

**SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR BACTERIAS DIAZÓTROFAS  
NODULANTES AISLADAS DE PLANTAS FABÁCEAS NATIVAS EN BOSQUES  
ALTOANDINOS DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO**

**DANIEL AUGUSTO BRAVO BENAVIDES**

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

**SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR BACTERIAS DIAZÓTROFAS  
NODULANTES AISLADAS DE PLANTAS FABÁCEAS NATIVAS EN BOSQUES  
ALTOANDINOS DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO**

**DANIEL AUGUSTO BRAVO BENAVIDES**

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

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

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

“Las ideas y conclusiones aportados en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

“Artículo 1 del acuerdo No. 234 de Octubre 11 de 1996, emanada por el honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño”.

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Director

---

Jurado

---

Jurado

San Juan de Pasto, Junio de 2008

## **AGRADECIMIENTOS**

Pablo Fernández Izquierdo, PhD Ciencias Biológicas, Universidad de la Habana Cuba. Decano de la Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales, Universidad de Nariño.

Dolly Margot Revelo Romo, Magister Ciencias Microbiológicas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. Profesora Tiempo Completo Ocasional, Universidad de Nariño.

Gladys Milena Guerrero Flórez, Magister Ciencias Microbiológicas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. Profesora Tiempo Completo Ocasional, Universidad de Nariño.

Ana María Hernández, Estudiante, Tesista del Programa de Química, Universidad de Nariño.

Ricardo Rosales, Estudiante, Tesista del Programa de Química, Universidad de Nariño.

Elkin Alexi Noguera Urbano, Tesista del Programa de Biología, Universidad de Nariño.

David Arturo, Laboratorista del Cromatografo de Gases y Masas. Universidad de Nairño.

A mi familia, a mi madre Clara Inés Benavides y a mi abuela Rosa Matilde por su dedicación, así como a mis tíos Juan Jairo Benavides y Javier Benavides por su constante apoyo e incansable empuje en mis decisiones.

A todos aquellos colegas y laboratoristas que contribuyeron a la consecución de este trabajo de investigación.

Una etapa se ha concluido, pero solo es el inicio de un proceso que espero me lleve la vida hasta el final. A mi madre y mi abuela les dedico este trabajo de grado, quienes forjaron mi forma de ser, una forma viviente tratando de explicar otras formas de vida.

A mis profesores, por su dedicación, por su tiempo, a mi amigo Pablo Fernández, quien me ha enseñando a ver la vida de otra manera, como la ve un microbiólogo formado como biólogo y con perspectivas como científico.

“Todo está en todas partes, el ambiente selecciona”, a lo cual debemos en esta era acelerada agregar: el hombre selecciona y la consciencia colectiva de una necesidad de cuidar y conocer elige. Es tan impresionante lo que tenemos de naturaleza a nuestro alrededor en Nariño, en Pasto, y sin embargo, como sociedad, es tan poco lo que hacemos por conocerla, por mantenerla, por convivirla. Solo espero que más personas se den cuenta de esto y no tomen la Biología como un trampolín a otras carreras, sino como lo que es, el medio para definir los parámetros de conducta de una sociedad más humana.

Y sobre los PHAs, puedo resumir, que es un estilo de vida, que te envuelve y te impulsa a seguir respirando solo para saber más, un poco más. Nada más que la verdad. Das wahr sehr gut.

## CONTENIDO

	pág.
1. INTRODUCCIÓN	21
2. MARCO REFERENCIAL	24
2.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)	24
2.2 GRÁNULOS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)	27
2.3 BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO	29
2.4 NUTRICIÓN BACTERIANA	30
2.5 IDENTIFICACIÓN DE LA FAMILIA <i>RHIZOBIACEAE</i>	34
2.6 PLANTAS LEGUMINOSAS	35
2.6.1 Subfamilia <i>Papilionoideae</i>	36
3 METODOLOGÍA	40
3.1 SITIOS DE MUESTREO	40
3.2 COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES VEGETALES	41
3.3 ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PHAs SINTETIZADOS POR BACTERIAS NODULANTES DE PLANTAS SILVESTRES DE LA SUBFAMILIA <i>FABOIDEAE</i>	42
3.3.1 Aislamiento de bacterias nodulantes de leguminosas en medio de cultivo diferencial Preparación de los nódulos	42
3.3.2 Diseño experimental de estimación de producción de PHA	44
3.3.3 Preinóculos y fermentaciones de las bacterias aisladas de plantas leguminosas	45
3.4 EFECTO DE LAS FUENTES DE CARBONO EN LA SÍNTESIS DE PHA EN EL AISLAMIENTO BACTERIANO SELECCIONADO	45

3.4.1 Diseño experimental para el efecto de las fuentes de carbono en la síntesis de PHA	45
3.4.2 Preinóculos y fermentaciones del aislado DPAV3T4	45
3.5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL AISLAMIENTO BACTERIANO DPAV3T4	46
3.6 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PHAs	47
3.7 PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
4.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LEGUMINOSAS DE LA SUBFAMILIA <i>FABOIDEAE</i>	49
4.1.1 Colecta e Identificación del material vegetal	49
4.2 ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PHAs SINTETIZADOS POR BACTERIAS NODULANTES DE PLANTAS SILVESTRES DE LA SUBFAMILIA <i>FABOIDEAE</i>	56
4.2.1 Aislamiento de bacterias nodulantes de leguminosas en medio de cultivo diferencial con capacidad de acumulación de PHAs	56
4.3 ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PHAs SINTETIZADOS POR BACTERIAS NODULANTES DE PLANTAS SILVESTRES DE LA SUBFAMILIA <i>FABOIDEAE</i>	60
4.4 EFECTO DE LAS FUENTES DE CARBONO EN LA SÍNTESIS DE PHA EN EL AISLADO BACTERIANO DPAV3T4	63
4.5 CARACTERIZACIÓN DEL AISLAMIENTO DPAV3T4	70
4.6 CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO EN EL AISLAMIENTO DPAV3T4	80
APORTES TEÓRICOS	81
APORTES PRÁCTICOS	82
5. CONCLUSIONES	83
6. RECOMENDACIONES	84

7. BIBLIOGRAFÍA	85
8. ANEXOS	97

## LISTA DE TABLAS

	pág
Tabla 1. Producción de PHB en la cepa <i>Bacillus megaterium</i> 12 en medio YM suplementado con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno Yüsekdag <i>et al.</i> (2004)	33
Tabla 2. Clasificación de las leguminosas según Forero (2005)	36
Tabla 3. Bosques altoandinos en los cuales se realizó el muestreo de Leguminosas	40
Tabla 4. Pruebas bioquímicas y de antibióticos aplicadas para caracterizar fenotípicamente los aislamientos seleccionados	46
Tabla 5. Descripción morfológica de los aislamientos bacterianos en agar YMA provenientes de 7 bosques altoandinos del Departamento de Nariño	57
Tabla 6. Estimación de la producción de PHAs sintetizados por bacterias nodulantes de plantas silvestres subfamilia <i>Faboideae</i>	60
Tabla 7. Prueba de contraste múltiple de rangos Tukey aplicada a las 45 fermentaciones realizadas para determinar el aislamiento con mejor respuesta a la producción de PHB	61
Tabla 8. Efectos de la fuente de carbono en la síntesis de PHB en el aislamiento bacteriano seleccionado DPAV3T4	63
Tabla 9. Análisis de Varianza para las 4 fuentes de carbono en el aislamiento bacteriano seleccionado DPAV3T4	64
Tabla 10. Matriz básica del perfil de resistencia de antibióticos y consumo de azúcares de diferentes aislamientos bacterianos evaluados.	73

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Composición química de un monómero de PHA. Kansitz (2004)	25
Figura 2. Hidroxiácidos (HAs) constituyentes del PHA biosintético. Steinbüchel (1995)	27
Figura 3. Modelos sugeridos para la formación de gránulos de PHA en bacterias. Wältermann (2005)	29
Figura 4. Esquema de la posible reacción enzimática que ocurre en <i>Rhizobium etli</i> y <i>Rhizobium tropici</i> , durante crecimiento en medio mínimo (MM). Encarnación (1995)	32
Figura 5. Inflorescencia en forma de espiga en individuos de la subfamilia <i>Papilionoideae</i> . Clements (2001)	37
Figura 6. Sépalos (1) compuestos o individuales connados, tubo lobulado (2), corola (3) pétalos en individuos de la subfamilia <i>Papilionoideae</i> . Clements (2001)	37
Figura 7. Composición falso color de las tres zonas de muestreo que corresponden a bosques altoandinos del departamento de Nariño. SIG	41
Figura 8. <i>Lupinus albus</i> L. colectada por el método de Somasegaran (1985)	42
Figura 9. Obtención de los extractos celulares bacterianos a partir de nódulos de las plantas leguminosas colectadas	43
Figura 10. Colonias en medio sólido Agar levadura manitol YMA pH 6,8 suplementado con azul nilo	44
Figura 11. Protocolo para extracción y caracterización de PHAs (Fernández 2005)	48
Figura 12. Primera zona de muestreo de plantas fabáceas, localizada entre los municipios de Pasto y Buesaco.	50
Figura 13. Plantas fabáceas en su hábitat natural. De izquierda a derecha: a. <i>Otholobium mexicanum</i> (L.). b. Extracción de <i>Trifolium repens</i> L.	50

Figura 14 Plantas fabáceas en su hábitat natural. a. <i>Centrosema virginianum</i> (L.). b. <i>Desmodium barbatum</i> (L.) Benth et Oerst c. <i>Crotalaria sagittalis</i> L.	51
Figura 15 Plantas fabáceas en su hábitat natural. a. <i>Desmodium uncinatum</i> (Jacq) D.Cb. <i>Pueraria phaseoloides</i> Benth	52
Figura 16. Plantas fabáceas en su hábitat natural. <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	52
Figura 17. Zona 2 correspondiente a los bosques aledaños a la Laguna Negra Reserva Natural Santuario de Flora y Fauna Galeras y Laguna de Telpis	53
Figura 18. Plantas fabáceas en su hábitat natural. a. <i>Lupinus albus</i> L. b. <i>Lupinus caucensis</i> C.P. Smith	54
Figura 19. Plantas fabáceas en su hábitat natural. <i>Lupinus pubescens</i> Benth	54
Figura 20. Plantas fabáceas en su hábitat natural. De izquierda a derecha: a. Bosque Páramo de Pueblo Viejo, b y c. Bosque Laguna Azufral.	55
Figura 21. Plantas fabáceas en su hábitat natural. a. <i>Desmodium tortuosum</i> (Sw) D.C. b. <i>Phaseolus dumosus</i> Macfad	56
Figura 22. Plantas fabáceas en su hábitat natural. a. Sistema radicular de <i>Otholobium mexicanum</i> (L.). b. Extracción de nódulos y cultivo del extracto nodular en cajas petri con agar YMA. c. Crecimiento del extracto nodular	58
Figura 23. Características macroscópicas de AzLATfr4 obtenido a partir de <i>Lupinus angustifolius</i> , en el bosque de ascenso a la Laguna del Azufral	58
Figura 24. Bacilos Gram negativos, características del aislamiento DCRO2T3 mediante tinción de gram	59
Figura 25. Bacilos Gram negativos, características del aislamiento DCRO2T3 mediante tinción de cápsula	59
Figura 26. Bacilos Gram negativos, características del aislamiento DCRO2T3 mediante tinción de sudan negro B	59
Figura 27. Crecimiento de los aislados nodulares en atmósfera anaerobia. El crecimiento se reveló a las 24 horas de incubación a 31°C±0.2	59

Figura 28. Fermentaciones bacterianas creciendo con agitación constante en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Nariño	60
Figura 29. Gráficos de dispersión y porcentaje de las tasas de crecimiento. Por cada tratamiento para cuatro fuentes de carbono. Prueba HSD Tukey	64
Figura 30. Cinéticas de crecimiento para el aislamiento bacteriano	65
Figura 31. Crecimiento macroscópico del aislado DPAV3T4	70
Figura 32. Crecimiento microscópico del aislado DPAV3T4	70
Figura 33. Observación de formación de cápsulas mediante la tinción de cápsula del aislado DPAV3T4	71
Figura 34. Observación de gránulos lipídicos mediante la tinción de sudán negro del aislado DPAV3T4	71
Figura 35. Dendrograma de similitud por UPGMA y matriz euclidiana mediante el programa NTSyS 5.01 para cepas comerciales vs. DPAV3T4	72
Figura 36. Dendrograma de similitud por UPGMA y matriz euclidiana mediante el programa NTSyS 5.01, mostrando la relación de rizobios aislados de diferentes especies vegetales de la subfamilia Faboideae basado en perfil fenotípico de antibióticos y pruebas bioquímicas	74
Figura 37. Perfil de movilidad electroforética de las isoenzimas Alanina Deshidrogenasa (ADH), b. Fosfatasa Alcalina (FAK) y c. Peroxidasa (POX)	76
Figura 38. Dendrograma de similitud por UPGMA y matriz euclidiana mediante el programa NTSyS 5.01, obtenido a partir del perfil de electroforesis de enzima multilocus (MLEE)	78
Figura 39. Cromatograma por CG del homopolímero Poli- $\beta$ -hidroxibutirato (P- $\beta$ -HB) correspondiente al aislamiento DPAV3T4	81

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Medio de cultivo para crecimiento y purificación de rizobacterias	97
Anexo B. Medio de cultivo para fermentaciones de rizobacterias	97
Anexo C. Medio de cultivo para crecimiento en atmósfera anaeróbica	98
Anexo D. Condiciones para electroforesis de enzimas multilocus no desnaturizante	99
Anexo E. Especies vegetales colectadas en 7 bosques altoandinos	103
Anexo F. Cromatograma patrón de copolímero P $\beta$ (HB-co-HV)	104

## GLOSARIO

Alelo:	Formas diferentes de un gen cada una con secuencia de nucleótidos única.
Diazotrofia:	Fenómeno exclusivo en procariontes de fijación biológica de nitrógeno.
Isoenzima:	Formas diferentes de una enzima con la misma función.
MLEE:	Método de Electroforesis de enzimas multiloci, para diferenciar isoenzimas en una o varias poblaciones.
Nódulo:	Estructura simbiótica producto de la deformación de un pelo radical por los polisacáridos bacterianos.
Polihidroxialcanoatos:	Polímeros bacterianos de reserva de energía y de carbono.
Polihidroxibutirato:	Éster hidroxiácido compuesto por monómeros de cuatro carbonos.
Rizobio:	Microorganismo fijador de nitrógeno que puede hacer simbiosis con leguminosas.
Rizoplaneo:	Es la superficie de raíz que está comprendida dentro de la rizósfera.
Rizósfera:	Es la capa fina de suelo que queda adherida al sistema de raíces de la planta.
Rizovaina:	Cilindro de suelo que se adhiere a las raíces vegetales.
TE:	Tipo electroforético, es el perfil de electromorfo distintivo para un genotipo multilocus único en cada aislado según las isoenzimas estudiadas.

## RESUMEN

En los últimos años el estudio en diversas bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) ha permitido mejorar la expectativa de producción a gran escala de estos valiosos compuestos. Uno de los grupos bacterianos con la capacidad metabólica para sintetizar PHA es el de los rizobios, que más allá de su importancia en la fijación biológica de nitrógeno y el ciclaje de dicho compuesto, se ha reportado como buen productor de PHAs (Encarnación 1995). Sin embargo, pese a todo el avance en el conocimiento de éste biopolímero bacteriano, son escasos los estudios realizados en rizobios, y en Nariño a pesar de poseer una gran diversidad biótica y metabólica no se conoce si los rizobios autóctonos poseen la capacidad de producir PHA.

Frente a tal problemática, se realizó esta investigación, con la cual se evaluó la producción de PHAs en rizobios nodulantes de plantas leguminosas silvestres, y se determinó el efecto de las fuentes de carbono en la producción de dicho metabolito. Se obtuvo un total de 101 plantas leguminosas pertenecientes a 23 especies de la subfamilia *Faboideae*, de las cuales se purificó a partir de los nódulos radiculares, 115 aislamientos bacterianos. 15 aislamientos fueron caracterizados dentro de la familia *Rhizobiaceae* y fueron utilizados para evaluar el efecto de las fuentes de carbono. El aislamiento con mayor producción fue DPAV3T4 con un  $Y_{p/x}$  de 0.36 equivalente a  $110 \text{ mg.L}^{-1}$  de PHA en un medio que contiene manitol como fuente de carbono y un  $Y_{p/x}$  de 0.13 equivalente a  $130 \text{ mg.L}^{-1}$  en un medio que contiene glucosa como fuente de carbono.

Finalmente se realizó una caracterización del aislamiento DPAV3T4 utilizando pruebas fenotípica y de electroforesis de isoenzimas multiloci, mediante las cuales se determinó el género bacteriano al cual pertenece y que en esta investigación se reporta como *Bradyrhizobium* sp. además se caracterizó el polímero obtenido mediante cromatografía de gases y se determinó que corresponde a poli-3-hidroxi-butirato.

## ABSTRACT

In the last decades different research in the Polyhydroxyalkanoates (PHAs) producer bacteria make then create good expectative about the industrial scale production (Encarnación 1995). Nowadays, on of them, like rhizobia group, have the metabolic capacity of PHA synthesizer. Through the bacterial importance in the biological fixation of nitrogen and cycling of this molecule, they have been reported like yielding PHA producer bacteria. Nevertheless, even all advance in this bacterial biopolymer knowledge, there are few research in rhizobial bacteria with PHA production and in the Nariño region, a richness and biodiversity region there are nothing about Rhizobia whit the capability of PHA production.

Looking about this problem, it made this work research, the purpose of this was evaluate the PHAs production in nodulant rhizobacteria isolated from Silvestre legume plants, and it was determinate the effect of the carbon source on the metabolite production. 101 legume plants were investigated and it grouped in 23 Silvestre species from *Faboideae* subfamily, them it the bacteria were purified from the radical nodules, 115 bacterial isolates were obtained. 15 isolates were characterized inside of the *Rhizobiaceae* family and were used too in the evaluation of the carbon source effect. The isolation with the best production was DPAV3T4 with a Yield ( $Y_{p/x}$ ) of 0.36 that meaning  $110 \text{ mg.L}^{-1}$  of PHA with manitol like carbon source; and the  $Y_{p/x}$  of 0.13 or  $130 \text{ mg.L}^{-1}$  of PHB in a medium with glucose like carbon source.

Finally was developed the characterization to the DPAV3T4 isolated using the phenotypic methods and the multiloci isozyme electrophoretic method that showed the bacterial genera and in this investigation it reported like *Bradyrhizobium* sp. Them it was characterized the PHA polymer obtained with the gas chromatographic method and was concluded that the polymer extracted was poly- $\beta$ -hydroxybutyrate.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres de origen bacteriano con propiedades fisicoquímicas, similares a los plásticos xenobióticos con la particularidad de ser biodegradables (Pettinari *et al.* 2004). Debido a esto, las grandes industrias farmacéuticas, de materiales resistentes y la medicina, están muy interesadas en obtener una alta producción de poliésteres bacterianos a bajos costos.

Existen aproximadamente 150 formas monoméricas de PHAs (Steinbüchel 1995), las cuales pueden generar 5000 tipos de plásticos mediante polimerización compuesta; cada uno de los cuales, posee características industriales únicas, como termolabilidad, flexibilidad y durabilidad. Los PHAs más destacados por estas características son el polihidroxibutirato (PHB) y el copolímero poli 3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (P 3HB-co-3HV). La composición monomérica del PHA sintetizado depende del sustrato, de la maquinaria proteica y de las rutas metabólicas que posean las bacterias (Lasala 2004).

Actualmente se utilizan alrededor de 90 géneros bacterianos para la producción industrial de los PHAs. Los más importantes son: *Cupriavidus necator*; *Bradyrhizobium japonicum* USD 110, *Rhizobium etli*, *Bacillus megaterium* (Peralta *et al.* 2004) y en la Universidad de Nariño se ha trabajado con la cepa *Bacillus mycoides* FLB2 con potencial industrial de copolímero PHB-coHV (Fernández, *et al.* 2005); Con las cepas descritas se han obtenido polihidroxicanoatos de gran importancia industrial como los PHBs y PHB-coHV. Todos los géneros mencionados representan nichos con adaptaciones fisiológicas particulares.

Un nicho poco explorado es el de las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno productoras de PHAs. En las 2 últimas décadas, la comunidad científica ha centrado su atención en este gremio de bacterias (Encarnación, S. 2002), porque además de sintetizar bioplásticos, tiene la capacidad de reducir nitrógeno, producir rizobiotoxinas (Lasala 2004), para controlar la proliferación de poblaciones competidoras y además sintetizar otros metabolitos como lectinas, auxinas y homoserinas, las cuales son hormonas importantes para el desarrollo vegetal en especies de interés agrícola. Más importante aún, los rizobios son un gremio de bacterias que mantienen el equilibrio de los ecosistemas.

A partir de bacterias tales como *Rhizobium etli*; *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli*; *Bradyrhizobium lioningense*, *Mesorhizobium plurifarum*, se han obtenido polihidroxicanoatos de relevancia comercial como el PHB. Dado que las bacterias diazótroficas productoras de PHAs poseen rutas fermentativas, pueden activar las enzimas implicadas en la síntesis de PHB disminuyendo el poder reductor disponible y generando competencia por Acetil-CoA con otras enzimas

del metabolismo primario. O puede suceder, que si se suplementa el medio de cultivo con ácidos grasos como fuente de carbono, como el succinato o el propionato (Cevallos *et al.* 1996), se activa la vía de la  $\beta$ -oxidación y se sintetiza el copolímero P 3HB-co-3HV (Encarnación 2002). Por lo anterior, el tipo de PHA en fijadoras de nitrógeno está relacionado con las enzimas disponibles, el sustrato consumido, las rutas termodinámicamente viables y la diversidad de bacterias asociadas a una leguminosa en particular.

Con respecto a la diversidad de bacterias nodulantes, se puede afirmar que Colombia, por ser un país biodiverso, posee una gran variedad de ambientes, que permiten la proliferación de sistemas vivos nativos, muchos de los cuales aún no han sido explorados por la sociedad. Cabe señalar que el departamento de Nariño cuenta con varios ecosistemas que permiten apreciar la diversidad biótica representativa del neotrópico.

Dentro de esos ecosistemas, se encuentran los páramos y los bosques altoandinos como: El bosque Alto de Daza, el bosque vía a Buesaco, el bosque aledaño a la Laguna Negra, el bosque aledaño a la Laguna de Telpis, el bosque de Pueblo Viejo, el bosque de Balalaika y el bosque de Ascenso al Azufral; los cuales corresponden a bosques altamente conservados con especies leguminosas silvestres y que han sufrido baja intervención antrópica. Pero a pesar de todo, el conocimiento existente con respecto a la síntesis de PHAs en bacterias diazótrofes es muy escaso en la comunidad científica; y en Nariño, aunque se han descrito 478 especies de plantas nativas de la subfamilia *Faboideae* (Universidad de Nariño 2006), no se conoce la relación fuente de carbono-metabolismo de PHAs en los endosimbiontes.

Con respecto al sustrato, las fuentes de carbono asequibles en la naturaleza para las bacterias fijadoras de nitrógeno, provienen de los carbohidratos presentes en el suelo bajo condiciones no simbiotes o de ácidos dicarboxílicos suministrados por plantas leguminosas en condiciones simbiotes (Kim *et al.* 1997). Para el caso de las simbiotes, el aporte de carbohidratos se da a través del floema (Prell y Poole 2006) y se presentan en forma de malato, succinato entre otros ácidos dicarboxílicos (Chohan *et al.* 1998). Se ha comprobado que según el tipo de carbohidratos disponibles para rizobios, existirá o no, capacidad de producir PHB (Perret 2000); pero en bacterias nativas de la región no se conoce dicho efecto.

Por esa razón, se ha planteado la pregunta de investigación: ¿Influye la fuente de carbono en la síntesis de PHA, en bacterias diazótrofes aisladas de plantas leguminosas silvestres de la subfamilia *Faboideae*? Para responder a dicha pregunta se evaluó la producción de polihidroxicanoatos en bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de nódulos de leguminosas silvestres de la subfamilia *Faboideae* en bosques altoandinos del departamento de Nariño. Para ello, se identificaron las leguminosas muestreadas en los diferentes bosques altoandinos; se estimó la producción de PHAs sintetizados por las bacterias aisladas; se

determinó el efecto de las fuentes de carbono en la síntesis de PHAs del aislado con mayor producción de polímero y se lo caracterizó fenotípicamente y por electroforesis de isoenzimas multiloci.

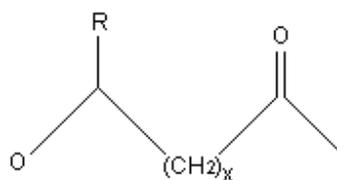
## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Los polihidroxicanoatos (PHAs) constituyen una familia de polímeros biodegradables de origen bacteriano (Steinbüchel 1998). El PHA es una inclusión de reserva o acumulo de sustancias orgánicas de tipo poliéster, rodeadas por una envoltura limitante de naturaleza proteica, que se origina dentro del citoplasma bajo determinadas condiciones de crecimiento. Lañez (1998), afirma que este polímero se sintetiza en algunas bacterias, y para ellas constituye una reserva de carbono y de energía; por ello se les denomina inclusiones orgánicas.

Kranz y Grabber (1997), mencionan que los PHAs son polímeros de reserva producidos por microorganismos, los cuales tienen la capacidad de sintetizarlos y degradarlos bajo condiciones de estrés nutricional; es decir, cuando hay un desequilibrio entre las concentraciones de los nutrientes, presentándose altas concentraciones de la fuente de carbono y bajas concentraciones de nitrógeno y/o fósforo. Dichos biopolímeros presentan varias propiedades fisicoquímicas de los plásticos xenobióticos derivados de la industria petroquímica; y cada tipo de PHA es sintetizado mediante diversas rutas metabólicas. Dependiendo de la longitud de la cadena lateral en las unidades monoméricas del polímero PHA -una propiedad que puede ajustarse modificando la composición del medio de crecimiento, o por modificación genética de la bacteria productora-, pueden conseguirse PHAs con diversos puntos de fusión, cristalinidad, flexibilidad y resistencia a la tensión. Cuando los suministros de nutrientes son escasos; es decir, existe la descompensación o desbalance nutricional en el ambiente, es necesario para las bacterias con la maquinaria metabólica de síntesis de PHA, guardar intracelularmente carbono en exceso, hasta el punto en el que su metabolismo primario no sea afectado. Por polimerización, los intermediarios solubles en las moléculas insolubles, permiten que la célula no sufra alteraciones de su estado osmótico y a la vez, se previene que la célula no consuma estos compuestos. Por consiguiente, como lo señala Lañez (1999), para la bacteria, el suministro de nutrientes permanecerá disponible a un bajo costo celular, con la garantía de obtenerlos sin las presiones selectivas que afronta en vida libre. El PHB es el PHA más común. La estructura química general de estos compuestos indica una organización compuesta (Figura 1).

Figura 1. Composición química de un monómero de PHA. Tomado de Kansiz *et al.* Applied and Environmental Microbiology. 2004. p 3410



La composición de la cadena lateral alquilo –el grupo radical- y el número de unidades metilo determinan el tipo de monómero; hasta el momento se han identificado más de 150 formas monoméricas (Kansiz *et al.* 2004). Para el caso del PHB, el número de unidades metilo en la cadena lateral es 1 y el grupo radical es una molécula de metilo (CH<sub>3</sub>). Un bajo número de microorganismos han sido tenidos en cuenta para procesos de optimización y rendimientos de PHB y hasta hace poco, se ha llegado a niveles de acumulación del PHB de hasta el 90% del peso seco celular; el cual se ha obtenido bajo condiciones de crecimiento óptimo. Este bajo número de cepas silvestres mejoradas utilizadas en la industria, se debe a que no todas las bacterias con capacidad de síntesis de PHAs acumulan altas concentraciones del compuesto y en consecuencia, no son de interés comercial; por otro lado, los altos costos y dificultad en el cultivo de bacterias viables *in vitro* representan una barrera en el campo industrial.

