



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y**  
**PARASITOLOGÍA**



**Rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por**  
**bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de**  
***Asparagus officinalis* L., noviembre – diciembre, 2016**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN**  
**BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADA POR:**

**Br. Luz Magaly Altamirano León**

**Br. Edwin Ramos Romero**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2018**

**Rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por  
bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de  
*Asparagus officinalis* L., noviembre – diciembre, 2016**

**TESIS**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

**APROBADA POR:**

Mblga. María Teresa García Silva

---

**PRESIDENTE**

MSc. Consuelo Rojas Idrogo

---

**SECRETARIO**

Lic. Julio Silva Estela

---

**VOCAL**

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

---

**PATROCINADORA**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2018**

## **AGRADECIMIENTO**

*Estas líneas servirán para expresar nuestro más grande y sincero agradecimiento a Dios y a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la elaboración del presente trabajo.*

*Un agradecimiento muy especial a nuestra asesora la Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán quien se comprometió con nosotros desde el inicio transmitiéndonos su conocimiento y sabiduría, por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por sus consejos, que ayudan a formarte como persona e investigador.*

*De igual manera agradecer al Mblgo. Manuel A. Farcio Villareal y al grupo de amigos del laboratorio de Biotecnología por su confianza y apoyo incondicional en cada etapa de la investigación.*

*Al técnico de laboratorio de Microbiología y parasitología al Sr. Jaime por su colaboración en la realización de la presente tesis.*

## **DEDICATORIA**

*A Dios, dueño de la vida, por ayudarme, acompañarme y guiarme en la realización de esta tesis, que sin lugar a duda hubo muchas dificultades, pero él estuvo siempre de mi lado para darme las fuerzas suficientes y poder llegar a la meta.*

*A mis padres CÁSTULO ALTAMIRANO FERNÁNDEZ y OLGA LEÓN ESPÁRRAGA, por haberme brindado su apoyo moral y económico aconsejándome siempre y dándome su amor incondicional de padres que siempre los caracteriza.*

*A mis hermanas DORIS y PILAR, por su apoyo moral y su cariño brindado constantemente, dándome aliento en todo momento.*

*A mis mejores amigas, Pilar, Dámaris y a mi amor Jeancarlos por su comprensión y apoyo.*

*Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida.*

## **DEDICATORIA**

*La presente tesis se la dedico en primera instancia a  
Dios quien supo guiarme por el buen camino, darme  
fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los  
problemas que se presentaban, enseñándome a encarar  
las adversidades, sin desfallecer en el intento.*

*A mis padres ADELINDA ROMERO SUXE y FERNAN  
RAMOS CASTRO, por haberme brindado la mejor  
educación y lecciones de la vida e impulsándome a ser  
mejor cada día los amo infinitamente.*

*A mi hermano JERLY RAMOS ROMERO y demás  
familiares en general por su cariño y apoyo moral, que  
siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada  
año de mi carrera Universitaria.*

*A mis amigos, quienes compartieron sus conocimientos,  
alegrías, tristezas sin esperar nada a cambio y de alguna  
manera contribuyeron para poder culminar con éxito  
esta tesis.*

# Índice

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Antecedentes de la investigación.....	3
2.2 Base teórica .....	6
2.2.1 Generalidades de los polihidroxialcanoatos .....	7
2.2.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno .....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
3.1 Materiales.....	12
3.1.1 Material biológico .....	12
3.1.2 Población y muestra .....	12
3.2 Métodos .....	12
3.2.1 Variables de fase descriptiva.....	12
3.2.2 Variables de la fase explicativa .....	12
3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis .....	14
3.2.4 Primera fase .....	14
3.2.4 Segunda fase .....	24
3.2.5. Análisis estadístico .....	35
IV. RESULTADOS.....	36
4.1 Bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de espárrago.....	36
4.2 Bacterias productoras de gránulos de PHA .....	36
4.3 Bacterias productoras de gránulos de PHA seleccionadas e identificadas fenotípicamente.....	41
4.4 Biomasa y PHA producidos por <i>Azospirillum</i> spp. en dos medios de cultivo.....	41
V. DISCUSIÓN .....	53
VI. CONCLUSIONES .....	57
VII. RECOMENDACIONES.....	58
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59
ANEXOS .....	67

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Lote de procedencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de <i>Asparagus officinalis</i> L. en el Fundo Josymar, Virú, La Libertad.....	15
<b>Tabla 2.</b>	Rango del número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram negativas teñidas con Sudan Negro B a las 24 y 48 horas.....	40
<b>Tabla 3.</b>	Rango del número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram positivas teñidas con Sudan Negro B a las 24 y 48 horas.....	40
<b>Tabla 4.</b>	Características fenotípicas diferenciales de <i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Burkholderia</i> y <i>Herbaspirillum</i> spp.....	42
<b>Tabla 5.</b>	Características de las bacterias fijadoras de nitrógeno Gram negativas seleccionadas por el mayor número de células con gránulos de PHA.....	43
<b>Tabla 6.</b>	Número de células bacterianas con gránulos de PHA en diferentes tiempos de incubación.....	43
<b>Tabla 7.</b>	Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de <i>Azospirillum</i> sp.130 en medios de cultivo balanceado (a) y desbalanceado (b).....	44
<b>Tabla 8.</b>	Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de <i>Azospirillum</i> sp.155 en medios de cultivo balanceado (a) y desbalanceado (b).....	45
<b>Tabla 9.</b>	Absorbancia (600nm) de biomasa de <i>Azospirillum</i> spp. en medios de cultivos balanceado y desbalanceado durante 36 horas.....	46
<b>Tabla 10.</b>	Concentración (gL <sup>-1</sup> ) de biomasa* de <i>Azospirillum</i> spp. en medios de cultivo balanceado y desbalanceado durante 36 horas.....	46

