representados en 10 morfotipos (Tabla 3). Entre estos el más representativo fue PI 1, con el 82.09 % de abundancia, los demás morfotipos registran valores inferiores a 10.69%, esto nos demuestra el predominio de un morfotipo bacteriano sobre el resto de los aislados.

Lo anterior se relaciona con el bajo índice de diversidad encontrado en esta área de estudio (Tabla 4), posiblemente este resultado se deba a lo mencionado por Jaramillo en el 2002, el cual dice que los que los suelos pertenecientes a cobertura de pinos, presenta condiciones adversas para las bacterias debido a la materia orgánica que lo caracteriza y a la acidez del suelo. En consecuencia prevalecerán solo las bacterias capaces de degradar este tipo de materia orgánica

lo que induce a que pocos individuos se adapten mejor al medio, se reproduzcan o sobrevivan mejor que otras bacterias presentes en el suelo.

Tabla 4. Índices de diversidad alfa para las bacterias PHAs en suelos bajo tres coberturas vegetales en el Centro Ambiental Chimayoy del Departamento de Nariño, colectadas entre los meses de Octubre - Noviembre del 2005

Áreas de estudio	Número de morfotipos	Número de individuos (UFC x 10 ⁸)	Índice de diversidad	Índice de dominancia
Bosque natural secundario	12	14,5	1.59	0.29
Plantación de pino	10	30,1	0.71	0.68
Zona de pastos	16	16,1	1.24	0.5

En la zona de pastos la abundancia de bacterias totales fue de 16.6 UFC x 10⁸, de los cuales el 26.5% son acumuladoras de PHAs, representados en 16 morfotipos, de los cuales el más abundante es PA 10 con un porcentaje de 65.53%, el resto de morfotipos presentaron valores más bajos del 15.40% que corresponden a PA1 (Tabla 3); aunque en esta área se encontró el mayor número de morfotipos, su abundancia no es uniforme, por lo tanto su diversidad es menor (1.24) en comparación con la diversidad de bacterias PHAs en el bosque natural secundario (1.59), probablemente esto se relaciona con el alto índice de dominancia que presenta, razón por la cual, algunos microorganismos son más abundantes que otros (Tabla 4). Este resultado se podría atribuir al hecho de que en suelos rizosféricos son espacios muy competitivos por las bacterias debido a los compuestos energéticos que producen las raíces, estimulando así el crecimiento de bacterias que aprovechen más rápidamente estos recursos (Valencia y Peña, 2001).

En el bosque natural secundario la abundancia de bacterias totales fue de 24.7 UFC x 10⁸, de los cuales el 23.9% son acumuladoras de PHAs, representados en 12 morfotipos, entre estos se destaca el morfotipo BNS 1, con un 44.39%, el resto de los aislados bacterianos presentan valores inferiores a 26.4 % (Tabla 3). En este lugar se encontró la mayor diversidad de bacterias PHAs (1.59), en comparación a las otras áreas de estudio, esto se debe a que existe un mayor grado de uniformidad en la abundancia de morfotipos bacterianos, lo que se refleja en el bajo índice de dominancia (0.29) (Tabla 4). Este resultado probablemente dependa de la influencia que produce la diversidad estructural de la población vegetal que caracteriza este ecosistema, ya que según Kennedy en 1999, la composición de la comunidad de las plantas influye en el crecimiento, la proliferación y la diversidad de las bacterias a causa de la composición química de los diferentes exudados de las raíces y las modificaciones que produce en cuanto la estructura, porosidad y retención de agua en el suelo.

4.3 RELACIÓN ENTRE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO Y LA POBLACIÓN DE BACTERIAS ACUMULADORAS DE PHAs

Con el objetivo de encontrar la relación existente entre las poblaciones microbianas con los factores físico - químicos del suelo y representar gráficamente las variables en función de las áreas de muestreo, se procedió a realizar el análisis de coordenadas principales PCooA, mediante el cual es posible calcular el porcentaje de afinidad que existe entre las variables de estudio con las diferentes zonas de trabajo; cabe anotar que las variables que hace parte de cada eje se identifican por el mayor peso absoluto en los factores de carga y su ubicación en el espacio es determinado por el signo (Gower, 1966; Rohfl, 1997) (Tabla 5; Anexo S).

Mediante este análisis se estableció que es necesario de las tres primeras coordenadas para explicar el 91.43% de la varianza total, en donde el primer eje absorbe un 70.8% de la varianza, el segundo el 12.91% y el tercero el 7.71%

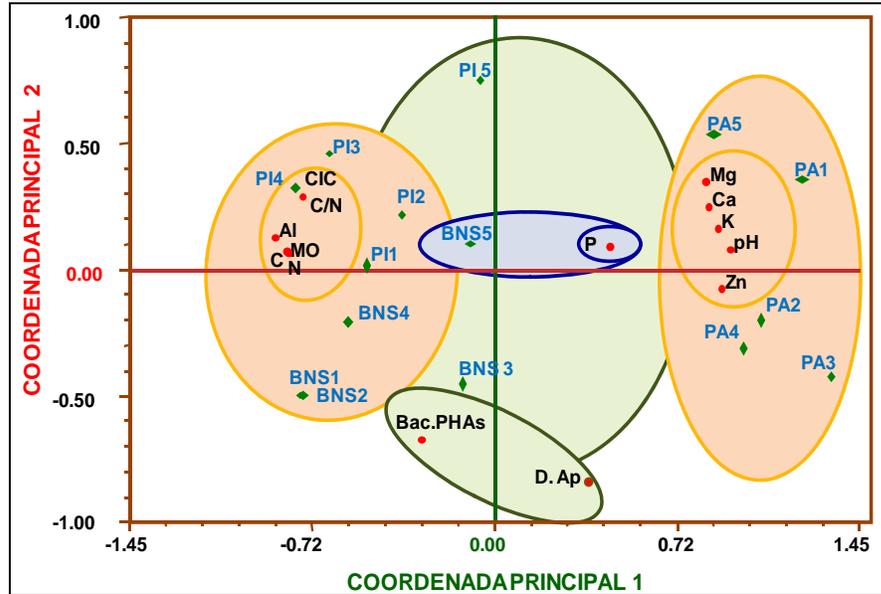
La primera coordenada principal, explica la formación de dos grandes grupos, uno de ellos formado por el conjunto de las parcelas ubicadas en la plantación de pino y bosque natural secundario, los cuales se destacan por tener altos contenidos de materia orgánica, CIC y Aluminio entre otros, y el segundo grupo está conformado por las parcelas que se establecieron en la zona de pastos como grupo independiente, las cuales tienen altos valores en el pH y el contenido de bases intercambiables, cuyos valores descienden a lado y lado del eje X (Figura 17). En la segunda coordenada lo constituye la relación entre la densidad aparente con la abundancia de bacterias PHA y la parcela V de la plantación de pinos con la parcela III del bosque natural secundario. La tercera coordenada está formada por el contenido de Fósforo y la parcela V del bosque natural secundario.

Tabla 5. Factores de carga de las variables edáficas y parcelas analizadas mediante el análisis de coordenadas principales.

Variable Analizada	Coordenada Principal		
	C1	C2	C3
pH	0.94	0.08	0.04
MO	-0.82	0.07	-0.07
Dap	0.37	-0.84	0.50
P	0.46	0.089	-0.48
CIC	-0.76	0.28	0.30
Ca	0.85	0.25	0.05
Mg	0.78	0.35	0.04
K	0.88	0.16	0.06
Al	-0.87	0.13	0.28
Zn	0.90	-0.08	-0.03
N	-0.82	0.07	-0.05
C	-0.82	0.07	-0.07
CvsN	-0.81	0.05	-0.09
BacPHA	-0.29	-0.68	-0.47

Parcelas	Coordenada Principal		
	C1	C2	C3
PA1	1.04	0.25	0.03
PA2	1.05	-0.19	-0.03
PA3	1.34	-0.41	0.23
PA4	0.95	-0.30	0.10
PA5	0.85	0.54	-0.10
PI1	-0.60	0.03	0.39
PI2	-0.37	0.22	0.27
PI3	-0.65	0.46	0.35
PI4	-0.77	0.30	0.28
PI5	-0.09	0.74	-0.46
BNS1	-0.77	-0.50	0.08
BNS2	-0.76	-0.49	-0.27
BNS3	-0.31	-0.49	-0.24
BNS4	-0.58	-0.20	0.02
BNS5	-0.32	0.039	-0.66

Figura 17. Análisis de coordenadas principales



BNS 1, 2, 3, 4, 5 (Parcelas de bosque natural secundario); PI 1, 2, 3, 4, 5 (Parcelas de plantación de pino); PA 1, 2, 3, 4, 5 (Parcelas de pastos); CIC (capacidad de intercambio cationico); CvsN (Relación Carbono/Nitrógeno); MO (materia orgánica); C (Carbono); N (Nitrógeno); Al (Aluminio); P (Fosforo), Mg (Magnesio); Ca (Calcio); K (Potasio); Zn (Zinc); pH (Potencial de Hidrogeno); Dap (densidad aparente); BacPHA (Bacterias acumuladoras de polihidroxicarboxilatos (PHA)); color naranja (primera coordenada); color verde (segunda coordenada); color azul (tercera coordenada).

Estudios realizados por Atlas y Bartha (2002) mencionan que en lugares donde el pH es fuertemente ácido hay mayor concentración de materia orgánica y solubilidad de Aluminio, pero por lo general hay déficit de bases intercambiables como: Calcio, Magnesio y Potasio, aspectos que son fácilmente apreciables en la Figura 17.

