

**Aislamiento, Caracterización y Selección de Cepas de *Frankia* sp. Aisladas de *Alnus acuminata* Productoras de Exopolisacáridos**

**Realizado por:**

**Lina Marcela Guerrero Vásquez  
Angie Nathalia Vallejo Unigarro**

**Facultad de Ingeniería Agroindustrial  
Programa de Ingeniería Agroindustrial**

**Universidad de Nariño**

**San Juan de Pasto**

**2022**

**Aislamiento, Caracterización y Selección de Cepas de *Frankia* sp. Aisladas de *Alnus acuminata* Productoras de Exopolisacáridos**

**Asesor: Ana María Rey Obando**

**Microbióloga Industrial MSc. Ph.D.**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agroindustrial, Modalidad Trabajo de Investigación

**Facultad de Ingeniería Agroindustrial  
Programa de Ingeniería Agroindustrial**

**Universidad de Nariño**

**San Juan de Pasto**

**2022**

### **Nota de Responsabilidad**

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1° del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

---

---

---

MSc. Ph.D. Ana María Rey Obando  
Asesor

---

MSc. Ph.D. Olga Lucia Benavides Calvache  
Jurado

---

MSc. Ph.D. andrés mauricio hurtado benavides  
Jurado

Pasto, Octubre 2022.

## **Dedicatoria**

Este trabajo de investigación está dedicado principalmente a Dios, por darnos la vida y posibilidad de llevar a cabo esta labor. A nuestros padres por el apoyo brindado a lo largo de nuestra carrera profesional y por último dedicamos este trabajo de investigación a nuestros hermanos, pareja y amigos, por el gran apoyo moral y estar siempre disponibles para nosotros en esta etapa tan importante de nuestras vidas.

## **Agradecimientos**

A Dios,

Por darnos la perseverancia, fuerza y sabiduría para culminar esta etapa universitaria.

De manera especial a nuestra Asesora Dr. Ana María Rey Obando con su apoyo, disposición y grandes conocimientos compartidos a lo largo de este proceso de investigación.

Agradecemos a los integrantes del grupo de investigación GAIDA por su colaboración y disposición.

## Resumen

Se realizó una evaluación para determinar la capacidad de producción de exopolisacáridos (EPS) de *Frankia*, que produjo bajo condiciones *in vitro* en medio benzilaminopurina (BAP) a una agitación constante de 180 r.p.m a 36 °C, se obtuvieron 58 aislamientos inicialmente se preselecciono 29 donde se estudiaron finalmente a dos cepas de provenientes de los municipio de Pasto (Cnp1) y Tangua (Cnt12) del Departamento de Nariño, las cuales fueron seleccionadas para los microensayos de fuentes de carbono y nitrógeno, que evidenciaron mayor producción de EPS fueron glucosa, melaza, manitol y sacarosa. La fuente de nitrógeno que manifestó mayor crecimiento microbial fue en el medio con extracto de levadura, igual respuesta se observó en la producción de EPS. Los resultados obtenidos con los EPS previamente identificados en las pruebas de temperatura, emulsión y viscosidad, indican que los EPS obtenidos por las cepas de *Frankia* se muestran termorreversibles, pueden servir en la formación de emulsiones y que además tienen características viscosas y elásticas. En consecuencia, los EPS obtenidos en esta investigación pueden funcionar satisfactoriamente en procesos agroindustriales e industriales, siendo necesario investigaciones aún más detalladas; en relación a las propiedades funcionales se destaca el polímero Cnp1 producido por la cepa que lleva su mismo nombre, se destaca entre los estudiados en esta investigación por su viscosidad. Por lo anterior dicho, con esta cepa se realizaron las primeras aproximaciones de la formación de biopelículas empleando varias formulaciones con aditivos empleados en el desarrollo de recubrimientos y biopolímeros. En general las películas y recubrimientos comestibles obtenidos

fueron transparentes, cohesivos y homogéneos. Los biopolímeros con glicerol presentaron los mejores comportamientos.

## Abstrac

An evaluation was carried out to determine the production capacity of exopolysaccharides (EPS) of *Frankia*, which produced under in vitro conditions in benzylaminopurine (BAP) medium at a constant agitation of 180 rpm at 36 °C, 58 isolates were obtained initially where two strains from the municipalities of Pasto (Cnp1) and Tangua (Cnt12) of the Department of Nariño were finally studied, which were selected for the microassays of carbon and nitrogen sources, which showed the highest EPS production were glucose, molasses, mannitol and sucrose. The nitrogen source that showed the highest microbial growth was the medium with yeast extract in the three strains. The same response was observed in EPS production. The results obtained with the EPS previously identified in the temperature, emulsion and viscosity tests indicate that the EPS obtained by the *Frankia* strains are thermoreversible, can be used in the formation of emulsions and also have viscous and elastic characteristics. Therefore, the EPS obtained in this research can function satisfactorily in agroindustrial and industrial processes, being necessary to carry out even more detailed investigations; in relation to the functional properties, the polymer Cnp1 produced by the strain with the same name stands out among those studied in this research due to its viscosity. Therefore, with this strain the first approximations of biofilm formation were carried out using several formulations with additives used in the development of coatings and biopolymers. In general, the edible films and coatings obtained were transparent, cohesive and homogeneous. The biopolymers with glycerol showed the best performance.

## Tabla de Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>19</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>4. MARCO REFERENCIAL Y ESTADO DEL ARTE</b>	<b>27</b>
<b>4.1. <i>Frankia</i> sp. Brunchorst</b>	<b>27</b>
4.1.1. Filogenia y biodiversidad	28
4.1.2. Morfología y fisiología	31
4.1.3. Simbiosis y formación de nódulos	34
4.1.4. Hábitat	39
4.1.5. Condiciones de aislamiento y características de colonias	39
4.1.6. Fuentes nutricionales	42
4.1.7. Fuentes de carbono	43
4.1.8. Fuentes de nitrógeno	44
4.1.9. pH y temperatura	45
<b>4.2. Polisacáridos</b>	<b>46</b>
4.2.1. Polisacáridos vegetales	47
4.2.2. Polisacáridos de algas marinas	47
4.2.3. Polisacárido de origen microbiano	48
<b>4.3. Polímeros producidos por microorganismos</b>	<b>48</b>
4.3.1. Exopolisacáridos microbianos	50
4.3.2. Biosíntesis de exopolisacáridos microbianos	55
<b>4.4. Importancia de <i>Frankia</i> sp. por sus procesos naturales</b>	<b>57</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>60</b>
<b>5.1. Objetivo General</b>	<b>60</b>
<b>5.2. Objetivos Específicos</b>	<b>60</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>61</b>
<b>6.1. Localización</b>	<b>61</b>
<b>6.2. Objetivo 1. Aislar, identificar y seleccionar cepas de <i>Frankia</i> sp. productoras de exopolisacáridos</b>	<b>61</b>

6.2.1. Recolección de nódulos	61
6.2.2. Clasificación de las zonas de influencia del departamento de Nariño	62
6.2.3. Recolección de muestras de suelo y raíces noduladas en <i>A. acuminata</i> en Nariño	64
6.2.4. Lavado y desinfección de nódulos	64
6.2.5. Codificación de las cepas de <i>Frankia</i> sp. Aisladas	67
6.2.6. Crio-conservación y activación de las cepas	68
6.2.7. Activación de las cepas de <i>Frankia</i> sp.	69
6.2.8. Identificación de cepas dentro del género de <i>Frankia</i> sp.	69
<b>6.3. Objetivo 2. Seleccionar las cepas de <i>Frankia</i> sp. de mayor producción de exopolisacáridos bajo diferentes parámetros</b>	<b>70</b>
6.3.1. Extracción y determinación de la cantidad de EPS bajo diferentes metodologías	70
6.3.2. Selección de cepas productoras de EPS	74
6.3.3. Cinética de crecimiento versus producción de EPS	77
6.3.4. Evaluación de la producción de EPS en diferentes fuentes de carbono	78
6.3.5. Evaluación de la producción de EPS en diferentes fuentes de nitrógeno	80
<b>6.4. Objetivo 3. Analizar y cuantificar la producción de exopolisacáridos obtenidos de cepas nativas de <i>Frankia</i> sp.</b>	<b>81</b>
6.4.1. Actividad emulgente	81
6.4.2. Grado de dispersión	82
6.4.3. Ensayos de disoluciones y ebulloscopia	82
6.4.4. Concentración del polímero	83
6.4.5. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad	84
6.4.5.1. Efecto de congelación-descongelación sobre la viscosidad	85
6.4.5.2. Efecto de esterilización en autoclave de vapor sobre la viscosidad	86
6.4.6. Determinación de viscosidad de los EPS bajo diferentes niveles de pH	86
6.4.7. Evaluación de la formación de biofilms	87
6.4.8. Elaboración de las biopelículas	89
<b>7. ANÁLISIS Y RESULTADOS</b>	<b>90</b>
<b>7.1. Caracterización de los nódulos recolectados</b>	<b>90</b>
<b>7.2. Características de las cepas aisladas</b>	<b>91</b>
<b>7.3. Obtención de exopolisacáridos producidos por <i>Frankia</i> sp.</b>	<b>119</b>
<b>7.4. Selección de cepas de <i>Frankia</i> sp. productores de exopolisacáridos bajo diferentes parámetros</b>	<b>123</b>
<b>7.5. Cinética de biomasa versus producción de EPS</b>	<b>135</b>
<b>7.6. Efecto de la producción de EPS en diferentes fuentes de carbono</b>	<b>142</b>
<b>7.7. Análisis de la producción de exopolisacáridos en cepas nativas de <i>Frankia</i> sp.</b>	<b>147</b>
7.7.1. Actividad emulgente	147

7.7.2. Grado de dispersión	152
7.7.3. Pruebas de dilución y ebulloscopia de los EPS	157
<b>7.8. Factores que influyen en la viscosidad de las preparaciones acuosas del EPS producidos por <i>Frankia</i> sp.</b>	<b>160</b>
7.8.1. Viscosidad de las soluciones acuosas de EPS de Cnp1 y Cnt12	160
7.8.2. Concentración de los exopolisacáridos de la cepa Cnp 1	164
7.8.3. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad	167
7.8.4. Efecto del proceso de esterilización en autoclave de vapor	171
7.8.5. Efecto del pH sobre la viscosidad	173
<b>7.9. Participación de los EPS en la formación de biofilms</b>	<b>174</b>
<b>7.10. Elaboración de biopelículas</b>	<b>178</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>185</b>
<b>9. RECOMENDACIONES</b>	<b>187</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>188</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>219</b>
<b>Anexo 1. Título. Medios de cultivo</b>	<b>219</b>
<b><i>Preparación</i></b>	<b>220</b>
<b>Anexo 2. Extracción de exopolisacáridos</b>	<b>221</b>
Metodología: Fuentes <i>et al.</i> , 2013	221
Metodología: Quesada <i>et al.</i> (1993)	221
Metodología: Alvarado, 2015	222
Metodología: Lee <i>et al.</i> , (2013)	223
	224
<b>Anexo 3. Determinación del contenido de proteínas:</b>	<b>225</b>
<b>Anexo 4. Carbohidratos totales de acuerdo a la técnica de Du Bois</b>	<b>227</b>
<b>Anexo 5. Determinación de turbidez por medio de espectrofotometría</b>	<b>230</b>
<b>Anexo 6. Colorimetría</b>	<b>231</b>

## Lista de Figuras

Figura 1. Grupos filogenéticos de plantas actinorrizas y de <i>Frankia</i> sp.	30
Figura 2. Fotomicrografías de estructuras especializadas de aislamientos de <i>Frankia</i> sp.	32
Figura 3. Desarrollo de vesículas de <i>Frankia</i> sp.	33
Figura 4. Raíces de <i>A. acuminata</i> formando nódulos con <i>Frankia</i> sp.	34
Figura 5. Proceso de formación de nódulos por microscopia de Luz (40x)	35
Figura 6. Infección y desarrollo nodular	36
Figura 7. Crecimiento en medio sólido de cepas de <i>Frankia</i> sp. aisladas de nódulos de <i>A. acuminata</i>	40
Figura 8. Cepas de <i>Frankia</i> sp. crecidas en medio BAP	41
Figura 9. Mapa de las zonas de recolección de nódulos de <i>Alnus acuminata</i> en Nariño	62
Figura 10. Muestras recolectadas de nódulo de raíces de <i>A. acuminata</i>	64
Figura 11. Desinfección y conservación de nódulos	65
Figura 12. Macerado de cortes de nódulos para siembra y aislamiento de <i>Frankia</i> sp.	66
Figura 13. Aislamiento de cepas de <i>Frankia</i> sp. en medio sólido (a y b) y líquido (c)	67
Figura 14. Crioconservación de cepas de <i>Frankia</i> sp.	68
Figura 15. Ensayos de resuspensión	73
Figura 16. Activación de cepas de <i>Frankia</i> sp.	74
Figura 17. Determinación de porcentaje de emulsión	81
Figura 18. Medida de viscosidad del EPS	83
Figura 19. Medición de concentración del biopolímero	84
Figura 20. Determinación de viscosidad del EPS a diferentes temperaturas	84
Figura 21. Diagrama metodología para la determinación de viscosidad del EPS con congelación y descongelación	85
Figura 22. Diagrama general para la determinación de viscosidad de EPS con el efecto de autoclave	86
Figura 23. Determinación de viscosidades del EPS a diferentes cambios de pH	86
Figura 24. Procedimiento general para la determinación de Biofilms	88

Figura 25	Fotografía de una placa microtiter	88
Figura 26.	Morfología de los nódulos recolectados en Pasto y Tangua	90
Figura 27.	Formación de pigmentos blancos de la cepa de <i>Frankia</i> sp. Cnt6	92
Figura 28.	Morfología de la cepa Cnt1 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	105
Figura 29.	Morfología de la cepa Cnt2 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Figura 30.	Morfología de la cepa Cnt3 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	105
Figura 31.	Morfología de la cepa Cnt4 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	106
Figura 32.	Morfología de la cepa Cnt5 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	106
Figura 33.	Morfología de la cepa Cnt6 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	106
Figura 34.	Morfología de la cepa Cnt7 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	107
Figura 35.	Morfología de la cepa Cnt8 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	107
Figura 36.	Morfología de la cepa Cnt9 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	107
Figura 37.	Morfología de la cepa Cnt10 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	108
Figura 38.	Morfología de la cepa Cnt11 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	108
Figura 39.	Morfología de la cepa Cnt12 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Figura 40.	Morfología de la cepa Cnp1 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	114
Figura 41.	Morfología de la cepa Cnp2 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	114
Figura 42.	Morfología de la cepa Cnp3 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	114
Figura 43.	Morfología de la cepa Cnp4 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	115
Figura 44.	Morfología de la cepa Cnp5 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	115
Figura 45.	Morfología de la cepa Cnp6 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	115
Figura 46.	Morfología de la cepa Cnp7 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	116
Figura 47.	Morfología de la cepa Cnp8 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	116
Figura 48.	Morfología de la cepa Cnp9 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	116
Figura 49.	Morfología de la cepa Cnp10 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	117
Figura 50.	Morfología de la cepa Cnp11 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	117

Figura 51. Morfología de la cepa Cnp12 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	117
Figura 52. Morfología de la cepa Cnp13 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	117
Figura 53. Morfología de la cepa Cnp14 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	118
Figura 54. Morfología de la cepa Cnp15 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	118
Figura 55. Morfología de la cepa Cnp16 de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Figura 56. Características de exopolisacáridos con diferentes metodologías de secado y solvente de la cepa de <i>Frankia</i> sp. Cnp1	121
Figura 57. Fotomicrografía de acumulación de gránulos en <i>Frankia</i> sp. Cnp1	123
Figura 58. Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnp1	135
Figura 59. Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnp10	136
Figura 60. Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnp11	136
Figura 61. Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnp14	137
Figura 62. Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnt5	137
Figura 63. Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnt8	138
Figura 64. Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cn12	138
Figura 65. Fotomicrografías de estructuras especializadas de las cepas de <i>Frankia</i> sp.	147
Figura 66. Actividad emugente exopolisacárido Cnp1 y control a las 24 horas	148
Figura 67. Actividad emugente exopolisacárido Cnt12 y control a las 24 horas	148
Figura 68. Datos de temperatura de ebullición obtenidos para las disoluciones del EPSCnp1	158
Figura 69. Datos de temperatura de ebullición obtenidos para las disoluciones del EPS Cnt12	159
Figura 70. Viscosidad de las preparaciones acuosas de las cepas estudio Cnp1 y Cnt12	162
Figura 71. Efecto de la concentración de los EPS cepa Cnp1 sobre la viscosidad de las preparaciones	165
Figura 72. Efecto del glicerol en los EPS de la cepa Cnp1 sobre la viscosidad y el esfuerzo cizalla	166
Figura 73. Efecto del aumento gradual de la temperatura sobre la viscosidad de los EPS Cnp1 y Cnt12	168
Figura 74. Determinación de viscosidad a diferentes valores de pH	173

Figura 75. Formación de biofilms con y sin agitación a las 24 y 48 horas de incubación	175
Figura 76. Fotomicrografías 40x de cepa de <i>Frankia</i> sp. Cnp1 a) hora 0 b) hora 24 c) hora 48	177
Figura 77. Fotomicrografías de cepa de <i>Frankia</i> sp. Cnt12 a) hora 0 b) hora 24 c) hora 48	178
Figura 78. Diagrama metodología extracción exopolisacáridos por Fuentes <i>et al.</i> , 2013	221
Figura 79. Diagrama metodología extracción exopolisacáridos por Quesada <i>et al.</i> (1993)	222
Figura 80. Diagrama metodología extracción exopolisacáridos por Alvarado (2015)	223
Figura 81. Diagrama metodología extracción exopolisacáridos por Lee <i>et al.</i> , (2013)	224
Figura 82. Diagrama para determinación del contenido de proteínas	225
Figura 83. Determinación de contenido de carbohidratos	228
Figura 84. Diagrama de espacio de color del método Cie L*, a*, b*	231

### Lista de Tablas

Tabla 1. Propiedades y atributos de algunos polisacáridos microbianos	53
Tabla 2. Información general de las zonas de recolección de las muestras en Nariño	61
Tabla 3. Codificación de cepas de <i>Frankia</i> sp. aisladas	68
Tabla 4. Diferencia de las metodologías para la extracción de EPS	71
Tabla 5. Composición de los biopolímeros evaluados	89
Tabla 6. Análisis de nutrientes del extracto de raíz de <i>Alnus acuminata</i>	94
Tabla 7. Características de las cepas de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	101
Tabla 8. Características de las cepas de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	109
Tabla 9. Respuesta a la evaluación de cuatro metodologías sobre la producción de EPS	119
Tabla 10. Análisis de los EPS obtenidos por cepas <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	123
Tabla 11. Análisis de los EPS obtenidos por cepas <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	124
Tabla 12. Análisis del peso seco y humedad de exopolisacárido obtenidos por las cepas de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Tangua	129
Tabla 13. Análisis del peso seco y humedad de exopolisacárido obtenidos por las cepas de <i>Frankia</i> sp. aisladas de Pasto	130
Tabla 14. Propiedades ópticas de los EPS obtenidos en las cepas procedente de Tangua	131
Tabla 15. Propiedades ópticas de los EPS obtenidos en las cepas procedente de Pasto	132
Tabla 16. Efecto de fuentes de carbono sobre el crecimiento y producción de EPS	142
Tabla 17. Crecimiento de tres cepas de <i>Frankia</i> sp. bajo diferentes fuentes de nitrógeno	144
Tabla 18. Formación de estructuras especializadas a los 15 días de incubación de tres cepas de <i>Frankia</i> sp. crecidas en medios con diferentes fuentes de nitrógeno	146
Tabla 19. Porcentaje de emulsión y fases oleosas con EPS producidos en medio BAP	149
Tabla 20. Emulsiones con diferentes tratamientos oleosos de los EPS Cnp1	153
Tabla 21. Emulsiones con diferentes tratamientos oleosos de los EPS Cnp1	154
Tabla 22. Temperaturas de ebullición de diferentes concentraciones de EPS Cnp1 y Cnt12	157
Tabla 23. Recuperación de la viscosidad de los exopolisacáridos al ser expuestos a temperatura y enfriamiento	170

Tabla 24. Efecto de viscosidad en congelación y descongelación	172
Tabla 25. Elaboración de biopelículas con diferentes aditivos	179
Tabla 26. Concentración para la curva de calibración	227

## 1. Introducción

El desarrollo de la biotecnología en el mundo ha generado retos en la industria relacionados con la necesidad permanente de mejorar la productividad y la competitividad regional y nacional. El conocimiento en el uso de especies ha encontrado una creciente aplicación en los sectores industriales, proponiendo nuevos métodos de producción. Es por ello, que la inversión en biotecnologías es cada vez más relevante en el desarrollo económico y social del país.

La posibilidad de obtener compuestos químicos de manera biológica se ha convertido en una estrategia de desarrollo tecnológico y ha sido entonces cuando los procesos biotecnológicos han empezado a ocupar un lugar de privilegio en la industria mundial.

Los productos de origen microbiano se han empleado hace muchos años atrás en la historia de la humanidad, con el tiempo sus usos se han considerado como una fuente de sustancias renovables útiles tal y dentro de este grupo de compuestos se encuentran los biopolímeros con potenciales aplicaciones en muchos de los sectores de la economía. Hoy en día se sabe, que la capacidad de formación de una biopelícula no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y se considera que, bajo ciertas condiciones, todos los microorganismos son capaces de formarlas, cuya matriz es un polimérico que constituye alrededor del 85% del volumen de cada una de esas unidades estructurales en la biopelícula (Lasa *et al.*, 2005). Una misma especie de microorganismo, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula (Abbasi & Amiri, 2008), entre ellos se pueden

distinguir varias clases acorde a su estructura química: ácidos nucleicos, poliamidas, polisacáridos, poliésteres orgánicos, politioésteres, poliésteres inorgánicos, poliisoprenoides y polifenoles (Steinbüchel, 2001).

Los biopolímeros presentan una estructura química y una composición compleja, por lo cual su síntesis química no es sencilla. A diferencia de los polímeros sintéticos, los biopolímeros son biodegradables y cada día se incrementa el número de aplicaciones en la industria farmacéutica, de alimentos, petróleo, entre otros, lo que respalda las razones del creciente interés para su producción (Lancheros *et al.*, 2002). Los polisacáridos microbianos presentan varias ventajas si se los compara con los de origen vegetal o los producidos por algas, lo es la gran variedad de compuestos, mayor uniformidad en sus propiedades, pureza y características intrínsecas debido a que su biosíntesis que es muy específica. De igual manera, los microorganismos pueden sintetizar las primeras seis clases de polímeros (ácidos nucleicos, poliamidas, polisacáridos, poliésteres orgánicos, politioésteres) que se destacan por tener aplicaciones en medicina, farmacia, agricultura y en muchas otras áreas, como materiales de envase. Finalmente, y una de las cualidades que más impacto puede generar sobre este tipo de polisacáridos es que su producción se realiza a partir de una fuente renovable e inagotable que puede ser desarrollada bajo condiciones controladas y a bajo costo (Steinbüchel, 2001).

Se ha identificado que las bacterias rizobiales, presentan la habilidad de producir exopolisacáridos efecto asociado a las condiciones en las que viven y a la necesidad de asociarse a un hospedero con las que establecen relaciones simbióticas (Lancheros *et al.*, 2002).

En este sentido, el presente estudio estuvo enfocado al estudio de los exopolisacáridos producidos por el actinomiceto *Frankia* sp. (Rey, 2006). *Frankia* sp. es un organismo complejo que presenta crecimiento pleomórfico, crece en forma de filamentos no aéreos con hifas septadas y ramificadas de 0,5 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, las cuales se diferencian en esporangios con aspectos irregulares que se desarrollan de manera, terminal, lateral o intercalada. Los esporangios contienen en su interior gran cantidad de esporas en estado latente, que germinan para formar hifas cuando encuentran condiciones ambientales adecuadas. Esta bacteria puede ser un saprofito de vida libre que se nutre de materia orgánica o vivir en relación simbiótica con plantas denominadas actinorrizas. Su hábitat se compone de sustratos como suelo, compost y desechos vegetales (Baker & Schwintzer, 1990). De manera asociada *Frankia* sp. suple intracelularmente a la planta con nitrógeno combinado que es fijado a través de los nódulos y de retorno se le suministra fuentes de carbón, entre otros beneficios. Los nutrientes son intercambiados entre el hospedero y microsimbiote y controlados por la membrana del plasmalema derivado de la interface que proviene de microsimbiote (Jeong *et al.*, 2004).

Se sabe que como todos los microorganismos simbióticos *Frankia* sp. durante el proceso de reconocimiento con el hospedero y durante la infección activa los genes *nod* asociados a la producción de flavonoides, como respuesta a ello la bacteria secreta exopolisacáridos produciendo la deformación y división de las células cordicales del hospedero, un importante paso para el desarrollo de los nódulos (Wolters, 1998). De igual manera, se ha reportado que una de las particularidades de este microsimbiote es la generación de polisacáridos de dos formas, a través de inclusiones intracelulares que actúan como material de reserva o reguladores, como por ejemplo se pueden mencionar al polihidroxibutirato (PHB) y la otra forma es como polisacáridos

extracelulares poli-hidroxialcanoatos (PHA's), que se pueden encontrar como material mucilaginoso extracelular en forma de cápsulas (Benson & Silvester, 1993).

En condiciones de laboratorio, *Frankia* sp. produce exopolisacáridos (EPS) que son excretados al medio de cultivo, los cuales están compuestos principalmente por carbohidratos formados por homo y heterodímeros y pueden contener constituyentes orgánicos e inorgánicos (Fuentes *et al.*, 2013). La producción de estos EPS en medio de cultivo han sido reportados en *Frankia* sp. por diversas investigaciones (Schwintzer, 2012). De igual manera, se han desarrollado investigaciones asociadas a la hidrólisis de enzimas en cultivos puros para entender el proceso de descomposiciones de complejos componentes como la celulosa y la lignina Safo & (Torrey, 1988) que permite ampliar el entendimiento de la relación hospedero-microambiente-suelo, estudios enfocados al crecimiento del microorganismo *in vitro* o estudios asociados a mejorar la respuesta en la nodulación de la planta cuando emplearon polímeros retenedores de agua con cepas de *Frankia* sp., entre otros (Rey *et al.*, 2014; Ranganathana, 2018).

Teniendo en cuenta el potencial de uso agroindustrial que puede ser obtenido a partir de estos subproductos generados por la bacteria en condiciones *in vitro* y los pocos estudios reportados de la composición y características del material mucilaginoso extracelular de este tipo de microorganismo, esta investigación pretende realizar las primeras aproximaciones de los exopolisacáridos producidos por el actinomiceto *Frankia* sp. en bajo crecimiento *in vitro* en cultivo en batch. Para ello, se aislarán cepas de *Frankia* sp. asociada a nódulos de *Alnus acuminata* de bosques de Nariño, seleccionando las cepas de mayor producción de exopolisacáridos en diferentes parámetros, finalmente se analizará la producción de exopolisacáridos obtenidos por fermentación discontinua de las cepas nativas de *Frankia* sp.

## 2. Planteamiento del Problema de Investigación y su Justificación

El desarrollo de polímeros sintéticos es identificado como un desarrollo importante del siglo XX, y su uso ha sido ampliamente expandido en la vida cotidiana. Los polímeros se producen principalmente a partir de fuentes de petróleo con funciones específicas (Valero *et al.*, 2013). A pesar de las ventajas que estos productos generan, presentan desventajas asociadas a su alta resistencia a la corrosión, al agua y a la descomposición por parte de microorganismos, lo que los convierte en residuos difíciles de eliminar generando un impacto ambiental alto. Dada la versatilidad en el uso de este tipo de materiales, su consumo se ha incrementado, por lo tanto, el impacto en el ambiente.

Con el uso de otras fuentes de obtención de polímeros que sustituyan los de origen sintético, se abre una línea de investigación que constituye un interesante y prometedor campo de acción. Los polisacáridos de origen microbiano son una solución por sus aplicaciones en la industria. Su uso se fundamenta en dos de sus características como lo son la capacidad para alterar las propiedades de flujo de agua y la posibilidad de formar geles. *Frankia* sp. es un actinomiceto que produce polisacáridos que cumplen con dichas características (Rey, 2006).

Los aportes experimentales y teóricos del presente trabajo, constituyen una potencial aplicación a esquemas actuales de producción de exopolisacáridos naturales de origen microbiano. Además, los resultados experimentales obtenidos representan un importante punto de partida en el estudio de la producción de biopelículas de exopolisacáridos generados por el actinomiceto *Frankia* sp. desarrolladas a partir de los esquemas de bioprocesos que incluyen fuentes alternativas de bajo costo.

Todo esto, aporta al auge que encamina la investigación hacia el desarrollo de técnicas amigables con el medio ambiente, sostenibles, adaptables y económicamente viables a través del uso de materiales de origen biológico, disminuyendo el uso de empaques sintéticos no biodegradables.

El actinomiceto *Frankia* sp. que es una especie con potencial uso en la industria agrícola por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico tanto libre como en forma asociada con plantas actinorrizas, producción de ácido indol acético, productor de antibióticos y establecer asociaciones con otros organismos simbióticos, además es un microorganismo capaz de producir biopolímeros intra y extracelularmente que hasta el momento no está ampliamente estudiado en este campo.

Dadas sus ventajas y la gran producción de estos polímeros en la industria, este estudio realiza las primeras aproximaciones a nivel de laboratorio sobre la producción de estos exopolisacáridos en función del rendimiento en fermentación en cultivo batch en función de promoción del crecimiento del este microorganismo.

### 3. Hipótesis y Pregunta de Investigación

El actinomiceto *Frankia* sp. es un microorganismo reconocido por su habilidad de fijar nitrógeno de manera asociada debido a la formación de nódulos con especies de plantas denominadas actinorrizas. El inicio de la simbiosis comienza a partir del reconocimiento microorganismo-hospedero a través de la detección de las proteínas flavonoides y betaínas que son secretadas por la raíz del hospedero y que permiten la activación de los genes *nod* en el microsimbote. Los factores Nod son señales de exopolisacáridos que participan en la deformación de los pelos radiculares, polarización de la membrana, oscilaciones intracelulares de calcio y la iniciación de la división celular radicular para establecer el primordio nodular (Gage, 2004). En condiciones *in vitro*, se ha detectado la formación de esos exopolisacáridos asociados a la composición de los medios (Rey, 2015), sin embargo, los estudios relacionados con la composición y posibles usos a nivel industrial no han sido reportados para este microsimbote.

Debido a la importancia del uso sostenible de productos ecológicos, los exopolisacáridos con fines de producción de biopolímeros son una línea de investigación que cobra interés a nivel industrial por tal motivo, se amplían más los estudios que permitan la obtención a menores costos a través del uso de microorganismos.

Por lo anteriormente expuesto, es necesario realizar los estudios que permitan describir, optimizar y caracterizar químicamente los exopolisacáridos producidos por las cepas de *Frankia* sp. En el presente estudio se considera la hipótesis: Al variar las condiciones de crecimiento *in vitro* y medio de soporte se estimulará la producción de exopolisacáridos de cepas nativas de *Frankia* sp. para la producción de un biopolímero.

En este sentido, para este trabajo se plantea como pregunta de investigación ¿Cuáles son las condiciones de crecimiento *in vitro* que permiten la producción de mayor cantidad de exopolisacáridos de *Frankia* sp. con el fin de hacer una aproximación preliminar al papel fisiológico desempeñado por el exopolisacárido producido?

## 4. Marco Referencial

### 4.1. *Frankia* sp. Brunchorst

*Frankia* sp. es un actinomiceto perteneciente a la familia *Frankiaceae* que presenta asociación simbiótica e induce la formación de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno atmosférico en algunas angiospermas no leguminosas denominadas “actinorrícicas”, motivo por el cual se le han dedicados muchas investigaciones en todo el mundo.

El primer reporte de simbiosis de *Frankia* sp. en nódulos fue reportado por Woronin en 1866, quien describió las vesículas y las hifas como un estadio del desarrollo de hongos y parásitos (Wolters, 1998). En 1988 el género de *Frankia* sp. fue propuesto en por J. Brunchorst quien planteó que el nombre *Frankia* resurgiera en honor del microbiólogo suizo Frank A.B. (1839-1900), debido a que acuñó el término “simbiosis”, aunque, Brunchorst y Frank, consideraron a *Frankia* sp. como un hongo (Lechevalier & Lechevalier, 1989; Wall, 2000).

En 1987 Baker intentó hacer la primera clasificación sub-genética de las cepas de *Frankia* sp. con base en su espectro de infección de hospedero. A través de ensayos de inoculación cruzada de diversos hospederos empleando como inóculo un macerado de nódulos y con cepas aisladas se definieron 6 especies del género *Frankia* sp. de plantas actinorrizas diferentes, lo cual le permitió definir grupos de infección de hospederos. Posteriormente se ha probado que el grado de especificad de algunas cepas y de ciertas plantas es variable, aún dentro de un mismo género de plantas existe una variación en el establecimiento de la simbiosis (Bautista & Valdés, 2008).

Es así, que Becking en 1974, clasificó a *Frankia* sp. dentro del miembro de la familia

*Frankiaceae* del orden *Actinomycetales*, por el tipo de esporangios que presenta este actinomiceto. Posteriormente, Becking propuso 10 géneros (*F. alni*, *F. elaeagni*, *F. brunchorstii*, *F. discariae*, *F. casuarinae*, *F. ceanothi*, *F. dryadis*, *F. purshiae* y *F. cercocarphi*), basado la planta hospedara (Benson & Silvestre, 1993).

#### **4.1.1. Filogenia y Biodiversidad**

Todas las cepas de *Frankia* sp. están clasificadas en un linaje separado de los actinomicetos Gram positivos de alta producción G+C (66-72%) con la siguiente posición jerárquica bacteriana (<http://www.cme.msu.edu/Bergeys/taxonomyinfo.html>):

Phylum XXVI: “*Actinobacteria*”

Clase I: *Actinobacteria*

Orden VI: *Frankiales*

Familia: *Frankiaceae*

Género: *Frankia*.

La definición taxonómica actual del género *Frankia* sp. “es un grupo de actinobacterias fijadoras de nitrógeno (tanto en simbiosis como en vida libre), de lento crecimiento, heterotróficos, que poseen una gran versatilidad metabólica, netamente de actividades líticas; que poseen una pared celular tipo III, patrón de fosfolípidos PI, lípidos haponoides (bacteriohopanetrol y bacteriopanetrol fanilacetato monoéster) en su pared celular, así como el azúcar 2-O-metil-D-manosa” (Pawłowski & Bisseling, 1996).

Se han realizado numerosos estudios de cepas haciendo un análisis de cada una de las características mencionadas anteriormente. Sin embargo, según (Bautista & Valdés, 2008) aun con la conjunción de los datos arrojados por los diferentes experimentos, existen varios aspectos

fenotípicos, genotípicos y ecológicos que no han permitido establecer una filogenia concreta y mucho menos la designación del nivel taxonómico de especies.

Estudios de homología DNA-DNA realizados por Akimov & Dobritsa (1992) permitieron demostrar la existencia de una enorme diversidad dentro del género que va más allá de los 4 grupos de especificidad de hospedero. Con el avance en los estudios se han llevado a la formación de más de 11 especies genómicas, reportes que desafortunadamente han sido realizados de manera aislada, lo que ha dificultado su comparación para una clasificación más robusta (Acosta, 2004)

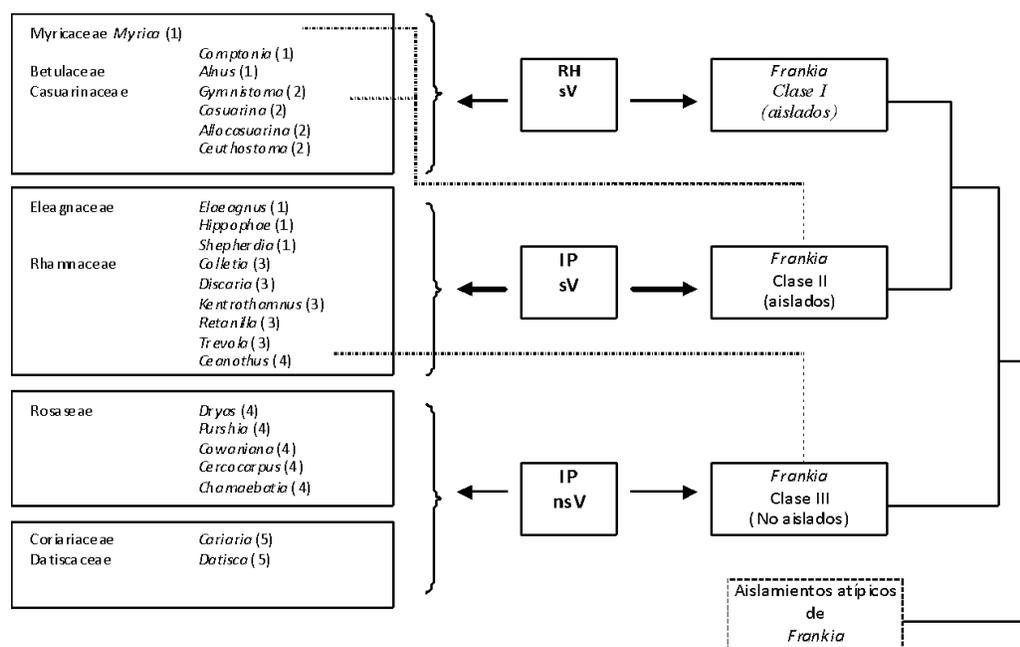
Otros mecanismos de identificación se basaron en técnicas inmunológicas, con lo cual se agruparon algunas cepas de *Frankia* sp. en diferentes serotipos (Lechevalier & Lechevalier, 1990). De igual manera se analizaron propiedades bioquímicas como proteínas totales (Benson *et al.*, 1983), manosa (Mort *et al.*, 1983), azúcares totales (Laurent *et al.*, 1987), actividades enzimáticas (Benoist *et al.*, 1992), perfiles de ácidos grasos (Mirza *et al.*, 1994) proteasas e isoenzimas (Bautista & Valdés, 2008). Paralelamente a los análisis anteriores, se inició el uso de análisis del genoma, se empleó la técnica de hibridación ADN-ADN, la cual se considera hasta el momento como el mejor criterio para definir especies en procariontes (Bautista & Valdés, 2008).

Partiendo de análisis de un mayor número de secuencias y construcción de “árboles filogenéticos de genes del 16S rRNA de *Frankia* sp. de los diferentes grupos de infección, permitieron establecer la filogenia del género, que es la más aceptada hasta el momento”. Se definieron cuatro grupos filogenéticamente congruentes: **Grupo I:** bastante diverso que incluye cepas infectivas en Myricacaceae, Betulaceae y Casuarinaceae;

**Grupo II:** comprende cepas presentes en los nódulos de Rosaceae, Coriariaceae y Datisceae; el **Grupo III:** se referencia a aquellas cepas asociadas con Eleagnaceae y Gymnostoma; y el **Grupo IV:** formado por aquellas cepas llamadas atípicas que no son capaces de nodular ni de fijar nitrógeno, son cepas aisladas de nódulos de diversas plantas, aunque son nif- o no *Alnus*. Las cepas de los grupos I, II y III son cultivables *in vitro* y las del grupo IV ha sido identificadas a partir de análisis del 16S rDNA *in situ* (Wall, 2000; Graham, 2005) (Figura 1).

**Figura 1**

*Grupos filogenéticos de plantas actinorrizas y de Frankia sp.*



*Nota.* RH: infección a través de pelos radiculares. IP: Penetración intracelular. sV: Formación de vesículas septadas en el nódulo. nsV: no forman vesículas septadas en el nódulo.

Fuente: Wall (2000).

Con la gran cantidad de estrategias que se han aplicado y todos los datos que con ellas se han obtenido, se ha puesto de manifiesto la gran diversidad de las cepas de *Frankia* sp., (Bautista & Valdés, 2008) así como la influencia que, en algunos casos, sobre ella tienen la localización geográfica de sus hospederos, lo que ha conducido aparentemente al desarrollo de genotipos de *Frankia* sp. con afinidades diferentes para el género de planta hospedera aun dentro de la misma familia de plantas (Benson & Dawson, 2007).

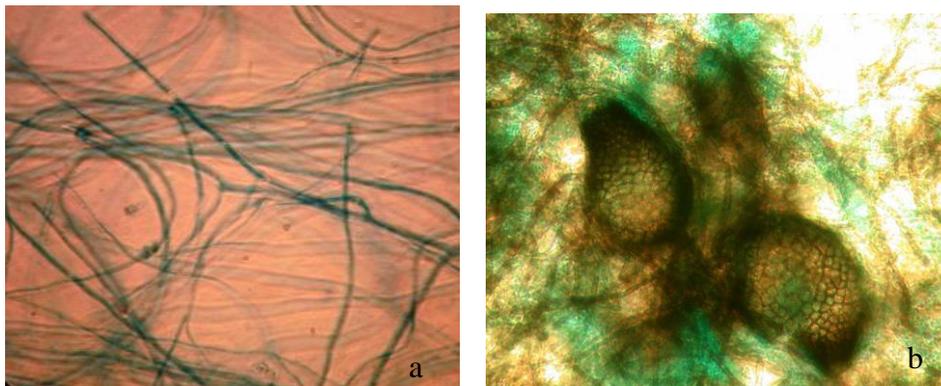
#### **4.1.2. Morfología y Fisiología**

Morfológicamente *Frankia* sp. es un organismo complejo, presenta un crecimiento pleomórfico, crecen en forma de filamentos no aéreos con hifas septadas y ramificadas de “0,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  de diámetro, las cuales se diferencian en esporangios con aspectos irregulares que se desarrollan de manera, terminal, lateral o intercalad“. Los esporangios contienen en su interior gran cantidad de esporas en estado latente, que germinan para formar hifas cuando encuentran condiciones ambientales adecuadas (Pawlowski & Bisseling, 1996).

Las hifas pueden diferenciarse para formar una estructura que constituye un rasgo sobresaliente de *Frankia* sp., las vesículas (Fontaine *et al.*, 1984). Estas son estructuras redondas, de pared gruesa y su desarrollo es a partir del hinchamiento de las hifas ramificadas, su función es proteger a la nitrogenasa que se encuentra en su interior del efecto negativo del oxígeno (Carú *et al.*, 2000) (Figura 2).

## Figura 2

*Fotomicrografías de estructuras especializadas de aislamientos de Frankia sp.*



*Nota.* Aislamientos crecidos en medio BAP libre de nitrógeno Microscopia óptica 100x. a. Producción de micelio b. Esporangio maduro. Cortesía Dra. Ana María Rey

A mayor concentración de oxígeno en el medio la pared envolvente también aumenta y las vesículas se evidencian al microscopio con mayor refringencia (Valdés *et al.*, 1991). Esta variación en el grosor de la pared sugiere un nivel específico de regulación del oxígeno en la vesícula que es dependiente del mismo oxígeno (Berry, 1994).

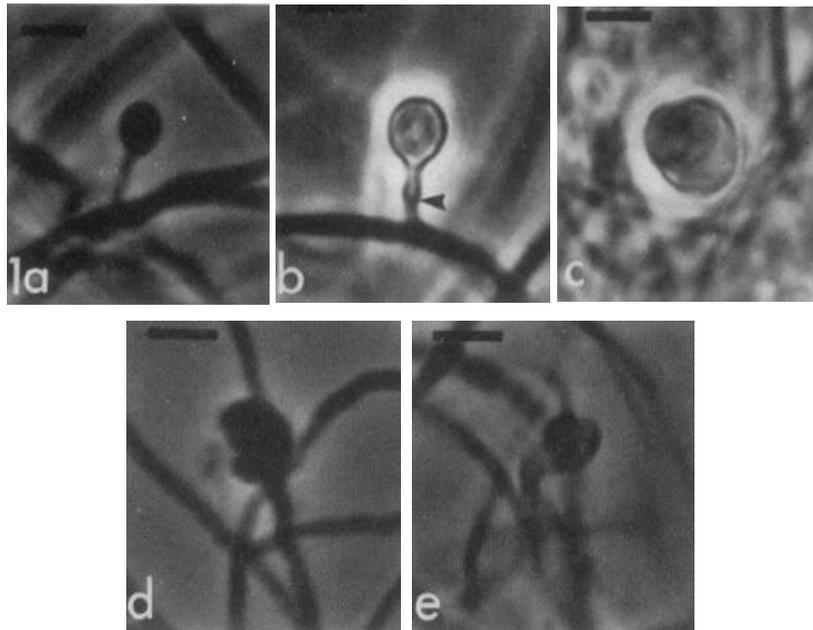
*In vitro* al remover el nitrógeno del medio de cultivo, se induce la formación de las prevesículas que se forman después del 5to a 6to día, etapa denominada “*fase oscura*” (Murry *et al.*, 1984), la cual no está asociada con la reducción de acetileno generado por la actividad de la nitrogenasa (Fontaine *et al.*, 1984).

La prevesícula se extiende con mayor frecuencia después de 2 h en el medio de cultivo libre de N e incrementa el tamaño cuando llega a la madurez (42-48 h) denominada “*fase*

*brillante*”, extendiéndose frecuentemente hasta alcanzar el máximo de la actividad de la nitrogenasa (Graham 2005). En vesículas jóvenes se observa la presencia de glicogen el cual suele disminuir con la madurez, efecto asociado a las altas demandas en el consumo de energía por la actividad metabólica (Murry *et al.*, 1984) (Figura 3).

### Figura 3

*Desarrollo de vesículas de Frankia sp.*



*Nota.* **a.** Fase oscura, 5 al 6 día, formación de prevesículas 1.5-2  $\mu\text{m}$ . **b y c** Fase brillante: formación de vesículas 8 día y madurez 2.5  $\mu\text{m}$ . fuente. Fontaine *et al.* (1984).

### 4.1.3. Simbiosis y Formación de Nódulos

Los nódulos son estructuras que se forma en la raíz como respuesta a la infección por la bacteria. Los nódulos actinorrízicos son perennes y tienen forma de estructuras coraloides con muchos lóbulos; cada lóbulo es una raíz lateral modificada. El tamaño de los nódulos varía con la planta hospedera y es muy común encontrar en el campo nódulos de 3 a 5 cm de diámetro. Suharjo & Tjepkema (1995). En *A. acuminata* los nódulos están concentrados en los primeros 5 cm del perfil del suelo, pueden medir hasta 6 cm de diámetro con tamaño, aspecto y distribución variable y formando grupos (Russo, 1989) (Figura 4).

#### Figura 4

*Raíces de A. acuminata formando nódulos con Frankia sp.*



Los nódulos tienen internamente un color rojo a rosado intenso, este pigmento se debe a la presencia de hemoglobina, la cual se asocia con la fijación de nitrógeno y activación de los nódulos, su función está en controlar el oxígeno necesario para activar esta enzima (Tjepkema *et al.*, 2002).

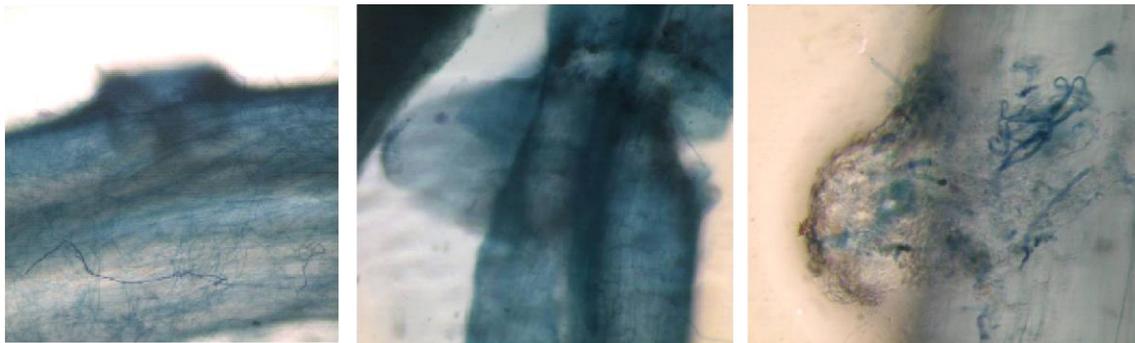
Estudios realizados por Christensen *et al.* (1991), permitieron evidenciar la producción de hemoglobina por *Frankia* sp. asociadas a raíces de plantas de *Casuarina* y en *Alnus* a través del tratamiento óptico de espectros de absorción típicas de la hemoglobina y por el aislamiento de genes de hemoglobina de *Casuarina*. Para ello realizó una purificación por filtración en gel y por intercambio de iones, que mostró que la hemoglobina forma un complejo estable con el oxígeno y lo convierte en carboxyhemoglobina.

