



SECCIÓN ARTÍCULOS ORIGINALES
REVISTA CENTRO DE ESTUDIOS EN SALUD
Año 9 - VOL 1 - N° 11 - 2009

ABUNDANCIA DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATO EN SUELOS DE LA REGIÓN ANDINA DE NARIÑO, COLOMBIA

Pablo Fernández Izquierdo,¹ Daniel Augusto Bravo Benavides²
Grupo de Biotecnología Microbiana de la Universidad de Nariño

Fecha de recepción: Julio - 30 /09

Fecha de aceptación: Octubre - 12 / 09

RESUMEN

Los estudios sobre los aspectos bioquímicos y las bases moleculares de los procesos enzimáticos involucrados en la síntesis de Polihidroxicanoatos (PHAs) en bacterias son abundantes, así como también en la degradabilidad del polímero y los métodos para incrementar la producción a nivel industrial; pero hay pocas investigaciones relacionadas con factores ecológicos de las bacterias productoras de PHAs, por lo cual, se evaluó el efecto de variables fisicoquímicas del suelo en la abundancia de bacterias productoras de PHAs. En esta investigación se estableció que la abundancia de bacterias productoras de Polihidroxicanoatos en suelos de la región Andina del Departamento de Nariño, Colombia, se encuentra relacionada con altas concentraciones de carbono, nitrógeno, elevada capacidad de intercambio catiónico y pH ácido. Entre las bacterias productoras de PHAs aisladas de suelos de esta región, el 71,1% sintetizan Polihidroxiacetato y el 28,9% acumulan el copolímero Poli (3hidroxiacetato-*co*-3-hidroxiacetato).

Palabras clave: Bioplástico; Polihidroxicanoato (PHA); copolímero.

-
- 1 Doctor en Ciencias Biológicas, Docente Universidad de Nariño, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. pfernandez@udenar.edu.co
 - 2 Biólogo, Universidad de Nariño, profesor Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. dabravob@gmail.com

ABSTRACT

There is a lot of information and studies about the biochemical aspects and the molecular bases of the enzymatic process involved in the synthesis of Polyhydroxyalkanoates (PHAs), as well as in the polymer degradability and methods for increasing the production at an industrial level. Nevertheless, there is little research related to the ecological factors of the PHAs producer bacteria. For this reason, the effect of the physicochemical soil variables in the PHAs producer bacteria abundance. In this research, it was established that the PHAs producer bacteria abundance in soils in the Andean region of Nariño in Colombia is connected with high concentrations of carbon, nitrogen, high capacity of cation interchange and acid pH. Among the PHAs producer bacteria abundance isolated from soils in this region, the 71, 1% synthesizes Polyhydroxybutyrate and the 28,9% accumulates the copolymer Poly (3hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate).

Key words: Bioplastic; polyhydroxyalkanoate; PHA; copolymer.

INTRODUCCIÓN

Los PHAs son materiales intracelulares de reserva energética y carbono, acumulados por algunas bacterias bajo determinadas condiciones nutricionales desbalanceadas. Estos biopolímeros presentan características físico-químicas similares a los plásticos de origen petroquímico, pero se diferencian por su carácter biodegradable. Las propiedades de los PHAs son tan amplias que pueden sustituir casi cualquier material conocido y de hecho se han empleado como fuente de carbono en la desnitrificación de agua potable.^{1,2} Existen PHAs de diferentes puntos de fusión, cristalización, flexibilidad, resistencia a la tracción, biocompatibilidad y velocidad de biodegradación,^{3, 4} por lo cual, los plásticos de origen bacteriano tienen diversas aplicaciones. Por ejemplo, en el área médica pueden usarse como materiales para cirugía reconstructiva,⁵ en la fabricación de hilos quirúrgicos para suturas, vendajes para heridas, reemplazos de hueso y placas, matriz para el crecimiento y sanado de huesos, reemplazos de vasos sanguíneos. En el área farmacéutica y agronómica, estos poliésteres se pueden usar como matriz biodegradable para la dosificación de drogas de liberación controlada; en la industria de alimentos para la elaboración de empaques, entre otros.^{6, 7, 8} Debido a sus propiedades termoplásticas y a su carácter biodegradable, han sido considerados como

posibles sustitutos de los plásticos derivados del petróleo.

Se ha descrito un gran número de bacterias productoras de PHAs, las cuales se han aislado de suelos, aguas y especies vegetales. La capacidad de las bacterias de colonizar diferentes ambientes, principalmente de los suelos, es el reflejo de estrategias de supervivencia. La síntesis de PHAs puede considerarse como ventaja competitiva, porque son reservas carbonadas que algunos microorganismos producen cuando hay limitaciones nutricionales en el ambiente.⁹ Esta característica metabólica puede ser un indicador de las condiciones fisicoquímicas de los suelos, porque muestra el desbalance nutricional entre las fuentes de carbono y nitrógeno, o puede ser el resultado de la deficiencia de algunos nutrientes como fosfatos, sulfatos, magnesio, potasio. *In vitro* estas condiciones son tomadas en cuenta para diseñar diferentes medios de cultivo y estrategias de producción del bioplástico.^{10, 11, 12, 13}