Además, en la plantación de pino y en el bosque natural secundario, la mayor concentración de Carbono posiblemente se debe a que los ecosistemas forestales contienen más Carbono por unidad de superficie que cualquier otro tipo de ecosistema debido a una lenta descomposición de la materia orgánica y por ende su acumulación en la capa superficial del suelo propiciando la acumulación de Carbono (Robert, 2002)

De esta manera es posible confirmar lo planteado por Eter (1990), quien menciona que la configuración externa de un paisaje es el resultado de los factores que intervienen en su formación (clima, geomorfología, suelos, hidrología, material

parental, vegetación, actividad humana, entre otros), y su interacción le confiere unos rasgos distintivos en cuanto a la composición físico-química del suelo y la cobertura vegetal, que son características que permiten reconocer y diferenciar, los paisajes unos de otros, además estos factores que inciden de manera directa en la abundancia de organismos presentes en el suelo.

Por lo tanto a través de este análisis se determino que la plantación de pino, lugar en donde se registraron los más altos valores en la abundancia bacteriana acumuladora de PHAs, está relacionada con los altos contenidos de materia orgánica y la disponibilidad de elementos como Carbono y Nitrógeno; probablemente esto se debe a que las bacterias acumulan diferentes sustancias cuando existe un exceso de recursos en su entorno, las cuales posteriormente son degradadas para mantener las funciones mínimas de la célula cuando la fuente de energía externa disminuye (Guerrero y Berlanga, 2001; Balows y col, 2002; Parham y col., 2003).

En cuanto a la materia orgánica presente en este lugar su acumulación y bajo grado de mineralización se debe a que las sustancias alofanicas, tales como la lignina y los polifenoles inducen una baja actividad enzimática y la formación de complejos insolubles formados a partir del Aluminio ya que al encontrarse en forma tóxica en este tipo de suelos, inmoviliza una gran cantidad de nutrientes, entre ellos el Fósforo, ocasionando estrés nutricional para muchos tipos bacterianos, es de señalar que la acumulación intracelular de PHA se favorece bajo estas condiciones (Ojumu y col., 2004), y posiblemente esta sea la razón por la cual, en suelos de plantación de pino, la abundancia de bacterias es alta en comparación con las demás áreas de trabajo (Foy, 1984; Haug, 1984; Fernandez, 2006).

La abundancia de bacterias PHAs en el suelo de bosque natural secundario fue la más baja ($14.39 \text{ UFC} \times 10^8$) en comparación con las demás áreas de muestreo, sin embargo comparte características físico-químicas similares con la plantación de pino, razón por la cual se ubican en la misma posición del plano, la diferencia se debe a la disponibilidad de nutrientes y la materia orgánica influyen en forma positiva en la abundancia y diversidad de las bacterias en el suelo, sin embargo, se debe tener en cuenta el tipo de materia orgánica ya que en la plantación de pino a pesar de tener niveles altos de materia orgánica esta se encuentra conformada por sustancias de difícil degradación para la microbiota del suelo, no obstante los valores bajos reportados en el bosque natural secundario para las bases intercambiables pueden ser una causa por la cual la síntesis de polímero bacteriano se presente en esta área de estudio (Driscoll y col., 1988; Kennedy, 1999; Vitousek, 1994; Pumisacho y Sherwood, 2002).

Además, cabe mencionar que la vegetación en bosque natural secundario y la acumulación de materia orgánica en estos ecosistemas le confieren al suelo propiedades de resistencia a la compactación ya que mantienen la humedad del

sustrato, al igual que modifican la estructura, la porosidad, el pH y el potencial redox, estas características propician un mejor ambiente para el desarrollo de los microorganismos de diferentes tipos metabólicos, incidiendo en la actividad, la densidad y la distribución de bacterias en microcolonias compuestas de pocas células que pueden pertenecer a diferentes morfotipos (IGAC, 1993; Nunan, y col., 2003; Nogales 2005).

Mediante el resultado obtenido para la zona de pastos, es posible determinar que aunque no es el lugar en donde se encuentra el mayor número de bacterias acumuladoras de PHAs ($16.1 \text{ UFC} \times 10^8$), tampoco es el más bajo, es probable que esto se deba a los valores altos en el contenido de bases intercambiables y el alto grado de compactación que se refleja en los valores de densidad aparente, característicos de este lugar.

Pérez, y col. (1998); y otros autores mencionan que las bacterias en general se son abundantes en suelos con alto contenido de materia orgánica y niveles elevados de carbono, superior del que necesitan para vivir (Cerrato y Alarcón, 2001; Dorronsoro, 2006); dichos aspectos no se presentan en esta zona, razón por la cual la abundancia de bacterias es inferior en comparación con la plantación de pino, lugar en donde se reporta una mayor abundancia bacteriana.

Además, la dinámica que presentan los suelos bajo cobertura de gramíneas relacionada con los aportes continuos de materia orgánica, y la baja acumulación de ésta en la capa superficial del suelo, aspectos que se traducen en los valores de pH, los cuales son más elevados en comparación con los ecosistemas forestales conlleva a incrementar los valores en el contenido de bases intercambiables las cuales cumplen funciones de gran importancia en la bacteria, por ejemplo: el Potasio, es considerado como un importante cofactor en algunas reacciones enzimáticas, relacionadas con la síntesis de proteínas (Madigan y col., 1997; Atlas y Bartha, 2002), y el Magnesio cuya función es la de estabilizar los ribosomas, membranas celulares, ácidos nucleicos y participar en la síntesis de muchas enzimas (Madigan y col., 1997; Toro, 2004).

Sin embargo, es posible que la abundancia de estas bacterias en este lugar sea mayor en comparación con la de bosque natural secundario, debido a los altos valores en la densidad aparente que hay en este lugar, producidas por la compactación, lo que ocasiona una baja capacidad de retención de agua y CIC en el suelo; de manera que quedan limitados varios nutrientes que son indispensables para la síntesis de moléculas importantes para las bacterias, por otro lado en la plantación de pinos la densidad aparente influyen en forma inversa con diversidad de las bacterias en el suelo. Porque los valores elevados de esta variable se correlacionan con escasa porosidad y menor disponibilidad de agua, en este sentido, esta condición afectará la actividad de agua, solubilidad de nutrientes y la presión osmótica. Pero en la abundancia de bacterias productoras de PHAs se incrementa, probablemente porque el polímero otorga resistencia a

las bacterias que tiene capacidad de sintetizarlo. Por ejemplo, Fernández (2006) menciona que la regulación del nivel de polimerización o depolimeración del PHA las bacterias soportan cambios de presión osmótica del ambiente, porque a diferencia del PHA, las unidades monoméricas que los conforman son osmóticamente activas y este procedimiento se lo puede considerar como una estrategia de supervivencia bacteriana (Guerrero y Berlanga, 2001).

Cabe señalar que los resultados obtenidos en zona de pastos se relacionan con los planteamientos de Luna y col. (2002), quienes mencionan que la vegetación presente en el lugar y los exudados que producen algunas raíces, cambian las propiedades físicas y químicas de los suelos, así como la estructura, la porosidad, el pH y el potencial redox; factores que en su conjunto tienen influencia sobre la densidad y la actividad de las poblaciones microbianas, reflejándose en la abundancia de bacterias productoras de PHAs.

Por otra parte la segunda coordenada principal separa la parcela cinco de la plantación de pino (Pi 5) y la parcela tres de bosque natural secundario (BNS 3), en función de la densidad aparente y la abundancia de bacterias acumuladoras de PHAs.

En este sentido, Sadeghian y col., (2002), menciona en uno de sus estudios que la actividad y la abundancia de los microorganismos se ve drásticamente reducida por la compactación, contrario a lo que ocurre en suelos con mayor volumen de poros que se caracterizan por tener una economía hídrica eficiente y materia orgánica aprovechable como las que presenta el bosque natural secundario, por lo cual, estas condiciones favorecen la mayor abundancia bacteriana, ante esta situación el polihidroxialcanoato se hidroliza a unidades monoméricas que retienen el agua y este procedimiento se lo puede considerar como una estrategia de supervivencia bacteriana según Guerrero y Berlanga en el 2001.

Al analizar los datos reportados para estas dos parcelas, la parcela BNS 3, presenta bajos valores en la densidad aparente y altos en la abundancia de bacterias PHAs, a diferencia de la parcela cinco de la plantación de pino (Pi 5), en donde los valores de densidad aparente son altos y la abundancia de microorganismos es baja, comprobando de esta manera lo planteado por Sadeghian (2002).

Y la tercera coordenada, explica la razón por la cual, la parcela cinco de bosque natural secundario (BNS 5), se separa de las demás en función de los contenidos de Fósforo, aquí su disponibilidad es baja pero sus contenidos de Aluminio son altos. Rodríguez y Fraga (1999), hacen referencia a esta situación al mencionar que el Fósforo forma compuestos insolubles con el Aluminio cuando el pH del suelo es fuertemente ácido, limitando la disponibilidad de este elemento; situación que se presenta en las parcelas ubicadas en el bosque.

Por lo tanto se podría considera que el tipo de cobertura vegetal presente en el lugar, cambian las propiedades físicas y químicas del suelo y que en conjunto tienen influencia sobre la abundancia y distribución de las bacterias porque son sensibles a este tipo de cambios, probablemente la acumulación del polímero PHA se utilice como un mecanismo por parte de las bacterias para establecerse en lugares con condiciones heterogéneas. Cabe la posibilidad de que en un futuro estas bacterias puedan ser utilizadas como indicadores potenciales para evaluar disturbios en el suelo.