En los nódulos actinorrízicos el tejido vascular se presenta en la parte central y las células que contienen la bacteria *Frankia* sp. se encuentran en el córtex (Péret *et al.*, 2007). Además de la estructura, también la ontogenia de los nódulos es diferente en las leguminosas; en estas el primordio del nódulo se forma en el córtex, mientras que en las plantas actinorrizas se forma en el periciclo, de manera que la bacteria tiene que atravesar casi todo el córtex de la raíz para llegar a las células nodulares (Obertello *et al.*, 2003).

El proceso de infección depende del tipo de hospedero, para lo cual se han planteado dos modelos: intercelular e intracelular. Para el caso de la infección de las células de *Frankia* sp. que “se asocian a los pelos radiculares de especies como *Alnus*, *Casuarina*, *Comptonia* y *Myrica*, presentan un proceso intercelular en la epidermis y el córtex de las raíces” (Obertello *et al.*, 2003) (Figura 5 y 6).

## **Figura 5**

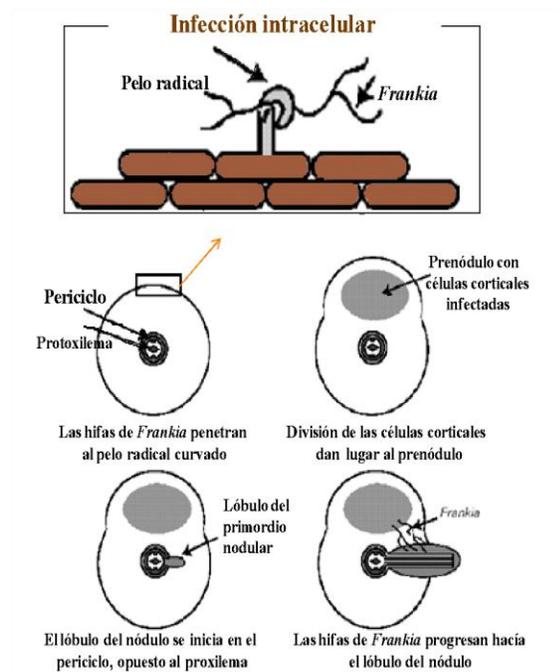
*Proceso de formación de nódulos por microscopia de Luz (40x)*



*Nota.* Cortesía: Ana María Rey Obando

## Figura 6

### *Infección y desarrollo nodular*



*Nota.* Elaborado por Obertello *et al.* (2003)

La invaginación por el plasmalema en el proceso de infección es similar al de las endomicorrizas y rizobios, formando el hilo de infección, producto de la ramificación y

encrespamiento del pelo radicular (Diouf *et al.*, 2003). Posteriormente, en el proceso de infección se activan los genes *nod* debido a la producción de flavonoides en el hospedero, la bacteria secreta lipo-oligosacáridos produciendo la deformación y división de las células cordicales. Esta activación de genes *nod* es un importante paso para el desarrollo de los nódulos (Wolters, 1998).

Después de la penetración, las hifas son rodeadas por la membrana de las células del hospedero, compuesta por celulosa, pectinas y hemicelulosas, proceso que ocasiona el desplazamiento del núcleo de la parte central del citoplasma celular. Las células de la hipodermis y el córtex se dividen en respuesta a la invasión de las hifas y forman el prenódulo (Diouf *et al.*, 2003).

Las hifas de *Frankia* sp. penetran el tejido hasta el córtex, produciendo señales en las células de la raíz que deterioran el citoplasma y ocasionando que la pared celular colapse, posteriormente, colonizan las células sobre las que se desarrolla el primordio del nódulo e inducen la formación del nódulo maduro intracelular (Obertello *et al.*, 2003). Este proceso ocurre de manera similar con las hifas que no penetran el pelo radicular (Van Cheleu *et al.*, 2006).

Cuando entra en las células de la planta inmediatamente *Frankia* sp. se incrusta dentro de una capa a manera de pared celular envuelta por una matriz pectinosa que crea una encapsulación tubular. *Frankia* sp. sigue su separación a través de las células dentro de estas zonas más profundas, donde continúa dividiéndose y creciendo hasta la formación del nódulo (Obertello *et al.*, 2003).

Debido a que los nódulos son parte del sistema radicular de la planta, ellos al igual que las raíces individuales, tienen un tiempo de vida definido. En el aliso bajo condiciones del suelo, los nódulos radiculares raramente sobreviven más de diez años y continuamente durante la vida de la planta actinorriza, se forman nuevas raíces y nódulos. Wolters (1998), describe un promedio de frecuencia de formación de un nódulo de unos 3 años.

Cuando los nódulos radiculares mueren las partículas de *Frankia* sp. se liberan en el suelo, de este modo la senescencia y degeneración de los nódulos puede ser un factor importante, especialmente para cepas sp (-), ya que permite el mantenimiento de grandes poblaciones de *Frankia* sp. en los ecosistemas del suelo y la rizósfera (Wolters, 1998). En el suelo, puede haber muchos mecanismos que contribuyen a la propagación de *Frankia* sp. en un ecosistema, como los movimientos de agua en sedimentos húmedos o por la lluvia, transportando así, las esporas debido a su pequeño tamaño y abundancia (Reddell & Spain, 1991).

Wall (2000) publicó un modelo para determinar el grado de especificidad entre la simbiosis *Frankia* sp. y plantas actinorrizas. Las señales emitidas por la bacteria llevan la información para que la raíz inicie el proceso de deformación de pelos radiculares, esto es reconocido por el hospedero la señal es reconocida se induce desencadena la vía de transducción.

Los receptores de la planta que se encuentran en la raíz reconocen la deformación del pelo y la simbiosis. La deformación de pelo radicular es necesaria pero no es suficiente para la nodulación que ocurre a través de la infección intracelular para plantas actinorrizas como *Alnus*, aunque no es necesario en otras actinorrizas como *Discaria*. El modelo, por lo tanto, propuso tres posibilidades que se dan después del paso de reconocimiento: A-C) Reconocimiento total entre

*Frankia* sp. y especies de actinorrizas con optimas tasas de nodulación. D) Reconocimiento parcial: en este tipo de reconocimiento existe claves de compatibilidad entre aislamientos de *Frankia* sp. y especies de plantas actinorrizas, pero con un retraso en la nodulación. E-F) Pares no compatibles.

#### **4.1.4. Hábitat**

Esta bacteria puede ser un saprofito de vida libre que se nutre de materia orgánica o vivir en relación simbiótica. Su hábitat se compone de sustratos como suelo, compost y desechos vegetales. De manera asociada *Frankia* sp. aporta intracelularmente a la planta nitrógeno combinado  $\text{NH}_4^+$  que es fijado a través de los nódulos y como retorno la planta le suministra fuentes de carbón en forma de carbohidratos solubles. Los nutrientes son intercambiados entre el hospedero y microsimbote y controlados por la membrana del plasmalema derivado de la interface que proviene de microsimbote (Jeong *et al.*, 2004).

#### **4.1.5. Condiciones de Aislamiento y Características de Colonias**

*Frankia* sp. puede ser aislada a partir los nódulos de las plantas a las que se asocia o a partir de la rizósfera viviendo de forma libre. Los aislamientos de *Frankia* sp. del suelo son raramente realizados, para lo cual, se ha reportado el empleo de fuentes modificadas de carbono. Para lograr los primeros aislamientos, se utilizó agar glucosa asparagina que es un medio diferencial utilizado comúnmente para el crecimiento y manteniendo de actinomicetos (Murry *et al.*, 1984; Carú *et al.*, 2000).

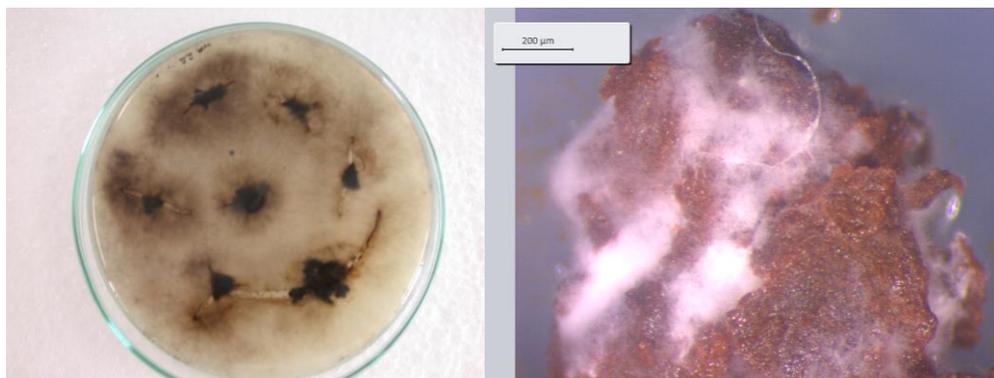
Una de las razones que limita el aislamiento de las cepas a partir de nódulos es la alta contaminación generada por otros microorganismos. El endófito puede permanecer viable en los nódulos durante un largo período antes de su aislamiento, para ello debe ser mantenido en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y consérvalos en un desecante como la sílica gel (Schwintzer & Tjepkema, 1990; Sarma *et al.*, 1998).

Entre los métodos más utilizados para el aislamiento de *Frankia* sp. se puede destacar la microdissección del nódulo, la filtración diferencial con gradiente de concentración de azúcar y centrifugación, y siembra directa del nódulo en medio líquido o semisólido, siendo este último el método más empleado (Benson *et al.*, 2004; Bassi & Benson, 2007).

En medio de cultivo sólido el crecimiento es muy lento, las colonias no forman micelio aéreo, las esporas y los micelios se dividen entre siete a diez días o más después de la siembra, reportándose la aparición de las primeras colonias a partir de la segunda a la cuarta semana, dependiendo de las condiciones nutricionales del medio (Figura 7).

### Figura 7

*Crecimiento en medio sólido de cepas de Frankia sp. aisladas de nódulos de A. acuminata*



La formación de los esporangios, de vesículas y la tasa de crecimiento se pueden ver afectadas por las fuentes nutricionales y condiciones *in vitro*, principalmente en medios sólidos (Rey, 2006). Para estimular el crecimiento de estas estructuras, se propagan en medio líquido bajo condiciones continuas y con una agitación de 180 rpm aproximadamente (Rey, 2015), lo que permite un crecimiento en menor tiempo y con mayor biomasa celular, debido a que no se acumulan metabolitos secundarios y la generación de mayor flujo de O<sub>2</sub>.

Adicionalmente, bajo estas condiciones el conjunto de filamentos tiene el aspecto de copos de algodón y su principal característica morfológica es la formación de esporangios redondos, cilíndricos o irregulares. La formación de vesículas se puede inducir, al retirar la fuente de nitrógeno del medio de cultivo (Simonet *et al.*, 1989) (Figura 8).

### Figura 8

*Cepas de Frankia sp. crecidas en medio BAP*



La cinética de crecimiento en cultivo en batch, indica que *Frankia sp.* presenta una fase lag con un tiempo de 2 a 4 días, que puede aumentar dependiendo de las condiciones nutricionales. La fase exponencial se inicia a partir del quinto día hasta el día 12

aproximadamente, la fase estacionaria es corta de 1 a 3 días; con la adición de fuentes de carbono se puede estimular el crecimiento diaúxico. La fase de muerte celular se extiende por un período de 3 a 6 días. Este crecimiento se debe a que el tiempo de generación de las cepas de *Frankia* sp. es mayor a 15 horas (Benson & Schultz 1990; Wall 2000).

#### **4.1.6. Fuentes Nutricionales**

Entre los criterios más relevantes a tenerse en cuenta en la selección del medio de cultivo y las condiciones para el aislamiento de *Frankia* sp. están: (1) Algunos aislamientos son microaerófilos y crecen mejor en medio estático en cajas de petri o en agitación en medio líquido. (2) El crecimiento es lento inclusive diferente entre las mismas cepas de *Frankia* sp. comparado con otros actinomicetos. (3) No todos los aislamientos presentan los mismos requerimientos nutricionales. (4) El óptimo de temperatura para su crecimiento oscila entre 25 a 35°C. (5) Presentan una baja sensibilidad a antibióticos o fúngicos, motivo que permite ser incorporados en el medio (Lechevalier & Lechevalier, 1990).

Nutricionalmente hablando, para el crecimiento de las cepas puede emplearse desde medios relativamente simples con fines específicamente para el mantenimiento, hasta medios complejos los cuales se emplean principalmente en la etapa de aislamiento y producción de biomasa y/o estimulación de la formación de estructuras especializadas; se ha encontrado mejor crecimiento en medios semisólidos (0,8 a 1% de agar) y líquidos con la adición de antibióticos como cicloheximida (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y nistatina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que reducen la formación de los contaminantes (Lechevalier & Lechevalier, 1990).

Los medios de cultivo más empleados para el aislamiento, crecimiento y mantenimiento de aislados de *Frankia* sp. se pueden mencionar: medio mínimo de propionato DMP (Baker, 1982), medio Benzil amina purina (BPA) (Murry *et al.*, 1984), Q Mod medio, Caseína hidrolasa, Bennett´s medio, Benson´s medio, HIML 3 medio. En estos medios se contempla como fuentes de carbono glucosa, propionato, peptona, caseína hidrolizada o fructosa, adicionalmente se emplean vitaminas y micronutrientes como estimulantes del crecimiento (Bassi & Benson, 2007).

La diversidad de estrategias para el aislamiento y caracterización que se han aplicado y todos los datos que con ellas se han obtenido, han permitido evidenciar la gran diversidad de las cepas de *Frankia* sp., así como la influencia que en algunos casos tiene sobre su aislamiento la localización geográfica y características ambientales de sus hospederos, lo que ha conducido aparentemente al desarrollo de genotipos de *Frankia* sp. con afinidades diferentes para el género de planta aún dentro de la misma familia de plantas (Mastrorunzio *et al.*, 2008).

#### **4.1.7. Fuentes de Carbono**

Muchos factores influyen sobre la formación y desarrollo de este actinomiceto, como lo es la temperatura, el pH, fuentes de nitrógeno y de carbono. Las fuentes de carbono utilizadas por *Frankia* sp. para el aislamiento, crecimiento y desarrollo incluyen los medios que contienen glucosa, propionato, ácidos grasos derivados del tween, succinato, malato y algunos ácidos orgánicos como el piruvato (Newcomb & Wood, 1987).

Así mismo, se ha demostrado que el género utiliza los ciclos del ácido cítrico, del glioxilato y también realiza actividades enzimáticas de gluconeogénesis. En las cepas y en los

grupos de vesículas de *Frankia* sp. se han encontrado enzimas como la glucoquinasa (Glucosa → 6P, fosfofructocinasa (Fructosa 6P → fructosa 1,6-bisP FBP) y piruvato cinasa (Fosforilización a nivel de sustrato) que participan en la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas. El propionato es metabolizado por la conversión a succinato a través de la vía de la propionil CoA carboxilasa (Newcomb & Wood, 1987). Los cultivos de fijadores de nitrógeno muestran actividades específicas más altas de glucosa 6-fosfato y fosfofructoquinasa que en los cultivos crecidos en presencia de amoníaco (López & Torrey, 1985).

Akkermans *et al.* (2011) reportaron aislamientos de *Frankia* sp. que utilizaron como fuente de energía el piruvato, el acetato y el propionato. Ashraf & Saijjard (1987) obtuvieron los mejores crecimientos en los medios que tenían como fuente de carbono la solución de Tween-80. Hafez *et al.* (1984) evaluaron el crecimiento de dos cepas *Frankia* sp. aislada de *Alnus nitida* bajo las fuentes de carbono acetato, propionato, butirato, piruvato, malato, succinato, glucosa, Tween-20 y Tween-80. Los resultados evidenciaron diferencias en la producción de proteína microbial en los medios con acetato, propionato, butirato, piruvato, Tween-20 y Tween-80 estimularon el crecimiento de la cepa An 1, aunque la cepa An 2 sólo creció en acetato, propionato, por lo anterior es claro que los aislados presentan preferencias en el uso de fuentes nutricionales.

#### **4.1.8. Fuentes de Nitrógeno**

*Frankia* sp. es una bacteria microaerófilas cuando utilizan nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) como fuente de nitrógeno y son absolutamente aerobias cuando se les proporciona nitrógeno combinado, como el amonio y nitratos, así como varios aminoácidos como fuente de N para su

crecimiento *in vitro*. La asimilación del amonio producto de la fijación del N<sub>2</sub> se lleva a cabo por el sistema glutamino-sintetasa, glutamato-sintasa (Huss-Danell, 1997).

Está demostrado que los procesos de crecimiento y fijación de nitrógeno de *Frankia* sp. están estrechamente relacionados con la disponibilidad y estructura química de las fuentes de energía, aunque se requiere que el medio disponga de una fuente de nitrógeno para síntesis proteica microbiana (Murry *et al.*, 1984).

#### **4.1.9. pH y Temperatura**

*Frankia* sp. presenta niveles de crecimiento en pH entre 4,5 y 8, valores de tolerancia altas para los organismos del suelo, con un óptimo de crecimiento en 6,5 (Burggraaf & Shipton 1982). La respuesta de *Frankia* sp. a la temperatura indica que es una bacteria mesófila, con un rango entre 28 y 36 °C. Algunos aislamientos crecen a 37 °C y se presenta lento y bajo crecimiento a 15 °C.

Analizando la capacidad de tolerancia al pH de los aislados, el crecimiento de cepas de *Frankia* sp. fue evaluado a través del peso seco, las proteínas totales y el total de ATP, bajo condiciones de diferentes temperaturas y pH. La producción de la proteína fue el método más sensible para cuantificar el crecimiento microbiano de *Frankia* sp., y fue seleccionado para realizar la evaluación periódica del crecimiento de *Frankia* sp. La temperatura óptima para el crecimiento de las cepas LDAgpl y AvcII de *Frankia* sp. fue de 30 °C, mientras que para la cepa CpII fluctuó entre 30 °C y 35 °C. No se observó crecimiento a 40 °C y se observó crecimiento a 10 °C, reportado por las cepas CpII y LDAgpl durante un período de crecimiento de 39 días. El rango de crecimiento de pH fue entre 6 y 8. El óptimo para cepa LDAgpl fue entre

6,5 y 7, para las cepas AvcII y CpII estuvo cerca de 6,5. Se observó aumento de la biomasa en algunos aislados en el pH de 4.6 y por encima de 8 (Burggraaf & Shipton, 1982).

Rey (2006) obtuvo el mayor crecimiento de las cepas de *Frankia* sp. en pH de 6,8, con una tolerancia al nivel ácido (4,5). Murry *et al.* (1984), encontraron que el óptimo pH para la actividad de la nitrogenasa medida a través de la técnica de reducción de acetileno (ARA) y la cinética de crecimiento de *Frankia* sp. fue cercana a un pH de 6,7 y que la mejor actividad de la nitrogenasa se presentó a pH de 8.

#### **4.2. Polisacáridos**

Los polisacáridos “son polímeros compuestos de moléculas formadas por unidades simples y repetitivas de azúcares unidos por enlaces glucosídicos que pueden ser lineales o ramificadas. Se encuentra entre los glúcidos y cumplen diversas funciones especialmente en reservas energéticas y estructurales” (De los Ángeles, 2016). Llegan a tener un peso molecular elevado, que depende de los residuos o unidades de monosacáridos que lo conforman (Saldarriaga *et al.*, 2007).. Los polisacáridos son sustancias de gran interés en la industria y son clasificados de acuerdo a su función como reserva o estructural. Entre los polisacáridos de reserva son el almidón, el glucógeno y los dextranos. Los polisacáridos estructurales son la celulosa, los xilanos, pectinas, carragenatos y goma.

En los últimos años, la preocupación de la contaminación ambiental a puesto de manifiesto la importancia del uso de compuestos biodegradables, a partir de materias primas de origen natural, combatiéndose en una mejor opción, dada las características que estos compuestos

cumplen desde el punto de vista ecológico. Los polímeros se pueden clasificar según su fuente, entre los más empleados comercialmente se pueden encontrar:

#### ***4.2.1. Polisacáridos Vegetales***

Presentan variedad de composición química, propiedades y procedencia. El almidón, goma arábiga o goma garrofin, que constituye el tejido de almacenamiento más importante en las plantas, la celulosa y la pectina que cumplen una función protectora frente a infecciones microbianas. “Se obtienen a partir de semillas, exudados de plantas y subproductos vegetales” (Saldarriaga *et al.*, 2007).

#### ***4.2.2. Polisacáridos de Algas Marinas***

En general las algas poseen en su estructura varios compuestos que, dependiendo de la especie varía en composición química, estructural y nutricional, entre los compuestos están los fenólicos, carbohidratos, ácidos grasos, péptidos, glicolípidos y otros como el ácido acrílico y dicetonas (Mata, 2006). Los polisacáridos es uno de los compuestos principales de las algas principalmente en las algas verdes cumplen un papel similar que en las plantas dando mayor flexibilidad la cual es importante en la fuerza y movimientos a los que se encuentran sometidos en su medio ambiente (Peso *et al.*, 2012).

### **4.2.3. Polisacárido de Origen Microbial**

Los productos de origen microbial se han empleados durante muchos años, actualmente, su uso se ha incrementado como una alternativa competitiva y amigable con el medio ambiente (Mata, 2006).

Los biopolímeros se dividen en aquellos basados en recursos renovables y degradables que cumplen los criterios y normatividades científicamente aceptadas como producto biodegradable o compostables (Saldarriaga *et al.*, 2007). Teniendo su fuente, los biopolímeros que se emplean en la industria se han dividido en tres subgrupos: polímeros basados en recursos renovables (celulosa y almidón), polímeros biodegradables basados en monómeros bioderivados como el aceite vegetal y ácido láctico obtenidos de las plantas y el tercer grupo y el que se enmarca dentro de esta investigación los biopolímeros sintetizados por microorganismos polihidroxicanoatos (PHA).

### **4.3. Polímeros Producidos por Microorganismos**

Los polisacáridos de origen microbiano se visualizan con gran interés en el campo industrial a nivel farmacéutico, alimentos y petróleo. Su uso se basa por dos características principales: la capacidad para alterar el flujo de agua y la posibilidad de formar geles (Lancheros *et al.*, 2002).

Algunos de esos biopolímeros cumplen la misma función mientras que otros son específicos de algunas especies y cumplen funciones biológicas distintas. Respecto a su localización celular, pueden estar intra y extracelular. Los biopolímeros de tipo polihidroxicanoatos (PHA) son poliéster sintetizados por algunas bacterias que los acumulan

como reservas de carbono y energía en forma de gránulos intracitoplasmáticos, constituidos por unidades repetitivas de diferentes hidroxiácidos o mezclas de ellos. En la pared celular, sirven para fines estructurales y de protección entre ellos se encuentra los ácidos teicoicos (Nwodo *et al.*, 2012).

Los PHAs pueden ser sintetizados a partir de diferentes sustratos entre los cuales se incluyen los desechos agroindustriales de bajo costo, generando una gran diversidad de PHAs, dependiendo del microorganismo, la fase de crecimiento y el sustrato. Los PHAs tienen un alto grado de polimerización, con un grado de cristalinidad en el rango de 60 a 80% son activos óptimamente por un quinto carbono, isotácticos e insolubles en agua, características que los hacen muy competitivos con el polipropileno y otros plásticos derivados del petróleo (Valero *et al.*, 2013).

Fuera de la célula, los biopolímeros extracelulares son más abundantes, pueden adoptar una forma de capa cohesiva unida covalentemente, denominada cápsula o competentemente excretada en el ambiente como limo. Algunas veces estas cápsulas sirven como adherentes de las células a las superficies y pueden producirse en exceso, cuando hay altas concentraciones de azúcares como reserva de carbohidratos pueden ser metabolizados posteriormente (Femming & Wingender, 2010).

En efecto, la estructura y funcionalidad de los de los EPS se han puesto en evidencia a través de los diferentes estudios, entre ellos, se incluye la adherencia de las células a las superficies, migración en agua subterránea, envoltura de protección contra predadores, protección de lavado o desecación en suelo como ocurre en bacterias del suelo, ataque de agentes

antimicrobianos de plantas o animales, protección contra ambientes salinos, bajas temperaturas como es el caso de comunidades que viven en el mar frío y otras comunidades marinas (Nwodo *et al.*, 2012).

El avance tecnológico ha permitido el descubrimiento de la utilidad de los polímeros bacterianos, lo que ha asegurado un gran número de aplicaciones industriales en todos los sectores. Uno de los factores de gran importancia está la biocompatibilidad inherente y la aparente naturaleza no tóxica de algunos de estos exopolisacáridos.

#### ***4.3.1. Exopolisacáridos Microbianos***

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros heterogéneos, que contienen un amplio rango de carbohidratos, así como sustituyentes orgánicos e inorgánicos. Son identificados por su capacidad de producir soluciones viscosas en medio acuoso (Moreira *et al.*, 2003).

Los polisacáridos microbianos son sintetizados y secretados al entono o extracelularmente por enzimas ancladas en la pared celular. Se presenta una alta diversidad y son categorizados por su estructura química, funcionalidad, peso molecular y enlaces de unión (Margesin & Miteva, 2008).

Los EPS están agrupados dentro de cuatro clases: polisacáridos, polianhidros inorgánicos (como los polifosfatos), poliéster y poliamidas. Están compuestos principalmente de “homopolisacáridos o heteropolisacáridos muy ramificados, entre los que se pueden encontrar pentosas o hexosas tales como, D-xilosa, D-ribosa, D-glucosa, L-ramnosa, Dmanosa, ácido D-glucurónico, D-galactosamina. Diversos EPS presentan

un alto peso molecular entre  $1 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  Da, debido a las cadenas de 25 carbonos” (Mata *et al.*, 2008).

Algunos EPS son macromoléculas neutras, pero la mayoría son polianiónicas debido a la presencia de cualquiera de los ácidos urónicos (siendo el ácido D-glucurónico el más común, otros como los ácidos D-galacturónico y D-manurónico han sido encontrados). Dentro de su composición se cuenta con la presencia de residuos inorgánicos como fosfato o sulfato, también pueden conferir un estado polianiónico.

La composición y estructura se determina por su conformación primaria y la configuración secundaria ordenada suele tomar la forma de hélices; en algunos polímeros la cadena principal está compuesta por enlaces  $\beta$ -1,4 o  $\beta$ -1,3 que puede conferir una estructura rígida, como se ve en la cadena principal celulósica de xantano producido por *Xanthomonas campestris*. Otros enlaces en polisacáridos pueden producir estructuras más 26 flexibles, como los enlaces  $\alpha$ -1,2 o  $\alpha$ -1,6, encontrados en estructuras de dextranos (Nicolaus *et al.*, 2010).

Aunque la composición de EPS y las propiedades físicas y químicas de estos biopolímeros pueden variar mucho, los azúcares son el componente más abundante, representando entre el 40% al 95% de las sustancias poliméricas extracelulares, sin embargo, independientemente de los sustratos de carbono presentes en su composición, estos no parecen funcionar como reserva de energía y los microorganismos no pueden catalizarlos. La mayoría de las bacterias liberan la principal cantidad de EPS durante la fase estacionaria en un cultivo en crecimiento en el laboratorio (Nichols *et al.*, 2005).

Según la funcionalidad se reconocen siete categorías: EPS constructivos o estructurales, absorbentes, tensioactivos, activos, informativos, redox-activos y nutritivos (Flemming *et al.*, 2007). A lo anterior, se suma los EPS involucrados en la resistencia a los bioácidos, en la arquitectura que facilitan la retención de agua, en la protección celular y los que tienen acción tensioactiva que incluyen moléculas con comportamiento anfifílico.

Los EPS constituyen hoy un campo de acción de gran importancia, dada la versatilidad de los microorganismos que pueden sintetizarlos con un número importante que utilizan fuentes renovables o residuos agroindustriales bajo condiciones controladas y con la posibilidad de la manipulación genética, que permite la obtención de productos con mejores propiedades funcionales e incluso mayor cantidad; adicionalmente, son más estables en condiciones extremas como el pH, la salinidad la temperatura, y uno de sus mayores beneficios que son biodegradables; todo ello, compiten de manera importante frente a los biopolímeros obtenidos a partir de plantas y algas, los cuales, presentan desventajas principalmente en la disponibilidad y la cantidad y propiedades requeridas, asociado a factores como la estacionalidad (Fuentes *et al.*, 2013; Öner, 2013).

En la tabla 1 se describen algunos polisacáridos microbianos algunas características el organismo que los produce.

**Tabla 1***Propiedades y atributos de algunos polisacáridos microbianos*

Microorganismo	Polisacárido	Peso molecular	Tipo de polímero	Monómero	Aplicaciones	Propiedades
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Dextranicum, Acetobacter</i> sp.	Dextranos	$10^6$ - $10^9$	Ramificad, Cadenas cortas	D-glucopiranososa	Alimentos, industria farmacéutica.	Alta estabilidad, soluble en agua, biodegradable, estable durante varios años, newtoniano.
<i>Pseudomonas aeruginosa,</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>	Alginatos	$(0,3-1,3) \times 10^6$	Lineal	D-manurónico D-glucurónico (4:1 a 20:1)	Alimentos, medicina	Capacidad gelificante, formación de film
<i>Xanthomonas spp</i>	Xantanos	$(2.0-5.0) \times 10^6$	Lineal con ramificaciones de trímeros ácidos (pentasacárido)	D-glucosa (principal), 6-oacetil-manosa, glucurónico, manosa y piruvato.	Alimentos, industrial del petróleo, farmacéutica, cosmetología productos de cuidado personal	Alta viscosidad. Estable en amplias temperaturas, pH y concentraciones de sal
<i>Rhizobium meliloti,</i>	Curdlan	$5 \times 10^4$ - $2 \times 10^6$	Lineal	$\beta$ - (1,3) glucano	Alimentos, industria	Habilidad de formación

Microorganismo	Polisacárido	Peso molecular	Tipo de polímero	Monómero	Aplicaciones	Propiedades
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		10 <sup>6</sup>		(polímero de glucosa)	farmacéutica, remoción de metales pesado, aditivos concentrados	de gel, insoluble en agua, comestible, no tóxico, tiene actividad biológica.
<i>Acetobacter</i>	Celulosa	~ 10 <sup>6</sup>	Lineal o fibrosa	β-glucosa	Alimentos (fibras digestibles), biomédica.	Insoluble en más de un solvente, alta resistencia a la tensión
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Succinoglicano	5x10 <sup>3</sup> - 1 x 10 <sup>6</sup>		Octasacáridos de glucosa y galactosa 7:1, unido a ésteres de acetato, succinato, y ceto ácido del piruvato.	Alimentos y recuperación de petróleo	Alta viscosidad, estable en ácidos, propiedades pseudoplásticas que permiten una buena suspensión de polvos.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>Gluconobacter hanseii</i>	Glucuronan	6 X 10 <sup>4</sup> – 6 x 10 <sup>5</sup>		Glucosa y ácido glucurónico	Productos de cuidado personal	Capacidad gelificante y de espesamiento

Nota. Fuente Franco (2004), Nwodo *et al.* (2012)

#### **4.3.2. Biosíntesis de Exopolisacáridos Microbianos**

Las diferentes clases de EPS se pueden distinguir basándose en el mecanismo de la biosíntesis y los precursores necesarios. La biosíntesis de EPS incluye tres fases principales: la asimilación de un sustrato de carbono, la síntesis intracelular del polisacárido y su secreción fuera de la célula (Mata, 2006). Las vías biosintéticas bacterianas comprenden captación del sustrato, por la vía metabólica central y la síntesis de polímero. Dependiendo del tipo de sustrato, puede ser tomado por la célula a través de un transporte activo o pasivo, este se cataboliza por la vía de la fosforilación intracelular o puede ser transportado y oxidado a través de la vía oxidativa periplásmica. Esta vía oxidativa solo existe en ciertas bacterias, mientras que la vía de la fosforilación intracelular se encuentra presente en todas las bacterias. Ambos sistemas han sido reportados en bacterias productoras de EPS y pueden funcionar simultáneamente si el sustrato está disponible. En el citoplasma, el sustrato se cataboliza a través del glicólisis y los metabolitos primarios formados se utilizan como precursores para la síntesis de pequeñas biomoléculas (por ejemplo, aminoácidos o monosacáridos) (Alvarado, 2015).

La síntesis de polisacáridos requiere precursores activados que son ricos en energía como, monosacáridos, azúcares difosfato, principalmente nucleótidos (NDP-azúcares), los cuales se derivan de azúcares fosforilados (Saldarriaga *et al.*, 2007). El mecanismo de biosíntesis de EPS depende del tipo de polisacárido. En el caso de homopolisacáridos (por ejemplo, dextrano, levano o mutano) la reacción de polimerización se produce debido a una glicosiltransferasa extracelular que es capaz de transferir una unidad de monosacárido desde un disacárido a una cadena de polisacárido creciente. En el caso de homopolisacárido o heteropolisacárido con unidades de repetición, el montaje de unidades de repetición tiene lugar en el citoplasma a través

de la acción de glicosiltransferasas específicas responsables de la transferencia continua de residuos de azúcar a un transportador lipofílico. Una vez formada la cadena de azúcares se procede a la secreción de EPS fuera de la célula, el cual es un proceso difícil para la bacteria, en la que los polímeros hidrófilos de alto peso molecular, se reúnen en el citoplasma para atravesar la envoltura celular (Alvarado, 2015).

La longitud de los polímeros producidos y su eventual modificación química, es decir, reacciones de acetilación y piruvilación y la adición de sustituyentes fosfato o sulfato están bajo control genético y enzimático (glicosiltransferasas). En contraste con la amplia diversidad de las estructuras moleculares que se encuentran en los EPS, se han reportado las vías para su biosíntesis y exportación en la mayoría de las bacterias Gram negativas de seguir alguno de estos dos mecanismos: la vía dependiente Wzy, en la que la repetición de polímero la unidad se monta en la cara interna de la membrana citoplasmática y se polimeriza en el periplasma, y la vía transportador dependiente de ABC, en el que la polimerización se produce en la cara citoplásmica de la membrana interna (Nicolaus *et al.*, 2010; Finore *et al.*, 2014).

Diversos estudios fisiológicos han revelado el efecto de factores tales como la temperatura, pH, oxígeno y la relación carbono/nitrógeno (C: N) sobre la disponibilidad de los precursores de nucleótidos de azúcar y por lo tanto sobre la producción de EPS. Sin embargo, la regulación de la biosíntesis de EPS es aún muy poco conocida. Es necesario más conocimiento sobre la genética y la bioquímica de la biosíntesis de EPS para ser capaz de diseñar con éxito las propiedades de los polisacáridos mediante la modificación de la composición y la longitud de la cadena (Freitas *et al.*, 2009; Finore *et al.*, 2014).

#### 4.4. Estado del arte del Exopolisacárido de *Frankia* sp.

Bradley Moore del Instituto Oceanográfico Scripps, en el 2011 publicó en la revista *Microbiología Aplicada y Ambiental*, que el simbiote bacteriano fijador de nitrógeno *Frankia* sp. es un microorganismo promisorio, debido a su capacidad de generar productos naturales, especialmente por ser microorganismo del suelo y su capacidad de vivir de manera libre y asociada con plantas actinorrizas y la interacción positiva que presenta con otros microorganismos del suelo. Entre los productos que han sido reportado, se encuentra la generación de pigmentos, agentes anticancerígenos, ácido indol acético, flavonoides, producción de poli-b-hidroxibutirato (PHA), exopolisacáridos, fijación biológica del nitrógeno de manera libre o asociada, producción de antibióticos, entre otros productos que son útiles para la industria (Berry *et al.*, 1989; Lechevalier & Lechevalier; 1990; Diouf *et al.*, 2003).

En este sentido, Bassi & Benson (2007) reportaron la producción de gránulos insolubles en la cepa de mediante imágenes por microscopía electrónica de transmisión *Frankia* sp. Ccl3 después de seis de crecimiento, los cuales según Tian *et al.*, (2020) son gránulos de poli(hidroxibutirato) (PHB), los cuales son empelados como reserva de carbono y energía en condiciones de algún nutriente esencial para las bacterias, en el caso de *Frankia* sp.

Al igual que los actinomicetos del suelo *Frankia* sp. cumplen una función importante en la descomposición de residuos orgánicos y principalmente por la incorporación de nitrógeno en el suelo de manera libre o asociada. Entre los aspectos está la capacidad de producir y secretar o exudar de EPS (Cano, 2011). En su medio natural, por lo que, la producción de altos niveles de EPS permite a las plantas soportar mejor los entornos en los que vive; a nivel de suelo forman

agregados y alteran su porosidad la cual está directamente relacionada con la transferencia del agua en el suelo hacia las raíces. De igual manera, ayudan a mantener la película de agua requerida por la actividad fotosintética y el crecimiento de las plantas, mejora el proceso de aireación del suelo y la infiltración y cubrir y proteger a las raíces contra el ataque de fitopatógenos (Noumavo *et al.*, 2016).

Las investigaciones de los EPS producidos por *Frankia* sp., se han fundamentado principalmente para entender los mecanismos simbióticos, con sus hospederos, para lo cual se ha estudiado en gran cantidad los genes involucrados en las señales moleculares entre el hospedero y el microsimbote que son determinantes en esta relación (Kucho *et al.*, 2010).

En este sentido, se ha determinado que la producción de los EPS, está altamente correlacionada con el proceso de reconocimiento y de infección de las células radiculares de especies como actinorrizas como *Alnus*, *Casuarina*, *Comptonia* y *Myrica* y *Frankia* sp. (Diouf *et al.*, 2003). En este sentido se sabe que la comunicación bioquímica y molecular entre *Frankia* sp. y el hospedero inicia con señalizaciones selectivas que estimulan o atraen a los organismos con los cuales se establecen, produciendo una liberación de exudados radicales ricos en vitaminas, azúcares, enzimas. La composición de estos exudados difiere entre especies de plantas y microsimbote (Noel *et al.*, 1984; Orozco, 1999).

Burggraaf & Shipton (1983) y Cerémonie *et al.* (1999) reportaron inductores de la deformación de los pelos radiculares en el sobrenadante del medio de *Frankia* sp., sustancias activas que presentaron una alta concentración ( $10^{-5}$  M) con una biosíntesis similar a los flavonoides, aunque, según estos autores, diferente a la ocurrida en los factores NOD en la

interacción rizobios-leguminosas (Benson & Silvestre, 1993).

Con el fin de estudiar la síntesis de polisacáridos en *Frankia* sp. Lee *et al.*, (2013) analizaron por q-RT-PCR la biosíntesis de azúcares y EPS, obteniendo 28 genes relacionados se ha determinado que los EPS producidos por *Frankia* sp. Los autores concluyeron que la cantidad de EPS aumenta de forma independiente a la regulación transcripcional, a las condiciones de nutricionales y a la fase de crecimiento microbial. Los EPS reportados por estos autores fueron neutros, compuestos por D-glucosa, D- galactosa y D- manosa en relaciones 1:3:2, formando unidades repetidas de hexasacáridos con características muy similares al curdlan.

En condiciones *in vitro*, se conoce la alta producción de EPS y taninos (Rey, 2015) que afectan de manera significativa los análisis genéticos. Para efectos de este estudio, precisamente estos productos se convierten en un atractivo importante.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo General

Obtener aislamientos de *Frankia* sp. a partir de nódulos de *Alnus acuminata* con potencial de producción de exopolisacáridos y conocer la composición química y propiedades funcionales.

### 5.2. Objetivos Específicos

Para el desarrollo del objetivo general, se plantea realizar los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar, identificar y seleccionar cepas de *Frankia* sp. productoras de exopolisacáridos.
2. Seleccionar las cepas de *Frankia* sp. de mayor producción de exopolisacárido bajo diferentes parámetros.
3. Analizar y cuantificar la producción de exopolisacáridos obtenidos de cepas nativas de *Frankia* sp.

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1. Localización

La investigación se realizó en el laboratorio de Investigación Grupo de apoyo a la investigación y desarrollo agroalimentario de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial en la Universidad de Nariño ubicada en la ciudad de Pasto-Colombia.

### 6.2. Objetivo 1. Aislar, Identificar y Seleccionar Cepas de *Frankia* sp. Productoras de Exopolisacáridos

#### 6.2.1. Recolección de Nódulos

Las muestras se recolectaron de raíces noduladas de *Alnus acuminata* H.B.K., nativos del Departamento de Nariño en los municipios de Tangua y Pasto (Tabla 2 y Figura 9), zonas que fueron seleccionadas por estar incluidas en proceso de reforestación dentro del proyecto “Incorporación de la especie *Alnus acuminata* H.B.K. en sistemas silvopastoriles para la producción ganadera sostenible del trópico alto Colombiano”, financiado por MINCIENCIAS año 2002.

**Tabla 2**

*Información general de las zonas de recolección de las muestras en Nariño*

Propietario	Municipio	Vereda	Finca	Lote	m.s.n.m	Temp./ anual
-------------	-----------	--------	-------	------	---------	-----------------

<b>Miguel Santacruz</b>	Pasto	Tomboloma	Itaipu	Cercado alisos	2760	12 °C
<b>Julio Omar Ramírez</b>	Tangua	Cubijan Bajo	Las Kuriquingas	Los alisos	3110	12.8 °C

**Figura 9**

*Mapa de las zonas de recolección de nódulos de *Alnus acuminata* en Nariño*



Fuente: Gobernación de Nariño mapa, 2021 Fuente: Google Earth

### **6.2.2. Clasificación de las Zonas de Influencia del Departamento de Nariño**

Las zonas de influencia de este estudio pertenecen al bosque andino ubicados entre los 2300 y los 2900 m.s.n.m. y al bosque alto andino que se consideran como la franja comprendida entre los 2900 y los 3800 m.s.n.m. (Tovar & Rubio, 2001). Para describir las características generales de las zonas de influencia fueron consultadas en el estudio de clasificación de suelos y

zonificación general de tierras del IGAC (1985ab y 2000) y la clasificación según Holdridge (1996).

El municipio Tangua en Nariño se encuentran ubicados en el piso altitudinal Montano, caracterizado por biotemperaturas medias entre los 8 y 18°C, precipitaciones de 500 a 1.000 mm/año y una altura de 2403 msnm (<https://es.weatherspark.com/y/20648/Clima-promedio-en-Tangua-Colombia-durante-todo-el-a%C3%B1o>). Esta zona de vida se conoce comúnmente como páramo. La formación de Usme fue en la época del Paleógeno en límites con el Neógeno; se distinguen dos partes: Una inferior constituida esencialmente por lodolitas con intercalaciones de capas de arenitas finas y una parte superior compuesta por arenitas de cuarzo de grano grueso y conglomerados de cuarzo. Presenta un relieve ondulado escapado, con pendientes complejas. Los suelos están formados a partir de materiales heterogéneos, localmente influidos por cenizas volcánicas y/o materiales orgánicos, presentan baja evolución, son generalmente superficiales y de baja fertilidad. Las condiciones climáticas y la localización geográfica hacen de estas tierras, áreas estratégicas para la conservación de las aguas, la fauna y la flora de los ecosistemas de páramo.

El Municipio de Pasto se clasifica como bosque seco montano bajo (bs-MB), esta zona se caracteriza climáticamente por presentar biotemperaturas medias entre 12 y 18°C y lluvias inferiores a 1.000 milímetros al año; ocupa una franja altitudinal que va desde los 2.000 hasta los 3.000 m. La evapotranspiración promedio anual en esta zona oscila entre 650 y 690 mm. Son de relieve plano a ondulado, con pendientes hasta del 12%. Los suelos formados a partir de materiales heterogéneos o con influencia variable de cenizas volcánicas, presentan baja evolución son generalmente profundos bien drenados y de fertilidad moderada.

### 6.2.3. Recolección de Muestras de Suelo y Raíces Noduladas en *A. acuminata* en Nariño

La recolección de las muestras de los nódulos de *A. acuminata* fue acorde a lo planteado en la metodología de Peck & Melsted (1973) y Salinas & García (1985), teniendo en cuenta los siguientes criterios: muestra representativa de las raíces nodulas, evitar la contaminación, identificar la muestra con los datos de recolección y transportar las muestras al laboratorio lo más pronto posible (Figura 10).

#### Figura 10

*Muestras recolectadas de nódulo de raíces de A. acuminata*



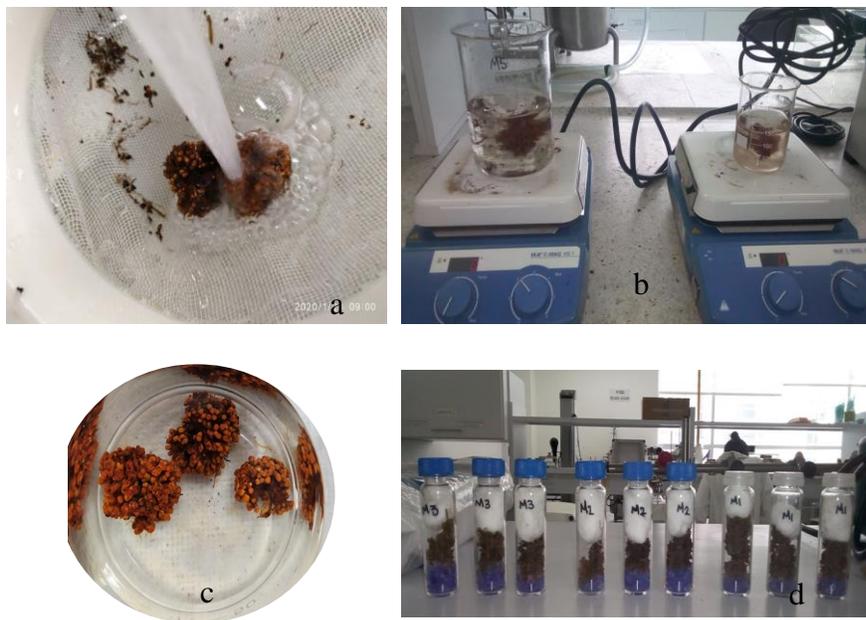
### 6.2.4. Lavado y Desinfección de Nódulos

Debido la morfología irregular que presentan los nódulos de *Frankia* sp. y garantizar la limpieza, se empleó la metodología planteada por Schwintzer & Tjepkema (1990) y Sarma *et al.* (1998). Con esto se pudo obtener nódulos libres de suelo y completamente limpios para ser macerados y/o sembrados en el medio de cultivo tanto líquido como sólido BAP.

Se realizaron lavados con dos soluciones: hipoclorito de sodio al 10% y peróxido de hidrógeno al 10%, adicionando estas soluciones en proporción 1:1 (25% del recipiente) y el resto con agua destilada hasta cubrir totalmente el nódulo y se llevaron a agitación constante durante media hora aproximadamente. Se realizó series continuas de lavados hasta contar con la total remoción del suelo. Posteriormente, se lavaron con abundante agua hasta la remoción total del hipoclorito y el peróxido de hidrógeno y se pasaron por una bomba de vacío para retirar la humedad. Finalmente, se conservaron en frascos estériles con sílica gel y algodón, hasta su uso como lo indica en la (Figura 11).

### Figura 11

#### *Desinfección y conservación de nódulos*



*Nota.* a. Lavado de nódulos. b. Inmersión para desinfectar nódulo. c. Lavado en agua. d. Conservación de nódulos desinfectados.