<b>Tabla 11.</b>	Coeficiente de rendimiento del producto en función de la biomasa por <i>Azospirillum</i> spp. 155 y 130 cultivados por 32 horas en medios balanceado y desbalanceado.....	50
<b>Tabla 12.</b>	Análisis de varianza del rendimiento de PHA en función de la biomasa ( $Y_p/x$ ) de dos cultivos bacterianos en dos medios de cultivo.....	50
<b>Tabla 13.</b>	Prueba de la Diferencia Mínima Significativa, DMS ( $\alpha=0,05$ ) del rendimiento de PHA en función de la biomasa ( $Y_p/x$ ) de dos cultivos bacterianos.....	51
<b>Tabla 14.</b>	Prueba de la Diferencia Mínima Significativa, DMS ( $\alpha=0,05$ ) del rendimiento de PHA en función de la biomasa bacteriana $Y_p/x$ en medios de cultivo balanceado y desbalanceado.....	51
<b>Tabla 15.</b>	Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del rendimiento de PHA en función de la biomasa de dos cultivos bacterianos en dos medios de cultivo.....	51
<b>Tabla 16.</b>	Absorbancia y biomasa de <i>Azospirillum</i> sp.155 cultivado en medio desbalanceado durante 32 horas.....	52
<b>Tabla 17.</b>	Cinética de la producción de biomasa y PHA por <i>Azospirillum</i> sp. 155 cultivado en medio desbalanceado durante 32 horas.....	52



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Estructura química de polihidroxicanoatos producidos por bacterias (Gómez, 2013).....	7
<b>Figura 2.</b>	Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos (González et al., 2013).....	9
<b>Figura 3.</b>	Plantas de <i>Asparagus officinalis</i> L. en Virú, región La Libertad, 2016.....	13
<b>Figura 4.</b>	Tratamientos para determinar el rendimiento de biomasa y PHA por dos cultivos bacterianos en medios de cultivo balanceado y desbalanceado.....	15
<b>Figura 5.</b>	Medios semisólidos sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	18
<b>Figura 6.</b>	Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno en medios semisólidos.....	18
<b>Figura 7.</b>	Siembra en medio sólido mediante la técnica de agotamiento y estría.....	19
<b>Figura 8.</b>	Siembra en medio semisólido mediante la técnica de puntura.....	19
<b>Figura 9.</b>	Bacterias endófitas y rizosféricas cultivadas en caldo fermentación.....	21
<b>Figura 10.</b>	Tinción de bacterias con Sudan Negro B.....	21
<b>Figura 11.</b>	Calentamiento de bacterias sin emisión de vapores.....	22
<b>Figura 12.</b>	Decoloración de bacterias con xilol.....	22
<b>Figura 13.</b>	Tinción de bacterias con safranina.....	23
<b>Figura 14.</b>	Bacterias productoras de gránulos de PHA cultivadas en caldo fermentación.....	25
<b>Figura 15.</b>	Esquema del ensayo para determinar el rendimiento de biomasa y PHA por dos cultivos bacterianos en medios balanceado y desbalanceado.....	25

<b>Figura 16.</b>	Inoculación de bacterias en medio de fermentación.....	27
<b>Figura 17.</b>	Extracción de muestra de medio cultivado con bacterias.....	27
<b>Figura 18.</b>	Lectura de absorbancia en espectrofotómetro de luz visible.....	29
<b>Figura 19.</b>	Biomasa de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos.....	29
<b>Figura 20.</b>	Biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio.....	30
<b>Figura 21.</b>	Biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio (a) y cloroformo (b).....	30
<b>Figura 22.</b>	Observación de dos fases en biomasa bacteriana tratada y centrifugada.....	31
<b>Figura 23.</b>	Extracción del cloroformo conteniendo el polihidroxialcanoato.....	33
<b>Figura 24.</b>	Pesado del tubo de ensayo conteniendo el polihidroxialcanoato.....	33
<b>Figura 25.</b>	Polihidroxialcanoato adherido en el fondo del tubo de ensayo.....	34
<b>Figura 26.</b>	Cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L, 2016.....	37
<b>Figura 27.</b>	Frecuencia de bacterias fijadoras de nitrógeno rizosféricas y endófitas aisladas de <i>Asparagus officinalis</i> L, 2016.....	37
<b>Figura 28.</b>	Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno desarrolladas en medios sólidos.....	38
<b>Figura 29.</b>	Película subsuperficial desarrollada por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.....	38
<b>Figura 30.</b>	Gránulos de PHA en bacterias Gram negativas.....	39
<b>Figura 31.</b>	Gránulos de PHA en bacterias Gram positivas.....	39
<b>Figura 32.</b>	Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de <i>Azospirillum</i> sp.130 en medios de cultivo balanceado (a) y desbalanceado (b).....	44

<b>Figura 33.</b>	Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de <i>Azospirillum</i> sp.130 en medios de cultivo balanceado (a) y desbalanceado (b).....	45
<b>Figura 34.</b>	Variación de la concentración de biomasa de <i>Azospirillum</i> sp.130 en medios de cultivo balanceado y desbalanceado.....	47
<b>Figura 35.</b>	Variación de la concentración de biomasa de <i>Azospirillum</i> sp.155 en medios de cultivo balanceado y desbalanceado.....	49
<b>Figura 36.</b>	Concentración de PHA producido por <i>Azospirillum</i> spp en medios de cultivo balanceado y desbalanceado durante 36 horas.....	49

## RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar el rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L. Muestras de suelo rizosférico, raíces y tallos previamente desinfectados, se cultivaron en medios sin nitrógeno para aislar bacterias fijadoras rizosféricas y endófitas, respectivamente. En caldo fermentación con glicerol como fuente de carbono, se investigó la producción de gránulos de PHA por estas bacterias, coloreándolas con Sudan Negro B después de 24 y 48 horas. Los dos cultivos bacterianos en los que se observó el mayor número de células con gránulos de PHA se llevaron a fermentación con glicerol en los medios balanceado y desbalanceado durante 36 horas, determinándose la biomasa, PHA y Yp/x. El 51,1% de las bacterias fijadoras fueron rizosféricas y el 48,9% endófitas. En el 56,67% de las bacterias se detectaron gránulos de PHA. El rendimiento Yp/x fue de 0,57855gg<sup>-1</sup> (*Azospirillum* sp.155) y 0,22543gg<sup>-1</sup> (*Azospirillum* sp.130) en el medio balanceado y 0,76718gg<sup>-1</sup> (*Azospirillum* sp.155) y 0,26229gg<sup>-1</sup> (*Azospirillum* sp.130) en el medio desbalanceado, después de 32 horas de fermentación. Se demostró la producción de PHA por las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de espárrago.