5. CONCLUSIONES

Los microorganismos son sensibles al disturbio y la evaluación de los efectos ocasionados sobre la abundancia y la diversidad microbiana del suelo puede contribuir a entender su funcionamiento y calidad para el desarrollo de agroecosistemas sostenibles (Kennedy, 1999). Por lo que a través de este estudio y la relación encontrada entre las diferentes variables físico - química del suelo la presente investigación, se concluye lo siguiente:

1. En general los suelos del Centro Ambiental Chimayoy, se caracterizan por ser ricos en material vegetal lo que se refleja en la textura orgánica, presentar pH que oscila desde ácido a muy ácido, concentración de materia orgánica superior al 15% y baja a muy baja saturación de bases intercambiables.
2. Existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la abundancia de bacterias PHAs de suelo bajo las tres coberturas vegetales.
3. La disponibilidad de nutrientes, la concentración y el tipo de materia orgánica influyen en la abundancia y diversidad de las bacterias productoras de PHAs.
4. La ABUNDANCIA BACTERIANA acumuladora de PHA, fue más alta en la plantación de pino seguida por la zona de pastos y ocupando el último lugar el bosque natural secundario.
5. Al comparar las tres áreas de estudio, la zona de pastos presentó el más alto índice de RIQUEZA seguido de bosque natural secundario y ocupando el último lugar la plantación de pino (*Pinus patula*).
6. El más alto índice de DOMINANCIA se presenta en la plantación de pinos y la mayor DIVERSIDAD de bacterias acumuladoras de PHAs se encuentra en el bosque natural secundario
7. Las características físico-químicas del suelo; afectan las poblaciones biológicas. En especial la de microorganismos que son los responsables de la gran mayoría de actividades concernientes con los procesos de descomposición de la materia orgánica y la disponibilidad de nutrientes en el suelo, los cuales reaccionan modificando su abundancia y la diversidad.

6. RECOMENDACIONES

- Teniendo en cuenta que los morfotipos de bacterias PHAs del suelo encontradas bajo las diferentes coberturas vegetales presentan características culturales y microscópicas diferentes, es necesario identificar hasta genero o especie los morfotipos encontrados en cada una de las áreas de estudio.
- Como se ha comprobado en el presente estudio las poblaciones bacterianas son sensibles a las variaciones en la cobertura vegetal y el tipo de materia orgánica, razón por la cual se sugiere desarrollar este tipo de estudios en suelos con otros tipos de vegetación, por ejemplo: suelos agrícolas, desérticos, lodazales, entre otros.
- Debido a que la abundancia y la riqueza de bacterias PHAs varía en función de las características del suelo, se sugiere evaluar la producción de polímero con cada uno de los aislados, para relacionarlo con las características físico-químicas del mismo.
- Las características físico- químicas del suelo constituyen el factor principal en el establecimiento de comunidades microbianas, sin embargo se debe tener en cuenta otro tipo de variables del ambiente como: Época del año, temperatura del suelo, precipitación, contenidos de hierro y azufre entre otros.
- Los resultados obtenidos sugieren que existen efectos de las propiedades fisicoquímicas del suelo en la abundancia de poblaciones bacterianas acumuladoras de PHAs, por lo que se recomienda realizar otras investigaciones encaminadas a considerar este tipo de bacterias como bioindicadoras del estado del suelo.

BIBLIOGRAFÍA

ABOCOL. Los elementos nutricionales en el suelo y sus funciones en las plantas (mayores-secundarios-menores). [artículo en línea]. Bogotá, Colombia: Investigación y Desarrollo, 2004. [Citado en Agosto del 2006]. Disponible en Internet: <http://www.abocol.com/articulo_especial.htm>

ACEVEDO, M. PORTA, J. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 3ª ed. Ed. ARTES GRAFICAS. Madrid, 1993.

AGROPEC-STAR. Manual de Agronomía. [Libro on line]. Guadalajara, México : Agropecstar, 2002. [Citado en Julio del 2006]. Disponible en Internet: <<http://www.agropecstar.com/portal/doctos/agronomia7.htm>>.

ALDEN, L; DEMOLING, F; BAATH, E. Method of Determining Factors Limiting Bacterial Growth in Soil. Environmental Microbiology. April, Vol. 67 (4): 1830-1838 p.

ALMEIDA, A; NANCY., I; PETTINARI., M y RUIZ., J. Bioplásticos : una alternativa ecológica. [Artículo en línea]. En : Rev. Química Viva. Vol. 3, No. 3 (Sept. 2004); [citado en Agosto 2006]. Disponible en Internet: <<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v3n3/pettinari.html>> ISSN 1666-7948.

ÁLVAREZ, S; VILLARREAL., H; CÓRDOBA., M; ESCOBAR., F; FAGUA., G; GAST., F; MENDOZA., H; OSPINA., M; y UMAÑA A.M. Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. En : Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. 2ª. ed. Editorial Programa de Inventarios de Biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia : 2006. pp. 185-226

ALDOMORE, C; NORVELL., A; BJORKMAN., T and HARMAN., G. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant- growth- promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. En : Appl. Environ. Microbiol. Vol. 65 (1999); 2926-2933 p.

ANDERSON, A. and DAWES, E. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial use of bacterial polyhydroxyalkanoates. En : Microbiol. Rev. Vol. 54, No. 4. (1990); 450-472 p.

ATLAS., R. y BARTHA., R. Ecología microbiana y Microbiología ambiental., 2 ed. Ed. Prentice Hall, 2002.

BALOWS, A; TRUPER., H.G; DWORKIN., M; HARDER., W y SCHLEIFER., K.H. The prokaryotes : A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 2a ed. New York; Springer-Verlag, 1992. 4126 p.

BARNARD, G. and SANDERS, N. The poly β hidroxybutyrate granules "in vivo". En : Journal of Biol. Chem. Vol. 24. (1999); 3286-3289 p.

BASSET, D. Developments in Cristalline, Polymers-2. En : El sevier. Appl. Science publishers London. Vol. 32 (1988); 456-462 p.

BELLO-AMEZ, S; JULCA., A; MENESES., L y SEVILLANO., R. La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. En : IDESIA (Chile). Vol. 24. No. 1 (Abr. 2006); 49-61 p.

BENAVIDES, O y GOMEZ, O. Plan de manejo de la microcuenca Tosoabi. Pasto, Nariño : COORPONARIÑO, 1998. 32 p.

BRISSIO, P. Evaluación preliminar del estado de contaminación en suelos de la provincia del Neuquén donde se efectúan actividades de explotación hidrocarburífera. [Online]. Argentina, 2005. Trabajo de Grado. (Licenciado en Saneamiento y Protección Ambiental). Universidad Nacional del Comahue. Área de salud y ambiente. [Citado en Agosto del 2006]. Disponible en Internet: <<http://www.tesis.bioetica.org/pab.htm>>

BURÉS, S. La materia orgánica en los suelos agrícolas. En : Terralia. No. 8 (May. 1999); 16 – 20 p.

CALLEJAS, M. Descubriendo la ciencia por medio de la relación suelo - agua – planta::Capítulo 2. El suelo : características y propiedades. [libro on line] Chile, Argentina : Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2003. [citado en Jul. 2006]. Disponible en Internet: <[http://agronomia.uchile.cl/extension/explora2003/ files/Gu%Eda %207.pdf](http://agronomia.uchile.cl/extension/explora2003/files/Gu%Eda%207.pdf)>.

CARBALLO, M; RODRÍGUEZ, M.; FERNÁNDEZ, A.; VILLAVERDE, M.; LÓPEZ A.; MARÍN, D.; NÚÑEZ, R.; GALEGO, N. y MARTÍNEZ, J. Producción de polihidroxialcanoatos en bacterias diazotrofas. I. Influencia de la aeración en la síntesis de poli β hidroxibutirato en *Azospirillum brasilense* CEPA 7. En: Revista Biología. Vol. 18, No. 1(2004); 87 -95 p.

CARRILLO, L. Microbiología agrícola. Capítulo 3. [Libro online]. Provincial de salta, Argentina : Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ciencias Agrarias. 2003. [citado en febrero del 2006]. Disponible en Internet: <<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap3.pdf>> ISBN 987-9381-16-5.

CERRATO, R y ALARCON, A. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. En : Ciencia Ergo Sum. Vol. 8, No. 2. (Jul. – Oct. 2001); 175 – 183 p.

CHIA-YIN, L; DER-SHYAN., S and YUN-TING., W. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. En : Environmental Microbiology. Vol. 146 (2000): p. 2019-2025

CORAL, D; BURBANO, H; UNIGARRO., A Y ROMO., M. Evaluación integral de la calidad del recurso suelo en el Santuario de Flora y Fauna Volcan Galeras, sur de Colombia. Pasto, Nariño : Editorial Universidad de Nariño, Sistema de Investigaciones - VIPRI, 2005. 368 p.

CORTES, A; CHAMORRO., C y VEGA., A. Cambios en el suelo por la implantación de praderas, coníferas y eucaliptos en un área aledaña al embalse Neusa (páramo de Guerrero). En : Investigaciones de Colombia. IGAC. Vol. 2, No. 1. (1990). 101-113 p.

DELGADO, M. Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal. [artículo en línea]. En : Investigaciones ORIUS BIOTECNOLOGÍA. Documentos técnicos (Abr. 2005) [citado en Julio del 2006]. Disponible en Internet : <<http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,63,0,0,1,0>>

DILLY, O; BLOEM., J; VOS., A and MUNCH., J. Bacterial diversity in agricultural soil during litter decomposition. En : Environmental Microbiology. Vol. 70. No. 1 (Jan. 2004); 468-474 p.

DORRONSORO, C y GARCÍA., I. Contaminación del suelo. [base de datos en línea]. España: Universidad de Granada. Area de Edafología y Química Agrícola. 2005 [citado en Junio del 2006]. Disponible en Internet: <<http://edafologia.ugr.es/contasue/tema14-16/prop.htm>>

DORRONSORO, C. Introducción a la edafología. [base de datos en línea]. España: Universidad de Granada, Area de Edafología y Química Agrícola. 2006 [citado en Junio del 2006]. Disponible en Internet: <<http://edafologia.ugr.es/introeda/tema02/prop.htm>>

DRISCOLL, C; SCHECHER., W; (1988) Aluminium in the environment. citado por FEIXA, X. Poliaminas y tolerancia al Aluminio en variedades tolerantes y sensibles de Zea mays [on line]. Barcelona, 2001, 148 p. Tesis doctoral (Doctor en Ciencias). Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Ciencias. Area de fisiología vegetal. [citado en Enero, 2007] Disponible en Internet:<http://www.tdx.cesca.es/TDX-1222103-154103/index_cs.html>

ELSAS, J y TREVORS, J. Microbiología moderna del suelo. Nueva York: Marcel Dekker. 1997.