Los nódulos desinfectados fueron cortados en lóbulos, a partir de los cuales se procedió a macerarlos bajo esterilidad como lo indica en la (Figura 12). El producto macerado fue sembrado en medio sólido benzil amina purina (BAP) modificado por Murry *et al.* (1984), que contenía  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mM, 7;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  mM, 3.4;  $\text{NH}_2\text{Cl}$  mM, 5; Napropionato mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mM, 5;  $\text{MgSO}_4$  mM, 0.1;  $\text{CaCl}_2$  mM, 0.07;  $\text{FeNaEDTA}$  mM, 10 mg / 1; biotina, 450  $\mu\text{m}$ / 1 y oligoelemento (Anexo 1).

### Figura 12

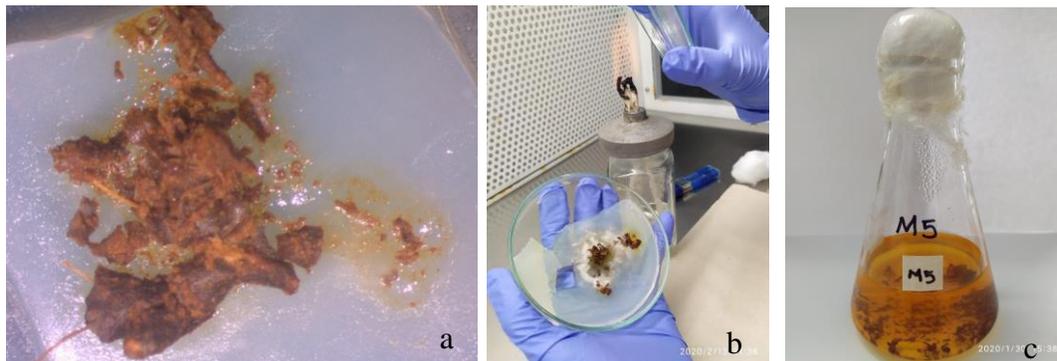
*Macerado de cortes de nódulos para siembra y aislamiento de Frankia sp.*



Los medios fueron llevados a incubación por un periodo de 2 a 4 meses, con vigilancia continua, hasta observar el crecimiento de las colonias. Durante este periodo se realizó seguimiento con anotaciones quincenales de las características macro y microscópicas de las colonias y de los aislados obtenidos. Se descartaron las colonias que presentaron contaminación. Las cepas presuntivas del género fueron resembradas en medio líquido BAP, con el fin de continuar su crecimiento y conservación (Figura 13).

### Figura 13

*Aislamiento de cepas de Frankia sp. en medio sólido (a y b) y líquido (c)*



Con el fin de disminuir la contaminación asociado por el lento crecimiento que presentan las cepas de *Frankia sp.* se adicionó en 5 ug/mL estreptomycin sulfato y nistatina como inhibidor de agentes contaminantes que no afecta el crecimiento de *Frankia sp.* (Lechevalier & Lechevalier, 1990).

#### **6.2.5. Codificación de las Cepas de *Frankia sp.* Aisladas**

Las cepas seleccionadas dentro del género fueron codificadas utilizando el sistema de clasificación planteado Lechevalier (1984), que contempla la asignación de código, resultado de la combinación de tres letras y un número consecutivo.

Como primera letra se empleó la **C** de Colombia, la segunda letra por Departamento de recolección: Nariño: **n**. Como tercera letra la zona de recolección de la muestra dentro del departamento, seguido de numero seriales a las cepas que finalmente cumplieron con las características propias de la especie (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Codificación de cepas de Frankia sp. aisladas*

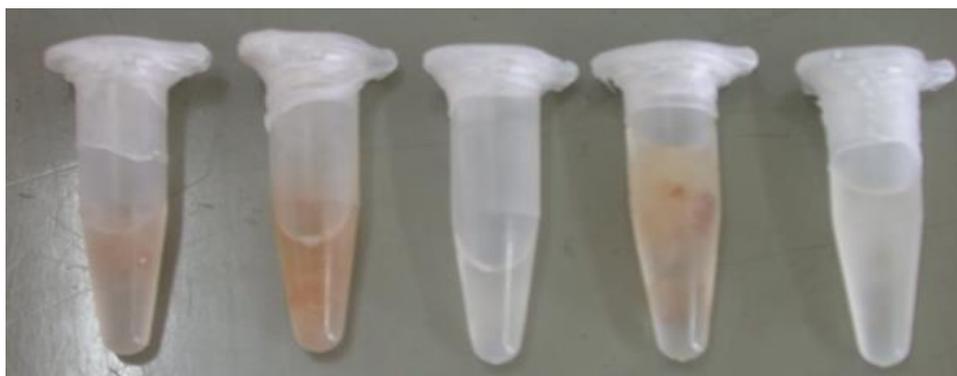
C: Colombia	
n: Nariño	
Tangua (t)	Cnt(n)
Pasto (p)	Cnp(n)
n: Corresponde al número de cepas aisladas	

#### 6.2.6. Crio-conservación y Activación de las Cepas

Las cepas de *Frankia sp.* fueron crio conservadas en el medio líquido BAP más glicerol (500 *ul* + 150 *ul* glicerol 10 %) y se mantuvieron en refrigeración a una temperatura 4 °C (Rey, 2006), (Figura 14).

**Figura 14**

*Crioconservación de cepas de Frankia sp.*



### **6.2.7. Activación de las Cepas de *Frankia* sp.**

Para realizar todas las pruebas planteadas en el estudio, las cepas fueron activadas utilizando Erlenmeyer de 500 mL y medio BAP, denominado cultivo stock, con agitación constante a 180 rpm, una temperatura de 36 °C y pH 6,5.

### **6.2.8. Identificación de Cepas Dentro del Género de *Frankia* sp.**

La primera selección de cepas se realizó teniendo en cuenta características propias del género de *Frankia* sp. según lo descrito por Brunchorst (1886). Adicionalmente, se incluyó la capacidad de producción de exopolisacáridos.

- **Características macroscópicas:** Se describió la morfología de las colonias como forma, color, forma del micelio y producción de EPS o geosmina. Se realizó registro fotográfico de las colonias por medio de Estereoscopio (Zeiss Stemi 305) para mayor acercamiento y en cámara común.

- Formación de micelio no aéreo sobre medio sólido.
- Crecimiento aerofílico y microaerofílico en medio líquido.

- **Características microscópicas:** La caracterización microscópica se realizó por medio de tinción de Gram y tinción de azul de tripán, verificando la presencia o ausencia de esporangios multiloculares y esporas, hifas septadas y la formación de vesículas fijadoras de nitrógeno.

- Producción de pigmentos: Corresponde a la formación de pigmentos intra y extracelulares
- Color: R: Rojo, A: Amarillo, C: Café. B: Blanca.
- Pigmentación: Presencia (+), Ausencia (-).

- Pigmentos celulares: Presencia (+), Ausencia (-).
- Pigmentos solubles: Presencia (+), Ausencia (-).
- ***Formación de EPS***
  - Presencia (Si), Ausencia (No).
  - Color. Por reconocimiento visual se identificó color café y blanco translucido.
  - Elasticidad con asa: Alta, Media, Baja.
  - Cantidad: Alta, Media, Baja.

### **6.3. Objetivo 2. Seleccionar las Cepas de *Frankia* sp. de Mayor Producción de Exopolisacáridos Bajo Diferentes Parámetros**

#### ***6.3.1. Extracción y Determinación de la Cantidad de EPS Bajo Diferentes Metodologías***

Como se indicó a lo largo de este documento, los estudios relacionados con la producción de exopolisacáridos de *Frankia* sp., se han basado en el entendimiento de la interacción como microsimbote, en este sentido, en bacterias que generan relación mutualista con plantas se han desarrollado sistemas que les permiten invadir y establecer infecciones en sus respectivos hospedadores, por ejemplo, los EPS producidos por rizobios cumplen funciones en la tención de O<sub>2</sub> requerido para procesos relacionados con la actividad de la nitrogenasa (Jain *et al.*, 1990). Es por ello que los estudios relacionados con los EPS para uso industrial generado por este microsimbote, requirió que algunas metodologías debieran ser estandarizadas y validas con el fin de seleccionar las mejores respuestas dieran bajo las condiciones de laboratorio.

La evaluación para determinar la metodología que permitiera obtener la mayor cantidad de EPS bajo las condiciones de laboratorio disponible, se realizó con la cepa Cnp1, la cual fue seleccionada porque en su momento contaba con una alta producción de biomasa y baja contaminación. Se partió de un cultivo stock en Erlenmeyer de 500 mL, medio BAP, con agitación constante a 180 rpm y 36 °C. El análisis se realizó a los 15 días de crecimiento.

Se partió de cuatro metodologías propuestas por Fuentes *et al.* (2013), Quesada *et al.* (1993), Alvarado (2015) y Lee *et al.* (2013), las cuales se describen de manera detallada en el anexo 2. Como se indica en la tabla 4, las metodologías presentan diferencias entre ellas específicamente en: el tiempo y revoluciones por minuto de la centrifugación y en la temperatura y forma de secado.

**Tabla 4**

*Diferencia de las metodologías para la extracción de EPS*

Autor	1 <sup>era</sup> Centrifugación	Tiempo (minutos)	Concentració n de etanol	Temperatur a etanol (°C)	Decantado (Horas)	2 <sup>da</sup> Centrifugación	Tiempo (minutos)	Secado EPS
Fuentes <i>et al.</i> , 2013	5000	30	96%	4	24-48			Temperatura ambiente
Quesada <i>et al.</i> , 1993	10000	60	96%	4	12	7000	10	Liofilización
Alvarado, 2015	4300	15	96%	20	16	4300	15	Liofilización
Lee <i>et al.</i> , 2013	15000	30	70%	4	24	15000	30	Temperatura ambiente

Adicionalmente, al análisis del rendimiento en gramos de los EPS, se analizó a la resuspensión el contenido de carbohidratos por absorbancia utilizando la metodología de Du Bois *et al.* (1956) (Anexo 4).

Bajo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos (metodologías), una cepa y tres replicas por tratamiento, se realizó el análisis para seleccionar la metodología de mayor sensibilidad para la extracción de EPS de *Frankia* sp. Los datos se analizaron mediante el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = u + T_i + E_{ij}$$

En donde:

**$Y_{ij}$**  = Variable de respuesta del tratamiento (Fuentes *et al.*, 2013, Quesada *et al.*, 1993, Alvarado, 2015, Lee *et al.*, 2013) repetición ( **$j_{1,2,3}$** ): (exopolisacáridos, carbohidratos).

**$u$**  = Respuesta media general.

**$T_i$**  = Efecto del tratamiento  $i$

**$E_{ij}$**  = Error experimental

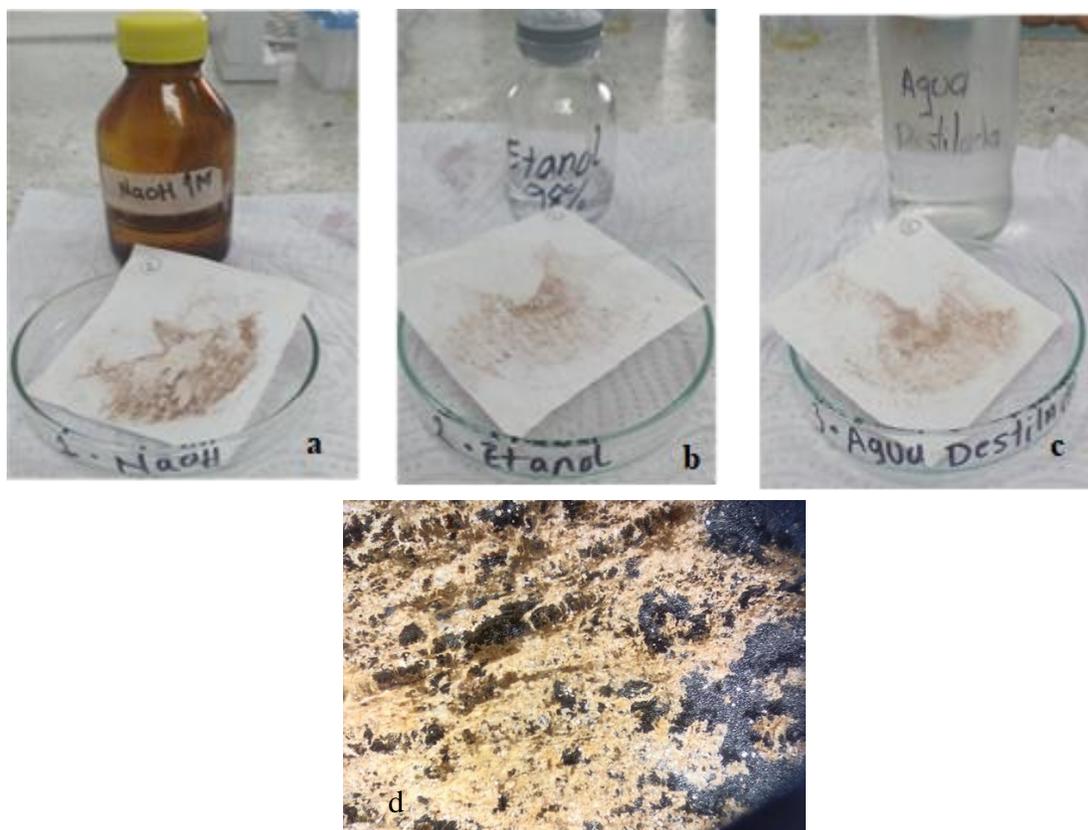
La información recolectada en esta fase se procesó en el programa SAS. La comparación de medias se realizó según la prueba de Tukey (Tukey`s Studentized Range).

Una vez analizada la metodología de extracción de los EPS, se realizó un segundo análisis con el fin de determinar y seleccionar la solución que permitiera recolectar y resuspender los EPS generados por *Frankia* sp. en medio líquido, ya que el sistema de secado genera que adhieran al papel filtro. En este sentido se empleó tres soluciones:

- Etanol al 96%: el etanol permitió resuspender parte importante de los EPS solo durante los primeros minutos, debido a que por las características de evaporación que presenta el etanol, al paso de unos minutos disminuye la capacidad de resuspensión requerida y adicionar más cantidad, termina por deteriorar el producto.
- Agua destilada: el agua no mostró ser una buena solución, ya que no se logró la resuspensión de los EPS.
- NaOH: la solución de hidróxido de sodio al 1N, definitivamente fue la mejor estrategia, permitiendo recuperar el total de los EPS resuspendidos y adheridos al papel filtro (Figura 15).

**Figura 15**

*Ensayos de resuspensión*



*Nota.* **a.** EPS resuspendidos en NaOH 1 N, **b.** EPS resuspendidos en etanol al 98 %, **c.** EPS resuspendidos en agua destilada **d.** Microfotografía EPS suspendidos en NaOH.

### **6.3.2. Selección de Cepas Productoras de EPS**

Con el fin de seleccionar las cepas de *Frankia* sp. con mayor capacidad de producción de EPS, se realizaron microensayos analizando los siguientes aspectos: producción de EPS (g/mL), carbohidratos ( $\mu\text{g/mL}$ ), crecimiento microbial proteínas ( $\mu\text{g/mL}$ ) turbidez (NTU Nephelometric Turbidity, Unit) y humedad (%).

Las 29 cepas de *Frankia* sp. aisladas, que estaban conservadas en medio BAP más glicerol (500 *ul* BAP + 150 *ul* glicerol 10%) a una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ , fueron activarlas en medio de cultivo stock en medio líquido BAP a  $36^{\circ}\text{C}$  con y una agitación constante de 180 rpm por un periodo de 15 días. Los microensayos realizados en frascos de 250 mL con 100 mL de medio líquido BAP y 5 mL de precipitado de células (Carú *et al.*, 2000; Rey, 2006). Se realizaron tinciones en fresco con azul de tripán y tinción de Gram con el fin de verificar la pureza de las cepas y formación de estructuras. La evaluación se realizó a los 15 días de crecimiento (Figura 16).

### **Figura 16**

*Activación de cepas de Frankia sp.*



Las evaluaciones realizadas en estos ensayos fueron las siguientes:

- **Producción EPS:** Total de los EPS (g/100 mL) obtenidos en las diferentes cepas fueron analizados a través de la determinación del producto secado a 30°C hasta obtención de peso constante (Lee *et al.*, 2013). Todas las muestras se realizaron por triplicado.

- **Determinación del contenido de carbohidratos** (Du Bois *et al.*, 1956): Esta técnica consiste en realizar a la muestra de carbohidratos una deshidrogenación seguida de una catálisis ácida utilizando como reactivos fenol y ácido sulfúrico concentrado para formar compuestos heterocíclicos coloridos que son derivados del furano, por lo que al presentar color se pueden analizar mediante espectrofotometría UV a una longitud de onda de 492 nm. Para el tratamiento de la muestra se realizó una solución madre. Previamente se realizó una curva de calibración con un stock de glucosa y a partir de la ecuación de la recta y las absorbancias obtenidas para las muestras, se procedió a la cuantificación de glucosa presente en la muestra (Anexo 4).

- **Contenido de proteínas de los EPS** (Bradford, 1976): se basa en una reacción colorimétrica de proteínas con un tinte, Coomassie Azul Brillante G-250. Las proteínas se unen al tinte en un ambiente ácido, induciendo un cambio espectral del color marrón al azul. Las

interacciones hidrófobas e iónicas con las proteínas de la muestra estabilizan la forma aniónica del tinte, provocando un cambio de color visible. El color azul que se desarrolla es, por tanto, proporcional al contenido de proteínas y se puede medir espectrofotométricamente en 595 nm.

Se construyó la curva de calibración utilizando concentraciones conocidas de proteínas utilizadas como estándar, para medir la concentración de proteína de a muestra (Anexo 3).

- **Turbidez:** Esta fue medida al medio de cultivo (Acebo & Hernández, 2013) (Anexo 5):

La turbidez es la reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas no disueltas de material distinto al propio líquido. Al ser un indicador de apariencia óptica, ocasionado por la dispersión y absorción de la energía lumínica a través del líquido, la turbidez solo puede ser medida usando técnicas ópticas. Se fundamenta en la relación de la intensidad de la luz que incidente y de la luz dispersada por el medio, mediante la ley de Lambert-Beer.

Los promedios de la desviación estándar de los microensayos producción de los EPS, determinación del contenido de carbohidratos de los EPS, contenido de proteína de los EPS y porcentaje de humedad se realizaron por triplicado. La recolección de los datos a los 15 días de incubación. La comparación de las diferencias entre los valores de las 29 cepas fue una prueba de ANOVA de una vía para encontrar las diferencias significativas entre las medias de los datos. La comparación de la información recolectada en esta fase se procesó en el programa Statistic Analysis System (SAS, 1997) y la prueba de comparación de medias por Tukey.

- **Humedad:** La humedad de los EPS está determinada por la pérdida de peso durante el secado. Una vez realizada la extracción del EPS se midió el peso inicial de la muestra (Húmeda)

posteriormente, se dejó secar a temperatura ambiente por 12 horas y se midió nuevamente el peso final de la muestra (Seca). Abajo se indicada la ecuación empleada para calcular el total de agua presente en la muestra, la cual es expresada por una pérdida de peso que se evidencia después del secado (Herrera, 2012).

**X**= Peso inicial muestra húmeda (**g**)

**Y**= Peso final de la muestra (**g**)

$$\% \text{ Humedad} = \left( 1 - \left( \frac{Y}{X} \right) \right) * 100$$

**-Colorimetría:** Se tomó directamente la muestra líquida y se midió en el Colorímetro (CR-5 de Konica Minolta), expresando el color en coordenadas L\*a\*b (Anexo 6).

### ***6.3.3. Cinética de crecimiento versus producción de EPS***

Las cepas de mayor producción de EPS, contenido de carbohidratos y proteínas fueron seleccionadas, para realizar la curva de crecimiento versus la producción de EPS.

Las curvas de crecimiento de las cepas se realizaron en cultivo batch dejando aproximadamente el 60% del espacio de los frascos con aire a fin de garantizar el crecimiento aeróbico. Los frascos se incubaron a 36 °C con agitación constante a 180 rpm. El medio de cultivo líquido empleado fue BAP con glucosa y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. Se realizaron mediciones de crecimiento diarias usando como parámetro de referencia la proteína total por medio del método de Bradford *et al.* (1976) (Anexo 3), lo que permitió establecer la cinética de crecimiento y determinar la fase exponencial de las cepas,

necesario para realizar los microensayos propuestos. La producción de EPS se realizó cada cinco días de evaluación evaluando el peso seco (Anexo 2).

Morfológicamente se realizó un análisis microscópico (Microscopio Zeiss Primostar Binocular) mediante tinciones en fresco con azul de tripán con el fin de analizar la formación de estructuras especializadas producidas en cada etapa de crecimiento de las cepas y tinción de Gram verificando así la pureza de las cepas.

#### ***6.3.4. Evaluación de la Producción de EPS en Diferentes Fuentes de Carbono***

La influencia del tipo de fuente de carbono sobre el crecimiento de las cepas de *Frankia* sp. y la eficiencia de la síntesis de EPS fue realizada en ácido cítrico, almidón, ácido pirúvico, celulosa, extracto de raíz, fructosa, galactosa, melaza, manitol, sacarosa y como control se empleó la glucosa. Estas fuentes se adicionaron al medio BAP según su aporte de carbono teniendo en cuenta la composición promedio de las células  $C_1O_{1.8}N_{0.2}O_{0.45}$  (Atkinson & Mavituna 1983) y la relación C/N presente en medio BAP:

$$0,267 \text{ g NH}_4\text{Cl} \rightarrow 0,00499 \cong 0.005 \text{ mol N}$$

$$10 \text{ g Glucosa} \rightarrow 0,0555 \text{ mol} = \text{C}$$

$$0,005 \text{ mol N} / 0,0555 \text{ mol C} = 0,09 \text{ mol N} / \text{mol C}$$

La evaluación de la producción crecimiento de las cepas se realizaron en cultivo batch dejando aproximadamente el 60% del espacio de los frascos con aire a fin de garantizar el crecimiento aeróbico. Los frascos se incubaron a 36 °C con agitación constante a 180 rpm. El medio de cultivo líquido empleado fue BAP con glucosa y  $\text{NH}_4^+$  como fuente de carbono y nitrógeno, respectivamente. Se realizaron mediciones de crecimiento diarias usando como

parámetro de referencia la proteína total por medio del método de Bradford *et al.* (1976) (Anexo 3). La producción de EPS se realizó cada cinco días de evaluación evaluando el peso seco (Anexo 2).

La evaluación del efecto de las fuentes de carbono sobre el crecimiento microbial y la producción de EPS, se realizó siguiendo un diseño completamente al azar con once tratamientos, tres cepas y tres réplicas por tratamiento, para un total de 99 unidades experimentales. Los datos se analizaron mediante el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + C_j + PC(ij) + \epsilon_{ij}$$

En donde:

$Y_{ijk}$  = Crecimiento de *Frankia* sp. (Cnp1, Cnp10, Cnt12)

$\mu$  = Media general

$P_i$  = Efecto debido a la fuente de carbono

$C_j$  = Efecto debido a la cepa j

$PC(ij)$  = Efecto de la interacción fuente de carbono i y la cepa j

$\epsilon_{ij}$  = Error experimental asociado a la fuente de carbono i y cepa j

La información recolectada en esta fase se procesó en el programa Statistical Analysis System (SAS 1997) utilizando el método de Tukey HSD (Honestly Significant Difference) para la comparación de medias. Las diferencias significativas entre tratamientos de las evaluaciones se realizaron considerando el valor  $p < 0.05$ .

### 6.3.5. Evaluación de la Producción de EPS en Diferentes Fuentes de Nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno en las que se evaluó el crecimiento y formación de estructuras de *Frankia* sp. fueron cloruro de amonio y extracto de levadura y se incluyó un control sin nitrógeno. La concentración utilizada fue de 11,6 g/L teniendo en cuenta que la levadura contiene 8,6% de nitrógeno en 100 g de biomasa.

En el análisis del efecto de estas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento microbiano se empleó un diseño completamente al azar con tres tratamientos, tres cepas y tres réplicas por tratamiento, para un total de 27 unidades experimentales. Los datos se analizaron mediante el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + C_j + PC(ij) + \epsilon_{ij}$$

En donde:

$Y_{ijk}$  = Crecimiento de *Frankia* sp. (Cnp1, Cnp10, Cnt12)

$\mu$  = Media general

$P_i$  = Efecto debido fuente de nitrógeno (fuentes de N y control)

$C_j$  = Efecto debido a la cepa  $j$

$PC(ij)$  = Efecto de la interacción fuente de nitrógeno  $i$  y el cepa  $j$

$\epsilon_{ij}$  = Error experimental asociado al fuente de nitrógeno  $i$  y cepa  $j$

La información recolectada en esta fase se procesó en el programa Statistic Analysis System (SAS 1997), utilizando el método de Tukey para la comparación de medias.

## 6.4. Objetivo 3. Analizar y Cuantificar la Producción de Exopolisacáridos Obtenidos de Cepas Nativas de *Frankia* sp.

### 6.4.1. Actividad Emulgente

Se empleó la metodología descrita por Fuentes *et al.*, (2013). El ensayo se realizó en tubos tapa rosca de base redonda, en los cuales se colocó 1,5 ml de fase oleosa (Aceite de jojoba, oliva, almendras, ricino y girasol) y 1,5 mL de la fase acuosa con polímero extraído de *Frankia* sp. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente. Como control se utilizó Tween 80.

La determinación del porcentaje de emulsión, los tubos fueron llevados a agitación por cinco minutos en un Vortex (Labnet International, VX-200), posteriormente, las muestras fueron dejadas en reposo. La determinación del porcentaje de emulsión se realizó a la hora 1 y a las 24 horas como lo indica en la (Figura 17).

**Figura 17**

#### *Determinación de porcentaje de emulsión*



Para determinar el porcentaje de emulsión se aplicó la ecuación 1, la cual describe la fracción emulsionada (altura de emulsión en centímetros) en función al volumen total de la muestra en centímetros (Aranberri *et al.*, 2006).

$$\% \text{ Actividad emulgente} = \frac{\text{altura emulsión (cm)}}{\text{altura mezcla (cm)}} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

#### **6.4.2. Grado de Dispersión**

Partiendo de la prueba de emulsión se determinó el grado de dispersión, utilizando el tween 80 como control se evaluó en los aceites de jojoba, oliva, almendras, ricino y girasol. El grado de dispersión, permitió determinar el tamaño comparativo de las gotas en la fase interna de la emulsión. La determinación se realizó mediante observación microscópico con objetivo de 10x a la hora y 24 horas. Se realizó procedimiento microfotográfico acoplado la cámara de celular al microscopio. El grado de dispersión que representa el tamaño comparativo de las gotas de la fase interna de la emulsión se terminó según lo planteado por Voight & Bornschein (1982) y Lendínez (2015).

#### **6.4.3. Ensayos de Disoluciones y Ebulloscopia**

Se preparó disoluciones variando la concentración de los polisacáridos utilizando como solvente agua destilada (Franco, 2004). Además de observar el comportamiento de la disolución, se midieron las temperaturas de ebullición de las soluciones con el fin de establecer si esta aumenta con la concentración y se presenta una tendencia lineal que permita tratar de encontrar

el peso molecular de los polímeros por el método de ebulloscopia. Las concentraciones a trabajar fueron expresadas en g/L.

#### 6.4.4. Concentración del Polímero

Para analizar la concentración de los EPS, las muestras fueron sometidas a ebullición en una plancha de calentamiento (IKA Agitadores Magnéticos C-MAG HS 7). Se realizó aumento de la temperatura gradualmente de 10 en 10 °C iniciando en 40 hasta los 90°C. Una vez alcanzado la ebullición, se midió el volumen final y el peso. Así se realizó de manera consecutiva con cada una de las concentraciones que se obtuvieron. Las medidas de viscosidad se realizaron con el viscosímetro marca Brookfield DV 3T Rheometer con la punta ULA (Figura 18).

**Figura 18**

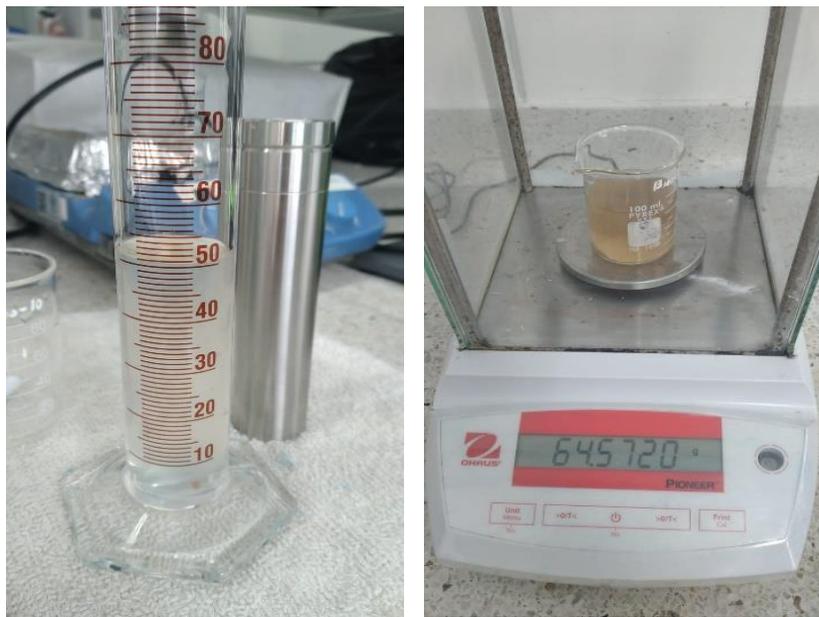
*Medida de viscosidad del EPS*



La concentración del biopolímero fue medida peso/volumen (%). Se aplicó a las muestras un esfuerzo de cizalla entre 2 a 7 Pa, y se aplicó un rango de gradiente de deformación de 0,1 a 150 s<sup>-1</sup> (Figura 19).

**Figura 19**

*Medición de concentración del biopolímero*



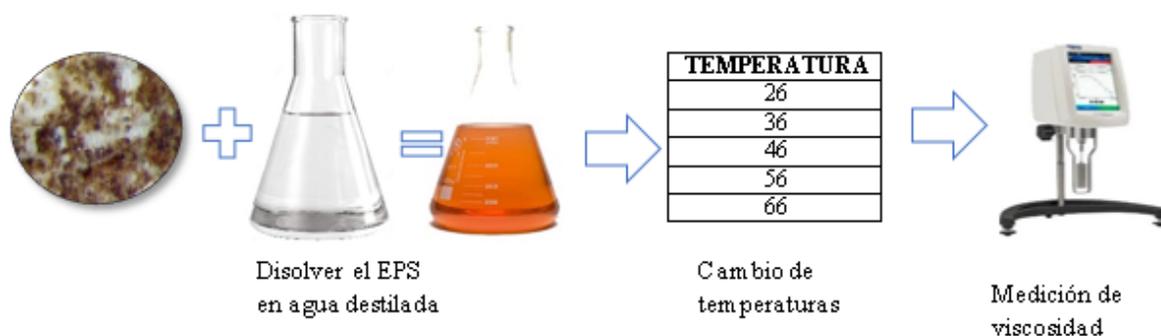
#### ***6.4.5. Efecto de la Temperatura Sobre la Viscosidad***

La muestra se llevó a medición directamente al reómetro (Brookfield DV3T) empleando una punta ULA (Mata, 2006) (Figura 20). Se realizó la evaluación posterior al sometimiento de la muestra a:

- Incremento gradual de temperatura
- Aumento y descenso de temperatura

**Figura 20**

*Determinación de viscosidad del EPS a diferentes temperaturas*



#### 6.4.5.1. Efecto de Congelación-descongelación Sobre la Viscosidad

El efecto de la congelación-descongelación y autoclave sobre la viscosidad fue evaluado en dos muestras diferentes y en tres momentos diferentes. La primera viscosidad se midió a una temperatura inicial de 26°C, Luego se llevó a autoclave a 121°C por 20 min, transcurrido ese tiempo se retiraron de la autoclave y se midió directamente la viscosidad a una temperatura de 87°C y posteriormente las muestras fueron dejadas a temperatura ambiente y se midió la viscosidad a las 24 horas posteriores del auto clavado (Mata, 2006) (Figura 21).

#### Figura 21

*Diagrama metodología para la determinación de viscosidad del EPS con congelación y descongelación.*



#### 6.4.5.2. Efecto de Esterilización en Autoclave de Vapor Sobre la Viscosidad

Para la determinación del efecto de la esterilización se mide la viscosidad antes y después del proceso de auto clavado. Se mide la viscosidad aplicando un esfuerzo de cizalla entre 1 y 5 Pa (Mata, 2006) (Figura 22).

**Figura 22**

*Diagrama general para la determinación de viscosidad de EPS con el efecto de autoclave*

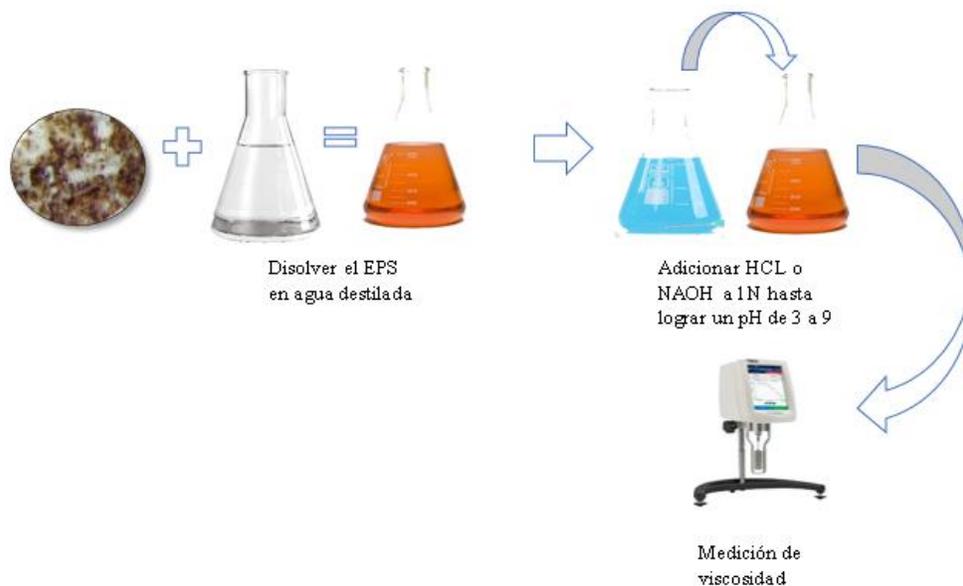


#### 6.4.6. Determinación de Viscosidad de los EPS Bajo Diferentes Niveles de pH

Se tomó la muestra y paso directamente al reómetro (Brookfield DV3T) con la punta ULA, midiendo el efecto del pH sobre la viscosidad, una vez que el polímero se disuelve en agua destilada el pH se ajustó con HCL o NaOH 1N llevando a diferente valor de 3 a 9 (Mata, 2006). El pH se midió en un pH metro (Thermo Orion Star A111) (Figura 23).

**Figura 23**

*Determinación de viscosidades del EPS a diferentes cambios de pH*



#### 6.4.7. Evaluación de la Formación de Biofilms

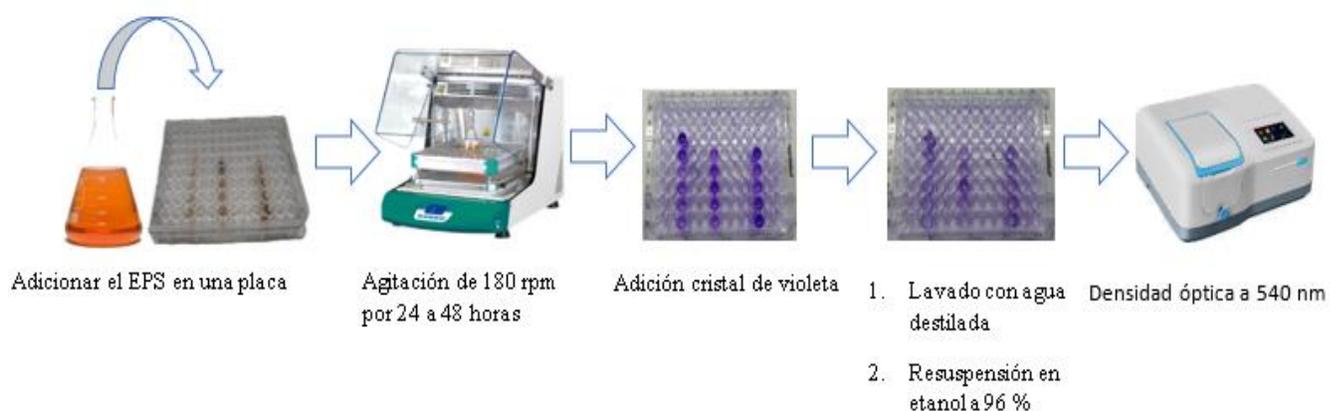
El estudio de la formación de biofilms de las cepas de *Frankia* sp. o biopelículas sobre una superficie inerte se realizó mediante la metodología de tinción con cristal (Marappa *et al.*, 2020). Se partió de un inóculo crecido por 5 días en medio BAP con agitación constante a 36°C. Se transfirió 1 mL de medio inoculado a las placas de microtiter y se llevaron a incubaron a 36 °C y en agitación constante a 180 rpm durante 24 y 48 horas pasado este tiempo se eliminó la parte líquida y se realizó lavado de las placas microtiter con agua destilada estéril.

Las células adheridas a las paredes de las placas fueron teñidas con una solución al 0,5% de cristal violeta en etanol Panreac Applichem® de 95 % (v/v), durante 15 minutos. Posteriormente, se realizó lavado con abundante agua para eliminar el colorante no adherido a las células. Finalmente, los biofilms fueron resuspendidos en etanol al 95% (v/v) mediante agitación vigorosa.

La medición de la suspensión resultante se realizó por densidad óptica en el espectrofotómetro Mapada P1 UV/visible, a una longitud de onda de 540nm. Para cada cepa se empleó como blanco el medio de cultivo sin inocular (Figura 24).

### Figura 24

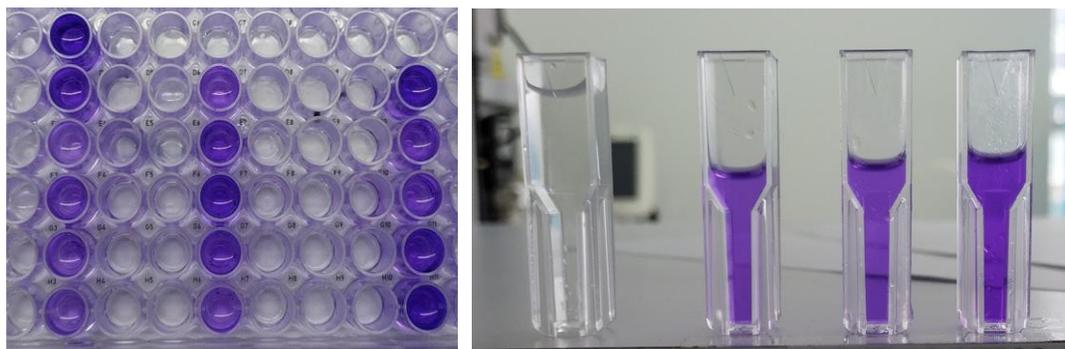
#### *Procedimiento general para la determinación de Biofilms*



En la figura 25 se indica una fotografía de la placa de microtiter empleada para la cuantificación de la formación de biofilms.

### Figura 25

#### *Fotografía de una placa microtiter*



#### 6.4.8. Elaboración de las Biopelículas

Teniendo en cuenta la respuesta obtenida en la producción de EPS y biomasa se seleccionó la cepa Cnp1 para realizar este ensayo.

Para el formulado de los biopolímeros de los EPS obtenidos, se empleó el método de “casting” de Rodríguez & Schobitz (2009) con algunas modificaciones empleadas por el grupo de investigación y desarrollo agroalimentario – GAIDA de la universidad de Nariño (Colombia).

Para la formación de las películas, se trabajó con una solución acuosa del exopolisacárido, glicerol, Tween 80 y cera de abejas, todos los componentes de grado alimenticio (Tabla 5).

**Tabla 5**

*Composición de los biopolímeros evaluados*

Biopolímero	EPS [g]	Glicerol (mL)	Tween 80 (mL)	Cera de abejas (mL)
<b>B1:</b> 30 mL de mezcla de 50:50%	15	15		
<b>B2:</b> 30 mL de mezcla de 40:60%	12	18		
<b>B3:</b> 30 mL de mezcla de 30:70%	6	24		
<b>B4:</b> 30 mL de mezcla de 20:40:40%	6	12	12	
<b>B5:</b> 30 mL de mezcla de 40:30:30%	12	9	9	
<b>B6:</b> 30 mL de mezcla de 30:35:35%	9	10,5	10,5	
<b>B7:</b> 30 mL de mezcla de 25:20:20:35%	7,5	6	6	10,5

Las mezclas formadoras de película fueron homogenizadas hasta tener una solución complementa uniforme. Se ajustó el pH con un rango entre 7 a 8 con NaOH 0,1N. Posteriormente, las mezclas de EPS + aditivo fueron calentadas a 100°C por 1 hora con agitación constante. Finalmente, fue filtrada esta solución. La evaluación se realizó en cajas de Petri, en las cuales se vació de 15 mL de solución y se dejaron en un horno de secado a 36°C por 24 horas.

## 7. Análisis y Resultados

### 7.1. Caracterización de los Nódulos Recolectados

Los nódulos de *Alnus acuminata* recolectados de Pasto y Tangua del Departamento de Nariño (Figura 26), presentaron forma coraloide de color café-amarillento propia de la especie. En las zonas de recolección, se encontraron a poca profundidad, lo que permitió recolectar las muestras fácilmente y sin generar daño a los árboles.

#### Figura 26

*Morfología de los nódulos recolectados en Pasto y Tangua*



## 7.2. Características de las Cepas Aisladas

Las cepas de *Frankia* sp. son clasificadas como microorganismos de crecimiento lento principalmente en la fase inicial, es decir cuando se aíslan del nódulo; en este sentido los primeros estudios no fueron llevados a cabo hasta 1978, impuso que dio un salto importante al conocimiento de esta especie gracias al primer reporte de aislamiento de *Frankia* sp. realizado por Callahan *et al.* (1978) quienes reportaron el primer aislamiento en cultivo del endófito de los nódulos de *Comptonia peregrina*. Posterior a ello, fueron publicados diversos trabajos relacionados con el cultivo de otras cepas. Todas estas cepas fueron morfológicamente relacionadas con otros *Actinomycetes* y por las suficientes diferencias se pudo justificar su clasificación como un género separado el cual se caracteriza por formación de esporangios típicos en los que las esporas no flageladas están formadas por divisiones celulares longitudinales, radiales y tangenciales (Burggraaf *et al.*, 1981).

Las cepas de *Frankia* sp. que han sido cultivadas a nivel de laboratorio, pertenecen a los grupos filogenéticos 1 y 3, del grupo 2 no se han reportado aislamientos. Las cepas del grupo 1 pertenecen al género *Alnus* especie hospedera de las cepas obtenidas en este trabajo. Las cepas de este grupo presentan características similares, entre ellas está la presencia de pigmentación en medios de cultivo con mayor énfasis en antiguos, los cuales tienen a tornarse de colores amarillo, rojo y café, adicionalmente, presentan la formación de pigmentos extracelulares que se liberan en el medio modificando su color.

De igual manera se observan colonias que tienden a ser aerofílicas y microaerofílicas en medio líquido, también se ha identificado la capacidad de fijar nitrógeno *in vitro* y la capacidad de asociarse de nuevo con raíces de sus hospederos, entre otras características.

Bajo observación por estereomicroscopio en las cajas de Petri invertidas las cepas de *Frankia* sp., comenzaron su crecimiento entre la segunda octava semana de sembrados los nódulos. Las colonias se caracterizaron por presentar un crecimiento pleomórfico, con forma de filamentos no aéreos, algunas colonias formaron pigmentos blancos, amarillos y naranjas, similar a los reportes Lechevalier & Lechevalier (1990) y Benson & Silvester (1993) (Figura 27).

### **Figura 27**

*Formación de pigmentos blancos de la cepa de Frankia sp. Cnt6*



El micelio de *Frankia* sp. crecido sobre los fragmentos de nódulos y sobre el medio de cultivo se detectó después de una incubación que oscilo entre la cuarta semana y hasta los 3 meses. La mayor cantidad de biomasa celular se evidenció hacia el cuarto y quinto mes. En este estudio se pudo observar que los nódulos recolectados desinfectados y sembrados inmediatamente, presentaron mejores resultados frente a los recolectados, desinfectados y llevados a conservación por refrigeración (Figura 11).

En términos generales se obtuvo más de un aislamiento por nódulo, en este sentido, se puede estimar que en casi la mitad de las placas sembradas se observó el crecimiento de varias colonias de *Frankia* sp. Inicialmente se obtuvo 58 aislamientos, los cuales fueron incubados para su caracterización. En las primeras etapas del aislamiento, los nódulos fueron numerados y los aislamientos que se originaron en el mismo nódulo se distinguían con letras y número consecutivos, acorde a lo que sugieren Normand & Lalonde (1982).

Los aislamientos del mismo nódulo generalmente mostraron similitud en morfología, producción de pigmentos y fisiología. Para esta investigación se decidió, tomar un aislado para representar el nódulo en la colección de cepas, usando como patrón de selección rápido crecimiento en la activación de las cepas. La reactivación de las cepas o cultivo stock fue exitoso, morfológica y fisiológicamente, estos fueron similares a las cepas parentales.

El tiempo real de crecimiento de las cepas de *Frankia* sp. depende en gran medida del medio utilizado, en este sentido, se sabe que algunas cepas pueden requerir factores de crecimiento tanto para el crecimiento inicial o para el crecimiento continuo como el caso de las aisladas de *A. acuminata* y es por ello que en esta investigación el medio empleado contenía vitaminas y minerales (Burggraaf, 1983; Normand & Lalonde, 1982; Quispel *et al.*, 1983).

En este sentido y con el fin de obtener biomasa celular de los aislamientos suficiente para preparar los inoculantes, se le adicionó al medio líquido BAP extracto de raíz de *A. acuminata* (100 ml /litro). Al observar el crecimiento y morfología de los medios líquidos con y sin extracto de raíz, se evidenció claramente que las cepas con extracto de raíz crecieron más rápidamente, con mayor formación de oligosacáridos y sin contaminación.

Estos resultados coinciden con los reportes de Quispel & Tak (1978); Quispel *et al.*, (1983) y Wolters (1998), quienes manifiestan, que la adición de extractos de plantas, benefician el crecimiento *in vitro*, debido a que poseen sustancias químicas que actúan como componentes activos y nutrientes, en el caso de las raíces de *A. acuminata* se presentan fenoles, minerales y compuestos orgánicos, que en el suelo inhiben el crecimiento selectivamente de patógenos y estimulan bioquímicamente a *Frankia* sp. para su crecimiento (Orozco, 1999).

En la tabla 6, se reportan los análisis de nutrientes presentes en el extracto de raíz empleado para el crecimiento de las cepas de *Frankia* sp. (Anexo 1). Los componentes de minerales que aporta el extracto son el Mo, Co, K, P y Fe, los cuales no están contemplados en el medio BAP. El S, Ca, Cl, B, Zn, Cu, y C son proporcionados en mayor porcentaje y solamente el Mg es ausente. Esto demuestra, que algunos de los niveles de nutrientes podrán llegar a ser reemplazados por la adición del extracto y así minimizar costos y tiempo en la obtención de biomasa celular de *Frankia* sp. debido a que cuenta con gran cantidad de nutrientes esenciales para estimular el crecimiento de *Frankia* sp. de manera libre (Murry *et al.*, 1984).