El PHB es una alternativa atractiva para el desarrollo de plásticos de origen bacteriano, diferente a los derivados petroquímicos; principalmente, debido a que el copolímero resultante con monómeros de Polihidroxivalerato (PHV) resulta ser una molécula biodegradable con propiedades similares a las poliolefinas, como el polipropileno y el polietileno. Por esta razón la principal dirección de los estudios actuales va dirigida a la industria de las fermentaciones del PHB.

Pueden distinguirse dos fases metabólicas de la biosíntesis del PHB en la mayoría de bacterias. *In vitro*, debe presentarse en el medio de cultivo una fuente de carbono apropiada para la biosíntesis de PHA. Éste proceso será posible únicamente en bacterias que posean un sistema de transporte específico, localizado en la membrana citoplasmática, o por difusión del compuesto dentro de la célula. La síntesis de PHB para la mayoría de bacterias, se puede explicar en dos fases. En la primera fase, las reacciones redox, convierten intracelularmente el compuesto carbonado en un tioéster de hidroxialcil-CoA, el cual es un sustrato de la enzima PHA<sub>sintasa</sub>. Esta enzima usa los tioésteres como sustratos y cataliza la formación de enlaces éster con la consecuente liberación de CoA (Kranz 1997).

En la fase dos, el tioéster de hidroxialcilCoA es polimerizado entre el grupo caronilo de un monómero y el grupo hidroxilo del monómero vecino, mediante la catálisis de la enzima PHA<sub>sintasa</sub>. Muchas bacterias poseen la maquinaria

metabólica para convertir Acetil-CoA en acetoacetyl-CoA y luego en D(-)-3-hidroxi-butiril-CoA, generando como producto final PHB (Kranz 1997). En cuanto a la aplicación del sustrato reductor, el tipo de reacción más simple, es la conversión de un ácido hidroxialcanóico (HA) a tioquinasa-CoA o transferasa-CoA, dentro del correspondiente tioéster de la CoA del hidroxialcanoato (HA); por ejemplo, la conversión de 4HB en 4-hidroxi-butiril-CoA. Si la fuente de carbono no es un sustrato precursor, y es convertida en mediador central de metabolismo, se realizan una serie de reacciones previas para obtener PHA a partir de ácido butírico u otros HAs. Tal como lo proponen Kranz y Grabber (1997), en el caso de *Cupriavidus necator* (conocida también como *Alcaligenes eutrophus*), los PHAs son acumulados hasta niveles tan altos, como el 96% del peso seco celular. Se considera que el biopolímero a parte de servir como fuente de carbono y de energía, tiene un importante rol como reductor equivalente.

Según Dunn (2002), una vez que se extrae PHA de la célula bacteriana, éste polímero muestra propiedades físicas que son similares a los plásticos de importancia industrial como el polipropileno. De hecho, se conocen más de 150 formas monoméricas de PHAs, las cuales varían por el grupo radical del carbono  $\alpha$  y que al polimerizarse, pueden resultar mediante combinaciones aleatorias, en la formación de más de 4.095 millones de copolímeros y terpolímeros; exponiéndose así, una amplia gama de plásticos biodegradables, cada uno con propiedades fisicoquímicas e industriales diferentes (Steinbüchel 1998). Además, el PHA, es una macromolécula que puede ser degradada por muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas en cuestión de días, o hasta varios años según el tipo de composición química del polímero y el tipo de bacteria; por ejemplo, la proporción de degradación del polihidroxi-butirato (PHB) por parte de *Pseudomonas oleovorans*, puede variar en el orden de unos meses en alcantarillados, o puede durar años, como en el caso de *P. putida* que se encuentra en aguas oceánicas (Madison *et al.* 1999).

Para el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno, existen varios reportes sobre la síntesis de PHAs de cadena corta y media como PHB, copolímero HB-HV y polihidroxi-octanoato (PHO) en diferentes géneros de la familia *Rhizobiaceae* (Kim 1996, Encarnación 2002). Sin embargo, el papel metabólico específico que desempeñan estos polímeros durante el proceso de nodulación y en el estado bacteroide no es muy claro aún (Trujillo 2004). Por ejemplo, actualmente, se están realizando estudios sobre el papel competitivo, que posee la actividad enzimática de las tres enzimas implicadas en la síntesis del PHA, sobre la actividad nitrogenasa en el proceso de fijación, así como también, las posibles repercusiones que dicha competencia intracelular, trae sobre la relación simbiótica planta-bacteria (Peralta 2004).

## 2.2 GRÁNULOS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Además de los grandes avances en investigaciones que han fundamentado los procesos enzimáticos y moleculares del metabolismo de los PHAs, el conocimiento acerca de la formación y la movilización interna de las inclusiones de PHAs y de inclusiones lipídicas en procariontas, en general, es muy escaso. Recientemente (Wältermann *et al.* 2005), se ha descrito la existencia de tres tipos de cuerpos lipídicos neutrales al interior de las células procariontas; éstos son: los triacilglicérols (TAGs), los ésteres céricos (WEs) y los polihidroxicanoatos (PHAs). Con respecto a los PHAs, se ha resuelto plantear dos hipótesis de la neogénesis del gránulo. Desde hace unos 30 años se conocía que existen tres categorías fundamentales de PHAs (Figura 2), organizadas con base en el tipo de monómeros por el grupo sustituyente en el carbono 2: Los PHAs de cadena lateral corta (PHAs<sub>SCL</sub>), los PHAs de cadena lateral media (PHAs<sub>MCL</sub>) y los PHAs de cadena lateral larga (PHAs<sub>LCL</sub>). En 2005, Steinbüchel y colaboradores han publicado, dos hipótesis de cómo ocurre la conformación de los gránulos de PHAs en el citoplasma bacteriano. La primera hipótesis se denomina “Modelo de Micelio” y la segunda “Modelo Botón de Membrana”.

Los modelos reflejan el tipo de polímero sintetizado en la bacteria –sea de cadena lateral corta, media o larga- y permiten comprender mejor el tipo de composición estructural del gránulo, teniendo en cuenta las proteínas de membrana asociadas y las posibles funciones que éstas puedan presentar sobre la superficie del mismo.

Figura 2. Hidroxiácidos (HAs) constituyentes del PHA biosintético. Tomado de Steinbüchel, A. Diversity Of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids. Germany. 1995. p 225

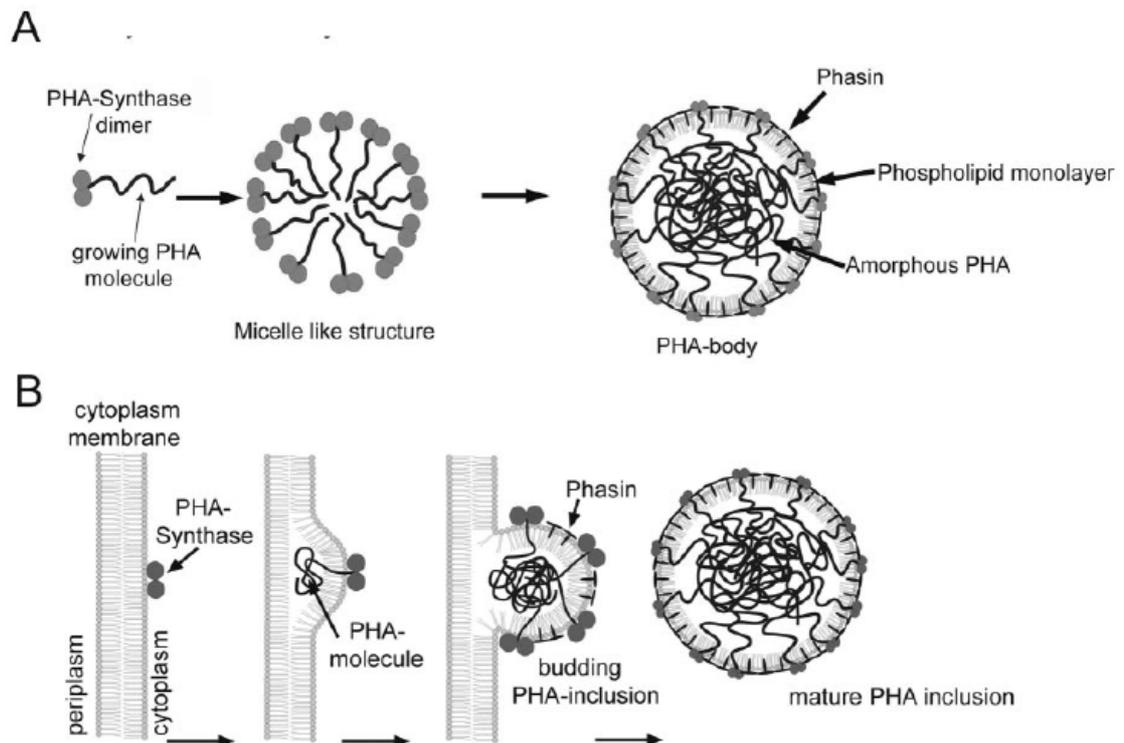
Cadenas largas de Ácido Hidroxicanoico

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
1-OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-OH	-	Glicolato	Lactato	2HB	2HV	2HHx	2HHp	2HO	2HN	2HD	2HUD	2HDD	2HTnD	2HTD	2HPD	2HHxD	2HHpD	2HOD
3-OH	-	-	3HP	3HB	3HV	3HHx	3HHp	3HO	3HN	3HD	3HUD	3HDD	3HTnD	3HTD	3HPD	3HHxD	3HHpD	3HOD
4-OH	-	-	-	4HB	4HV	4HHx	4HHp	4HO	4HN	4HD	4HUD	4HDD	4HTnD	4HTD	4HPD	4HHxD	4HHpD	4HOD
5-OH	-	-	-	-	5HV	5HHx	5HHp	5HO	5HN	5HD	5HUD	5HDD	5HTnD	5HTD	5HPD	5HHxD	5HHpD	5HOD
6-OH	-	-	-	-	-	6HHx	6HHp	6HO	6HN	6HD	6HUD	6HDD	6HTnD	6HTD	6HPD	6HHxD	6HHpD	6HOD
7-OH	-	-	-	-	-	-	7HHp	7HO	7HN	7HD	7HUD	7HDD	7HTnD	7HTD	7HPD	7HHxD	7HHpD	7HOD
	HA <sub>SCL</sub>					HA <sub>MCL</sub>								HA <sub>LCL</sub>				

El modelo de micelio implica la formación de estructuras tipo micelio a partir de la PHA<sub>sintasa</sub> (phaC), la cual se considera como una enzima intracelular e hidrofílica. La conversión al complejo enzima-producto anfifílico es mediada por la síntesis prolongada de moléculas de PHA hidrofóbico. Al ir madurando, este complejo enzima-producto anfifílico va formando la estructura miceliar, el cual esta compuesta por los monómeros PHAs -zona hidrofóbica- y los dímeros de enzima PHA<sub>sintasa</sub> -cabeza polar- (Figura 3A). En este modelo, la PHA<sub>sintasa</sub>, se fija en la superficie del gránulo maduro; pero a medida que el gránulo crece por extensión en las cadenas laterales de PHA, las proteínas de PHA<sub>sintasa</sub> son separadas y dispersas en el citoplasma; liberando espacio para la incorporación de otras proteínas denominadas fasinas, las cuales impiden la entrada de agentes extraños como los fosfolípidos; además, contribuyen a evitar la coalición del gránulo con otros entes lipídicos.

El modelo “Botón de Membrana”, es parcialmente análogo al modelo de formación de cuerpos lipídicos en semillas de plantas superiores. Este depende del enganche de las PHA<sub>sintasas</sub> en la membrana celular. Una vez enganchada, la PHA<sub>sintasa</sub> empieza a sintetizar una molécula de PHA en crecimiento dentro de la cobertura hidrofóbica de la bicapa fosfolipídica, lo cual causa una ruptura de dicha bicapa en la membrana plasmática. Semejante a lo que ocurre en la formación de TAGs en el retículo endoplasmático de las semillas vegetales, el complejo PHA-membrana se invagina y queda rodeado por una sola capa de fosfolípidos (Figura 3B). Este modelo proporciona una explicación sobre cómo ocurre la incorporación de fosfolípidos en la superficie del gránulo de PHA; sin embargo, aún no se comprende totalmente cómo se inicia el proceso de incorporación de fasinas a la superficie del gránulo y cuántas fasinas deben incorporarse para generar el estado anfifílico del gránulo PHA. Se ha comprobado, que este modelo se cumple en bacterias que sintetizan PHAs de cadena lateral larga (PHA<sub>LCL</sub>); pero en bacterias que sintetizan PHAs de cadena media (PHA<sub>MCL</sub>) y corta (PHA<sub>SCL</sub>), se ajusta más el modelo Micelio, anteriormente descrito.

Figura 3. Modelos sugeridos para la formación de gránulos de PHA en bacterias. A. El “Modelo Micelio”. B. El “Modelo Botón de Membrana”. Tomado de: Wältermann, M, *et al.* Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure, Formation, and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots. Minireview. Germany. 2005. p 761



Trainer y Trevo (2006) mostraron una relación directa entre el tipo de modelo de neogénesis del gránulo de PHA con la neogénesis de los nódulos bacterianos, en función de la pérdida o retención del meristemo vegetal en la estructura externa nodular, así como por las fuentes de carbono suministrados a los bacteroides. Frente a tan compleja relación metabólica que implican ambas estructuras, la de PHA y la del nódulo, es evidente que se hace necesario conocer el tipo de PHA sintetizado por bacterias diazotróficas y la influencia de la fuente de carbono sobre el nivel de síntesis.

### 2.3 BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

Existen hasta el momento 6 géneros propuestos de la familia *Rhizobiaceae*, que se han identificado como fijadores de nitrógeno (Wang *et al.* 2002); de ellos, 3 géneros han sido reportados para las zonas tropicales: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*; los otros 3 géneros: *Allorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*, se encuentran en zonas templadas y subtropicales. Para el caso del neotrópico se ha reportado la presencia dominante

de dos géneros: *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Barrera *et al.* 1997), con los cuales se ha realizado muchos estudios en los campos de fisiología, filogenia y evolución de sistemas metabólicos (Parker 2001). Con base en las secuencias del gen 16S ARNr, todos los rizobios definidos son miembros de la subdivisión  $\alpha$  Proteobacteria. Los 6 géneros de los rizobios son grupos filogenéticos entremezclados con otros géneros de las  $\alpha$  Proteobacteria. Por el momento, los géneros *Azorhizobium*, *Allorhizobium* y *Bradyrhizobium*, son dos ramas separadas de los otros géneros; los géneros *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*, son dos grupos distintos, pero relacionados con los géneros *Allorhizobium* y *Rhizobium* (Freiberg *et al.* 1997).

Estas bacterias se distinguen morfológicamente, por poseer formas de bacilos, ser Gram negativos, no formadores de esporas, con un flagelo polar o periférico ó pueden tener de 2 a 6 flagelos peritricos; sus colonias poseen una textura mucilaginosa, *in vitro* usan diferentes fuentes de carbono, pero se destaca el carbohidrato manitol, dado que este grupo bacteriano posee la capacidad y las rutas metabólicas para catabolizarlo de manera más eficiente; para su crecimiento *in vitro*, requieren medios ácidos (pH 6.0 - 6.5); y bacterias del género *Bradyrhizobium* alcalinizan el medio (Somasegaran y Hoben 1985).

Algunas diferencias moleculares importantes entre los géneros bacterianos *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son macroscópicas *in vitro*; sin embargo, existen diferencias marcadas sobre estrategias de infección que indican una organización molecular diferente; por ejemplo, *Rhizobium* tiene baja especificidad por el hospedero; además, ubica los genes implicados en el proceso de nodulación, en plásmidos de alto peso molecular; mientras que *Bradyrhizobium*, tiene especificidad más alta por el hospedero y los genes implicados en el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico, se encuentran en el cromosoma (Sprent *et al.* 1990).

Dado que son géneros fijadores, ambos grupos bacterianos aportan nitrógeno a las plantas; pero la estrategia de desarrollo y formación del nódulo tiene implicaciones sustancialmente diferentes. Las diferencias más destacadas, son las relacionadas con el tiempo de formación del nódulo en el proceso de infección. Para el caso de *Rhizobium*, la infección ocurre en cuestión de horas o pocos días, según la especie; en cambio para *Bradyrhizobium*, puede tardar hasta varias semanas. Por otro lado, los requerimientos nutricionales para cada microorganismo varían según el género; estos requerimientos, afectarán *in situ* la fisiología del nódulo y por ende, la fisiología de los pelos radicales (Halpern 2005).

## 2.4 NUTRICIÓN BACTERIANA

El proceso de fijación de nitrógeno se ha denominado diazotrofia y se designa diazótrofos a los microorganismos procariotas capaces de fijar nitrógeno. Ningún eucariota tiene la capacidad de fijar nitrógeno. Para ejecutar el proceso de fijación

mediante la enzima nitrogenasa, los rizobios requieren grandes cantidades de energía. Debido a que no todos los géneros rizobianos reducen la misma cantidad de nitrógeno, sus requerimientos energéticos también son diferentes. Es por esto, que las fuentes de carbono y energía utilizadas en las rutas metabólicas de los rizobios, son diferentes para cada género de la familia. Ello conlleva, a que las estrategias de obtención de nutrientes se relacionen, con la disponibilidad de los mismos en el suelo, en estado de vida libre, o las fuentes de carbono de origen vegetal, suministradas cuando ocurre la simbiosis y cambia a bacteroide. El bacteroide, es el estado de transformación fisiológica requerido para iniciar el proceso de fijación y obtención de compuestos carbonados. Por lo anterior, el tipo de planta asociada a la bacteria influye directamente en la fuente de carbono que será suministrada al rizobio (Dunn *et al.* 2002).

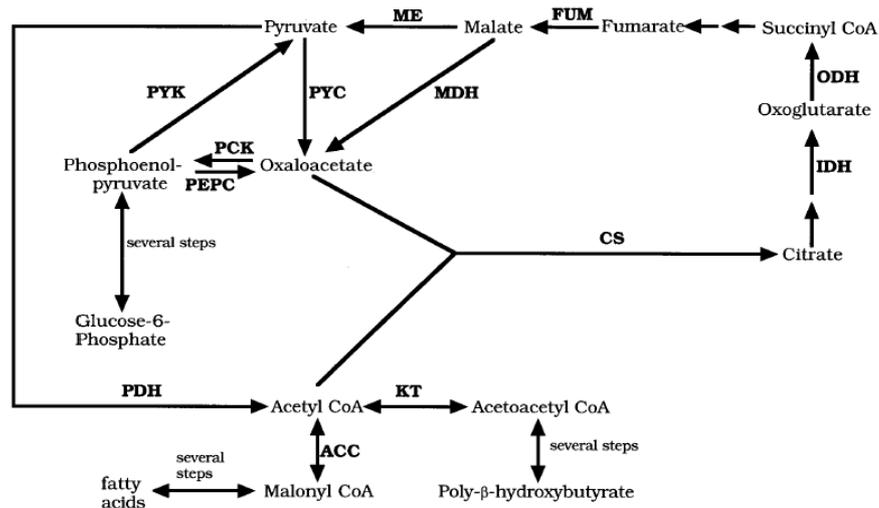
En la naturaleza y en estado de vida libre, las fuentes de carbono y nitrógeno a las cuales el rizobio puede acceder, son por lo general, residuos de materia orgánica soluble presentes en suelos asociados a biomasa vegetal; entre ellos, pueden presentarse carbohidratos como glucosa, sacarosa, maltosa, fructosa, manitol y almidón (Kim *et al.* 1996). También pueden presentarse ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos, como el malato, glutamato, succinato y fumarato (Figura 4); así como productos metabólicos, como el piruvato (Romanov *et al.* 1994). Pero debido a que no todos los suelos son ricos en materia orgánica, estos microorganismos han generado una serie de adaptaciones evolutivas, con el fin de sobrevivir a ambientes hostiles con escasos recursos nutritivos.

En el caso de *Rhizobium*, se conoce que es tolerante a altas condiciones de estrés, como altas temperaturas, acidez en el medio y la presencia de metales pesados. Una de las adaptaciones que poseen, es la de asociarse en simbiosis con plantas leguminosas, en las cuales pueden acceder a una fuente elevada de energía y de carbono; al sufrir el proceso de transformación en bacteroides, los aportes de carbono por parte de la planta, se dan principalmente por moléculas de carbohidratos, dirigidas por los conductos de transporte de floema hacia los simbiosomas, a través de la membrana peribacteroidal, ubicada en los nódulos radiculares (Gage 2004).

Por lo general, en dicho estado morfológico, el bacteroide habita en un ambiente de descompensación nutricional, debido a que obtiene grandes cantidades de carbono, pero muy bajas de nitrógeno y fósforo. Este hecho, genera estrés nutricional en el microorganismo, por lo cual se inicia un proceso de acumulación de nutrientes. Éste es un mecanismo de reserva de carbono, como respuesta al drástico cambio de un déficit nutricional. Esas reservas de carbono son por lo general, polimerizadas como PHA, el cual tiene funciones variadas, que pueden ser, desde la ruptura del polímero para liberar poder reductor y emplearlo en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Encarnación 1995), hasta la iniciación de una nodulación infectiva-efectiva (Trainer y Charles 2006). El hecho de poseer propiedades simbióticas altamente estables y una continua fuente de carbono, que

es acumulada en forma de PHAs, hace de estos microorganismos un atractivo objeto de estudio.

Figura 4. Esquema de la posible reacción enzimática, que ocurre en *Rhizobium etli* y *Rhizobium tropici*, durante crecimiento en medio mínimo (MM). Tomado de Encarnación, S. *et al.* Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etli*. 1995. p 3059



Por otro lado, para utilizar un medio de cultivo *in vitro*, es necesario tener en claro y comprender la ocurrencia, la estructura, los principios biosintéticos y las funciones del polihidroxiclcanoato (Steinbüchel 2001). Se puede destacar que la fuente de carbono ampliamente utilizada en medios selectivos y enriquecido, para aislar rizobios de cualquier género, es el manitol; sin embargo, se ha comprobado que bajo estrés nutricional, colonias de *Rhizobium etli*, han desarrollado la capacidad de utilizar el piruvato o el lactato como fuentes de carbono. Para generar la condición de estrés nutricional, se suele transferir el rizobio de un medio rico en nutrientes para luego transferirlo a un medio mínimo o basal; debido a que, este crecimiento desbalanceado, se asocia con el metabolismo fermentativo de los polihidroxiclcanoatos (McDermott *et al.* 1998). Sin embargo, el uso de un medio basal suplementado con fuentes de carbono como succinato y cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) como fuente de nitrógeno, afectan la concentración del sustrato y la actividad enzimática, por lo cual, inducen al microorganismo a utilizar el acetil-CoA como molécula precursora del TCA y no como sustrato para una respuesta fermentativa: la síntesis de polihidroxiacetato (Encarnación 1995). Con todo, aún no está muy claro el proceso que ocurre al interior de bacterias del género *Bradyrhizobium* para sintetizar PHB, tanto en estado de vida libre, como en estado de nodulación madura. En el caso de *Rhizobium* y *Azorhizobium*, se desconocen aún, las condiciones por las cuales no sintetiza polímero en estado de nodulación madura; tan solo se han reportado las condiciones de síntesis para el estado de

vida libre y de nodulación temprana (Mandon *et al.* 1998). Cabe destacar también, que la actividad nitrogenasa para la fijación de nitrógeno molecular, suele ser mayor en el género *Rhizobium*, que la actividad enzimática que ocurre en el género *Bradyrhizobium*.

Otras fuentes de nitrógeno y fosfato que inhibe la síntesis de PHAs en las bacterias, son las melazas no refinadas, las cuales interfieren con la condición de nutriente limitante usado para inducir la síntesis de PHB. En *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*, se han probado diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para determinar los rendimientos de producción de PHB intracelular, donde la mejor fuente de carbono para la producción fermentativa de PHB fue la glucosa (Tabla 1), y la mejor fuente de nitrógeno fue la peptona (Yüksekdağ *et al.* 2004). Sin embargo, ya que la glucosa es una fuente de carbono costosa en términos de rendimiento  $y_{s/p}$  e  $y_{x/p}$ , se puede observar que la segunda opción en fuentes de carbono con un bajo costo a utilizar es la sacarosa.

Tabla 1. La producción de PHB de la cepa *Bacillus megaterium* 12 en medio YM con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Tomado de YÜKSEKDAG, Z. *et al.* Effect of Carbon and Nitrogen Sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB), synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. 2004. p 65

Carbon and Nitrogen Sources	Dry Cell Weight (g/L)	PHB (g/L)	Yield of PHB (%)
Glucose	1.23±0.43	0.240±0.05	19.51
Sucrose	0.95±0.04	0.070±0.01	7.37
Arabinose	2.47±0.05	0.050±0.02	2.02
Mannitole	3.94±1.01	0.160±0.06	4.06
L-Cysteine	2.36±0.70	0.198±0.03	8.39
L-Glycine	0.68±0.20	0.113±0.06	16.60
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.88±1.47	0.050±0.01	1.02
Protease Peptone	1.30±0.60	1.023±0.30	78.69
Potassium Nitrate	2.59±0.10	0.061±0.00	2.36
Control (NB)	0.89±0.06	0.071±0.00	7.98

NB: Nutrient Broth

En general, los rizobios a diferencia de la bacteria entérica *Escherichia coli*, tienen una baja capacidad de asimilar nitrógeno a partir de amonio, lo cual sugiere que dicho factor limitante, disminuye la capacidad de retención de carbono en forma de PHB y obliga las condiciones limitantes de crecimiento bacteriano. Este es un hecho que al parecer, favoreció en algún momento de la historia evolutiva rizobiácea, la asociación simbiótica con plantas leguminosas. Estudios anteriores (Ludwig 1978) han demostrado, que la baja actividad catalítica exhibida por los rizobios para asimilar el amonio, difiere de la actividad de *E. coli* bajo cualquier condición de cultivo y que dicha reacción puede deberse a los ambientes diferentes que habitan éstos microorganismos.

## 2.5 IDENTIFICACION DE LA FAMILIA RHIZOBIACEAE

Algunos autores (Jordan 2004, Moulin 2004, Rivas 2004), han recomendado eliminar la familia *Rhizobiaceae* de la subclase  $\alpha$  Proteobacteria y agrupar a bacterias nodulantes como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* y no rizobiales, como el caso de *Methylobacterium* y *Devosia*; así como también, incluir en el orden “*Rizobiales*”, a bacterias de la subclase  $\beta$  Proteobacteria, como el caso de *Ralstonia* y *Burkholderia*, que también poseen la capacidad de nodular. Sin embargo, la confusión sobre los caracteres taxonómicos que se deben emplear para agrupar o separa organismos dentro de este taxa, aún no está totalmente despejada. En los últimos años, se ha incrementado la cantidad de investigaciones enfocadas a encontrar bacterias que nodulen raíces de especies leguminosas tropicales; sin embargo, la identificación de muchos de los endosimbiontes permanece aún sin realizarse completamente (Trujillo *et al.* 2004).