**Palabras clave:** polihidroxialcanoatos, bacterias fijadoras de nitrógeno, Sudan Negro

## ABSTRACT

The present investigation was carried out with the objective of determining the performance of polyhydroxyalkanoates produced by nitrogen-fixing bacteria isolated from *Asparagus officinalis* L. Rhizospheric soil samples, roots and stems previously disinfected, were grown in nitrogen-free media to isolate rhizospheric and endophytic binding bacteria. , respectively. In broth fermentation with glycerol as a carbon source, the production of PHA granules by these bacteria was investigated, coloring them with Sudan Negro B after 24 and 48 hours. The two bacterial cultures in which the greater number of cells with PHA granules was observed were taken to fermentation with glycerol in the balanced and unbalanced media during 36 hours, determining the biomass, PHA and  $Y_p/x$ . 51.1% of the fixing bacteria were rhizospheric and 48.9% endophytic. In 56.67% of the bacteria, PHA granules were detected. The yield  $Y_p/x$  was  $0.57855\text{gg}^{-1}$  (*Azospirillum* sp.155) and  $0.22543\text{gg}^{-1}$  (*Azospirillum* sp.130) in the balanced medium and  $0.766718\text{gg}^{-1}$  (*Azospirillum* sp.155) and  $0.26229\text{gg}^{-1}$  (*Azospirillum* sp.130) in the unbalanced medium, after 32 hours of fermentation. The production of PHA was demonstrated by the nitrogen-fixing bacteria isolated from asparagus.

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates, nitrogen-fixing bacteria, Sudan Negro

## **I. INTRODUCCIÓN**

Los plásticos derivados del petróleo son materiales muy útiles por su estabilidad y resistencia; no obstante, estas propiedades los hacen muy problemáticos, una vez que han cumplido su función, porque permanecen en el ambiente y no son degradados por los microorganismos (Allsopp et al., 2007). En el mar los residuos plásticos causan enrollamientos, provocando la muerte de los animales por ahogo, asfixia, estrangulamiento, inanición y heridas. También pueden ser ingeridos obstruyendo el tracto digestivo y causando malnutrición, inanición y muerte (Derraik, 2002; Boland & Donohue, 2003; Allsopp et al., 2007).

Los polihidroxicanoatos (PHA) constituyen una alternativa para los plásticos petroquímicos. Son poliésteres de hidroxialcanoatos con propiedades del plástico sintético y la ventaja de ser completamente biodegradables (Grados et al., 2008). Son producidos y acumulados como gránulos intracelulares por más de 300 bacterias diferentes (Segura et al., 2007), incluyendo Eubacterias y Archaeas (Serrano, 2010), cuando en el medio hay abundancia de carbono y déficit de elementos como nitrógeno, fósforo o magnesio, entre otros (Fernández et al., 2005). Estas bacterias tienen un metabolismo versátil con actividad celulolítica (Grados et al., 2008), hidrólisis de polímeros como el almidón (Guzmán y Hurtado, 2011) y diazotrofia o fijación de nitrógeno (Cerrone, 2011; Rubio, 2012).

Los PHA son producidos industrialmente; no obstante, presentan la desventaja de ser no económicos (Segura et al., 2007). El costo del polihidroxibutirato (PHB), uno de los PHA más conocido es estimado en 2,13 a 6,25 dólares  $\text{kg}^{-1}$ , superando ampliamente 1,45 dólares  $\text{kg}^{-1}$  del petroplástico (Gómez, 2013). La producción rentable del PHA depende del microorganismo

propiamente dicho: rendimiento, utilización de fuentes de carbono económicas (Becerra, 2013), velocidad de crecimiento y síntesis del polímero, cantidad y calidad, así como también de las estrategias de fermentación y procesos de extracción y purificación (Bello et al., 2008).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno reducen el nitrógeno molecular hasta amonio, que puede ser utilizado para la síntesis de compuestos por los seres vivos (Altamirano et al., 2014), son fáciles de aislar y propagar en sustratos disponibles y de bajo costo (Cerrone, 2011) y agrupan géneros reconocidos por su capacidad para acumular PHA (Baca et al., 2010). En los cultivos agrícolas como *Asparagus officinalis* L. “espárrago” existe una diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno, que no ha sido investigada, con la perspectiva de obtener cepas con mayor rendimiento en el polímero y que puedan ser utilizadas en la producción comercial con bajo costo. La investigación de bacterias productoras de PHA no solo contribuirá al conocimiento de la microbiota del espárrago, sino que también permitirá obtener aislados bacterianos con un gran potencial biotecnológico en la producción de biopolímeros y otros productos de interés económico, con miras al procesamiento de la industria biotecnológica local.

Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema ¿Cuál es el rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L.? El objetivo general fue: Determinar el rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L., noviembre a diciembre 2016. Los objetivos específicos fueron: aislar bacterias fijadoras de nitrógeno en raíces, tallos y suelo rizosférico de espárrago, detectar gránulos de PHA en las bacterias, utilizando la tinción de Sudan Negro B, identificar fenotípicamente los diez cultivos de bacterias con el mayor número de células con gránulos de PHA, cuantificar la biomasa y PHA y calcular el rendimiento  $Y_{p/x}$  de dos aislados de bacterias en dos medios de cultivo y determinar la cinética de la producción de biomasa, PHA y rendimiento  $Y_{p/x}$  de un aislado bacteriano en un medio de cultivo seleccionado. La hipótesis planteada fue: Las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L. alcanzan un rendimiento de PHA mayor al 70% de su peso seco.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes de la investigación

Las bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHA), se encuentran en diversos ambientes y se han aislado de suelos (Fernández et al., 2009), raíces (Baca et al., 2010), raíces y suelo rizosférico (Lisboa y Segura, 2010; Jara y Tafur, 2015), salinas (Llontop, 2012; Flores e Idrogo, 2015), agua de mar (Ríos y Rivera, 2012), subproductos de la industria alimentaria (Cardona et al., 2013), suelos contaminados (Sánchez et al., 2012), ambientes contaminados y no contaminados (Razzaq et al., 2010), aguas residuales (Cuesta, 2014) y lodos activados (Arroyave et al., 2013).

La concentración de PHA se investigó en especies de *Azospirillum* aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz”. Las raíces se sembraron en medio NFb semisólido, donde las bacterias fijadoras de nitrógeno se reconocieron por una película blanquecina bajo la superficie y el viraje del indicador al azul. Las bacterias se identificaron fenotípicamente, se llevaron a una fermentación discontinua en caldo *Azotobacter* modificado, alimentado con una solución saturada de ácido málico cada 12 horas y se realizaron tinciones con Sudan Negro B, para seleccionar las bacterias productoras de gránulos de PHA y cuantificar la biomasa y el PHA. Se obtuvieron 96 cultivos de *A. lipoferum* y *A. brasilense* productoras de PHA provenientes del 35,42% de las muestras de raíces de tomate y 58,33% de arroz. La concentración máxima de PHA fue 0,661 gL<sup>-1</sup> con *A. lipoferum* y 0,738 gL<sup>-1</sup> con *A. brasilense*, observándose que las bacterias aisladas de tomate alcanzaron una mayor concentración de biomasa y PHA (Baca et al., 2010).