**Tabla 6**

*Análisis de nutrientes del extracto de raíz de Alnus acuminata*

Nutriente	BAP	EXTRACTO DE RAÍZ		
	(ppm)	ppm	No aporta (ppm)	Aporte (ppm)
<b>Proteína Cruda</b>		0.02%		

<b>Carbohidratos solubles en</b>				
<b>agua</b>		35.8%		
<b>Mg</b>	5	0	5	
<b>S</b>	11	100	-	89
<b>Ca</b>	3	200	-	197
<b>N</b>	71	32	39	
<b>Cl</b>	247	3600	-	3353
<b>B</b>	40	650	-	610
<b>Mn</b>	50	5	45	-
<b>Zn</b>	3	650	-	647
<b>Cu</b>	2	50	-	48
<b>Na</b>	1	nd	-	
<b>Mo</b>	0	83	-	82
<b>Co</b>	0	50	-	50
<b>K</b>	0	100	-	100
<b>P</b>	0	100	-	100
<b>Fe</b>	0	3,5		3,5

\* nd: no determinado

Fuente: Rey, 2006.

Adicionalmente, al incorporar el extracto de raíz en el medio, los cultivos continuaron su crecimiento bajo agitación constante a 180 rpm y a una temperatura de 36 °C. Esto permitió un crecimiento rápido y uniforme de las cepas, lo cual confirma los reportes de Lechevalier *et al.* (1983), quienes mencionan que el proceso de agitación duplica el crecimiento de *Frankia sp.*

Los resultados de los aislamientos obtenidos a partir de los nódulos de *A. acuminata* procedentes de Tangua se indican en la tabla 7 y en las figuras de 28 a la 39 y los procedentes de Pasto se indican en la tabla 8 y en las figuras de la 40 a la 55. El análisis realizado a las cepas fueron basados en observaciones fenotípicas y morfológicas a nivel microscópico (microscopio de luz y estereomicroscopio) y macroscópico.

Un parámetro de gran importancia para la selección de cepas con fines industriales es un rápido crecimiento (Valero *et al.*, 2013), es importante, por lo tanto, incluir este criterio de evaluación, debido a que *Frankia sp.* está clasificada como actinomicetos de lento crecimiento, lo cual se asocia, entre otros factores, a los altos requerimientos nutricionales que limitan su aislamiento en laboratorio y a su morfología filamentosa (Benson & Silvester, 1993). En este sentido y respecto al crecimiento de cepas se clasificaron de acuerdo a su capacidad de producción de biomasa a la tercera semana de incubación, las cepas de crecimiento rápido fueron aquellas que visualmente presentaron alta producción de biomasa en el tiempo de evaluación y las de crecimiento lento fueron las que presentaron baja producción de biomasa durante el mismo periodo. Los aislamientos clasificados como crecimiento rápido fueron Cnp1, Cnp7, Cnp8, Cnp10, Cnp11, Cnp12, Cnp14, Cnp15, Cnt1, Cnt4, Cnt5, Cnt6, Cnt7, Cnt8, Cnt9 y Cnt12, es decir el 50 % de total de los aislamientos obtenidos. Este parámetro es de gran importancia, teniendo en cuenta que las cepas de *Frankia sp.* se identifican por su lento crecimiento.

Todos los aislados obtenidos cumplieron con los criterios morfológicos de las cepas de *Frankia* sp. como lo reporta en la literatura Lechevalier (1984). El crecimiento vegetativo fue filamentosos con ramificación y tabicación o septos (Figuras 31 y 32), con promedios del filamento que variaba según la edad del cultivo entre 0,2 a 1,0  $\mu\text{m}$ , con un engrosamiento ocasional en algunas cepas que fueron menores a 0,1 o superiores a 1,5  $\mu\text{m}$  aproximadamente.

La esporulación es una estrategia adaptativa microbiana para resistir condiciones inhóspitas, crecimiento y dispersión para colonizar ambientes más favorables. Este rasgo microbiano es generalizado en las Actinobacterias, entre ellas, las cepas de *Frankia* sp., las cuales son capaces de producir esporangios ( $\text{Sp}^+$ ) cuando están en simbiosis dentro células huésped y también producir esporangios en cultivo puro (Bethencourt *et al.*, 2019).

Los aislamientos de *Frankia* sp. provenientes de *A. acuminata* producen esporangios, pero el tamaño y la frecuencia difieren entre cepa a cepa (Tablas 7 y 8). En el momento de la evaluación, en algunas cepas no se evidenció la formación de esporangios (Figuras 31 y 32) efecto asociado a la edad del cultivo. Los aislamientos que manifestaron producción de esporangios fueron en Tangua: Cnt4, Cnt8, Cnt10 y en Pasto: Cnp3, Cnp5 y Cnp8. La forma de los esporangios también varió entre las cepas y estado de crecimiento. En la mayoría de las cepas los esporangios se desarrollaron como hinchazones laterales o terminales en las hifas por ejemplo la cepa Cnt1; también se presentaron de diferentes formas como: redondas en los aislados Cnt4, Cnt9, Cnt7, pedunculadas en la cepa Cnp8 o en forma de cono en los aislados Cnt10, Cnp6, Cnp12 (Figuras 31 y 32).

La estructura especializada y encargada del proceso de fijación biológica de nitrógeno vesículas, se observó en ocho cepas de Tangua (Cnp6, Cnp7, Cnp11, Cnp12, Cnp13, Cnp14, Cnp15) y siete en Pasto: Cnp6, Cnp7, Cnp11, Cnp12, Cnp13, Cnp14 y Cnp15. En condiciones *in vitro* la formación de vesículas se asocia a limitaciones de  $\text{NH}_3^-$  y a condiciones aeróbicas, motivo por el cual las cepas toman este elemento del aire fijándolo e incorporándolo al medio de cultivo (Huss-Danell, 1997). Estas vesículas están rodeadas por una envoltura gruesa compuesta por docenas de capas de lípidos hopanoides (Berry *et al.*, 1993). Dado que la envoltura funciona como una barrera para la penetración del oxígeno, la nitrogenasa, que se expresa dentro de las vesículas, conserva su actividad (Benson & Silvester, 1993).

Lechevalier & Lechevalier (1989), reportan que los aislamientos de tipo B, presentan un crecimiento sumergido en el medio líquido, por lo cual, son aerofílicas y que este tipo de aislamiento no puede ser mantenido en medio inclinado. Los cultivos de tipo A, son microaerofílicas y se caracterizan por formar un anillo en la superficie del medio; adicionalmente, puede ser mantenidos en medio inclinado.

El tipo de respiración identificado en medio de cultivo líquido estático durante una semana de evaluación fue microaerofílico el cual se presentó en las cepas Cnt1, Cnt2, Cnt3, Cnt4 y Cnt7 es decir el 41% de Tangua y de Pasto con un 68,7% las cepas que presentaron respiración microaerofílica fueron Cnp1, Cnp2, Cnp3, Cnp4, Cnp5, Cnp10, es decir tipo A. Las demás cepas se pueden clasificar como tipo B.

Muchas cepas de *Frankia* sp. generan pigmentos asociados a la producción de melanina, aunque a la fecha no se ha caracterizado rigurosamente la biosíntesis de melanina en este género,

aunque si bien, en algunas cepas ha sido asociada la producción de pigmentos con la producción de antibióticos (Yuan *et al.*, 2007). Frente a la formación de pigmentos, se observó en ocho cepas procedentes de Tangua (Cnt1, Cnt2, Cnt3, Cnt7, Cnt9, Cnt10, Cnt11, Cnt12) de las cuales el 48% presentaron color café con diversidad de tonalidades, tres de color rojo y una amarilla. De las cepas de Pasto únicamente el aislado Cnp2 no formó pigmentos. Los colores que se presentaron en estas cepas fueron café, rojo y amarillo.

Frente a los pigmentos a nivel celular, se observó que las cepas Cnt2, Cnt3, Cnt9, Cnt11 de Tangua y Cnp1, Cnp5, Cnp12, Cnp13 y Cnp14 de Pasto. Frente a la capacidad de liberar pigmentos al medio de cultivo, se observó que las cepas Cnt1, Cnt3, Cnt9, Cnt11, Cnt12 y Cnp1, Cnp2, Cnp3, Cnp5, Cnp7, Cnp13 y Cnp14 mostraron esta propiedad.

En la primera parte experimental se tuvieron dificultades para producir el exopolisacárido en el medio BAP. Para conocer la causa del porqué no se obtenía el producto se evaluó primero el crecimiento del microorganismo con y sin agitación. Con la agitación y la temperatura adecuada se logró generar la opacidad la cual se asocia a una mezcla de ácidos orgánicos producto del metabolismo celular. La primera evaluación de la producción de EPS fue visual, a través de la formación de una capa la viscosidad alrededor de las cepas. Para esta etapa de evaluación se encontró que bajo las condiciones de crecimiento las cepas Cnt1, Cnt3, Cnt4, Cnt5, Cnt6, Cnt7, Cnt8, Cnt9, Cnt10, Cnt11 y Cnt12 de Tangua y Cnp1, Cnp3, Cnp5, Cnp7, Cnp13 y Cnp14 de Pasto, produjeron EPS.

A través del uso de asa, se puede determinar la elasticidad de las cepas. Se observó una mayor elasticidad en las cepas Cnt5, Cnt8, Cnt10, Cnt11 y Cnt12 de Tangua y Cnp14 de Pasto.

Con elasticidad media se observó en las cepas Cnt3, Cnt4, Cnp1, Cnp7 y Cnp13 y elasticidad baja las cepas Cnt1, Cnt6, Cnt7, Cnt9, Cnp3 y Cnp5. Dadas las características de las cepas a producir pigmentos, se reportó la formación de pigmentos en los EPS, los colores producidos oscilaron entre blanco translucido y café en las cepas Cnt5, Cnt8, Cnt10, Cnt12, Cnp1, Cnp3, Cnp5, Cnp7, Cnp13 y Cnp14.

Una característica de gran importancia producida por los actinomicetos del suelo es la generación del olor típico del suelo húmedo producción de un metabolito denominado geosmina (Franco, 2004). La presencia de Geosmina se observó en los aislados Cnt4, Cnt5, Cnt11 Cnp1, Cnp3, Cnp4, Cnp6, Cnp10, Cnp13, Cnp14 y Cnp16 (Figuras 28 y 29).

Analizado las cepas y sus características se realizó una preselección de las cepas teniendo en cuenta tres criterios principales: producción de EPS, rápido crecimiento y elasticidad alta para continuar con la evaluación. La presencia de EPS asociados a las células bacterianas se reconoce por la formación de colonias gomosas en medio sólido y la formación de gel en medios líquido (Luque *et al.*, 2010) los aislados preseleccionados son para las curvas de crecimiento versus producción EPS fueron: Cnp1, Cnp10, Cnp11 y Cnp14 de Pasto y Cnt5, Cnt8 y Cnt12 Tangua.

**Tabla 7**

*Características de las cepas de Frankia sp. aisladas de Tangua*

Aislamiento	Profundidad	Crecimiento (l: lento, r: rápido)	Estereomicroscopio 0,63 x	Características macroscópicas	Características microscópicas 100x	Producción EPS				Producción de pigmentos			
						Presencia	Color	Elasticidad con asa (alta, media, baja)	Cantidad (alta, media, baja)	Pigmentación	Color colonia	Pigmentos	Pigmentos
<u>Cnt1</u>	10	R	Nódulo con crecimiento de hifas de color blanco. El crecimiento de micelio cubre de manera consistente la superficie del lóbulo.	Colonia: Filamentosa, plana e irregular. Microaerofílica.	Gram positiva. Hifas delgadas con formación de esporangio. Presencia de esporas.	Si	Café	Baja	Baja	+	C	-	+
<u>Cnt2</u>	10	L	Crecimiento sobre los lóbulos de color blanco puntiforme.	Colonia: algodonosa microaerofílica.	Presencia de hifas en el nódulo septadas delgadas.	No	No	No	No	+	R	+	-
<u>Cnt3</u>	10	L	No determinado	Colonia: algodonosa en medio líquido, en medio sólido pigmentación. Microaerofílica.	Hifas delgadas con formación de septos.	SI	Blanco translucido	Media	Baja	+	C	+	+
<u>Cnt4</u>	20	R	Producción alta de secreciones transparentes	Colonia: algodonosa en medio líquido.	Hifas maduras con septos bien definidos.	Si	Blanco translucido	Media	Baja	-	B	-	-

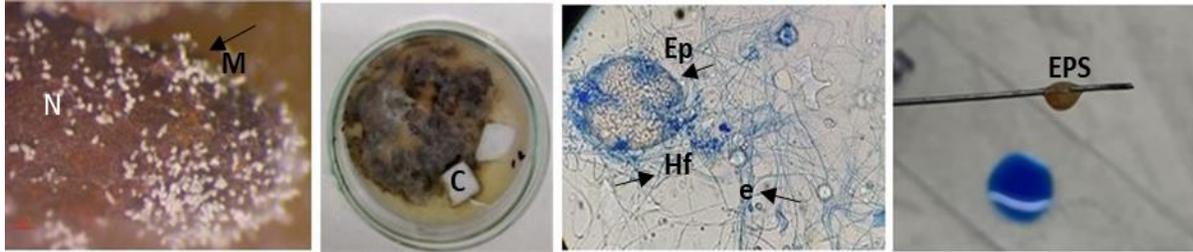
Aislamiento	Profundidad	Crecimiento (l: lento, r: rápido)	Estereomicroscopio 0,63 x	Características macroscópicas	Características microscópicas 100x	Producción EPS				Producción de pigmentos			
						Presencia	Color	Elasticidad con asa (alta, media, baja)	Cantidad (alta, media, baja)	Pigmentación	Color colonia	Pigmentos	Pigmentos
			de geosmina	Microaerofílica.	Formación de esporangio en estado primario.								
<u>Cnt5</u>	20	R	Producción de secreciones transparentes de geosmina. Colonia algodonosa.	Colonia: Algodonosa de color blanco dispersa en el medio	Hifas delgadas, formación de exopolisacárido.	Si	Blanco translucido	Alta	Alta	-	B	-	-
<u>Cnt6</u>	20	R	Producción de colonias puntiformes blancas	Colonia en forma de copos de algodón. Aerofílica.	Hifas delgadas. Presencia de EPS.	Si	Blanco translucido	Baja	Baja	-	B	-	-
<u>Cnt7</u>	20	R	Crecimiento sobre el lóbulo de color blanco algodonosa	En medio líquido crecimiento de color café. Microaerofílica.	Hifas delgas y gruesas que se manifiestan de manera consistente y con presencia de septos.	Si	Café	Baja	Baja	+	C	-	-
<u>Cnt8</u>	20	R	Crecimiento sobre el lóbulo de color blanco filamentoso	En medio líquido el crecimiento de colonias redondas algodonosas. Aerofílica.	Hifas delgadas con formación de esporangios.	Si	Café	Alta	Alta	-	B	-	-

Aislamiento	Profundidad	Crecimiento (l: lento, r: rápido)	Estereomicroscopio 0,63 x	Características macroscópicas	Características microscópicas 100x	Producción EPS				Producción de pigmentos			
						Presencia	Color	Elasticidad con asa (alta, media, baja)	Cantidad (alta, media, baja)	Pigmentación	Color colonia	Pigmentos	Pigmentos
<u>Cnt9</u>	20	R	Crecimiento en el lóbulo de color blanco, algodonosas.	Colonias dispersas en el medio de cultivo.	Se observa la presencia de hifas gruesas con septos cortos.	Si	Café	Baja	Baja	+	R	+	+
<u>Cnt10</u>	20	L	Crecimiento en el lóbulo de color blanco en forma de algodón y sobre el medio de cultivo pequeñas colonias blancas	Caja inicial: Presenta colonias de color blanco, con micelio no aéreo, no forma redes entre las diferentes colonias que se observan en el nódulo.	Hifas septadas gruesas con formación alta de vesículas	Si	Blanco translucido	Alta	Alta	+	C	-	-
<u>Cnt11</u>	20	L	Formación de hifas algodonosas sobre el lóbulo y Producción de geosmina	Crecimiento de color café sobre los lóbulos	Formación de hifas maduras	Si	Blanco translucido	Alta	Media	+	R	+	+
<u>Cnt12</u>	20	R	Se observa crecimiento de hifas blancas algodonosas y dispersas en todo el lóbulo. Presencia de	Crecimiento en medio liquido de colonias blancas con centro café	Formación de hifas más gruesas	si	Blanco translucido	Alta	Alta	+	A	-	+

Aislamiento	Profundidad	Crecimiento (l: lento, r: rápido)	Estereomicroscopio 0,63 x	Características macroscópicas	Características microscópicas 100x	Producción EPS				Producción de pigmentos			
						Presencia	Color	Elasticidad con asa (alta, media, baja)	Cantidad (alta, media, baja)	Pigmentación	Color colonia	Pigmentos	Pigmentos
<u>Cnt13</u>	20	R	geosmina.  Producción alta de secreciones transparentes de geosmina	Colonia: algodonosa en medio líquido.  Microaerofílica.	Hifas maduras con septos bien definidos.  Formación de esporangio en estado primario.	Si	Blanco translucido	Media	Baja	-	B	-	-

### Figura 28

*Morfología de la cepa Cnt1 de Frankia sp. aisladas de Tangua*



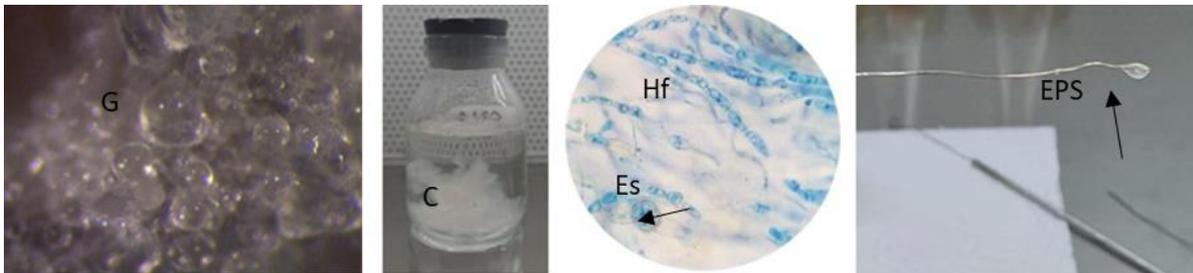
### Figura 29

*Morfología de la cepa Cnt2 de Frankia sp. aisladas de Tangua*



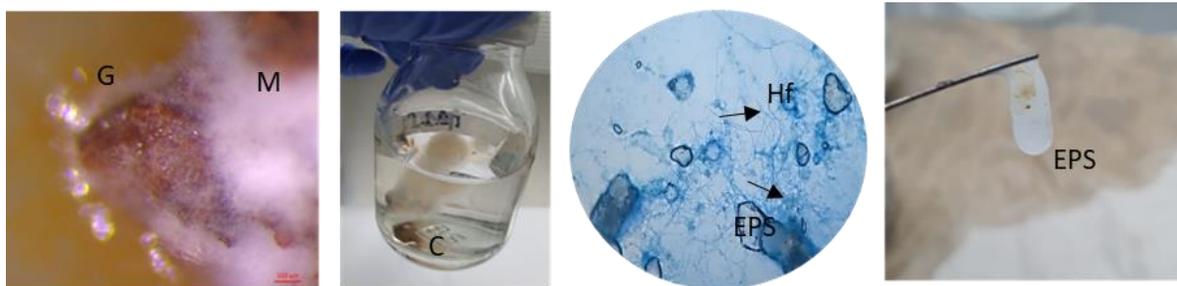
### Figura 30

*Morfología de la cepa Cnt3 de Frankia sp. aisladas de Tangua*

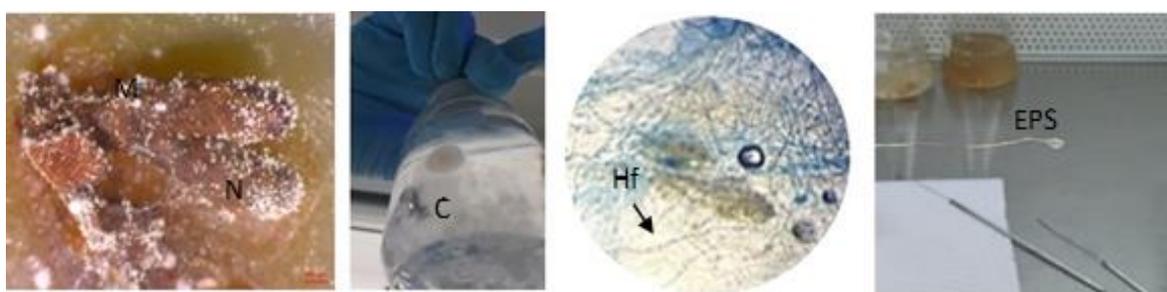


**Figura 31**

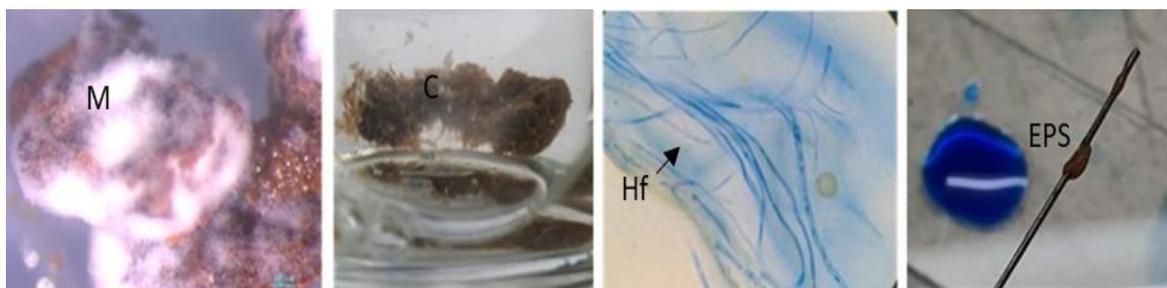
*Morfología de la cepa Cnt4 de Frankia sp. aisladas de Tangua*

**Figura 32**

*Morfología de la cepa Cnt5 de Frankia sp. aisladas de Tangua*

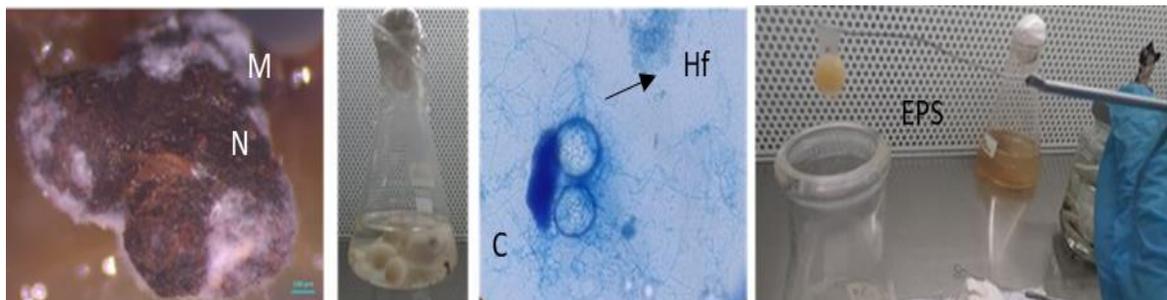
**Figura 33**

*Morfología de la cepa Cnt6 de Frankia sp. aisladas de Tangua*

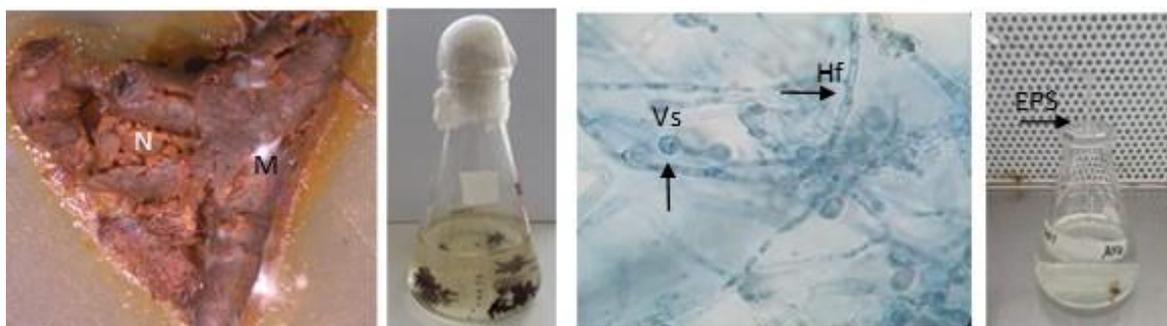


**Figura 34**

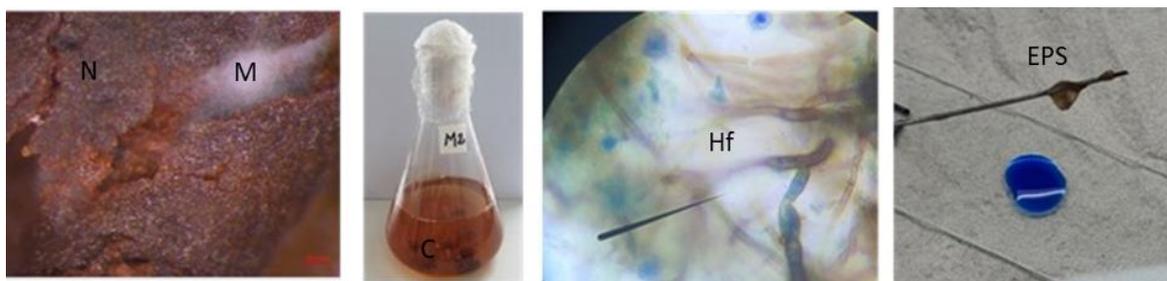
*Morfología de la cepa Cnt7 de Frankia sp. aisladas de Tangua*

**Figura 35**

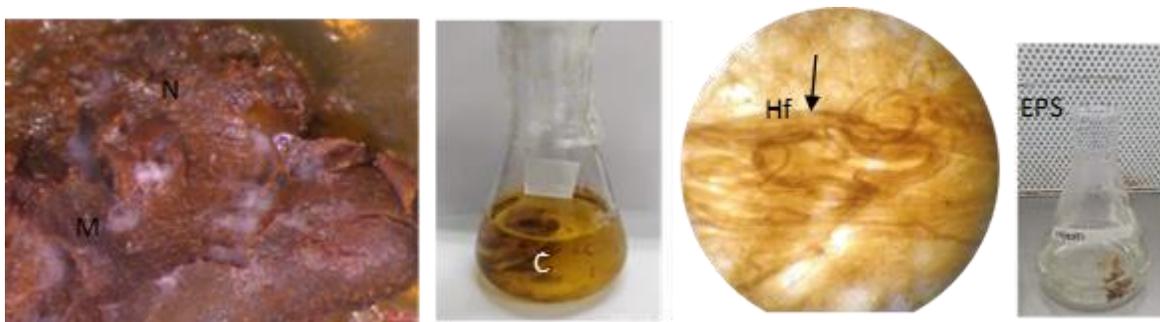
*Morfología de la cepa Cnt8 de Frankia sp. aisladas de Tangua*

**Figura 36**

*Morfología de la cepa Cnt9 de Frankia sp. aisladas de Tangua*

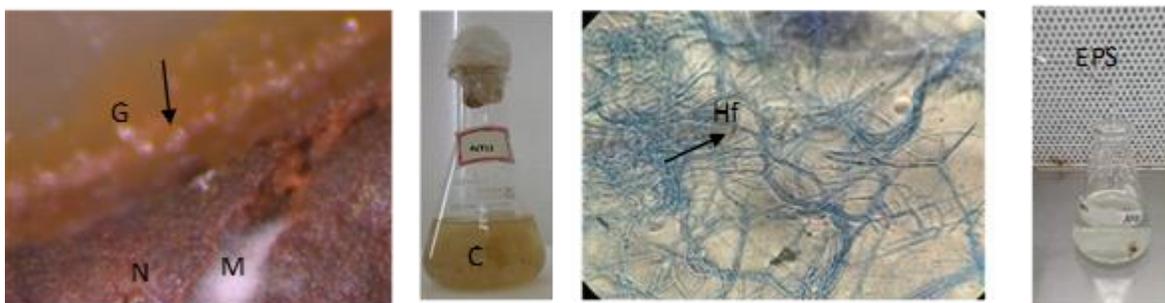
**Figura 37**

*Morfología de la cepa Cnt10 de Frankia sp. aisladas de Tangua*



**Figura 38**

*Morfología de la cepa Cnt11 de Frankia sp. aisladas de Tangua*



*Nota. Imágenes 28 a 38:* N: Nódulo, L: Lóbulo, M: Micelio, Hf: Hifa, Vs: Vesícula, Es: Espora Ep: esporangio, EPS: Exopolisacárido, C: Colonias, Pg: Pigmentos extracelulares liberados al medio, G: Geosmina

**Tabla 8**

*Características de las cepas de Frankia sp. aisladas de Pasto*

Aislamiento (cepa)	Profundidad recolección nódulo (cm)	Crecimiento (l: lento, r: rápido)	Estereomicroscopio 0,63 x	Características microscópicas 100x	Características macroscópicas	Producción EPS				Producción de pigmentos			
						Presencia	Color	Elasticidad con asa (alta, media, baja)	Cantidad (alta, media, baja)	Pigmentación colonia	Color colonia	Pigmentos celulares	Pigmentos soluble
<b>Cnp1</b>	10	R	Crecimiento de micelio de color blanco algodonosa y producción de geosmina	Colonia con crecimiento disperso en el medio líquido microaerofílico.	Formación de las hifas con septos bien definidos. Gram positiva.	Si	Blanco translucido	Alta	Media	+	R	+	+
<b>Cnp2</b>	10	L	Crecimiento de micelio de color blanco algodonosa.	Colonia semicompacta, microaerofílica	Formación de las hifas septadas. Gram Positiva.	No	No	No	No	+	C	-	+
<b>Cnp3</b>	10	L	Crecimiento lento de micelio sobre el lóbulo de color blanco. Producción baja de geosmina	Colonias microaerofílica dispersas en colonias en el medio.	Formación de hifas delgadas. Se observó presencia de esporas. Gram positiva.	Si	Café	Baja	Baja	+	R	-	+
<b>Cnp4</b>	10	L	Crecimiento lento de micelio sobre el lóbulo de color blanco. Producción de geosmina de pequeño	Colonias algodonosas, microaerofílica.	Formación de hifas delgadas. Gram positiva.	Si	Café	Baja	Baja	+	C	-	-

Aislamiento (cepa)	Profundidad recolección nódulo (cm)	Crecimiento (l: lento, r: rápido)	Estereomicroscopio 0,63 x	Características microscópicas 100x	Características macroscópicas	Producción EPS			Producción de pigmentos				
						Presencia	Color	Elasticidad con asa (alta, media, baja)	Cantidad (alta, media, baja)	Pigmentación colonia	Color colonia	Pigmentos celulares	Pigmentos soluble
			tamaño.										
<b>Cnp5</b>	10	L	Crecimiento en forma algodonosa.	Colonias dispersas microaerofílica.	Formación de hifas delgadas. Formación de esporas. Gram positiva.	Si	Blanco translucido	Baja	Baja	+	R	+	+
<b>Cnp6</b>	10	L	Crecimiento de micelio blanco. Presencia de mucosidad posiblemente debido a la producción de geosmina	Colonias pequeñas redondas de consistencia algodonosa.	Formación de hifas delgadas con la formación de ramificaciones. Formación de vesículas jóvenes.	Si	Blanco translucido	Alta	Media	+	R	-	-
<b>Cnp7</b>	10	R	Crecimiento de micelio brillante blanca sobre el lóbulo.	Bajo crecimiento sólido. En medio líquido Aerofilica.	Formación de hifas maduras con septos bien definidos. Formación de vesículas en estado maduro. Gram positiva.	Si	Blanco translucido	Baja	Media	+	C	-	+

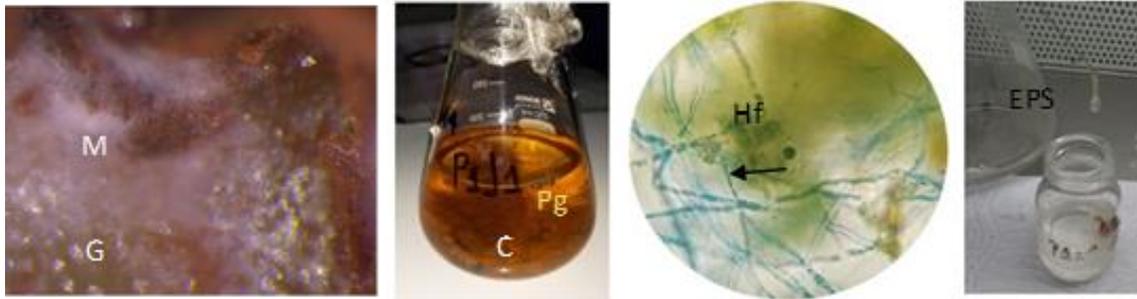
Aislamiento (cepa)	Profundidad recolección nódulo (cm)	Crecimiento (l: lento, r: rápido)	Estereomicroscopio 0,63 x	Características microscópicas 100x	Características macroscópicas	Producción EPS		Producción de pigmentos					
						Presencia	Color	Elasticidad con asa (alta, media, baja)	Cantidad (alta, media, baja)	Pigmentación colonia	Color colonia	Pigmentos celulares	Pigmentos soluble
<b>Cnp8</b>	10	R	En medio sólido crecimiento de colonias de color café sobre los fragmentos de los nódulos.	Formación de colonias redondas aerofilicas con forma algodonosa y compacta	Hifas con septos bien definidos. Se observa la formación de esporangios maduros e irregulares.	Si	Blanco translucido	Baja	Baja	+	R	-	-
<b>Cnp9</b>	10	L	Lóbulo con crecimiento de micelio filamentosos y algodonoso.	Colonias en medio sólido crecimiento sobre el lóbulo.	Formación de hifas delgadas.	Si	Café	Baja	Baja	+	R	-	-
<b>Cnp10</b>	10	R	Formación de micelio blanco esparcido por todo el lóbulo. Presencia de producción de geosmina.	Colonias semicompacta microaerofilica.	Formación de hifas gruesas con septos bien definidos.	Si	Blanco translucido	Alta	Alta	+	C	-	-
<b>Cnp11</b>	10	R	Formación de micelio blanco consistencia algodonosa. Presencia	Colonias microaerofilica amorfas.	Formación de hifas delgadas con septos y alta producción	Si	Blanco translucido	Alta	Media	+	C	-	-

Aislamiento (cepa)	Profundidad recolección nódulo (cm)	Crecimiento (l: lento, r: rápido)	Estereomicroscopio 0,63 x	Características microscópicas 100x	Características macroscópicas	Producción EPS				Producción de pigmentos				
						Presencia	Color	Elasticidad con asa (alta, media, baja)	Cantidad (alta, media, baja)	Pigmentación colonia	Color colonia	Pigmentos celulares	Pigmentos soluble	
			de mucosidad sobre el medio de cultivo.		de vesículas en estado temprano de formación. Gram positivas.									
<b>Cnp12</b>	10	R	Colonia filamentososa dispersa sobre el lóbulo y sobre el medio de cultivo.	Formación varias colonias aerofilicas en el medio.	Se observa hifas delgadas consistentes septadas con formación de vesículas	Si	Café	Media	Media	+	A	+	-	
<b>Cnp13</b>	10	L	Colonia filamentososa con borde irregular. Presencia de geosmina.	Formación de colonias amorfas microaerofilica.	Se observa hifas delgadas consistentes septadas con formación de vesículas	Si	Blanco translucido	Alta	Media	+	C	+	+	
<b>Cnp14</b>	10	R	Colonias blancas. Se presenta una alta producción de geosmina.	Colonias dispersas microaerofilica.	Formación de hifas septadas con alta producción de vesículas	Si	Blanco translucido	Alta	Alta	+	R	+	+	

Aislamiento (cepa)	Profundidad recolección nódulo (cm)	Crecimiento (l: lento, r: rápido)	Estereomicroscopio 0,63 x	Características microscópicas 100x	Características macroscópicas	Producción EPS				Producción de pigmentos			
						Presencia	Color	Elasticidad con asa (alta, media, baja)	Cantidad (alta, media, baja)	Pigmentación colonia	Color colonia	Pigmentos celulares	Pigmentos soluble
<b>Cnp15</b>	10	R	Formación de colonias filamentosas blancas.	Colonias de color amarillo dispersa en el medio microaerofílica.	Formación de hifas delgadas y septadas. Producción de vesículas	Si	Café	Baja	Media	+	A	-	-
<b>Cnp16</b>	10	L	Colonias filamentosas con producción de geosmina	Colonias compactas microaerofílica.	Formación de hifas con septos bien definidos	Si	Blanco translucido	Baja	Baja	+	C	-	-

### Figura 39

*Morfología de la cepa Cnp1 de Frankia sp. aisladas de Pasto*



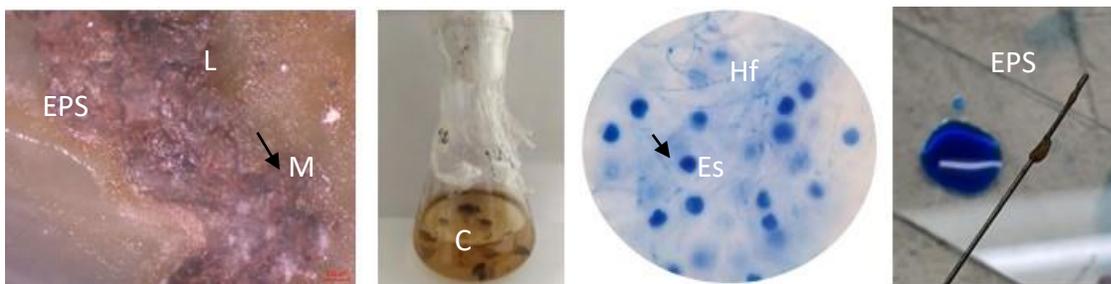
### Figura 40

*Morfología de la cepa Cnp2 de Frankia sp. aisladas de Pasto*



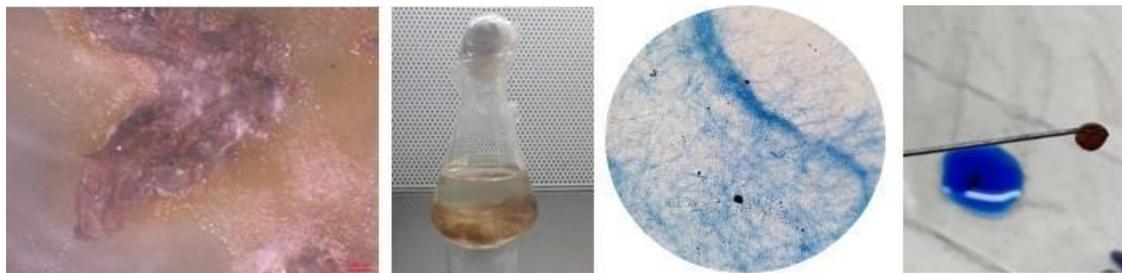
### Figura 41

*Morfología de la cepa Cnp3 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

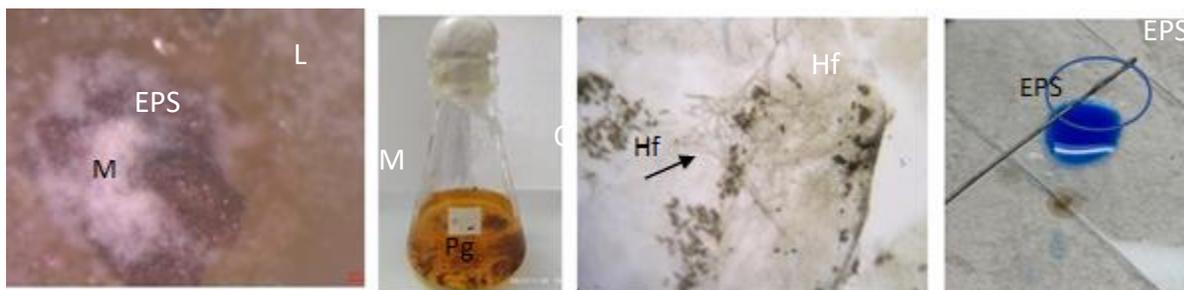


**Figura 42**

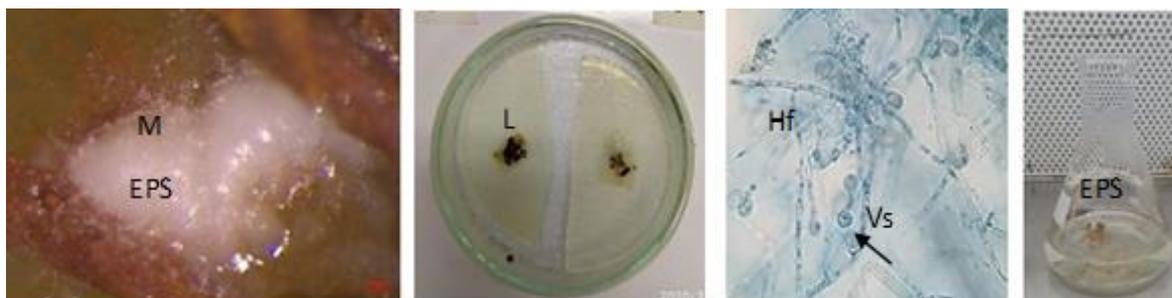
*Morfología de la cepa Cnp4 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

**Figura 43**

*Morfología de la cepa Cnp5 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

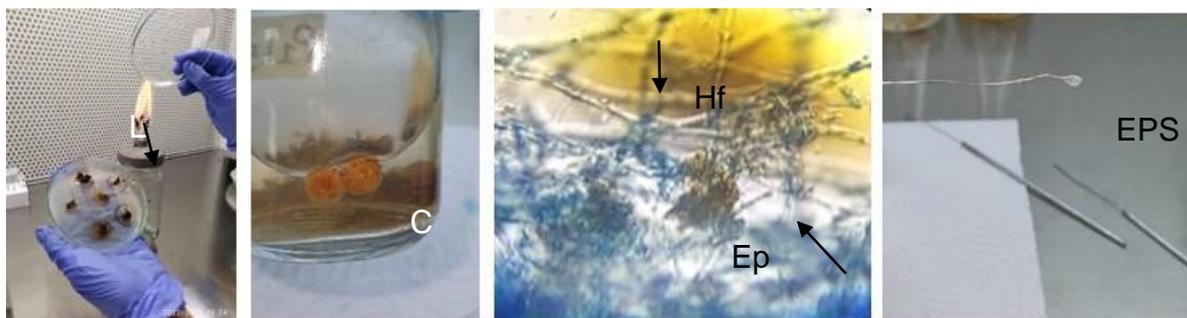
**Figura 44**

*Morfología de la cepa Cnp6 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

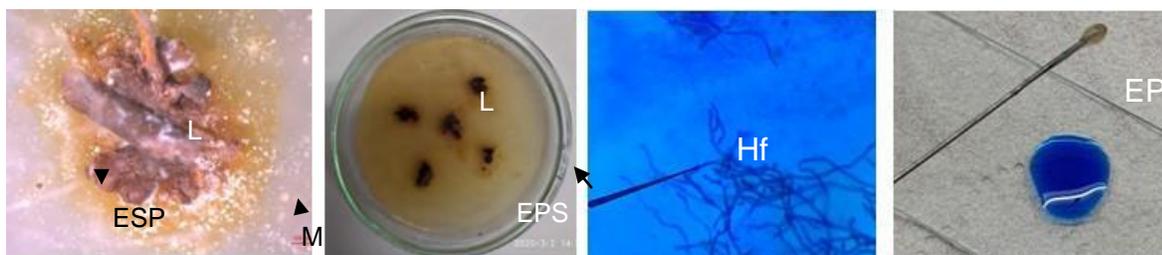


**Figura 45**

*Morfología de la cepa Cnp7 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

**Figura 46**

*Morfología de la cepa Cnp8 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

**Figura 47**

*Morfología de la cepa Cnp9 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

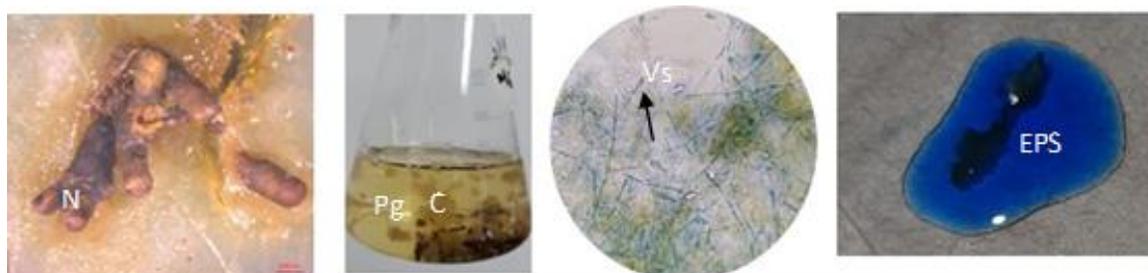


**Figura 48**

*Morfología de la cepa Cnp10 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

**Figura 49**

*Morfología de la cepa Cnp11 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

**Figura 50**

*Morfología de la cepa Cnp12 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

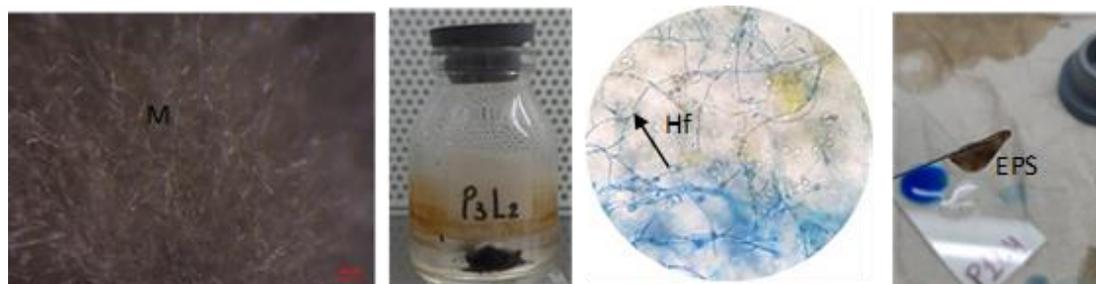


**Figura 51**

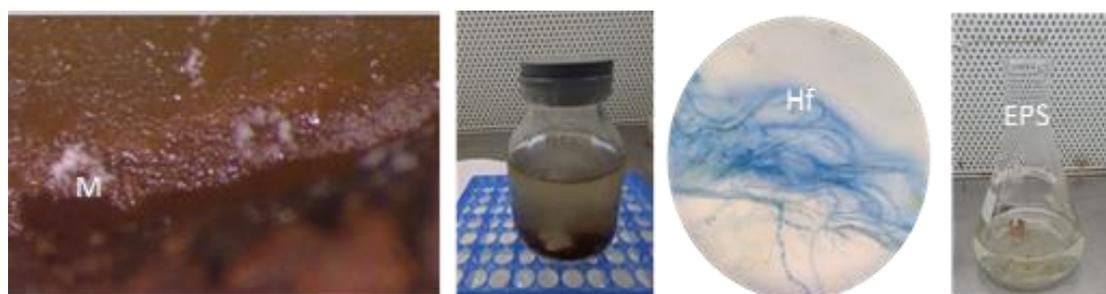
*Morfología de la cepa Cnp13 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

**Figura 52**

*Morfología de la cepa Cnp14 de Frankia sp. aisladas de Pasto*

**Figura 53**

*Morfología de la cepa Cnp15 de Frankia sp. aisladas de Pasto*



*Nota.* N: Nódulo, L: Lóbulo, M: Micelio, Hf: Hifa, Vs: Vesícula, Es: Espora Ep: esporangio, EPS: Exopolisacárido, C: Colonias, Pg: Pigmentos extracelulares liberados al medio, G: Geosmina.