Existe abundante información sobre aspectos relacionados con la bioquímica y las bases moleculares de los procesos enzimáticos involucrados en la síntesis de PHAs con el objetivo de emplear organismos recombinantes que faciliten la producción a gran escala.^{14, 15, 16, 17} Pero hay pocos estudios relacionados con factores ecológicos de las bacterias productoras de PHAs,

por lo cual, en esta investigación se evaluó el efecto de variables fisicoquímicas del suelo en la abundancia de bacterias productoras de PHAs.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en la región Andina del departamento de Nariño, al sur de Colombia, situado entre 0° 37' - 2° 43' latitud norte y 79° 31' - 76° 47' longitud oeste del meridiano de Greenwich. La zona de muestreo fue ubicada desde los 1.650 hasta los 3.030 m.s.n.m. con temperaturas dentro de un rango de 12 a 24°C. La topografía de la zona caracterizada por la presencia de pendientes que oscilan entre 12% a 50%, abarcó a los municipios del Rosario, Chachagüí, El Tablón, Buesaco, Pasto, Guaitarilla, Imués, Guachucal, Cumbal y La Florida.

En este trabajo se consideró la caja petri como la unidad de muestreo, en total se trabajó con 93 cajas petri, este número se calculó según los procedimientos descritos por Krebs ⁽¹⁸⁾ para poblaciones con distribución de Poison: $N = [(200 \times CV)/r] 2 \times 1/PM$

Donde N = tamaño de la muestra, PM = Promedio en prueba piloto, CV = Coeficiente de variación r = Error relativo (5%).

El número de muestras de suelo y de municipios se calculó dividiendo N entre 3 así:

$$\text{Numero de muestras de suelo} = 93/3 = 31$$

$$\text{Número de municipios} = 31/3 = 10,3$$

Por lo cual, de un municipio se colectaron cuatro muestras de suelo y de cada uno de los 9 municipios restantes se obtuvieron tres muestras. En total se colectaron 31 muestras según la metodología propuesta por Motta ⁽¹⁹⁾.

De cada una de las muestras, diez (10) gramos de suelo previamente tamizados y macerados

en mortero, fueron resuspendidos con 90 ml. de agua destilada estéril. Se prepararon diluciones seriadas con agua destilada estéril. De la sexta dilución, por triplicado, fueron inoculadas cajas petri con 1 ml. de la suspensión, posteriormente se adicionó 15 ml. de medio base (MB), el cual estaba conformado por glucosa 5 g, peptona bacteriológica 2.5 g.l⁻¹, extracto de levadura 2,5 g.l⁻¹, suplementado con agar 1,2 g.l⁻¹ y Nilo rojo al 0,01% en una proporción de 1 µl por ml. de medio de cultivo. Las 93 cajas petri fueron incubadas a 30°C y observadas a las 24, 48 y 72 hrs. en transiluminador de luz UV ($\lambda = 340\text{nm}$), las colonias con emisión de fluorescencia naranja fueron consideradas como positivas para la síntesis de PHA.²⁰ Estas colonias fueron cuantificadas y su valor se expresó en porcentaje.

Las colonias que resultaron positivas en las pruebas de Nilo rojo se sembraron por triplicado en erlenmeyer con 100 ml de caldo MB, se incubaron a 30°C con agitación constante a 120 r.p.m. para la extracción del polímero; los botones celulares se procesaron por el método de Martínez.²¹

Para caracterizar el polímero por Cromatografía de Gases, se mezcló 1 mg. de muestra, 1 ml. de cloroformo y 1 ml. de metanol: ácido sulfúrico (8515,v/v), la mezcla fue calentada a 90°C durante dos horas, luego fue enfriada rápidamente y se adicionó 1 ml. de NaCl al 0,1%, se separó la fase orgánica de la acuosa y se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, posteriormente se inyectó 0.5 µl de fase orgánica en el cromatógrafo de gases (GC - QP5000 Shimadzu) equipado con una columna capilar de sílica fundida MDN-S de 30 m. de longitud, 0.25 mm. de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. El inyector y el detector de temperaturas de flama ionizante fueron configurados a 250 °C. El programa de temperatura fue de 60 °C durante 2 minutos incrementándose 6 °C por minuto hasta el máximo de temperatura de 220 °C. Se utilizó el

modo de inyección Split con una razón de 23:2. Los tiempos de retención de los monómeros metilados del PHA sintetizado por la cepa se compararon con patrones de Hidroxibutirato de metilo y del copolímero (3HB-co-3HV 80:20).