El rendimiento de PHA se investigó en bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azotobacter* aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. “maíz”. Las bacterias se aislaron en el medio sólido sin nitrógeno LG, se identificaron fenotípicamente, se cultivaron en caldo de producción Burk’s modificado, durante 72 horas y se investigó la presencia de gránulos de PHA en las células bacterianas coloreadas con Sudan Negro B. Las bacterias con las que se cuantificó el mayor número de células con gránulos se llevaron a fermentación discontinua con glucosa como fuente de carbono y se determinó el rendimiento Yp/x. Se obtuvieron 130 cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias, entre las que 24,62% se identificó como *Azotobacter* spp. El rendimiento Yp/x fue de 0,608-0,840gg<sup>-1</sup>. Se determinó que *Azotobacter* spp. nativas tienen potencial como productoras de PHA (Jara y Tafur, 2015).

Con la perspectiva de disminuir los costos se investigó el efecto de las brácteas pulverizadas de *Cynara scolymus* “alcachofa” sobre el crecimiento y producción de polihidroxibutirato (PHB) por las bacterias fijadoras de nitrógeno *Azotobacter chroococcum* y *Rhizobium etli* Rf-188. El bioproceso se realizó en medio base 77 líquido con 10% de inóculo, a 30°C. A las 48 horas se agregaron 1,2 y 3% de brácteas pulverizadas y después de 72 horas de incubación se contaron los gránulos de PHB en las células teñidas con Negro Sudan II, se recuperó y pesó el polímero obtenido y se contaron y pesaron las células bacterianas. Con *A. chroococcum* se alcanzaron 231x10<sup>-4</sup> UFCmL<sup>-1</sup>; 0,76gL<sup>-1</sup> de peso celular y 0,71gL<sup>-1</sup> de PHB (93,42%) en comparación con el control con 72x10<sup>-4</sup>; 0,41 y 0,01 respectivamente. Con *R. etli* se alcanzaron 280x10<sup>-4</sup> UFCmL<sup>-1</sup>; 2,90gL<sup>-1</sup> de peso celular y 0,67gL<sup>-1</sup> de PHB (23,10%), en comparación con el control con 126x10<sup>-4</sup>; 0,23 y 0,01% respectivamente. Se demostró la factibilidad de usar brácteas de alcachofa para la producción de PHB (Rubio, 2012).

El alpeorujo o residuo de la agroindustria del aceite de *Olea europea* L. “olivo” fue investigado para la producción de PHA por las bacterias fijadoras de nitrógeno, *Azotobacter chroococcum* y *A. vinelandii* cepas 1 y 2. El 25% de las bacterias que sintetizaron gránulos de PHA teñidos con Sudan Negro B y Azul Nilo II se cultivaron en medio Burk’s sin nitrógeno, alcanzándose 0,56gL<sup>-1</sup> de PHA con *A. chroococcum*. Con adición de NH<sub>4</sub>Cl 0,12% se obtuvieron 2,3gL<sup>-1</sup>

de PHA con *A. vinelandii* (67% del peso de la biomasa), después de 72 horas de incubación. Esta bacteria fue cultivada en alpeorujó previamente digerido en anaerobiosis y suplementado con micronutrientes cuantificándose  $1,063\text{gL}^{-1}$  de PHA, correspondiente a 33% del peso de la biomasa. Se demostró la producción de PHA por *Azotobacter* spp. en el alpeorujó (Cerrone, 2011).

En suelos contaminados con residuos del beneficio de *Furcraea bedinghausi* “fique” se aislaron 248 colonias bacterianas. Se realizaron tinciones con rojo y azul de Nilo y detección por PCR del gen *phaC*. Las bacterias positivas a dichas pruebas fueron identificadas utilizando análisis filogenéticos de secuencias de 16S ADN y pruebas bioquímicas. En cultivos sumergidos con medio mínimo de sales y glucosa como fuente de carbono se obtuvo el polímero, cuya naturaleza se determinó mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS/SJM. El 1,6% de las bacterias presento potencial para producir PHA, identificándose *Bacillus megaterium* (50%), *B. mycoides* (25%) y *Gordonia* sp. (25%). El gen *phaC* se detectó en *B. megaterium* cuantificándose  $63,8\text{-}95,3\text{mgg}^{-1}$  de PHB. Las bacterias aisladas tienen el potencial para la producción de PHA a partir de residuos agroindustriales, dándole un valor agregado y reduciendo su condición contaminante (Sánchez et al., 2012).

En los lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales se realizó una bioprospección para identificar bacterias con potencial para la producción de PHA. Muestras de lodo recirculado o de retorno (LAR) y de licor mixto (lm) o lodo activado del tanque de aireación mezclado con aguas residuales en el tanque de sedimentación, se colectaron, diluyeron y sembraron en Agar Mac Conkey. Las colonias de bacterias no fermentadoras de lactosa se aislaron, se cultivaron en medio mínimo de sales (MSM) con glucosa, a  $30^{\circ}\text{C}$ , durante las 72 horas y se realizaron tinciones de las células con Sudan Negro para observar gránulos de PHA. Se obtuvieron 11 colonias de bacterias no fermentadoras, observándose gránulos en el 45%, con 2-25% de acumulación. Se identificaron *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila* y *Sphingomonas paucimobilis*, considerándose con potencial para la producción de PHA (Arroyave et al., 2013).

La relación entre las variables fisicoquímicas del suelo y la abundancia de bacterias productoras de PHA se investigó en muestras de suelo colectadas en zonas andinas entre 1650 a 3030 msnm. Las muestras se sembraron en medio base suplementado con Nilo Rojo 0,01% (MB). Las colonias de bacterias productoras de PHA con emisión de fluorescencia naranja se sembraron en caldo MB para la producción y recuperación del PHA, polímero que fue caracterizado por cromatografía de gases. El número de bacterias productoras de PHA fue de  $0,78-6,33 \text{ UFC} \times 10^{-6}$  con una absorbancia relativa de 0,63-14,96%. La concentración de PHA fue de 27,50-881,42  $\text{mgL}^{-1}$ , demostrándose que el 71,1% de las bacterias sintetizó PHB y el 28,9% el copolímero Poli (3hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato). Se demostró que la abundancia de bacterias productoras estuvo relacionada con altas concentraciones de carbono y nitrógeno, elevada capacidad de intercambio catiónico y pH ácido (Fernández et al., 2009).