### 7.3. Obtención de Exopolisacáridos Producidos por *Frankia* sp.

Como se indica en la tabla 9, se observó diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre las metodologías evaluadas en las variables EPS y carbohidratos. La cantidad en gramos de EPS se obtuvo con las metodologías planteadas por Lee *et al.*, (2013) y Quesada *et al.*, (1993) con valores de 1,79 y 1,63 g/ml respectivamente. Al analizar la concentración de carbohidratos en las muestras se observó mejores resultados con la metodología planteada por Lee *et al.*, (2003), quienes utilizaron esta técnica para evaluar la producción de EPS en la cepa CcI3 de *Frankia* sp. con presencia y ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo.

**Tabla 9**

*Respuesta a la evaluación de cuatro metodologías sobre la producción de EPS*

Metodología	EPS (g/100 mL)**	Concentración carbohidratos (µg/mL)**
Fuentes <i>et al.</i> , 2013	0,90 c	17,16 c
Quesada <i>et al.</i> , 1993	1,63 a	52,75 b
Alvarado, 2015	1,34 b	21,92 c
Lee <i>et al.</i> , 2013	1,79 a	59,69 a

*Nota.* \*\* Diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ). \* Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). <sup>ns</sup> no existen diferencias Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P > 0.05$ )

Según, Nwodo *et al.* (2012), los métodos usados para la recuperación de un EPS dependen sobre todo de las características de microorganismo empleado, del tipo de polisacárido y del grado de pureza deseado.

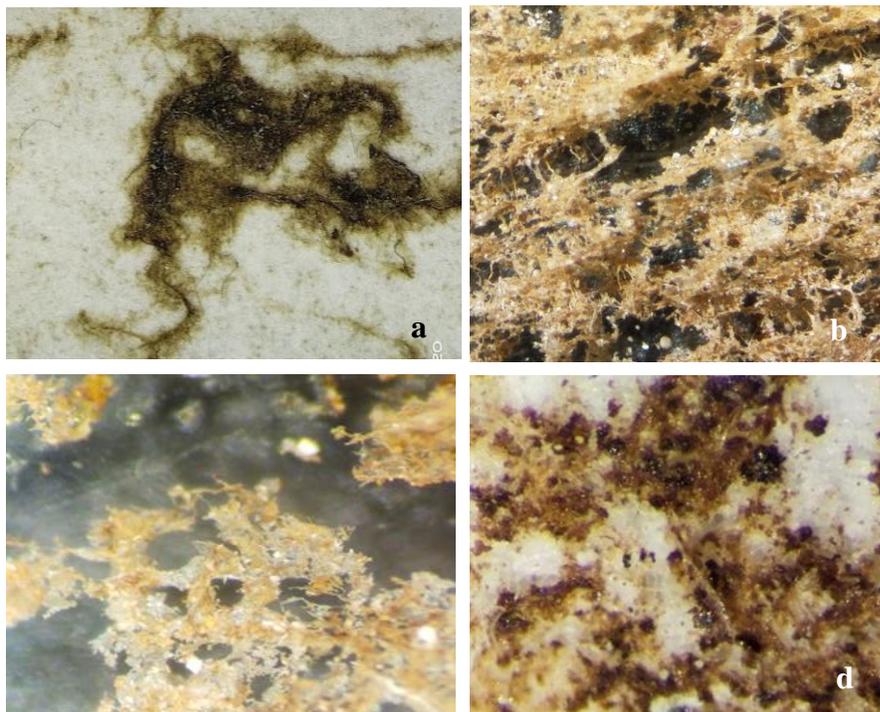
De hecho, los procedimientos de purificación reducen la recuperación del producto, afectando negativamente las propiedades del EPS, es decir, cuando la eliminación de proteínas se realiza mediante la adición de productos químicos, pueden reaccionar con los componentes de los EPS. Smith & Pace (1982), presentan esquemas de recuperación para polisacáridos microbianos con diversos tipos de solventes como acetona, metanol, etano, isopropanol entre otros como agentes precipitantes.

De igual manera, el proceso de secado que se realiza con la finalidad de reducir la humedad del exopolisacárido de un estado sólido tipo gel, puede colapsar luego de que la cantidad de agua presente en la matriz se reduce significativamente (Jiménez & Merchant, 2003). Freitas *et al.*, (2011) mencionan que es importante elegir cuidadosamente el procedimiento más apropiado para la recuperación del producto y su pureza, con el fin de disminuir el riesgo de afectar las propiedades de los exopolisacáridos.

Los sólidos obtenidos en este estudio fueron sometidos a cuatro metodologías de precipitado y de secado con el fin de remover parte de las impurezas como sales inorgánicas y pigmentos| (Figura 56).

### Figura 54

*Características de exopolisacáridos con diferentes metodologías de secado y solvente de la cepa de Frankia sp. Cnp1*



*Nota.* Fotomicrografía con estereomicroscopio 10x. a. Fuentes *et al.* (2013). b. Quesada *et al.*, 1993. c. Alvarado, 2015. d. Lee *et al.*, 2013.

Utilizando un secado de 18°C por 24 horas y precipitado con 0,90 g/100 ml según lo planteado por Fuentes *et al.*, (2013) los exopolisacáridos presentaron una consistencia gomosa de

color café oscuro, el producto obtenido fue difícil recuperarlo del papel Whatman.

Microscópicamente se observó fibras poco homogéneas y dispersas (Figura 56a).

Con el secado por medio de liofilización durante 24 horas y obtención de polisacárido con 1,63 g/100 ml como solvente acorde a lo planteado por Quesada *et al.*, (1993) se obtuvo suelto y de fácil de recuperación del papel filtro, la coloración fue de color café a amarillento y brillante, con superficies homogéneas formando fibras compactas (Figura 56b).

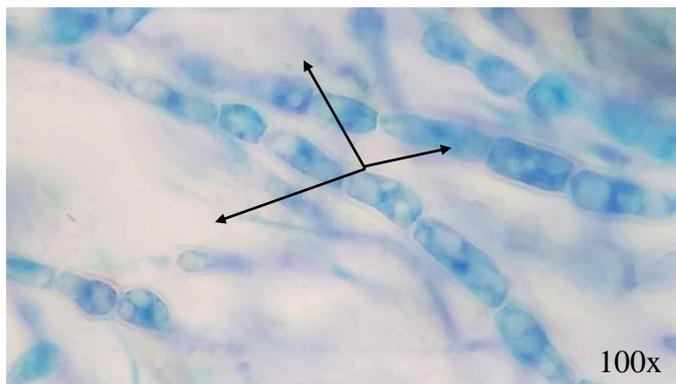
Al secar la muestra por medio de liofilización por 24 horas y precipitado con 1,34, según lo planeado por de Alvarado (2015) se presentó un EPS suelto fácil de extraer del papel filtro de color café y amarillento, más translucido, brillante, microscópicamente se observó superficies poco homogéneas y con una estructura más compacta formando fibras.

Con la metodología de Lee *et al.*, (2013) presentó exopolisacáridos mayor extracción de los exopolisacáridos de color café a amarillento y brillante. Microscópicamente se observó superficies poco homogéneas y su estructura más compacta formando fibras.

Microscópicamente se pudo observar la presencia de la formación de gránulos de EPS que son empleados como fuente de energía y de carbono (Figura 57). Las bacterias que producen y acumulan en condiciones desbalanceadas de crecimiento, es decir cuánto existe alguna limitación de nutrientes esencial o por exceso de fuente de carbono, forman gránulos donde se acumulan los polihidroxialcanoatos (PHAs). Además de ser fuente de carbono para la célula, los PHAs son fuente importante para la esporulación y en la protección del complejo de la nitrogenasa en bacterias fijadoras de nitrógeno, por la característica oxidativa de los PHAs (Bassi & Benson, 2007).

**Figura 55**

*Fotomicrografía de acumulación de gránulos en Frankia sp. Cnp1*



#### 7.4. Selección de Cepas de *Frankia* sp. Productores de Exopolisacáridos Bajo Diferentes

##### Parámetros

En las tablas 10 y 11 se presentan los análisis de varianza de las medias obtenidas de las cepas a los 15 días de crecimiento en cultivo en batch con agitación constante a 36°C.

**Tabla 10**

*Análisis de los EPS obtenidos por cepas Frankia sp. aisladas de Tangua*

Cepa	Polisacáridos		Glucosa**		Proteínas**		Turbidez**	
	g/100 mL *		g/100 mL		µg/ 100 mL		NTU	
<b>Cnt1</b>	0,43	abcd	9,25	h	0,30	ab	<b>1,43</b>	<b>a</b>
<b>Cnt2</b>	0,49	abcd	19,20	g	<b>0,33</b>	<b>a</b>	0,31	bcd
<b>Cnt3</b>	0,45	abcd	33,92	cde	0,14	E	0,13	cd
<b>Cnt4</b>	0,20	bcd	35,24	cd	0,21	bcde	0,33	bcd
<b>Cnt5</b>	<b>0,57</b>	<b>a</b>	36,48	bc	0,25	abcd	0,56	bc

<b>Cnt6</b>	0,51	abc	30,87	de	0,18	Cde	0,79	b
<b>Cnt7</b>	0,45	abc	25,64	f	0,21	bcde	0,27	cd
<b>Cnt8</b>	<b>0,61</b>	<b>a</b>	<b>47,22</b>	<b>a</b>	0,27	Abc	0,06	d
<b>Cnt9</b>	0,15	cd	19,42	g	0,25	abcd	<b>1,29</b>	<b>a</b>
<b>Cnt10</b>	0,42	abcd	33,75	cde	0,15	De	0,57	bc
<b>Cnt11</b>	0,43	abcd	29,66	ef	0,22	bcde	0,44	bcd
<b>Cnt12</b>	0,53	ab	40,35	b	0,25	abcd	0,61	bc
<b>Cnt13</b>	0,13	d	19,42	g	0,20	Cde	0,05	d

Nota. \*\* Diferencias altamente significativas (P< 0.01). \* Diferencias significativas (P<0.05). <sup>ns</sup> no existen diferencias Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey (P> 0.05).

**Tabla 11**

*Análisis de los EPS obtenidos por cepas Frankia sp. aisladas de Pasto*

Cepa	Polisacáridos		Glucosa**		Proteínas**		Turbidez**	
	g/100 mL *		g/ 100 mL		µg / 100 mL		NTU	
<b>Cnp1</b>	<b>1,16</b>	<b>a</b>	<b>34,75</b>	<b>a</b>	0,35	b	<b>1,21</b>	<b>a</b>
<b>Cnp2</b>	0,69	b	26,22	e	0,26	e	0,34	d
<b>Cnp3</b>	0,63	b	17,37	i	0,10	k	0,21	f
<b>Cnp4</b>	0,62	b	24,55	f	0,23	f	0,12	gh
<b>Cnp5</b>	0,68	b	16,35	j	0,11	k	1,21	a
<b>Cnp6</b>	0,68	b	28,44	d	0,21	g	0,16	fg
<b>Cnp7</b>	0,66	b	33,33	b	0,32	c	0,12	gh
<b>Cnp8</b>	0,50	b	33,09	c	0,19	h	0,29	e
<b>Cnp9</b>	0,57	b	32,05	d	0,17	i	0,20	f

<b>Cnp10</b>	<b>1,08</b>	<b>a</b>	<b>34,77</b>	<b>a</b>	<b>0,38</b>	<b>a</b>	0,89	b
<b>Cnp11</b>	<b>1,11</b>	<b>a</b>	<b>35,21</b>	<b>a</b>	<b>0,39</b>	<b>a</b>	0,93	b
<b>Cnp12</b>	0,67	b	22,33	h	0,12	j	0,35	d
<b>Cnp13</b>	0,69	b	23,25	g	0,31	d	0,49	c
<b>Cnp14</b>	<b>1,15</b>	<b>a</b>	<b>34,87</b>	<b>a</b>	0,36	b	<b>1,21</b>	<b>a</b>
<b>Cnp15</b>	0,69	b	23,14	gh	0,22	g	0,26	e
<b>Cnp16</b>	0,69	b	31,24	c	0,19	h	0,11	h

*Nota.* \*\* Diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ). \* Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). <sup>ns</sup> no existen diferencias Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P > 0.05$ ).

Según Marappa *et al.* (2020) en las etapas del proceso de formación de biofilms después de la multiplicación bacteriana se forma una micro colonia, la cual en determinadas condiciones ambientales comienza a secretar exopolisacáridos. Es por ello, que en esta evaluación todas las cepas fueron analizadas en condiciones similares en cuanto a temperatura y medio de cultivo, para disminuir factores que pudieran afectar el desarrollo bacteriano o la productividad de los exopolisacáridos entre las cepas.

Todas las cepas se desarrollaron adecuadamente, se evidenció mayor crecimiento en algunas cepas y todas las cepas produjeron EPS, el cual se presentó adherida a las colonias formando una membrana sobre las colonias. Se observó poca producción de EPS en el sobrenadante del medio de cultivo.

La agitación de los medios de cultivos crea condiciones que pueden ser o no estresantes y no naturales para las cepas bacterianas, por lo que puede influir en la capacidad de producción de exopolisacáridos hacia el medio, porque genera distribución de nutrientes y de oxígeno (Michel *et al.*, 2009). Estos factores son de gran importancia y pueden influir de alguna forma en los resultados que obtuvieron en la evaluación

Las cepas de *Frankia* sp. produjeron exopolisacáridos entre 0,13 a 1.16 g (aislamientos Cnt13 y Cnp1). Aunque si bien el origen geográfico de las cepas no fue considerado en este estudio, los resultados obtenidos en cuanto a la producción de exopolisacáridos fue superior en las cepas aisladas de Pasto respecto a las de Tangua, en este sentido se puede asociar a que existen adaptaciones por parte de las cepas bacterianas al ambiente donde se desarrollan, debido a que se seleccionan mutaciones que mejoran la adaptación de las cepas a factores ambientales estresantes (Galán *et al.*, 2006).

Con diferencias altamente significativas, las mayores producciones de EPS fueron obtenidas por las cepas Cnt5 y Cnt8 con valores de 0,57 a 0,53 g/100 mL respectivamente del municipio de Tangua y Cnp1, Cnp10, Cnp11 y Cnp14 con valores de 1,16, 1,08, 1,11 y 1,15 g/100 mL respectivamente del municipio de Pasto.

Los reportes obtenidos en producción de EPS coinciden con los reportados por Fuentes *et al.* (2013) quienes evaluaron bacterias del suelo de ambientes salinos con valores de 0,84 a 0,96 g/L. Quesada *et al.* (1993) obtuvieron valores a los 8 días de incubación de 2,8 g/L en *Volcaniella eurihalina* y a los 15 días de 2,5 g/L, datos que son superiores a los obtenidos en este estudio. En *Rhizobium leguminosarum* Janczarek *et al.* (2015), reportó valores de EPS entre 0,4

g/L utilizando como fuente de carbono el glicerol hasta 1,5 g/L con el arabitol, valores similares a los obtenidos en este estudio con el uso de glucosa como fuente de carbono.

Según López *et al.* (2017) el método de fenol-ácido sulfúrico ha sido uno de los métodos más utilizados en investigaciones para la determinación de carbohidratos totales. Rao & Pattabiraman (1989) y Masuko *et al.*, 2005, fueron algunos de los autores que modificaron el método inicial propuesto por Du Bois *et al.*, contribuyendo en la mejora de este, en el presente trabajo se hizo uso de este método debido a su facilidad y rapidez en los resultados.

El análisis de varianza (Tablas 10 y 11) mostró que tanto el medio de cultivo como la fuente de carbono empleado influyó en la producción de EPS ( $P < 0,01$ ). La determinación del contenido de carbono en presencia de ésteres metílicos en lo mono, oligo y polisacáridos como en sus derivados presentó diferencias altamente significativas en las cepas evaluadas ( $P < 0,01$ ). Los niveles de carbohidratos presentes en las muestras oscilaron entre 92,5 g a 472,2 g en las cepas Cnt1 y Cnt8 de Tangua y en los EPS procedentes de la cepa de Pasto valores entre 163,4 a 352,14 g. Las EPS de las cepas evaluadas que presentaron los mayores niveles de carbohidratos fueron Cnt8, Cnp1, Cnp10, Cnp11, Cnp14 con valores de 472,2, 347,5, 347, 352,1, 348,7 g.

Respecto al contenido de proteínas, se detectaron valores que oscilaron entre un 0,14 a 0,33  $\mu\text{g}$  procedentes de las cepas de Tangua y 0,102 a 0,393  $\mu\text{g}$  procedentes de Pasto. Acorde a lo planeado por Mata (2006) la metodología empleada para la extracción de los EPS, permite la obtención de un producto más purificado logrando eliminar las proteínas no asociadas a los EPS por el proceso de ultracentrifugación, lo cual se puede inferir que las proteínas obtenidas mediante el método de Bradford (1976), son procedentes de las exopolisacáridos que están

unidas al mismo. Se asocia, que las proteínas que están unidas a los exopolisacáridos, cumplen un papel importante en la actividad emulgente (Cantú *et al.*, 2020).

La técnica empleada es sensible e involucra la unión del Azul de Coomassie G-250 a la proteína provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante entre 365 a 595 nm, por lo cual el cambio en la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteína (Fernández & Galván, 2010). Los resultados obtenidos permitieron observar que el EPS de las cepas de *Frankia* sp. contiene un alto contenido de proteínas, los cuales no influye por su peso o biomasa, ya que este depende de sus características fisicoquímicas y en cada EPS se presenta con diferentes características.

Con el fin de observar las modificaciones de los medios de cultivo frente a la producción de exopolisacáridos y la liberación de pigmentos propios de este tipo de microorganismo, se realizó el análisis de la turbidez. En general los medios se mantuvieron translucidos, a pesar de las pigmentaciones extracelulares que generaron algunas cepas. El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas en la turbidez, se observó que la intensidad de la pigmentación que generan las cepas a nivel extracelular incidió sobre los valores de la turbidez. Los valores de turbidez oscilaron entre 0,13 cepa Cnt3 a 1,43 cepa Cnt1 aislados de Tangua y los aislados de Pasto los valores fueron entre 0,113 cepa Cnp16 y 1,213 cepa Cnp1. Estos valores no mostraron correlación con la producción de EPS.

#### - **Resultados de humedad**

Los resultados de peso seco y humedad presentados en los EPS obtenidos de las cepas de Tangua y Pasto se indican en las tablas 12 y 13.

**Tabla 12**

*Análisis del peso seco y humedad de exopolisacárido obtenidos por las cepas de Frankia sp. aisladas de Tangua.*

<b>Cepa</b>	<b>Peso húmedo</b> (g)	<b>Peso seco</b> (g)	<b>Humedad</b> (%)
<b>Cnt1</b>	1,52	0,3	80,3
<b>Cnt2</b>	1,54	0,46	70,0
<b>Cnt3</b>	1,81	0,31	82,7
<b>Cnt4</b>	1,24	0,41	67,0
<b>Cnt5</b>	1,66	0,45	73,4
<b>Cnt6</b>	1,26	0,39	68,9
<b>Cnt7</b>	1,67	0,49	70,4
<b>Cnt8</b>	1,76	0,35	80,1
<b>Cnt9</b>	1,66	0,33	80,2
<b>Cnt10</b>	1,66	0,33	80,3
<b>Cnt11</b>	1,16	0,29	74,2
<b>Cnt12</b>	0,99	0,38	61,7
<b>Cnt13</b>	1,09	0,24	77,7

**Tabla 13**

*Análisis del peso seco y humedad de exopolisacárido obtenidos por las cepas de Frankia sp. aisladas de Pasto*

Cepa	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)
<b>Cnp1</b>	1,77	0,38	78,6
<b>Cnp2</b>	2,64	0,12	95,4
<b>Cnp3</b>	2,33	0,23	90,0
<b>Cnp4</b>	1,95	0,28	85,4
<b>Cnp5</b>	2,28	0,05	97,7
<b>Cnp6</b>	1,84	0,24	87,0
<b>Cnp7</b>	2,25	0,56	75,0
<b>Cnp8</b>	1,52	0,73	52,2
<b>Cnp9</b>	1,84	0,16	91,2
<b>Cnp10</b>	1,51	0,60	60,2
<b>Cnp11</b>	1,80	0,18	90,0
<b>Cnp12</b>	1,96	0,04	97,8
<b>Cnp13</b>	1,84	0,26	85,7
<b>Cnp14</b>	1,83	0,18	90,0
<b>Cnp15</b>	1,76	0,22	87,4
<b>Cnp16</b>	1,83	0,27	85,2

El porcentaje de humedad promedio de los exopolisacáridos fue de 82% valor alto debido a que la humedad presenta una relación directamente proporcional a la producción de EPS (Torres & Mora, 2010), de igual manera, los exopolisacáridos también cumplen la función de

reservorio de humedad, fue importante para el mantenimiento de reserva de agua para los microorganismos durante periodos secos (Crespo, 2012).

Los resultados obtenidos en el porcentaje de humedad de las muestras en promedio de 79,8% entre todas las cepas evaluadas, con un valor mínimo de 52,2% (Cnp8) y un máximo de 97,8% (Cnp5).

- **Resultados evaluación de colorimetría**

Los atributos de color son primordiales debido a que influye directamente en el atractivo visual del producto y la aceptabilidad del consumidos (Silva *et al.*, 2015). Para comprender mejor las propiedades ópticas de los EPS. El resultado del análisis del espacio de color CIELAB de los EPS producidos por las cepas, se indica en las tablas 14 y 15. Dentro de este espacio, tres de las coordenadas registradas son  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . La coordenada  $L^*$  representa la luminosidad, tomando valores desde 0 (negro) a 100 (blanco), mientras que las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  expresan la rueda del color, tomando valores de  $+a^*$  (rojo) hasta  $-a^*$  (verde) y de  $+b^*$  (amarillo) hasta  $-b^*$  (azul) (Piñeros *et al.*, 2019).

**Tabla 14**

*Propiedades ópticas de los EPS obtenidos en las cepas procedente de Tangua*

Cepa	Espacio de color					
	L	DS	$a^*$	DS	$b^*$	DS
<b>Cnt1</b>	98,26	0,04	0,2	0,02	-2,21	0,13
<b>Cnt2</b>	95,62	0,10	0,13	0,03	0,45	0,07
<b>Cnt3</b>	96,12	0,12	0,15	0,05	0,67	0,19

<b>Cnt4</b>	94,45	0,18	0	0,01	-2,06	0,07
<b>Cnt5</b>	93,67	0,02	0,15	0,03	-2,39	0,02
<b>Cnt6</b>	95,26	0,12	0,13	0,05	-2,21	0,10
<b>Cnt7</b>	97,74	0,04	0,16	0,04	-2,52	0,15
<b>Cnt8</b>	95,89	0,02	0,16	0,04	-2,28	0,03
<b>Cnt9</b>	95,93	0,04	0,14	0,07	-2,23	0,13
<b>Cnt10</b>	97,56	0,09	0,14	0,03	-2,56	0,07
<b>Cnt11</b>	97,23	0,09	0,14	0,05	-2,16	0,05
<b>Cnt12</b>	96,73	0,14	0,16	0,08	-2,24	0,15
<b>Cnt13</b>	97,78	0,06	0,13	0,05	-2,59	0,06

**Tabla 15**

*Propiedades ópticas de los EPS obtenidos en las cepas procedentes de Pasto*

Cepa	Espacio de color					
	L	DS	a*	DS	b*	DS
<b>Cnp1</b>	96,06	0,05	0,1	0,10	-2,1	0,07
<b>Cnp2</b>	96,88	0,11	0,16	0,05	-2,2	0,10
<b>Cnp3</b>	93,11	0,10	0,54	0,13	2,4	0,10
<b>Cnp4</b>	95,69	0,11	-0,03	0,02	0,37	0,19
<b>Cnp5</b>	95,09	0,02	0,05	0,00	0,23	0,21
<b>Cnp6</b>	94,62	0,04	-0,11	0,03	0,3	0,06
<b>Cnp7</b>	96,03	0,09	0,05	0,03	-1,23	0,22
<b>Cnp8</b>	96,03	0,45	0,05	0,02	-1,23	0,22
<b>Cnp9</b>	96,32	0,21	-0,05	0,02	-0,76	0,22
<b>Cnp10</b>	96,95	0,05	0,16	0,12	-2,23	0,11

<b>Cnp11</b>	97,33	1,00	0,15	0,05	-2,04	0,15
<b>Cnp12</b>	95,39	0,60	-0,23	0,02	4,55	0,08
<b>Cnp13</b>	96,64	0,30	-0,11	0,08	0,04	0,01
<b>Cnp14</b>	96,57	0,14	-0,01	0,01	-0,63	0,08
<b>Cnp15</b>	96,89	0,03	0,09	0,01	-1,66	0,01
<b>Cnp16</b>	96,49	0,03	-0,02	0,01	-0,43	0,01

Los resultados obtenidos indican que todos los EPS obtenidos se presentaron valores de alta luminosa L\* (94,62 a 97,78). Con respecto a la coordenada cromática a\* se observó que el 72% de los EPS mostraron comportamiento positivo (0 a 0,16), que indica una coloración con tendencia al rojo, color rojo asociado a algunas de las pigmentaciones que genera este tipo de microorganismo en condiciones de cultivo. Los otros EPS fueron negativas las cuales se asocian al color verde. Respecto a la coordenada b\* los valores fueron el 29% positivos, es decir que tiene que los EPS presentan una coloración amarilla, el 71% presentaron un comportamiento negativo (-0,43 a -2,59). Llama la atención que la mayoría de las muestras en esta coordinada fueron de color azul.

Muchas cepas de *Frankia* sp. producen pigmentos, lo que está asociado a la generación de melanina. Aunque la melanina es importante en los mecanismos de competencia entre los organismos y aunque no es esencial para su desarrollo o crecimiento, si juega un papel importante en la fijación de nitrógeno en nódulos, lo cual ha sido identificado con cepas de *Rhizobium phaseoli* (Borthakur *et al.* 1987). La producción de pigmentos en cepas de *Frankia* sp., también están asociados a las fuentes nutrientes y a la edad del cultivo (Yuan *et al.*, 2007).

Bajo estudios de espectroscopia con diferentes longitudes de ondas, se demuestra que existe una diversidad de respuesta en la observancia de la luz frente a la pigmentación, valores cercanos a una observancia de 200 nm se genera coloración negra y a medida que se amplía el rango se genera una coloración roja. Los análisis espectroscópicos en este estudio no proporcionaron los tipos de pigmentos producidos en de las muestras evaluadas, pero si se evidenció en el 41% de los aislamientos que el micelio siempre se pigmentaba antes de que el medio de cultivo líquido se oscureciera, efecto asociado a la evidencia de tirosinasa extracelular en *Frankia* sp. acorde a lo reportado por Bell & Wheeler (1986).

Estos estudios pueden ser incluidos dentro de evaluaciones futuras, debido a que algunas cepas de *Frankia* sp. y en especial las asociadas a nódulos de *Alnus acuminata*, son productoras de pigmentos, por lo tanto, al realizar este tipo de pruebas se puede determinar si los pigmentos producidos por *Frankia* sp. en un tiempo específico y bajo unas condiciones determinadas de crecimiento pueden afectar o no el color de los EPS. También permite determinar un rango de tolerancia para establecer un color adecuado para el producto final ya sea recubrimientos o biopelículas.

Macroscópicamente, las colonias en los diferentes medios de cultivo evaluados durante el experimento, presentaron formación de pigmentos de color café, blanco y amarillo asociados a las fuentes nutricionales incorporadas en los medios. Los resultados obtenidos, pueden asociarse a los pigmentos producidos por el micelio que se asocian a la presencia de taninos, provitaminas y carotenos presentes en la solución acuosa del extracto de raíz, el cual puede generar la formación de estos pigmentos por contener sustancias como pectinas y hemicelulosas (heteropolisacáridos complejos), cuyo principal constituyente es el ácido galacturónico, que,

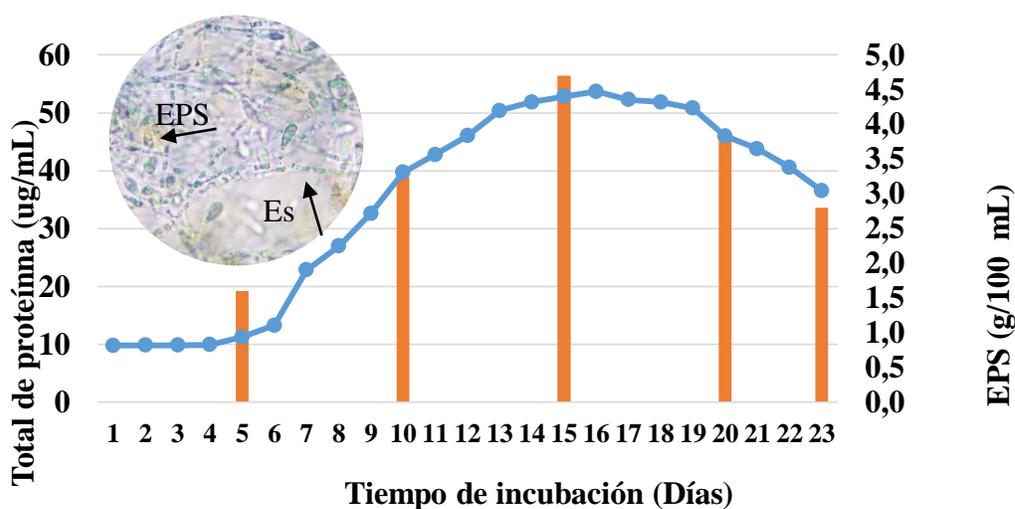
mediante hidrólisis, permite la producción de D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa y algunos otros azúcares (Wolters, 1998).

### 7.5. Cinética de Biomasa Versus Producción de EPS

El efecto del tiempo frente al crecimiento y a la producción de EPS de las cepas Cnp1, Cnp10, Cnp11 y Cnp14 de Pasto y Cnt5, Cnt8 y Cnt12 Tangua se indican en las Figuras 58 a la 64. Se puede apreciar en las figuras que todos los microorganismos se van desarrollando en la función al tiempo. La síntesis de los EPS excretado se pudo apreciar visualmente alrededor de la colonia con la formación de un gel transparente. Es así que, a partir del quinto día fue notorio que, a medida que la biomasa celular aumentaba se produjo mayor producción de EPS, alcanzando el máximo de exopolisacáridos en la fase estacionaria en todas las cepas.

#### Figura 56

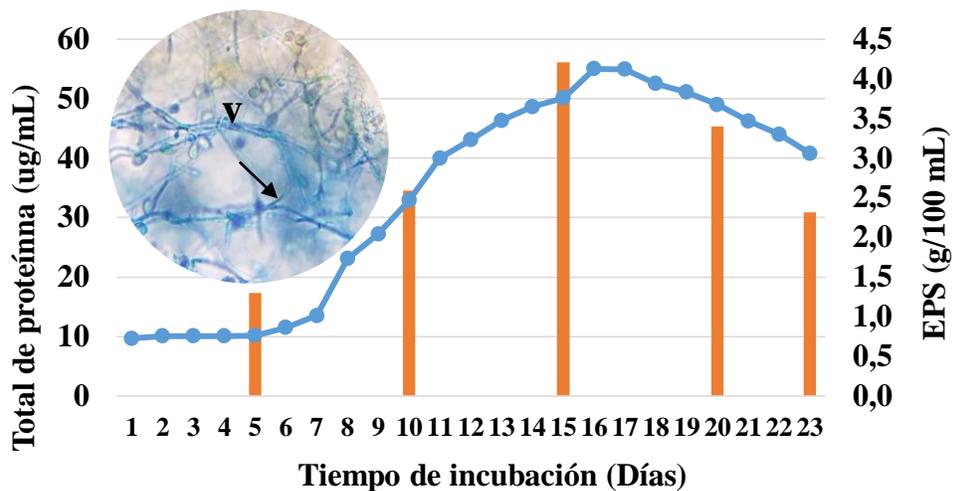
*Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnp1*



*Nota.* Fotomicrografía 100x. Formación de esporangios (Ep) y EPS a los 15 días de crecimiento

Figura 57

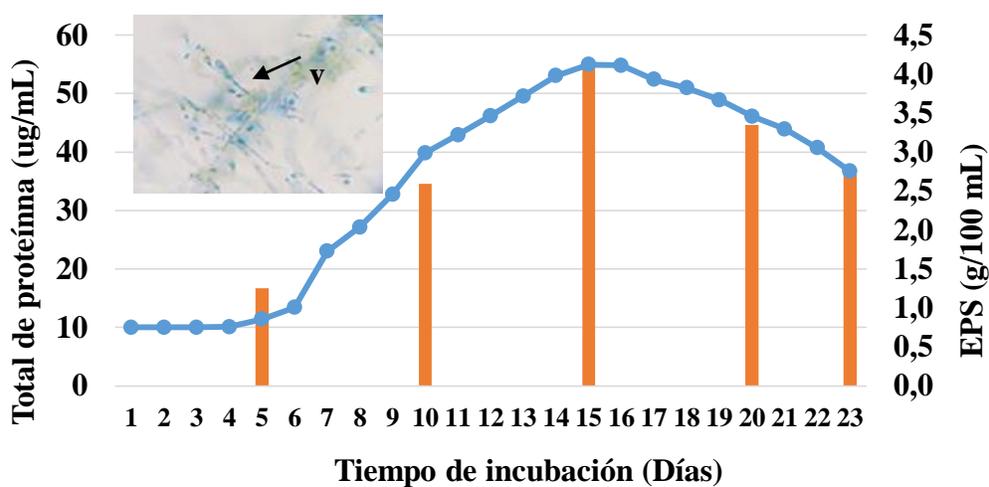
Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnp10



Nota. Fotomicrografía 100x. Formación de vesículas (v) a los 15 días de crecimiento

Figura 58

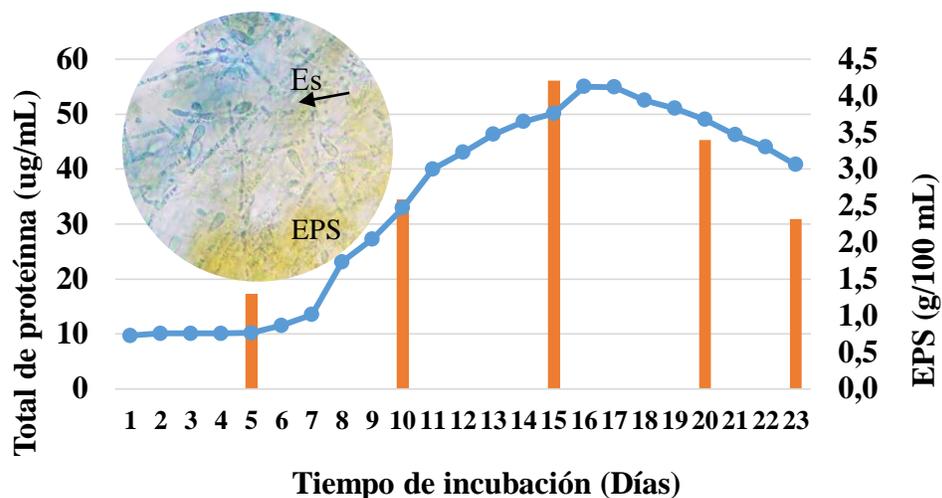
Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnp11



Nota. Fotomicrografía 100x. Formación de esporangios (Es) a los 15 días de crecimiento

**Figura 59**

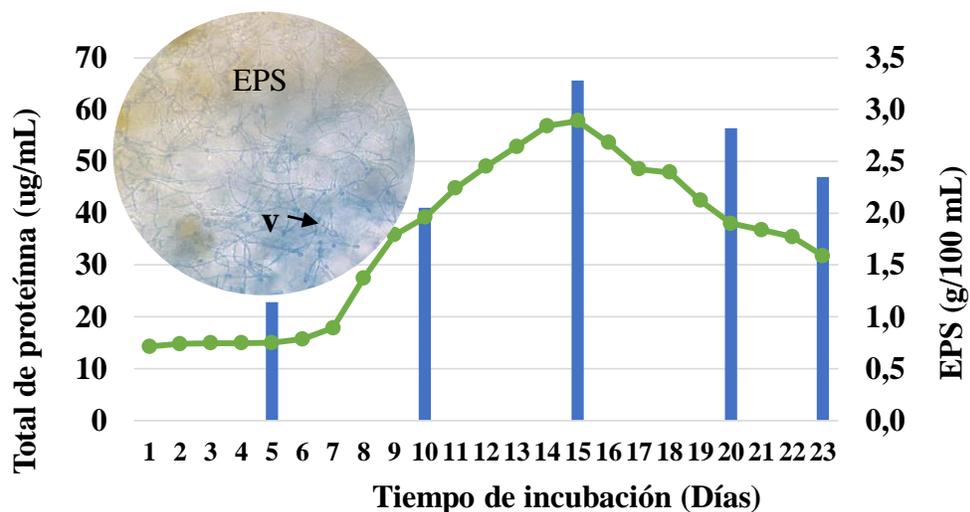
*Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnp14.*



*Nota.* Fotomicrografía 100x. Formación de vesículas (V) y EPS a los 15 días de crecimiento

**Figura 60**

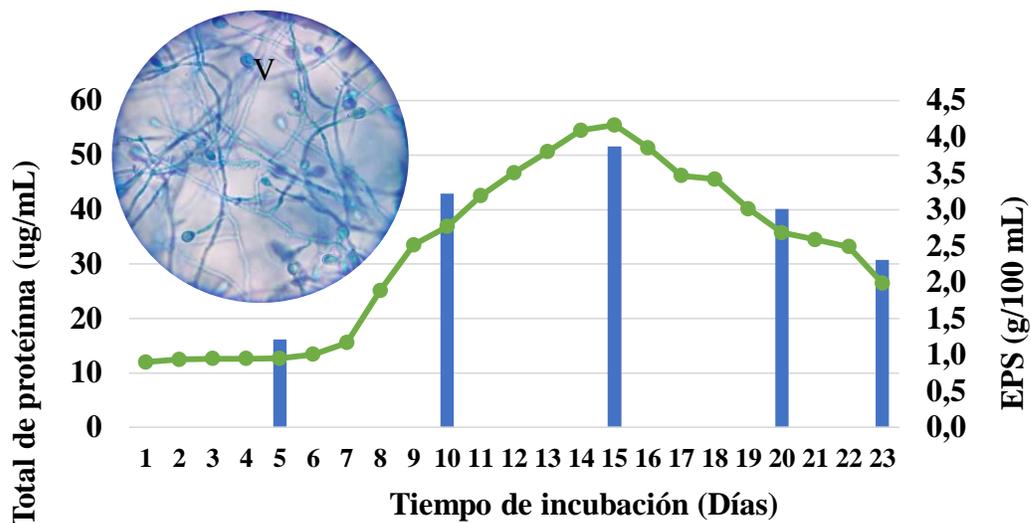
*Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnt5*



*Nota.* Fotomicrografía 100x. Formación de vesículas (v) y EPS a los 15 días de crecimiento.

**Figura 61**

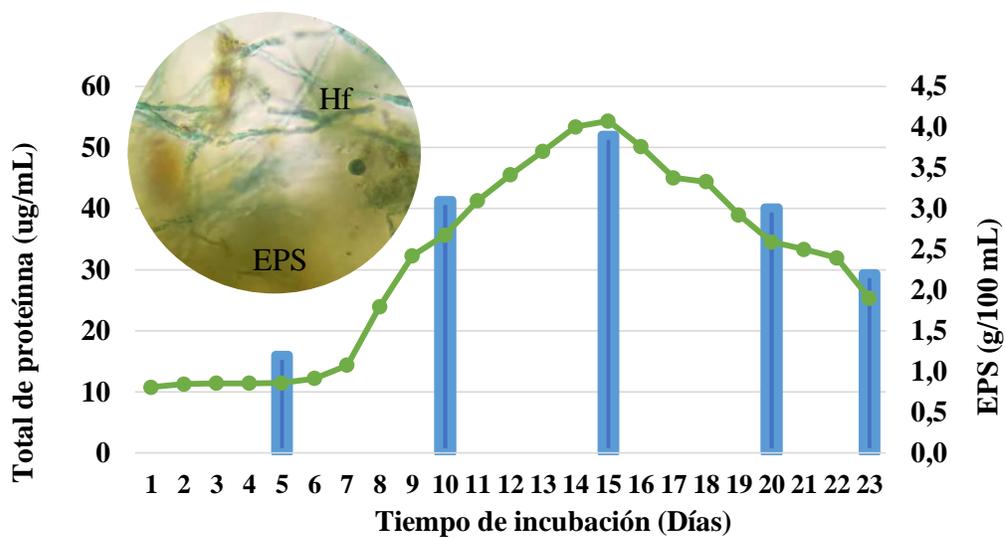
*Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cnt8*



*Nota.* Fotomicrografía 100x. Formación de vesículas (v) y EPS a los 15 días de crecimiento

**Figura 62**

*Efecto del tiempo de incubación sobre la producción de EPS de la cepa Cn12*



*Nota.* Fotomicrografía 100x. Hifas (Hf) y EPS a los 15 días de crecimiento

La solubilización del exopolisacárido define el comportamiento reológico del medio de cultivo, en este sentido durante la fase inicial los cultivos presentaron un comportamiento Newtoniano, es decir, que la viscosidad fue independiente de la rapidez de deformación. A medida que se presentó el crecimiento (5 al 7 día), se incrementó la viscosidad del medio gradualmente y se convierte en fluido dilatante o espesante.

Como se puede observar en las figuras, las cepas presentaron la fase lag hasta el día séptimo de incubación. La fase de crecimiento exponencial se manifestó a partir del octavo día; la fase estacionaria se visibilizo entre los días 13 a 19 para las cepas aisladas de Pasto y entre el día 14 al 17 para las cepas procedentes de Tangua, durante esta etapa de crecimiento se alcanzó la mayor producción de exopolisacárido y la mayor estabilidad de la red polimérica. La fase exponencial es un indicador del crecimiento microbiano en relación con su metabolismo, en este sentido, la asimilación de carbono y nitrógeno, son parte fundamental para producción de la biomasa celular.

A partir de este periodo se presentó el descenso en el crecimiento asociado a la muerte celular por limitación de nutrientes por efecto del metabolismo celular. Cuando alguno de estos macronutrientes se encuentra en bajas concentraciones, se generan en el microorganismo cambios enzimáticos y metabólicos en respuesta a este estrés, lo que le permite en algunas ocasiones, producir una mayor biomasa celular, generación de metabolitos secundarios (como material de reserva) y la formación de estructuras especializadas. Se observó que la viscosidad del medio empezó a decaer donde empieza un decline o muerte celular. En el caso de *Frankia* sp. estas condiciones estimulan la producción de vesículas como mecanismo para obtener el

nitrógeno a partir de la fijación biológica de nitrógeno, de igual manera, se genera la producción de esporas como respuesta al estrés como sistema de conservación (Rodríguez *et al.*, 2005).

Los valores de los exopolisacáridos producidos, oscilaron entre 3,2 a 4,7 g/100 mL para las cepas de *Frankia* sp. aisladas de Pasto y 3,22 a 3,9 g/100 mL en las cepas procedentes de Tangua. La mayor producción de los EPS se manifestó en la fase estacionaria en todas las cepas, los valores de producción de EPS fueron 4,7 g/100 mL (Cnp1), 4,2 g/100 mL (Cnp10), 4,1 g/100 mL (Cnp11), 3,74 g/100 mL (Cnp14), 3,28 g/100 mL (Cnt5), 3,22 g/100 mL (Cnt8) y 3,9 g/100 mL (Cnt12). Se sabe que la síntesis de los polímeros es diferente entre microorganismos inclusive entre el mismo género, así como, suele estar asociado con el crecimiento (Quesada *et al.*, 1993).

Con estos datos se observó que la formación de EPS va aumentando en la forma gradual hasta llegar a una fase constante (10 a 17 días), esta evolución de constatare producción o aumento en la formación del biopolímero, indica que *Frankia* sp. es capaz de sostener un ritmo de producción se desacelera y empieza a decrecer, que es algo característico de los polímeros de origen microbial y se puede sintetizar y degradar con gran rapidez debido a que se encuentra en un estado dinámico en el cual actúan simultáneamente; en este sentido, la degradación se puede llegar a controlar, a través de la regulación enzimática encargadas de esta función, de tal manera que solo actúen en ciertas condiciones (Janczarek *et al.*, 2015).

La producción de EPS en cepas de *Rhizobium* a los 5 días obtuvo valores entre 0,09 y 0,95 g/L (Fuentes *et al.*, 2013). En cepas también de *Rhizobium* Franco (2004), reporta producción de 3,9 g /L de EPS a las 72 horas de crecimiento, fase exponencial para este tipo de bacterias.

Janczarek *et al.* (2015), reportó niveles de EPS de 1500 mg/ L en *Rhizobium leguminosarum* a las 72 horas utilizando como fuente de carbono glicerol y con glucosa 1000 mg/mL.

El análisis bajo el microscopio realizado entre los 15 a 19 días de crecimiento, permitió visibilizar que cepas Cn12 y Cnt5 manifestaron autólisis del micelio comportamiento que Horriére (1984) relaciona al aumento de la actividad proteolítica.

Las cepas Cnp10, Cnp11, Cnt5 y Cnt8 manifestaron una alta producción de vesículas y en las cepas Cnp1 y Cnp14 se observó esporangios jóvenes. Aunque no se conoce claramente la persistencia de la formación de las vesículas en el suelo, si se sabe, que éstas son liberadas a priori en la senescencia de nódulos, por lo que se pueden convertir en un potencial propágulo del microsimbote (Schultz & Benson, 1989). Está demostrado que los procesos de crecimiento de las vesículas y la fijación de nitrógeno de *Frankia* sp. están estrechamente relacionados con la disponibilidad y estructura química de las fuentes de energía, aunque se requiere que el medio disponga de una fuente de nitrógeno para síntesis proteica microbial (Murry *et al.*, 1984).

Con los datos los datos obtenidos se pueden inferir, que la característica principal para las condiciones de fermentación discontinua o en batch, para la producción de EPS, es el responsable directo de los cambios ocurridos en las propiedades reológicas que se observó en los medios, por lo tanto, para la obtención de EPS de manera constante se recomienda evaluar sistemas de fermentación continua, que permita analizar con más detalle los cambios de en parámetros durante la fermentación y la solubilización del EPS en el medio.

Al analizar las curvas de crecimiento se observó que la velocidad máxima de crecimiento se presentó en el día 15, por lo tanto y basado en esta observación, se seleccionó el día 15 como el más apropiado para realizar los microensayos.

### 7.6. Efecto de la Producción de EPS en Diferentes Fuentes de Carbono

Conocer las necesidades de crecimiento de *Frankia* sp. es esencial para identificar la fisiología de esta especie. En diferentes investigaciones, se ha demostrado que las cepas de *Frankia* sp. presentan diversidad en la utilización de mono y disacáridos, alguno de los cuales puede ser limitantes para su crecimiento (Huang & Benson, 2012).

Teniendo en cuenta la cinética de crecimientos versus la producción de EPS se seleccionó dos cepas procedentes de Pasto (Cnp1, Cnp10) y una procedente de Tangua (Cnt12), para realizar los microensayos de fuentes nutricionales (Tabla 16).