Las muestras de suelo se analizaron por técnicas de uso rutinario en el Laboratorio de Suelos de la Universidad de Nariño para cuantificar: materia orgánica, carbono, nitrógeno total, densidad aparente, capacidad de intercambio catiónico, pH y relación Carbono/Nitrógeno, así como también los minerales de P, Ca, Co, B, K, Fe, Zn, Mn, Mg, Cu.^{22, 23} La relación entre las propiedades físico químicas de las diferentes muestras de suelo con la abundancia relativa de bacterias productoras de PHAs se evaluó usando el método multivariado de análisis de componentes principales.^{24, 25}

RESULTADOS

Aislamiento de bacterias productoras de PHAs

El mayor número de aislados bacterianos con reacción positiva ante la prueba de Nilo rojo se detectó en Cumbal donde el número de bacterias PHA positivas por gramo de suelo fue significativamente superior de casi veinticinco veces, con respecto al promedio obtenido de las muestras de suelo del municipio de Pasto (tabla 1). Cabe resaltar que en cuatro muestras de suelo: Chachagüí 1, Guaitarilla 1, Imués 3 y Pasto 3, no se detectaron colonias bacterianas con fluorescencia característica de producción de PHAs, por lo tanto no fueron incluidas en el análisis de varianza. Con la prueba paramétrica F se encontró que en las muestras de suelo analizadas, existen diferencias significativas ($p < 0,001$) entre el número de unidades formadoras de colonias bacterianas positivas a la prueba Nilo rojo, a través de la prueba Tukey se establecieron nueve grupos de suelos. En el grupo con menor número de bacterias productoras de PHA se incluyeron las muestras de Pasto 1, Pasto 2, Buesaco 1, Imués 1, La Florida 2, y La Florida 4. La muestra de

suelo con mayor número de bacterias PHA positivas correspondió a Imués 2. En total, de las 31 muestras de suelo analizadas se aislaron 48 morfotipos bacterianos.

Tabla 1. Distribución de bacterias totales productoras de PHAs aislados de suelos de municipios muestreados en la región Andina del Departamento de Nariño

Municipio	Bacterias Totales *	Bacterias PHA *	Abundancia Relativa Bacterias PHA *
	UFC x 10 ⁶	UFC x 10 ⁶	%
Chachagüí	42.89	1.22	2.85
Tablón	50.00	2.11	4.22
Rosario	54.44	2.67	4.90
Buesaco	123.78	0.78	0.63
Imués	74.56	2.78	3.73
Guaitarilla	50.56	0.44	0.88
Pasto	30.44	0.22	0.73
La Florida	82.22	1.00	1.22
Cumbal	42.33	6.33	14.96
Guachucal	32.33	2.22	6.87

* Promedio de 3 muestras de suelo

** La detección de colonias PHA positivas se realizó por la técnica cualitativa de Nilo rojo.

En 3 de los 48 aislamientos bacterianos no se detectaron en los cromatogramas de gases derivados metilados de los ácidos hidroxibutírico o hidroxivalérico utilizados como patrones. De los 45 aislados restantes, 32 (71.1%) presentaron un solo pico con un tiempo de retención similar al del patrón 3-Hidroxibutírico y 13 (28.9%) de los aislados presentaron dos picos con tiempo de retención igual al de los ésteres de metilo de los ácidos hidroxibutírico e hidroxivalérico (tabla 2).

Es de resaltar que en general el pH del suelo fue ácido, de las 31 muestras analizadas, el 19.35% presentaron un pH entre 4.7 y 4.85; el 48.4%

entre 5.0 y 5.92, y solo una muestra del municipio de Buesaco, presentó reacción ligeramente básica de 7.3. El contenido de materia orgánica fue variable, osciló entre 0.7% a 31.78%, destacándose las muestras de los municipios

de Tangua, Florida, Cumbal y Guachucal, que presentaron valores superiores al 10%. Cabe señalar que las muestras del municipio de Chachagüí, el Tablón y Buesaco fueron las de menor contenido de materia orgánica.

Tabla 2. Niveles de producción de Polihidroxicanoato sintetizado por los diferentes aislados bacterianos positivos ante la prueba de Nilo Rojo

Aislado Bacteriano	PHA mg.l ⁻¹	S	Aislado Bacteriano	PHA mg.l ⁻¹	S	Aislado Bacteriano	PHA mg.l ⁻¹	S
BUE1*	237.73	24.97	CUM6	60.20	8.61	IMU1	129.05	19.71
BUE2	346.47	16.95	CUM7	322.40	15.50	IMU2	560.61	27.42
BUE3*	100.90	21.01	CUM8	64.31	13.47	IMU3	77.45	12.99
BUE4	27.50	8.80	CUM9	266.76	13.05	IMU4*	69.59	15.97
CHA1	60.83	12.28	CUM10	164.83	16.15	IMU5	117.37	22.88
CHA2	48.91	10.97	CUM11	31.12	11.31	PAS1**	0.00	0.00
CHA3*	173.81	18.54	FLB1*	387.51	20.57	PAS2	121.93	16.12
CHA4*	98.79	17.62	FLB2*	400.11	21.27	ROS1*	355.21	19.45
CHA5	56.02	16.07	FLB3	59.17	11.66	ROS2*	375.18	17.80
CUA1**	0.00	0.00	FLB4	218.75	16.93	ROS3*	88.06	16.74
CUA2	29.75	5.09	GUA1	414.38	20.27	ROS4	82.78	16.43
CUM1**	0.00	0.00	GUA2	260.09	15.11	TAB1*	142.62	17.43
CUM2	127.42	15.19	GUA3	95.96	18.93	TAB2*	269.42	24.25
CUM3	234.78	19.29	GUA4	109.03	14.25	TAB3	71.40	14.28
CUM4	74.44	13.44	GUA5	90.30	14.18	TAB4*	265.96	15.47
CUM5	702.76	22.89	GUA6	881.42	20.32	TAB5	166.50	17.73