La identificación actual de miembros de la familia *Rhizobiaceae*, se basa en una combinación de técnicas bioquímicas, analíticas y moleculares, con el fin de confirmar el género rizobiáceo y las posibles implicaciones ecológicas que pueda tener; como es el caso de inoculación cruzada, competencia por el sustrato, capacidad de fijación de nitrógeno por el sistema nitrogenasa–hidrogenasa; y en el caso de la presente investigación, la capacidad de síntesis de PHA. Las descripciones realizadas en el epígrafe 2.3 de este marco referencial, indican algunas características de condiciones de cultivo *in vitro* con el fin de diferenciar el género y determinar condiciones de fermentación; sin embargo, para una identificación completa, es necesario emplear mayor cantidad de técnicas, en especial la secuenciación parcial del gen ARNr 16S. Sin embargo, con técnicas que no impliquen la manipulación de genes, también existe validez para la caracterización de cada género rizobiano (Svetlana 2006; Dunn 2004). Para el caso de *Bradyrhizobium*, recientemente se ha publicado un listado de pruebas bioquímicas y de condiciones de cultivo: como actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, prueba de la enzima ureasa, reducción de nitrato, asimilación de L-Arabinosa, D-Mannosa, Maltosa, Ramnosa, Manitol, D-Turanosa, D-Arabitol (Trujillo *et al.* 2004); así como resistencia a ciertos antibióticos, como: Cloramfenicol, Bacitracina, Novobiocina y Polimixina B (300 IU), entre otros (Yao *et al.* 2002).

Por otro lado, se suele utilizar la técnica molecular de electroforesis de enzimas multiloci (MLEE) (Mhadhbi *et al.* 2005), que permite evaluar en un mismo gel, varias isoenzimas de diferentes aislamientos; y para el caso de *Bradyrhizobium*, las más usadas son: peroxidasa, amilasa, fosfatasa alcalina, alcohol deshidrogenasa, alanina deshidrogenasa, butirato esterasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, enzima málica, malato deshidrogenasa, fosfoglucosa isomerasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Parker 2001). Para el caso de *Rhizobium*, las

isoenzimas más utilizadas son las mismas (Eardly 1995), pero debido a divergencia entre los grupos, se puede observar en los electromorfos, que la movilidad de las isoenzimas es diferente para cada género, teniendo en cuenta la diferencia en los pesos moleculares que existen en las enzimas entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, lo cual implica diferencias moleculares en los genes que codifican para dichas isoenzimas. Las diferencias entre los géneros tiene mucha relación con el grado de dependencia que han adquirido los rizobios con leguminosas; la compleja comunicación molecular entre los rizobios y sus hospederos, permite vislumbrar diferencias metabólicas y de respuesta frente a los sustratos, en un ambiente determinado. De ahí, la importancia de conocer los hospederos vegetales de los simbioses y el ambiente favorable que proporcionan a los rizobios para la acumulación de PHAs.

## 2.6 PLANTAS LEGUMINOSAS

Las plantas leguminosas son de especial interés en las regiones tropicales; porque pueden ser explotadas en la agricultura dado el gran contenido proteico de sus frutos y de otras estructuras como los cotiledones; además, son de importancia cultural en muchos pueblos y son conocidas por ofrecer múltiples servicios, como barreras naturales de campos de cultivo, como forraje para el ganado dado su alto contenido proteico, algunos géneros se emplean para la recuperación de suelos erosionados, en ambientes cálidos son tolerantes a la sequía y sirven como alimento y como insumos de materiales de uso doméstico (Díaz 1999). Recientes reportes indican que en todo el mundo hay crecimiento de leguminosas en alrededor de 250 millones de hectáreas; y en éstas leguminosas, los rizobios asociados, están fijando 90 millones de toneladas métricas de nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) por año (Kinzig *et al.* 2004), lo cual equivale a 625 Kg de fertilizante de urea, disponible para las plantas y el resto de sistemas vivos (Feng *et al.* 2002).

A nivel biológico, son de gran importancia, dado que hacen parte de las plantas que tienen la capacidad de formar asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno; y es conocido, el gran aporte de nitrógeno que obtienen de dicha relación mutualista (Rechinger 1991); por lo cual, son reportadas grandes rendimientos de proteína en hojas, fruto, tallo y raíces. Por otro lado, las leguminosas, muestran una amplia diversidad tanto morfológica según el tipo de hojas y de sistemas radicales como de hábitats según su estrategia de crecimiento si es herbácea o subarborescente. Se encuentran desde bosques tropicales conservados, hasta en páramos en zonas de vida de 2800 a 3600 msnm. Dado que la carencia de nitrógeno suele darse en suelos desnudos y sin abonar, las leguminosas noduladas presentan una ventaja selectiva en tales condiciones y pueden crecer bien en zonas donde no lo harían otras plantas (Emerson 1996).

Las plantas leguminosas constituyen la familia *Fabaceae*; dentro de la cual se han clasificado tres subfamilias conocidas con los nombres de *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* y *Faboideae* o *Papilionoideae*. Las tres subfamilias se identifican porque cada una tiene características especiales en sus flores que permiten diferenciarlas (Varela 1978), en el caso de *Faboideae* (Figura 5) los pétalos, el cáliz y el estandarte, son diferentes con respecto a las otras dos subfamilias. En cada una de estas subfamilias, hay varios géneros y a su vez, cada género está formado por varias especies, jerarquía que se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de las leguminosas. Tomado de: FORERO, E. Estudios en Leguminosas Colombianas. ACCEFIN. 2005. p 22

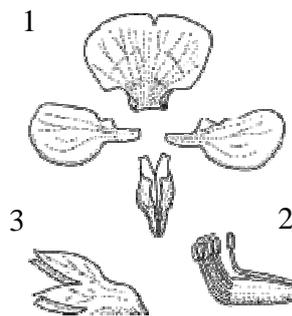
Jerarquías de Clasificación		Características
<b>Reino</b>	Vegetal	Organismos vivos que viven fijados al suelo, no se mueven de un lugar a otro; además, realizan fotosíntesis.
<b>División</b>	Espermatofitas	Plantas que se reproducen mediante semillas
<b>Subdivisión</b>	Angiospermas	Plantas que presentan semillas encapsuladas dentro de un ovario y al madurar, éstas se convierten en fruto.
<b>Clase</b>	Dicotiledóneas	Presentan en sus semillas dos hojas embrionarias, tienen flores con cinco sépalos, cinco pétalos y sus tallos pueden engrosarse a través del cámbium vascular.
<b>Orden</b>	<i>Fabales</i>	
<b>Familia</b>	<i>Fabaceae</i>	Producen frutos en legumbre o vaina y tienen hojas compuestas.
<b>Subfamilias</b>	<i>Mimosoideae</i>	Tienen flores regulares con pétalos y sépalos valvados, es decir, las hojas que forman el botón de la flor, se tocan por los bordes, pero ninguna se coloca por encima o por debajo de la que queda al lado.
	<i>Caesalpinioideae</i>	Poseen flores irregulares (zigomorfas) con pétalos imbricados en el botón, el borde derecho del pétalo cubre el borde izquierdo del siguiente.
	<i>Faboideae</i> o <i>Papilionoideae</i>	Tienen flores irregulares con un pétalo en forma de estandarte, alas y quilla; presenta floración en forma de racimos o espiga.

2.6.1 Subfamilia *Faboideae*. La mayoría de los géneros de *Faboideae*, se constituyen generalmente por hierbas, bejucos herbáceos o leñosos, arbustos o árboles, raras veces con espinas, algunas veces con tricomas en forma de "T" o con células basales cortas y una célula terminal larga; savia incolora o rojiza; hojas usualmente alternas, pinnaticompuestas (pinnadas) o palmaticompuestas o trifolioladas o unifolioladas; a veces simples, frecuentemente con pulvínulos en las bases del pecíolo, pinnas y pínulas, con estipulas que suelen transformarse en espinas; inflorescencias indeterminadas en racimo, espiga (Figura 5) o capítulo; flores isodiamétricas, zigomorfas (papilionadas, con estandarte o vexillo, alas, y quilla o carina), ligeramente períginas, estambres frecuentemente diadelfos (9+1), monodelfos, poliadelfos, o libres; presentan disco nectarífero basal; placentación marginal y su fruto es en forma de legumbre o lomento (Clements *et al.* 2001). Entre los géneros más representativos en Colombia están: *Crotalaria*, *Desmodium*, *Lupinus*, *Phaseolus*, *Trifolium* (Forero y Romero 2005).

Figura 5. Inflorescencia en forma de espiga en *Lupinus angustifolius* de la subfamilia *Faboideae*. Tomado de: Clements, J. *et al.* Characterization Of A Non-Abscission Mutant In *Lupinus angustifolius*. I. Genetic And Structural Aspects. *American Journal of Botany*. 2001. pp 31–42



Figura 6. Pétalos (1) compuestos o individuales connados, estandarte (2), cáliz (3), en individuos de la subfamilia *Faboideae*. Tomado de: Clements, J. *et al.* Characterization Of A Non-Abscission Mutant In *Lupinus angustifolius*. L. Genetic and Structural Aspects. *American Journal of Botany*. 2001. pp 31–42



La disposición de las flores generalmente es en ráquimos, espigas o cabezuelas vistosas, por lo general irregulares. El perianto suele presentar 5 sépalos (Figura 6), connados en un tubo lobulado que a menudo es bilabiado; la corola es papilionácea con 5 pétalos; el estandarte o vexillo es más grande y enrollado que los pétalos, rara vez la flor es resupinada (p.e. géneros como *Canavalia*, *Centrosema*), los dos pétalos laterales permanecen libres o pueden converger; los dos pétalos inferiores y la quilla, son distalmente connados rodeando al androceo y gineceo (Judd 1999).

El androceo presenta por lo general de 10 a 5 estambres. De todos los filamentos, 9 son connados, en la vaina abierta alrededor del pistilo; el décimo pistilo -en la cara adaxial-, puede ser parcial o completamente separado o diadelfo. Puede presentarse que el décimo pistilo esté suprimido. Sus filamentos son nectaríferos hacia la base y poseen un anillo basal alrededor del ovario (Kittelson 2000). Las

anteriores, son características que permite identificar a la planta dentro de la subfamilia *Faboideae*.

Es importante conocer muy bien la morfología de las Fabáceas y el proceso de nodulación, ya que mediante sus características morfológicas y las características fisiológicas del nódulo, se puede generar un perfil de posibles asociaciones simbióticas, así como el potencial de acumulación de PHA en función de dichas sociedades entre bacterias fijadoras de nitrógeno y las plantas en estudio. Antes de la infección, existe un prolongado y acogido contacto entre microorganismos rizobianos y el pelo radical de la planta; este contacto se presenta de modo perpendicular. El proceso de anclaje bacteria-planta se debe a unas proteínas azucaradas segregadas por la planta que actúan como haptenos determinantes de antígenos bacterianos. La especificidad de esta unión depende del género bacteriano presente en la comunidad bacteriana cercana a la rizovaina y de las características del estado de desarrollo vegetal (Atlas y Bartha 2002).

Cuando ocurre la infección, primero se observa la deformación de los pelos radicales que comienza, con un acumulo de metabolitos de la bacteria. En rizobios del neotrópico, intervienen enzimas proteolíticas de pared, que se encargan de abrir en la planta un orificio, lo cual indica el inicio de la invasión bacteriana. Normalmente la infección crece en dirección opuesta a la gravedad hacia la estela, atravesando las células corticales (Baginsky 2002). Después, en la planta ocurre una segregación de fitohormonas como citoquinas y auxinas, debido a que las bacterias inducen una proliferación celular. Sin embargo, hay muchos factores limitantes de la simbiosis que pueden concluir apresuradamente el proceso de colonización bacteriana; los factores ambientales más incidentes en esta repentina conclusión del proceso de infección son: la clase de suelo, la humedad del suelo, la temperatura, el nivel de agua y los elementos minerales asequibles (Hussein 1999).

En las raíces de plantas leguminosas Fabáceas, existe una gama de sustancias señal, como las sustancias quimiotácticas que atraen a las bacterias, tales como: la homoserina, la betaína y los flavonoides (Perret *et al.* 2000). Estos exudados se sintetizan en concentraciones nanomolares, suficientes para la atracción de bacterias fijadoras de nitrógeno, especialmente para los rizobios. Por otro lado, las diazótrofes responden a la excitación inducida por la planta, sintetizando ácido indolacético (AIA), que es una hormona de crecimiento vegetal y que así como el ácido indolbutírico, el ácido fenilacético y algunos cloro-indoles, hace parte de la familia de las auxinas bacterianas que contribuyen a una colonización efectiva de la raíz (Liang 2005). El AIA, es una hormona distribuida ampliamente por las bacterias fijadoras de nitrógeno, y participa como un factor destacado en la simbiosis bacteria-leguminosa. Según Campbell (1984) y Perret (2000), el AIA es característico de cada género bacteriano; y los genes que codifican para AIA podrían eventualmente usarse como marcadores moleculares, debido a que cada

género rizobiano posee decoraciones moleculares adecuadas que permiten colonizar especies leguminosas específicas.

En el proceso de nodulación, el AIA resulta como señal de respuesta al triptófano, el cual es un aminoácido exudado por los pelos radicales. Esta comunicación molecular, permite que las diazótrofas transformen el aminoácido triptófano en AIA, el cual ejerce una fuerza antigravitatoria que permite el enroscamiento o ramificación de los pelos radicales alrededor de las bacterias (Atlas *et al.* 2002). Las concentraciones de AIA sintetizado por bacterias fijadoras de nitrógeno, varían dependiendo del género bacteriano y del tipo de raíz vegetal con la cual se asocia; estas concentraciones son importantes, porque determinan el crecimiento o la inhibición del tejido vegetal, para formar finalmente el nódulo con bacteroides productores de polihidroxialcanoatos intracelularmente (Moore 1998). Una vez establecidos los bacteroides en el tejido meristemático, inducen mayor actividad de división celular en la raíz, generando la estructura nodular de origen vegetal o bacteroidal; con lipoquitooligosacáridos, exo-oligosacáridos y peptidoglucano bacteriano en nódulos determinados (Staehelein, C *et al.* 2006); y polisacáridos de origen vegetal en nódulos indeterminados. Finalizada la formación del nódulo, la simbiosis se hace efectiva y el proceso de fijación de nitrógeno y de acumulación de PHA comienza a desarrollarse.

Recientemente se ha comprobado, que el tipo de nódulo influye en la síntesis de PHA, debido a que la manutención energética del nódulo formado puede depender de la planta, o puede mantenerse por la acción integradora de la planta hospedera y el simbionte microbiano. Los nódulos determinados, son los que pierden el meristemo vegetal y la estructura envolvente del nódulo depende de compuestos carbonados de origen vegetal, reduciendo el transporte de carbono y energía bacteriana a la manutención del nódulo y permitiendo acumular altas concentraciones de carbono en forma de PHA (Trainer 2006). Los nódulos indeterminados, conservan el meristemo vegetal y su fisiología depende de polisacáridos de origen bacteriano y vegetal, lo cual disminuye su capacidad de retener carbono y acumularlo en forma de PHA (Denison 2000).

Por lo tanto, la entramada relación simbiótica planta-rizobio refleja *in vivo* la posibilidad de acumular polímero en diferentes concentraciones, lo cual dependerá del suministro de carbono aportado por la especie leguminosa específica, la actividad metabólica bacteriana y la neogénesis del gránulo y del nódulo. En condiciones de laboratorio, el medio de cultivo suple las necesidades nutricionales de los aislados nodulares y es necesario determinar si las fuentes de carbono que se suministren al medio, influyen en la síntesis de polihidroxialcanoatos.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 SITIOS DE MUESTREO

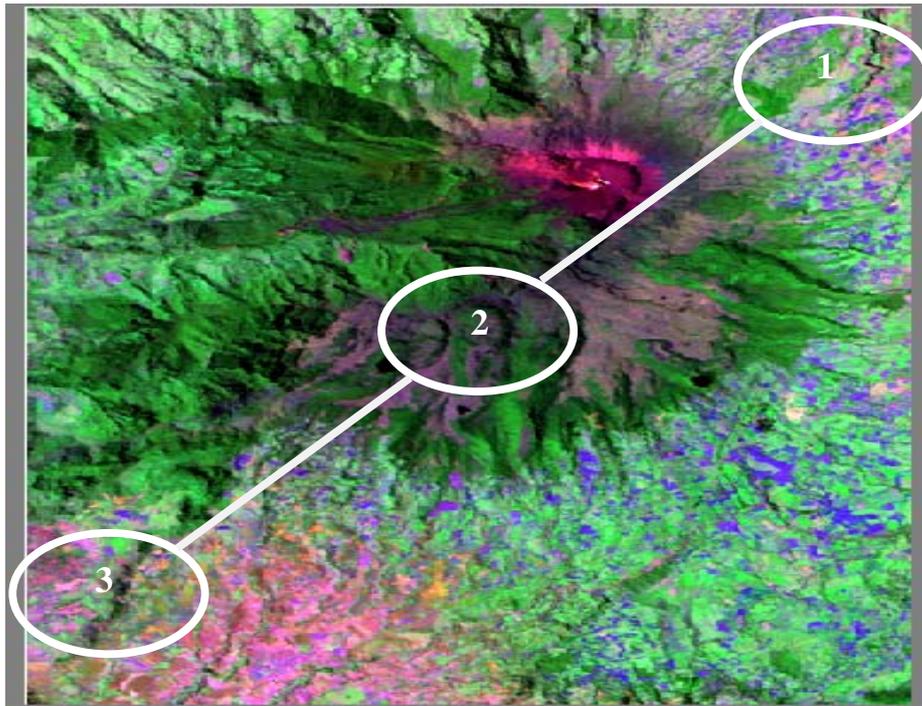
Se seleccionaron tres zonas de muestreo en forma linear abarcando gran parte de la región altoandina del departamento de Nariño. Como criterio de selección de los bosques dentro de cada zona se utilizó los reportes de leguminosas Faboides de la base de datos del herbario PSO de la Universidad de Nariño (2007) (Figura 7). Dentro de estas tres zonas de muestreo se escogieron 7 bosques con características ambientales particulares que se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Bosques altoandinos en los cuales se realizó el muestreo de leguminosas Faboides para la obtención de aislamientos bacterianos rizobianos.

	Bosque	m.s.n.m.	T° ambiental	Ubicación geográfica	Municipio
Zona 1	Alto de Daza	2800	12	1°15'16"N 77o19'13,73"W	Pasto
	Buesaco	2200	16	1°24'14,16"N 77o07'13,73"W	Buesaco
Zona 2	Laguna Negra	2880	9	1°11'37,20"N 77o22'27,22"W	Pasto
	Laguna Telpis	3200	7	1°09'21,12"N 77o23'28,01"W	Yacuanquer
Zona 3	Pueblo Viejo	2740	6	1°07'52,15"N 77o25'30,48"W	Tùquerres
	Balalaika	2500	8	1°05'23,12"N 77o28'34,68"W	Tùquerres
	Laguna Azufra	4000	6	1°05'29,14"N 77o36'44,19"W	Tùquerres

Según la descripción de Holdridge (1953) los bosques corresponden a zonas de vida diferentes catalogadas como paramos, bosques premontanos, bosques secundarios en regeneración y bosques altamente conservados.

Figura 7. Composición falso color de las 3 zonas de muestreo que corresponden a 7 bosques altoandinos del departamento de Nariño. Círculos en blanco: (1) Bosques Alto de Daza y Vía Buesaco; (2) Bosques Laguna Negra y Laguna de Telpis (3) Bosques Pueblo Viejo y Balalaika. Fuente: Este Proyecto. Mapa realizado por el autor con el paquete informático para sistemas de información geográfica (SIG): ILWIS 3.3 Academic.



### 3.2 COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES VEGETALES

En cada bosque se ubicaron parcelas de muestreo de 50 m x 2 m (Gentry 1993). Cada parcela se compuso de 5 subparcelas de 10 m x 2 m. Se colectaron 5 individuos por cada especie vegetal de la subfamilia *Faboideae* teniendo en cuenta como condiciones de muestreo que presentaran inflorescencia e infrutescencia, caracteres indicadores de nodulación en estado maduro y efectivo. Se utilizó la metodología para la recolección del material biológico (vegetal y microbiano) recomendada por Somasegaran y Hoben (1985). Se removieron tanto la muestra vegetal como el rizoplano (tierra asociada a los pelos radicales de la planta) hasta 20 cm periféricos desde el tallo (Figura 8).

Figura 8. Remoción de la planta *Lupinus albus* L. y la tierra asociada a la raíz o rizoplano.



La muestra vegetal fue colectada y recortada desde el tallo. Tanto las raíces como el rizoplano, se colectaron en bolsas plásticas oscuras sin perforaciones. En campo los sistemas radiculares se conservaron en bolsas plásticas y se transportaron al laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Nariño, para ser procesados y macerados el mismo día de colecta. Las muestras vegetales colectadas en campo, se prensaron y llevaron inmediatamente al horno de secado de la Universidad de Nariño con el fin de identificar la especie mediante clave taxonómica dicotómica (Forero 2005, Téllez 2006) así como también por comparación de las muestras colectadas con ejemplares de investigación en el herbario PSO de la Universidad de Nariño.

### 3.3 ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PHAs SINTETIZADOS POR BACTERIAS NODULANTES AISLADAS DE PLANTAS SILVESTRES DE LA SUBFAMILIA *FABOIDEAE*

3.3.1 Aislamiento de bacterias nodulantes de leguminosas en medio de cultivo diferencial con capacidad de acumulación de PHAs. En campo los nódulos fueron colectados junto con todo el sistema radicular vegetal. En el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Nariño los nódulos fueron depositados en tubos esterilizados a 120°C x 15 Lbs. de presión durante 15 minutos. La estructura nodular se depositó en morteros de porcelana y se purificó mediante la técnica de hipoclorito de sodio al 3% v/v desinfectando la superficie nodular durante 1 minuto (Somasegaran y Hoben 1985); posteriormente se lavaron 3 veces con agua

destilada y se maceraron en agua destilada con pistilo de porcelana con el fin de obtener el extracto celular (Figura 9).

Figura 9. Representación de fases para la obtención de extractos nodulares obtenidos a partir de *Trifolium repens* L. en el bosque alto de Daza Municipio de Pasto.



Para el aislamiento de bacterias se empleó agar levadura manitol (YMA, Anexo A) 30% suplementado con el colorante Azul Nilo (Merck) al 0,1% (Spiekermann 1999), con el fin de identificar las colonias más fluorescentes como factor indicador de posible presencia de ácidos hidroxialcanóicos. El extracto bacteriano se inoculó en superficie, trasvasando 0.1mL del extracto en la superficie del agar. La dispersión se realizó por todo el medio mediante asa de vidrio. Las cajas de petri se incubaron a 30°C durante 24 horas.

El aislamiento y la purificación de las bacterias nodulantes se realizó utilizando un medio de cultivo diferencial agar levadura manitol (YMA 30% p/v) con un pH 6.8, suplementado con colorante azul nilo, recomendado por Spiekermann (1999) (Figura 10). Para el aislamiento de colonias se escogieron como positivas, aquellos aislamientos que crecieron mediante en cámara de anaerobiosis para determinar la pertinencia de los aislamientos a la familia *Rhizobiaceae* (Anexo C) Además, aquellas colonias que bajo luz UV presentaron fluorescencias rojas, amarillas y verdes fueron seleccionadas como PHA positivas. Las colonias positivas se sembraron por agotamiento en cajas con agar YMA suplementado con Azul Nilo e incubados a 30°C por 24 horas. A partir del crecimiento de las cajas se purificó la colonia aislada, repicándola nuevamente en cajas de petri con

el mismo medio diferencial. Finalmente los aislamientos purificados fueron nuevamente expuestos a luz ultravioleta para verificar la fluorescencia utilizada como carácter de tamizaje.

tinción de Sudán Negro lipofílico, de acuerdo a la metodología aplicada por Kallio (1960), con el fin de observar gránulos de PHAs. Los morfotipos fueron catalogados positivos, cuando se evidenció la presencia de gránulos intracelulares de color oscuro intenso y de textura compacta. A los morfotipos positivos con la prueba de Sudán Negro se les realizó una tinción de Gram (Doetsch 1981), para determinar las características microscópicas del aislamiento (Somasegaran y Hoben 1985); como por ejemplo, bacilos gram negativos cortos, medianos o largos en empalizadas. Se realizó una prueba final de tinción negativa de cápsula con tinta china. Las tinciones descritas se realizaron para todas las colonias purificadas (Grohte *et al* 1999).

Figura 10. Agar levadura manitol YMA pH 6,8 suplementado con Azul Nilo. Fuente Bravo, D. Proyecto VIPRI “Caracterización *Lupinus albus* y *Lupinus caucuensis* asociadas a bacterias productoras de PHAs en Laguna Negra y Laguna de Telpis”.



De los crecimientos en la siembra por agotamiento se tomó una colonia para ser preservada mediante tres métodos y por triplicado. Primero por el método de perlas de porcelana sobre algodón estéril junto con esferas de sílica gel secadas a 280°C, descrito por Somasegaran y Hoben (1985), segundo por tubos con agar inclinado y tercero en caldo nutritivo en glicerol (Willems 2006).

3.3.2 Preinóculos y fermentaciones de las bacterias aisladas de nódulos de plantas leguminosas. Con el fin de realizar los preinóculos, se tomó una colonia de las cajas purificadas y se transfirió al medio mínimo. Los preinóculos fueron de 72 horas de maduración. Para realizar los inóculos los preinóculos se ajustaron a una absorbancia de 0.2 a 600 nm de longitud de onda en espectrofotómetro de UV (HACH Modelo DR2010). Para la producción de PHA en rizobios, se utilizó el medio mínimo recomendado por Encarnación (1995, Anexo B), en g.L<sup>-1</sup> de agua destilada: Manitol, 10g; Extracto de levadura, 0,2 g; Peptona, 0,8 g; MgSO<sub>4</sub>·7.H<sub>2</sub>O, 0,5 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g; NaCl, 0,1 g. Concentración final de nitrógeno: 1 g.L<sup>-1</sup>;

pH: 6,8 Esterilización a 120°C x 15 min. 15 Lbs / presión. El cultivo se llevó a crecimiento en incubadora a 30°C con agitación constante en agitador orbital termostataado a 250 rpm durante 48 horas. Después del crecimiento, los inóculos se ajustaron a una absorbancia de 0.2 a 600 nm de longitud de onda diluyendo en medio de cultivo mínimo. El volumen de los caldos de fermentación fue de 300 mL, el inóculo tuvo 48 horas de incubación, la concentración del inóculo fue de 10%, la temperatura de incubación fue de 30°C, el tiempo de incubación de 24 horas.

Como variable de control, se utilizó la prueba de Dubois (1963) para cuantificación de azúcares mediante el uso del complejo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fenol. Como variables de respuesta se tuvo en cuenta la producción de biomasa ( $X$  mg.L<sup>-1</sup>), por espectrofotometría UV (Madigan *et al.* 2003), utilizando un espectrofotómetro marca HACH® modelo DR2010.; la síntesis de PHA (PHA mg.L<sup>-1</sup>) se cuantificó por gravimetría (Law y Slepecky 1960). Además se calcularon los rendimientos de biomasa ( $y_{x/s}$ ) y de producto ( $y_{p/s}$ ) (Crueger y Crueger 1989). A partir de los análisis de las fermentaciones, se seleccionó el aislamiento bacteriano que mejor rendimiento obtuvo para evaluar las fuentes de carbono y la síntesis de PHA.