ENCARNACION, S; DUNN., M; WILLMS., K and MORA., J. Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etili*. En : Journal Bacterial. Vol. 177. No. 11 (1995); 3058-3060 p.

EQUIPO DEL PROYECTO FERTILIZAR -INTA PERGAMINO. Movilidad del Fósforo en el suelo. Argentina. En : Boletín trimestral de fertilizantes y agroquímicos. No. 1 (abr. 2006)

ESPINOZA, Y. Secuestro de carbono en el suelo. [artículo en línea]. En : Revista Digital CENIAP HOY No. 7. (Ene – Abr. 2005). [citado en Julio 2006] Disponible en internet: <<http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n7/arti/espinozay/arti/espinozay.html>> ISSN: 1690-4117

ÉTER, A. Introducción a la ecología del paisaje: un marco de integración para los levantamientos rurales. IGAC. Bogotá, Colombia. 1990. 90 p.

FAO. Los principales factores ambientales y de suelos que influyen sobre la productividad y el manejo. En : Manual de practicas integradas de manejo y conservación de suelos. [Libro on line]. París, Francia : FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), 2000. [citado en Junio del 2006]. Disponible en Internet: <<http://www.fao.org/ag/ags/agse/agse/7mo/iita/iita.html>>

FAVELA, E.; CORTÉS, J. y CORTÉS, G. Aspersiones foliares de zinc en nogal pecanero en suelos alcalinos En : Terra. Vol. 18, No. 240 (Junio, 2000); 239-245 p.

FENCHEL, T; KING., GM and BLACKBURN., TH. Bacterial Biogeochemistry : The Ecophysiology of Mineral Cycling. 2 ed. San Diego : Academic Press, 2000; 43-59 p, 117-161 p.

FERNÁNDEZ, P. Abundancia de bacterias acumuladoras de Polihidroxicanoatos en suelos agrícolas de la región Andina del Departamento de Nariño y caracterización de una cepa de *Bacillus micoydes* FLB 2. Productor de copolímero. La Habana – Cuba, 2006, 135 p. Tesis doctoral. (Doctor en microbiología). Universidad de la Habana. Facultad de Biología. Área de Microbiología

FERNÁNDEZ, L. Los suelos. [Libro online]. Badajoz, España : Universidad de Extremadura Badajoz, 2003. [citado en Marzo del 2006]. Disponible en Internet: <http://ecologia.unex.es/siamex/temasfisico/suelo/los_suelos.htm>.

FINDLAY, R. and WHITE, D. Polymeric β -hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. En: Appl. Environ. Microbiol. Vol. 45 (1983); 71-78 p. Citado por: ROTHERMICH, M; GUERRERO., R; LENZ., R and GOODWIN., S. Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuation of

Poly(hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 66 (2000); 4279-4291 p.

FOY, C. (1984) Physiological effects of hydrogen, aluminium and manganese toxicities in acid soil. citado por FEIXA, X. Poliaminas y tolerancia al Aluminio en variedades tolerantes y sensibles de Zea mays [on line]. Barcelona, 2001, 148 p. Tesis doctoral (Doctor en Ciencias). Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Ciencias. Área de fisiología vegetal. [citado en Enero, 2007] Disponible en Internet: <http://www.tdx.cesca.es/TDX-1222103-154103/index_cs.html>

FRISTCHE, K; LENZ., R. and FULLER., R. Bacterial polyester containing branched poly (β -hydroxyalkanoates) units; Int. J. En : Biol. Macromol. Vol 12 (1990); 92-101 p.

FUENTES, F y MASSOL-DEYÁ., A. Manual de laboratorios: Ecología de microorganismos. [Libro online]. Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico. 2002. 217 p. [citado en Marzo del 2006]. Disponible en Internet: <<http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p1-intro.pdf>>.

FUENTES, J. Propiedades generales de los suelos. En : El suelo: Un sistema vivo. [libro on line] Chile, Argentina : Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2003 [citado en Julio del 2006]. Disponible en Internet: <<http://agronomia.uchile.cl/extension/explora2003/files/Gu%EDa%207.pdf>>

GARVEBA, P; VENN., J; and ELSAS., J. Microbial diversity in soil : Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. En : Annual Review of Phytopathology. Vol. 42 (sep. 2004); 243-270 p.

GERNGROSS, T y MARTÍN D. Enzyme-catalyzed synthesis of poly [(R)-(-)-3-hydroxybutyrate] Formation of macroscopic granules in vitro En : Proc. Nat. Acad. Sci. Usa, Vol. 92 (1985); 6279-6283 p.

GINER, J y ARCINIEGA, L. Las sustancias húmicas: incidencia en la fertilidad de los cultivos. En : Agrícola Vergel. No. 269 (May. 2004); 264-269 p.

GODOY, F; BUNSTER., M; MATUS., V; ARANDA., C; GONZALEZ., B. and MARTINEZ., M. Poly- β -hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. En : Lett Appl Microbiol. Vol. 36 (2003); 315-20 p.

GOMEZ, D. Aislamiento y caracterización de bacterias nativas productoras de polihidroxialcanoatos. [Online] En : Universitas Scientiarum. Original no consultado. Resumen en: Resúmenes tesis de posgrados. Vol. 8. No 1 (Ene. -

Jun. 2003) [citado en Agosto 2006]. Disponible en Internet < <http://www.javeriana.edu.co/ciencias/universitas/vol8n1/MAESTR.htm>>

GOWER, J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. En : *Biometrika*. Vol. 53. (1966); 325-338 p.

GRANT, W. y LONG, P. Microbiología ambiental. [Libro on line] Zaragoza : Acribia. 1989 (Citado en septiembre del 2004). Disponible en Internet: <www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia/micro.html>

GUERRERO, R. y BERLANGA, M. La "inmortalidad" procariótica y la tenacidad de la vida. [artículo en línea] Barcelona, España. En : *Actualidad SEM*. Vol. 32, No.16 (Dic. 2001); 16 - 23 p. [citado en Agosto 2006]. Disponible en Internet: <<http://ice.d5.ub.es/conferencias/carpetes/guerrero/3articulosmicrobactsem/33inmortalactsem32.PDF>>.

HAUG, A. (1984) Molecular aspects of Aluminium toxicity, citado por FEIXA, X. Poliaminas y tolerancia al Aluminio en variedades tolerantes y sensibles de *Zea mays* [on line]. Barcelona, 2001,148 p. Tesis doctoral (Doctor en Ciencias). Universidad Autonoma de Barcelona. Facultad de Ciencias. Area de fisiología vegetal. [Citado en Enero, 2007] Disponible en Internet:<http://www.tdx.cesca.es/TDX-1222103-154103/index_cs.html>

HENDERSON, R; and COLEN., W. Physiology of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus* growing in continuous culture. En : *Microbiology*. Vol. 143 (1997); 2361-2371 p.

HENRYSSON, T and McCARTY., P. Influence of the endogenous storage lipid poly- β -hydroxybutyrate on the reducing power availability during cometabolism of trichloroethylene and naphthalene by resting methanotrophic mixed cultures. En : *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59 (1993); 1602-1606 p.

HIDALGO, W. y ZAMBRANO, J. Aislamiento de bacterias nativas productoras de Polihidroxialcanoatos PHA's presentes en suelos de la región Andina del Departamento de Nariño. Colombia, 2005, 106 p. Trabajo de Grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas.

HOFSTEDE, R. y AGUIRRE, N. Biomasa y dinámica del carbono en relación con las actividades forestales en la Sierra del Ecuador. En: G. Medina y P. Mena (Eds) *El páramo como espacio de mitigación de carbono atmosférico*. En : Serie Páramo 1. GTP/Abya Yala, Quito. (1999) 29-52 p.

HOLDRIDGE. L. Ecología. Basada en zonas de vida. 1ª ed. Ed. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura ICA. Costa Rica. 1987.

I.G.A.C. Aspectos ambientales para el ordenamiento territorial del occidente del departamento del Caquetá. Bogotá : INPA-IGAC, 1993. citado por : MORA, J. La actividad microbiana : un indicador integral de la calidad del suelo. [artículo en línea] En : Luna Azul, revista digital de la Universidad de caldas. No 5, Art. 6 (2005); 1-6 p. [citado en Octubre 2006]. Disponible en Internet: <http://lunazul.ucaldas.edu.co/downloads/9cc8db94Revista_5_6_9.pdf. >

JAIMES, E. Curso de actualización sobre caracterización de suelos. Trujillo. Universidad de Los Andes. Núcleo Universitario "Rafael Rangel". Coordinación de Investigación y Postgrado. Grupo de Investigación de Suelos y Aguas. 1994. 255 p

JARAMILLO, D. Introducción a la ciencia del suelo. [Libro online]. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2002, 613 p. [citado en septiembre del 2005]. Disponible en internet: <<http://www.unalmed.edu.co/~esgeocien/001851>>

KARR, D; WATERS., J and EMERICH., D. Analysis of poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-inclusions high-pressure liquid chromatography and U. V. Detection. En : Appl. Environ. Microbiol. Vol. 46 (1983); 1339-1344 p.

KAWAGUCHI, Y. and DOI., Y. Kinetics and mechanisms of synthesis and degradation of poly- β -hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus*. En : Macromolecules. Vol. 225 (1992); 2324- 2329 p.

KENNEDY, A. Bacterial diversity in agro ecosystems. En : Agr. Ecosys. Environ. Vol. 74 (1999); 65-76 p. Citado por : CARDONA, G, ARCOS, A. y MURCIA, U. Abundancia de actinomicetes y micorrizas arbusculares en paisajes fragmentados de la Amazonia colombiana. En : Agronomía Colombiana. Vol. 23, No. 2. (2005); 317-326 p.