**Tabla 16**

*Efecto de fuentes de carbono sobre el crecimiento y producción de EPS*

Fuente de carbono	Cnp1		Cnp10		Cnt12	
	EPS* (g/100 mL)	Crecimiento ** (mg/mL)	EPS* (g/100 mL)	Crecimiento** (mg/mL)	EPS* (g/100 mL)	Crecimiento ** (mg/mL)
Ácido cítrico	3,6 ab	5,7 c	3,2 ab	5,7 c	3,2 ab	7,4 d
Almidón	2,7 b	11,2 b	2,7 b	11,18 b	2,7 b	11,1 c
Ácido pirúvico	4,7 ab	11,3 b	4,0 ab	11,3 b	3,9 ab	11,6 c
Celulosa	3,0 ab	8,0 c	2,6 ab	8,0 c	2,6 b	10,7 c
Extracto de raíz	4,4 ab	7,6 c	4,0 ab	4,1 c	3,9 ab	11,2 c
Fructosa	3,0 ab	13,3 ab	2,6 ab	13,3 ab	2,6 b	<b>16,6 a</b>

<b>Galactosa</b>	3,3 ab	6,5 c	2,9 ab	6,5 c	2,6 b	14,7 ab
<b>Glucosa</b>	<b>4,7 a</b>	<b>14,7 a</b>	<b>4,3 a</b>	<b>14,7 a</b>	<b>4,1 a</b>	10,8 c
<b>Melaza</b>	3,9 ab	11,4 b	3,6 ab	11,4 b	3,2 ab	<b>16,9 a</b>
<b>Manitol</b>	3,3 ab	11,9 b	2,9 ab	11,9 b	2,6 b	12,9 bc
<b>Sacarosa</b>	3,9 ab	5,7 c	3,9 ab	5,7 c	3,2 ab	8,0 d

Nota. \*\* Diferencias altamente significativas ( $P < 0.01$ ). \* Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). <sup>ns</sup> no existen diferencias Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey ( $P > 0.05$ )

Se presentaron diferencias significativas entre las fuentes de carbono tanto en crecimiento como en producción de EPS en las cepas Cnp11 y Cnp12, la cepa Cnp10 únicamente presentó diferencias significativas en la producción de EPS. El mayor nivel de crecimiento se observó con la glucosa. La mayor eficiencia en la producción de EPS se observó en glucosa, celulosa y ácido pirúvico. Bajo las condiciones de este estudio, se pudo observar que la producción de los EPS está directamente proporcionar al crecimiento de las cepas.

El rendimiento celular de las cepas fue adecuado en todos los medios evaluados. El total del crecimiento de las tres cepas, permitió confirmar el efecto positivo de emplear glucosa como fuente de carbono tanto para el crecimiento microbial como para la producción de EPS, con diferencias altamente significativas frente a los demás tratamientos evaluados ( $P < 0.001$ ). Esta información es de gran importancia para identificar estrategias de aumento del crecimiento de *Frankia* sp. en condiciones de laboratorio, disminuyendo el tiempo de producción de biomasa de este microorganismo y la generación de metabolizar productos secundarios como los EPS. En

términos de nutrición, los actinomicetos muestran ser un grupo muy adaptable, debido a que son heterótrofos lo cual les confiere la capacidad de utilizar una amplia gama de compuestos carbonados y nitrogenados, como polisacáridos, lípidos, hidrocarburos saturados, fenoles, proteínas y quitina (Wild, 1992). El análisis realizado a las fuentes de nitrógeno se indica la tabla 17.

**Tabla 17**

*Crecimiento de tres cepas de Frankia sp. bajo diferentes fuentes de nitrógeno*

Fuente de Nitrogeno	Cnp1		Cnp10		Cnt12	
	EPS* (g/100 mL)	Crecimiento** (mg/mL)	EPS* (g/100 mL)	Crecimiento** (mg/mL)	EPS <sup>ns</sup> (g/100 mL)	Crecimiento ** (mg/mL)
Cloruro de amonio	5,6 b	11,5 b	3,1 b	9,3 b	3,6 b	10,9 b
Extracto de levadura	<b>9,6 a</b>	<b>14,6 a</b>	<b>5,9 a</b>	<b>11,3 a</b>	<b>4,6 a</b>	<b>14,9 a</b>
Sin fuente (N <sub>2</sub> )	5,6 b	10,9 b	4,5 b	9,6 b	2,8 b	5,6 c

*Nota.* \*\* Diferencias altamente significativas (P< 0.01). \* Diferencias significativas (P<0.05). <sup>ns</sup> no existen diferencias Promedios en una misma columna con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey (P> 0.05).

Las cepas mostraron un crecimiento positivo con la fuente extracto de levadura lo cual se evidenció en la producción de EPS.

La cepa Cnp1 presentó valores de 14,6 mg proteína/mL y 9,6 g/100 mL de EPS para la fuente extracto de levadura, con un incremento en el crecimiento del 26,9% y en la producción de EPS del 73,8% frente al tratamiento con cloruro de amonio.

En la cepa Cnp10, el uso de diferentes fuentes de nitrógeno estuvo asociada con diferencias en crecimiento 15 días de incubación. El mayor crecimiento se presentó en el medio con extracto de levadura, con valores de 11,3.66 mg proteína/mL, con un incremento en crecimiento en presencia de esta fuente de nitrógeno fue de 21,5% frente al cloruro de amonio. La producción de EPS fue de 5,9 g/100 mL con un incremento del 47,4%.

En lo referente a la cepa Cnt12, esta mostró capacidad de crecimiento en medios con y sin nitrógeno, mostrando diferencias altamente significativas entre las fuentes de nitrógeno. El crecimiento alcanzó el 14,9 mg proteína/mL con el uso del extracto de levadura. El incremento en crecimiento frente al tratamiento con cloruro de amonio fue de 36,6%. La producción de EPS no presentó diferencias significativas entre las tres evaluaciones.

El extracto de levadura es una fuente tanto de compuestos nitrogenados, como los elementos traza, cofactores enzimáticos, vitaminas y ácidos nucleicos, componentes que favorecen el crecimiento microbial. *Frankia* sp. demostró el uso apropiado de la misma, lo cual estuvo directamente relacionado con un aumento en el crecimiento microbial y la producción de EPS (Edens *et al.*, 2002).

La deficiencia de nitrógeno afecta el crecimiento normal y la síntesis de nuevas células. En el caso de *Frankia* sp. se ha reportado que cuando hay deficiencia de nitrógeno se aumenta la producción de poli-b-hidroxibutirato (PHA) en condiciones *in vitro*. En condiciones de campo, esta sustancia está relacionada con reconocimiento hospedero-microsimbiote y en el encrepamiento de los pelos radiculares. Asimismo, estos biopolímeros están relacionados con

reservas de carbono y energía y su producción es estimulada por exceso de carbono soluble y limitaciones de los macronutrientes nitrógeno y fósforo (Diouf *et al.*, 2003).

En la tabla 18 y en la figura 65 se muestra la formación de estructuras a los 15 días de evaluación bajo las condiciones de crecimiento evaluadas.

**Tabla 18**

*Formación de estructuras especializadas a los 15 días de incubación de tres cepas de Frankia sp. crecidas en medios con diferentes fuentes de nitrógeno.*

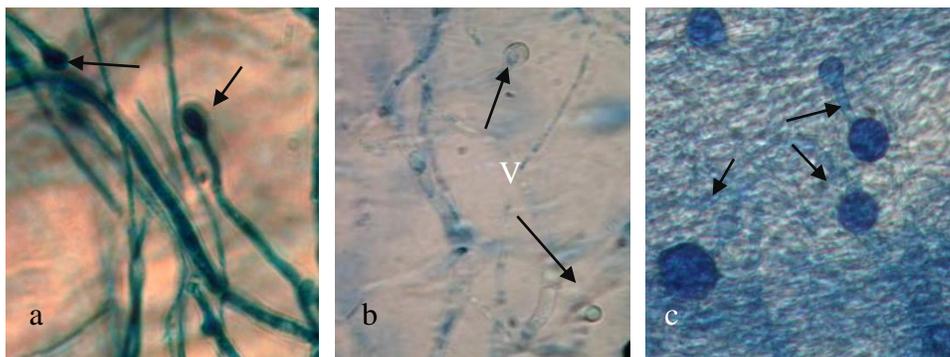
Fuente	Cnp1		Cnp10		Cnt12	
	Vesículas	Esporangios	Vesículas	Esporangios	Vesículas	Esporangios
<b>Cloruro de amonio</b>	+	±	+	±	+	±
<b>Extracto de levadura</b>	±	++	±	+	±	±
Sin fuente (N <sub>2</sub> )	++	++	++	±	++	++

*Nota.* \*Crecimiento relativo de esporangios y vesículas: Ausencia (-), ocasionalmente abundante (±), abundante (++)

En las tres cepas, en todas las fuentes de nitrógeno hubo formación de vesículas, pero la mayor cantidad se observó en el medio sin fuente de nitrógeno. Bajo el microscopio se observó que, en las fuentes con nitrógeno, las vesículas se encontraron en fase oscura (Figura 65 a y b), estado en el que posiblemente aún se encuentra nitrógeno disponible. Por el contrario, en el medio sin nitrógeno se observó la formación de esporas maduras, con presencia de glicógeno debido a la demanda de consumo de energía por la actividad metabólica (Murry *et al.*, 1984).

### Figura 63

*Fotomicrografías de estructuras especializadas de las cepas de Frankia sp.*



*Nota. a. Cepa Cnp1 +levadura b. Cepa Cnp10+cloruro de amonio. c. Cnt12+levadura. V: Vesículas Microscopia de luz. Magnificación x100.*

### 7.7. Análisis de la Producción de Exopolisacáridos en Cepas Nativas de *Frankia* sp.

Las cepas Cnp1 y Cnt12 fueron seleccionadas, para realizar los análisis de determinación de las características del exopolisacáridos producidos. Los EPS fueron denominados con los nombres de las cepas Cnp1 y Cnt12.

#### 7.7.1. Actividad Emulgente

Los resultados de la media de tres determinaciones indican el porcentaje emulsionado de la mezcla agua-fase oleosa. Las medidas fueron evaluadas tras dejar la emulsión en reposo durante 1 hora y pasadas las 24 horas, a temperatura ambiente, con el fin de realizar la evaluación de la estabilidad de las mismas a través del tiempo.

En las figuras 66 y 67 se puede evidenciar el resultado de la actividad emulgente de los EPS Cnp1 y Cnt12, sobre las distintas fases oleosas ensayadas (aceite de oliva, girasol, almendra,

ricino y, jojoba) y el surfactante químico utilizado como parámetro de control que fue el Tween 80.

### Figura 64

*Actividad emulgente exopolisacárido Cnp1 y control a las 24 horas*



*Nota.* Aceite: oliva, girasol, almendra, ricino, Tween (control) y jojoba

Debido a la acción de la agitación frente a la inestabilidad de las emulsiones del exopolisacárido Cnp1 y el control, se observó que las pruebas que contenían aceite de jojoba y almendras presentaron una inestabilidad tipo creaming o sedimentación, la cual se generó por la acción de la gravedad que produce un gradiente vertical de concentración de las gotas sin variar la distribución. Por su parte, el aceite de ricino y el Tween mostraron una inestabilidad de la emulsión posiblemente tipo floculación, el cual se controla por las fuerzas de atracción electrostáticas de Van der Waals y repulsivas de tipo estéricas y de hidratación (Aranberri *et al.*, 2006).

### Figura 65

*Actividad emulgente exopolisacárido Cnt12 y control a las 24 horas*



*Nota.* Aceite: oliva, girasol, almendra, ricino, Tween (control) y jojoba.

Las emulsiones de los EPS Cnt12 y el control, fueron, posiblemente de tipo coalescencia, la cual básicamente se observa por la fusión de gotas las cuales crear unas gotas de mayor tamaño con la eliminación de parte de la interfase líquido/líquido. A pesar de que el proceso de inestabilidad debido a la coalescencia no se comprende en su totalidad, se cree que está relacionado con la curvatura preferida y con la rigidez de la capa de tensioactivo que estabiliza la emulsión (Aranberri *et al.*, 2006).

El porcentaje de fase emulsionada que originan los exopolisacáridos fue prácticamente en todos los casos, superior al 50% como se indica en la tabla 19.

**Tabla 19**

*Porcentaje de emulsión y fases oleosas con EPS producidos en medio BAP*

EPS	Tiempo (h)	Oliva	Girasol	Almendra	Ricino	Jojoba
Cnt12	1	53,1	50,5	46	50,7	56
	24	43,2	47,4	26,3	46,5	40,3
Cnp1	1	54,7	58,4	55	36,3	58,6
	24	50	52,3	50,4	28,5	46,7

Control	1	60	59,9	59,3	59,1	60
Tween 80	24	60	59,7	59	58,3	59,8

A través de este ensayo se puede determinar que los EPS obtenidos por las dos cepas de *Frankia* sp. presentaron actividad emulgente. De igual manera, se presentó una disminución de la emulsión a través del tiempo, efecto asociado a la degradación del EPS (Mata, 2006). Después de 1 hora de evaluación el EPS Cnt12 presentó de la mayor actividad emulgente en aceite de oliva, girasol, ricino y jojoba con valores del 53,1%, 50,5%, 50,7% y 56% respectivamente. Los EPS Cnp1 obtuvo valores cercanos al 50% en todos los aceites con excepción del ricino. Pasadas las 24 horas el EPS Cnt12 presentó los mayores porcentajes emulgentes en todos los aceites a excepción del aceite de almendras y el EPS Cnp1 presentó acción emulgente en todos los aceites mostrando el menor valor en el ricino.

Por su parte el control Tween 80 alcanzó el valor máximo de emulsión con el aceite de oliva, jojoba a la primer hora y pasada las 24 horas se observó similar comportamiento en la actividad emulgente en todos los aceites evaluados.

La estabilidad de las emulsiones producidas por los exopolisacáridos de *Frankia* sp., presentan una disminución en el porcentaje al transcurrir las 24 horas en los aceites evaluados con un promedio del 50%, a excepción del aceite de almendras y ricino que fueron inferiores, No se evidenció signos de floculación, coalescencia o sedimentación.

Durante la formación de la emulsión, la deformación de la gota es opuesta por el gradiente de presión entre el lado externo (convexo) y el lado interno (cóncavo) de la interfaz. En este sentido, la agitación es la presión o el gradiente de velocidad requerido para generar esta

formación en la emulsión. Los resultados obtenidos en esta investigación, permiten inferir que los EPS producidos por las cepas de *Frankia* sp., presentaron la capacidad de formar un gel que rodea las gotículas de la fase oleosa, que actúa como barrera, impidiendo la coalescencia y la rotura de la emulsión.

La mayor parte de los estudios sobre emulsiones se centran en la formación y caracterización a través de análisis de estructuras y propiedades en función de diferentes variables asociadas a la composición y mecanismos de preparación como las condiciones de formación, tipo de emulsificantes hidrofílicos, lipofílicos y la utilización de distintos compuestos como polisacáridos para ayudar a la estabilización del sistema, incorporación de compuestos bioactivos fundamentalmente hidrosolubles en la fase acuosa interna (Jiménez, 2013).

Los estudios realizados por García (2021) con microorganismos halófilos reporta porcentajes de emulsión entre el 55% y el 70% en su mayoría de ensayos, siendo superiores al patrón para varios de los EPS estudiados. Esta emulsión no solo fue estable durante las primeras 24 horas, sino que también mantuvieron la emulsión por más de 120 hora.

Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron presentados por Fuentes *et al.* (2013) con *Halomonas* sp., pero inferiores a los reportados Mata (2006) en cepas de halófilas y a los reportes de Amjres *et al.*, (2010) en *Halomonas nitroreducens* quienes reportaron porcentajes emulgente de 85% para aceite de oliva y del 70% para aceite de girasol.

La posibilidad de emulsificación de aceite de oliva y aceite de girasol de los biopolímeros es un dato interesante a nivel agroindustrial. Las emulsiones de aceite/agua son muy comunes en

la industria, especialmente en la producción de biopelículas, recubrimientos y muchos otros productos. El porcentaje del exopolisacárido de *Frankia* sp. emulsionado con los dos aceites fue al menos comparable al obtenido con cualquier emulsionante químico utilizado como control en este estudio, y en muchos casos superior.

### **7.7.2. Grado de Dispersión**

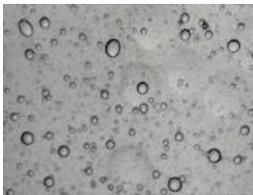
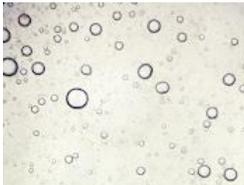
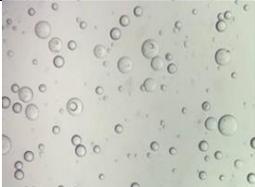
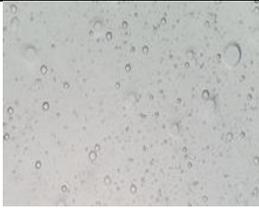
Existe un elevado número de especies microbianas que sintetizan exopolisacáridos con actividad emulgente (bioemulgentes). Una emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable de dos o más líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles. Las funciones bioemulgentes en general son: i) incrementar el área de superficie entre dos fases inmiscibles, en agua y una fase oleosa o substrato insoluble; ii) incrementar la biodisponibilidad de sustratos hidrofóbicos mediante el aumento de la solubilidad; iii) regular la adhesión y separación de los microorganismos a las superficies (Aranberri *et al.*, 2006).

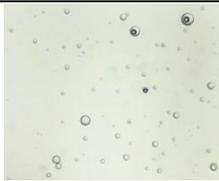
Basados en su masa molecular los bioemulgentes, pueden ser divididos en bioemulgentes de pequeña masa molecular y de elevada masa molecular. Los de pequeña masa molecular son los glucolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos, los cuales actúan en la disminución de la tensión superficial de las emulsiones lo que le confiere una actividad surfactante o tensioactiva estos se denominan biosurfactantes. Los de mayor masa molecular, están integrados por lipolisacáridos y compuestos polisacáridos en general, los cuales provocan una disminución de la tensión superficial de las interfaces, aunque no tan marcadas como los emulgentes de menor masa molecular, se consideran bioemulgentes estabilizadores (Aranberri *et al.*, 2006).

El resultado de las microfotografías de las gotículas y algunas de sus características evidenciadas se indican en las Tablas 20 y 21.

**Tabla 20**

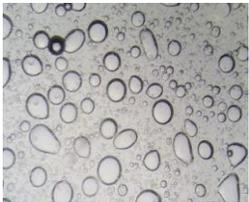
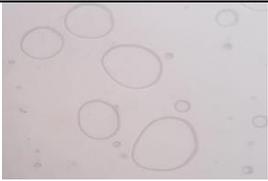
*Emulsiones con diferentes tratamientos oleosos de los EPS Cnp1*

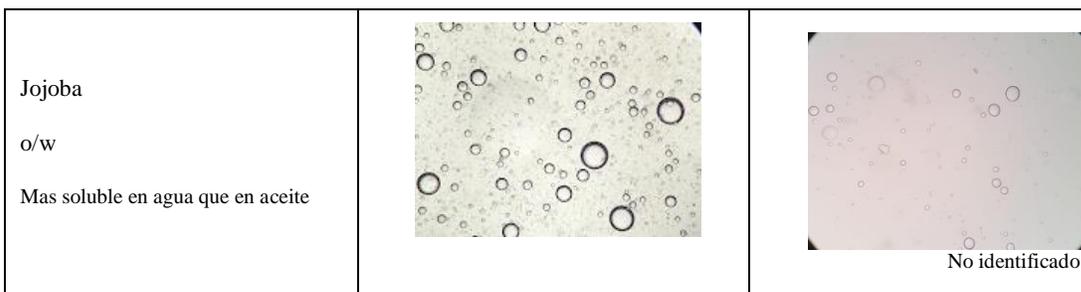
Aceite	1 hora	24 horas
Oliva o/w Mas soluble en agua que en aceite		 <p style="text-align: right;">Sedimentación</p>
Almendras o/w Mas soluble en agua que en aceite		 <p style="text-align: right;">Coalescencia</p>
Girasol o/w Mas soluble en agua que en aceite		 <p style="text-align: right;">Coalescencia</p>
Aceite de ricino o/w Mas soluble en agua que en aceite		 <p style="text-align: right;">Sedimentación</p>

<p>Jojoba</p> <p>o/w</p> <p>Mas soluble en agua que en aceite</p>		 <p>Coalescencia</p>
---	---	---

**Tabla 21**

*Emulsiones con diferentes tratamientos oleosos de los EPS Cnt12*

Aceite	1 hora	24 hora
<p>Oliva</p> <p>o/w</p> <p>Mas soluble en agua que en aceite</p>		 <p>Coalescencia</p>
<p>Almendras</p> <p>o/w</p> <p>Mas soluble en agua que en aceite</p>		 <p>Agregación</p>
<p>Girasol</p> <p>o/w</p> <p>Mas soluble en agua que en aceite</p>		 <p>Goticas de emulsión múltiple</p>
<p>Ricino</p> <p>o/w</p> <p>Mas soluble en agua que en aceite</p>		 <p>Goticas de emulsión múltiple</p>



Al analizar las fotomicrográficas se identificó que las emulsiones presentaron estabilidad física de tipo sedimentación en el aceite de oliva y ricino en EPS Cnp1 y EPS Cnt12 respectivamente; la sedimentación es una emulsión que se generan como consecuencia de la diferencia de densidades entre ambas fases, este tipo de estabilizadores se disuelven en la fase continua y aumentan su viscosidad o crean puntos de conexión, que restringe la movilidad de las gotas y las colisiones entre ellas, reduciendo el riesgo de coalescencia, un ejemplo claro de este tipo son los polisacáridos (Janczarek *et al.*, 2015).

Las emulsiones que mostraron ser de tipo coalescencia fueron el aceite de oliva en los EPS Cnt12 y en aceite de girasol y almendras en los EPS Cnp1. Este tipo de emulsión se caracteriza por presentar tensión interfacial, lo que causa un cambio real en la distribución del tamaño de la gota, el tamaño inicial de la gota solo puede ser recuperada mediante otro proceso de emulsificación (Mata, 2006).

La cepa Cnt12 presentó emulsión tipo agregación en el aceite de oliva, la cual se origina como consecuencia de las fuerzas de atracción interparticulares, en este sentido la gota permanece constante la distribución inicial puede conseguir por agitación (Aranberri *et al.*, 2006).

Las emulsiones simples se presentaron en todos los aceites a excepción de los EPS expuestos a los aceites girasol y ricino. Las emulsiones múltiples son sistemas multicompartimentizados, que se caracterizan por la coexistencia de emulsiones de aceite-en-agua (O/W) y de agua en aceite (W/O), donde los glóbulos de la fase dispersa contienen dentro de ellos gotas dispersas más pequeñas. Este tipo de emulsiones son importantes para microencapsulación en farmacología, cosmética y otros usos industriales (Aranberri *et al.*, 2006).

Los diámetros de las gotas líquidas que se encuentran dispersas se encuentran en el rango de 0,1 y 100  $\mu\text{m}$ . Aunque se traten de dispersiones termodinámicamente inestables, las emulsiones pueden convertirse en cinéticamente estables gracias a la presencia de agentes tensioactivos que presentan la capacidad de absorción en las superficies de las gotas. En la mayoría de las emulsiones una de las fases es acuosa y la otra un aceite polar, como se puede evidenciar en el registro fotográfico. Las emulsiones obtenidas fueron de aceite en agua (*oil-in-water*, o/w) (Aranberri *et al.*, 2006).

Las emulsiones que presentaron los exopolisacáridos del actinomiceto *Frankia* sp. fueron similares a los reportados por Exenta *et al.* (2020) quienes evaluaron proteína extraída de almendra. Por su parte García (2021) en bacterias halófilas reportaron una emulsión estable en el tamaño de la gota al transcurrir el tiempo, donde muestra un buen carácter emulgente y estabilizador. Loyeau (2017) en bacterias probióticas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* encontraron que la emulsión se desestabiliza en con el transcurso del tiempo, efecto asociado a que las gotas de aceite aisladas a la superficie presentaron menor densidad que la fase.

### 7.7.3. Pruebas de Dilución y Ebulloscopia de los EPS

Se realizaron varias diluciones a diferentes concentraciones de los EPS Cnp1 y Cnt12, con el fin de determinar si el agua es el solvente ideal para estos compuestos o si era necesario encontrar un solvente más fino al biopolímero. De igual manera, se determinó el punto de ebullición. Los resultados de los valores de concentraciones y los datos de temperaturas de dilución obtenidos se indican en la tabla 22.

**Tabla 22**

*Temperaturas de ebullición de diferentes concentraciones de EPS Cnp1 y Cnt12*

EPS	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)	Volumen medio (mL)	Concentración (g/L)
<b>Cnp1</b>	15	0	80	70
	30	8	78	83,4
	40	7	78	83,2
	50	10	77	82,7
	60	10	75	80,7
	70	12	51	56,8
	80	14	48	53,6
	90	14	47	52,8
	92	8	18	23,4
<b>Cnt12</b>	15	0	80	71,0
	30	5	78	73,9

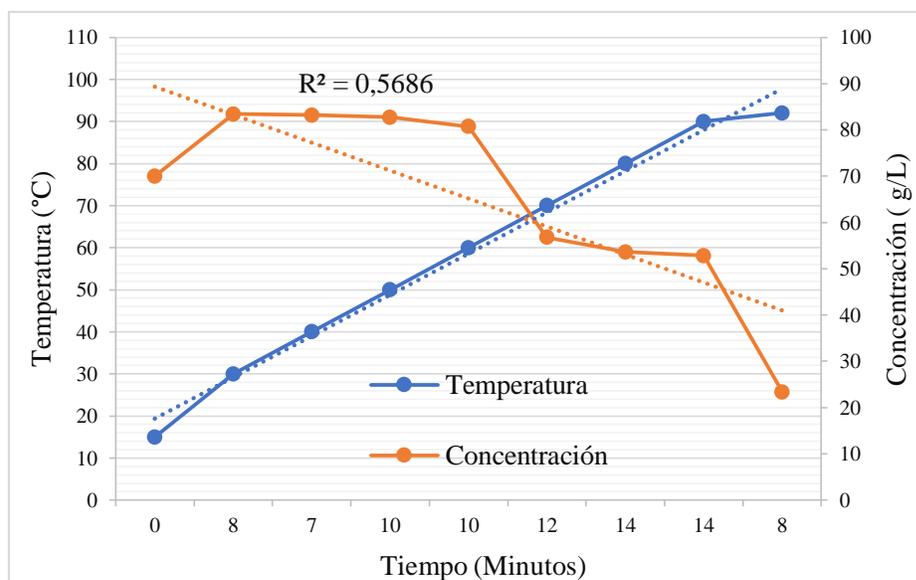
40	7	75	72,8
50	10	74	72,3
60	13	72	70,4
70	14	58	56,1
80	15	56	53,3
90	12	46	43,6
92	9	14	11,7

La concentración de los dos EPS fue de 70 y 71 g/L en su estado inicial a temperatura ambiente. Los valores presentaron una disminución en su concentración con la temperatura, con un mayor efecto a los 92°C que generó un descenso en la concentración del 66 y 83% en los EPS Cnp1 y Cnt12 respectivamente. Como se puede observar a los 70 °C, la viscosidad descendió con mayor tendencia en los dos EPS.

Con datos obtenidos, se realizó las gráficas que se observan en las figuras 68 y 69 Como se puede ver la concentración de los dos EPS presentan una tendencia lineal con un del  $R^2$  56 y 70% respectivamente. Frente al tiempo no se observó una tendencia lineal significativa para los dos EPS.

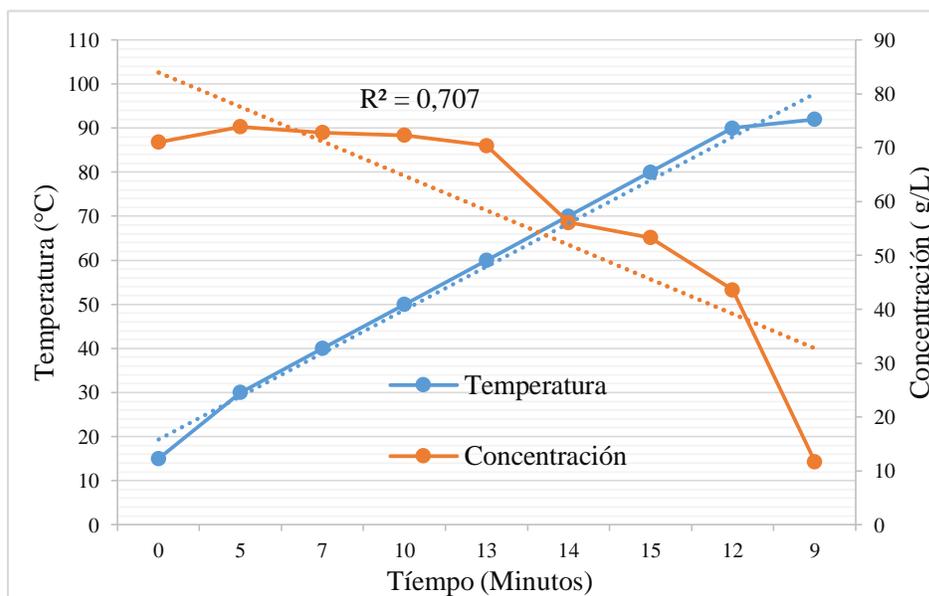
### **Figura 66**

*Datos de temperatura de ebullición obtenidos para las disoluciones del EPSCnp1*



**Figura 67**

*Datos de temperatura de ebullición obtenidos para las disoluciones del EPS Cnt12*



A partir del comportamiento que tuvieron los puntos de ebullición para ambos polímeros y al observar las disoluciones después de un tiempo, se puede establecer que los polisacáridos por las cepas de *Frankia* sp. presentan solubilidad en agua y es por eso, los puntos de ebullición de las disoluciones son mayores a medida que se aumenta la concentración. Se puede concluir que el solvente empleado para estos polisacáridos, fue bueno.

El método de ebulloscopia para calcular el peso molecular mide la diferencia entre las temperaturas de ebullición del disolvente puro y de varias soluciones del polímero en el mismo disolvente (Miranda, 2015). Franco (2004) realizó estos mismos ensayos con exopolisacáridos producidos por cepas de *Rhizobium leguminosarum* y obtuvo valores diferentes respecto a los evidenciados en *Frankia* sp., los autores no encontraron en el agua como el mejor solvente para los EPS producidos por estas cepas. En este sentido, se puede inferir que los EPS producidos por *Frankia* sp., contienen características diferenciales, en su totalidad no estudiados a nivel químico, con adelantos básicos a nivel molecular y más asociados a la simbiosis.

## **7.8. Factores que Influyen en la Viscosidad de las Preparaciones Acuosa del EPS Producidos por *Frankia* sp.**

### ***7.8.1. Viscosidad de las Soluciones Acuosa de EPS de Cnp1 y Cnt12***

La viscosidad es la medida de la fricción interna de un fluido la cual genera cierta resistencia a fluir. La medición de la viscosidad permite entender el tipo de flujo que presenta y así lograr entender las propiedades de los EPS (Orozco, 1999).

Dentro de este trabajo el término viscosidad se define como la capacidad que poseen los microorganismos para formar filamentos estirados dentro de medios líquidos, esto se observa cuando son recogidas con un asa de siembra (Dierksen *et al.*, 1997).

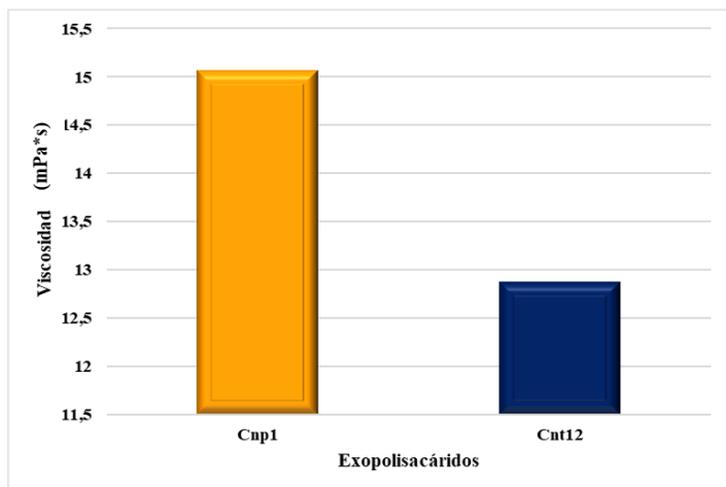
Los fluidos se dividen en newtonianos o no newtonianos según el tipo de relación que se produzca entre el esfuerzo de corte y el gradiente de velocidad de deformación. Así, cuando la relación entre ambos parámetros es lineal al fluido se lo denomina newtoniano y la constante de proporcionalidad entre ambos parámetros es la viscosidad. En los fluidos no newtonianos la relación no es lineal y los diferentes comportamientos de flujo posibles son: pseudoplástico, dilatante, herschel bulckley y plástico de Bingham. En los fluidos pseudoplásticos al aumentar el gradiente de velocidad disminuye el incremento de esfuerzo observado para una variación en el gradiente de velocidad. Esto significa que la resistencia del líquido a fluir disminuye con el aumento del gradiente de velocidad aplicado (Pérez *et al.*, 2010).

La viscosidad es un parámetro importante que permite definir el posible uso de los EPS a nivel industrial. Con esta evaluación, se pretende contribuir a la identificación de si los EPS obtenidos por las cepas de *Frankia* sp. son aptos o no para procesos de gelificación, fijación o como materiales útiles en la elaboración de biopelículas o recubrimientos para alimentos. Uno de los parámetros que permitió concluir un resultado positivo es el concepto que, para los microorganismos simbióticos, la presencia de los exopolisacáridos es importante en el proceso de reconocimiento entre hospedero y microsimbote. A nivel *in vitro* se reconocen por la formación de colonias mucosas en el crecimiento en medio sólido o por el aumento de la viscosidad o la formación de un gel en medios líquidos como es el caso de *Frankia* sp. (Rey, 2015).

Como se indica en la figura 70, el comportamiento de mayor viscosidad fue el EPS Cnp1 con una viscosidad máxima de 15 mPa\*s. Este EPS fue aislado de la cepa que lleva su nombre, la cual demostró en los diferentes ensayos realizados en este trabajo, una mayor producción de EPS, alto crecimiento traducido en biomasa, baja contaminación y mejores características visuales de la viscosidad en forma del gel en el medio de cultivo líquido. Este resultado es coherente con lo mencionado por diversos autores, donde se manifiesta que la producción de EPS puede variar entre especies, procedencia y comportamiento en condiciones nutricionales (Mata, 2006).

### Figura 68

Viscosidad de las preparaciones acuosas de las cepas estudio Cnp1 y Cnt12



Las cepas de *Frankia* sp. aisladas de *Alnus acuminata*, mostraron capacidad de producir EPS, efecto asociado a la presencia de azúcares en la pared celular de *Frankia* sp. el cual contiene el monosacárido (2-Ometil-D-manosa) que cumple un rol específico en el reconocimiento con el hospedero durante la simbiosis (Kucho *et al.*, 2010). Lee *et al.* (2013)

encontraron en los EPS producidos por la cepa de *Frankia* sp. que los principales monosacáridos de los residuos de glucosilo fueron galactosa, glucosa y manosa, independientemente de las condiciones de crecimiento.

La naturaleza de las moléculas de EPS influye en gran medida en la estabilidad y en los valores de viscosidad, Flemming & Wingender (2001) sugieren que existen comportamientos para cada cepa o cultivo y las interacciones entre las diferentes fuerzas físico-químicas da lugar a la matriz de EPS que tiene características tridimensionales y gelatinosas.

Lee *et al.* (2013) encontraron en los EPS producidos por la cepa de *Frankia* sp. que los principales monosacáridos de los residuos de glucosilo fueron galactosa, glucosa y manosa, independientemente de las condiciones de crecimiento.

Los diferentes valores de viscosidad se ven afectados por el pH, la concentración de sales, azúcares y otros componentes como lípidos y polisacáridos (Pilosof, 2000). Polímeros como la celulosa reducen la viscosidad en microorganismos fijadores de nitrógeno como *Rhizobium*, y en colonias de coloración rojiza como en *P. endophyticum* PEPV15 se encuentra un polisacárido muy acuoso y menos viscoso que el de las cepas de *Rhizobium* (Flores, 2018).

Soluciones muy diluidas de EPS bacterianos suelen comportarse como fluidos newtonianos. En cambio, a mayores concentraciones muestran comportamiento pseudoplástico. Este comportamiento se presenta en soluciones de EPS producidos por *Propionibacterium* (Gorret *et al.*, 2003), *Lactococcus lactis* (Tuinier *et al.*, 1999), microorganismos de los gránulos de kéfir (Grattepanche *et al.*, 2007) y en algunos cultivos iniciadores de yogurt de lactobacilos (Petry *et al.*, 2003; Canquil *et al.*, 2007).

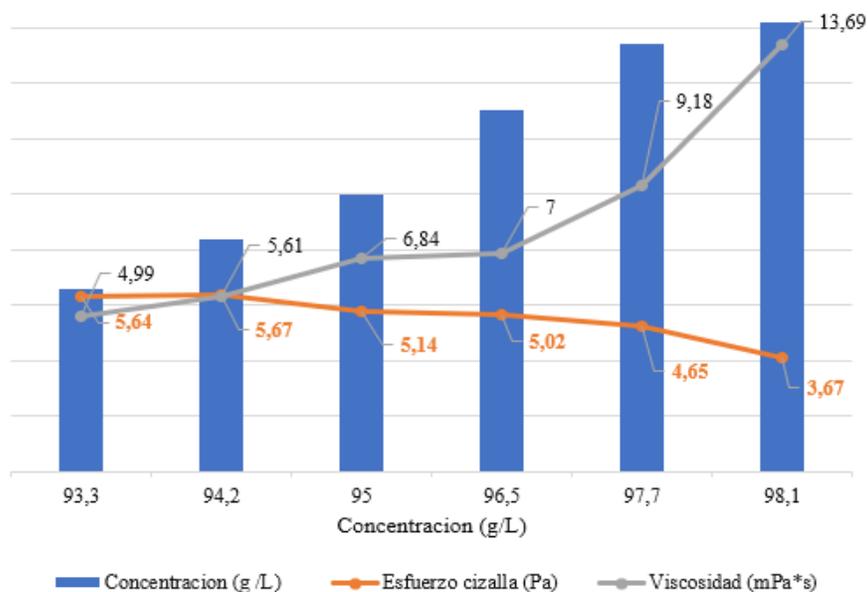
### ***7.8.2. Concentración de los Exopolisacáridos de la Cepa Cnp 1***

Dada la respuesta de los EPS obtenidos de la cepa Cnp1, se realizó una prueba única a esta cepa para determinar la concentración de los EPS, los cuales se indican en la figura 71.

Acorde a los resultados reportados por diferentes autores como se ha documentado a lo largo del documento, la viscosidad presentó una tendencia a aumentar con la concentración de los EPS de esta cepa. La dependencia entre la viscosidad y el gradiente de deformación o esfuerzo de cizalla es un indicativo del comportamiento pseudoplástico de los EPS de la cepa de *Frankia* sp. Cnp1 en solución; es así, que la viscosidad disminuyó al aumentar el gradiente de deformación (esfuerzo cizalla). Esta respuesta es una propiedad general en la mayoría de los biopolímeros de uso industrial (Mata, 2006).

#### **Figura 69**

*Efecto de la concentración de los EPS cepa Cnp1 sobre la viscosidad de las preparaciones acuosa.*



La medida obtenida en el Rheometro Brookfield permitió utilizar un rango de fuerza de cizalla entre 3,34 – 6,02, torque entre 45% y 82%, arrojando una desviación en la mayoría de las mediciones de  $\pm 0,1$  mPa\*s.

La relación de la viscosidad y el esfuerzo de cizalla permite conocer el esfuerzo aplicado a la muestra y la deformación resultante. En este sentido, la deformación inicial fue de 0,5 Pa y alcanzó su valor máximo de 0,65 Pa. González *et. al.* (2015) mencionan, que este valor representa una baja inestabilidad de la mezcla de polímeros químicos. Específicamente en EPS producidos por microorganismos, el bajo esfuerzo de cizalla hace relación a un alto valor de viscosidad (Moreno *et al.*, 2000)

Al someter a la mezcla de EPS de la cepa Cnp1 en solución con glicerol, se presentó cualidades como un agente espesante o viscosante. En la figura 72 se puede observar que, a

medida que aumenta la fuerza de deformación (fuerza de cizalla), aumentó la viscosidad de la mezcla del biopolímero.

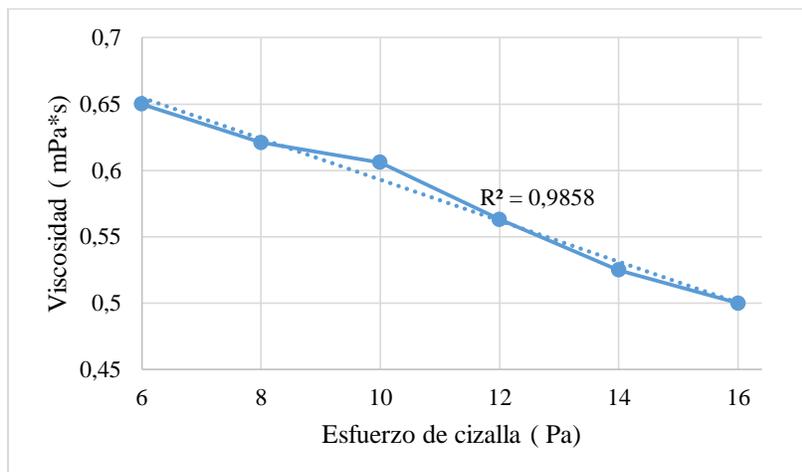
Hosseini *et al.* (2010) compararon las propiedades reológicas de una solución acuosa de C.M.C. en función a la concentración y encontraron que la solución de C.M.C. se comporta como un fluido pseudoplástico. Haddarah *et al.* (2014) realizó un estudio reológico a la goma de algarrobo, a una concentración de 1% (w/v) y encontró un comportamiento de fluido pseudoplástico. En el polisacárido proveniente de *Nostoc sphaericum*, Roldan (2015) encontró que a medida que se incrementaba la concentración del hidocoloide de esta cianobacteria se aumenta la viscosidad de la emulsión.

Por su parte Amjres (2010), reportó que el biopolímero producido por *Halomonas nitroreducens* cepas HK30 y HK12 presentaron una mayor capacidad viscosizante a medida que aumentaba el esfuerzo de cizalla. Igual respuesta se observó con el maurano un exopolisacárido producido por *Halomonas maura* (Bouchotroch *et al.*, 2001).

En algunos casos se observa un rango en el comportamiento del alginato efecto del gradiente sobre la viscosidad aparente el cual tiene un máximo en torno a la concentración de 0,1% en masa, donde este alcanza su máximo valor de viscosidad. Este mismo comportamiento se reporta para polímeros como la goma Cashew (Mothé & Rao, 1999).

## **Figura 70**

*Efecto del glicerol en los EPS de la cepa Cnp1 sobre la viscosidad y el esfuerzo cizalla*



### 7.8.3. Efecto de la Temperatura sobre la Viscosidad

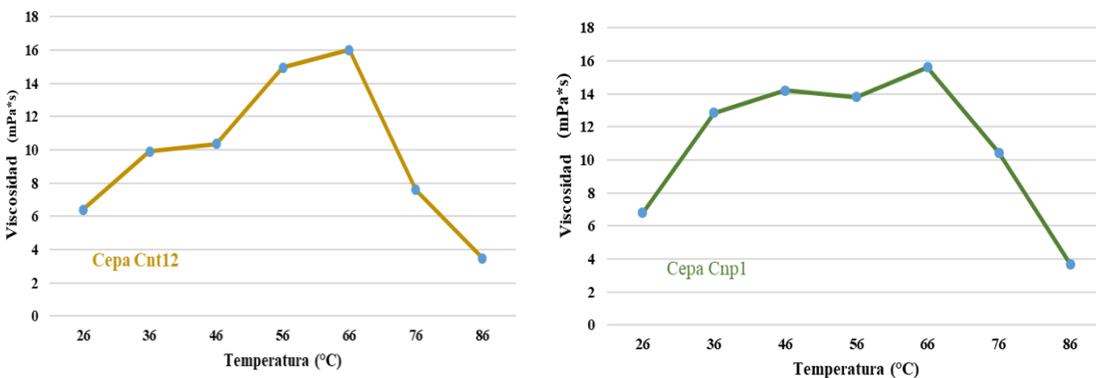
El análisis térmico permite medir algunas propiedades de ciertos materiales cuando estos se programan a una medición continua en función de la temperatura, es decir, cuando se está controlando el calentamiento y o enfriamiento. Conocer las propiedades térmicas de los polímeros permite determinar las transiciones térmicas que ocurren cuando son expuestos a temperaturas, por ejemplo, el efecto en la descomposición, temperatura de fundición o de transición vítrea, entre otros, efectos que varían acorde a la naturaleza del polímero (Janczarek *et al.*, 2015).

La respuesta de la viscosidad respecto a la temperatura de los EPS en solución, es un factor de gran importancia, ya que los polímeros deben ser expuestos a diferentes temperaturas en su aplicación a nivel industrial (Montoya *et al.* 2021).

En la figura 73, se indican los resultados térmicos realizados a las muestras de biopolímeros obtenidos.

**Figura 71**

*Efecto del aumento gradual de la temperatura sobre la viscosidad de los EPS Cnp1 y Cnt12.*



Como se observa en la gráfica, se presentó una evolución de la viscosidad de los exopolisacáridos acorde al aumento de la temperatura, llegando a un máximo de viscosidad a los 66°C con 16 y 15 mPa\*s para EPS Cnp1 y EPS Cnt12 respectivamente. A partir de esta temperatura, se evidenció un descenso marcado sobre de viscosidad hasta los 3,7 y 3,5 mPa\*s.

Durante el incremento de la temperatura se notó que al aumentar la temperatura superior a los 90°C la mezcla del biopolímero inició un proceso de ebullición, el valor de la viscosidad en este punto del ensayo no pudo ser detectado por el equipo.

Estos cambios graduales de temperaturas de descomposición suministran información sobre la relación que existe entre la estructura y las propiedades físicas estableciéndose que a medida que transcurre el tiempo y la temperatura, se genera una red polimérica más estable.

La disminución de la viscosidad se debe a un estado de desorden de las partículas de los polisacáridos que aumenta a medida se incrementa el calentamiento, lo cual hace inestable estas

soluciones disminuyendo su rango de aplicación a nivel industrial en procesos que precisen calentamiento (Sutherland, 1999).

Los resultados obtenidos, permite identificar que las soluciones acuosas de los dos EPS, aumentaron con la temperatura, en este sentido se pudo determinar que el biopolímero obtenido en este estudio presenta cualidades de alta resistencia a altas temperatura (Sutherland, 1999).

En ensayos relacionados donde se utilizó gomas derivadas de la linaza, albahaca, jarabes alimenticios y exopolisacáridos producidos por otros microorganismos y se evidenció que a medida que aumenta la temperatura disminuye la viscosidad de la mezcla (Paris, 2009; Abbes *et al.*, 2015; Abbastabar *et al.*, 2015).

En polisacáridos extraídos de algas como el alginato, Gómez & Navaza en el año 2002, observaron una disminución de la viscosidad aparente a medida que la temperatura aumentaba, lo que producía una pérdida en el comportamiento pseudoplástico, efecto asociado al gradiente de velocidad sobre la viscosidad de la muestra.

El índice de viscosidad a diferentes concentraciones del hidrocoloide de *Nostoc sphaericum* v. en solución, disminuyó cuando la temperatura aumentó de 27 a 70 °C, bajando de 60 mPa\*s a 3 mPa\*s. Este fenómeno en la variación de la viscosidad aparente con la temperatura se puede atribuir al movimiento térmico de las moléculas, el cual se intensifica con el aumento de temperatura, ampliando así, la distancia intermolecular y debilitando las interacciones. Además, así como los polisacáridos del *Nostoc sphaericum* v. pueden hidrolizarse a alta temperatura, cabe la posibilidad de que el EPS producido por *Frankia* sp.

también pueda hidrolizarse y que esto cause la disminución de la viscosidad (Kim & Yoo, 2011; Roldan, 2015).