*Aislados productores de copolímero

** Aislados no productores de PHA

La cuantificación de PHA se realizó por CG

El nitrógeno total varió entre 0.13% para el municipio de Pasto hasta un máximo de 0.81% para el municipio de Cumbal. La relación carbono/nitrógeno fue diversa, sin embargo, es de resaltar que las muestras de los municipios de Cumbal y Guachucal, presentaron una elevada relación carbono/nitrógeno a diferencia de algunas muestras de suelo de los municipios de Chachagüí, Buesaco y El Rosario. Cabe resaltar que la capacidad de intercambio catiónico fue elevada, se encontró en un rango de 12.8 meq/100 g de suelo en el municipio de Florida hasta 48.8 para el municipio de Guachucal. Se destaca la muestra de suelo del municipio de Cumbal que presentó un valor máximo de 64.6 para esta variable edáfica.

El municipio de Buesaco presentó los valores más altos para fósforo, magnesio y calcio, pero valores opuestos de acuerdo con el ordenamiento de estos elementos se registraron en los municipios de Chachagüí, Florida y Cumbal, respectivamente. El potasio fue elevado en los municipios de Guaitarilla, La Florida y Cumbal con un valor de 0.7 meq aproximadamente, y particularmente bajó en el municipio de Guachucal. Las muestras de suelo de los municipios de Imués, Guaitarilla y Pasto exhibieron valores elevados para manganeso y cobre, resultados inversos se registraron en los municipios de Cumbal y Guachucal respectivamente.

Los municipios de Florida y Cumbal, también se destacan por su elevado contenido de zinc y boro respectivamente, por el contrario, en el municipio de Chachagüí se registró el menor contenido de zinc, en el mismo sentido, los municipios de Buesaco, Imués y San Juan de Pasto registraron muestras con menor concentración de boro. La Densidad del suelo en la mayoría de los casos fue menor de 1 g.cm^{-1} , lo cual indica el alto grado de porosidad de las muestras estudiadas. Es de mencionar que existe alto grado de variabilidad en las muestras evaluadas, puesto que todas las características físico-químicas presentan

desviaciones estándar elevadas, este es un parámetro que está acorde con otros reportes.^{26,27}

A través del análisis de componentes principales se estableció que tres combinaciones lineales fueron responsables del 70% de la variación de las propiedades del suelo. Las variables que integran el componente uno son: pH, porcentaje de materia orgánica, densidad aparente, capacidad de intercambio catiónico, Nitrógeno, relación Carbono/Nitrógeno y porcentaje de bacterias fluorescentes con Nilo rojo. El componente dos se encuentra integrado por las variables Fósforo y Calcio, Magnesio, y manganeso, por otro lado, Potasio, Hierro, Cobre, Boro y Zinc son los factores del componente 3. Los factores de carga de cada una de las variables se observan en la (tabla 3.)

Las relaciones de las diferentes variables fisicoquímicas del suelo en los dos primeros componentes principales se aprecian en la (Figura 1.)

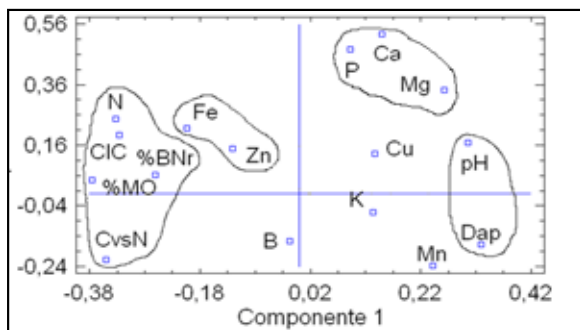
Tabla 3. Factores de carga de las variables edáficas según los componentes principales. Las variables que hacen parte del componente se identifican por su mayor valor absoluto

Variable	Componente		
	1	2	3
pH	0.31	0.17	0.15
* %MO	-0.37	0.05	0.14
Dap	0.33	-0.17	-0.12
P	0.09	0.48	-0.18
CIC	-0.33	0.19	0.23
Ca	0.15	0.53	-0.02
Mg	0.26	0.34	0.24
K	0.13	-0.06	0.37
Fe	-0.20	0.21	-0.47
Mn	0.24	-0.24	-0.07
Cu	0.14	0.13	-0.24
Zn	-0.12	0.15	-0.46

B	-0.02	-0.16	-0.28
N	-0.33	0.25	0.19
C/N	-0.35	-0.22	-0.10
%RN	-0.26	0.06	0.19

* %MO = Porcentaje de Materia orgánica, Dap = Densidad aparente, P = Fósforo, CIC = Capacidad de intercambio catiónico, Ca = Calcio, Mg = Magnesio, K = Potasio, Fe = Hierro, Mn = Manganeso, Cu = Cobre, Zn = Zinc, B = Boro, N = Nitrógeno, C/N = Relación carbono nitrógeno, % RN = Porcentaje de bacterias nilo rojo positivas.