3.3.3 Diseño experimental para la producción de PHA. Con el fin de obtener el mejor aislamiento bacteriano productor de PHA, se aplicó el diseño experimental de bloques al azar con 3 réplicas por tratamiento, en donde la unidad experimental fue el erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio mínimo descrito en el epígrafe anterior. Como tratamiento se usaron los aislamientos bacterianos positivos a la prueba de azul nilo (Spiekermann 1999).

#### 3.4 EFECTO DE LAS FUENTES DE CARBONO EN LA SÍNTESIS DE PHA EN EL AISLAMIENTO BACTERIANO SELECCIONADO

3.4.1 Diseño experimental para el efecto de las fuentes de carbono en la síntesis de PHA. Con el fin de evaluar el efecto de las fuentes de carbono en la síntesis de polihidroxicarboxilatos en el aislamiento seleccionado DPAV3T4, se aplicó el diseño experimental de bloques al azar con 3 réplicas en donde la unidad experimental fue el Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio mínimo del epígrafe 3.3.3. Los tratamientos fueron las fuentes de carbono sacarosa (Grothe *et al.* 1999), glucosa (Lasala 2004), xilosa (Encarnación 1995) y galactosa (McKay *et al.* 1998), para ello se reemplazó la fuente de carbono manitol en el medio mínimo y los demás nutrientes se mantuvieron con las mismas concentraciones; las 4 diferentes fuentes de carbono se agregaron por separado en el medio mínimo en una concentración de 10 g.L<sup>-1</sup>.

3.4.2 Preinóculos y fermentaciones del aislamiento DPAV3T4. Como condiciones de fermentación la obtención del preinóculo se hizo en 50mL de medio basal con glucosa (10 g.L<sup>-1</sup>) descrito en el epígrafe 3.3.2; el ajuste del inóculo se realizó trasvasando 10 mL de preinóculo a 90mL de medio mínimo estéril a fermentar. La

fermentación se realizó durante 3 días a 30°C con agitación constante de 250 rpm en agitador orbital termostatado.

Para las cinéticas de crecimiento se tomaron muestras de 10 mL de cada fermentación y cada 2 horas, se realizaron lecturas de absorbancia a partir de los caldos en crecimiento. De los 10 mL extraídos, 5 mL se utilizaron para la cinética de PHA, 3 mL se utilizaron para la cinética de biomasa y 2 mL para la cinética de degradación de carbohidratos.

### 3.5 CARACTERIZACIÓN DEL AISLAMIENTO BACTERIANO DPAV3T4

Se utilizó una colonia para realizar tinción de Gram y de esta manera conocer la morfología microscópica, donde se utilizaron como referencia las descripciones realizadas por el manual Bergey (1989); además se describió la morfología de la colonia sembrada en agar YMA (Somasegaran y Hoben 1985).

Se realizaron las pruebas bioquímicas sugeridas por Trujillo (2005) que incluyen las pruebas de ureasa, bilis esculina y reducción de nitrato en incubación a 31°C, así como la asimilación de Citrato de Simmons, y de azúcares como D-Manosa, Maltosa, Ramnosa, Manitol, y la resistencia a los antibióticos. Todas las pruebas se describen en la tabla 4. Se escogieron 9 antibióticos tanto de amplio espectro, como los denominados antibióticos para bacterias Gram negativas (Alexandre *et al.* 2006). Las fuentes de carbono se utilizaron con el fin de comparar los resultados con los obtenidos para cepas *Bradyrhizobium lupini*, *Rhizobium leguminosarum* y para *Ochrobactrum lupini* (Trujillo 2005)

Tabla 4. Lista de antibióticos y pruebas bioquímicas utilizadas para caracterizar fenotípicamente los aislamientos con fluorescencia positiva ante azul Nilo.

PRUEBA	ABREVIATURA
AMIKACINA	AK
AMPICILINA	AMP
BACITRACINA	B
CEFTAZIDIMA	CAZ
ÁCIDO FUSCÍDICO	FD
LINCOMICINA	MY
NOVOBIOCINA	NV
TIRMETROPRIM SULFAMETOXASOL	SXT
VANCOMICINA	VA
RHAMNOSA	RM
D-MANNOSA	MN
MALTOSA	ML
CITRATO	CT
UREA	UR

BILIS ESCULINA	BE
REDUCCIÓN DE NO <sub>3</sub>	RN

Además, se realizó una caracterización por análisis comparativo de perfiles de isoenzimas con diferentes tipos electroforéticos (Parker 2001), mediante el marcador genético de electroforesis de enzimas multiloci (MLEE) (Selander *et al.* 1986; Silva y Vinuesa 2007) para los 15 aislamientos seleccionados de tal manera que se pudo detectar la similitud de los aislamientos. Para ello, a partir de 200 mL de biomasa obtenida por fermentaciones en medio mínimo con las condiciones de crecimiento descritas en el epígrafe 3.3.2, se realizó el perfil isoenzimático. Se utilizó la tinción específica de las enzimas Alanina Deshidrogenasa (ALD), Fosfatasa alcalina (FAK) y Peroxidasa (POX).

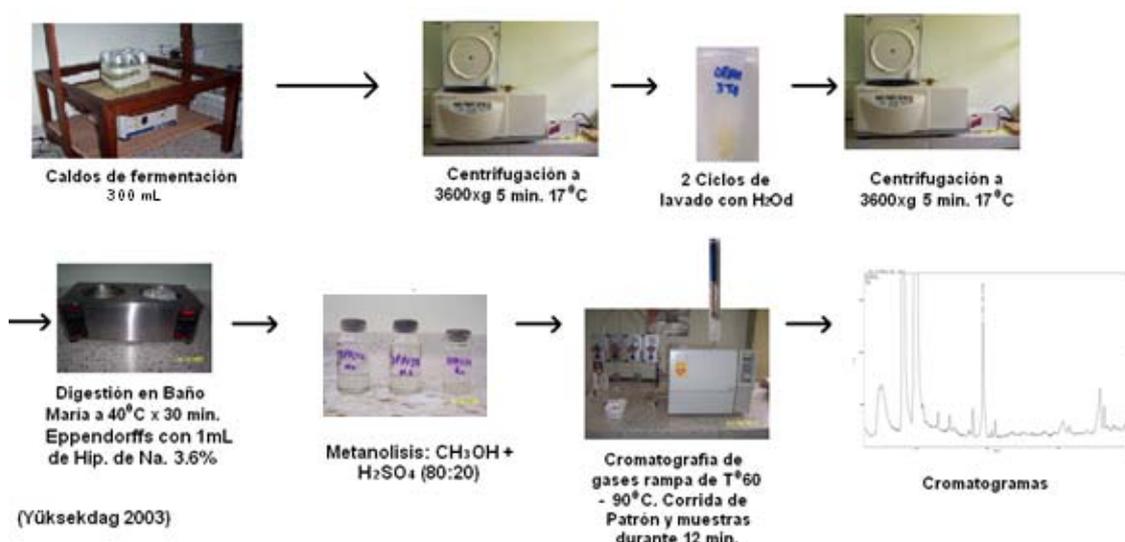
Mediante la matriz obtenida con las tinciones específicas se realizó un dendrograma de similitud poblacional usando el paquete bioinformático NTSys versión 5.01, aplicando el método de distancia UPGMA y una matriz Euclidiana (Nei y Kumar 2000). Las condiciones de la corrida electroforética se registran en el anexo D.

### 3.6 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PHAs

Se realizó una fermentación en 300 mL de medio mínimo empleando la mejor fuente de carbono evaluada. Para la extracción y purificación del polímero se aplicó el método descrito por Braunegg (2005), mediante el cual se realizó la extracción por precipitación centrifugando el caldo fermentado a 33,000 x g durante 5 minutos; la lisis se obtuvo disolviendo el pellet obtenido en 1 mL de hipoclorito de sodio al 3.5%, se procedió a realizar digestión de las bacterias (Jacquel *et al* 2008), llevando el tubo eppendorff a baño maría a 40°C por 30 minutos. Finalizada la digestión, fue centrifugado el tubo a 33,000 x g durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y realizando 2 lavados al pellet obtenido con 1 mL de agua destilada y centrifugando a las mismas condiciones descritas. Luego se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 99%, se enjuagó el pellet con 1 mL de agua destilada y luego de centrifugar y descartar el sobrenadante el tubo se llevó a secado en estufa a 60°C x 24 hrs. Trascorrido dicho tiempo se disolvió la muestra en 1 mL de cloroformo grado espectroscópico, dando vórtex por 3 minutos. Se adicionó 1 mL de agente derivatizante, que consiste en 85 mL de metanol y 15 mL de ácido sulfúrico al 98%, en una relación 20:1. Se llevó a digestión la muestra en baño maría a 90°C por 2 horas. Pasado ese tiempo se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se adicionó 1 mL de NaCl al 0.1%; la fase acuosa fue descartada, se recuperó la fase orgánica del fondo del tubo y se deshidrató la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro (Hesse 1943, Fernández 2005).

Finalmente se corrió 1  $\mu\text{L}$  de muestra en cromatógrafo de gases (CGSM) marca Shimadzu GC-17<sup>a</sup>, versión 3, con puerto de inyección Split/Splitless (Figura 11). Se utilizó un detector FiD, Split: 80:1, columna DB5 (30 mt x 0.25 mm de diámetro; 25  $\mu\text{m}$  de espesor); el gas de arrastre fue Helio a 100 KPascales de Presión, con velocidad lineal de 40  $\text{cm}\cdot\text{seg}^{-1}$ ; flujo interno de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; la temperatura del horno o rampa de temperatura fue de 60° (@6°C. $\text{min}^{-1}$  hasta 90°C 5 minutos), el total de corrida fue de 12 minutos. Los tiempos de retención calculados se compararon con patrones de copolímero Poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato de marca Supelco®, según las condiciones del método de Hesse y Saroul (1943). Los patrones estaban disponibles en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Nariño.

Figura 11. Extracción y caracterización de PHAs



### 3.7 PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Statgraphics plus 5.1. Con los datos obtenidos se realizó una prueba de normalidad. Con el diseño experimental realizado se escogió el aislamiento con mayor rendimiento de producción de PHA mediante una prueba de rangos múltiples Tukey HSD. Para determinar si las fuentes de carbono influyen sobre la síntesis de PHB se utilizó el test T-Student para evaluar la normalidad de los datos, un ANOVA simple para determinar el tratamiento con mejor respuesta y un análisis de contraste de rangos múltiples de Tukey HSD para determinar diferencias verdaderamente significativas entre los tratamientos.

## 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se muestrearon 101 plantas pertenecientes a 23 especies de leguminosas de la subfamilia *Faboideae*, en 7 bosques correspondientes a las tres zonas de altamontaña planteadas en la metodología. Para todos los bosques, el muestreo se realizó en época seca, durante los meses de Junio a Octubre.

Cada género vegetal descrito en el epígrafe 4.1.1, se caracterizó por colonizar espacios con diferentes condiciones ambientales. Algunas plantas colonizan bordes de carretera, otras están en bosque secundario, en claros de bosque conservado y de transectos cortos. Excepto por las especies: *Phaseolus vulgaris* L. y *Lupinus pubescens* Benth, todas las plantas colectadas pertenecen al estrato herbáceo, típico de las leguminosas de la subfamilia *Faboideae* en la zona neotropical.

Doyle y Lickow (2003), mencionan que los patrones de crecimiento vegetal reflejan la relación de la especie vegetal vs. la disponibilidad y competencia por el sustrato; así como también, la disponibilidad de nutrientes del suelo, el acceso a luz solar y el espacio. Estos factores físico-ambientales, afectan el crecimiento y la distribución de las plantas, pero a la vez, permiten la rápida colonización de los miembros de la subfamilia *Faboideae*, en zonas con procesos de sucesión por intervención antrópica. Por esta razón, a pesar de realizarse una búsqueda amplia por transectos al interior del bosque conservado y secundario en las tres áreas de muestreo, solo se pudo observar especies leguminosas en los bordes de los bosques y en claros con suficiente radiación solar, lo cual posiblemente afecta su distribución.

### 4.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LEGUMINOSAS DE LA SUBFAMILIA *FABOIDEAE*

4.1.1 Colecta e Identificación del material vegetal. La primera zona altoandina muestreada se localizó entre los bosques Alto de Daza y Río Buesaco (Figura 12). Presenta una topografía de pendientes estructuradas con grados agudos de inclinación. La primera zona corresponde a bosques altamente conservados, parcelas cultivadas y bosque secundario en regeneración. La altura promedio fue de 2800 m.s.n.m. La humedad relativa promedio registrada fue de 72%, la temperatura ambiente promedio fue de 13°C y la temperatura de suelos fue de 7°C. En los 5 subtransectos se pudo observar 13 especies vegetales, para un total de 43 plantas colectadas. Entre las especies observadas se destacan las siguientes:

Figura 12. Primera zona de muestreo de plantas fabáceas, localizada entre los municipios de Pasto y Buesaco.



*Otholobium mexicanum* (L.) Grimes (Figura 13a), pertenece a la tribu *Psoraleeae* (Hutchinson 1964), presenta 5 hojas trifolioladas, con foliolos de color fucsia con forma ovoide, oblicua y equitante, presentó nódulos indeterminados. *Trifolium repens* L. (Figura 13b) pertenece a la tribu *Trifolieae* (Brown 1814), se caracteriza por su inflorescencia en glomérulo de color blanco (Figura 13c), presentó nódulos indeterminados.

Figura 13. Plantas fabáceas en su hábitat natural: (a.) *Otholobium mexicanum* (L.) Grimes (b.) *Trifolium repens* L. (c.) Inflorescencia en umbela de *Trifolium repens* L. Plantas colectadas en los Bosques Alto de Daza - cerro de Pinasaco y Buesaco; Municipios de Pasto y Buesaco.



(a)

(b)

(c)

*Centrosema virginianum* (L.) Benth, bejuco trepador, pertenece a la tribu *Phaseoleae*, trifoliada con folíolos largos (Figura 14a), presentó nódulos indeterminados. *Desmodium barbatum* (L.) Benth et Oerst, de la tribu *Desmodieae* (Kajita 2001), posee hojas trifolioladas, alargadas (Figura 14b), con forma ovoide alargada, tricomadas en la cara adaxial; presentó nódulos determinados. *Crotalaria sagittalis* L. (Figura 14c), pertenece a la tribu *Crotalarieae* (Bernal 1982), posee hojas trifolioladas amplias, con extensión apical y cara adaxial suculenta; presentó nódulos indeterminados.

Figura 14. Plantas fabáceas en su hábitat natural. (a.) *Centrosema virginianum* (L.) Benth. (b.) *Desmodium barbatum* (L.) Benth et Oerst. (c.) *Crotalaria sagittalis* L. Obtenidas de los Bosques de Alto de Daza - cerro de Pinasaco y Buesaco; Municipios de Pasto y Buesaco.



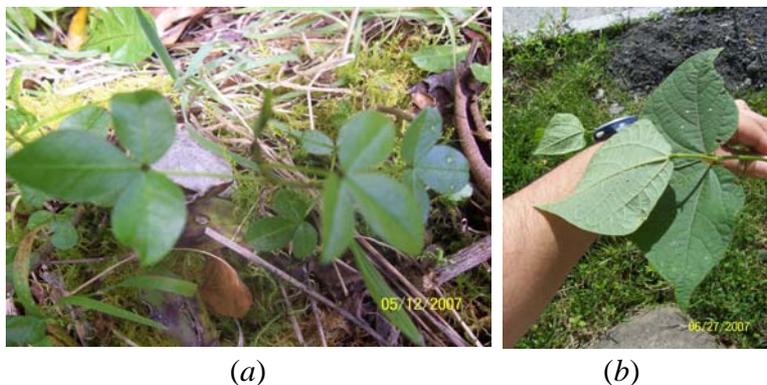
(a)

(b)

(c)

*Desmodium uncinatum* (Jacq) D.C., hace parte de la tribu *Desmodieae* (Kajita 2001), con hábito de crecimiento herbáceo de 20 a 30 cm de altura, estípelas glandulares y folíolos romboides-ovados, con envés seríceo (Figura 15a); presentó nódulos indeterminados. *Pueraria phaseoloides* Benth es de la tribu *Phaseoleae*, – una de las tribus con más representantes en la subfamilia *Faboideae*–, presentó hábito herbáceo bejuco, sus folíolos son levemente lobulados y el envés de los folíolos es seríceo (Figura 15b). Presentó nódulos grandes, en estado infectivo – efectivo y determinados.

Figura 15. Plantas fabáceas en su hábitat natural (a.) *Desmodium uncinatum* (Jacq) D.C. (b.) *Pueraria phaseoloides* Benth. Obtenidas de los Bosques Alto de Daza - cerro de Pinasaco y Buesaco, Municipios de Pasto y Buesaco.



*Phaseolus vulgaris* L. pertenece a la tribu *Phaseoleae* (Rehder 1945), presenta foliolos con borde entero, los cuales son mayores a 4 cm de longitud (Figura 16). Cabe señalar que esta especie muestreada no hace parte de cultivos; se muestreó en el bosque secundario en regeneración aledaño a la carretera vía a Buesaco. Por tanto, las especies colectadas, son leguminosas silvestres de *Phaseolus* que cohabitan con otros géneros de la subfamilia *Faboideae*. Se puede observar en la figura 16, que el número de individuos es grande en función de la disponibilidad de sustratos –nutrientes y luz solar-, debido a su hábito de crecimiento arbustivo. Presentó nódulos determinados y grandes.

Figura 16. Planta de *Phaseolus vulgaris* L. en su hábitat natural, con altura de 1,68mt. Obtenida del Bosque de Buesaco, a 2Km. de la entrada de Buesaco. Municipio de Buesaco.



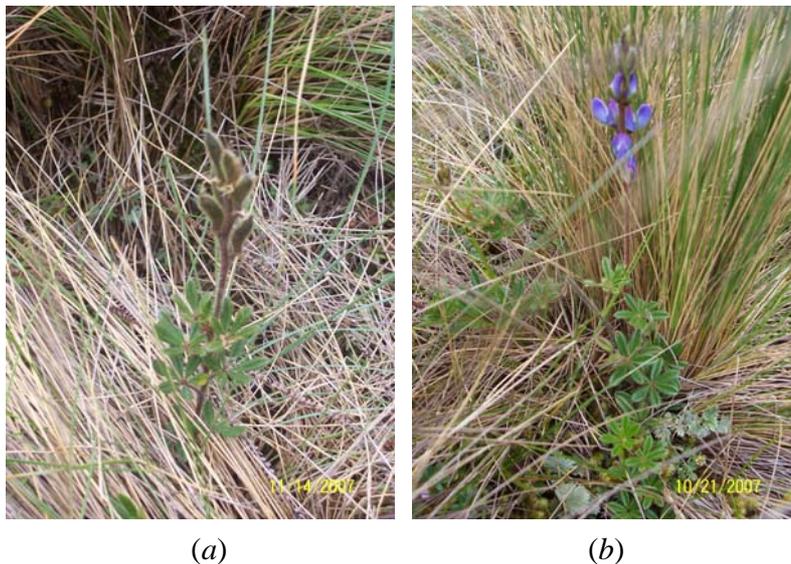
La segunda área muestreada, se localizó en el bosque aledaño a la laguna negra dentro de la Reserva Natural de Flora y Fauna Galeras y Laguna de Telpis. El bosque aledaño a ambas lagunas, corresponde a bosque altamente conservado (Figura 17). La altura promedio fue de 2700 msnm para Laguna Negra y de 2900 msnm para Laguna de Telpis. Se registró una humedad relativa promedio de 81%, alta pluviosidad, la temperatura ambiental promedio fue de 9°C y la temperatura promedio de suelos fue de 4°C. Se pudo observar en todos los subtransectos, 6 especies vegetales, para un total de 28 plantas colectadas. Entre esas especies se destacan las siguientes:

Figura 17. Segunda zona de muestreo de plantas fabáceas, localizada entre los municipios de Pasto y Yacuanquer.



*Lupinus albus* L., la cual hace parte de la tribu *Genisteae* (Schuster 2000), se caracteriza por tener hojas palmado-digitadas (Figura 18a), siempre persistentes. Se observaron nódulos indeterminados. *Lupinus caucensis* C.P. Smith, pertenece a la misma tribu de *Lupinus albus* L. Se diferencia, debido a que posee una altura promedio mayor a *L. albus* L. y carece de recubrimiento de tricomas (Figura 18b), se observó la presencia de nódulos indeterminados y grandes. *L. caucensis* C.P. Smith, posee hojas suculentas y brillantes, en tanto que *L. albus* L. posee textura foliar opaca, factor que puede incidir en la fotorespiración para cada especie, dependiendo de su estrategia por disminuir al máximo la pérdida de agua celular en función de la incidencia de la luz solar.

Figura 18. Plantas fabáceas en su hábitat natural (a.) *Lupinus albus* L. (b.) *Lupinus caucensis* C.P. Smith. Obtenidas de los Bosques aledaños a la Laguna Negra - Reserva Natural Santuario de Flora y Fauna Galeras; y a la Laguna de Telpis. Municipios de Pasto y Yacuanquer.



*Lupinus pubescens* Benth, es una especie diferenciada en su altura con respecto a las dos anteriores. Exhibe hábito de crecimiento herbáceo en su rango superior, altura promedio muestreada de 1.7 mts. Ésta es una especie subarbustiva, de hojas amplias, opacas y tricomas; formadora de nódulos indeterminados. Esta especie es de baja distribución y de difícil acceso por la altura muestreada (3000 msnm) y el grado de pendiente en el que se encontraron las muestras (Figura 19).

Figura 19. Planta *Lupinus pubescens* Benth. En su hábitat natural. Obtenida en el Bosque aledaño a Laguna Negra - Reserva Natural Santuario de Flora y Fauna Galeras. Municipio de Pasto.



La tercera zona muestreada correspondió a bosques conservado y secundarios en regeneración, ubicados en Pueblo Viejo (Figura 20a), el bosque aledaño a la Laguna del Azufra y el bosque de Balalaika (Figura 20b y c). El clima fue predominantemente frío, con precipitaciones ocasionales, se registró una altura promedio de 4200 msnm, temperatura ambiental promedio de 7°C, humedad relativa de 81% y temperatura de suelos promedio de 3°C. Se pudo observar en los subtransectos, 4 especies vegetales, para un total de 30 plantas colectadas. Entre las especies observadas se destacan las siguientes:

Figura 20. Tercera zona de muestreo de plantas fabáceas, localizada en el municipio de Túquerres.



*Desmodium tortuosum* (Sw) D.C., pertenece a la tribu *Desmodieae* (Kajita 2001); posee hojas trifolioladas, alargadas (Figura 21a), la estructura foliar posee venas secundarias reticuladas, composición seríceea alrededor de la nervadura central y flores fasciculadas de color violeta claro. Sus nódulos tenían una estructura determinada. *Phaseolus dumosus* Macfad., es de la tribu *Phaseoleae*. Crece en forma de bejuco, presenta flores de color blanco (Figura 21b) y muchas semillas pequeñas; presentó nódulos determinados. En esta zona se destaca la observación de muchos individuos de *Lupinus pubescens* Benth y de *Lupinus albus* L.

Figura 21 Plantas fabáceas en su hábitat natural (a.) *Desmodium tortuosum* (Sw) D.C. (b.) *Phaseolus dumosus* Macfad. Obtenidas en el Bosque de Balalaika, carretera Túquerres-Balalaika Km18. Municipio de Túquerres.



De las 23 especies de plantas colectadas en este trabajo, 13 correspondieron a la zona 1, lo cual equivale al 65% del muestreo total; 6 correspondieron a la zona 2, que equivale al 20% y 4 correspondieron a la zona 3, equivalente a un 15% del total (Anexo E). Lo anterior permite concluir que en los bosques: Alto de Daza y de Buesaco, se obtuvo una mayor cantidad de especies. Todas las muestras fueron secadas y etiquetadas; y se realizó el ingreso de los especímenes al herbario PSO de la Universidad de Nariño. Cada sistema radicular de todas las especies vegetales se procesaron para extraer los bacteroides en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Nariño.

#### 4.2 ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PHAs SINTETIZADOS POR BACTERIAS NODULANTES AISLADAS DE PLANTAS SILVESTRES DE LA SUBFAMILIA *FABOIDEAE*

4.2.1 Aislamiento de bacterias nodulantes de leguminosas en medio de cultivo diferencial. Dado que hubo una colección de 5 muestras por cada una de las 23 especie vegetales de las tres zonas evaluadas, se obtuvo un total de 115 asilamientos bacterianos nodulares. Cada aislamiento fue etiquetado con datos de nomenclatura y bosque respectivo. Los preservados fueron conservados en cajas que contenían los datos de georeferenciación, elevación sobre el nivel del mar, temperatura ambiental y temperatura promedio de suelos, fecha de colecta y nombre del colector. Las cajas fueron selladas y guardadas en Freezer a -20°C.

De las 23 especies de plantas fabáceas, 16 presentaron nódulos determinados; y 7 presentaron nódulos indeterminados. El tipo de nódulo bacteriano y las descripciones sobre el aislamiento de bacterias se presentan en la tabla 5. Cabe destacar que todos los aislamientos bacterianos son gram negativos, con formación de colonias mucoides, de borde regular y elevación cóncava. En nódulos determinados se aislaron colonias separadas y pequeñas; y en nódulos

indeterminados se obtuvo colonias grandes y mucoides. Esto se observó en los 115 aislamientos bacterianos obtenidos de 101 plantas colectadas.

Tabla 5. Descripción de los aislamientos bacterianos correspondientes a 7 bosques altoandinos del Departamento de Nariño, obtenidos a partir de cultivos en cajas de petri con agar YMA a 30°C x 24 horas de incubación.

ESPECIE VEGETAL	CEPA	TIPO DE NÓDULO	COLOR COLONIA	DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA
<i>Crotalaria sagittalis</i> L.	DCRO2T2	INDETERMINADO	Rosado	Bacilos cortos emparejados
<i>Crotalaria sagittalis</i> L.	DCRO2T4	INDETERMINADO	Rosado	Bacilos medianos emparejados
<i>Desmodium uncinatum</i> (Jacq) D.C.	DERY2T5	INDETERMINADO	Blanco	Bacilos cortos segregados
<i>Desmodium uncinatum</i> (Jacq) D.C.	DERY2T4	INDETERMINADO	Blanco	Bacilos medianos individuales
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	DPAV2T3	DETERMINADO	Rosado	Bacilos cortos dispersos
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	DPAV3T4	DETERMINADO	Rosado	Bacilos cortos dispersos
<i>Lupinus albus</i> L.	TLAL2TG1	INDETERMINADO	Rosado	Bacilos cortos segregados
<i>Lupinus caudensis</i> C.P. Smith	TLCA2T1	DETERMINADO	Rosado	Bacilos medianos dispersos
<i>Trifolium campestre</i> Schreb	TTCA3T5g	DETERMINADO	Blanco	Bacilos medianos dispersos
<i>Trifolium campestre</i> Schreb	TTCA3T3g	DETERMINADO	Blanco	Bacilos cortos dispersos
<i>Lupinus pubescens</i> Benth	ALANT2m	INDETERMINADO	Rosado	Bacilos medianos dispersos
<i>Lupinus pubescens</i> Benth	ALANT2C3	INDETERMINADO	Rosado	Bacilos largos dispersos
<i>Lupinus pubescens</i> Benth	ALANT5f1	INDETERMINADO	Rosado	Bacilos medianos en empalizadas
<i>Lupinus pubescens</i> Benth	ALANT5fr2	INDETERMINADO	Rosado	Bacilos medianos dispersos

Las cajas petri con medio de cultivo YMA pH 6.8 suplementado con azul Nilo fueron inoculadas con extractos nodulares y examinadas en UV a una longitud de onda de 350 nm (Figura 22). Las colonias que presentaron fluorescencia roja amarilla y verde se seleccionaron como acumuladoras de PHAs y fueron purificadas en el mismo medio suplementado con azul Nilo. Después de 24, 48 y 72 horas fueron examinadas en transiluminador UV a la longitud de onda ya descrita. Posteriormente, se realizó una descripción macroscópica de las colonias (Tabla 5). Cabe señalar que la mayoría presentó una apariencia mucilaginosa, con pigmentación roja o rosada, borde continuo, elevación cóncava y textura cremosa – mucoide. La descripción macroscópica anterior (Figura 23) se ajusta a lo descrito por Dowling, Broughton, (1986); y Trujillo (2005) para bacterias fijadoras de nitrógeno simbiotes de leguminosas. Para observar el gránulo de PHA al microscopio fotónico se realizó una tinción con Negro sudan (Ostle y Holt 1982; Fernández, *et al.* 2006).