Por otro lado, mientras que muchos polisacáridos solubles en agua tienen una caída en la viscosidad con el aumento de las temperaturas (Wu *et al.*, 2014), como es el caso de la goma de Tara obtenida de *Caesalpinia spinosa*, Farhoosh & Riazi (2007) y Yang & Zhu (2007), demostraron que la goma de xantano puede mantener la viscosidad a altas temperaturas, o se puede presentar el caso de que el valor de viscosidad del polímero empieza a descender desde una temperatura específica como en el caso del murano el cual llega a una temperatura por encima de los 60 °C y sus valores de viscosidad empiezan a descender (Moreno, 2013; Quesada *et al.*, 2006) o en la goma welan producida por *Sphingomonas* sp donde a solo al alcanzar temperaturas superiores a 80 °C los valores de viscosidad empiezan a fluctuar (Chengzhu *et al.*, 2021).

Al someter la viscosidad de las preparaciones acuosas de los dos EPS a un cambio drástico de temperatura (Tabla 23).

**Tabla 23**

*Recuperación de la viscosidad de los ex polisacáridos al ser expuestos a temperatura y enfriamiento.*

EPS	Temperatura inicial (°C)	Viscosidad inicial (mPa*s)	Temperatura final (°C)	Viscosidad final (mPa*s)
Cnp1	15	7,91		
	70	4,25	4	4,81

	90	3,26	4	4,36
	15	7,60		
<b>Cnt12</b>	70	3,65	4	4,51
	90	3,52	4	3,76

El comportamiento del biopolímero en solución tras un calentamiento a 70 y 90°C, indicaron una pérdida de la viscosidad al ser expuesto a cambios de temperaturas drásticos, llegando a tener patrones de viscosidad muy bajos con pérdida del 46 y 42% EPS Cnp1 y 48 y 46%. Datos similares a los reportados por Mata (2006). La recuperación de la viscosidad tras refrigeración se logró en un 69 y 70% EPS Cnp1 y 77 y 72% en el EPS Cnt12. Se observó que el existió un efecto sobre las propiedades viscosizantes de los exopolisacáridos producidos por las dos cepas, esta pérdida recuperó progresivamente su carácter viscoso.

En murano en solución, también resiste un descenso y aumento de temperatura tal como lo reporta Quesada *et al.* (2006).

#### ***7.8.4. Efecto del Proceso de Esterilización en Autoclave de Vapor***

El movimiento del vapor de agua a través de una lámina de polímero, permite identificar y determinar el funcionamiento de las biopelículas como barreras y predecir el grado de preservación (Montoya *et al.*, 2021).

El efecto del vapor sobre la viscosidad de los EPS se puede observar en la tabla 24. Como se puede observar la viscosidad de los EPS se estabilizó después de las 24 horas de autolavado. Los resultados obtenidos con los previamente identificados en las pruebas de temperatura, indican que los EPS obtenidos por las cepas de *Frankia* sp. se muestran termorreversibles.

**Tabla 24**

*Efecto de viscosidad en congelación y descongelación*

Muestras	Hora	Viscosidad (mPa*s)
<b>Cepa 1</b>	0	7,91
	Después de autolavado (87 °C)	3,47
	24	13,81
<b>Cepa 12</b>	0	9,94
	Después de autolavado (87 °C)	3,7
	24	16,62

Estudios realizados en biopolímeros como curdlan, xantano y succinoglicano se evidenció la no alteración de las propiedades viscosantes de estos polímeros sometidos a procesos de congelación y descongelación sucesivas (Paris 2009; Born *et al.*, 2002; Martínez 2010). Por lo tanto, los EPS obtenidos en esta investigación pueden funcionar satisfactoriamente en procesos de congelación, descongelación y procesos en los que sean necesarias etapas de auto clavado.

A nivel industrial el EPS se podría utilizar como aditivo en alimentos como embutidos los cuales contemplan etapas de esterilización. De igual manera, también podría ser utilizado en la industria de los helados y alimentos congelados ya que permitiría mantener la propiedad de la viscosidad en bajas temperaturas. Para ello, es importante ampliar estudios más detallados acerca

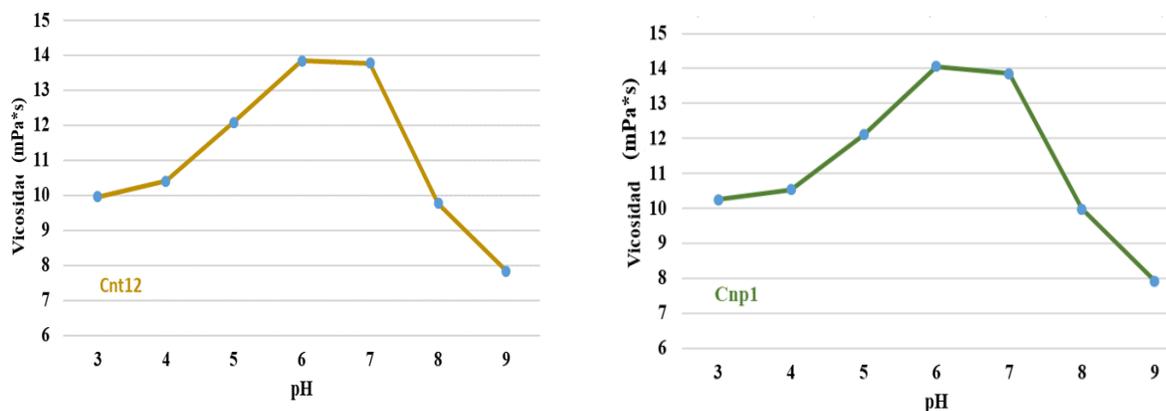
de su aplicabilidad y su uso a nivel industrial, teniendo en cuenta estos ensayos de aproximaciones realizadas.

### 7.8.5. Efecto del pH Sobre la Viscosidad

En la figura 74, se grafica el efecto del pH sobre la viscosidad los dos exopolisacáridos. Las curvas permiten observar detalladamente la forma en la que la viscosidad responde a los cambios de pH, llegando a ser una relación dinámica en la cual el exopolisacárido modifica su viscosidad ante los diferentes cambios de pH.

**Figura 72**

*Determinación de viscosidad a diferentes valores de pH*



Los EPS mostraron un comportamiento similar en los diferentes niveles de pH evaluados con una mayor viscosidad entre el pH 5 a 7. El pH básico generó mayor impacto sobre la viscosidad que el pH ácido. Los intervalos de pH fueron evaluados en exopolisacáridos producidos por *Paenibacillus* por Weon *et al.* (1999), se encontró un efecto del pH sobre la viscosidad, siendo mayor la respuesta de la viscosidad en pH de 6 hasta 10.

En *Rhizobium leguminosarium*, el efecto de pH fue óptimo de 6,5 y 7,5 (Janczarek *et al.*, 2015). En *Vibrio alginolyticus* se presentó una disminución de la viscosidad con pH ácidos (2) y muy básicos (11) (Muralidhara & Jayachandran, 2003).

Estos cambios de la viscosidad generados por el pH como se evidencia en la (figura 48) se deben a las fuerzas iónicas y en las interacciones que existen entre las fuerzas de atracción y repulsión de las cadenas poliméricas del exopolisacárido, tal comportamiento, es semejante a ocurrido en las gomas derivadas de origen natural como la goma de almendra, goma de linaza y goma de albahaca (Qian, 2012; Amini & Razavi, 2012;). Por su parte, las gomas xantana, konjac y la de mascar, se mantienen estables a un amplio rango de valores de pH siendo muy atractivas para ser utilizadas a nivel industrial (Chen, 2006).

El rango evaluado de pH (3 a 9) fue basado en los diferentes referentes bibliográficos como Sutherland (1999), quien sustenta que cada una de las cadenas poliméricas reacciona de diferente manera a cada valor de pH. Como era de esperarse, los resultados obtenidos indican un efecto positivo a estos cambios. De estos resultados, queda pendiente realizar estudios donde se evidencie la no ruptura de la composición del EPS en ambientes ácidos o alcalinos extremos ya que una ruptura daría inicio a una degradación por hidrólisis (Ale *et al.*, 2016).

### **7.9. Participación de los EPS en la Formación de Biofilms**

La relación entre las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo es un proceso coevolutivo largo y complejo, que conduce a interacciones especializadas y duraderas que van desde el engaño hasta el altruismo. Las múltiples interacciones planta-microbio que tienen lugar en la rizósfera están mediadas a través de una red dinámica, a través de señales moleculares

secretadas como respuesta al ataque en el caso de una enfermedad o como una estructura de raíz en desarrollo, como en la simbiosis de micorrizas rizobianas y arbusculares (Ktari *et al.*, 2017).

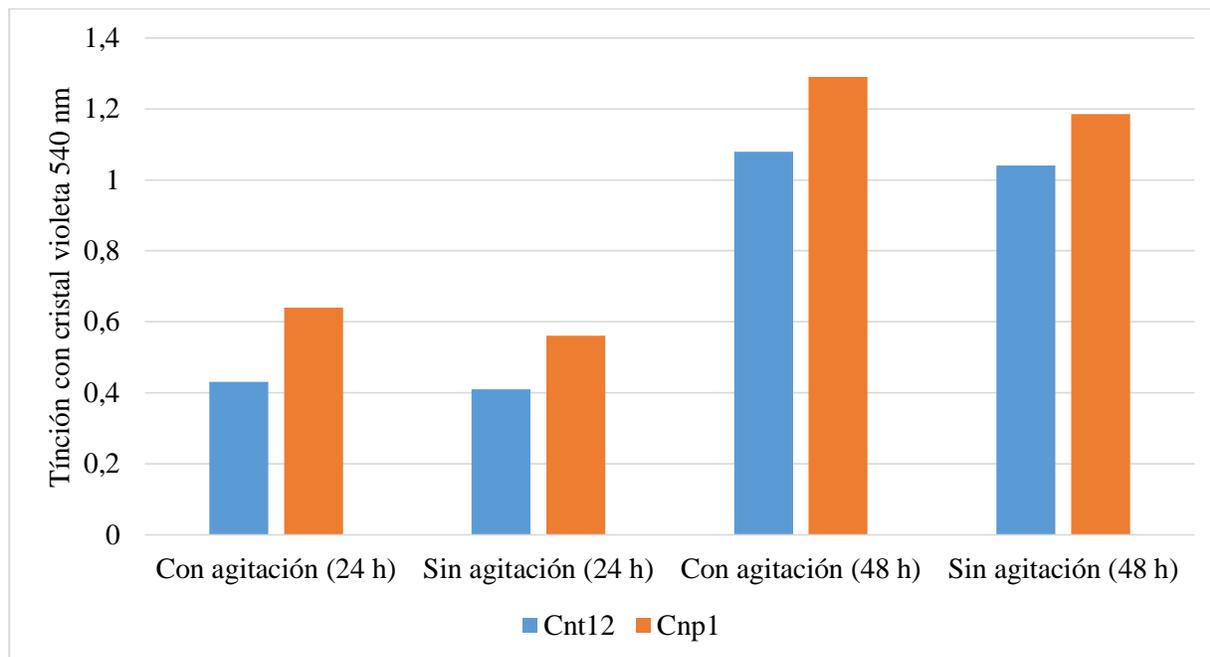
La formación de biopelículas ha sido ampliamente estudiada en microorganismos simbióticos, ya que esta capacidad es relevante en las interacciones entre microsimbionte y hospedero (Bhattacharyya & Jha, 2012). La capacidad de formar biopelículas y colonizar activamente la superficie de la raíz es una ventaja para las bacterias simbióticas, ya que les permite competir por el espacio, sacando a otras bacterias de su área de acción. Es así que, estudios realizados por Marappa *et al.*, (2020) en endófitos de *Frankia* sp. aislada de *Casuarina* sp, encontró que los EPS aislados son agentes multipotentes antimicrobianos y antibiofilms en condiciones *in vitro* contra patógenos multihuéspedes de plantas actinorrizas.

En condiciones de laboratorio, se observó la formación de biofilms en los cristales de los frascos con los medios de cultivo líquido en las cepas de *Frankia* sp. aisladas que se dejaron por tiempo prologando. Con el fin de identificar si las cepas productoras de EPS Cnp1 y Cnt12 formaban biofilms, se aplicó la técnica de adhesión sobre superficies (placas microtiter) y su posterior tinción con cristal violeta. Se incluyó una evaluación de temperatura y de agitación, con el fin de observar las características de estos biofilms y la influencia.

En la figura 75 se muestran los resultados obtenidos tras incubar las dos cepas de *Frankia* sp. con agitación constante de 180 rpm y sin agitación a 36°C por un periodo de 24 y 48 horas.

### **Figura 73**

*Formación de biofilms con y sin agitación a las 24 y 48 horas de incubación*

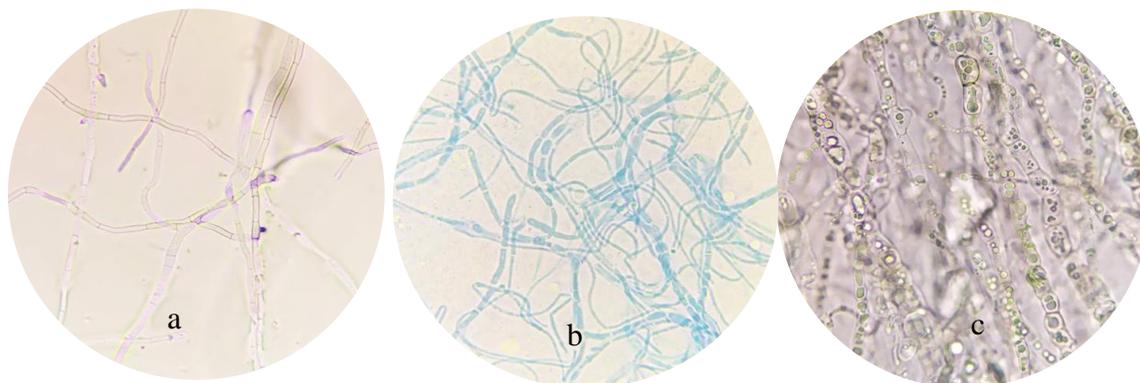


Como se puede observar en la figura 75, las cepas evaluadas presentaron capacidad de formar biofilms con agitación y sin agitación. El efecto de la agitación mostró un efecto positivo en la producción de biofilms en la cepa Cnp1 con una leve pero mayor formación de biofilms en los periodos de evaluación, respecto a la cepa Cnt12. Lo anterior, permite evidenciar que la modificación de las condiciones de crecimiento es importante para el desarrollo de este tipo de estructuras.

Microscópicamente para la cepa Cnp1, el crecimiento vegetativo fue filamentososo con ramificación y tabicación. Al inicio del periodo de evaluación, el diámetro del filamento varió entre 0,5 y 1,0  $\mu\text{m}$  (Figura 76 a) con el paso de los periodos de incubación se observó un engrosamiento ocasional de 1,5  $\mu\text{m}$  a las 48 horas (Figura 76 b y c). No se observó formación de esporas o vesículas. En la Figura 76 c, se observa la presencia de glicógeno dentro de las hifas.

**Figura 74**

*Fotomicrografías 40x de cepa de Frankia sp. Cnp1.*

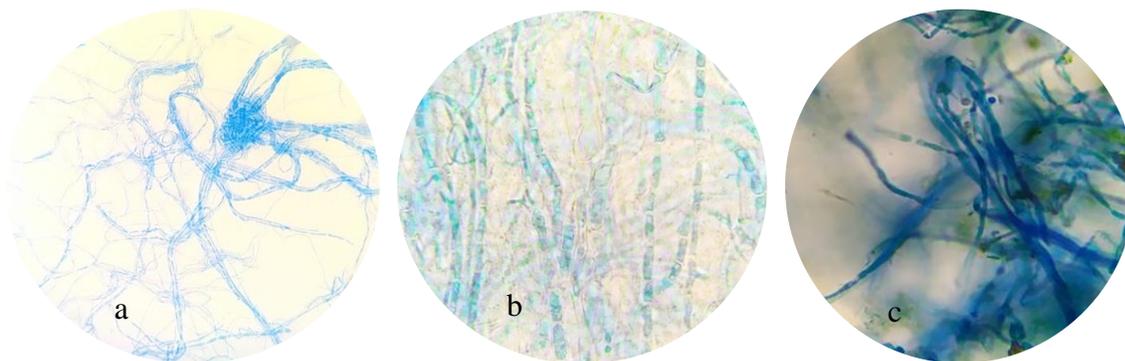


*Nota.* a) hora 0 b) hora 24 c) hora 48

Como se observa en la figura 77 a, la cepa Cnt12 inicialmente presentó la formación de hifas las cuales varió en ancho de 0,8 a 1,5 mm al pasar el periodo de incubación. No se observó formación de esporangios ni vesículas en los aislamientos, pero si la formación de pequeñas vesículas (Figura 77 b).

**Figura 75.**

*Fotomicrografías de cepa de Frankia sp. Cnt12*



*Nota.* a) hora 0 b) hora 24 c) hora 48

La formación de biofilms generalmente está relacionado por microorganismos patógenos que afectan las industrias y la salud humana. También se conoce biofilms naturales útiles como por ejemplo los formados por bacterias fijadoras de nitrógeno que se generan sobre las raíces de plantas leguminosas y actinorrizas, aumentando el rendimiento de los cultivos y las características físicas y químicas de los suelos. Los sistemas más empleados son los biofilms para el uso de aguas residuales, biorremediación y para el aprovechamiento de residuos de minería. Los biofilms se han empleado tradicionalmente para la elaboración de alimentos como la levadura que se desarrolla en la interfase líquido/aire, la superficie de los vinos, aditivos alimentarios, ácidos orgánicos, entre otros.

#### **7.10. Elaboración de Biopelículas**

Este ensayo consistió en realizar las primeras aproximaciones de la formación de biopelículas empleando varias formulaciones con aditivos empleados en el desarrollo de recubrimientos y biopolímeros

Los resultados de la evaluación de la formulación de siete biopolímeros con exopolisacáridos obtenidos de la *Frankia* sp. Cnp1, empleando componentes orgánicos y biodegradables de bajo costo y alta disponibilidad en el mercado se indican en la tabla 25.

**Tabla 25***Elaboración de biopelículas con diferentes aditivos*

Biopolímero	Observaciones	Color	Registro fotográfico
B1	<p>Cuando se dejó a temperatura ambiente se mantuvo en estado líquido a las 24 horas.</p> <p>Cuando se llevó a incubación a 60°C la mezcla formó una biopelícula gruesa, regular y homogénea.</p>	Traslúcida, levemente blanca	
B2	<p>Cuando se dejó a temperatura ambiente se mantuvo en estado líquido a las 24 horas.</p> <p>Cuando se llevó a incubación a 60°C la mezcla formó una biopelícula delgada, irregular y carente de homogeneidad.</p>	Traslúcido con un leve color café	

Biopolímero	Observaciones	Color	Registro fotográfico
B3	A temperatura ambiente se mantuvo en estado líquido hasta las 24 horas. Cuando se llevó a incubación a 60°C la mezcla formó una biopelícula gruesa, regular y muy homogénea.	Traslúcido	
B4	Cuando se llevó a incubación a 60°C la mezcla formó una biopelícula delgada, regular y frágil.	Traslúcido con leve color café	

Biopolímero	Observaciones	Color	Registro fotográfico
B5	<p>A temperatura ambiente se mantuvo en estado líquido levemente acuoso.</p> <p>Bajo calor a 60°C la mezcla formó una biopelícula gruesa, regular y homogénea.</p>	Traslúcido	
B6	<p>No hay cambio en las condiciones físicas de la mezcla, se mantuvo en estado líquido tanto a temperatura ambiente como a 60°C.</p>	Traslúcido	

Biopolímero	Observaciones	Color	Registro fotográfico
B7	La mezcla se repele y no se genera una mezcla homogénea, no hay formación de película.	Traslúcido	

En general las películas y recubrimientos comestibles obtenidos fueron transparentes, cohesivos y homogéneos. La cera de abejas no permitió la formación de biopelículas, quedando un polímero semilíquido.

Posterior a la incubación las formulaciones fueron llevadas a temperatura ambiente. Durante este proceso de enfriamiento se observó la estabilización de los mismos con excepción de las B7 y B8 con cera de abejas. Con el descenso de la temperatura, se observó cierta pérdida de claridad y transparencia, en las formulaciones B4 y B2, este efecto se asocia a la temperatura de gelatinización (Breuninger *et al.*, 2009).

Los biopolímeros con glicerol presentaron los mejores comportamientos. El glicerol es un poliol incoloro, inodoro y soluble en agua, formador de soluciones neutras y está aprobado por la FDA para ser aplicado en alimentos sin riesgo alguno. Los resultados obtenidos, están acorde a su uso comercial por su capacidad plastificante más utilizado en la elaboración de recubrimientos y películas comestibles, incorporado normalmente en dosis bajas, pues, su efecto plastificante suele influir negativamente en la permeabilidad de los recubrimientos (Arvanitoyannis *et al.*, 1989).

Los recubrimientos cumplen innumerables funciones, ya que poseen características que les permite conservar los productos. La evaluación en los materiales empleados ha permitido el uso de diversas materias primas sencillas o complejos envases multicapas que no requieren refrigeración, en la actualidad ya se incluyen materiales tipo activo o inteligente (Marsh & Bugusu, 2007).

Se conoce tres tipos de generaciones de recubrimientos. La primera generación son materiales hechos de polietileno de baja densidad 5 a 15% como las bolsas, con lenta fragmentación con moléculas pequeñas no biodegradables. Los de segunda generación

comprenden mezclas de almidón 40-70% y polietileno de baja densidad y una adición de copolímeros hidrofílicos como el polivinil alcohol y acetato de vinilo. La degradación del almidón toma alrededor de 40 días y la degradación final de la película entre 3 a 4 años (Robertson, 2008).

Los obtenidos en esta investigación pertenecen a los de tercera generación, los cuales se subdividen en tres subcategorías a) polímeros extraídos de biomasa b) polímeros producidos a partir de la síntesis química de monómeros de biomasa c) son los producidos naturalmente o por organismos genéticamente modificados (Robertson, 2008). En este último subgrupo se encuentra los materiales formadores de películas que incluyen almidones, gomas vegetales, almidones modificados químicamente y fibras. Los polisacáridos tienen monómeros simples, sin embargo, la conformación de su estructura es más complicada con comportamientos impredecibles, efecto asociados a los grupos hidroxilo o al resto de hidrófilos en la estructura de hidratos de carbono neutros, los enlaces de hidrógeno influyen de manera significativa en la formación de recubrimientos y sus características (Han, 2005)

La principal ventaja de este grupo de biopolímero es que proporcionan propiedades mecánicas adecuadas y presentan una alta capacidad para retrasar la transmisión de  $O_2$  y  $CO_2$  (Pavlath & Orts, 2009), pese a ello, los polímeros hidrófilos, tienen propiedades de barreras a la humedad y vapor de agua muy bajas (Rhim & Ng, 2007).

## 8. Conclusiones

- El estudio de la diversidad de cepas nativas de *Frankia* sp. asociadas con *Alnus acuminata* H.B.K en Colombia y la evaluación la producción de exopolisacáridos, puede contribuir a promover el potencial del uso de estas cepas con fines industriales y convertirse en un valor agregado de los beneficios de este microsimbote.
- Los altos requerimientos nutricionales y lento crecimiento, han sido las principales limitantes del aislamiento *in vitro* de *Frankia* sp. Sin embargo, en esta investigación se logró obtener 58 aislados, que procedían de los municipios de Pasto y Tangua, las cuales, mostraron capacidad de formación de exopolisacáridos principalmente cuando fueron sometidas a agitación constante e inclusión de extracto de raíz.
- La glucosa y el extracto de levadura mostraron ser las fuentes de carbono y nitrógeno de mayor afinidad por las cepas, produciendo mayor biomasa y exopolisacáridos.
- *Frankia* sp. demostró ventajas específicas para uso biotecnológico, presentando crecimiento rápido frente a los reportes obtenidos en otros estudios y la producción de exopolisacárido en un período de tiempo relativamente corto.
- El uso de este polisacárido celular en la formación de biopelículas puso en evidencia qué bajo determinadas condiciones y con el uso de aditivos como el glicerol, se formó una biopelícula transparente cohesiva y homogénea, las cuales son características propias de los recubrimientos comerciales más reconocidos en la industria de alimentos.
- Se observa la formación de biofilms en los cristales de los frascos con los medios de cultivo líquido, con y sin agitación presentándose mejores resultados con agitación, La característica de biofilms es determinante para su uso en la elaboración de alimentos como la levadura.

- Los exopolisacáridos obtenidos por las cepas de *Frankia* sp. son aptos para procesos de gelificación, fijación o como materiales útiles en la elaboración de biopelículas o recubrimientos para alimentos; la viscosidad para este exopolisacárido se marcó en un valor máximo bajo determinadas condiciones, según esto podemos confirmar que este exopolisacárido presenta una matriz tridimensional y por ende características gelatinosas, la cual puede variar con la concentración, el pH y temperatura.
- En cuanto a la concentración, la viscosidad se mostró directamente proporcionalidad siendo que, a mayor concentración, mayor viscosidad.
- El polisacárido microbiano de *Frankia* sp. puede funcionar como emulsificante ya que en este estudio el porcentaje de fase emulsionada fue superior al 50% en todos los casos evaluados, los comportamientos que se observaron fueron simple y múltiple, de tipo creaming, floculación y agregación, en algunas se observó coalescencia y disminución de la emulsión a través del tiempo efecto asociado a la degradación del exopolisacárido.

## 9. Recomendaciones

A continuación, se plantean las siguientes recomendaciones:

1. Ampliar los estudios sobre las propiedades viscoelásticas de los EPS producidos por cepas de *Frankia* sp.
2. Para formulaciones a escala piloto superiores a 1 litro adicionar el extracto de raíz de *Alnus acuminata*.
3. Realizar estudios que permitan caracterizar la composición de las estructuras químicas que conforman los exopolisacárido de *Frankia* sp. y aumentar las evaluaciones reológicas, físicas y químicas con el fin de ampliar los conocimientos industriales de este EPS.
4. Evaluar sistemas de fermentación continua de manera constante que permita analizar con más detalle los cambios de los parámetros durante la fermentación y la solubilización del EPS en el medio para su obtención, empleando sustratos más económicos.
5. Ampliar las evaluaciones con diferentes concentraciones de plastificante como el glicerol y exopolisacárido con el fin de obtener una biopelícula de mayor consistencia.
6. Analizar la composición química y de la masa molecular de los exopolisacáridos producidos.
7. Es necesario realizar un análisis sensorial y reológico de la biopelícula observando sus propiedades para la industria alimentaria.

## 10. Referencias Bibliográficas

- Abbasi A. & Amiri S.** 2008. Emulsifying behavior of an exopolysaccharide produced by *Enterobacter cloacae*. African Journal Biotechnology. Vol. 7:10. ISSN 1684–5315.  
<http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Abbastabar B., Hossein M.A., Adnani A. & Abbasi S.** 2015. Determining and modeling rheological characteristics of quince seed gum. Food Hydrocolloids. Vol. 43:259-264.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.05.026>.
- Abbes F., Masmoudi M., Kchaou W., Danthine S., Blecker C., Attia H. & Besbes S.** (2015). Effect of enzymatic treatment on rheological properties, glass temperature transition and microstructure of date syrup. LWT Food Science Technology. Vol. 60(1):339-345.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.027>.
- Acebo D. & Hernández G.** 2013. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 44(1). ISSN: 0253-5688.  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181226886003>.
- Acosta E.Y.** 2004. Diversidad genómica de cepas de *Frankia* sp. de diferentes orígenes y hospederos mediante polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en biotecnología genómica. Instituto Politécnico Nacional. México. <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/1171>.
- Akimov V.N. & Dobritsa V.** 1992. Grouping of *Frankia* sp. strains on the basis on DNA relatedness. System Applied Microbiology. Vol. 15:372-379.  
[https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80210-9](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80210-9)

**Akkermans A., Roelofsen W., Huss-Danell K. & Harkink R.** 2011. Utilization of carbon and nitrogen compounds by *Frankia* sp. synthetic media and in root nodules of *Alnus glutinosa*, *Hippophaé rhamnoides* and *Datisca cannabina*. In. Canadian Journal of Botany. Vol. 61(11):2793-2800. <https://doi.org/10.1139/b83-309>.

**Ale E C., Perezlindo M.J., Pavón Y., Peralta G.H., Costa S., Sabbag N., Bergamini C., Reinheimer J.A. & Binetti A.G.** 2016. Technological, rheological and sensory characterizations of a yogurt containing an exopolysaccharide extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2, a new food additive. Food Research International. Vol.90: 259-267. ISSN 0963-9969. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.045>

**Alvarado V.** 2015. Evaluación del exopolisacáridos producido por una bacteria psicrotolerante aislada del noreste de México y sus potenciales aplicaciones industriales. Tesis Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. and surface properties. Plant Soil. Vol. 388:211–227. Doi: 10.1007/s11104-014-2320-5. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/9408>.

**Amini A.M. & Razavi S.M.** 2012. Dilute solution properties of Balangu (*Lallemantia royleana*) seed gum: Effect of temperature, salt, and sugar. International Journal of Biological Macromolecules. Vol. 51 (3): 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijbio mac.2012.05.018>.

**Amjres H., Béjar V., Quesada E., Abrini J. & Llamas I.** 2010. Aplicaciones del exopolisacárido producido por la cepa HK30 de *Halomonas nitroreducens* en la industria farmacéutica. ARS Pharmaceutica. Suplemento Vol. 3:255-266. ISSN: 0004-2927. <http://farmacia.ugr.es/ars/>

**Aranberri I., Binks B.P., Clint J.H. & Fletcher P.D.** 2006. Elaboración y caracterización de

emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. Iberoamericana de Polímeros. Vol. 7(3): 211-231. <https://www.researchgate.net/publication/255671706>.

**Arvanitoyannis I., Eleftheriadis I. & Tsatsaroni E.** 1989. Influence of pH on adsorption of dye-containing effluents with different bentonites, *Chemosphere*. Vol. 18(9–10):1707-1711. ISSN 0045-6535. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(89\)90454-2](https://doi.org/10.1016/0045-6535(89)90454-2).

**Ashraf H. & Saijjard M.** 1987. Isolation and characterization of *Frankia* sp. from nodules of actinorhizal plants of Pakistan. In: *Physiology Plantarum*. Vol. 70(2):255-258.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb06141.x>

**Atkinson B. & Mavituna F.** 1983. Manual de ingeniería bioquímica y biotecnología. Londres: MacMillan. ISBN: 0333332741. <https://lib.ugent.be/catalog/rug01:000126930>.

**Baker D. & Schwintzer C.** 1990. Introduction. The biology of *Frankia* sp. and actinorhizal plants. In: Schwintzer C.R. and J.D. Tjepkema (eds.) San Diego, Academic Press.

[https://www.sciencedirect.com/book/9780126332100/the-biology-of-Frankia sp. -and-actinorhizal-plants](https://www.sciencedirect.com/book/9780126332100/the-biology-of-Frankia-sp.-and-actinorhizal-plants).

**Baker D.** 1982. A cumulative listing of isolated of *Frankia* sp., the symbiotic, nitrogen-fixing actinomycetes. <https://www.researchgate.net/publication/285424073>.

**Bassi C. & Benson D.** 2007. Growth characteristics of the slow-growing actinobacterium *Frankia* sp. strain CcI3 on solid media. *Physiologia Plantarum*. Vol. 130(3):391–399. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00866.x>.

**Bautista H.H. & Valdés M.** 2008. *Frankia* sp. y la simbiosis actinorrizica. Latinoamericana de

microbiología. Vol. 50 (3-4): 90-102. [https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2008/mi08-3\\_4g.pdf](https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2008/mi08-3_4g.pdf)

**Bell A. & Wheeler M.** 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopath.* Vol. 24: 411–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.002211>.

**Benoist P., Müller A., Diem H.G. & Schwencke J.** 1992. High-molecular-mass multicatalytic proteinase complexes produced by the nitrogen-fixing *actinomycete Frankia* sp. strain BR. *American society for microbiology.* Vol. 174(5):1495-1504. <https://doi.org/10.1128/jb.174.5.1495-1504.1992>.

**Benson D. & Silvester W.** 1993. Biology of *Frankia* sp. strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Review.* Vol. 57(2):293-319. <https://doi.org/10.1128/mr.57.2.293-319.1993>.

**Benson D.R., Buchholz S.E. & Hanna D.G.** 1983. Identification of *Frankia* sp. strain by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Applied Environmental Microbiology.* Vol. 47: 489-494. <https://doi.org/10.1128/aem.47.3.489-494.1984>.

**Benson D. & Dawson O.** 2007. Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic *Frankia* sp. and its host plants. *Physiol Plant*1. Vol. 30:318–330. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00934.x>.

**Benson D. & Schultz N.** 1990. Physiology and Biochemistry of *Frankia* sp. in Culture. Chapter 6. Christa R. Schwintzer, John D. Tjepkema (Eds.). *The Biology of Frankia sp. and Actinorhizal Plants*, Academic Press. 1990. Pg. 107-127. ISBN 9780126332100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-633210-0.50011-3>

- Benson D., Stephens D., Clawson M. & Silvester W.** 1984. Identification of *Frankia* sp. strains by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Applied Environmental Microbiology. Vol. 47: 489-494. <https://doi.org/10.1128/aem.47.3.489-494.1984>
- Benson D., Vanden B. & Potter D.** 2004. Actinorhizal symbioses: Diversity and biogeography. In: Plant microbiology (ed. M. Gillings). BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford. Vol. 15(54):99-130. [https://www.researchgate.net/publication/265348504\\_Actinorhizal\\_symbioses\\_diversity\\_and\\_biogeography](https://www.researchgate.net/publication/265348504_Actinorhizal_symbioses_diversity_and_biogeography)
- Berry A.M., Kahn R.K. & Booth M.C.** 1989. The identification of indole compounds secreted by *Frankia* sp. HFPAE113 in defined culture medium. In: Plant and soil. Vol. 118:205-209. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF02232808>
- Berry A.** 1994. Recent developments in the actinorhizal symbioses. In: Plant and Soil. Vol. 161: 135-145. <https://doi.org/10.1007/BF02183094>
- Berry A., Harriott O., Moreau R., Osman S., Benson D. & Jones A.** 1993. Hopanoid lipids compose the *Frankia* sp. vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 90 (13): 6091–6094. <http://www.jstor.org/stable/2362336>.
- Bethencourt L., Boubakri H., Taïb N., Normand P., Armengaud J., Fournier P., Brochier C. & Herrera A.** 2019. Comparative genomics and proteogenomics highlight key molecular players involved in *Frankia* sp. sporulation. Research in Microbiology. Vol. 170(4-5):202-213. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.04.002>.

- Bhattacharyya P.N. & Jha D.K.** 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World journal of microbiology & biotechnology*. Vol. 28(4):1327–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22805914>.
- Born K., Langendorff V. & Boulenger P.** 2002. Xanthan. In: *Biopolymers*. Vol. 5: 259-291. ISBN: 9783527313457
- Borthakur D. & Johnston A.W.** 1987. Secuencia de *psi*, un gen en el plásmido simbiótico de *Rhizobium phaseoli* que inhibe la síntesis y nodulación de exopolisacáridos y demostración de que su transcripción es inhibida por *psr*, otro gen en el plásmido simbiótico. *Mol Gen Genet*. Vol. 207:149–154. <https://doi.org/10.1007/BF00331502>.
- Bouchotroch S., Quesada E., Del Moral A., Llamas I. & Béjar V.** 2001. *Halomonas maura* sp. a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Vol. 51(5):1625-1632. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-5-1625>.
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Breuninger W., Piyachomkwan K., & Sriroth K.** 2009. Tapioca/Cassava Starch: Production and Use. En J. N. BeMiller (Ed.), *Starch: Chemistry and Technology* (3a ed.) (541-568): Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00012-4>.
- Brunchorst J.** 1886. Über einige Wurzelanschwellungen, besonders diejenigen von *Alnus* und den Elaeagnaceen. Sobre hinchazones de las raíces, en particular las de *Alnus* y *Elaeagnaceae*. *Untersuchungen aus dem botanischen Institut en Tübingen*

Investigaciones del Instituto Botánico de Tübingen. Vol. 2: 151-177.

<https://doi.org/10.1007/s10482-018-1165-y>.

**Burggraaf A.J & Shipton W.A.** 1982. Estimates of *Frankia* sp. growth under various pH and temperature regimes. In: Plant and Soil. Vol. 69 (2):135-147.

<https://doi.org/10.1007/BF02374509>.

**Burggraaf A.J & Shipton W.A.** 1983. Studies on the growth on *Frankia* sp. in relation to infectivity and nitrogen fixation (acetylene reduction). In: Canadian Journal of Botany. Vol. 61: 2774-2782. <https://doi.org/10.1139/b83-307>.

**Burggraaf A.J., Quispel P., Tak T. & Valstar J.** 1981. Methods of isolation and cultivation of *Frankia* sp. species from actinorrhizas. Plant Soil. Vol. 61: 157-168. Doi.

<https://doi.org/10.1007/BF02277372>

**Callahan D., Torrey J.G. & Tredici P.** 1978 Isolation and cultivation in vitro of the Actinomycete causing root-nodulation in *Comptonia*. Science. Vol. 199:899–902. Doi: 10.1126/ciencia.199.4331.899.

**Cano M.** 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: *micorrizas*, *trichoderma spp.* y *pseudomonas spp.* Una revisión. Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales Actualidad y Divulgacion Científica. Vol. 14 (2): 15-31. ISSN 0123-4226

**Canquil N., Villarreal M., Bravo S. & Rubilar M.** 2007. Behavior of the rheological parameters of exopolysaccharides synthesized by three lactic acid bacteria. Carbohydrate Polymers. Vol. 68(2):270-279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.012>

**Cantú J.C, Martínez A.A., Gallardo C.T., Villarreal M., González J.G., Alanís K.G. & Lugo R.** 2020. Determinación de la capacidad emulsionante de proteína extraída de

almendra de *Prunus serotina* var. *capuli* para su aprovechamiento y valorización en la industria alimentaria. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Vol. 5:753-757. <https://www.researchgate.net/publication/345020353>

**Carú M., Becerra A., Sépulveda D. & Cabello A.** 2000. Isolation of infective *Frankia* sp. strains from root nodules of *Alnus acuminata* (Betulaceae). In: World Journal of Microbiology & Biotechnology. Vol. 16: 647:651.  
<https://doi.org/10.1023/A:1008929520571>

**Cerémonie H., Debellé F. & Fernandez M.P.** 1999. Structural and functional comparison of *Frankia* sp. root hair deforming factor and *rhizobial* Nod factor. In: Canadian Journal of Botany. Vol. 77: 1293-1301. <https://doi.org/10.1139/b99-060>

**Chen H.H., Xu S. & Wang Z.** 2006. Gelation properties of flaxseed gum. Journal of Food Engineering. Vol. 45: 41-46. <http://dx.doi.org/10.1002/actp.1994.010450108>

**Chengzhu K., Lulú W., Wang M., Qiwen L., Xiaoling L., Yuan G. & Shubo L.** 2021. Efecto de la adición de NaCl en la producción de goma Welan con el mutante UV de *Sphingomonas* sp. Polímeros de carbohidratos. Vol 265: 110-118.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118110>

**Christensen T., Dennis E., Peacock J., Landsman J. & Marcker K.A.** 1991. Hemoglobin genes in non-legumes: Cloning and characterization of a *Casuarina glauca* hemoglobin gene. Plant Mol. Biol. Vol.16: 339-344. <https://doi.org/10.1007/BF00020566>

**Crespo J.C.R.** 2012. Estudio de polisacáridos superficiales de *Sinorhizobium freddi* HH103 y su implicación en la interacción simbiótica con sus leguminosas hospedadoras. Trabajo

presentado para optar al grado de Doctor. Universidad de Sevilla. España.

<https://hdl.handle.net/11441/70107>

**De los Ángeles A.** 2016. Obtención de biopolímero plástico a partir del almidón de malanga (*Colocasia esculenta*), por el método de polimerización por condensación en el laboratorio 110 de la UNAN-Managua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Managuan.

[https://core.ac.uk/display/53104922?utm\\_source=pdf&utm\\_medium=banner&utm\\_campaign=pdf-decoration-v1](https://core.ac.uk/display/53104922?utm_source=pdf&utm_medium=banner&utm_campaign=pdf-decoration-v1)

**Dierksen K.P., Sandine W.E. & Trempey J.E.** 1997. Expression of rop and mucoid phenotypes in *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Sci.* Vol. 80(8): 1528-1536.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76082-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76082-X)

**Diouf D., Diop T. & Ndoye I.** 2003. Actinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbioses: how much do we know? In: *African Journal of Biotechnology*. Vol. 2(1):1-7.

<https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1001>

**Du Bois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. & Smith F.** 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. Vol. 28:350–

356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

**Edens N., Reaves L., Bergana L., Reyzer I., O'mara P., Baxter J. & Snowden K.** 2002. Yeast Extract Stimulates glucose metabolism and inhibits lipolysis in rat adipocytes *in vitro*. *Biochemical and Molecular Actions of Nutrients*. Vol. 132(6): 1141-1148.

**Exena J.C.C., Lu A.A M., Bautista M., Báez J.B.G., Gallardo C.T., García K.G.A. &**

**Duran R.L.** 2020. Determinación de la capacidad de emulsionante de la proteína extraída

de almendra de *Prunus serotina* var. Capulí para su aprovechamiento y valorización en la industria alimentaria. Investigación y Desarrollo en ciencia y Tecnología de alimentos. Vol 5: 753-757. : <https://www.researchgate.net/publication/345020353>

**Farhoosh R. & Riazi A.** 2007. A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. Food Hydrocolloids. Vol 21(4), 660–666. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.07.021>

**Fernández E. & Galván A.** 2010. Métodos para la cuantificación de proteínas. Prácticas Generales de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. <https://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/bqym.pdf>.

**Finore I., Donato P., Mastascusa V., Nicolaus B. & Poli A.** 2014. Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production. Marine Drugs. Vol. 12(5): 3005–3024. <https://doi.org/10.3390/md12053005>.

**Flemming H.C. & Wingender J.** 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs), Part II: Technical aspects. Wat. Sci. Tech. Vol. 43 (6): 9-16. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0328>.

**Flemming H.C. & Wingender J.** 2010. La matriz del biofilm. Nat Rev Microbiol. Vol. 8: 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

**Flemming H.C, Neu T.R. & Wozniak D.J.** 2007. La Matriz EPS: La “Casa de las Células del Biofilm”. Journal of bacteriology. Vol. 189 (22): 7945-7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>.

**Flores J.D.F.** 2018. Caracterización molecular y funcional de biofertilizantes bacterianos, y análisis de su potencial para mejorar la producción de cultivos de maíz, guisante, lechuga,

fresa y zanahoria. Memoria presentada para optar al Grado de Doctor. Universidad de Salamanca. España. <https://doi.org/10.14201/gredos.139502>.

**Fontaine J., Grivegne A. & Reuse J.** 1984. Adrenoceptors and regulation of intestinal tone in the isolated colon of the mouse. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 81(2):231-43. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1984.tb10070.x>.

**Franco J.** 2004. Producción de biopolímeros vía fermentativa utilizando cepas de *Rhizobium leguminosaru*. Trabajo presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Químico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/2819>.

**Freitas F., Alves V. & Reis M.** 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*. Vol. 29(8): 388-398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>.

**Freitas F., Alves V., País J., Costa N., Oliveira C., Mafra L., Hilliou L., Oliveira R. & Reis M.** 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource Technology*. Vol. 100(2): 859–865. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.002>.

**Fuentes A., Carreño C. & Llanos C.** 2013. Rendimiento de exopolisacáridos emulgentes producidos por bacterias halófilas nativas en tres concentraciones de melaza de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”. *Scientia Agropecuaria*. Vol. 4:111 – 120. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2013.02.04>.

- Gage D.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. In. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 68 (2): 280-300. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>.
- Galán J., Baquero M., Morosini M. & Baquero F.** 2006. Bacterias con alta tasa de mutación: los riesgos de una vida acelerada. *Asoc. Col. Infectar* Vol. 10(1): 22-29. ISSN 0123-9392.
- García A.H.** 2021. Estudio de microorganismos halófilos moderados productores de exopolisacáridos pertenecientes a salinas de interior de en Castilla – La Mancha. Tesis doctoral de microbiología. Universidad Autónoma de Madrid. España.  
<http://hdl.handle.net/10486/699720>
- Gómez D. & Navaza J.M.** 2002. Caracterización reológica de dispersiones agua-alginato sódico con aplicación en la industria alimentaria. *Journal of Food*. Vol. 3(5): 302-306.  
<https://doi.org/10.1080/11358120209487743>.
- González C., Valbuena A., Celis A., Perentena L. & Colina M.** 2015. Degradación oxidativa de quitosano con peróxido de hidrógeno. *Iberoamericana de Polímeros*. Vol. 16(1): 46-68.  
<https://www.researchgate.net/publication/318351505>.
- Gorret N., Renard C.M., Famelan M.H., Maubois., J.L. & Doublier J.L.** 2003. Rheological characterization of de EPS produced by *P. acidici-porpcionici* on milk microflata. *Carbohydrate polymers*. Vol. 51:149-158. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00141-8).
- Graham P.H.** 2005. Biological dinitrogen fixation symbiotic. Chapter. 16. In: *Principles and applications of soil microbiology*. Second dition. Editors. Sylvia, D.M. Fuh, J.J.; Hartel, P.G. & Zuberer, D.A. Pearson Princl Hall. New Jersey: 426-427.  
<http://res2.agr.ca/lacombe/pdf/hilites/00ResHiSpr.pdf>.

**Grattepanche F., Audet P. & Lacroix C.** 2007. Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. *International Dairy Journal*. Vol. 17(2):123-132. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.008>.

**Haddarah A., Bassal A., Ismail A., Gaiani C., Ioannou I., Charbonnel C., Hamieh T. & Ghoul M.** 2014. The structural characteristics and rheological properties of Lebanese *Journal of Food Engineering*. Vol. 120: 204–214.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.026>.

**Hafez F., Akkermans D. & Chaudhary A.** 1984. Morphology, physiology and infectivity of two *Frankia* sp. isolates An 1 and An 2 from root nodules of *Alnus nitria*. In: *Plant and Soil*. Vol. 78:45-59. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-6158-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-009-6158-6_6).

**Han J.H.** 2005. Edible films and coatings: a review. In: Han J H (Ed.), *Innovations in Food Packaging*. Oxford, UK: Elsevier Academic Press: 239– 262.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394601-0.00009-6>.

**Herrera P.R.** 2012. Evaluación de los exopolisacáridos producidos por una cepa nativa de cianobacteria *Nostoc* sp. como sustrato en la producción de bioetanol. Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Magister en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental Bogotá D.C., Colombia.  
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/11522>.

**Holdridge R.L.** 1996. *Ecología basada en las zonas de la vida II. Serie*. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. San José, Colección de libros y materiales educativos.

(83): 216. <http://www.cct.or.cr/contenido/wp-content/uploads/2017/11/Ecologia-Basada-en-Zonas-de-Vida-Libro-IV.pdf>.

**Horriére F.** 1984. *In Vitro* physiological approach to classification of *Frankia* sp. isolates of the “*Alnus* group”, based on urease, protease and B-glucosidase activities. *Plant and Soil*. Vol. 118:7-13. Doi: 10.1007/978-94-009-6158-6\_2.

**Hosseini S.H.P., Matia L.M., Goh K.T., Razavi M.A. & Mortazavi S.A** 2010. Steady shear flow behavior of gum extracted from *Ocimum basilicum* L. seed: Effect of concentration and temperature. *Journal of Food Engineering*. Vol. 101: 236–243.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.025>

**Huang Y. & Benson D.R.** 2012. Growth and development of *Frankia* sp. spp. strain CcI3 at the single-hypha level in liquid culture. *Archives of microbiology*. Vol. 194(1):21-28.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-011-0734-5>

**Huss-Danell K.** 1997. Actinorhizal symbioses and their N<sub>2</sub> fixation. In: *New Phytologist*. Vol. 136:375-405. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00755.x>

**IGAC. Instituto Geográfico Agustín Codazzi.** 1985. Zonificación agroecológica de Colombia. Memoria explicativa. Convenio con el ministerio de Agricultura y el Instituto Agropecuario ICA: 29-30. <http://documentacion.ideam.gov.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=17535>.