Figura 1. Ordenamiento de características edáficas de los suelos estudiados de la Región de Nariño, en los dos primeros componentes principales



*Las variables que forman un cluster presentan entre sí correlación positiva

DISCUSIÓN

Los resultados del recuento de bacterias en las muestras de suelo (tabla 1), indican que su número total se encuentra dentro del rango informado para los métodos de cultivo *in vitro*.²⁸ Estas técnicas permiten cuantificar las comunidades microbianas productoras de PHAs de los suelos con su posterior purificación, de esta manera, el fenotipo de los aislamientos microbianos puede ser ampliamente evaluado y así mismo, sus relaciones con las variables edáficas pueden ser establecidas.

En Colombia se han publicado estudios relacionados con el aislamiento de bacterias

productoras de PHAs de suelos utilizados para el cultivo de caña de azúcar. En uno de ellos, se mencionó que de 69 cepas bacterianas 25 de estas (36.2%), fueron positivas para la síntesis del biopolímero;²⁹ en otro estudio, aplicando la técnica de tinción con Sudan negro, se informó que de 242 colonias bacterianas 132 (54.5 %), mostraron capacidad para acumular este polímero.³⁰

En esta investigación se utilizó un medio de cultivo con Nilo rojo incluido a una concentración muy baja (0.001%) capaz de detectar el PHA, asegurando eficiencia y economía. El medio así conformado queda transparente y sin interferencias. Con él se pudo determinar que en las muestras de suelo el 14% de la población total fue de bacterias productoras de PHAs, cabe señalar que la selección de colonias bacterianas por la observación de fluorescencia permite desechar cepas con baja producción de PHAs.

Los porcentajes de bacterias productoras de PHA informadas en este estudio son menores a los reportados en investigaciones similares realizadas en Colombia.^{29, 30} Estas diferencias se pueden atribuir a dos factores: primero, las técnicas de detección de bacterias productoras de PHA con Sudan negro y Nilo rojo presentan diferente grado de especificidad. Es bien conocido que el colorante Sudan negro exhibe afinidad por sustancias lipídicas en general,³¹ pero no es selectivo para la detección específica de PHAs. Por tanto, el valor encontrado por Muñoz²⁹ puede estar sobreestimado, porque el Sudan Negro II tiene especificidad baja, ya que también se une a moléculas diferentes de los PHAs.³² Es de señalar que los colorantes con mayor especificidad para detectar bacterias acumuladoras de PHAs son el Nilo rojo y el Nilo azul por la ventaja de que fluorescen en presencia de estos poliésteres bacterianos; segundo, aunque en los estudios de bacterias productoras de PHAs anteriores a esta investigación no se reportan las características fisicoquímicas de

los suelos que permitan realizar comparaciones detalladas, es posible generalizar si se considera que las propiedades del suelo varían de una región a otra en dependencia de las interacciones entre el material parental, clima, topografía y factores bióticos, probablemente los tipos de suelos empleados en los dos estudios referidos arriba sean diferentes. Es de señalar que las interacciones que ocurren en el suelo inciden en las poblaciones bacterianas, por tanto, el origen de las muestras determinará el resultado final.

Relación de las Bacterias PHA positivas con variables edáficas

Con el análisis de componentes principales se encontró que el ambiente que favorece, de forma significativa, la abundancia de bacterias productoras de PHAs, se caracteriza por: presentar elevada concentración de materia orgánica y nitrógeno, alta relación C/N, alta capacidad de intercambio catiónico, pH ácido y baja densidad aparente. Los suelos que presentan estas características fueron colectados en los municipios de Cumbal y Guachucal. En ellos se alcanzaron los valores más altos de abundancia relativa en bacterias productoras de PHA.

Aunque es ampliamente conocido que el carbono y el nitrógeno son elementos fundamentales para el crecimiento de la microbiota del suelo,³³ no es prudente atribuir el incremento de bacterias productoras de PHAs exclusivamente a estos nutrientes, puesto que el efecto de los mismos debe ser similar para otros grupos de bacterias organótrofas. El efecto positivo del carbono y el nitrógeno sobre la presencia de bacterias productoras de PHAs, se evidenció cuando, además de las concentraciones elevadas, se generó una alta relación de la variable C/N entre 15:1 a 20:1 en el suelo. Esta condición es confirmada por los estudios de producción *in vitro* de PHAs, en los cuales se recomienda el uso de medios de cultivo desbalanceados con alta relación de las fuentes de carbono y nitrógeno.

Las bacterias cultivadas bajo estas condiciones sintetizan PHA como estrategia metabólica para regular la concentración de carbono y consumir poder reductor.³⁴

En el análisis de componentes principales, se evidenció que existe una relación inversa entre el pH del suelo con el número de bacterias acumuladoras de PHAs, por lo cual el pH ácido entre 4,7 y 5,5 tuvo efecto positivo sobre este grupo de bacterias. La influencia del pH puede evidenciarse de dos formas. El primer mecanismo es indirecto relacionado con la disponibilidad de los nutrientes, considerando que en condiciones ácidas el fósforo inorgánico y el magnesio son mucho más solubles, quedando disponibles para los microorganismos del suelo,^{35, 36} pero a valores de pH inferiores a 5, el fósforo se fija en compuestos insolubles de hierro o aluminio. En consecuencia, por esta vía se disminuyeron las concentraciones de fósforo disponible.^{37, 38} Las muestras de suelo empleadas en este estudio son particularmente ácidas, con altas concentraciones de hierro. Bajo estas condiciones es de suponer que hay una marcada deficiencia de fósforo soluble para los organismos del suelo. Es de señalar que en la mayoría de las bacterias productoras de PHAs la acumulación intracelular aumenta bajo condiciones deficientes de fósforo.³⁹