Figura 22. Evaluación por UV del extracto nodular obtenido a partir de *Otholobium mexicanum* (L.) Grimmes, en agar YMA pH 6.8, suplementado con azul Nilo. La colonia con fluorescencia amarilla fue escogida para purificarse.



Figura 23. Siembra purificada del aislamiento AzLATfr4, evaluada en UV y en luz blanca. El aislamiento se obtuvo de *Lupinus pubescens* Benth, en el bosque de ascenso a la Laguna del Azufre.



Los resultados de las pruebas confirmatorias son iguales a las reportadas por Vásquez-Arroyo (1998) y Vinuesa (2007), quienes afirman que éstas características ubican a los aislamientos seleccionados dentro de la familia *Rhizobiaceae*; tales pruebas incluyeron tinción de gram, tinción negativa de cápsula por tinta china (Figuras 24 a 26), presencia de cápsulas y crecimiento de bacterias en Agar Manitol libre de nitrógeno bajo condiciones de anaerobiosis (Figura 27).

Figura 24-26. Fotografías en las cuales se observan las características microscópicas del aislamiento DCRO2T3 que confirma su pertenencia a la familia *Rhizobiaceae*. De izquierda a derecha: Tinción de gram, tinción de cápsula, tinción de sudan negro B. Observaciones realizadas en microscopio óptico marca OLYMPUS CH-2 Modelo CHS Made In Japan.

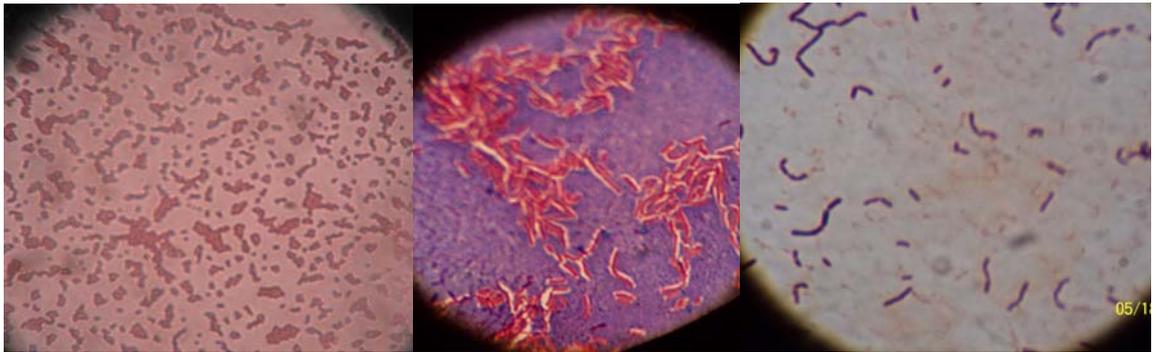


Figura 27. Fotografías que describen el sistema de cultivo anaerobio y cajas petri con los aislamientos en atmósfera anaerobia. El crecimiento se observó a las 24 horas de incubación a  $31^{\circ}\text{C}\pm 0.2$ .



Se reactivaron los aislamientos seleccionados y se realizaron las fermentaciones para el siguiente diseño experimental mediante fermentaciones bacterianas en agitación constante (Figura 28) con diferentes fuentes de carbono como tratamiento.

Figura 28. Fermentaciones creciendo con agitación constante en el laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular de la Universidad de Nariño.



#### 4.3 ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PHAs SINTETIZADOS POR BACTERIAS NODULANTES DE PLANTAS SILVESTRES DE LA SUBFAMILIA *FABOIDEAE*

De los 105 aislamientos 15 cumplieron con las características que describen la familia *Rhizobiaceae*, los cuales se utilizaron para estimar la producción de PHAs. En la tabla 6 se aprecian los resultados de las variables de respuesta obtenidas de los diferentes aislamientos bacterianos. Cabe señalar que a través de la prueba de normalidad T-Student realizado a cada aislamiento existen diferencias estadísticamente significativas con un  $p = 0,002$  y un nivel de confianza del 99%.

Tabla 6. Estimación de la producción de PHAs sintetizados por bacterias nodulantes de plantas silvestres subfamilia *Faboideae* a partir de 45 fermentaciones realizadas con el fin de determinar el aislamiento con mayor producción.

AISLAMIENTO	X g/L	PHB g/L	Y p/x	AISLAMIENTO	X g/L	PHB g/L	Y p/x	AISLAMIENTO	X g/L	PHB g/L	Y p/x
ALANT5fr2	0,03	0,02±0.85	1,5	ALANT5f1	0,01	0,01±0.01	0	TTCA3T5g	0,08	0,01±0.85	8
ALANT5fr2	0,04	0,06±0.36	0,67	ALANT5f1	0,01	0,03±0.18	0,33	TTCA3T5g	0,32	0±0.00	0
ALANT5fr2	0,03	0,07±0.22	0,43	ALANT5f1	0,01	0,02±0.28	0,5	TLCA2T1g	0,08	0,01±0.85	8
ALANT2c3	0,03	0,05±0.32	0,6	DERY2T4	0,01	0±0.00	0	TLCA2T1g	0,06	0,01±0.85	6
ALANT2c3	0,01	0,01±0.57	1	DERY2T4	0,01	0,01±0.57	1	TLCA2T1g	0,09	0,02±0.85	4,5
ALANT2c3	0,03	0±0.00	0	DERY2T4	0,02	0±0.00	0	TTCA3T3g	0,02	0,01±0.85	2
ALANT2m	0,02	0,01±0.15	2	DCRO2T4	0,01	0,08±0.06	0,12	TTCA3T3g	0,02	0,02±0.85	1
ALANT2m	0,08	0,01±0.59	8	DCRO2T4	0	0,02±0.01	0	TTCA3T3g	0,06	0,01±0.85	6
ALANT2m	0,03	0,06±0.26	0,5	DCRO2T4	0,02	0,1±0.09	0,2	TLCA2T1	0,01	0,01±0.85	1
DCRO2T2	0,04	0±0.00	0	TTCA3T5g	0,23	0±0.00	0	DPAV3T4	0,03	0,07±0.11	0

DCRO2T2	0,03	0,04±0.85	0,75	DERY2T5	0,03	0±0.00	0	DPAV3T4	0,05	0,04±0.07	0
DCRO2T2	0,07	0,02±0.04	3,5	DERY2T5	0,03	0±0.00	0	DPAV2T3	0,03	0,01±0.04	3
DPAV3T4	0,04	<b>0,11±0.02</b>	<b>0,36</b>	DERY2T5	0,05	0,01±0.87	5	DPAV2T3	0,03	0,01±0.01	3
TLCA2T1G	0,04	0,01±0.03	4	TLCA2T1G	0,15	0,01±0.61	15	DPAV2T3	0,02	0±0.00	0
TLCA2T1G	0,12	0,01±0.89	12	TLCA2T1	0,12	0,01±0.89	12	TLCA2T1	0,12	0,01±0.96	12

Con los datos obtenidos en las 15 fermentaciones con 3 réplicas, se aplicó la prueba Tukey de mínimas diferencias significativas con la cual se estableció que el aislamiento bacteriano que más produce biomasa como PHB es DPAV3T4 obtenido a partir de *Phaseolus vulgaris* en el bosque de Buesaco. Los datos del estadístico aplicado se pueden apreciar en la Tabla 7.

Tabla 7. Prueba de contraste múltiple de rangos Tukey aplicada a las 45 fermentaciones realizadas para determinar el aislamiento con mejor respuesta a la producción de PHB.

Contraste Múltiple de Rango

-----

Método: 95,0 porcentaje LSD Tukey

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
ALANT5fr2	3	0,00333333	X
DTCA4T4	3	0,00333333	X
DCRO2T4	3	0,00333333	X
DCRO2T2	3	0,00666667	X
TTCA3T5g	3	0,01333333	X
TLCA2T1	3	0,01333333	X
TLCA2T1G	3	0,01666667	X
TTCA3T3g	3	0,02	XX
ALANT5f1	3	0,02	XX
ALANT2c3	3	0,02	XX
ALANT2m	3	0,02666667	XX
DERY2T5	3	0,05	XX
DPAV2T3	3	0,06333333	X
DERY2T4	3	0,06666667	X
DPAV3T4	3	0,11	X

-----

Después de realizar la prueba Tukey y comparar con otros aislamientos, se observó que la máxima concentración de PHB de bacterias diazótrofes asociadas a leguminosas silvestres de Nariño fue de 0.11 g.L<sup>-1</sup>, que es baja con relación a la cepa comercial *Bradyrhizobium japonicum* de 46 g.L<sup>-1</sup> (Encarnación 1998). Sin embargo no puede haber un punto de comparación. No se utilizó una cepa de referencia dado que el objetivo de esta investigación no es evaluar un medio de cultivo optimizado tanto para la producción de biomasa como de polímero, sino evaluar la incidencia de las fuentes de carbono en aislamientos silvestre de rizobios nodulantes.

En la tabla 6 se puede apreciar, que aislamientos diferentes a DPAV3T4 presentan mayor producción de biomasa, como es el caso del aislamiento TTCA3T5 ( $0.32 \text{ g.L}^{-1}$ ); sin embargo, la producción de polímero fue nula, por lo cual el rendimiento también fue nulo. Para este aislado, se puede proponer una fermentación fed-batch, que incremente la producción de polímero en función de la biomasa obtenida. Igualmente, se puede apreciar en la tabla 6, que el mejor rendimiento obtenido de producto–sustrato, fue en el aislamiento DCRO2T2 (0.75); sin embargo, obtuvo una baja producción de biomasa y de producto. La baja producción de ambos parámetros, se puede deber a la fisiología nodular de donde provino el aislamiento; *Crotalaria sagittalis* L. presentó nódulos indeterminados. Los bacteroides pertenecientes a este tipo de nódulos, se destacan en la literatura (Trainer y Charles 2006) por no ser acumuladores de PHB en concentraciones apreciables, sin embargo este aislamiento presentó una acumulación que puede ser mejorada en futuras investigaciones mediante fermentaciones fed-batch, para incrementar los niveles de síntesis de polímero.

Por otro lado, se destaca la alta producción del aislado DPAV3T4, comparado con los otros aislamientos nativos, ya que el PHA en rizobios, además del rol tradicional de ser reservorio de fuente de carbono, aceptor alternativo de electrones, fuente de poder reductor, entre otros; cumple con otras funciones como por ejemplo, controla el estado celular del potencial redox, disminuye las concentraciones de oxígeno, baja el potencial redox y permite un concurrente incremento en los niveles celulares de NAD(P)H (Trainer y Charles 2006); además, activa la inhibición de la enzima isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente y citrato sintasa. Esta inhibición enzimática, dirige el Acetil-CoA y niveles de NADP y electrones desde el ciclo de Krebs hacia la síntesis de PHB. Por tanto, la producción de PHA en DPAV3T4 probablemente está asociado con la condición fisiológica de bacterias de nódulos determinados, como es el caso de los obtenidos a partir de *Phaseolus vulgaris* L.

Por otra parte, la alta producción de PHA comparada con los otros aislamientos bacterianos, le confiere características particulares útiles en procesos de producción de bioabonos, inoculación cruzada para promover el crecimiento vegetal y estudios en manipulación genética.

Considerando que el PHA confiere a la bacteria capacidad para resistir ambientes hostiles (Martínez-Romero 2006), DPAV3T4 puede ser utilizada en la producción de bioabonos (Okon e Itzigsohn 1995), porque éste aislamiento tendrá un rango de vida mayor a los microorganismos competidores, y por tanto tendrá mayor probabilidad de infectar raíces de leguminosas. Por lo anterior es evidente que son aptos para procesos de inoculación cruzada con hospederos vegetales cultivables. La producción de bioabonos es atractiva para el sector agrícola, debido a que no implica transformación química contaminante de los cultivos y los rendimientos de biomasa vegetal aumentan significativamente (Ackermann y Babel 1998).

Además, la cepa DPAV3T4 puede ser utilizada para la producción de PHB mediante la optimización de un medio de cultivo a partir de sustratos baratos, que permitan aprovechar la fuente de carbono para la síntesis de PHB (Brauneg 2005); cabe señalar que varias cepas han mejorado sus rendimientos de producción de polímero mediante optimización del medio de cultivo; por ejemplo, la cepa *Mesorhizobium plurifarum* 4033 produjo hasta 500 mg.L<sup>-1</sup> de PHB en un medio optimizado (Lasala *et al* 2004); la cepa *Bacillus mycoides* M17-2 produjo inicialmente 10 mg.L<sup>-1</sup> (Hidalgo y Zambrano 2005) y en un reciente estudio de optimización del medio de cultivo a partir de sustratos baratos utilizando la misma cepa, se obtuvo una producción de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de PHA (Díaz 2008; comunicación directa); es decir, 100 veces más que el resultado reportado por Hidalgo y Zambrano (2005). Por todo lo anterior, el aislamiento DPAV3T4, que produce 110 mg.L<sup>-1</sup> tiene posibilidades de producir altas concentraciones de PHA en un medio optimizado.

La cepa DPAV3T4 también puede emplearse en estudios de manipulación génica que contribuyan a optimizar la actividad metabólica de las enzimas implicadas en la síntesis de polímero (Cevallos 1996).

#### 4.4 EFECTO DE LAS FUENTES DE CARBONO EN LA SÍNTESIS DE PHA EN EL AISLAMIENTO BACTERIANO DPAV3T4

El efecto de cada una de las fuentes de carbono obtenidas a partir del diseño experimental planteado para cuatro variables de respuesta, se puede apreciar en la tabla 8.

Tabla 8. Efecto de las fuentes de carbono en la síntesis de PHB.

Fuente de Carbono	Biomasa g/L	PHA g/L	$\mu$	Rendimiento Yp/x
Glucosa	1,02±0.03	0,13±0.02	0,94	0,13
Sacarosa	0,99±0.02	0,07±0.01	0,92	0,07
Galactosa	0,88±0.01	0,05±0.03	0,73	0,06
Xilosa	0,26±0.04	0,01±0.01	0,69	0,04

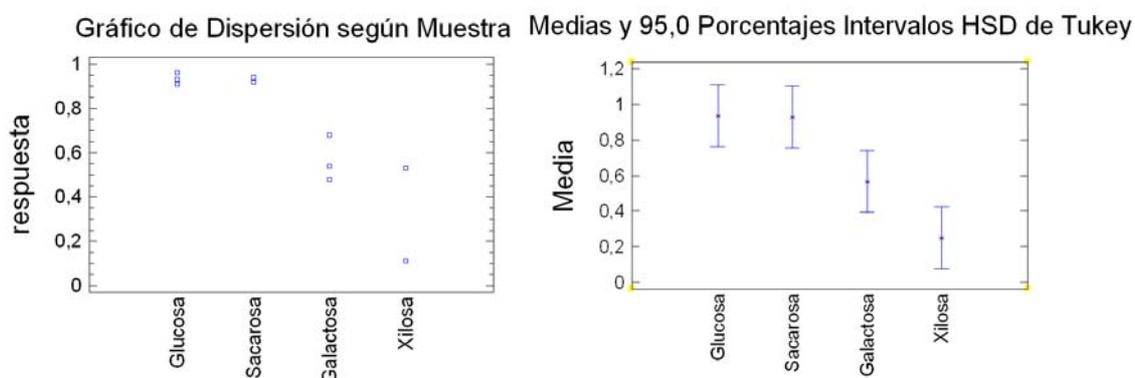
Para demostrar si las fuentes de carbono influyen en la síntesis de PHB, se realizó una prueba ANOVA con los datos obtenidos en este diseño experimental (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de la Varianza para las cuatro fuentes de carbono evaluadas como tratamientos en función de la síntesis de PHB en el diseño experimental.

Análisis de la Varianza					
Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	0,966892	3	0,322297	18,39	0,0006
Intra grupos	0,1402	8	0,017525		
Total (Corr.)	1,10709	11			

La tabla ANOVA presentada arriba muestra la varianza de los datos correspondientes a la tasa de síntesis de PHB microbiano en dos componentes: un componente entre grupos (fuente de carbono evaluada) y un componente dentro de cada grupo (réplicas del diseño experimental). Puesto que el valor p del test F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables (las fuentes de carbono) a un nivel de confianza del 95.0% (Figura 29).

Figura 29. Gráficos de dispersión y porcentaje de las tasas de crecimiento por cada tratamiento para cuatro fuentes de carbono.



En las gráficas de la figura 30 se aprecia el efecto de las fuentes de carbono en la síntesis de PHA en el aislamiento DPAV3T4 con los carbohidratos: Glucosa, Sacarosa, Galactosa y Xilosa. Cabe señalar que con el fin de obtener una mejor visualización del comportamiento de las variables de producción de PHA se utilizó una constante K para la curva de biomasa..

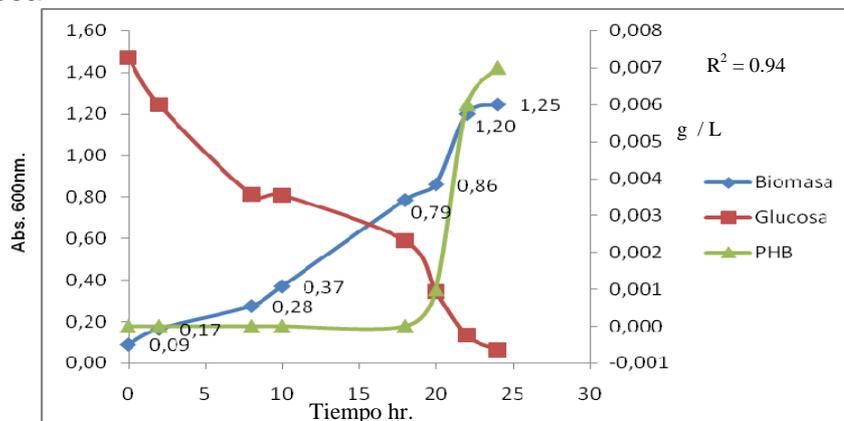
Las cinéticas de biomasa, producto y sustrato muestran diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% para cada fuente de carbono utilizada como tratamiento o variable de respuesta en el diseño experimental. Esta observación corrobora los planteamientos de Prell y Trainer (2006), quienes afirmaron que la función y los cambios que sufre el metabolismo dependen del sustrato a degradar por parte de estas bacterias; y que a pesar de existir diferentes hidratos de

carbono complejos en su estado de vida saprófito como calisteginas, staquidrinas, homoserinas, trigonelinas, mimosinas y rizopinas, los tiempos de degradación y el crecimiento celular también se afectan y disminuyen con respecto a fuentes de carbono sencillas como glucosa o sacarosa.

En DPAV3T4, la cinética de crecimiento con glucosa como fuente de carbono (figura 30a), permite observar dos fases de crecimiento: exponencial y estacionaria en los tiempos de 0-22 y 22-24 horas respectivamente. No se observó fase de adaptación debido a que el inóculo se encontraba en fase exponencial y se compuso del mismo medio basal que el caldo de fermentación. La glucosa es un carbohidrato sencillo y la mayoría de los organismos vivos pueden catabolizarlo y en el caso de las bacterias, nutrientes como la glucosa son de fácil transporte a través de la membrana citoplasmática (Yüksekdağ 2004); por este hecho, el crecimiento bacteriano no se afectó inicialmente y el inóculo inmediatamente empezó a metabolizar rápidamente el sustrato disponible de la fermentación.

Figura 30. Cinéticas de crecimiento para el aislamiento bacteriano DPAV3T4 en medio de cultivo mínimo con diferentes fuentes de carbono por tratamiento: a.) Glucosa b) Sacarosa c) Galactosa d) Xilosa. Los valores originales obtenidos para PHB fueron multiplicados por una constante K=5.

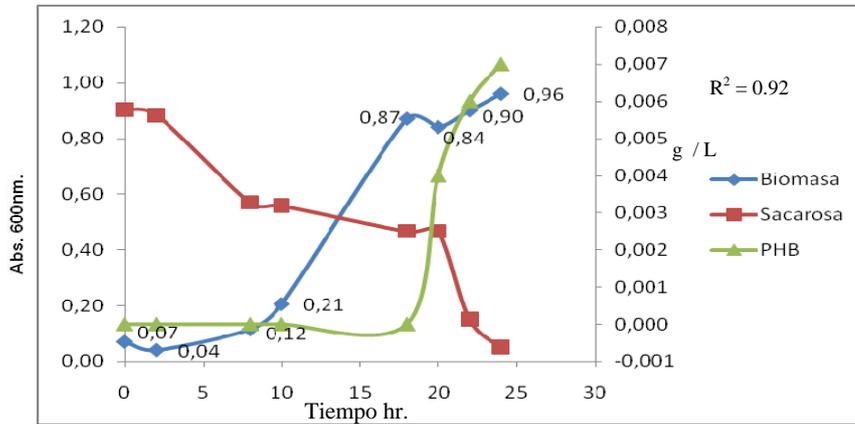
a.) Glucosa



La gráfica 30b presenta la cinética del aislamiento DPAV3T4 en medio que contiene sacarosa como fuente de carbono. En ella se observan tres fases de crecimiento: fase de adaptación, fase exponencial y una segunda fase exponencial. La fase de adaptación cambia con respecto a la cinética del mismo aislamiento con glucosa como fuente de carbono. Existe una relación compleja entre la sacarosa,  $K_2HPO_4$  e inóculo tanto en cepas de *Rhizobium meliloti* (Lakshman *et al.* 2004) como en el aislamiento DPAV3T4. Los nutrientes cuando se acomplejan inciden en el crecimiento y generan una fase de adaptación, necesaria para disponer de los reguladores enzimáticos para catabolizar esta fuente de carbono. Este proceso es lento y se evidencia en las primeras dos horas

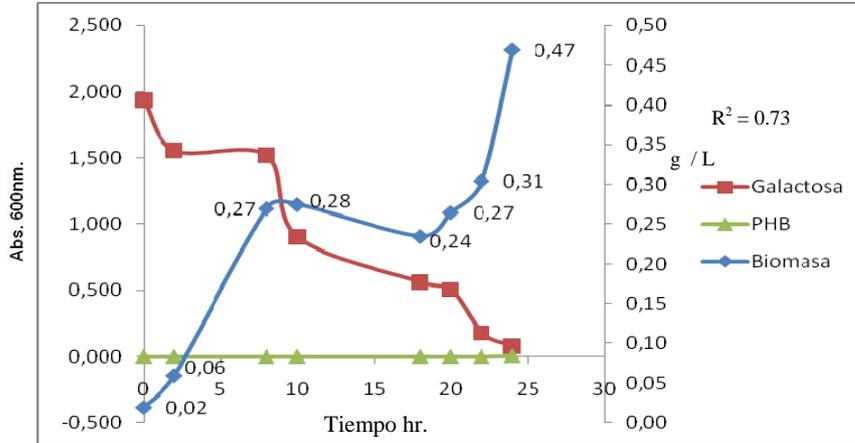
de crecimiento bacteriano, hasta que la población sintetiza las enzimas necesarias para el sustrato disponible y se inicia la fase exponencial.

b.) Sacarosa



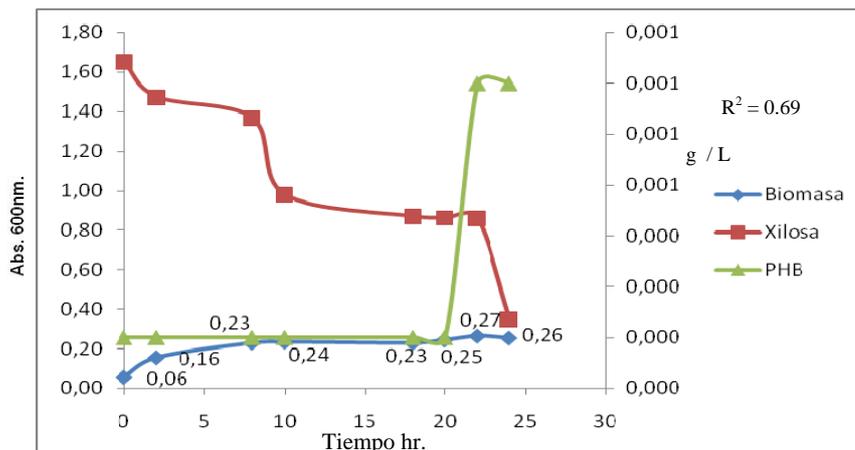
La cinética de crecimiento para el aislamiento DPAV3T4 con galactosa como fuente de carbono, permite observar tres fases de crecimiento: fase exponencial, de latencia y una segunda fase exponencial. Esta bacteria no puede metabolizar galactosa. La fase de adaptación ocurre debido a que los microorganismos no utilizan la galactosa como sustrato de carbono. La represión catabólica o la inhibición de determinadas rutas metabólicas para degradar galactosa pueden ser una razón de este comportamiento de crecimiento (Koller, *et al.* 2008). Probablemente, las curvas de consumo de sustrato y de cinética crecimiento con galactosa de la figura 30c, reflejan la degradación de otras fuentes de carbono presentes en el medio de cultivo. Aquí cabe señalar que el método de Dubois permite obtener datos de degradación de carbono sin diferenciar la fuente, sea esta un carbohidrato o un ácido graso u otro nutriente (Madigan, *et al.* 2003). En la cinética de crecimiento correspondiente al aislamiento DPAV3T4 en medio que contiene galactosa como fuente de carbono, también se puede evidenciar un patrón de crecimiento diáuxico. Esto se debe probablemente a la hidrólisis de la galactosa para formar en baja concentración moléculas más simples como dulcitol y glucosa, y a su vez, secretar exoenzimas para hidrolizar el dulcitol y poder asimilar los residuos mediante el sistema transportador de membrana (Udvardi y Day 1997). Además, se ha observado que rizobios de crecimiento lento como DPAV3T4 muestran un tiempo de generación menor cuando crecen en fuentes de carbono como glicerol u otras fuentes de carbono como galactosa (François y Gaudry 2001).

c.) Galactosa



La cinética de crecimiento para el aislamiento DPAV3T4 con xilosa como fuente de carbono, permite observar dos fases de crecimiento: Fase exponencial y fase de latencia. Se puede observar que la bacteria evidencia un bajo consumo de la fuente de carbono, y la producción de PHB inicia en la fase estacionaria. Es destacable la relación inversa del crecimiento vs. síntesis de PHB, debido a que la gráfica refleja una fermentación no asociada al crecimiento y además, la producción del metabolito es bajo, en función del escaso carbono utilizado. La curva de sustrato consumido, refleja una degradación lenta e improductiva de la fuente de carbono, frente al metabolito PHB. Por todo lo mencionado, se evidencia en la cinética un comportamiento de metabolito secundario.

d.) Xilosa



Con respecto al consumo de sustrato con las fuentes de carbono glucosa y sacarosa, se aprecia que la degradación de carbohidratos está directamente relacionada con la generación de biomasa o crecimiento microbiano. En el caso de ambas fuentes carbonadas, la degradación es constante pero suavizada, como se observa en las cinética (Figura 30 a y b); pero no sucede lo mismo para la degradación de las otras dos fuentes de carbono. Debido a que los rizobios de vida libre pueden crecer con diferentes azúcares tanto mono como disacáridos, bajo condiciones de cultivo ellos expresan sistemas transportadores específicos que permiten capturar los carbohidratos del medio y acumularlos al interior del citoplasma. Sin embargo, los bacteroides generalmente son incapaces de transportar por el sistema peribacteroidal la mayoría de azúcares de estructura compleja, entre los cuales se incluyen a la galactosa y la xilosa (Glenn y Dilworth 1981).