## **2.2 Base teórica**

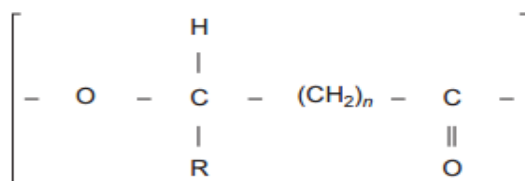
Los bioplásticos son polímeros con propiedades plásticas parecidas a los de un polímero termoplástico, pero no proceden del petróleo, sino de una fuente orgánica renovable y son biodegradables. El protocolo EN13432, establecido por la “Internacional Standard Organization” (ISO), describe las características de un plástico biodegradable. En el ensayo químico, todos los constituyentes deben reducirse a moléculas fácilmente metabolizables, manteniéndose el contenido de metales pesados por debajo del valor umbral. La biodegradabilidad implica que en un medio acuoso, el 90% de todo el material debe ser transformado hasta dióxido de carbono, antes de 6 meses. La desintegrabilidad, se refiere a la fragmentación y pérdida de la visibilidad del residuo después del proceso de compostaje, el material debe estar desintegrado antes de 3 meses, teniendo como máximo 10% de residuos en el tamizado con malla de 2mm y el producto obtenido no deberá reducir el valor agronómico ni presentará efectos ecotóxicos en el crecimiento de las plantas (Cerrone, 2011).

Los polímeros biodegradables se dividen en tres grandes grupos. Un primer grupo procede de cultivos agrícolas o de animales, mencionándose la celulosa, almidón, gluten y caseína. En el segundo grupo se incluyen los

polímeros excluidos de la biomasa, mediante síntesis química. Es el caso del ácido láctico, procedente de la fermentación del almidón de maíz y que se trata químicamente para formar cadenas largas, con una estructura molecular parecida a los derivados del petróleo, denominada ácido poliláctico, PLA. Otro ejemplo es el quitosano, derivado de la quitina, procedente del exoesqueleto crustáceos. El tercer grupo de bioplásticos es el sintetizado por microorganismos o polihidroxialcanoatos (Hernández & Guzmán, 2009).

### 2.2.1 Generalidades de los polihidroxialcanoatos

Los PHA son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos o poliésteres lineales de ácidos (R)-3-hidroxicarboxílicos (R)-HA que algunas Bacteria y Archaea acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlos como fuente de carbono y energía. Los PHA (Figura 1) están compuestos de monómeros de (R)-B-hidroxiácidos, en los cuales el grupo “R” varía desde metil (C<sub>1</sub>) hasta tridecil: C<sub>13</sub> (Gómez, 2013).



**Figura 1.** Estructura química de polihidroxialcanoatos producidos por bacterias (Gómez, 2013).

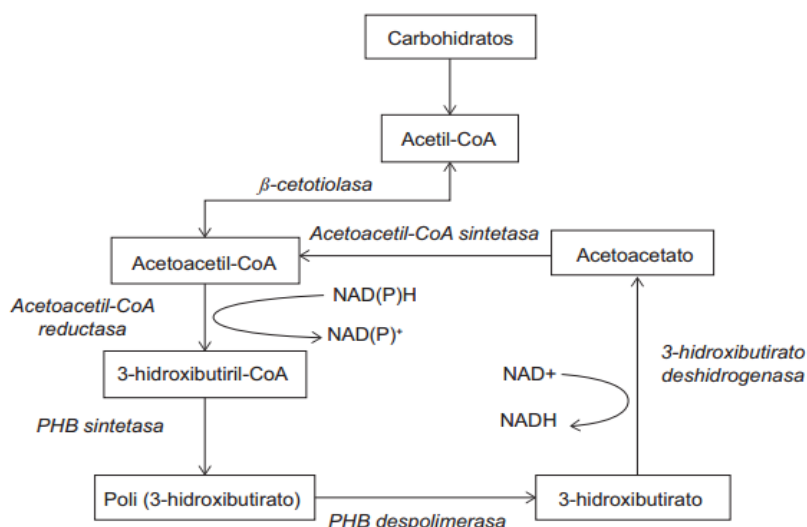
La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos, por acción de enzimas intracelulares tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanoico) con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster: biopoliésteres (Cerrone, 2011; González et al., 2013). Según el número de carbonos en cada monómero, los PHA son de cadena corta (scl, short-chain-length) con 3-5 átomos de carbono (Poli-3-hidroxivalerato [P(3HV)] y el Poli-3-hidroxi butirato [P(3HB)] ; PHA de cadena media (mcl, medium-chain-length) con 6-14 carbonos (copolímero poli-3 (HB-co-HV) y PHA de cadena mixta, que combinan monómeros de cadena corta y cadena media: Poli (3HB-co-3HV-CO-3HHX). También se consideran los PHA de cadena larga (lcl, large chain length), con más de 14 átomos de carbono (Gómez, 2013; González et al., 2013).

Los PHA tienen características físicas similares a los plásticos derivados del petróleo como el polipropileno y polietileno de baja densidad (PEBD). Son poliésteres insolubles en agua, termoplásticos y elastoméricos. La mayoría son polímeros parcialmente cristalinos y por lo tanto sus propiedades térmicas y mecánicas se reportan en términos de la temperatura de transición ( $T_g$ ) o de temperatura de fusión. Las propiedades mecánicas y físico-químicas como rigidez, fragilidad, cristalinidad, elasticidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea y resistencia a solventes orgánicos dependen de la composición monomérica. Son poliésteres en los que la variabilidad reside en la longitud y naturaleza de la cadena lateral de cada monómero, así como en la proporción en cada tipo de monómero se encuentra en el polímero (Fernández, 2012; Becerra, 2013).

Los PHA se definen como biopolímeros de reserva de carbono y energía; relacionados con la adaptación y supervivencia en nichos ecológicos muy competitivos: resistencia a condiciones desfavorables, incluyendo frío y calor, radiación UV, desecación, presión osmótica y diferentes compuestos químicos. También se relacionan con la formación de esporas y quistes, fijación de nitrógeno, formación de biopelículas y en la relación tipo simbiote entre plantas y microorganismos rizosféricos (Fernández, 2012).