Bajo el efecto del pH ácido, la solubilización de metales pesados puede alcanzar niveles tóxicos.^{40, 41, 42} Por ejemplo, se ha descrito que concentraciones Cu y Zn superiores a 4 mmol por kilogramo de suelo reducen en un 30% la tasa de respiración y en cultivos *in vitro* se presenta una drástica disminución de unidades formadoras de colonias.^{43, 44} El segundo mecanismo, por el cual el pH influye en la abundancia de bacterias productoras de PHAs se relaciona con el exceso de carbono disponible en el ambiente. Una posible vía para regular las concentraciones intracelulares de carbono puede ser a través de la secreción de sustancias como ácidos

orgánicos y aminoácidos. Sin embargo, esta estrategia no es la más adecuada en este tipo de ambientes, ya que la eliminación de ácidos orgánicos intensificaría la acidez del suelo e incidiría negativamente en la estabilidad celular, por lo cual, la acumulación intracelular de carbono en moléculas osmóticamente inertes es la alternativa más apropiada. De esta forma no se inducen variaciones del pH en el ambiente. El PHA es un polímero utilizado como reserva de carbono y poder reductor, el carbono es de rápida disponibilidad para la producción de diversos compuestos. La síntesis de este tipo de poliéster es una estrategia que confiere resistencia ante condiciones ambientales adversas,^{45, 46} por ello, las bacterias que pueden acumular PHAs presentan ventaja competitiva frente a poblaciones que carecen de esta característica.

En el mismo sentido, los suelos con mayor abundancia de bacterias productoras de PHAs tienen una capacidad de intercambio catiónico entre 48 a 64 meq/100 g. La correlación directa entre estas dos variables posiblemente se atribuye a que en este tipo de suelos ácidos una gran parte de los cationes son de hidrógeno y aluminio, cationes que afectan la disponibilidad de los nutrientes, particularmente el aluminio forma compuestos insolubles de Fósforo. La baja disponibilidad de este nutriente afectaría la síntesis de ATP y por consiguiente a nivel de la membrana celular se reprime el transporte de electrones y la liberación de hidrogeniones hacia el medio, en consecuencia se incrementa el poder reductor de la célula el cual es utilizado para síntesis de PHAs.

Por otra parte, se encontró una correlación negativa entre la densidad aparente del suelo y el número de bacterias productoras de PHAs. Esta propiedad se encuentra inversamente relacionada con la concentración de agua.⁴⁷ Es bien conocido que la disponibilidad de agua afecta el estatus osmótico de la bacteria, e indirectamente regula la disponibilidad de nutrientes, difusión

de gases, el pH del suelo, y la temperatura.⁴⁸ Así mismo, se ha establecido que las inclusiones citoplasmáticas, como los gránulos de reserva de PHAs, son osmóticamente neutros,⁴⁹ por tanto, aunque el déficit de agua produce tensiones a la célula, al parecer el movimiento de nutrientes y el metabolismo energético van en direcciones contrarias a la acumulación de inclusiones. En este sentido, si el déficit de agua incrementa, los procesos de mineralización de la materia orgánica disminuyen.⁵⁰ Es probable que en suelos correspondientes a los municipios de Pasto, Guaitarilla, El Rosario, Chachagüí y Buesaco, la disminución del número de bacterias acumuladoras de PHAs se encuentre influenciada por la pérdida de carbono disponible y la acumulación de compuestos refractarios. Este cambio en la calidad de materia orgánica posiblemente induce sucesiones en la comunidad microbiana.^{51, 52, 53, 54}

Aunque la relación C/N, incidió favorablemente en la abundancia de bacterias productoras de PHAs, la baja capacidad de intercambio catiónico y la elevada densidad aparente del suelo redujeron este tipo de población bacteriana. Es por ello que al comparar las muestras de suelo de los municipios Pasto con Guachucal y Cumbal se encontró que son similares en el número total de bacterias, sin embargo, los datos obtenidos para las bacterias productoras de PHAs fue marcadamente diferente (tabla 1).

De acuerdo con los anteriores planteamientos, la abundancia de bacterias productoras de PHAs en suelos de la región Andina se encuentra relacionada con las condiciones ácidas del ambiente. Su producción es favorecida por las concentraciones elevadas de carbono, nitrógeno, relación C/N e intercambio catiónico. Estos resultados representan una novedad científica, por cuanto no se ha reportado antes en la literatura un estudio similar, ni demostrado a nivel de campo estas relaciones fisiológicas.

CONCLUSIONES

La técnica de tamizaje empleando Nilo rojo en medio de cultivo, acompañada de CG, es una estrategia confiable que permite evaluar un gran número de muestras de ambientes naturales para la detección de bacterias productoras de PHAs.

La abundancia de bacterias productoras de PHAs en suelos de la región Andina del departamento de Nariño se favorece por las altas concentraciones de carbono, nitrógeno, relación C/N de 20:1, elevada capacidad de intercambio catiónico 48 a 64 meq/100 g y pH ácido entre 4,7 y 5,5.