Por lo anterior, la degradación de galactosa y xilosa es baja con relación a las dos primeras fuentes de carbono en DPAV3T4. Esta bacteria consume de manera más eficiente fuentes de carbono sencillas. En recientes estudios con *Bradyrhizobium japonicum* (Kadouri *et al.* 2005) se ha destacado que el crecimiento de rizobios en su hábitat natural se ve afectado tanto por la capacidad de metabolizar determinados sustratos, como por la capacidad de retener carbono intracelularmente. Muchos sustratos presentes en el suelo no son de fácil degradación y por ser un ambiente heterogéneo, discontinuo y estructurado con una alta diversidad de microhábitats, las condiciones nutricionales cambian rápidamente para estos microorganismos, y ese es un factor determinante en el control de crecimiento microbiano.

Sin embargo es de especial atención, la degradación de galactosa y xilosa, las cuales en el periodo de tiempo 10-20 horas sufren una degradación acelerada, incrementando la velocidad de consumo y sin embargo no incrementando proporcionalmente la velocidad de crecimiento de la bacteria en cada fermentación bajo las condiciones de cultivo evaluadas, como se observa en las cinéticas c y d de la figura 30. Esto probablemente indica la dificultad para crecer y obtener energía a partir de las fuentes de carbono galactosa y xilosa.

Una característica que se puede observar en la producción de PHB (Figura 30) es que se inicia en todas las fermentaciones, cuando la cinética de crecimiento inicia la fase estacionaria. Por lo tanto, las fermentaciones son no asociadas al crecimiento (Garden 1959; Creuger y Crueger 1989). La fase estacionaria del crecimiento es el punto en el cual se inicia la fase exponencial de la síntesis de PHB. Esto obedece a la ruta metabólica del carbono que está implicada en la primera fase de crecimiento.

Se ha descrito el impacto inmediato de las fuentes de carbono en el metabolismo microaerófilico de los rizobios (Dunn 1998). En dicho metabolismo, el ciclo de Krebs es regulado para asegurar que la energía y la generación de precursores

coincidan para las necesidades de biosíntesis y de reproducción o crecimiento en un ambiente particular. Sin embargo, las condiciones de crecimiento determinan cuál reacción anaplerótica está siendo usada para mantener el ciclo de Krebs funcionando. Entre las diversas rutas que deben usarse para producir Acetil-CoA como precursor del ciclo de Krebs, y dadas las condiciones anaerobias, la vía derivada del poli- $\beta$ -hidroxibutirato parece ser la más adecuada dado su origen metabólico fermentativo. En vista de lo observado en las cinéticas del aislamiento DPAV3T4 utilizando la fuente de carbono galactosa, es probable que múltiples mecanismos de control dirijan la baja concentración de Acetil-CoA, de electrones e hidrogeniones por glucólisis o por rutas metabólicas alternas al ciclo de Krebs y no a la acumulación de PHB, o si lo hace sea en tan baja concentración. Sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de dicha regulación en rizobios. Michael Dunn planteó una posible ruta fermentativa alterna de degradación del polímero PHB en rizobios (1996) bajo condiciones limitantes de carbono durante el crecimiento en medio mínimo para producir Acetil-CoA en la reacción catalizada por la enzima  $\beta$ -Cetotiolasa. Esa puede ser una razón por la cual la degradación del polímero es tan rápida y probablemente por lo cual el PHB se percibe en bajas concentraciones en las cinéticas obtenidas.

En la evaluación de las fuentes de carbono, el mejor rendimiento se dio bajo las fermentaciones que contenían glucosa como fuente de carbono (0.13). Se encontraron diferencias significativas en la síntesis de PHB en función de la biomasa con los diferentes tratamientos empleados; por lo cual, las fuentes de carbono influyen directamente en la síntesis de PHB en el aislamiento DPAV3T4. Pese a que la fermentación con una mayor producción de PHB se dio en el medio que contiene glucosa (0.13 g.L<sup>-1</sup>), las producciones obtenidas de polímero en esta investigación revelan un rendimiento aparentemente bajo con respecto a las cepas comerciales de *Cupriavidus necator* (también denominada *Ralstonia eutropha*; Verlinde *et al.* 2007), *Bradyrhizobium japonicum* USD110 (Mercan *et al.* 2002) y *Escherichia coli* recombinante (Nikel *et al.* 2006). Pero el valor cuatro veces inferior al obtenido por dichas cepas obedece a que las cepas comerciales son por lo general recombinantes y mutantes y no silvestres; son cepas manipuladas para la producción específica de polihidroxialcanoatos; además, la mayoría de reportes presentados para las cepas comerciales se publican después de optimizar los diferentes componentes nutricionales y físicos implicadas en mejores rendimientos de producción de PHB (Trotsenko 2000).

Dado que el aislamiento DPAV3T4 presentó biosíntesis del polímero no asociada al crecimiento, es factible en el futuro, diseñar un medio de cultivo que favorezca el rendimiento del producto, mediante fermentaciones Batch continuas. Por lo anterior, la optimización de un medio de cultivo será el próximo paso para la producción de plástico biodegradable a partir de éste aislamiento.

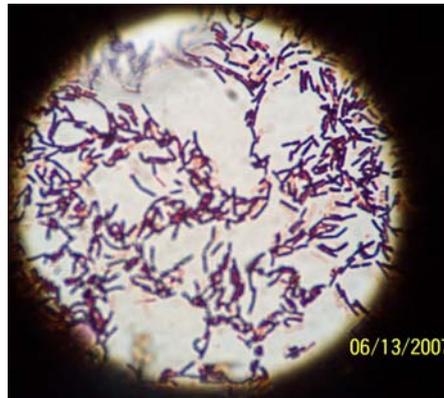
#### 4.5 CARACTERIZACIÓN DEL AISLAMIENTO DPAV3T4

El aislamiento bacteriano DPAV3T4 en medio de cultivo sólido YMA forma colonias de color rosado, con elevación convexa, borde liso y uniforme, y de textura mucosa (Figura 31), se observaron bacilos cortos de bordes romos con respuesta negativa a la tinción Gram, estos bacilos se aprecian en forma aislada y agrupados en empalizada. (Figura 32),

Figura 31. Crecimiento macroscópico del aislamiento DPAV3T4 en agar YMA con indicador Rojo Congo.



Figura 32. Tinción del aislamiento DPAV3T4 con la coloración de Gram, en donde se aprecia la morfología bacilar gram negativa.



Con la tinción negativa de tinta china se observa la presencia de capsula, y con la tinción sudan negro, se observan en su citoplasma la formación de gránulos oscuros. (Figura 33 y 34). Es de señalar que tanto las características macroscópicas y microscópicas de aislamiento en estudio concuerdan con las descripciones realizadas por Somasegaran y Hoben (1985) para los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Figura 33. Tinción de cápsula del aislamiento DPAV3T4 mediante la prueba negativa de tinta china, donde se aprecia un color azul, que corresponde al medio líquido; el color rojo corresponde a la tinción de la estructura interna de las bacterias; y los espacios transparentes, que no se colorearon, corresponden a las cápsulas bacterianas.

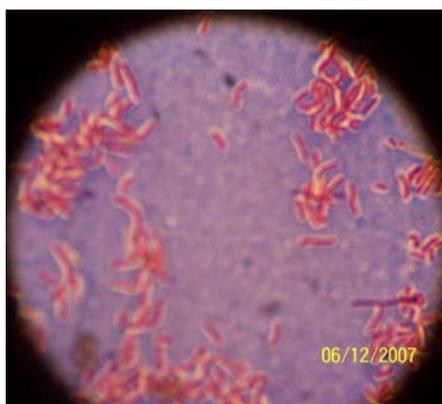
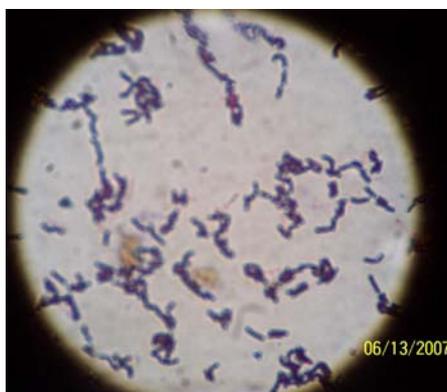


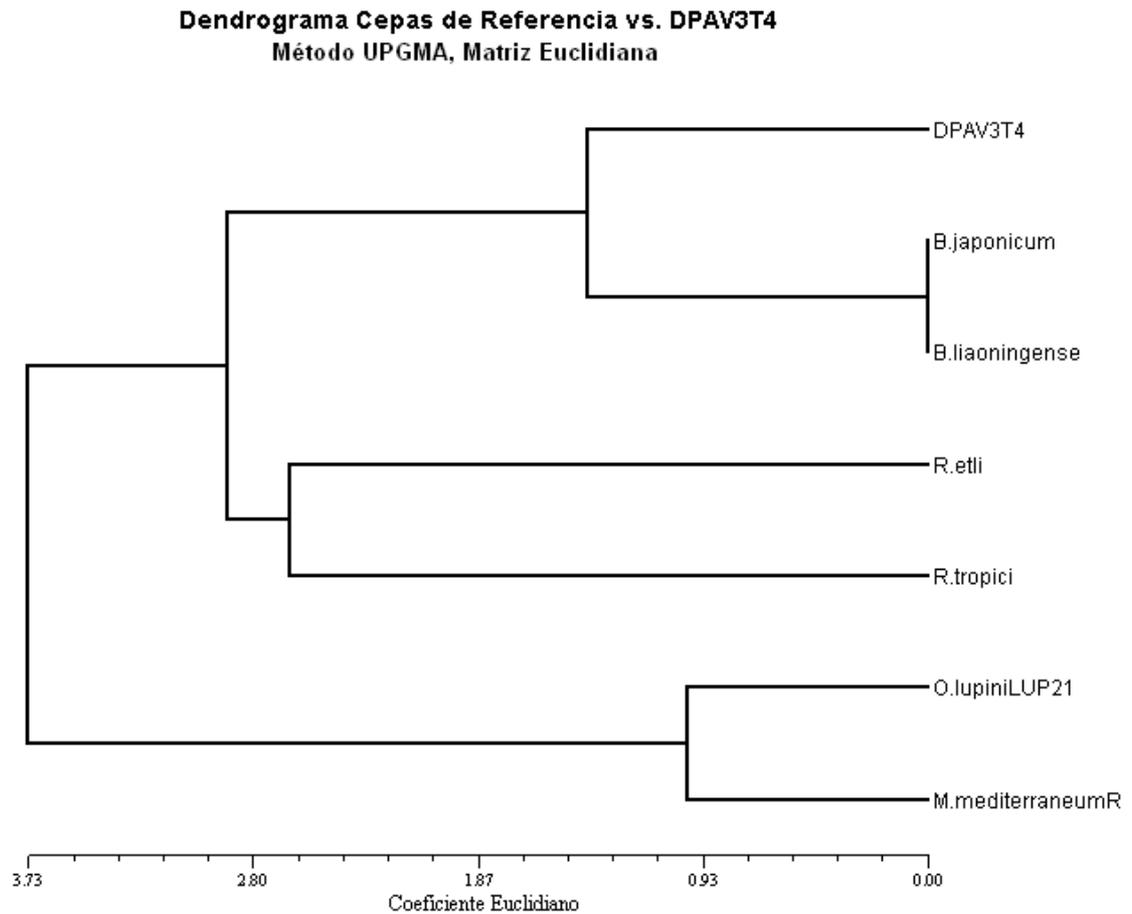
Figura 34. Tinción del aislamiento DPAV3T4 mediante la prueba de sudán negro B por microscopía fotónica. Las bacterias se aprecian teñidas de color oscuro, indicando la presencia de gránulos lipídicos.



Además, los perfiles bioquímicos y de antibióticos se aprecian en la tabla 7, para este caso, es de resaltar que el aislamiento DPAV3T4 tiene patrón de respuesta bioquímica similar a la cepas *Bradyrhizobium* (Dunn *et al.* 2004). Con base en los estudios de Trujillo, M (2005) utilizando pruebas bioquímicas, y con las pruebas de antibiograma aplicadas por Alexandre *et al.* (2006) se realizó un dendrograma de similaridad para determinar el grado de acercamiento entre la cepa comercial *Bradyrhizobium japonicum* DSMZ144 (Trujillo 2005) con la cepa evaluada en este trabajo DPAV3T4 (Figura 35). Se utilizó como Outgroup dos cepas de referencia utilizadas por Trujillo, pertenecientes a diferentes géneros reportados para el

neotrópico: *Ochrobactrum lupini* LUP21<sup>T</sup> y *Mesorhizobium mediterraneum* Rch-984.

Figura 35. Dendrograma de similitud con perfil de pruebas bioquímicas y antibióticos, mediante el método UPGMA y una matriz euclidiana, para cepas comerciales y su relación con el aislamiento DPAV3T4.



En el dendrograma se puede observar la cercanía del aislamiento DPAV3T4 con cepas del género *Bradyrhizobium*. A pesar de que siempre se supuso que *Phaseolus vulgaris* es colonizada por bacterias del género *Rhizobium* (Amarger *et al.* 1997) recientes estudios confirman que *Bradyrhizobium* también puede establecer asociación simbiótica con *Phaseolus vulgaris* L. Anderson *et al.* (2002) reportó que bacterias del género *Bradyrhizobium* pueden colonizar plantas silvestres de la especie *Phaseolus vulgaris* L. y concluyeron que el género *Bradyrhizobium* confiere mayores rendimientos de nitrógeno que el género *Rhizobium*. Por otro lado, Grange *et al.* (2007) reportó que Colombia es un reciente centro de diversificación genética de la especie *Phaseolus vulgaris* L.,

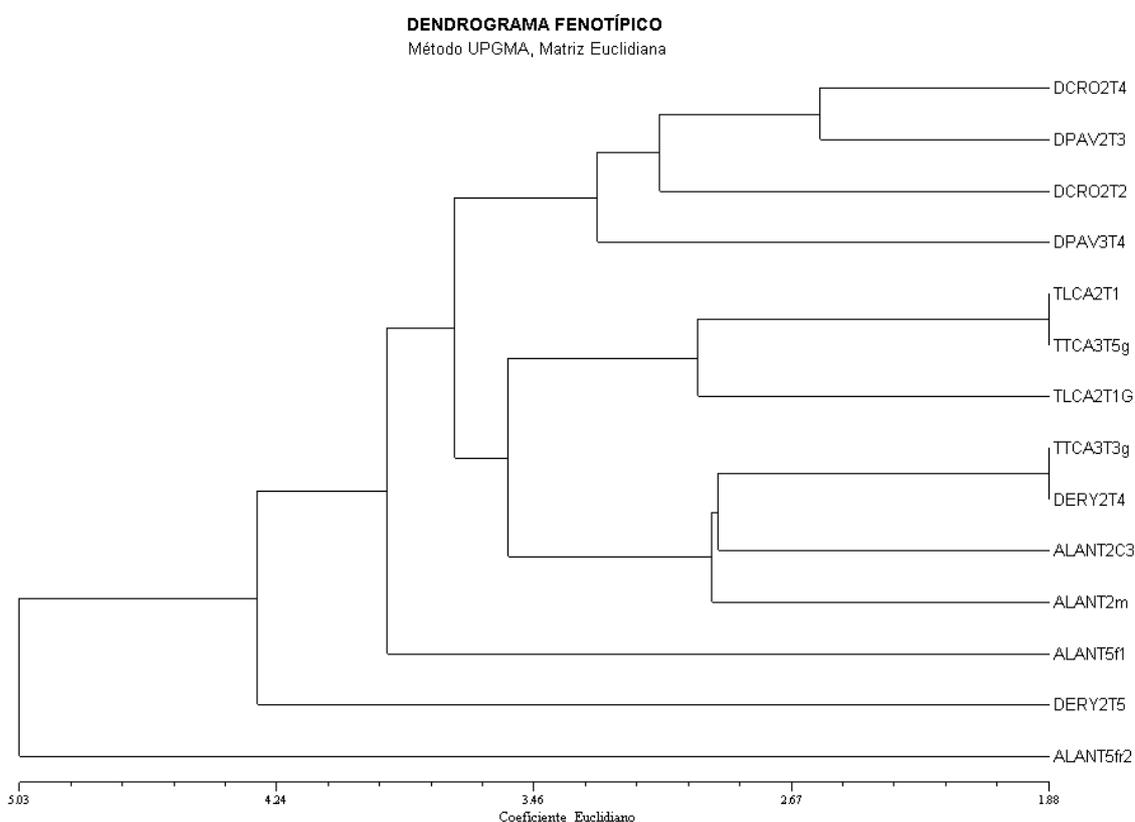
debido a que algunos reportes (Vinuesa 2005) indican que las poblaciones rizobiáceas colombianas están filogenéticamente relacionadas con poblaciones rizobiáceas de Islas Canarias, es probable que una gran diversidad de géneros simbioses puedan infectar y nodular especies silvestres de frijol en Nariño.

Con el fin de comparar el grado de asociación entre los aislamientos de los bosques altoandinos se realizó un dendrograma de similitud fenotípico (Figura 36); para lo cual se utilizó pruebas bioquímicas y de antibióticos recomendadas por Trujillo (2005). Los datos de la prueba se presentan en la tabla 10. Cabe señalar que las pruebas bioquímicas y de antibióticos tienen gran importancia en la caracterización de rizobios, y es un criterio válido en la taxonomía polifásica actual (Dunn *et al* 2004), por lo cual se usa como herramienta de identificación de la familia *Rhizobiaceae*.

Tabla 10. Matriz básica del perfil de resistencia de antibióticos y consumo de azúcares de diferentes aislamientos bacterianos evaluados. Convenciones: Ak=Amikacina; AMP=Ampicilina; B=Bacitracina; CAZ=Ceftazidima; FD=Acido Fuscídico; MY= Lincomicina; NV=Novobiocina; SXT=Trimetroprim Sulfametoxazol; VA=Vancomicina; 0 = Sensible; 1 = Resistente; 1 = Consume azúcar; 0 = No consume azúcar.

PRUEBA	DCRQ2T4	DPAV2T3	DCRQ2T2	DERY2T5	DPAV3T4	TLCA2T1	TLCA2T1c	TICA3T3c	TICA3T5c	ALANT5r2	ALANT5r1	ALANT2C3	ALANT2m	DERY2T4
AK	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
AMP	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
CAZ	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
FD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MY	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
NV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SXT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RHAMNOSA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
D-MANNOSA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
MALTOSA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
CITRATO	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
UREA	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
BILISECULINA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
REDUCCIÓNENCB	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1

Figura 36. Dendrograma basado en perfil fenotípico de antibióticos y pruebas bioquímicas, el cual muestra la relación de rizobios aislados de diferentes especies vegetales de la subfamilia *Faboideae* en bosques altoandinos del Departamento de Nariño. Método UPGMA y coeficiente Euclidiano. Convenciones: DCRO = Aislamiento bacteriano de *Crotalaria sagittalis* L. en Daza; DPAV = Aislamiento bacteriano de *Phaseolus vulgaris* en Buesaco; TLCA = Aislamiento bacteriano de *Lupinus causensis* L en Laguna de Telpis; TTCA = Aislamiento bacteriano de *Trifolium campestre* Schreb. en Laguna Negra. DERY = Aislamiento bacteriano de *Desmodium uncinatum* (Jacq) D.C. en Buesaco; ALAN = Aislamiento bacteriano de *Lupinus pubescens* Benth en Laguna Azufral.



El dendrograma refleja 5 grupos diferenciados con respecto al comportamiento frente a las pruebas. El aislamiento más distante de los otros es ALANT5fr2 y corresponde al punto de muestreo 2 –bosque Laguna Negra- y al hospedero *Lupinus angustifolius* L. Este distanciamiento obedece a que en ALANT5fr2 el perfil de respuestas fenotípicas frente a las pruebas utilizadas es diferente a las respuestas fenotípicas del resto de la población. Cabe señalar que el aislamiento ALANT5fr2 es resistente a Vancomicina y los genes de resistencia dispuestos en este microorganismo le confieren una ventaja selectiva para nodular a su hospedero vegetal, eliminando competencia por la planta con otras comunidades

microbianas. Además éste microorganismo no crece en medios de Citrato y de Bilis esculina, dado que la planta de donde se lo aisló presentó frutescencia, es probable que los bacteroides tuvieran un alto grado de adaptación tanto a las fuentes de carbono proporcionadas por la planta, como por los metabolitos secundarios y alcaloides exudados por la planta para el control de otros microorganismos.

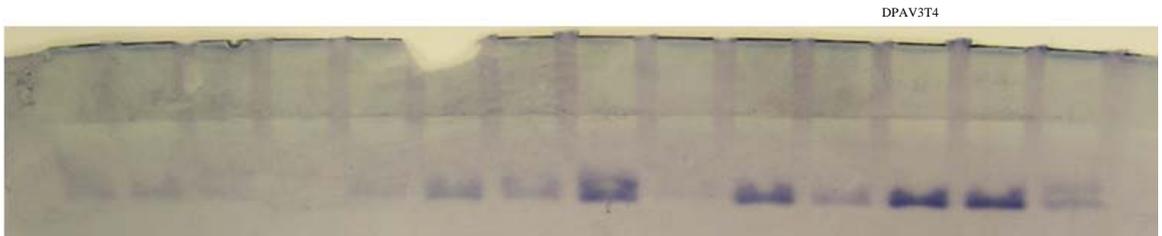
En el caso de DPAV3T4 que proviene de *Phaseolus vulgaris* está estrechamente relacionado por similitud con los aislamientos DCRO2T4 y DCRO2T2 extraídos de *Crotalaria sagittalis* L. Considerando que los genes de resistencia a antibióticos son de fácil transferencia dentro de la misma población por estar localizados en plásmidos (Alexandre *et al.* 2006), debería esperarse que aislamientos del mismo bosque muestreado se agrupen en un clúster bajo el perfil de resistencia intrínseca a antibióticos. Sin embargo, en el presente estudio se muestra que los clústeres de los aislamientos rizobianos basados en el perfil de antibióticos no reflejan su origen geográfico. Esto se debe al dinamismo del comportamiento asociado a genes de utilidad de supervivencia en diferentes ambientes (Silva y Vinuesa 2007). Además es corroborado por otros estudios que permiten explicar la cercanía filogenética entre poblaciones rizobianas de origen Colombiano con poblaciones de latitudes tan lejanas como las Islas Canarias (Vinuesa 2005).

Zerhari (2000) y Eardly (2006), estudiaron rizobios nodulantes de especies vegetales diferentes a través de su perfil isoenzimático. Este dinamismo de intercambio génico les permite adaptarse a condiciones ambientales estresantes como por ejemplo la presencia de nuevas leguminosas en un sitio determinado. Los cambios evolutivos de los genes codificantes para enzimas de importancia metabólica pueden vislumbrarse a través de la comparación isoenzimática que refleja la historia evolutiva de poblaciones rizobianas no relacionadas geográficamente. Conclusiones similares se han dado por otros autores

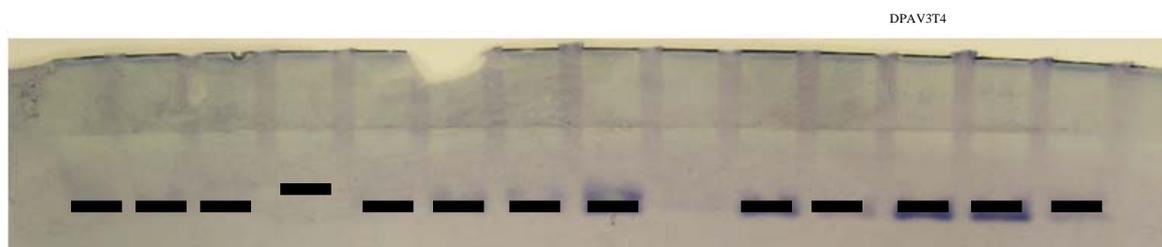
Con base en lo anterior, se realizó un dendrograma mediante perfil isoenzimático (Figura 38) para apreciar la similitud de las poblaciones estudiadas con base en las moviidades enzimáticas.