Los PHA se acumulan como polímeros líquidos, móviles y amorfos en forma de gránulos, que se alojan en el citoplasma microbiano, rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene polimerasas y despolimerasas (González et al., 2013). Los gránulos de naturaleza hidrofóbica están rodeados por una membrana lipídica, en la que se encuentran ancladas proteínas implicadas en su metabolismo, denominadas GAP: granule associated protein (Fernández, 2012). El número de gránulos por célula se define en las primeras etapas de acumulación y la producción del polímero cesa cuando su contenido alcanza cerca del 80% del peso celular en base seca, concluyéndose que existen restricciones físicas que impiden a la célula acumular más polímeros, a pesar de la disponibilidad del sustrato y actividad de la PHA polimerasa (González et al., 2013).

Los PHA provienen de tres vías metabólicas: degradación de azúcares mediante la obtención de acetil CoA, degradación de ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación) y biosíntesis de ácidos grasos. El proceso metabólico para la producción de PHA de cadena corta a partir de carbohidratos (Figura 2), comienza con el acetil-CoA, en una secuencia de tres reacciones catabolizadas por las enzimas 3-cetotiolasa, acetoacetil-CoA y la poli (3-hidroxibutirato) sintasa. En primer lugar la condensación de dos moléculas de acetil CoA origina acetoacetil CoA mediante un  $\beta$ -cetoacil CoA tiolasa (acetil CoA acetiltransferasa, EC 2.3.1, 9). En esta ruta, el piruvato no va hacia el ciclo de Krebs y es derivado hacia la formación de acetil CoA, el cual es reducido a (R)-3- hidroxibutiril- CoA por una deshidrogenasa dependiente de NADPH (acetoacetil CoA reductasa: hidroxibutiril CoA deshidrogenasa, EC 1.1.1.36). Por último, los monómeros de (R)-3-hidroxibutiril-CoA son polimerizados por la polimerasa de PHB o poli (3-hidroxibutirato) sintasa (Fernández, 2012; Gómez, 2013; González et al., 2013).



**Figura 2.** Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos (González et al., 2013).

Las bacterias productoras de PHA se agrupan según las condiciones para la síntesis del polímero. El primer grupo requiere la limitación de un nutriente esencial (N, P, S, Mg, O<sub>2</sub>) para sintetizar PHA a partir de un exceso de carbono, como es el caso de *Cupriavidus necator*, *Bacillus* spp. *Protomonas extorquens* y *P. oleovorans.*, entre otras. El segundo grupo de bacterias

productoras puede acumular polímeros en grandes cantidades durante la fase de crecimiento. Se incluyen *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* y *E. coli* recombinante (González et al., 2013). Las estrategias de cultivo para la obtención de alta concentración de un producto de interés son: cultivo en lote, lote alimentado y continuo (Cerrone, 2011; Becerra, 2013).

En el cultivo por lote alimentado de bacterias que requieren limitación de algún nutriente para sintetizar PHA, se utiliza un sistema en dos etapas. En la primera, se obtiene una concentración de biomasa deseada sin limitación de nutrientes y en la segunda etapa se promueve la síntesis de PHA, manteniendo en concentración limitante uno de los nutrientes esenciales. En esta segunda etapa la concentración de biomasa sin PHA permanece casi constante y el incremento en biomasa se debe a la acumulación intracelular del polímero. Para el cultivo de bacterias con producción de PHA asociada al crecimiento se puede alcanzar alta productividad en un sistema de lote alimentado en una sola etapa. (Cholula, 2005; González et al., 2013).

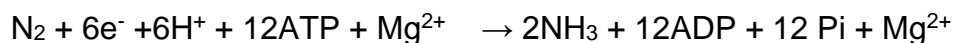
### **2.2.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno**

El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es la única reserva accesible en la biósfera. Representa el 78% de los gases que conforman la atmósfera, sin embargo, no se encuentra disponible para las plantas (Mantilla et al., 2009). El  $N_2$  es una molécula casi inerte debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, cuya ruptura requiere mucha energía, como la proveniente de la radiación ultravioleta y combustibles fósiles (Baca et al., 2000); no obstante, el nitrógeno atmosférico puede ser incorporado al ecosistema a través de la fijación biológica, diazotrofia o reducción a amonio (Menezes, 2009; Pérez et al., 2010).

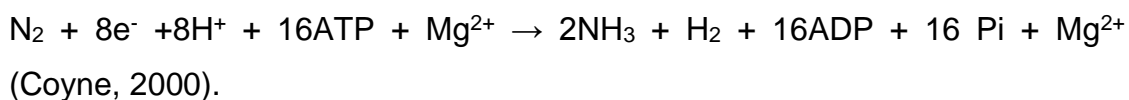
La fijación de nitrógeno es realizada por Eubacterias y Archaeas en una reacción catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa (Baca et al., 2000), compuesto por dos metaloproteínas y tres grupos prostéticos. La proteína I es la dinitrogenasa o “hierro-molibdeno-proteína”. La proteína II es la dinitrogenasa reductasa o “hierro-proteína”. Para su funcionamiento, el complejo enzimático requiere un donador de electrones de bajo potencial, de la hidrólisis de ATP y de un ambiente anaerobio. La proteína II, codificada por el gen *nifH* transporta

los electrones del donador (ferrodoxina o flavodoxina) hacia la proteína I, que reduce la molécula de N<sub>2</sub> (Baca et al., 2000; Altamirano et al., 2014).

La fijación biológica de nitrógeno requiere un gasto considerable de energía. La ecuación es:



Los electrones circulan a través de diversos portadores de electrones y reducen finalmente el nitrógeno: e<sup>-</sup> → Ferrodoxina → Flavodoxina → Proteína del hierro → Proteína del MoFe → N<sub>2</sub>. Cada electrón transferido requiere dos ATP; sin embargo, la nitrogenasa no es del todo efectiva y también reduce otros compuestos como el H<sup>+</sup>, N<sub>2</sub>O, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, CN y C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (acetileno). Por tanto, La ecuación general para la fijación de nitrógeno, catalizada por la nitrogenasa es:



Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas pueden ser de vida libre, asociativa y simbiótica. Las de vida libre son heterótrofas y requieren un ecosistema capaz de brindar una fuente de carbono para la fijación del nitrógeno. Las representantes de este grupo son *Beijerinckia* y *Azotobacter*. Un segundo grupo de bacterias, se asocia con las poáceas, pudiendo ser endófitas facultativas y obligadas. Las endófitas facultativas colonizan tanto el suelo rizosférico como el interior de la raíz, siendo el género *Azospirillum* representante de este grupo. A su vez, las diazotróficas endófitas obligadas, colonizan el interior de las raíces, mencionándose especies de *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* y *Burkholderia* (Garrido, 2007). Por su parte, el tercer grupo de bacterias diazotróficas son las simbióticas, que fijan el nitrógeno en el interior de nódulos, diferenciados principalmente en las leguminosas, incluyendo la familia Rhizobiaceae: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (Calvo, 2011).