Entre las bacterias productoras PHAs aisladas de suelos de la región Andina del departamento de Nariño, el 71.1% sintetizan Polihidroxibutirato y el 28.9% acumulan el copolímero Poli (3hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato).

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Sistema de Investigaciones de la Universidad de Nariño por su apoyo económico y logístico.

REFERENCIAS

- Biedermann, J.; Owen, A. J.; Schelse, K. T.; Gassner, F. y Sussmuth, R. 1997. Interaction between poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate and a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Can J. Microbiol.* 43:561-568.
- Hiraishi A. y S. T. Khan. 2003. Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:103-109
- Lee, S. Y. 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnol.* 14:431-438
- Sudesh, K., Abe, H., y Doi, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science.* 25:1503-1555.
- Lee, S. Y. 1996b. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49:1-14
- Holmes P. A. 1988. Biologically produced PHA polymers and copolymers. In: *Developments in crystalline polymers*, Bassett DC (ed), Elsevier, London 2: pp. 1-65.
- San Román, J. y P. Guillén. 1992. Biomateriales poliméricos compuestos para aplicaciones quirúrgicas: composites para cirugía ortopédica y remodelación ósea; *Rev. de Plásticos Modernos.* 438: 674-688.
- Duvernoy, O., T. Malm, J. Ramström y S. Bowald. 1995: A biodegradable patch used as a pericardial substitute after cardiac surgery: 6- and 24- month evaluation with CT; *Thorac Cardiovasc. Surg.* 43:271-274
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2000. *Biology of Microorganisms*, 9th edition, Prentice-Hall, Upper Saddle River.
- Findlay, R. H., y D. C. White. 1983. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:71-78.
- Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M., y Soga, K. 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28:330-334.
- Brandl, H. E, Gross, R. A., Lenz, R. W, y Fuller, R.C. 1988 *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl Environ. Microbiol* 54:1977-1982.
- Brandl, H., E. Knee, J. J., Fuller, R. C., Gross R. A., y Lenz, R. W. 1989. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly (b-polyhydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. *Int. J. Biol. Macromol.* 11:49-55.
- Beaulieu M., Beaulieu, Y., Mélinard, J., Pandian, S., y Goulet, J. 1995. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 165-169.
- Steinbüchel, A., B. Fuchtenbusch, V. Gorenflo, S. Hein, R. Jossek, S. Langenbach, y B. H.A. Rehm. 1997. Biosynthesis of polyester in bacteria and recombinant organism. *Polym. Degrad. Stabl.* 59:177-182.
- Jong-il Choi, Sang Yup Lee, y Kyuboem Han. 1998. Cloning of the *Alcaligenes latus* Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Genes and

- Use of These Genes for Enhanced Production of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli* Appl. Environ. Microbiol. 64:4897-4903.
17. Lütke-Eversohl Tina, Bergander Klaus, Luftmann Heinrich y Alexander Steinbüchel 2001. Identification of a new class of biopolymer: bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages. Microbiology, 147, 11-19.
 18. Krebs Charles J. 1989. Ecological Methodology. Harper Collins publishers. Inc. New York, p. 654.
 19. Motta de Muñoz, Beatriz; Rodríguez T. C; Montenegro H. Marulanda J. Correa del C. Adela; Bendek de V. Myrian. 1990. Métodos analíticos de laboratorios de suelos. Min. Hacienda, Rep. Colombia, Bogotá, 5002 p.
 20. Spiekermann, P., Rehm, B. H. A., Kalscheuer, R., Baumeister, D. y Steinbüchel, A. 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. Arch Microbiol 171:73-80.
 21. Martínez, J., Rodríguez, M., Fernández, A. I., Villaverde, M. J.; López, A., Marín, D., Núñez, R., Galego, N., Carballo, E. M., 2004. Producción de polihidroxialcanoatos en bacterias diazótrofes. I. influencia de la aeración en la síntesis de poli β hidroxibutirato en *Azospirillum brasilense* cepa 7. Universidad de la Habana. Rev. Biología. 18: 87-95.
 22. Unigarro Sánchez Alberto, Carreño Castellanos Rosario. 2005. Métodos químicos para el análisis de suelos. Editorial Universitaria de la Universidad de Nariño. Pasto. Colombia, 72 Págs.
 23. Motta, op, cit
 24. McGarigal, Kevin, Cushman, Sam, Stafford Susan. 2000. Multivariate statistics for wildlife and ecology research. Springer-Verlag New York. Inc. 282 p.
 25. Digby P.G.N. y Kemton, R. A. 1994. Multivariate analysis of ecological communities. Published by Chapman and Hall London. United Kingdom, p. 2006.
 26. Mora, Revelo, B. Obando, Enríquez, L. Rosero, B. D. 2005. Dinámica del componente bioorgánico en suelos de alta montaña del santuario de Flora y Fauna, Galeras, Nariño, Colombia. Trabajo de grado, Universidad de Nariño. 215 p.
 27. Unigarro, Sánchez Alberto. 2005 Evaluación de la calidad de un suelo Distrito de Cunday mediante la determinación de algunas propiedades físicas, químicas y biológicas en el Santuario de Flora y Fauna, Galeras, Nariño. Tesis MSc. Universidad Nacional de Colombia. 160 Págs.
 28. Atlas, Ronald. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental, Madrid, Addison-Wesley Iberoamericana. 677p.
 29. Muñoz, G., Rincón A., Gómez, D., Poutou R., Delgado, J. M. 2002 Aislamiento e identificación de bacterias nativas productoras de polihidroxialcanoatos. En: Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia. Bogotá, Ministerio del Medio Ambiente, Serie de documentos generales INVIMAR, No 10. 334 p.
 30. González J. F., Suárez, D. 2004. Exploración para la obtención de bacterias nativas rizosféricas productoras de Polihidroxialcanoatos (PHAs), en suelos de caña de azúcar en los departamentos de Nariño y Santander, Colombia. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Memorias del XXXIX Congreso Nacional. Ibagué No 2 415 p.
 31. Locquin Marcel, Langeron Maurice. 1985. Manual de Microscopía. Labor S.A. p. 215.
 32. Page, W. J. y Ch. J. Tenove. 1996. Quantitation of poly-β- hydroxybutyrate by fluorescence of bacteria and granules stained with Nile Blue A; Biotech. Tech. 10:215-220
 33. Parham, J. A., Deng, S. P., Da, H. N., Sun, H. Y., y Raun, W. R. 2003. Long-term cattle manure application in soil. II. Effect on soil microbial populations and community structure. Biology and Fertility of Soils. 38:209 – 215.
 34. Grothea, E., Murray Moo-Younga, Yusuf Chistib. 1999. Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. Enzyme and Microbial Technology. 25:132-141
 35. Rodríguez, H., Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17:319-339.
 36. Altomare, C. W., Norvell, A., Bjorkman, T., y Harman, G. E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. in: Appl. Environ. Microbiol. 65:2926-2933.
 37. Goldstein, A. H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. Biol. Agric. Hortic. 12:185-193.
 38. Huber, D. M., y T. S. McCay-Buis. 1993. A multiple