KRIEG, N. Y HOLT, J. BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Williams & Wilkins Philadelphia. Tokio. Vol 2. (1986); 1599 p.

LAGEVEEN, R; HUISMAN., G; PREUSTING., H; KETELAAR., P; EGGINK., G and WITHOLT., B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxybutyrate. En : Appl. Environ. Microbiol. Vol. 54 (1988); 2924-2932 p.

LEE, S. Plastic bacteria progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. En : TIBTECH. Vol. 14 (1996); p. 431-438.

LEIVA, P. El medio ambiente en Colombia. [libro on line]. 2ª. ed. Bogota, Colombia : IDEAM (INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS

AMBIENTALES), 2001, 530 p, [citado en Julio del 2006.], Disponible en Internet: <<http://www.ideam.gov.co/publica/medioamb/preliminares.pdf>>. ISBN958-95850-94

LÓPEZ, N; RUIZ., J and MÉNDEZ., B. Survival of poly-3-hydroxybutyrate - producing bacteria in soil microcosms. En : World J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 14 (1998); 681-684 p.

LUCENA, J. Los micronutrientes y su utilización en la agricultura. [base de datos en línea]. España: Universidad Autónoma de Madrid, 2000. [citado en julio del 2006]. Disponible en Internet: <http://www.fertiberia.com/servicios_on_line/cursos/micronutrientes/indexmicro.html>

LUNA., C; GUIDO, M; VEGA., J; HERNÁNDEZ., F; VÁSQUEZ., S; TRUJILLO., N; RAMÍREZ., E y DENDOOVEN., L. Actividad microbiana en suelos. En : Avance y Perspectiva. Vol. 21 (Sept. - Oct. 2002); 328 – 332 p.

MADIGAN, M; MARTINICO., J. y PARKER., J. Brock Biología de los Microorganismos, 8 ed. España : Prentice Hall, 1998. 1096 p.

MAHECHA, L. El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. En : Rev. Col Cienc Pec. Vol. 15, No.2 (2002); 226 - 231 p.

MARTEL, Y.A. Cation exchange capacity of clayrich soils in relation to organic matter, mineral composition, and surface área. En : Soil Sci. Soc. Am. J. Vol. 42. (1987); 764-767 p.

MARTÍN, A. Introducción a la microbiología del suelo. 3a. ed. México : Libros y Editoriales S.A. 1998. 491 p.

MARTÍNEZ, L.J and ZINCK, A. Temporal variation of soil compaction and deterioration of soil quality in pasture areas of Colombian Amazonia. En : Soil Till. Res. Vol. 75 (2004); 3 - 17 p.

MAYER, F. Structural Aspects of Poly- β -hydroxybutyrate granules. Citado por : SCHELEGEL, H; STEINBUCHER A. Bacterial polyhydroxyalkanoates poly- β -hydroxyalkanoic acid. 1992. 265-268 p.

MENESES, L. Effect of meadow management on plant species diversity, aboveground phytomass yield and sodding process (2005). citado por: BELLO-AMEZ., S; JULCA., A; MENESES., L; SEVILLANO., R. La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. [artículo en línea]. En : IDESIA (Chile) Vol. 24. No. 1 (Abril, 2006); p 49-61, [citada en Julio del 2006]. Disponible en Internet: <<http://www.scielo.cl/scielo.php>>. ISSN 0718-3429

MORA, J. La actividad microbiana: un indicador integral de la calidad del suelo. [artículo en línea] En : Luna Azul, revista digital de la Universidad de caldas. No. 5, Art. 6 (2005); 1-6 p. [citado en Abril 2005]. Disponible en Internet: <http://lunazul.ucaldas.edu.co/downloads/9cc8db94Revista5_6_9.pdf>

MORENO, C.E. Métodos para medir la biodiversidad. M & T-Manuales y Tesis SEA, Vol. 1. Zaragoza, 84 p.

NAVARRO, A. Curso de Ciencias Ambientales: Edafología. [base de datos en línea]. España: Universidad de Extremadura, Área de Edafología y Química Agrícola, 2005 [Citada en febrero del 2006]. Disponible en Internet: <[http://www.unex.es/edafo/CA Edafologia.html](http://www.unex.es/edafo/CA%20Edafologia.html)>

NAVE, R. y GARCÍA, P. Dinámica de la materia orgánica con énfasis en suelos de Ando. En: Revista de Chapingo. Vol 5, No. 1 (1990); 68 p.

NOGALES B. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del Iceberg. [artículo en línea] En : Ecosistemas. Vol.2 (2005); p.1-10 [citado marzo del 2006]. Disponible en Internet: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=116&Id_Categoria=2&tipo=portada>

NUNAN, N; WU., K; YOUNG., I; CRAWFORD., J. y RITZ., K. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-structure of soil. En : FEMS Microbiol. Ecol. Vol. 44. (2003); 203-215 p. citado por : NOGALES, B. La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. [artículo en línea] En : Ecosistemas. Vol.2 (2005); p. 1 – 10 [citado marzo del 2006]. Disponible en Internet:<[http://www.revistaecosistemas.net /articulo.sp?Id=116&Id_Categoria=2&tipo=portada](http://www.revistaecosistemas.net/articulo.sp?Id=116&Id_Categoria=2&tipo=portada)>

OJUMU, T; YU., J. and SOLOMON., B.O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. En : African journal of Biotechnology, Vol. 8 (2004); 18-24 p.

OLALDE, V. y AGUILERA., L. Microorganismos y biodiversidad. En : Terra. México. Vol. 16. No. 3. (1998); 289-292 p.

OSTLE, A. and HOLT., J. Nile blue A as a fluorescent strain for poly- β -hydroxybutyrate. En : Appl. Environ. Microbiol. Vol. 44 (1982); 238-241 p.

OVALLES, F. El color del suelo: Definiciones e interpretación. En : Revista Digital CENIAP HOY. [artículo en línea]. No. 3. (Sep. - Dic. 2003) [citada Julio del 2006]. Disponible en Internet:<<http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/3/texto/ovalles.html>>. ISSN:1690-4117

PAGE, W; MANCHAK., J. and RUDY., B. Formation of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. En : *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 58 (1992); 2866-2873 p.

PAGE, W. J. y TENOVE, Ch. Quantitation of poly- β -hydroxybutyrate by fluorescence of bacteria and granules stained with Nile blue A. En : *Biotech. Tech.* Vol. 10 (1996); 215-220 p.

PARHAM, J. A; DENG., S; DA., H; SUN., H and RAUN., W. Long-term cattle manure application in soil. II. Effect on soil microbial populations and community structure. En : *Biology and Fertility of Soils.* Vol. 38 (2003); 209-215 p.

PARK, M; KIM., C; YANG., J; LEE., H; SHIN., W; KIM., S. and SA., T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. En : *Microbiol. Res.* Vol.160(2005); 127-133 p.

PARKINSON, D y COLEMAN., D. Methods for assessing soil microbial populations, activity and biomass. En : *Agriculture, Ecosystems and Environment.* Vol. 34 (1991); 3-33 p.

PÉREZ, P; OURO., G; MERINO., A. y MACÍAS., F. Descomposición de materia orgánica, biomasa microbiana y emisión de CO₂ en un suelo forestal bajo diferentes manejos silvícolas. En : *Edafología.* Vol. 5. (Dic.1998); 83-93 p.

POVOLO, S. Biosíntesi di poliesteri di origine microbica: i poliidrossialcanoati di *Rhizobium* sp., Tesis doctoral, Università degli Studi di Bologna, 1995. Citado en : POVOLO, F; HERMIDA., E; MIYAZAKICY., S y QUAGLIANOCA., J. Tracción en películas de polímero biodegradable. [online]. En : *Jornadas SAM 2000 (IV : 2000 : Argentina) IV Coloquio Latinoamericano de Fractura y Fatiga.* (ago. 2000); 1107-1112 p. [citado en Diciembre del 2005]. Disponible en Internet: <<http://www.materiales-sam.org.ar/sitio/biblioteca/neuquen/Trabajos/1610.PDF>>.

PRESCOTT, L; HARLEY., J. y KLEIN., D. *Microbiología.* [libro online]. 5 ed. España: McGraw-Hill, 1998 52 – 54p. [citado en enero 2006]. Disponible en Internet:<<http://imb.usal.es/jmfa/imiq/PrescottCh3.pdf>>

PUMISACHO, M. y SHERWOOD, S. El cultivo de la papa En : Ecuador.Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (Iniap) y Centro Internacional de la Papa (CIP), Quito. (2002); 2002 p. citados En : NÚSTEZ., C y ACEVEDO., J. Evaluación del uso de *Penicillium janthinellum* Biourge sobre la eficiencia de la fertilización fosfórica en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. var. Diacol Capiro). En : *Agronomía Colombiana.* Vol. 23, No. 2. (2005); 290-298 p.

QUAGLIANO, J. Producción microbiológica del poliéster biodegradable poli-3-hidroxi-butirato (PHB) a partir de *Azotobacter chroococcum* 6B, Tesis doctoral, Facultad de Agronomía, UBA, 1998. Citado en : POVOLO, F; HERMIDA., E; MIYAZAKICY., S y QUAGLIANOCA., J. Tracción en películas de polímero biodegradable. [online]. En : Jornadas SAM 2000 (IV : 2000 : Argentina) IV Coloquio Latinoamericano de Fractura y Fatiga. (ago. 2000); 1107-1112 p. [citado en Diciembre del 2005]. Disponible en Internet: <<http://www.materiales-sam.org.ar/sitio/biblioteca/neuquen/Trabajos/1610.PDF>>.

REVOL, J. F. High-resolution electron microscopy of poly(β -hydroxybutyrate); En : Polymer, Vol. 30 (1989); 1973-1976 p.