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Material biológico**

El material biológico estuvo constituido por muestras de raíces, tallos y suelo rizosférico de espárrago y bacterias fijadoras de nitrógeno.

##### **3.1.2 Población y muestra**

En la primera fase de la investigación la población estuvo constituida por las plantas de espárrago (Figura 3) del fundo Josymar (50ha) en Virú, Trujillo y se investigó una muestra no probabilística de 96 plantas colectadas durante noviembre a diciembre de 2016. El número de muestras fue calculado (Vásquez et al., 2012), tomando en cuenta una prevalencia de 90% (Anexo 1), determinada en un estudio piloto por los investigadores. En la segunda fase de la investigación, la población estuvo constituida por los cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno, productoras de PHA aisladas de raíces, tallos y suelo rizosférico de espárrago y se investigaron diez cultivos de bacterias seleccionadas. En ambas fases, el muestreo fue no probabilístico y por conveniencia (Hernández et al., 2014).

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variables de fase descriptiva**

Variables cuantitativas: Número de células con gránulos de PHA.

##### **3.2.2 Variables de la fase explicativa**

Variables independientes: Cultivos (2) de bacterias productoras de PHA.

Medios de cultivo (2): balanceado y desbalanceado.

Variable dependiente: Concentración de biomasa, concentración de PHA, rendimiento Y (p/x).



**Figura 3.** Plantas de *Asparagus officinalis* L. en Virú, región La Libertad, 2016.

### **3.2.3 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis**

El trabajo de investigación se realizó en dos fases: en la primera fase descriptiva con el diseño “Sólo Después” (Vásquez et al., 2012) se detectaron y seleccionaron las bacterias fijadoras de nitrógeno productoras de gránulos de PHA. En la segunda fase se realizaron dos ensayos uno experimental y otro descriptivo. En el primer ensayo experimental, bajo un diseño completamente aleatorio (DCA) con arreglo factorial  $2 \times 2 + 3$  se investigaron dos factores (Hernández et al., 2014): Cultivo bacteriano (A) con dos niveles (cultivos 1 y 2) y medio de cultivo (B) con dos niveles (balanceado y desbalanceado). Los tratamientos fueron cuatro con tres repeticiones totalizando 12 unidades experimentales (Figura 4). En el segundo ensayo con el diseño “Sólo Después” (Vásquez et al., 2012) se determinó la cinética de la producción de biomasa y PHA por un cultivo bacteriano en un medio seleccionado.

### **3.2.4 Primera fase**

En la primera fase de la investigación se aislaron bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno, se detectaron gránulos de PHA en las bacterias teñidas con Sudan Negro B y se seleccionaron los diez cultivos con el mayor número de células con gránulos de PHA.

#### **a. Lugar de muestreo y obtención de muestras**

Las 96 muestras de raíces, tallos y suelo rizosférico de espárrago se colectaron en el fundo Josymar, ubicado en el lote 10,6 del sector IV, Proyecto Especial Chavín en la provincia de Virú, región La Libertad (Tabla 1). Virú tiene una superficie de 3218,74km<sup>2</sup> y limita por el norte con la provincia de Trujillo, por el este con las provincias de Julcán y Santiago de Chuco, por el sur con la región de Ancash y por el oeste con el océano Pacífico (Municipalidad Provincial de Guadalupe, 2016). El fundo Josymar tiene 50ha, distribuidas en 24 lotes de aproximadamente 1,5ha cada uno. Al momento del muestreo 19 lotes estaban sembrados con espárrago cultivar UC-157 F2 (cuatro plantas por metro lineal), con 1,8-2,5 años transcurridos después del transplante de coronas y una población promedio de 30 000 plantas ha<sup>-1</sup>.

Variables independientes		Cultivo bacteriano (A)	
		1	2
Medio de cultivo (B)	Balanceado	r1	r1
		r2	r2
		r3	r3
	Desbalanceado	r1	r1
		r2	r2
		r3	r3

**Figura 4.** Tratamientos para determinar el rendimiento de biomasa y PHA por dos cultivos bacterianos en medios de cultivo balanceado y desbalanceado.

**Tabla 1.** Lote de procedencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de *Asparagus officinalis* L. en el Fundo Josymar, Virú, La Libertad

Lote	Nº de surcos	Nº de muestras
A1-B1-C1	54	15 (1-15)
A2-B2-C3	61	15 (16-30)
A3-B3-C3	62	15 (31-45)
A4-B4-C4	63	15 (46-60)
C5	56	5 (61-65)
A6-B6-C6	64	15 (66-88)
C7	49	5 (81-85)
C8	55	6 (86-91)
C9	51	5 (92-96)
Total: 19 lotes	515	96

En el campo de cultivo de espárrago, cada cinco surcos se seleccionó la planta más vigorosa y se extrajeron aproximadamente 50g de raíces con suelo adherido, se depositaron en bolsas de polietileno debidamente identificadas e inmediatamente se transportaron en una caja térmica ( $10\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) hacia el Laboratorio de Microbiología y Parasitología: Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo en Lambayeque.

#### **b. Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno**

Las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno microaerófilas se aislaron de las raíces y tallos desinfectados superficialmente (Pérez et al., 2010; Altamirano et al., 2014). Las raíces fueron lavadas con agua potable para retirar el suelo adherido. Para la desinfección las raíces y tallos, se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5cm, se pesaron 5g y se depositaron en frascos de 500mL de capacidad, con tapa, previamente esterilizados, para ser lavados con 50mL de agua destilada más detergente neutro 0,005% por 1 minuto y enjuagados por cuatro veces consecutivas con agua destilada esterilizada, a razón de 1 minuto por enjuague.

Después de la desinfección las raíces se agitaron por 15 minutos en solución tampón de fosfato de potasio  $0,05\text{molL}^{-1}$ , pH 7.0; se sometieron a inmersión por 1 minuto en alcohol 70% y agitación por 5 minutos en solución de hipoclorito de sodio (NaCl) 5% más Tween 80%. A continuación, el tejido fue llevado a nuevos frascos previamente esterilizados, para la inmersión por 1 minuto en alcohol 70%, seguida de agitación por 15 minutos en solución tampón y finalmente, lavado por cuatro veces con agua destilada esterilizada.