Figura 37. a. Perfil de movilidad electroforética de las isoenzimas Alanina Deshidrogenasa (ALD), b. Fosfatasa Alcalina (FAK) y c. Peroxidasa (POX).

a. Alanina Deshidrogenasa ALD



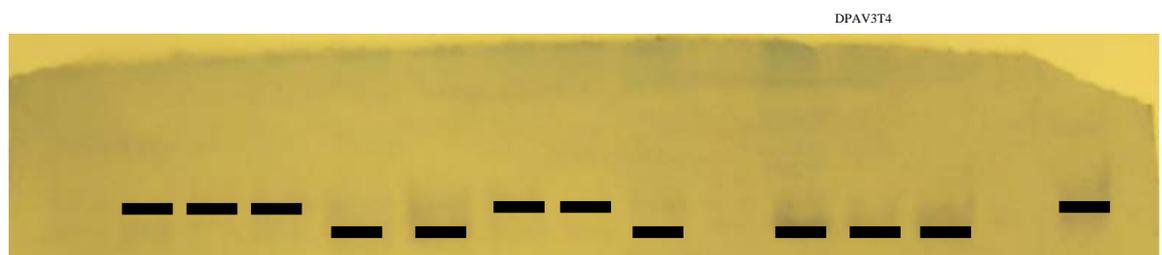
Ideograma ALD



b. Fosfatasa Alcalina FAK



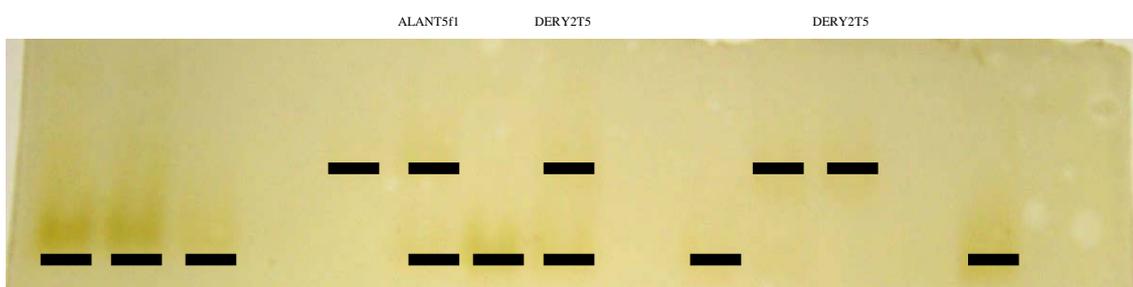
Ideograma FAK



c. Peroxidasa POX

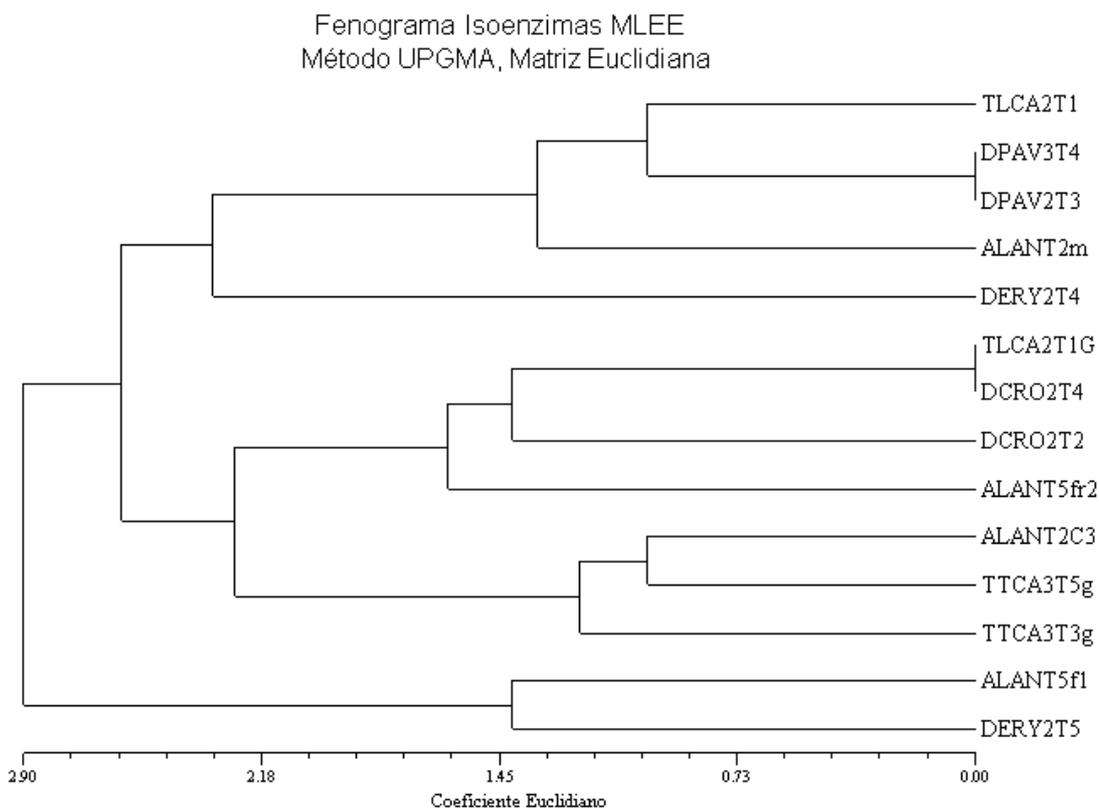


Ideograma POX



El dendrograma por MLEE (Figura 38) mediante perfil de electroforesis de las isoenzimas: alanina deshidrogenasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa (Figura 37a-c), muestra la relación entre el aislamiento DPAV3T4 con los aislamientos DPAV2T3 y TLCA2T1. Esto significa que las isoenzimas estudiadas, presentes en DPAV3T4, tienen similar estructura y peso que las encontradas en los aislamientos DPAV2T3 y TLCA2T1, a pesar de no corresponder a la misma zona geográfica. Resultados similares se encuentran en la literatura (Baquero y Blázquez 1997) con cepas de *Mesorhizobium loti* de diferentes zonas geográficas y con *Rhizobium* spp. (Belalcázar y Tupaz 2006)

Figura 38. Dendrograma de similaridad obtenido a partir de la matriz de electroforesis de isoenzimas multiloci (MLEE). Método UPGMA y coeficiente Euclidiano. Convenciones: DCRO = Aislamiento bacteriano de *Crotalaria sagittalis* L. en Daza; DPAV = Aislamiento bacteriano de *Phaseolus vulgaris* en Buesaco; TLCA = Aislamiento bacteriano de *Lupinus causensis* L en Laguna de Telpis; TTCA = Aislamiento bacteriano de *Trifolium campestre* Schreb. en Laguna Negra. DERY = Aislamiento bacteriano de *Desmodium uncinatum* (Jacq) D.C. en Buesaco; ALAN = Aislamiento bacteriano de *Lupinus pubescens* Benth en Laguna Azufral.



Además, en el perfil de isoenzimas, se puede apreciar el agrupamiento en el clúster más lejano, de los aislamientos ALANT5f1 y DERY2T5 (Figura 38) obtenidos a partir de *Lupinus pubescens* Benth. y *Desmodium uncinatum* (Jacq) D.C. respectivamente. Estos dos aislamientos presentaron un perfil peroxidasa diferente al resto de la población evaluada, con dos bandas en el mismo pozo; es decir dos isoenzimas peroxidasa con movilidades diferentes en el mismo locus. Se ha reportado para *Bradyrhizobium* sp., la existencia de cinco enzimas peroxidasa (Passardi, *et al.* 2007); de las cuales dos son monoméricas en el mismo organismo: Haloperoxidasa y Alquilhidroperoxidasa D (Passardi *et al.* 2007) Esta observación es muy importante porque corrobora la hipótesis planteada sobre

genes implicados en el metabolismo bacteriano que pueden estar codificados tanto en el cromosoma, como en plásmidos (Martínez-Romero 2004).

En el electrograma de la enzima peroxidasa, los aislados ALANT5f1 y DERY2T5 obtenidos en esta investigación, presentaron 2 bandas en el mismo locus, las cuales representan dos diferentes productos proteicos codificados por dos alelos diferentes (Hoelzel 1998). Por lo tanto, si los aislamientos ALANT5f1 y DERY2T5 poseen la enzima Haloperoxidasa, probablemente el gen que codifica para dicha enzima se encuentra localizado en el cromosoma bacteriano (Giraud 2007) y si poseen la enzima Alquilhidropoxidasa D, es probable el gen que codifica para ésta enzima se encuentra en un plásmido (Copeland 2008). O es probable que la posición del gen en el cromosoma o se encuentre en regiones diferentes para cada producto proteico debido a eventos estocásticos por acción de trasposones que afectaron la secuencia aminoacídica para cada isoenzima (Nelson y Cox 2004). Para identificar el tipo de enzima asociada y su ubicación en la entidad genética se requiere realizar estudios de curación de plásmidos y secuenciación del cromosoma.

La peroxidasa es una enzima que elimina y controla elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) formadas por elevadas concentraciones de oxígeno (González *et al.* 2002) y se originó como una respuesta adaptativa al ambiente, debido al cambio de atmósfera reductora a una atmósfera oxidante en el Eón proterozoico, hace 2200 millones de años (Sprenst 2007). Por tanto, la reacción que cataliza la enzima peroxidasa es uno de los mecanismos adaptativos más influyentes en las formas tóxicas intracelulares. Por ello hay diferentes isoenzimas peroxidasa en los aislamientos ALANT5f1 y DERY2T5. Aquellos microorganismos que tengan varias estrategias adaptativas, mayor probabilidad de selección tendrán frente al cambio ambiental. Esa es la principal razón por la cual se reporta una alta tasa de transferencia horizontal de genes y se describe como uno de los principales mecanismos de diversidad génica en rizobios (McInnes *et al.* 2004; Silva y Vinuesa 2007).

Por todo lo anterior, los resultados obtenidos por similitud en el patrón fenotípico e isoenzimático indican los siguientes razonamientos. Primero: una relación entre los aislamientos DPAV3T4 y DCRO2T4 en el dendrograma fenotípico (coeficiente de similitud euclidiana: 2.5); cabe señalar que DCRO2T4 fue aislado del hospedero *Crotalaria sagittalis* L. y según Vinuesa y colaboradores (2004) *Crotalaria sagittalis* L. es hospedero para *Bradyrhizobium* sp. Segundo: *Bradyrhizobium* sp. se ha aislado de *Phaseolus vulgaris* L. (Trujillo *et al.* 2005). Tercero: el género *Bradyrhizobium* se caracteriza por un crecimiento lento (Willems 2006). Y cuarto: las características de crecimiento macroscópico, así como el patrón de pruebas bioquímicas y de antibióticos del aislamiento DPAV3T4 corresponden a las descritas para el género *Bradyrhizobium* y a menudo se recurre a los test fenotípicos para su identificación (LLoret y Martínez-Romero 2005). Por otro lado, el género *Rhizobium* es de crecimiento rápido, la colonias

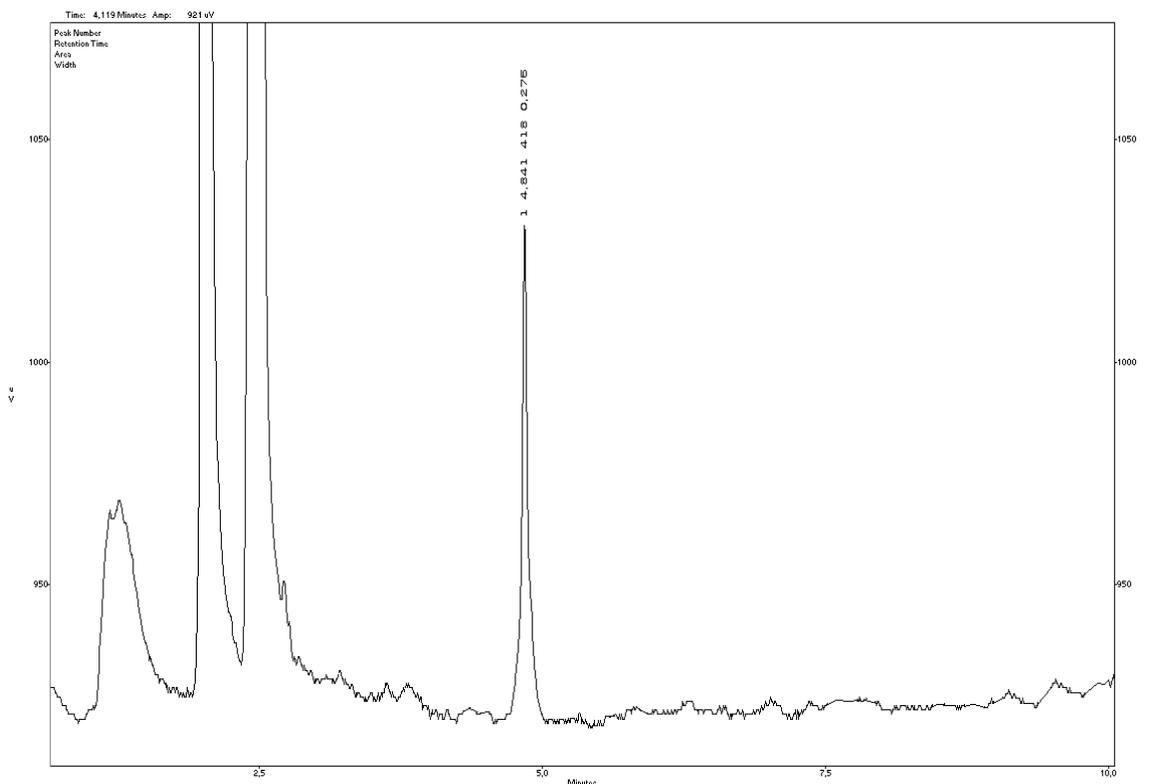
que crecen en placa son de color blanco y no rosado, y poseen peroxidasas diméricas o tetraméricas como Catalasa-Peroxidasa (Passardi 2007). Willems (2006), Dunn y Svetlana (2008; comunicación directa), afirman que con los anteriores test fenotípicos realizados se puede establecer que el aislamiento DPAV3T4 pertenece al género *Bradyrhizobium* y probablemente se pueda reportar como ***Bradyrhizobium* sp.** Aunque lo recomendable para establecer la especie exacta a la que pertenece DPAV3T4 sería aplicar la taxonomía polifásica que involucra marcadores moleculares y fenotípicos.

Uno de los aspectos a destacar en esta investigación, es el hecho de aislar un microorganismo como DPAV3T4 fijador de nitrógeno de la planta fabácea, el cual tiene características fenotípicas diferentes a las que se han reportado por los endosimbiontes que nodulan a *Phaseolus vulgaris* L. Por lo cual cabe la posibilidad de realizar otro tipo de investigaciones encaminadas a inoculación cruzada y uso de otros microorganismos igualmente eficientes en la fijación de nitrógeno simbiótica con respecto a los reportados del género *Rhizobium*. También se pueden sugerir estudios de coevolución.

#### 4.6 CARACTERIZACIÓN DE POLIHIDROXIBUTIRATO EN EL AISLAMIENTO DPAV3T4.

El patrón de copolímero presentó dos picos bien definidos a una ampliación de 4000; el análisis por cromatografía de gases, presentó tiempos de retención para todas las patrones con un intervalo de 4.80 – 4.85 minutos para las fracciones metiladas de butirato y de 7.95 – 7.99 minutos para las fracciones metiladas de valerato (Anexo F). En los cromatogramas de las muestras de polímero producido por DPAV3T4 en la fermentación con glucosa como fuente de carbono solo se observa un pico representativo de la fracción butirato con un tiempo de retención de 4.84 minutos (Figura 39), por lo cual es posible afirmar que *Bradyrhizobium* sp. DPAV3T4 sintetiza el homopolímero poli- $\beta$ -hidroxibutirato.

Figura 39. Cromatograma del aislamiento DPAV3T4 correspondiente al homopolímero Poli- $\beta$ -hidroxibutirato (P- $\beta$ -HB).



## APORTES TEÓRICOS

En la región andina del departamento de Nariño, se reportan por primera vez aislamientos bacterianos fijadores de nitrógeno productores de PHAs.

En la región andina del departamento de Nariño, la especie silvestre de *Phaseolus vulgaris* L. colectada en diferentes bosques altoandinos posee endosimbiontes con alta capacidad de acumular polihidroxibutirato.

A partir de la especie silvestre de *Phaseolus vulgaris* L. se aisló un endosimbionte con características fenotípicas del género *Bradyrhizobium*.

Todas las fermentaciones realizadas para evaluar el efecto de las fuentes de carbono, mostraron síntesis de PHB no asociada al crecimiento.

Los aislamientos bacterianos ALANT5f1 Y DERY2T5 mostraron dos movilidades electroforéticas diferentes a las reportadas por la literatura para el caso de peroxidases, indicando la posibilidad de que cada uno de los aislamientos presente dos tipos de isoenzimas: Haloperoxidasas y alquilhidroperoxidases D.

## APORTES PRÁCTICOS

Se formó una colección de 115 aislamientos bacterianos diazótrofos aisladas de 101 individuos vegetales correspondientes a 23 especies diferentes de leguminosas hospederas, de las cuales 14 fueron reconocidas dentro de la familia *Rhizobiaceae*.

El aislamiento que mayor producción de PHB presentó fue DPAV3T4 obtenido a partir de *Phaseolus vulgaris*, con  $130 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Las fuentes de carbono influyen en la síntesis de PHAs dado que en las fermentaciones, se presentaron diferencias significativas en los rendimientos de producción de PHA con variaciones de  $Y_{p/x}$  de 0.13 a 0.04.

## 5. CONCLUSIONES

- 1 En 7 bosques altoandinos se obtuvo un total de 23 especies vegetales pertenecientes a la subfamilia *Faboideae*. La zona de muestreo 1, correspondiente a los Bosques Alto de Daza y Buesaco, presentó la mayor diversidad con 13 especies vegetales, lo cual equivale al 65% de las leguminosas colectadas.
- 2 De 115 aislamientos bacterianos obtenidos en esta investigación, 15 presentaron características fenotípicas de la familia *Rhizobiaceae* y también fueron productores de PHAs.
- 3 De los 15 aislamientos bacterianos productores de PHA, DPAV3T4 fue el mayor productor con 110 mg por litro con manitol y alcanzó una producción de 130mg con glucosa como fuente de carbono.
- 4 En el aislamiento DPAV3T4, las fuentes de carbono utilizadas influyen en el nivel de síntesis de polihidroxitirato.
- 5 En las fermentaciones realizadas con el aislamiento DPAV3T4 la síntesis de PHB no se encuentra asociada al crecimiento bacteriano.
- 6 La caracterización del aislamiento DPAV3T4 permite reportarlo como *Bradyrhizobium* sp.
- 7 En los dendrogramas obtenidos tanto en el perfil fenotípico como en el isoenzimático se observó que no existe una relación entre el origen geográfico de cada aislamiento con la respuesta frente a las condiciones propuestas.
- 8 El polihidroxicanoato sintetizado por el *Bradyrhizobium* sp. DPAV3T4, corresponde al homopolímero de polihidroxitirato.

## 6. RECOMENDACIONES

- 1 Dirigir estudios al muestreo de otros bosques donde se encuentre reportes de leguminosas de la subfamilia *Faboideae*, que sean silvestres para aislar los bacteroides y determinar si son productores de polihidroxicanoatos.
- 2 Realizar una investigación dirigida a optimizar un medio de cultivo a partir de sustratos baratos y biodegradables, como quinua, sueros de leche, harinas de sangre, harina de papa u otras fuentes de carbono y nitrógeno asequibles para mejorar las condiciones de fermentación y obtener rendimientos superiores a 130 mg por litro de PHB, reportados en esta investigación. Así como aplicar un sistema de fermentación adecuado a la fisiología bacteriana del aislamiento DPAV3T4.
- 3 Determinar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno a partir de las cepas preservadas y depositadas en el banco cepario del laboratorio de Biotecnología, con el fin de realizar pruebas de inoculación cruzada y concluir si son diazótrofes útiles como biofertilizantes de cultivos de leguminosas comerciales, como el frijol (*Phaseolus vulgaris*), la lenteja (*Lens sp.*) la habichuela (*Vicia faba*) entre otros. Así como determinar la capacidad de síntesis de metabolitos bacterianos de importancia agrícola como homoserinas, ácido indolacético rizobiotoxinas, alcaloides entre otros.
- 4 Realizar estudios para la identificación polifásica de *Bradyrhizobium sp.* DPAV3T4.
- 5 Identificar mediante CG-SM el contenido de aceites y por HPLC el contenido proteico de interés comercial de las leguminosas silvestres muestreadas, con el fin de recomendar especies aprovechables en cultivos de gran extensión que generen concentraciones adecuadas de nitrógeno reducido mediante la fijación biológica de nitrógeno.

## BIBLIOGRAFÍA

ACKERMANN, J.; BABEL, W. Approaches to Increase the Economy of the PHB production. Elsevier Science Limited. Leipzig, Germany. 1998. pp. 183-186 Vol. 59.

ALEXANDRE, A. *et al.* Natural Populations of Chickpea Rhizobia Evaluated by Antibiotic Resistance Profiles and Molecular Methods. *Microbial Ecology*. 2006. pp. 128-136. Vol. 51.

ANDERSON, N.; ASCHER, P.; HAGHIGHI, K. Root peroxidases and *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* nodulation affinities of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius*. A. Gray congruity backcross. 2002. Kluwer Academic Publishers. pp. 379-390 Vol. 126.

ATLAS, R. *et al.* *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Pearson Educación. 4ª Edición. Madrid Spain, 2002, pp. 97 ISBN 84-7829-039-7.

AZCÓN-BIETO, J.; TALÓN, M. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Edicions Universitat de Barcelona. McGraw-Hill Interamericana. 2000. pp. 522.

BAGINSKY, C. Diversity and Evolution of Hydrogenase Systems in Rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. Madrid Spain, 2002, pp 4915-4924 Vol. 68. No. 10.

BAQUERO, F. BLAZQUEZ, J. *Evolution of Antibiotic Resistance*. Springer Verlag. 1997. pp. 485-491 vol. 14.

BARRERA, L. *et al.* Biodiversity of Bradyrhizobia Nodulating *Lupinus* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Maryland USA, 1997, pp 1086-1091 Vol 47 No.4.

BELALCÁZAR, E.; TUPAZ, M. Determinación de Perfiles Isoenzimáticos en *Rhizobium* spp. Aislados de Suelos del Departamento de Nariño. 2006. pp. 1-85.

BERNAL, H. Taxonomía numérica de un género de Angiospermas: Delimitación de especies en *Crotalaria* (*Fabaceae* - *Faboideae*). P 492.

BRAUNEGG, G. *et al.* A rapid chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *ASM Journal*. USA. 1978. pp. 26-32 Vol. 4, No. 150.

- BRAVO, D. Identificación y Caracterización de especies de la familia *Fabaceae* que presenten asociación simbiótica con bacterias de *Rhizobium* productoras de Polihidroxialcanoatos (PHA) en la Laguna de Telpis. 2004. Proyecto Estudiantil participante de la VII Convocatoria Alberto Quijano Guerrero, financiado en su totalidad por el Sistema de Investigaciones de la Universidad de Nariño. pp. 1-48.
- BROWN, R. Leguminosae Order *Papilionaceae*. Nicol London, England. 1814, Vol. 1.
- BURBANO, O. Características bioquímicas y condiciones de fertilidad de los suelos volcánicos. Revista de Investigaciones (Colombia). 1989. pp.98 – 115. Vol. 3.
- CAMPBELL, R. Ecología Microbiana. McGraw-Hill. London England, 1989, p 72 Vol 2.
- CEVALLOS, M. *et al.* Genetic and Physiological Characterization of a *Rhizobium etli* Mutant Strain Unable To Synthesize Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate. American Society for Microbiology Journal. Mexico City México, 1996, pp 1646-1654 Vol 178 No. 6.
- CHOHAN, S. *et al.* Acetoacetyl Coenzyme A Reductase and Polyhydroxybutyrate Synthesis in *Rhizobium (Cicer)* sp. Strain CC 1192. American Society for Microbiology Journal. Sydney Australia, 1998, pp 2859-2863 Vol 64 No. 8.
- CLEMENTS, J. *et al.* Characterization Of A Non-Abscission Mutant In *Lupinus angustifolius*. I. Genetic And Structural Aspects. American Journal of Botany. Lyon France, 2001, pp 31–42 Vol 88 No.1.
- COPELAND, A. *et al.* US DOE Joint Genome Institute (JGI-PGF) Sequencing of the draft genome and assembly of Bradyrhizobium sp BTAi1. Unpublished. 2008
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Editorial Acribia. Oldenbourg, München Germany. 1989 2ª Edición.
- DENISON, R. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by Rhizobia. 2000. American Natural Journal. Vol. 156 pp. 567-576.
- DÍAZ, S. Las Leguminosas. Editora Dosmil. Bogotá Colombia, 1999, pp 1-295 Vol 2.
- DOETSCH, R. N. Determinative methods of light microscopy, App. Environ. Microbiol. 1981. pp. 21-33.
- DOYLE, J.; LICKOW, M. The Rest of Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. New York, USA. 2003. pp. 900-910. Vol. 131.

DOWLING, F.; BROUGHTON, C. Morphological change in rhizobial cultures. 1986 ASM Journal. Vol 36. pp. 254-262.

DRISCOLL, B.; FINAN, T. Properties of NAD(+)- and NADP(+)- dependent malic enzymes of *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* and differential expression of their genes in nitrogen-fixing bacteroids. ASM. 1997. pp. 492-498.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Minnesota University Press. Minnesota USA, 1963, pp 26-34 Vol 34 No. 5.

DUNN M. Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in rhizobia. Cuernavacas, México. Elsevier. FEMS Microbiology. 1998. pp. 105-123.

DUNN M. *et al.* Effect of aniA (Carbon Flux Regulator) and phaC (Poli- $\beta$ -Hydroxybutyrate-Synthase Gen) in Mutations of Pyruvate Metabolism in *Rhizobium etli*. American Society for Microbiology Journal. Cuernavaca Mexico, 2002, pp 2296-2299 Vol 184 No. 8.

DUNN, M. *et al.* Biochemical characterization of a *Rhizobium etli* and the monovalent cation-stimulated acyl-coenzyme A carboxylase with a high substrate specificity constant for propionyl-coenzyme A. Microbiology. Cuernavaca, México. 2004. pp. 399-406.

EARDLY, B. *et al.* Species Limits in *Rhizobium* Populations That Nodulate the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). Applied and Environmental Microbiology Journal. Pennsylvania USA, 1995, pp 507-512 Vol. 61, N. 2.

EMERSON, F. Basic Botany. The Blakiston Company. United Kingdom, 1996, pp 1-646 2a Edition.

ENCARNACIÓN, S. *et al.* AniA Regulates Reserve Polymer Accumulation and Global Protein Expression in *Rhizobium etli*. American Society for Microbiology Journal. Cuernavaca México, 2002, pp 2287-2295 Vol. 184 No. 8.

ENCARNACIÓN, S. Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etli*. Journal of Bacteriology. Cuernavacas Mexico, 1995, pp 3058- 3066 Vol 177 No. 11.

FENG, L. *et al.* Morphological Changes of Rhizobia in Peat Cultures. Applied and Environmental Microbiology Journal. Sydney Australia, 2002, pp. 1064-1070 Vol 68 No.3.

- FERNÁNDEZ, P.; ORTÍZ, F.; ESPAÑA, J. Caracterización de poli-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycooides*, FLB2. Revista Centro de Estudios en Salud 2005. pp. 72-76 Vol. 1 No. 6.
- FERNÁNDEZ, P.; ORTÍZ, F.; BURBANO, O.; GUERRERO, M.; ESPAÑA, J. Influencia de Fuentes de Carbono y Nitrógeno en el Crecimiento Bacteriano y Síntesis de Polihidroxialcanoato de una Cepa de *Bacillus mycooides* FLB2. Revista Centro de Estudios en Salud 2006. pp. 34-42 Vol. 1 No. 7.
- FORERO, E.; ROMERO, C. Estudio en Leguminosas Colombianas. ACCEFIN. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. No. 25, 2005, p. 413.
- FRANÇOIS, J.; GUADRY, M. Nitrogen Assimilation by Plants. Physiological, Biochemical and Molecular Aspects. Science Publishers, Inc. Plymouth, UK. 2001. 2a Edición.
- FREIBERG, F. *et al.* Molecular Basis of Symbiosis Between Rhizobium and Legumes. Nature. London England, 1997, pp 507-512 Vol 74 No. 16.
- GAGE, DANIEL. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, pp 280-300 Vol 68 No. 2
- GARDEN, E. Fermentation Process Kinetics. Journal of Biochemistry Microbiology. 1959. pps. 413-429. Vol. 1.
- GENTRY, A. The Family Guide To The Family And Genera of Woody Plant of Northwest South America (Colombia – Ecuador – Perú). The Conservation International Press. Washington, D.C. USA, 1993, pp 1-1216 Vol.2.
- GIRAUD ,E. *et al.* Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. 2007, Science Vol. 316 pp. 1307-1312.
- GLENN, .A; DILWORTH, M. The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast- and slo-growing species of Rhizobium. Archiv Microbiology. Australia. 1981. pp. 233-239. Vol. 129.
- GONZÁLEZ, V.; *et al.* An Evolutionary Genomic Perspective of the Symbiosis Bacteria-Plant. UNAM Editorial Universitaria. México. 2002. pp. 1-4. Vol1.
- GROHTE, E. *et al.* Fermentation Optimization for the Production of Poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) Microbial Thermoplastic. Elsevier. Enzyme and Microbial Technology Journal. Almeria Spain, 1999, pp 132-141. Vol 1 No. 25.

GRANGE, L. *et al.* New insight into the origins and evolution of Rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. 2007. Soil Biology & Biochemistry. Vol 39 pp. 867-876.

HADRI, A. *et al.* Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. Elsevier. 1998. pp. 223-236.

HALPERN, L. Sources And Consequences Of Seed Size Variation In *Lupinus perennis* (*Fabaceae*): Adaptive And Non-Adaptive Hypotheses. American Journal of Botany. Genove Italy, 2005, pp 205–213 Vol 92 N.2.

HESSE, G.; SARUUL, M. Absortions Methods in Chemish Laboratorium. Groiter Verlag. Berlin. 1943, pp. 234-262. Vol.1.