ROBERT, M. Captura de carbono en los suelos para un mejor manejo de la tierra. En : Manual de practicas integradas de manejo y conservación de suelos. [Libro online]. París, Francia: FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), 2002. 73 p. [citado en Junio del 2006]. Disponible en Internet: <http://www.fao.org/ag/ags/agse/agse_s/7mo/iita/iita.htm>. ISBN 92-5-304690-2

RODRÍGUEZ, C. Caracterización físico-química del suelo en tres coberturas vegetales y su relación con la macrofauna del suelo en la vereda la Josefina, municipio de Pasto, Nariño. Colombia, 2005. Trabajo de Grado. (Ingeniería agroforestal). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Agrícolas. Programa de Ingeniería Agroforestal. 83 p.

RODRIGUEZ, H; and FRAGA., R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. En : Biotechnol. Adv. Vol. 17 (1999); 319-339 p. citado por : FERNÁNDEZ. L; ZALBA., P; GOMEZ., M y SAGARDOY., M. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. En : Ciencia del suelo. Vol. 23, No. 1. (Jul. 2005); 31-37 p. ISSN 0326-3169

ROHFL, F. NTSYS numerical taxonomy and multivariate analysis system. versión 2.0. manual. applied biostatistic INC. New York, EEUU : setuket. 1997. 31 p

ROMERA, M y GUERRERO., L. Agricultura ecológica. [base de datos en linea]. España : departamento de . Universidad de. Copyright infoagro.com. 2006. [citado en Julio del 2006]. Disponible en Internet:<<http://www.infoagro.com/agricultura/ecologica/agriculturaecologica17.asp>>

ROTHERMICH, M; GUERRERO., R; LENZ., R. and GOODWIN., S. Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuation of Poly(hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats. En : Applied and Environmental Microbiology. Vol. 66 (2000); p. 4279-4291.

RUCKS, L; GARCÍA., F; KAPLÁN., A; PONCE DE LEÓN., J y HILL., M. Propiedades físicas del suelo. Montevideo, Uruguay: Universidad de la república, Área de agronomía. 2004, 68 p., [citada en Julio del 2006]. Disponible en internet: <<http://www.fagro.edu.uy/~edafologia/>>

RUIZ, J; LOPÉZ., N; FERNÁNDEZ., R. and MÉNDEZ., B. Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. En : Applied and Environmental Microbiology. Vol. 67, No.1 (Jan. 2001); 225-230 p.

SADEGHIAN, S; RIVERA, J y GÓMEZ, M. Impacto de sistemas de ganadería sobre las características físicas, químicas y biológicas de suelos En : Los Andes de Colombia. Agroforestería para la Producción Animal en Latinoamérica., (2002); 77-95 p. Disponible en Internet:<<http://www.fao.org/ag/Aga/agap/FRG/AGROFOR1/siavosh6.pdf>>

SALINAS-GARCIA, J.R, HONS, F.M., and MATOCHA, J.E. Long-term effects of tillage and fertilization on soil organic matter dynamics. En : Soil Sci. Soc. Am. J. Vol. 61 (1997): 152-159 p.

SANDOVAL, J. Acondicionadores y mejoradores del suelo. [libro on line] Colombia: FOCET. La opinión S.A: 2003. 56 p. [citada en agosto del 2006]. Disponible en Internet:<<http://200.13.202.26:90/pronatta/proyectos/pdf/public/201541211ica.pdf>>

SEGURA, D. and ESPIN., G. Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli* ptsP affects poly- β -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vilandii*. En : Journal Bacterial. Vol. 180 (1998); 4790-4793 p.

SICARD, L y SUAREZ, A. Efectos de Plantaciones Forestales sobre Suelo y Agua. En : Serie Técnica No. 40 (1998). Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal CONIF. Santafé de Bogotá D.C, Colombia

SMITH, R. y SMITH, T. Destacados sobre suelo. Ecología. 4ª ed. Madrid, España : Pearson. 2001. Disponible en Internet: <<http://www.veterinaria.uchile.cl/profesor/agrez/guiaporcapitulos/guiaporcapitulos/suelos.PDF>>

SPIEKERMANN, P; REM., B; KAISCHEUER, R; BAUMEISTER., D y STEINBUCHEL., A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. En : Arch Microbiol. Vol. 171 (1999); 73-80 p.

STEINBUCHER., A; SPIEKERMANN, P; REM., B; KAISCHEUER, R; BAUMEISTER., D. Sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. En : Arch Microbiol. Vol. 171 (1999); 73-80 p.

STEKOLSCHIK, G. Plásticos biodegradables. Una manera sostenible de cuidar el medioambiente. [online]. En : Noticias Breves de la SEGB-FCEyN, México : (10, May., 2006); [citado en Agosto del 2006]. Disponible en Internet: <http://www.fcen.uba.ar/prensa/noticias/2006/noticias_10may_2006.html >

SUÁREZ, D; MORENO., N y SÁNCHEZ., J. Exploración para la obtención de bacterias nativas rizosféricas productoras de Polihidroxicanoatos (PHAs), en suelos de caña de azúcar en los Departamentos de Nariño y Santander, Colombia. En : Acta Biológica Colombiana. Vol. 9, No. 2. (2004); p.71

SYLVIA, D; FUHRMANN., J; HARTEL., P; ZUBERER., D. Principles and applications of soil microbiology., Bogotá, Colombia : Ed. Grupo K-T-DRA Ltda. 1995. 550 p.

TISDALL, J. Formation of soil aggregates and accumulation of soil organic matter. En : CARTER, M. and STEWARD., B. Structure and organic matter storage in agricultural soils. En : Lewis Publishers, 1996. Citado en : MORA R. La actividad microbiana: un indicador integral de la calidad del suelo. Trabajo experimental desarrollado para un Seminario Académico del Programa de Biología del suelo, Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia-Palmira. [citada en Oct 2006] Disponible en Internet:<http://lunazul.ucaldas.edu.co/index.php?option=com_content&task=view&id=223&Itemid=223>

TORO, D. La biodiversidad microbiana del suelo, un mundo por descubrir. [artículo en línea] En : Luna Azul, revista digital de la Universidad de caldas. No.1, Art. 5 (2003); 1-7 p. [citado en Agosto 2006] Disponible en Internet:<http://lunazul.ucaldas.edu.co/downloads/Revista19_5.pdf>.

UNIGARRO, A y CARREÑO., M. Métodos químicos para el análisis de suelos. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño, 2005. 72 p.

VALENCIA, E; PEÑA., J. El suelo y sus habitantes microbianos: consideraciones ecológicas. En : Avance y Perspectiva. Vol. 20. (Nov. – Dic. 2001); 401-406 p.

VELÁSQUEZ, J; OCHOA., G y OBALLOS, J. Suelos de la cuenca del santo domingo sector la soledad. (caracterización Físico-química) En : Revista Forestal Venezolana. Vol. 41. No. 1 (1997) 69-75 p.

VILLEGAS, J. Análisis del conocimiento en la relación agua-suelo-vegetación para el departamento de Antioquia. [artículo en línea] En : Revista EIA (Escuela de

Ingeniería de Antioquia, Medellín : Colombia), No. 1 (Feb. 2004); 73-79 p.
Disponible en Internet: <<http://ftp.eia.edu.co/administrativo/RevistaEIA/07.pdf>>

VITOUSEK, P; TURNER., D; PARTON., W; SANFORD., R. Litter Decomposition on the Manual Loa Environmental Matrix, Hawaii: Patterns, En :Mechanisms and Models. Ecology. Vol. 75 (1994); 418-429 p.

ZAMORANO. Guía salud de los suelos. [libro on line] Tegucigalpa, Honduras : Proyecto de Reactivación Agrícola de Honduras. 2002. 162 p. [citado en marzo del 2005]. Disponible en Internet: < <http://ppathw3.cals.cornell.edu/iipmweb/Chapter4.pdf>. >

ANEXOS

Anexo A. Prueba piloto

Con el fin de establecer el número de muestras representativas en cada sitio; se realizó el siguiente procedimiento:

- ✓ Se trazo dos transeptos a manera de zig-zag, tratando de cubrir la mayor área posible.
- ✓ De cada transepto se colecto una muestra compuesta por 15 submuestras, todas recolectadas a los 20 cm de profundidad, esto con el fin de evitar factores que pueden intervenir en los resultados.
- ✓ Posteriormente estas fueron llevadas al laboratorio para prepararlas con el fin de realizar el respectivo análisis microbiológico.

Análisis microbiológico

Este análisis consistió en realizar diluciones seriadas hasta 10^{-9} , con el fin de determinar cual dilución favorecía el crecimiento de las bacterias en la concentración adecuada, determinándose que la dilución apropiada para aplicar en el presente estudio es 10^{-6} , y posterior siembra por duplicado teniendo en cuenta la dilución, en medio de Agar Plate Count suplementado con Rojo Nilo y extracto de suelo, el cual estaba previamente preparado; esto con el fin de determinar la presencia del biopolímero.

- ✓ A las 72 horas de incubación y observarse crecimiento bacteriano se contabilizo y selecciono solamente aquellas cajas petri que contenían entre 30 y 300 UFC totales. A partir de esta prueba se logro determinar que la dilución 10^{-6} , permitía un adecuado crecimiento bacteriano ya que en las dos replicas se obtuvo un numero de bacterias adecuado para el conteo.
- ✓ posteriormente con los datos obtenidos se calculó la media y desviación estándar de las bacterias productoras de polihidroxicanoatos, magnitudes que además de permitir establecer el tipo de distribución, se puede determinar el número de puntos de muestreo aplicando la siguiente fórmula:

Puntos de muestreo

$$\begin{aligned} CV &= 1 / \sqrt{rs - 1} \\ CV &= S/X \\ S &= 1; r = (1 / CV^2) + 1 \end{aligned}$$

Donde:

CV = coeficiente de variación
r = numero de muestras
S = desviación estándar
 \bar{x} = promedio

Anexo B. Tinciones utilizadas y preparación del medio de cultivo

- Medio de cultivo selectivo

Se preparo 250 ml de medio de cultivo, para lo cual se tomo 5.625 g de Agar Plate Count, 2.25 g de sacarosa, 250 μ l de extracto de suelo y se ajustó el pH a 6.8 – 7.0, después se esterilizó a 15 Lb de presión durante 15 minutos.