- component analysis of the take-all disease of cereals. *Plant Dis.* 77:437-447.
39. Ojumu, T. V., Yu, J., y Solomon, B.O. 2003. Production of Polyhydroxyalkanoates, a family of bacterial biodegradable polymer. *African journal of Biotechnology.* 3:18-24.
40. Ellis Richard J., Morgan Philip, Weightman Andrew J. y Fry John C. 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3223-3230.
41. Giller, K. E., Witter, E., y McGrath, S. P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soil: a review. *Soil Biol. Biochem.* 30:1389-1414.
42. Shi W., Becker J., Bischoff M., Turco, R. F., y Konopka, A. E.. 2002. Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3859-3866.
43. Baldrian, P., Carsten Inder Wiesche, Jíí Gabriel, Frantiek Nerud, and Frantiek Zadrazil. 2000. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic Enzymes and Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in Soil In: *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 66, No. 6, p. 2471-2478.
44. Rajapaksha R. M. C. P., Tobor-Kapon, M. A., y Baath E. 2004. Metal toxicity effects fungal and bacterial activities in soil differently. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2966-2973.
45. Kadouri, D., Burdman, S., Jurkevitch, E., y Yaacov, O. 2002. Identification and isolation of genes involved in Poly(β -Hydroxybutyrate) Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and Characterization of a phbC Mutant. In: *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 68, No. 6, p. 2943-2949.
46. Ruiz, J. A., López N. I., Fernández, R. O., y Méndez, B.S. 2001. Polyhydroxyalkanoate Degradation Is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 67:225-230.
47. Instituto Colombiano Agropecuario 1993. Manual de análisis de suelos, plantas y aguas para riego. Editorial Produmedios Bogotá. 236 p.
48. Griffiths, R. I., A. S. Whiteley, A. G. O'Donnell, y M. J. Bailey. (2003). Influence of depth and sampling time on bacterial community structure in an upland grassland soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43:35-43.
49. Williams, S. G., Greenwood, J. A., y Jones, C. W. 1996. Physiological and biochemical changes accompanying the loss of mucoidy by *Pseudomonas aeruginosa*. In: *microbiology*, 142:881-888.
50. Lundquist, E.J., Jackson, L-E.. y Show, K. M. 1999. Wet-dry cycles affect dissolved organic carbon in two California agricultural soil. *Soil Bio. Biochem.* 31:1031-1038.
51. Dilly, O., Bartsch, S., Rosenbrock, P., Buscot, F., y Munch, J. C. 2001. Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (Gaertn.) L.) forest. *Soil Biol. Biochem.* 33:921-930.
52. Heal, O. W., Anderson, J. M., y Swift, M. J. 1997. Plant litter quality and decomposition: an historical overview, p. 3-10. In G. Cadisch and K. E. Giller (ed.), *Driven by nature. Plant litter quality and decomposition.* CAB International, Wallingford, United Kingdom.
53. Dilly, O., y J.-C. Munch. 1996. Microbial biomass content, basal respiration and enzyme activities during the course of decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) Forest. *Soil Biol. Biochem.* 28:1073-1081.
54. Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC) 2005. Estudio general de suelos y zonificación de tierras, departamento de Nariño. Bogotá Colombia. Publicado en CD.