**Jain D.K, Prevost D. & Bordeleau L.M.** 1990. Role of bacterial polysaccharides in the derepression of ex-planta nitrogenase activity with rhizobia. *FEMS Microbiol Ecol*. 73:167-173. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb03937.x>.

**Janczarek M., Rachwał K., Cieřla J., Ginalska G. & Birganowski A.** 2015. Production of

exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. *Plant Soil*. 388:211–227.  
<https://doi.org/10.1007/s11104-014-2320-5>.

**Jeong J., Suh S., Guan C., Fang T.Y., Moran N., Jae O.C., Sun A.C., Demchenko K.N., Pawlowski K. & Lee Y.** 2004. A Nodule-Specific Dicarboxylate Transporter from alder is a member of the peptide transporter family. *Plant Physiology*. Vol. 134:969–978.  
<https://doi.org/10.1104/pp.103.032102>.

**Jiménez F. & Merchant H.** 2003. *Biología celular y molecular*. Primera Edición. Pearson Educación, Capítulo 3. ISBN 970-26-0387-0.

**Jiménez F.C.** 2013. Emulsiones múltiples; compuestos bioactivos y alimentos funcionales. *Nutr Hosp*. Vol. 28(5):1413-1421. ISSN 1699-5198.  
<https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.5.6673>.

**Kim W.W. & Yoo B.** 2011. Rheological and thermal effects of galactomannan addition to a corn starch paste. *LWT. Food Science and Technology*. Vol 44: 759-764.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.009>.

**Ktari A., Gueddou A., Nouioui I., Miotello G., Sarkar I., Ghodhbane F.G, Sen A., Armengaud J. & Gtari1 M.** 2017. Host plant compatibility shapes the proteogenome of *Frankia* sp. *coriariae*. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 8(170):1-12.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00720>.

**Kucho K.I., Hay A.E. & Normand P.** 2010. The Determinants of the Actinorhizal Symbiosis. *Microbes Environ*. Vol. 25(4): 241. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10143>

- Lancheros R., Caicedo L. & Navarro Y.** 2002. Polisacáridos Rhizobianos una nueva alternativa. *Revista Ingeniería e investigación*. Vol 49: 4-8.  
<https://doi.org/10.15446/ing.investig>
- Lasa I., Pozo J.L., Penades J. R. & Leiva J.** 2005. Biopelículas bacterianas e infección. *Anales Sis San Navarra*. vol.28 (2):163-175. ISSN 1137-6627. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272005000300002>.
- Laurent L.S., Bousquet J., Simon L. & Lalonde M.** 1987. Separation of various *Frankia* sp. strains in the *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups using sugar analysis. In *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 183: 764-772. <https://doi.org/10.1139/m87-131>.
- Lechevalier M. & Lechevalier H** 1990. Systematic, isolation and culture of *Frankia* sp. In: *The Biology of Frankia sp. and actinorhizal plants*. Schwintzer & Tjepkema, New Jersey, USA: 35-60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-633210-0.50008-3>.
- Lechevalier M. & Lechevalier H.** 1989. Actinomycetes with multilocular sporangia. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins. Vol. 4 (27): 2405-2416.  
[https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1844866](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1844866).
- Lechevalier M., Beaker D. & Horriére F.** 1983. Physiology, chemistry, serology and infectivity of two *Frankia* sp. isolates from *Alnus incana* subsp. *rugosa*. In: *Canadian Journal of Botany*. Vol. 61(11):6829-2833 <https://doi.org/10.1139/b83-314>.
- Lechevalier M.** 1984. The taxonomy of the genus *Frankia* sp. In: *Plant and soil*. Vol. 79 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-1>.

- Lee H., Donati A.J., Hahn D., Tisa L.S & Chang W.S.** 2013. Alteración de la producción de exopolisacáridos y el perfil transcripcional de la cepa CcI3 de *Frankia* sp. de vida libre en condiciones de fijación de nitrógeno. *Microbiol Biotechnol* . Vol. 97:10499–10509.  
<https://doi.org/1007/s00253-013-5277-z>.
- Lendínez M.** 2015. Estudio de emulsiones altamente concentradas de tipo W/O: relación de gota y propiedades. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Trabajo de Grado. Universidad de Barcelona. España. <http://hdl.handle.net/2445/66594>.
- López M. & Torrey J.** 1985. Purification and properties of trehalase in *Frankia* sp. ArI3. *Archives of Microbiology*. Vol. 143: 209-215. <https://doi.org/10.1007/BF00411237>.
- López X., Taramuel A., Arboleda C., Segura F. & Restrepo L.** 2017. “*Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales*”. Universidad de Antioquia, Colombia. 29 (2), 180-198. e-ISSN: 2224-5421.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-54212017000200002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212017000200002).
- Loyeau P.A.** 2017. Encapsulación de bacterias probióticas, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* INL 1, utilizando emulsiones de productos de reacción de maillard y aceite de girasol mediante gelificación de alginato de calcio. Instituto de Tecnología en Alimentos. XXI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral  
<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1979/8.2.2.pdf>.
- Luque R., Quezada E., Béjar V. & Llamas J.** 2010. Aislamiento de cepas de género *Alomonas* con interés biotecnológico en Rambla Salada (Murcia). *Pharmaceutica*. 15(3):453-462. ISSN: 0004-2927. <http://hdl.handle.net/10481/26609>.

- Marappa N., Dharumaduraia D., Nooruddina T. & Mohammad A.** 2020. Morphological, molecular characterization and biofilm inhibition effect of endophytic *Frankia* sp. from root nodules of Actinorhizal plant *Casuarina* sp. South African Journal of Botany. Vol. 134:72-83. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.039>.
- Margesin R. & Miteva V.** 2008. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. Research in microbiology. Vol.162 (3): 346-361. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.12.004>.
- Marsh K. & Bugusu B.** 2007. Food Packaging - Roles, Materials, and Environmental Issues. Journal of food science. Vol. 72(3): 39-55 <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>.
- Martínez M.M.C.** 2010. Elaboración de queso fresco utilizando dos gomas guar y carragenato a dos temperaturas con y sin cultivo láctico. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Latacunga. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/860>.
- Mastrorunzio J., Tisa L., Normand P. & Benson D.** 2008. Comparative secretome analysis suggests low plant cell wall degrading capacity in *Frankia* sp. symbionts. BMC Genomics. Vol 9: 47. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-47>.
- Masuko T., Minami A., Wasaki N., Majima T., Nishimura S. & Lee Y.** 2005. "Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format". Anal biochem, 339 (1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>.
- Mata J.A., Bajar V., Bressollier P., Tallon R., Urdaci M.C, Quesada E. & Llamas I.** 2008. Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria

belonging to the family *Alteromonadaceae*. Journal of Applied Microbiology. Vol. 105(2): 521-528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03789.x>.

**Mata J.** 2006. Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger*. Tesis de Doctorado, Universidad de Granada, España.  
<https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/973/16115946.pdf?sequence=1>.

**Michel C., Bény C., Delorme F., Poirier L., Spolaore P., Morin D. & D'Hugues P.** 2009. New protocol for the rapid quantification of exopolysaccharides in continuous culture systems of acidophilic bioleaching bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82: 371-378.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1824-4>.

**Miranda J.** 2015. Reacciones y sus mecanismos en la degradación de polímeros. Trabajo de grado para obtener el título de Ingeniero Químico petrolero. Escuela superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. México D.F.  
<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/18230/25-1-16842.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

**Mirza M.S., Akkermans W.M. & Akkermans A.D.** 1994. PCR-amplified 16S rRNA sequence analysis to confirm nodulation of *Datisca cannabina* L. by the endophyte of *Coriaria nepalensis* Wall. In: plants and Soil. Vol. 160: 147-152.  
<https://doi.org/10.1007/BF00150356>.

**Montoya P., Cosiansi J., Grasso F. & Melchiorre M.** 2021. Formulación y propiedades de biopolímero de recubrimiento para semillas de maní (*Arachis hypogaea* L.). Agriscientia. Vol.38: 15-27. <http://dx.doi.org/10.31047/1668.298x.v38.n1.30254>.

- Moreira L., Videira P., Sílvia S., Leitão J., Cunha M. & Correia I.** 2003. Identification and physical organization of the gene cluster involved in the biosynthesis of Burkholderia cepacia complex exopolysaccharide. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol.312 (2)12: 323-333. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.118>.
- Moreno A S C.** 2013. La comparación de las Gomas Xanthan y Arábica en las propiedades reológicas de la mayonesa. Tesis de pregrado. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3167>.
- Moreno J., Ángeles M.V., Madiedo J.M, Muñoz J., Rivas M. & Guerrero M.G.** 2000. Propiedades químicas y reológicas de un polisacárido extracelular producido por la cianobacteria Anabaena sp. ATCC 33047. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 67(3): 283-290.Doi. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000205\)67:3<283::AID-BIT4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000205)67:3<283::AID-BIT4>3.0.CO;2-H).
- Mort A., Normand P. & Lalonde M.** 1983. 2- O -Metil- D -manosa, un azúcar clave en la taxonomía de *Frankia* sp. Revista canadiense de microbiología. Vol. 29 (8):993-1002 <https://doi.org/10.1139/m83-156>.
- Mothè C.G. & Rao M.A.** 1999. Comportamiento reológico de dispersiones acuosas de goma de marañón y goma arábica: efecto de la concentración y mezcla. In Food Hydrocolloids. Vol. 13: 501-506. ISSN 0268-005X. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00035-1).
- Muralidhara M. & Jayachandran S.** 2003. Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. Process Biochemistry. Vol. 38(6):31. 841-847. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00021-3).

**Murry M.A, Fontaine M.S & Torrey J.G.** 1984. Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPAr1.3 grown in batch culture. In. Plant and Soil. Vol. 78: 61-78.

<https://doi.org/10.1007/BF02277840>.

**Newcomb W. & Wood S.** 1987. Morphogenesis and fine structure of *Frankia* sp.

(Actinomycetales): The microsymbiont of nitrogen-fixing actinorhizal root nodules.

International Review of Cytology. Vol.(109):1-88. [https://doi.org/10.1016/s0074-](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61719-2)

[7696\(08\)61719-2](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61719-2).

**Nichols C., Bowman J. & Guezennec J.** 2005. Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an antarctic sea ice bacterium grown in batch culture.

Applied and environmental microbiology. Vol.71 (7): 3519–3523. [https://doi.org/10.1128 /](https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3519-3523.2005)

[AEM.71.7.3519-3523.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3519-3523.2005).

**Nicolaus B., Kambourova M. & Oner E.** 2010. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. Environmental technology. Vol.31 (10).1145–1158.

<https://doi.org/10.1080/09593330903552094>.

**Noel K.D., Sanchez A., Fernandez L., Leemans J. & Cevallos M.A.** 1984. *Rhizobium phaseoil* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertion. In: Journal of bacteriology. Vol.158:

148152. <https://doi.org/10.1128/jb.158.1.148-155.1984>.

**Normand P. & Lalonde M.** 1982. Evaluation of *Frankia* sp. strains isolated from provenances of two *Alnus* species. In: Canadian Journal of Microbiology. Vol. 28(10): 1133.1142.

<https://doi.org/10.1139/m82-168>.

**Noumavo P., Agbodjato S., Moussa F., Adjanohoun A. & Baba-Moussa L.** 2016.

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: efectos beneficiosos para una

agricultura saludable y sostenible. *Africana de Biotecnologia*. Vol. 15(27):1452-1463.

<https://doi.org/10.5897/AJB2016.15397>.

**Nwodo U., Green E. & Okoh A.** 2012. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* Vol.13: 14002-14015. <https://doi.org/10.3390/ijms131114002>.

**Obertello M., Oureye M., Laplaze L., Santi C., Svistoonoff S., Auguy F., Bogusz D. & Franche C.** 2003. Actinorhizal nitrogen fixing nodules: infection process, molecular biology and genomics. Review. In: *African Journal of Biotechnology*. Vol. 2(12):528-538. <https://doi.org/10.5897/ABJ2003.000-1104>.

**Öner E.** 2013. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. 2013. Fang Z. (Ed.) *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries* : 35-56. ISBN 978-3642-44050-2. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-32735-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-32735-3_2).

**Orozco C.E.M.** 1999. Análisis de algunas características físicas y químicas de un biopolímero producido por *Klebsiella pneumoniae* en un proceso de fermentación simple. Trabajo de grado para optar por el título de magister en ciencias con especialidad en ingeniería cerámica. Universidad autónoma de nuevo león. Monterrey. México. <http://eprints.uanl.mx/7978/1/1020126079.pdf>.

**Orozco F.H.** 1999. Biología del nitrógeno. Conceptos básicos sobre sus transformaciones biológicas. Tomo I. Universidad Nacional. Sede Medellín: 321. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/7317>.

**Paris X.** 2009. Obtención de exopolisacáridos de interés industrial apartir de lactosuero y permeatos. Tesis doctoral. Universiad de Granda. España. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/2376/18101604.pdf?sequence=1>.

- Pavlath A.E. & Orts W.** 2009. Películas y recubrimientos comestibles: ¿por qué, qué y cómo?. En: Huber, K., Embuscado, M. (eds) Edible Films and Coatings for Food Applications. Springer, Nueva York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92824-1_1).
- Pawlowski K. & Bisseling T.** 1996. Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? The plant cell. Vol 8(10):1899-1913.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1899>
- Peck T.R. & Melsted S.W.** 1973. Field sampling for soil testing. En Wasls L.M. & Beaton J.D. Eeds. Soil testing and plant analysis. Soil Science Society of America. Inc. Madison, Wisconsin, E,U: 491. <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub2.c3>.
- Péret B., Swarup R., Jansen L., Devos G., Auguy F., Collin M., Santi C., Hocher V., Franche C., Bogusz D., Bennett M. & Laplaze L.** 2007. Auxin influx activity is associated with *Frankia* sp. infection during actinorhizal nodule formation in *Casuarina glauca*.:1852–1862. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101337>.
- Perez L., Mendez A.F & Iturbe J.M.** 2010. Velocidad terminal de una esfera descendente y la viscosidad de fluidos diferencia entre fluidos newtonianos y no newtonianos. En: Latin-American Journal of Physics Education. Vol. 4(2). ISSN-e 1870-9095.  
<http://dialnet.unirioja.es/servlet/oaiart?codigo=3696401>.
- Peso P., Frontela C., González C., Ros G. & Martínez C.** 2012. Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. Biología marina y oceanografía. Vol. 47(3): 373-381. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572012000300001>

- Petry S., Furlan S., Waghorne E. & Saulnier L.** 2003. Comparison of the thickening properties of four *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* strains and physicochemical characterization of their exopolysaccharides. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 221(2):285-91. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00214-3)
- Pilosof A.M. R.** 2000. Propiedades de hidratación. En: Pilosof, A. M. R. & Bartholomai, G. B. *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Eudeba. CYTED. Buenos Aires, Argentina, cap. 1: 17–28. <https://docplayer.es/116156655-Pilosof-a-m-r-y-bartholomai-g-b-caracterizacion-funcional-y-estructural-de-proteinas-editorial-eudeba-bs-as-argentina.html>.
- Piñeros N., Barahona F., Catro Y. & Toro R.** 2019. Propiedades microestructurales y ópticas de películas biodegradables a base de almidón termoplástico y poli ( $\epsilon$ -Caprolactona) con Actividad Antioxidante. *Información tecnológica*. Vol. 30(4):293-300. ISSN 0718-0764. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000400293>.
- Qian C., Decker E.A., Xiao H. & McClements D.J.** 2012. Estabilidad física y química de nanoemulsiones enriquecidas con  $\beta$ -caroteno: influencia del pH, fuerza iónica, temperatura y tipo de emulsionante. *Química de los alimentos*. Vol. 132(3): 1221–1229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.091>.
- Quesada A.E., Bejar M.V., Moral A., Ferrer M.R., Arias S., Llamas I. & Martínez F.** 2006. *Halomonas maura* TK26 (CECT 5720) un mutante que sintetiza con alto rendimiento el exopolisacárido maurano26. Oficina española de patentes y marcas, Universidad de Granada. <http://hdl.handle.net/10481/1107>.
- Quesada A.E, Bejar V. & Calvo C.** 1993. Exopolysaccharide production by *Volcaniella*

*eurihalina*. *Experientia* Vol. 49: 1037-1041. <https://doi.org/10.1007/BF01929910>.

**Quispel A. & Tak T.** 1978. Estudios sobre el crecimiento del endófito de *Olalnus glutinosa* (l.) vill. En soluciones de nutrientes. *New Phytol.* Vol. 81: 587-600.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1978.tb01632.x>.

**Quispel A., Burggraaf A.J., Borsje H. & Tak T.** 1983. El papel de los lípidos en el crecimiento de los aislados de *Frankia* sp. *Canadiense de Botánica.* Vol. 61(11): 2801-2801. <https://doi.org/10.1139/b83-310>.

**Ranganathana S.** 2018. Innate immunity engaged or disengaged in plant-microbe interactions. Chapter 6. Ram Prasad, Sarvajeet Gill & Narendra Tuteja (Eds.). Crop improvement through microbial biotechnology new and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Pg 107-144. ISBN 9780444639875.

**Rao P. & Pattabiraman T N.** 1989. Reevaluación de la reacción fenol-ácido sulfúrico para la estimación de hexosas y pentosas. Elsevier. Vol. 181(1): 18-22.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90387-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90387-4).

**Reddell P. & Spain A V.** 1991. Transmission of infective *Frankia* sp. (Actinomycetales) propagules in casts of the endogeic earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta: Glossoscolecidae). In: *Soil Bioplogy and Biochemistry.* Vol. 23 (8):775-778.  
[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(91\)90148-D](https://doi.org/10.1016/0038-0717(91)90148-D).

**Rey A.M.O., Chamorro D.V & Barahona R.R.** 2014. Producción de dos cepas de *Frankia* sp. Aisladas de *Alnus acuminata* H.B.K. por fermentación Fedbatch. Colombia *Revista De Investigación Agraria y Ambiental.* Vol. 5(1):81 – 92.  
<https://doi.org/10.22490/21456453.925>.

**Rey A.M.O.** 2006. Estudio de la actividad de cepas nativas de *Frankia* sp. en *Alnus acuminata* H.B.K. Facultad de Ciencias Maestría Interfacultades en Microbiología Universidad Nacional De Colombia. Bogotá. [https://es.scribd.com/document/447438782/ESTUDIO-DE-LA-ACTIVIDAD-DE-CEPAS-NATIVAS-DE-Frankia sp. -EN-Alnus-acuminata-H-B-K](https://es.scribd.com/document/447438782/ESTUDIO-DE-LA-ACTIVIDAD-DE-CEPAS-NATIVAS-DE-Frankia-sp.-EN-Alnus-acuminata-H-B-K).

**Rey A.M.O.** 2015. Evaluación de la producción *in vitro* de biomasa de cepas de *Frankia* sp. aisladas a partir de *Alnus acuminata* H.B.K. para el desarrollo de un inoculante. Universidad nacional de Colombia Doctorado en Ciencias Agropecuarias - Área Agraria Facultad de Ciencias Agrarias Medellín, Colombia.

**Rhim J.W. & Ng P.K.** 2007. Películas de nanocompuestos a base de biopolímeros naturales para aplicaciones de empaque, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 47(4): 411-433. <https://doi.org/10.1080/10408390600846366>.

**Robertson G.** 2008. 1 - State-of-the-art biobased food packaging materials. *Environmentally Compatible Food Packaging*. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, *Environmentally Compatible Food Packaging*, Woodhead Publishing. Pag. 3-28. ISBN 9781845691943. <https://doi.org/10.1533/9781845694784.1.3>.

**Rodríguez A., Trujillo I., Bringas Y., Rojas M., Manzano J. & Heydrich M.** 2005. Caracterización fisiológica de la comunidad microbiana endófito de la caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 7:66-75. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/487>.

**Rodríguez D. & Schobitz R.** 2009. Película antimicrobiana a base de proteína de suero lácteo, incorporada con bacterias lácticas como controlador de *Listeria monocytogenes*, aplicada

sobre salmón ahumado. Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol.7  
(2): 49 – 54. ISSN: 1692-3561.

**Roldan W.V.C.** 2015. Caracterización y cuantificación del comportamiento oreológico del hidrocoloide proveniente del Nostoc ( *Nostoc sphaericum* V.) . Tesis para optar el grado de magister scientiae en tecnología de alimentos. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima. Peru. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/1823>.

**Russo R.** 1989. Evaluating alder-endophyte (*Alnus acuminata*-*Frankia* sp. -Mycorrhizae) interactions. I. Acetylene reduction in seedlings inoculated with *Frankia* sp. strain Ar13 and *Glomus* intra-radices, under three phosphorus levels. In. Plant and Soil. Vol. 118(1-2):151-155. <https://doi.org/10.1007/BF02232801>

**Safo S.S. & Torrey J.G.** 1988. Polysaccharide hydrolyzing enzymes of *Frankia* sp. (Actinomycetales). Plant and Soil. Vol.112 (1): 89-97.  
<https://doi.org/10.1007/BF02181757>.

**Saldarriaga J., Zuluaga R., Álvarez C. & Gañán P.** 2007. Caracterización de polisacáridos naturales obtenidos a partir de fuentes colombianas. Revista Investigaciones Aplicadas. (2): 6-12. : <https://www.researchgate.net/publication/28211497>.

**Salinas J. & Garcia R.** 1985. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras, Centro Internacional de Agricultura Tropical, Programa de Pastos y Forrajes. Colombia. [https://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/PNAAU497.pdf](https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNAAU497.pdf).

**Sarma G., Sen A., Carghese R. & Misra A.** 1998. A novel technique for isolation of *Frankia* sp. and generation of single-spore cultures. Canadian Journal Microbiology. Vol. 44(5):490-492. <https://doi.org/10.1139/w98-007>.

- Schultz N.A. & Benson D.R.** 1989. Developmental potential of *Frankia* sp. vesicles. In: Journal of Bacteriology. Vol. 171(12): 6872-6877. <https://doi.org/10.1128/jb.171.12.6873-6877.1989>.
- Schwintzer C. & Tjepkema J.** 1990. The biology of *Frankia* sp. and actinorhizal plants. Department of botany and plant pathology. University of Maine. Orono, Maine. Academic Press Inc. Harcourt brace Jovanovich, Publishers. San Diego: 35-60. ISBN 0-13633210-x.
- Schwintzer C.R.** 2012. The Biology of *Frankia* sp. and Actinorhizal Plants. Elsevier. 426 Pp. ISBN: 0323150861.
- Silva M.C.P., Teixeira J.A., Pereir V.A. & Stefani R.** 2015. Películas de mezcla de quitosano/almidón de maíz con extracto de *Brassica oleraceae* (repollo rojo) como indicador visual del deterioro del pescado. LWT - Food Science and Technology. Vol. 61(1):258–262. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.041>.
- Simonet P., Le Yhi N. & Bardin R.** 1989. Diversity of *Frankia* sp. strain isolate a single alder stand. In: Plant and soil. Vol. 118: 13-22. <https://doi.org/10.1007/BF02232786>.
- Smith I.H & Pace G.W.** 1982. Recuperación de polisacáridos microbianos. Revista de Tecnología Química y Biotecnología, 32(1), 119–129. <https://doi.org/10.1002/jctb.5030320116>.
- Steinbüchel A.** 2001. Perspectives for Biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. Macromolecular Bioscience. Vol (1)1: 1-24. [https://doi.org/10.1002/1616-5195\(200101\)1:1<1::AID-MABI1>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1616-5195(200101)1:1<1::AID-MABI1>3.0.CO;2-B).

- Suharjo U. & Tjepkema J.** 1995. Ocurrencia de hemoglobina en los nódulos radiculares fijadores de nitrógeno de *Alnus glutinosa*. *Physologia Plantarum*. Vol. 95: 247-252. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00834.x>.
- Sutherland W.I.** 1999. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. In: *Carbohydrate Polymers*. Vol. 38(4):319-328. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00114-3).
- Tian L., Xiaolong L., Tian J., Ji L., Chen L., Phan L. & Tian C.** 2020. Research Advances of Beneficial Microbiota Associated with Crop Plants. *International Journal of Molecular sciences*. Vol. 21(5): 1793. <https://doi.org/10.3390/ijms21051792>.
- Tjepkema J.D., Cashion R.E., Beckwith J. & Schwintzer C.R.** 2002. Hemoglobin in *Frankia* sp., a Nitrogen-Fixing Actinomycete. *American Society for Microbiology Journals*. Vol.68 (5): 2629-2631. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2629-2631.2002>.
- Torres A. & Mora E.H.** 2010. Isolation and characterization of potentially toxic harmful cyanobacteria from Oaxaca and Chiapas, Mexico. In *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*. Vol. 45(1): 128-136. ISSN: 1093-4529. <https://doi.org/10.1080/10934520903388483>.
- Tovar V.J. & Rubio O.R.** 2001. Apuntes sobre ecosistemas Colombianos. Universidad Nacional de Colombia sede de Palmira: 13-14. <https://doi.org/10.21676/23897864.2628>.
- Tuinier R., Zoon P., Cohen Stuart M., Fler G.J. & De Kruif C.** 1999. Concentration and shear rate dependence of the viscosity of an exocellular polysaccharide. *Biopolymers*. Vol. 50: 641–646. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199911\)50:6<641:AID-BIP8>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199911)50:6<641:AID-BIP8>3.0.CO;2-D).

- Valdés M., Ramírez S.H., Guillén S.R, Del Valle C.R. & Serna M.N.** 1991. Algunas características morfológicas y fisiológicas de *Frankia* sp. aislada de *Alnus* y *Casuarina*. Latinoamericana de Microbiología y Parasitología. Vol. 33(4):271-277. ISSN 0034-9771.
- Valero V., Ortigón Y. & Uscategui Y.** 2013. Biopolímeros: avances y perspectivas. Dyna. Vol. 80 (181):171-180. ISSN: 0012-7353.
- Van Cheleu M., Lrvaas E., Ring E. & Soldheim B.** 2006. Early interactions between *Alnus glutinosa* and *Frankia* sp. strain Arl3. Production and specify of root hair deformation factor(s). In. Physiology Plantarum. Vol.99: 579:589. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb05360.x>.
- Voight R. & Bornschein M.** 1982. Tratado de tecnología farmacéutica. Tercera edición. Editorial Acribia, Zaragoza. ISBN: 84-200-0501-0.
- Wall L.G.** 2000. The actinorhizal symbiosis. Journal Plant Growth Regulation. Vol.19 (2):167-182. <https://doi.org/10.1007/s003440000027>.
- Weon T.S, Goon G.K, Sang H.N, Samg D.C, Hyun H.S, Seon E.K. & Yong H.P.** 1999. Isolation and Characterization of a Novel Exopolysaccharide-Producing *Paenibacillus* sp. WN9 KCTC 8951P. Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 9(6):820-825. ISSN 1017-7825.
- Wild A.** 1992. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Versión Española de P. Urbano Terrón y C. Rojo Fernández. Mundi-Prensa. España. ISBN: 847114400X 9788471144003.
- Wolters D.J.** 1998. Ineffective *Frankia* sp. in wet alder soils. Doctor en ciencias naturales y matemáticas. Universidad Agrícola de Wageningen. Departamento de ciencias

Biomoleculares. Holanda. <http://hdl.handle.net/11370/e6082601-f116-4298-af8d-ce12f4bfe54d>.

**Wu Y, Ding W, Jia L. & Qiang H.** 2014. The rheological properties of tara gum (*Caesalpinia spinosa*) Food Chemistry. Vol. 168: 366–371.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.083>.

**Yang X. & Zhu W.** 2007. Viscosity properties of sodium carboxymethylcellulose solutions. Cellulose. Vol. 14(5): 409–417. <https://doi.org/10.1007/s10570-007-9137-9>.

**Yuan W, Burleigh S.H. & Dawson J.** 2007 Melanin biosynthesis by *Frankia* sp. strain Ce15. Physiologia Plantarum. Vol. 131:180–190. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00948.x>.

## 11. Anexos

---

### Anexo 1. Título. Medios de cultivo

---

#### Medio Benzil Amina Purina (BAP) modificado por Murry *et al.* (1984)

<i>Macronutrientes</i>	<b>g/litro/6.8 pH</b>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.05
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.01
NH <sub>4</sub> Cl	0.267
FeEDTA	0.01
BAP sólido agar	15

#### **Adicionar después de autoclavar:**

Solución stock de vitaminas	1 mL
Solución stock de micronutrientes	1 mL
Solución buffer	10mM

#### *Solución stock de micronutrientes*

	<b>g/L</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.81
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> .2H <sub>2</sub> O	0.025
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.001

#### *Solución stock de vitaminas*

	<b>mg/100 mL</b>
Tiamina HCL	10
piridoxina HCL	5
ácido nicotínico	50
biotina	22.5
ácido fólico	10
riboflavina	10

#### *Solución buffer*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 M

#### **Extracto de Raíz**

Raíz de <i>Alnus acuminata</i>	50 g
Agua	1 litro
Adicionar antes de autoclavar	100mL de extracto de raíz/litro de medio BAP

## Medio Extracto De Raíz

<i>Extracto de raíz</i>		0.1 mL/L
<i>Solución stock de micronutrientes</i>	<b>g/L</b>	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.81	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.025	
<i>Solución stock de vitaminas</i>	<b>/100 mL</b>	
Tiamina HCL	10	
Piridoxina HCL	5	
Ácido nicotínico	50	
Biotina		22.5
Ácido fólico	10	
Riboflavina	10	
<i>Solución buffer</i>		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1 M
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		1 M
<b>Adicionar después de autoclavar:</b>		
Solución stock de vitaminas	1 mL	
Solución buffer		10 mM

### *Preparación*

- Macro nutrientes se los prepara al instante se toma el pH, se adiciona el agar y se autoclavar
- Para 1 Litro se adiciona 1 mL de micronutrientes
- 500 ml se adiciona 0,5 mL de micronutrientes
- Posterior a esto se adicionan las vitaminas ya filtradas para un litro 1 mL y 500 mL 0,5 mL
- Finalmente se adiciona antibióticos
- Para un litro 1 mL de nistatina y 1 mL gentamicina 500 mL 0,5 mL de nistatina y 0,5 mL de gentamicina

---

## Anexo 2. Extracción de exopolisacáridos

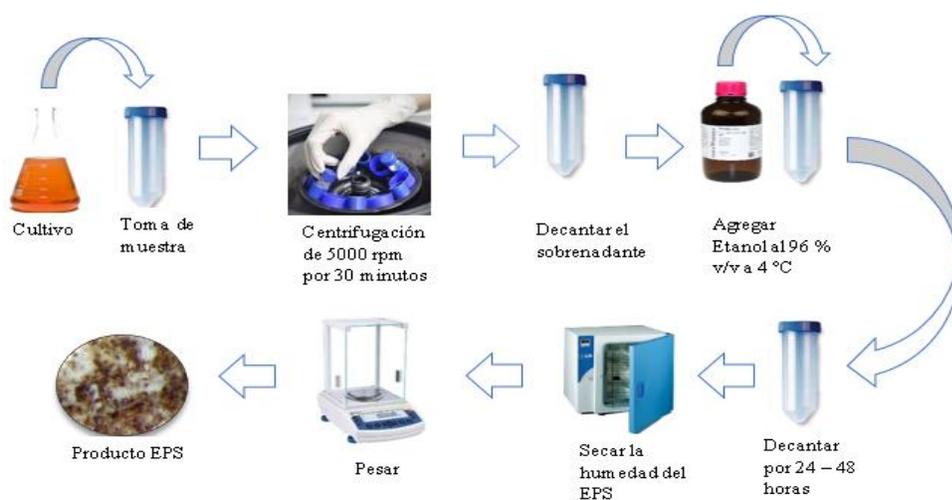
---

*Metodología: Fuentes et al., 2013*

Los polisacáridos producidos son separados por precipitación selectiva con etanol. Para ello, los cultivos se llevarán a centrifugación a 5000 rpm por 30 minutos hasta separar la biomasa (esta fase puede estar sujeta a modificación en tiempos y revoluciones). Al sobrenadante se le añadirá etanol al 96% (v/v) a 4°C con el fin de precipitar los EPS, por un periodo de 24 a 48 horas hasta que decante el más pesados de los polisacáridos y el otro sobrenadante en el etanol, se seca y se pesa. La productividad de cada cepa se expresará en gramos de EPS por litro de medio de cultivo (Figura 78).

**Figura 76**

*Diagrama metodología extracción exopolisacáridos por Fuentes et al., 2013*



*Metodología: Quesada et al. (1993)*

Los cultivos se centrifugan a 10.000 rpm durante 60 minutos. Al sobrenadante se le añade tres volúmenes de etanol 96% (v/v) frío (-4 °C) y tras 12 horas a 4° C se recoge el precipitado

del material extracelular (EPS) mediante centrifugación a 7.000 rpm durante 10 minutos, se dejan evaporar totalmente los posibles restos de alcohol en el precipitado y éste se solubiliza en agua destilada.

El material extracelular en solución se purifica mediante ultra centrifugación a 50.000 rpm durante 60 min. Posteriormente, el sobrenadante se dializa empleando membranas de diálisis de tamaño de poro 12-14000 Daltons, durante 72 horas en agua destilada y, por último, se liofiliza para eliminar el agua y así poder determinar la producción por gravimetría (Figura 79).

### Figura 77

Diagrama metodología extracción exopolisacáridos por Quesada et al. (1993)



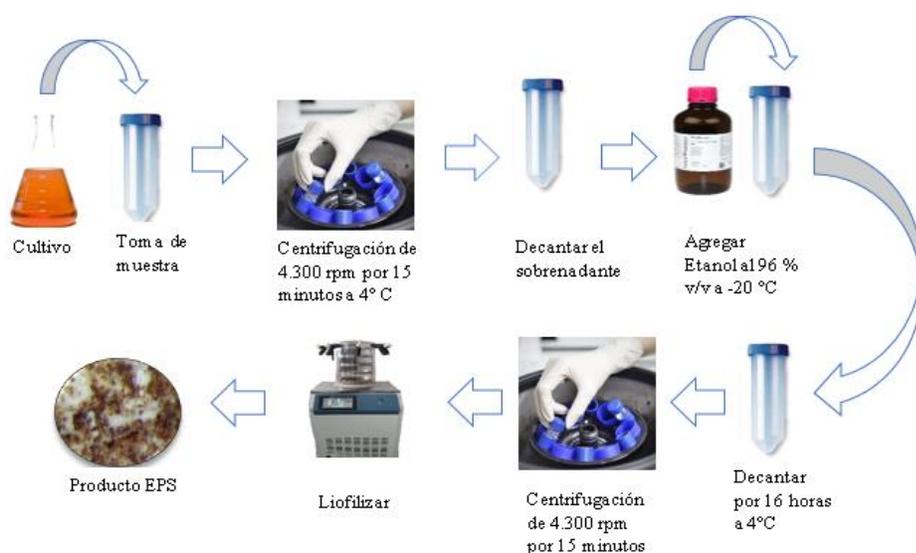
*Metodología: Alvarado, 2015*

Se toma una muestra de 10 ml de los cultivos bacterianos, posteriormente se centrifuga a 4300 rpm durante 15 minutos, empleando una centrifuga refrigerada a 4 °C. Una vez separados el paquete celular del sobrenadante, se procede a decantar el sobrenadante en otro tubo para

añadirle dos volúmenes de etanol frío (-20 °C) al 96 % (v/v) para precipitar el EPS. Dejar en reposo durante 16 horas a 4°C, para posteriormente centrifugar a 4300 rpm durante 20 minutos y obtener el pellet de EPS. El pellet obtenido se liofiliza hasta eliminar completamente la humedad para posteriormente pesar el producto obtenido (Figura 80).

### Figura 78

*Diagrama metodología extracción exopolisacáridos por Alvarado (2015).*



### *Metodología: Lee et al., (2013)*

Los sobrenadantes retenidos de los cultivos se filtran (tamaño de poro, 0,22 µm). Posteriormente, el EPS se precipita mediante la adición de tres volúmenes de etanol helado y se incuba a - 20 ° C durante la noche. Después de centrifugación a 15.000 × gramo durante 30 min a 4°C, el EPS precipitado se lava con etanol al 70%, se seca a temperatura ambiente, posteriormente, se resuspende en agua desionizada. El contenido total de carbohidratos se

determina utilizando el método de fenol / ácido sulfúrico (Du Bois *et al.*, 1956) con glucosa (Glc) como estándar (Figura 81).

### Figura 79

Diagrama metodología extracción exopolisacáridos por Lee *et al.*, (2013).



---

### **Anexo 3. Determinación del contenido de proteínas:**

---

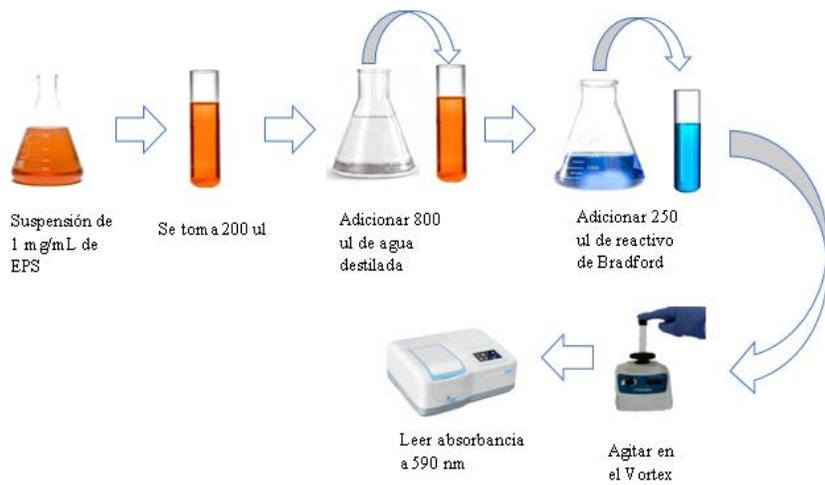
Para la determinación del contenido de proteínas se realizó utilizó la metodología de Bradford (1976) (Figura 82).

#### ***Procedimiento***

- **Preparación del Reactivo Bradford:** Se pesaron 10 mg de azul de Coomassie ® Brilliant blue G-250 de (Panreac Applichem®), en la balanza analítica, se adicionaron 5 mL de etanol (Panreac Applichem®) al 95 % v/v y 10 mL de ácido fosfórico (Panreac Applichem®) al 85% v/v, se aforó a 100 mL con agua destilada, se filtró con papel filtro cuantitativo Whatman grado 42 y se almacenó en un frasco color ámbar a 4 °C.
- **Preparación de la solución concentrada de albúmina de suero bovina (BSA) 1000 µg/ml:** Se pesan 4 mg de BSA (Panreac Applichem®) Fracción V (pH 7,0) y se disuelven en 4 ml de agua destilada. Después, se hace la curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de BSA, las soluciones se preparan con concentración de 100-1000 µg/ml, a partir de BSA y agua destilada (Buffer), llevándolas a un volumen final 1 mL.
- **Determinación de proteínas:** A partir de una suspensión de 1 mg/ml de exopolisacáridos en agua destilada, se toman 200 µl y se completa hasta 800 µl con agua destilada. A esta solución se le añadió 250 µl del reactivo de Bradford, se agita la muestra vigorosamente para finalmente medir la absorbancia en un espectrofotómetro (Mapada P1 UV/visible) a una longitud de onda de 590 nm.

#### **Figura 80**

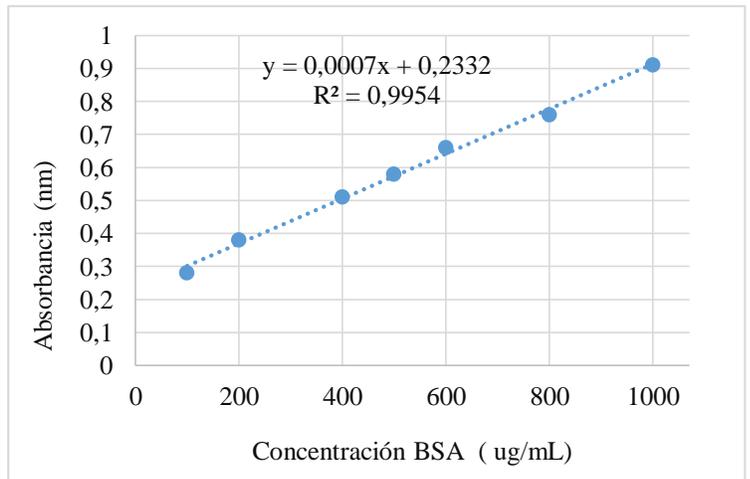
*Diagrama para determinación del contenido de proteínas*



**Tabla 26**

*Concentraciones para contenido de proteínas*

Concentración BSA (ug/mL)	ul stock BSA (0,1 mg/ml)	Cantidad de Buffer (ul)	Absorbancia (nm)
<b>100</b>	100	900	0,28
<b>200</b>	200	800	0,38
<b>400</b>	400	600	0,51
<b>500</b>	500	500	0,58
<b>600</b>	600	400	0,66
<b>800</b>	800	200	0,76
<b>1000</b>	1000	0	0,91



---

## **Anexo 4. Carbohidratos totales de acuerdo a la técnica de Du Bois**

---

### ***Preparación de reactivos:***

#### **- Preparación del stock de glucosa de 400 mg/L:**

Tomar 0.0400 g de glucosa anhidra grado reactivo con exactitud hasta la décima de mg, disolver, ajustar a aforo de 100 mL con agua desionizada, empacar en viales de 1 mL, rotular correctamente y almacenar en congelador para su posterior uso.

### **Materiales:**

- 0.0400 g glucosa anhidra
- 100 mL agua desionizada
- 100 Eppendorf de 1 mL

#### **Preparación del reactivo de fenol 5%:**

Tomar 5 g de fenol grado reactivo pesados con exactitud hasta la décima de g; disolver y aforar a 100 mL con agua desionizada, almacenar en frasco ámbar, rotular correctamente, éste reactivo es muy estable y debe ser mantenido a la temperatura del laboratorio (Tabla 26).

### **Materiales:**

- 5 g de fenol grado reactivo
- 100 ml de agua desionizada
- 1 frasco ambar de 200

### **Procedimiento:**

#### **Tabla 27**

*Concentración para la curva de calibración*

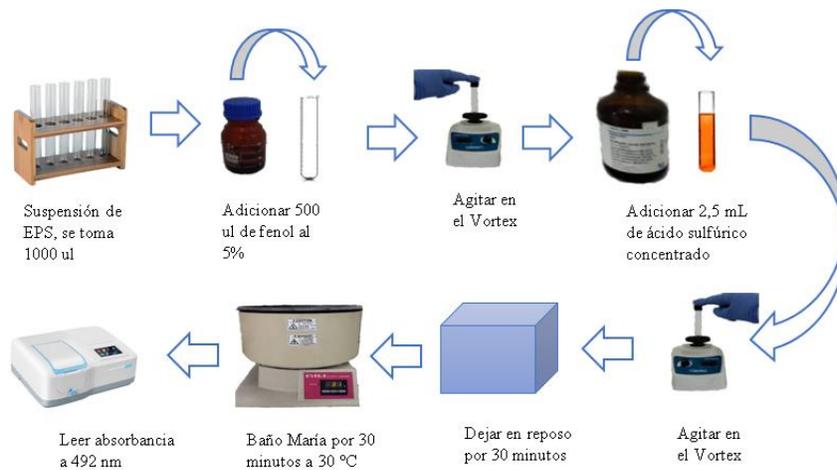
Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6
Glucosa 400 mg/L ( $\mu$ L)	0,0	25	50	100	150	200	250
H <sub>2</sub> O destilada ( $\mu$ L)	1000	975	950	900	850	800	750
Glucosa (mg/L)	0,0	10	20	40	60	80	100

### Preparación de la curva de calibración:

Una vez realizada la curva de calibración se hace la medición del contenido de carbohidratos (Figura 83).

### Figura 81

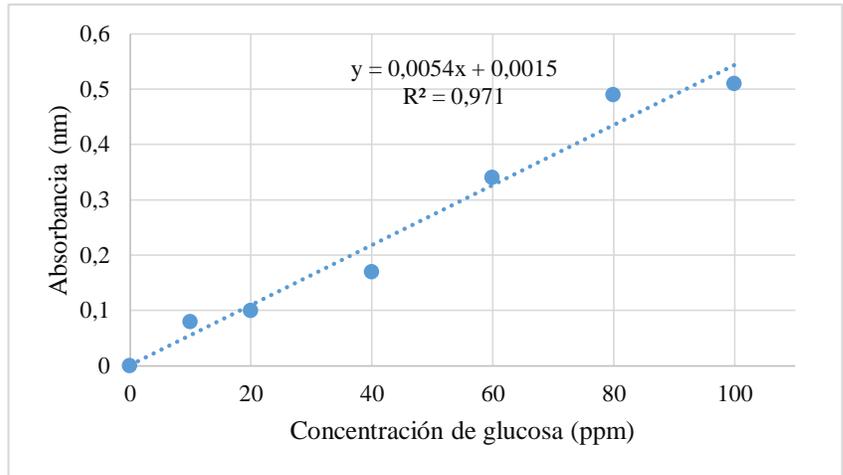
#### *Determinación de contenido de carbohidratos*



**Tabla 28**

*Concentración de contenido de carbohidratos*

Concentración de glucosa (ppm)	Absorbancia (nm)
0	0,00
10	0,08
20	0,10
40	0,17
60	0,34
80	0,49
100	0,51



---

## Anexo 5. Determinación de turbidez por medio de espectrofotometría

---

### *Procedimiento*

- Solución ácido acondicionada: Se compone de 30 mL ácido clorhídrico concentrado, 300 mL agua destilada, 100 mL alcohol etílico y 75 g cloruro de sodio
- Reactivo de Cloruro de bario dihidrato, ACS (Thermo Scientific) se adiciona 0,05 g por muestra
- Solución patrón: 100 ppm de  $\text{SO}_4$ , 1,1479 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a 110 °C por 2 horas y se afora a 1000 mL.

---

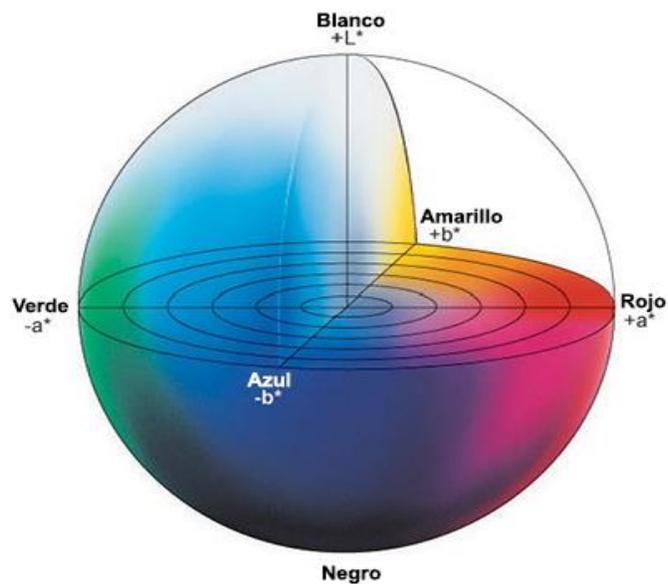
## Anexo 6. Colorimetría

---

El espacio de color  $L^*a^*b^*$  fue modelado en base a una teoría de color oponente que establece que dos colores no pueden ser rojo y verde al mismo tiempo o amarillo y azul al mismo tiempo. Como se muestra a continuación,  $L^*$  indica la luminosidad y  $a^*$  y  $b^*$  son las coordenadas cromáticas (Figura 84).

### Figura 82

*Diagrama de espacio de color del método Cie  $l^*, a^*, b^*$ .*



Fuente: Konica Minolta