Al medio de cultivo listo para servir en cajas petri se agrego 250 μ l/ml de Rojo Nilo 0.1%, este reactivo permite la fluorescencia de la colonia en la presencia de ácidos grasos.

- Extracto de suelo

En un erlenmeyer se coloco 50 g de suelo tamizado posteriormente se adiciono 250 ml de agua destilada - estéril, se autoclavó durante 15 minutos a 15 Lb de presión, posteriormente se filtro la mezcla a través de una malla formada de gasa y algodón hasta obtener un extracto claro, se ajusto el pH a siete con un margen de error de dos puntos y se esterilizo nuevamente (com. Pers. Fernández, P.).

- Tinción Sudan Negro

- ✓ Colocar en un portaobjetos una gota de agua destilada
- ✓ Con una asa bacteriológica tomar un inculo del cultivo y realizar un extendió en la láminas.
- ✓ Fijar el inculo mediante el calor haciendo uso de un mechero
- ✓ Adicionar durante 15 minutos el colorante negro sudan
- ✓ Lavar el colorante con agua destilada estéril durante 30 segundos
- ✓ Aplicar durante 1 minuto safranina.
- ✓ Repetir el lavado con agua destilada estéril durante 30 segundos
- ✓ Dejar secar la placa a temperatura ambiente para su posterior observación
- ✓ Los gránulos de PHB se colorean de gris a negro y las células vegetativas de color rosado (Martínez, 2004)

Anexo C. Tablas de análisis físico-químicos del suelo

Análisis de muestras de suelos de bosque natural secundario					
Parámetros	I	II	III	IV	V
pH	4,9	4,80	5,10	4,90	4,90
Materia Orgánica	27,3	27,20	25,30	26,30	21,60
Densidad Aparente (g/cc)	0,6	0,60	0,60	0,70	0,60
Fósforo (P) Bray II (ppm)	4	6,00	5,00	6,00	4,00
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	71	67,00	65,40	59,00	67,00
Calcio de cambio (meq/100 g)	4,1	2,70	6,00	2,00	2,40
Magnesio de cambio (meq/100 g)	1,5	1,30	2,10	1,10	1,20
Potasio de cambio (meq/100 g)	0,8	0,53	0,71	0,54	0,65
Aluminio de cambio (meq/100 g)	3,4	3,70	2,10	2,90	3,60
Zinc (ppm)	1,7	1,36	1,26	1,00	0,72
F=Franco-Ar=Arcilloso-A=Arenoso	Orgánico	Orgánico	Orgánico	Orgánico	Orgánico
Nitrógeno total (%)	0,78	0,78	0,76	0,77	0,70
Carbono orgánico (%)	15,84	15,76	14,68	15,26	12,50
Bacterias totales	806	90	262	281	0

Análisis de muestras de suelos de plantación de pinos					
Parámetros	I	II	III	IV	V
pH	4,80	4,80	4,50	4,70	4,80
Materia Orgánica	25,40	22,00	24,40	25,50	19,50
Densidad Aparente (g/cc)	0,70	0,60	0,80	0,80	0,80
Fósforo (P) Bray II (ppm)	7,00	7,00	4,00	3,00	2,00
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	57,00	55,00	56,00	62,00	59,60
Calcio de cambio (meq/100 g)	0,70	0,40	Trazas	0,30	1,40
Magnesio de cambio (meq/100 g)	0,40	0,50	0,30	0,40	0,60
Potasio de cambio (meq/100 g)	0,24	0,21	0,20	0,30	0,29
Aluminio de cambio (meq/100 g)	2,00	2,00	2,20	2,80	2,00
Zinc (ppm)	1,30	0,94	0,94	1,20	0,88
F=Franco-Ar= Arcilloso- A=Arenoso	Orgánico	Orgánico	Orgánico	Orgánico	Orgánico
Nitrógeno total (%)	0,76	0,70	0,74	0,76	0,66
Carbono orgánico (%)	14,76	12,74	14,13	14,81	11,30
Bacterias totales	676	843	727	759	6

Análisis de muestras de suelos de la zona de pastos					
Parámetros	I	II	III	IV	V
pH	5,50	5,50	5,60	5,60	5,50
Materia Orgánica	17,70	18,80	18,50	20,20	16,70
Densidad Aparente (g/cc)	0,80	0,70	0,80	0,70	0,70
Fósforo (P) Bray II (ppm)	6,00	7,00	10,00	7,00	3,00
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	43,60	47,20	51,40	47,20	45,40
Calcio de cambio (meq/100 g)	6,10	8,50	10,10	7,80	5,40
Magnesio de cambio (meq/100 g)	2,10	2,60	3,20	2,70	1,20
Potasio de cambio (meq/100 g)	1,16	1,35	1,64	1,50	1,15
Aluminio de cambio (meq/100 g)	0,20	*	*	*	*
Zinc (ppm)	3,60	4,00	5,00	3,80	2,40
F= Franco- Ar= Arcilloso- A=Arenoso	Arcilloso	Arcilloso	Arcilloso	Arcilloso	F-A
Nitrógeno total (%)	0,62	0,64	0,64	0,67	0,59
Carbono orgánico (%)	10,25	10,93	10,72	11,69	9,67
Bacterias totales	243	203	320	344	500

Anexo D. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para el contenido de materia orgánica en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	134.15	2	67.07	14.86	0.0006
Intra grupos	54.16	12	4.51		
Total (Corr.)	188.31	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 14,86, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	12.0
Área de pastos	5	3.2
Plantación de pinos	5	8.8
Estadístico = 10.21	P-valor = 0.008	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo E. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para el contenido de Nitrógeno en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	0.04	2	0.02	16.47	0.0004
Intra grupos	0.01	12	0.001		
Total (Corr.)	0.06	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 16,4703, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	12.1
Área de pastos	5	3.2
Plantación de pinos	5	8.7
Estadístico = 10.21	P-valor = 0.006	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo F. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para el contenido de Carbono en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	45.41	2	22.70	14.41	0.0006
Intra grupos	18.91	12	1.57		
Total (Corr.)	64.32	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 14,408, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	11.8
Área de pastos	5	3.2
Plantación de pinos	5	9.0
Estadístico = 9.62	P-valor = 0.008	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo G. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para la relación Carbono/Nitrógeno en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	18.69	2	9.34	12.58	0.0011
Intra grupos	8.91	12	0.74		
Total (Corr.)	27.60	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 12,5814, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	11.8
Área de pastos	5	3.2
Plantación de pinos	5	9.0
Estadístico = 9.62		P-valor = 0.008

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo H. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para el pH en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	1.83	2	0.914	85.69	0.0000
Intra grupos	0.13	12	0.010		
Total (Corr.)	1.96	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 85,6875, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	7.7
Área de pastos	5	13.0
Plantación de pinos	5	3.3
Estadístico = 12.21	P-valor = 0.002	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo I. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para la Capacidad de Intercambio Cationico en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	902.41	2	451.208	38.03	0.0000
Intra grupos	142.36	12	11.864		
Total (Corr.)	1044.78	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 38,0317, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	12.6
Área de pastos	5	3.0
Plantación de pinos	5	8.4
Estadístico = 11.62	P-valor = 0.003	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo J. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para el contenido de Fósforo en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	11.2	2	5.6	1.33	0.3000
Intra grupos	50.4	12	4.2		
Total (Corr.)	61.6	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 1,33333, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	7.0
Área de pastos	5	10.3
Plantación de pinos	5	6.7
Estadístico = 2.06	P-valor = 0.356	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo K. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para el contenido de Calcio en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	124.52	2	62.26	28.72	0.0000
Intra grupos	26.0	12	2.16		
Total (Corr.)	150.54	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 28,7231, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	8.2
Área de pastos	5	12.8
Plantación de pinos	5	3.0
Estadístico = 12.02	P-valor = 0.0024	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo L. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para el contenido de Magnesio en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	9.22	2	4.61	18.59	0.0002
Intra grupos	2.97	12	0.248		
Total (Corr.)	12.19	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 18,5914, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	8.8
Área de pastos	5	12.2
Plantación de pinos	5	3.0
Estadístico = 10.88	P-valor = 0.0043	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo M. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para el contenido de potasio en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	3.17	2	1.59	78.38	0.0000
Intra grupos	0.243	12	0.020		
Total (Corr.)	3.42	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 78,3845, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	8.0
Área de pastos	5	13.0
Plantación de pinos	5	3.0
Estadístico = 12.5	P-valor = 0.0019	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo N. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para el contenido de Aluminio en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	25.26	2	12.63	67.55	0.0000
Intra grupos	2.244	12	0.18		
Total (Corr.)	27.50	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 67,5544, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	12.6
Área de pastos	5	3.0
Plantación de pinos	5	8.4
Estadístico = 11.87	P-valor = 0.0026	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo O. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para el contenido de Zinc en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	23.11	2	11.55	33.35	0.0000
Intra grupos	4.15	12	0.34		
Total (Corr.)	27.27	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 33,3472, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	6.4
Área de pastos	5	13.0
Plantación de pinos	5	4.6
Estadístico = 9.79	P-valor = 0.0074	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo P. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para la Densidad Aparente en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor p
Entre grupos	0.048	2	0.024	5.54	0.0198
Intra grupos	0.052	12	0.004		
Total (Corr.)	0.1	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 5,53846, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	4.0
Área de pastos	5	10.0
Plantación de pinos	5	10.0
Estadístico = 6.72	P-valor = 0.0035	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo Q. Análisis de varianza y test Kruskal-Wallis para la abundancia de bacterias acumuladoras de PHAs en el suelo bajo las tres coberturas vegetales

TABLA ANOVA					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Cociente - F	Valor P
Entre grupos	301420.0	2	150710.0	4.08	0.0446
Intra grupos	443789.0	12	36982.5		
Total (Corr.)	745209.0	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de cada grupo. El F-ratio, que en este caso es igual a 4,07517, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 variables a un nivel de confianza del 95,0%.