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

HOELZEL, A. Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. Oxford University Press. 2th Edition. 1998, pp. 1- 445.

HUSSEIN, H. Rhizobium-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation Under Several Conditions and in an Arid Climate. Microbiological And Molecular Biology Reviews. Beni-Suef Egypt, 1999, pp 968-989 Vol 63 No. 4.

HUTCHINSON, J. The genera of flowering plants. Clarendon Press, Oxford. USA. 1964. Vol 1.

JACQUEL, N. *et al.* Isolation and Purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). Biochemical Engineering Journal. 2008.pp. 15-27 Vol 39.

JORDAN, D. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing Root Nodule Bacteria From Leguminous Plants. International Systematics of Bacteriology Journal. Illinois USA, 1982, pp 136-139 Vol 32 No. 1.

JUDD, W. *et al.* Plant Systematics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts USA. 1999, pp 1-464.

KADOURI, D. *et al.* Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Rehovot, Israel. 2005. pp. 55-67. Vol. 31.

KAJITA, T.; *et al.* RbcL and legume phylogeny, with particular reference to *Phaseoleae*, *Milletieae*, and *allies*. Systematics Botany. USA. 2001. p 524 Vol. 3.

KALLIO, R. *et al.* Sudanophilic Granules And Lipid Of *Pseudomonas methanica*. American Society for Microbiology Journal. Michigan USA, 1960, pp 370-386 Vol 41 No. 6.

KANSIZ *et al.* PHAs A New Biotechnology Way. American Society for Microbiology. Chicago USA, Vol. 66. 2004, pp 3403-3418 Vol 6 No.1.

KIM, S. *et al.* Enzymes of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Metabolism in Soybean and Chickpea Bacteroids. Applied and Environmental Microbiology. Sydney Australia, 1996, pp 4186-4190 Vol 62 No. 11.

KIM, S.; COPELAND, L. Acetyl Coenzyme A Acetyltransferase of *Rhizobium* sp. (*Cicer*) Strain CC 1192. American Society for Microbiology Journal. Sydney Australia, 1997, pp 3432-3437 Vol 63 No. 9.

KINZIG, A. *et al.* Is Nitrogen Fertilizer Use Nearing a Balance-Reply. Physiological Today. Zaragoza Spain, 2004, pp 24-35 Vol 47 No. 1.

KITTELSON, P. Outcrossing Rate And Inbreeding Depression In The Perennial Yellow Bush Lupine, *Lupinus arboreus* (*Fabaceae*). American Journal of Botany. Portland USA, 2000, pp 652-660 Vol 87 No. 5.

KOLLER, M; *et al.* Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. Bioresource Technology. Elsevier. Petersgasse, Austria. 2008.

KRANZ R. *et al.* Production of Polyhydroxyalkanoates in *Rhodobacter capsulatus*: Genes, Mutants, Expression and Physiology. FEMS Microbiology Letters. Illinois USA, 1997, pp. 3003-3009 Vol 63 No.8.

LAÑEZ, E. Polihidroxicanoatos, Nuevas Tendencias. FEMS. Cartas Microbiológicas. Argentina, 1999, pp 2670-2684 Vol. 3 No. 6.

LAÑEZ, E. Polihidroxicanoatos. FEMS. Cartas Microbiológicas. Argentina, 1998, pp 1282-1286 Vol. 19 No. 8.

LAKSHMAN, K. *et al.* Simultaneous and comparative assessment of parent and mutant strain of *Rhizobium meliloti* for nutrient limitation and enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production using optimization studies. Elsevier. Process Biochemistry. India. 2004. pp. 1977-1983. Vol. 39.

LASALA, F. Producción de Polihidroxicanoatos (PHAs) Por Bacterias Diazótrofas II. Estudio de la Síntesis a Escala Zaranda con *Mesorhizobium plurifarum* (4033). Revista Biológica. La Habana Cuba, 2004, pp 1-10 Vol. 18 No. 2.

- LIANG, Y. Response Of Root Branching To Abscisic Acid Is Correlated With Nodule Formation Both In Legumes And Nonlegumes. *American Journal of Botany*. Portland USA, 2005, pp 1675–1683 Vol. 92 N. 10.
- LLORET, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Evolución y Filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. México. 2005. pp. 43-60. Vol. 47.
- LUDWIG, R. Control of Ammonium Assimilation in *Rhizobium* 32H1. *Journal of Bacteriology*. Massachusetts USA, 1978, pp 114-123 Vol 135 N. 1.
- MADIGAN, M; MARTINKO, J; PARKER, J. *Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall, Pearson Education. 10ª Edición. Illinois, USA. 2003. pp. 1-1089.
- MADISON L. *et al.* Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiological and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology. Massachusetts USA, 1999, pp 21-53 Vol 63 N.1.
- MANDÓN, K. *et al.* Poly-β-Hydroxybutyrate Turnover in *Azorhizobium caulinodans* is Required for Growth and Affects *nifA* Expression. *Journal of Bacteriology*. Barcelona Spain, 1998, pp 5070-5076 Vol 180 No.19.
- McDERMOTT, T. *et al.* Carbon Metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* Bacteroids. *FEMS Microbiol Review*. Ireland, 1998, pp 327-340 Vol. 63 N. 1.
- McINNES, A. *et al.* Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities—a review. 2004. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol 36 pp. 1295-1308.
- McKAY, I. *et al.* Carbon Catabolism in Continuous Cultures and Bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* MNF 3841. *Archiv for Microbiology* UK, 1998, pp 606-610 Vol 152 No.1.
- MERCAN, N. *et al.* Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by some rhizobia bacteria. USA. 2002. pp. 217-224. Vol. 4No.32.
- MHADHBI, H. *et al.* Interaction between *Medicago truncatula* lines and *Sinorhizobium meliloti* strains for symbiotic efficiency and nodule antioxidant activities. Hamman, Tunisia. 2005. pp. 4-11. Vol. 124.
- MOORE, T. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer Verlag. New York USA, 1998, pp 645-672 Vol. 72 No. 18.
- MOULIN, L. *et al.* Phylogenetic Analyses of Symbiotic Nodulation Genes Support Vertical and Lateral Gene co-transfer within the *Bradyrhizobia* Genus. *Molecular and Phylogenetic Evolution Journal*. Cambridge USA, 2004, pp 720-732 Vol. 30 No. 1.

NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. 2000. Oxford University Press. pp. 1-333.

NELSON, D.; COX, M. Lehninger's Principle of Biochemistry. 2004. Fourth Edition, University of Wisconsin-Madison. pp. 1-1124.

NIKEL, P. *et al.* Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli* *arcA* mutants in microaerobiosis. *Appl. Environment Microbiol.* Vol 72 pp. 2614-2620.

OKON, J.; ITZIGSOHN, R. The Development of *Azospirillum* as a Commercial Inoculant for Improving Crop Yields. *Biotechnology Advances*. Elsevier Science Inc. 1995. 415-424, vol 13 No. 3.

OSTLE, A.; HOLT, J. Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982. pp. 238-241 Vol. 44 No. 1.

PARKER, M. Case of Localized Recombination in 23S rRNA Genes from Divergent *Bradyrhizobium* Lineages Associated with Neotropical Legumes. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. California USA, 2001, pp 2076-2082 Vol. 67 No. 5.

PARKER, M. Case of Localized Recombination in 23S rRNA Genes from Divergent *Bradyrhizobium* Lineages Associated with Neotropical Legumes. New York. ASM. USA 2001. pp. 2076-2082. Vol. 67. No. 5.

PASSARDI, F. *et al.* PeroxiBase: The peroxidase database. *Phytochemistry*. 2007. pp. 1605–1611

PASSARDI, F. *et al.* Phylogenetic distribution of catalase-peroxidase: Are there patches of order in chaos?. 2007. *Gene*. Vol. 397 pp. 101-113.

PERALTA, H. Engineering of the *nifH* Promoter Region and Abolishing Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Accumulation in *Rhizobium etli* Enhance Nitrogen Fixation in Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. Cuernavaca México, 2004 pp 3272-3281 Vol. 70 N. 6.

PERRET, X. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiological and Molecular Biology Reviews*. Basel Switzerland, 2000, pp 180-201 Vol. 64 No. 1.

PETTINARI, J. *et al.* Bioplásticos: Una Alternativa Ecológica. *Revista Química Viva*. Argentina, 2004, pp 1-10 Vol. 3 año 3.

PRELL, J.; POOLE, P. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. Elsevier Reading, UK. 2006. pp. 162-168. Vol. 14 No. 4.

RECHINGER, F. Die Pflanzen und Ihr Leben. Kosmos VerlagsHandlung. Stuttgart Germany, 1991, pp 1-693 Vol. 8.

REHDER, A. Notes on some cultivated trees and shrubs. Plant physiology. USA 1945. pp. 476.

RIVAS, R. *et al.* *Bradyrhizobium betae* sp. nov. Isolates From Roots of *Beta vulgaris* Affected by Tumor-like Deformations. International Journal of Systematics Evolution Microbiology. Minnesota USA, 2004, pp 1355-1367 Vol. 65 No. 4.

ROMANOV, V. *et al.* Carbon Metabolism Enzymes of *Rhizobium tropici* Cultures and Bacteroids. Applied and Environmental Microbiology Journal. Cuernavaca Mexico, 1994, pp 2339-2342 Vol. 60 No. 7.

SCHULZE-MENZ, G. *Leguminosae*. A Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien. Germany. 1964. pp. 232. Vol. 4.

SCHUSTER, W. Geschichte und Verbreitung der Leguminosen. Germany. 2000. pp. 26-64.

SELANDER, R. K. *et al.* Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. American society for Microbiology. Pennsylvania, USA. 1986, pp. 873-884. Vol. 51, No. 5.

SENIOR, P; DAWES, E. Poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. Journal. 1971. pp. 55-66.

SILVA, C.; VINUESA, P. Ecología Evolutiva de Bacterias y el Concepto de Especie: El caso de los Rizobios. 2007. pp. 351-392. En: EGUIARTE L. *et al.* Ecología Molecular. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. pp.1-608.

SLEPECKY, R. *et al.* Assay of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric Acid. Illinois Press. Illinois USA, 1960, pp 2960–2964.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. Legume-Rhizobium Technology. Prentice Hall. USA, 1985, pp 1- 365 Vol. 3.

SPIEKERMANN, P. *et al.* A Sensitive, Viable-Colony Staining Method Using Nile Red for Direct Screening of Bacteria that Accumulate Polyhydroxyalkanoic Acids and Other Lipid Storage Compounds. Springer-Verlag. Münster Germany, 1999, pp 73-80 Vol. 171 No. 1.

- SPRENT, J. *et al.* Nitrogen Fixing Organisms – Pure and Applied Aspects. Chapman and Hall, London England, 1990, pp 1-149.
- SPRENT, J. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. 2007. *New Phytologist*. Vol. 174. pp. 11-25.
- STAEHELIN, C.; *et al.* Exo-Oligosaccharides of *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Are Required for Symbiosis with Various Legumes. *American Society for Microbiology*. 2006. pp. 6168-6178 Vol. 188, No. 17.
- STEINBÜCHEL, A. Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids. *Minireviews*. Elsevier. FEMS. Göttingen Germany, 2006, pp 219-228 Vol 128 N. 1.
- STEINBÜCHEL, A. *et al.* Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecular Bioscience*. Weinheim Germany, 2001, pp 1-24 Vol. 1 No.1.
- STEINBÜCHEL, A. *et al.* Mechanism of Lipid-Body Formation in Prokaryotes: How Bacteria Fatten Up. *Molecular Microbiology Journal*. Münster Germany, 2005, pp 750-763 Vol. 55 No. 1.
- STEINBÜCHEL, A. *et al.* Bakterianische Polyhydroxyalkanoate Säure Vielfalt. Springer Verlag. Münster Germany, 1998, pp 172-201 Vol. 1 N 20.
- STEINBÜCHEL, A. Mikrobiologische Hydroxyalkanoate Säure Vielfalt: Die Zukunft.(MiniReview) Springer Verlag. Berlin Germany, 2000, pp 456-498 Vol. 4 No. 18.
- SVETLANA, Y., KAHN, M. Dicarboxylate Transport and Characterization methods in Rhizobia. 2006. *FEMS Microbiology Letters*. pp.896-900
- TELLEZ, O. Clave Taxonómica Dicotómica subfamilia *Fabaceae*. *Flora de Nicaragua*. MOBOT Press. Missouri SA, 2006, pp 1-12.
- TRAINER, M.; CHARLES, T. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. Mini-Review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer Verlag. 2006. p. 377-386.
- TROTSENKO, Y.; BELOVA, L. Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co -3-Hydroxyvalerate) and Its Regulation in Bacteria. *Microbiology*. 2000. pp. 635 – 645 Vol. 69 No. 6.

TRUJILLO, M. *et al.* Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. Applied and Environmental Microbiology Journal. Córdoba Argentina, 2005, pp 1318-1327 Vol. 71 No. 3.

UDVARDI, M.; DAY, D. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. Ann. Rev. Plant Physiol. Australia. 1997. pp.493-523. Vol. 48.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO, Base de Datos Herbario PSO Actualizado Marzo 2006. Pasto Colombia, 2006.

VARELA. G. Aspectos Microbiológicos de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno. Puerto Montt Chile, 1978, pp 1 -78. Vol. 1.

VÁSQUEZ-ARROYO, M. A rapid method for rhizobial detection in cultures.1998. Vol. 32. pp. 285-294

VERLINDEN, R. *et al.* Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. Review Article. Wolverhampton, UK. 2007. pp. 1437-1449. Vol. 102.

VINUESA, P. *et al.* Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. Molecular Phylogenetics and Evolution. Elsevier. Margburg, Germany. 2005. pp. 29-54.

WÄLTERMANN, M, *et al.* Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure, Formation, and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots. Minireview. American Society for Microbiology Journal. Münster Germany, 2005, pp 3607-3619 Vol. 187 No. 11.

WANG, T. *et al.* *Rhizobium* y su Destacada Simbiosis con Plantas. Edición Universitaria UNAM. México, 2002, pp 1-18.

WAYNE, D. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa Wiley. 4a Edición. 2002. pp.1-755.

WILLEMS, A. The Taxonomy of Rhizobia. An Overview. Plant and Soil. Springer Verlag. Ledeganckstraat, Belgium. 2006. pp. 3-14. Vol. No. 287.

WILLIAM'S AND WILKINS. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1989. Interamericana S.A., Baltimore – E.U.

YAO, Z. *et al.* Characterization of Rhizobia that Nodulate Legume Species Within the Genus *Lespedeza* and Description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. International Journal of Systematical Bacteriology. South Korea, 2002, pp 706-711 Vol. 45 No. 1.

YÜKSEKDAG, Z. *et al.* Effect of Carbon and Nitrogen Sources and Incubation Times on Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) Synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. African Journal of Biotechnology. Denizli Turkey, 2004, pp 63-66 Vol. 3 No.1.

ZERHARI, K. *et al.* Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating different species in the arid and Saharan regions of Morocco. ASM. 2000. pp 351-369. Vol. 46.

## ANEXOS

Anexo A. Medio de cultivo para crecimiento y purificación de rizobacterias.

Agar Levadura Manitol (YMA)

Reactivo	Cantidad g/L
Manitol	10
Extracto de levadura	0,5
Peptona	0,5
Agar	15
Rojo Congo	0.3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.3
NaCl	0.2
H <sub>2</sub> O destilada	1000mL

Se calienta hasta ebullición, se reposa durante 2 minutos y posteriormente se autoclava a 120°C x 15 Lbs. de presión durante 15 minutos. Se enfría a temperatura ambiente y se sirve el medio en cajas de Petri previamente esterilizadas.

Tomado de: Oxoid Manual; UK. 1990. p. 2-150

Anexo B. Medio de cultivo para fermentaciones de rizobacterias.

Caldo Levadura Manitol:

Reactivo	Cantidad g/L
Manitol	10
Extracto de levadura	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
NaCl	0.2
H <sub>2</sub> O destilada	1000mL

Se calienta durante 2 minutos y posteriormente se autoclava a 120°C x 15 Lbs. de presión durante 15 min. Se enfría a temperatura ambiente y se inoculan los aislados.

Tomado de: Encarnación, S. Fermentative Production of PHAs in *Rhizobium etli*. ASM Journal. 1995. p. 2286

Anexo C. Medio de cultivo para crecimiento en atmósfera anaeróbica.

Agar Jensen Modificado:

Reactivo	Cantidad g/L
Manitol	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
CaHPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.2
FeCl <sub>3</sub>	0.1
H <sub>2</sub> O destilada	800 mL
Agar	15
Solución de Micronutrientes	200 mL

Se calienta hasta ebullición, se reposa durante 2 minutos y posteriormente se autoclava a 120°C x 15 Lbs. de presión durante 15 min. Se enfría a temperatura ambiente y se sirve el medio en cajas de Petri previamente esterilizadas.

Tomado de: Rao, S. Soil Microbiology. Science Publishers, Inc. USA. 1999. p. 397

Solución de Micronutrientes:

Reactivo	Cantidad g/L
MnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2.03
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.08
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.57
CoCl <sub>2</sub>	2.03
Na <sub>2</sub> VaO <sub>4</sub>	0.08
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

Tomado de: Muñoz, B., *et al.* Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. República de Colombia, Ministerio de Hacienda. 1990. p. 409

Anexo D. Electroforesis de enzimas multilocus en condiciones no desnaturalizantes.

*a. Método de obtención del extracto proteico (Selander 1986):*

Se realizan fermentaciones bacterianas en Erlenmeyers (300mL) con medio mínimo durante 24 horas a 30°C.

Se centrifugan los caldos a 33,000 x g durante 5 minutos.

Se lava el pellet bacteriano obtenido con agua destilada y nuevamente se centrifuga a 33,000 x g durante 5 minutos.

Se descarta el sobrenadante y se adiciona 1mL de Buffer de muestra y 100 µL de Lisozima al 1%.

Se realizan ciclos de agitación en vórtex y se da tiempo a la ruptura de la pared bacteriana por acción de Lisozima durante 4 horas.

Se adiciona vidrio molido estéril y se realiza maceración abrasiva mediante el uso de taladro Black and Decker M-27 con varillo de vidrio vicelada con punta fina que realiza la función de broca. Se somete cada muestra a maceración durante 30 segundos.

Se centrifugan las muestras en los tubos eppendorff a 33,000 x g durante 20 minutos.

Del sobrenadante (extracto proteico) se toman 60 µL de muestra y se mezclan con 60µL de azul de bromofenol.

*Preparación Buffer de muestra pH 6,8:*

Reactivo	Volumen
Trizma base	0.83g en 60 mL de H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> concentrado	2.82 mL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Aforar a 100 mL

Concentración final del Buffer 0,06M.

*b. Preparación Azul de Bromofenol:*

Reactivo	Volumen
Glicerol	6 mL en 1 mL de H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
Tris/HCl 0,2M pH 8.8	1 mL
Azul de Bromofenol	1 mL al 0,01%

Azul de Bromofenol al 0,01%: 0,1g de Azul de Bromofenol en 100mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

c. *Preparación Geles de Poliacrilamida al 30% de concentración con 9% de dureza (Ferreira, 1998):*

Gel separador:

Reactivo	Volumen Para 2 vidrios
Solución A	12,5 mL
Solución C	12,5 mL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	24.825 mL
TEMED	25 µL
Persulfato de Amonio	250 µL
<i>Volumen final:</i>	50 mL

Solución A = Buffer para gel separador:

Trizma Base            4,84g  
 H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>                    aforar a 100 mL  
 pH 8.8 con HCl.

Solución C = Acrilamida –Bisacrilamida al 30%:

Acrilamida            29.02 g  
 Bisacrilamida        0.8 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>                    aforar a 100 mL

Para el gel concentrador, se agregan los reactivos hasta el agua destilada y se agita con un imán de agitación o un agitador de vidrio durante 2 minutos. Posteriormente se agrega al Beaker el TEMED y luego el persulfato de amonio y se sirve entre los vidrios inmediatamente. Se demora en polimerizar bajo estas condiciones alrededor de 20 minutos.

Los vidrios se deben lavar con etanol al 70% y luego secar con toallas absorbentes. Para sellar bien los vidrios se embadurnan los separadores de vidrio con suficiente vaselina y se instalan entre los vidrios. Se presan con dos ganchos por cada lado de los vidrios y dos ganchos en la base. Una vez agregado el gel separador, se agrega una capa de agua para luego retirarla y verter en su lugar el gel concentrador, este procedimiento se realiza con el fin de acelerar la polimerización del gel separado y de esta manera mantener la margen para introducir el gen concentrador.

Gel Concentrador:

Reactivo	1 lado vidrios	Para 2 lados
Solución B	1,25 mL	2,50 mL
Solución C	0,83 mL	1,66 mL
Rivoflavina	1,78 mL	3,56 mL
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	1,12 mL	2,24 mL

TEMED	2 $\mu$ L	4 $\mu$ L
Persulfato de Amonio	20 $\mu$ L	40 $\mu$ L
Volumen final:	5 mL	10 mL

Solución B: Tris-HCl a pH 6,8

Rivoflavina: 0,006g en 100 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

La mezcla anterior de gel concentrador, se vierte inmediatamente a los vidrios y se espera alrededor de 15 minutos hasta la polimerización total.

Para agregar la muestra a los pozos se hace la relación 1:1 así: 40  $\mu$ L de muestra (extracto proteico) mezclada en 40  $\mu$ L de Azul de Bromofenol. De la mezcla se toman 40  $\mu$ L y se vierten a cada pozo (de lado y lado de la cámara).

Una vez polimerizados los geles en los vidrios se retiran los ganchos y los vidrios se ensamblan en la cámara de electroforesis vertical para proteínas y se prensa herméticamente.

En la cámara horizontal de electroforesis se agrega el buffer de corrida tanto en la base como en los geles ajustados. El buffer de corrida está compuesto por:

Tris 0,1M	12,11 g
Glicina 0,78M	57,65 g
HCl	Hasta ajustar a pH 8,3

Con la ayuda de la aguja de una jeringa de 10 mL se retiran las burbujas de aire que se depositan debajo entre los vidrios y el buffer de corrida de la base de la cámara, con el fin de que el paso de la corriente sea libre de interferencias y de esta manera se sumerja completamente el gel en el buffer. Una vez hecho esto con una micropipeta de 100  $\mu$ L se trasvasan en los pozos 40  $\mu$ L de las muestras mezcladas con azul de bromofenol. Se realiza una precorrida bajo los siguientes parámetros:

Voltaje:	200 V
Amperaje:	15 mA
Tiempo:	60 minutos

La precorrida finaliza cuando las muestras se han concentrado (indicador de azul de bromofenol) depositado en finas líneas que migraron verticalmente desde el pozo hasta donde termina la señalización con rivoflavina (indicador amarillo) e inicia el gel separador. Si no ocurre la concentración de las muestras, se realiza nuevamente la precorrida bajo los parámetros arriba descritos.

Posteriormente se realiza la corrida bajo los siguientes parámetros:

Voltaje: 200 V  
 Amperaje: 40 mA  
 Tiempo: 3 horas

NOTA: el tiempo de corrida debe siempre ajustarse al desplazamiento total de los pozos, una vez las muestras hallan atravesado todo el frente de corrida, se debe finalizar la electroforesis.

a. *Tinción del sistema Alanina Deshidrogenasa (ALD) descrita por Selander 1986:*

Reactivo	Volumen
L-Alanina	39 mg
Buffer fosfato pH 7.0	39 mL
MTT	386 µL
PMS	193 µL
NAD	773 µL

En un Beaker mezclar bien las soluciones del sistema enzimático y se realiza la tinción en bandeja de plástico Viniplas donde se deposita el gel de poliacrilamida una vez finalizada la corrida electroforética. La bandeja plástica se traslada a una incubadora a 43°C en oscuridad durante 60 minutos. Finalmente se retira la solución reveladora y se toman los registros fotográficos de las bandas electroforéticas en cámara de UV.

b. *Tinción del sistema Fosfatasa Alcalina (FAK) descrita por Rius, 2001:*

Reactivo	Volumen
Solución Buffer Tris-HCl pH 8,5 (0,4M)	100 mL
Naftil Fosfato de Sodio	0,05 g
Fast Blue RR	0,05 g

En un Beaker mezclar bien la solución buffer con el Naftil fosfato de sodio y el reactivo Fast Blue RR. Se realiza la tinción en bandeja de plástico Viniplas donde se deposita el gel de poliacrilamida una vez finalizada la corrida electroforética, se sirve la mezcla del Beaker sobre el gel. La bandeja plástica se traslada a un agitador orbital a 150 rpms durante 20 minutos en incubadora a 43°C durante 20 minutos. Finalmente se lava el gel con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se toman los registros fotográficos en cámara de UV.

c. *Tinción del sistema Peroxidasa (POX) descrita por Rius, 2001:*

Reactivo	Volumen
Solución 1: Bencidina hidroclicrica en S/n alcohólica al 50%	1 g de Bencidina hidroclicrica en 50 mL de S/n alcohólica al 50%

Solución 2: Acetato de Sodio	2,05 g en 50 mL de ácido acético pH 4.6
Solución 3: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,5 mL llevar a 50 mL con solución 2
Solución Peroxidasa	50 mL de solución 1 en 50 mL de solución 3

En un Beaker mezclar bien las soluciones 1 y 3 y realizar la tinción en bandeja de plástico Viniplas donde se deposita el gel una vez finalizada la corrida electroforética. La bandeja plástica se traslada a un agitador orbital a 150 rpms durante 20 minutos y en incubadora a 43°C durante el mismo periodo de tiempo. Finalmente se lava el gel con H<sub>2</sub>O y se toman los registros fotográficos en cámara de UV.

#### Anexo E. Especies vegetales colectadas en 7 bosques altoandinos

<b>Bosque</b>	<b>Especie Vegetal Faboideae</b>
Alto Daza	<i>Otholobium mexicanum</i> (L) Grimes
Alto Daza	<i>Trifolium repens</i> L.
Buesaco	<i>Calopogonium mucunoides</i> Desv.
Buesaco	<i>Centrosema virginianum</i> (L.) Benth
Buesaco	<i>Clitoria ternatea</i> L.
Buesaco	<i>Crotalaria incana</i> L.
Buesaco	<i>Crotalaria sagittalis</i> L.
Buesaco	<i>Desmodium intortum</i> (Mill.) Urban
Buesaco	<i>Desmodium molliculum</i> L.
Buesaco	<i>Erythrina edulis</i> Triana ex. Micheli
Buesaco	<i>Macroptilium gracile</i> (Benth) Urb.
Buesaco	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Buesaco	<i>Trifolium campestre</i> Schreb
Aledaño Laguna Negra	<i>Lupinus albus</i> L.
Aledaño Laguna Negra	<i>Trifolium campestre</i> Schreb
Aledaño Laguna Negra	<i>Trifolium repens</i> L.
Aledaño Laguna Negra	<i>Vicia angustifolia</i> (Reichard)
Aledaño Laguna Negra	<i>Lupinus caucencis</i> C.P. Smith
Asenso Laguna Telpis	<i>Lupinus pubescens</i> Benth
Balalaika	<i>Cologania broussonetii</i> (Balb) D.C.
Balalaika	<i>Otholobium munyense</i> (Macbr.) Grimes
Balalaika	<i>Vicia faba</i> L.

Anexo F. Cromatograma patrón de copolímero P $\beta$ (HB-co-HV).

El tiempo de retención para la fracción butirato en éste cromatograma del patrón de copolímero coincidieron con el tiempo de retención de la fracción butirato presentada en el Cromatograma obtenido para el aislamiento DPAV3T4.