TEST DE KRUSKAL-WALLIS		
Zona	Tamaño muestral	Rango medio
Bosque natural secundario	5	8.8
Área de pastos	5	11.2
Plantación de pinos	5	4.0
Estadístico = 6.72	P-valor = 0.0035	

El test de Kruskal-Wallis prueba la hipótesis nula de igualdad de las medianas dentro de cada una de las 3 columnas. Los datos de todas las columnas primero se combinan y se ordenan de menor a mayor. Entonces se calcula el rango medio para los datos en cada columna. Puesto que el p-valor es inferior a 0,05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medianas a un nivel de confianza del 95,0%.

Anexo R. Descripción de las características culturales de los morfotipos productores de PHAs del suelo bajo las tres coberturas vegetales

Descripción cultural de morfotipos de bacterias productoras de PHAs en la Plantación de Pinos		
Morfotipos	Gram	Descripción
PI 1	-	Bacilos solos, forma de la colonia tipo puntiforme, de color rosado, con borde entero, elevación plana y de superficie lisa brillante.
PI 2	+	Bacilos en empalizada, forma de la colonia tipo circular, de color blanco, con borde entero, elevación plana y de superficie lisa brillante.
PI 3	+	Bacilos esporulados, forma de la colonia tipo irregular, de color blanco, con borde ondulado, elevación umbilicada y de superficie lisa brillante.
PI 4	-	Bacilos solos, forma de la colonia tipo circular, de color rosado, con borde entero, elevación plana y de superficie lisa brillante.
PI 5	-	Bacilos solos, forma de la colonia tipo circular y elevada, de color amarillo claro, con borde entero y de superficie lisa brillante.
PI 6	+	Bacilos solos, forma de la colonia tipo circular, de color amarillo oscuro, con borde entero, elevación umbilicada y de superficie lisa brillante.
PI 7	+	Bacilos en cadena, forma de la colonia tipo irregular, de color curuba, con borde rizado, elevación plana y de superficie lisa brillante.
PI 8	-	Bacilos en cadena, forma de la colonia tipo circular y elevada, de color blanco, con borde entero y de superficie seca.
PI 9	-	Bacilos empalizados, forma de la colonia tipo circular, de color curuba, con borde entero, elevación convexa y de superficie lisa brillante.
PI 10	-	Bacilos empalizados, forma de la colonia tipo irregular, de color verde claro, con borde lobulado, elevación convexa y de superficie seca.

Descripción cultural de morfotipos de bacterias productoras de PHAs en Bosque Natural Secundario.		
Morfotipos	Gram	Descripción
BNS 1	+	Bacilos solos, forma de la colonia tipo puntiforme, de color rosado, con borde entero, elevación plana y de superficie lisa brillante.
BNS 2	+	Bacilos en cadena, forma de la colonia tipo irregular, de color gris, con borde ondulado, elevación plana y de superficie seca pulverulenta.
BNS 3	+	Bacilos en cadena, forma de la colonia tipo irregular, de color amarillo, con borde ondulado, elevación plana y de superficie lisa brillante.
BNS 4	+	Bacilos en empalizada, forma de la colonia tipo circular, de color blanco, con borde entero, elevación convexa y de superficie lisa brillante.
BNS 5	-	Bacilos solos, forma de la colonia tipo circular, de color amarillo, con borde entero, elevación convexa y de superficie lisa brillante.
BNS 6	-	Bacilos en empalizada, forma de la colonia tipo circular, de color blanco, con borde entero, elevación convexa y de superficie lisa brillante.
BNS 7	+	Bacilos en cadena, forma de la colonia tipo circular, de color transparente en el borde y amarillo en el centro, con borde entero, elevación convexa y de superficie lisa brillante.
BNS 8	-	Bacilos solos, forma de la colonia tipo irregular, de color verde, con borde ondulado, elevación plana y de superficie seca ornamentada.
BNS 9	+	Bacilos en cadena, forma de la colonia tipo irregular, de color blanco, con borde rizado, elevación convexa y de superficie seca pulverulenta.
BNS 10	-	Bacilos en cadena, forma de la colonia tipo circular, de color rosado, con borde entero, elevación plana y de superficie lisa brillante.
BNS 11	-	Bacilos en cadena, forma de la colonia tipo irregular, de color verde, con borde rizado, elevación convexa y de superficie lisa brillante.
BNS 12	+	Bacilos solos, forma de la colonia tipo circular, de color exterior blanco y de centro verde, con borde entero, elevación plana y de superficie lisa brillante.

Descripción cultural de morfotipos de bacterias productoras de PHAs en la zona de Pastos		
Morfotipos	Gram	Descripción
PA 1	-	Bacilos en empalizada, forma de la colonia tipo irregular elevada, de color verde claro, con borde rizado y de superficie erizada.
PA 2	-	Bacilos solos, forma de la colonia tipo circular, de color rosado, con borde rizado, elevación convexa y de superficie lisa brillante.
PA 3	-	Cocos en pares, forma de la colonia tipo irregular, de color verde claro, con borde rizado, elevación plana y de superficie seca.
PA 4	-	Bacilos en empalizada, forma de la colonia tipo circular, de color transparente, con borde entero, elevación convexa y de superficie lisa brillante.
PA 5	+	Bacilos solos, forma de la colonia tipo circular y elevada, de color verde claro, con borde rizado y de superficie erizada.
PA 6	+	Bacilos en cadena, forma de la colonia tipo circular, de color amarillo oscuro, con borde entero, elevación convexa y de superficie lisa brillante.
PA 7	-	Bacilos esporulados en pares, forma de la colonia tipo circular, de color blanco, con borde entero, elevación convexa y de superficie lisa brillante.
PA 8	+	Bacilos en cadena, forma de la colonia tipo irregular y elevada, de color curuba, con borde ondulado y de superficie lisa brillante.
PA 9	+	Cocos en pares, forma de la colonia tipo irregular y elevada, de color amarillo claro, con borde rizado y de superficie lisa brillante.
PA 10	-	Bacilos en empalizada, forma de la colonia tipo irregular y elevada, de color verde claro, con borde lobulado y de superficie lisa brillante.
PA 11	-	Bacilos solos, forma de la colonia tipo irregular y elevada, de color verde oscuro, con borde rizado y de superficie lisa brillante.
PA 12	-	Cocos en pares, forma de la colonia tipo irregular, de color verde claro, con borde entero, elevación plana y de superficie lisa brillante.
PA 13	-	Bacilos empalizados, forma de la colonia tipo circular, de color verde claro, con borde entero, elevación umbilicada y de superficie lisa brillante.
PA 14	-	Bacilos empalizados, forma de la colonia tipo irregular y elevada, de color verde claro, con borde ondulado y de superficie seca.
PA 15	-	Bacilos solos, forma de la colonia tipo circular y elevada, de color transparente, con borde entero y de superficie lisa brillante.
PA 16	+	Bacilos solos, forma de la colonia tipo irregular, de color blanco, con borde rizado, elevación plana y de superficie seca.

Anexo S. MATRIZ DE ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES

Características Físico – Químicas de los suelos vs Abundancia de bacterias acumuladoras de PHA; en las tres zonas de estudio.

VARIABLES	PARCELAS														
	ZONA DE PASTOS					PLANTACION DE PINO					BOSQUE NATURAL SECUNDARIO				
	PA 1	PA 2	PA 3	PA 4	PA 5	PI 1	PI 2	PI 3	PI 4	PI 5	BNS 1	BNS 2	BNS 3	BNS 4	BNS 5
pH	5,50	5,50	5,60	5,60	5,50	4,80	4,80	4,50	4,70	4,80	4,90	4,80	5,10	4,90	4,90
MO	17,70	18,80	18,50	20,20	16,70	25,40	22,00	24,40	25,50	19,50	27,30	27,20	25,30	26,30	21,60
Dap	0,80	0,70	0,80	0,70	0,70	0,70	0,60	0,80	0,80	0,80	0,60	0,60	0,60	0,70	0,60
P	6,00	7,00	10,00	7,00	3,00	7,00	7,00	4,00	3,00	2,00	4,00	6,00	5,00	6,00	4,00
CIC	43,60	47,20	51,40	47,20	45,40	57,00	55,00	56,00	62,00	59,60	71,00	67,00	65,40	59,00	67,00
Ca	6,10	8,50	10,10	7,80	5,40	0,70	0,40	0,01	0,30	1,40	4,10	2,70	6,00	2,00	2,40
Mg	2,10	2,60	3,20	2,70	1,20	0,40	0,50	0,30	0,40	0,60	1,50	1,30	2,10	1,10	1,20
K	1,16	1,35	1,64	1,50	1,15	0,24	0,21	0,20	0,30	0,29	0,80	0,53	0,71	0,54	0,65
Al	0,20	0,01	0,01	0,01	0,01	2,00	2,00	2,20	2,80	2,00	3,40	3,70	2,10	2,90	3,60
Zn	3,60	4,00	5,00	3,80	2,40	1,30	0,94	0,94	1,20	0,88	1,70	1,36	1,26	1,00	0,72
N	0,62	0,64	0,64	0,67	0,59	0,76	0,70	0,74	0,76	0,66	0,78	0,78	0,76	0,77	0,70
C	10,25	10,93	10,72	11,69	9,67	14,76	12,74	14,13	14,81	11,30	15,84	15,76	14,68	15,26	12,50
CvsN	16,50	17,00	16,75	17,44	16,38	19,42	18,20	19,09	19,50	17,12	20,30	20,20	19,31	19,80	17,80
Bac PHA	243	203	320	344	500	676	843	727	759	6	806	90	262	281	0