Para verificar la desinfección de la superficie de las raíces (Pérez et al., 2010), alícuotas del último lavado fueron sembradas en agar nutritivo e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. El tejido vegetal previamente desinfectado fue depositado en papel secante para eliminar el exceso de humedad y luego fue llevado a bolsas de polietileno de 15x16cm, donde fue macerado y resuspendido en 0,5mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v), en caso de ser necesario. Con una jeringa se extrajo 1mL, sembrándose inmediatamente una gota por doble puntura en los medios de cultivo semisólidos sin nitrógeno (Figura 5, anexo 2): NFb y LGI para

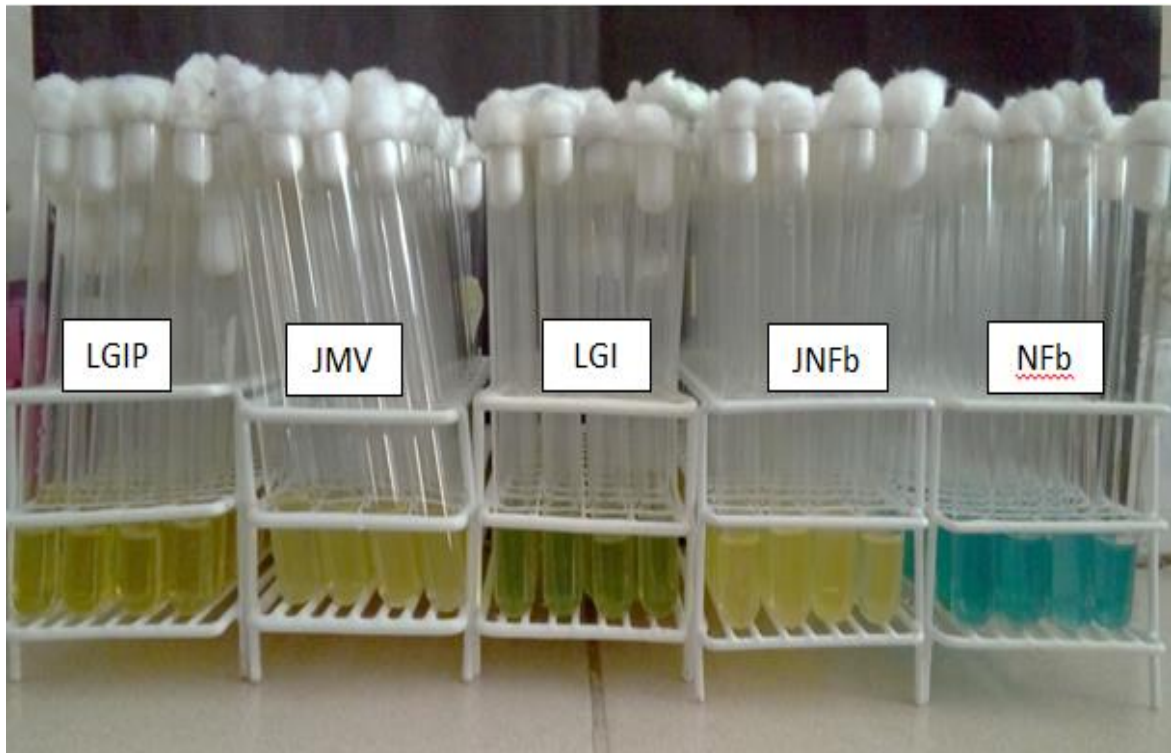
*Azospirillum* spp., JNFb para *Herbaspirillum* spp., LGI-P para *Gluconacetobacter* spp. y JMV para *Burkholderia* spp. (Garrido, 2007; Jha et al., 2009).

Después de la incubación a  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 7 días, se seleccionaron los medios donde se observó una película blanquecina bajo la superficie y el viraje del indicador (Figura 6) y se realizaron subcultivos en similares medios por dos veces consecutivas: primer y segundo subcultivo. Para el aislamiento de bacterias microaerófilas, con la película bacteriana se obtuvo una suspensión en solución salina esterilizada y se sembró en los medios sólidos respectivos, incubando a  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Los diversos morfotipos de las bacterias aisladas se cultivaron nuevamente en medio semisólido (tercer subcultivo) y posteriormente en el medio sólido correspondiente contenido en placa de Petri y luego en vial.

### **c. Aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno**

Las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias y microaerófilas se aislaron (Garrido, 2007; Altamirano et al., 2014) de las raíces con suelo rizosférico previamente deshidratadas bajo sombra, durante 72 horas. Las raíces fueron fragmentadas (5cm), aleatoriamente se tomaron 10g de raíces junto con el suelo adherido y se depositaron en frascos de 500mL de capacidad, conteniendo 90mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85% p/v). Después de agitar manualmente durante 10 minutos, los frascos conteniendo la suspensión de raíces y suelo en solución salina, se tomaron alícuotas (una gota) y se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría sobre la superficie de medios sólidos sin nitrógeno, para aislar bacterias aerobias (Figura 7) y mediante la técnica de puntura en medios semisólidos sin nitrógeno, para aislar microaerófilas (Figura 8). Ambos medios, sólidos y semisólidos, fueron suplementados con antimicótico.

Las bacterias aerobias fueron aisladas en los medios de cultivo sólidos (Anexo 2) LG para *Azotobacter*, LGD para *Derxia* y BEIJ para *Beijerinckia* spp. (Garrido, 2007; Jha et al., 2009). Después de la incubación a  $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 2 días, con los morfotipos de las bacterias representativas se obtuvieron suspensiones en solución salina esterilizada y se sembraron en los medios sólidos respectivos y posteriormente en agar papa.



**Figura 5.** Medios semisólidos sin nitrógeno para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno.



**Figura 6.** Película blanquecina y viraje del indicador por bacterias microaerófilas fijadoras de nitrógeno en medios semisólidos.





**Figura 7.** Siembra en medio sólido mediante la técnica de agotamiento y estría.



**Figura 8.** Siembra en medio semisólido mediante la técnica de puntura.



Las bacterias microaerófilas fueron aisladas de manera similar a la explicada en bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno. Las colonias de bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno se cultivaron en agar nutritivo a 30°C, durante 24 horas, se realizaron tinciones de Gram y de esta manera se obtuvieron los cultivos puros que se guardaron en refrigeración (8°C).

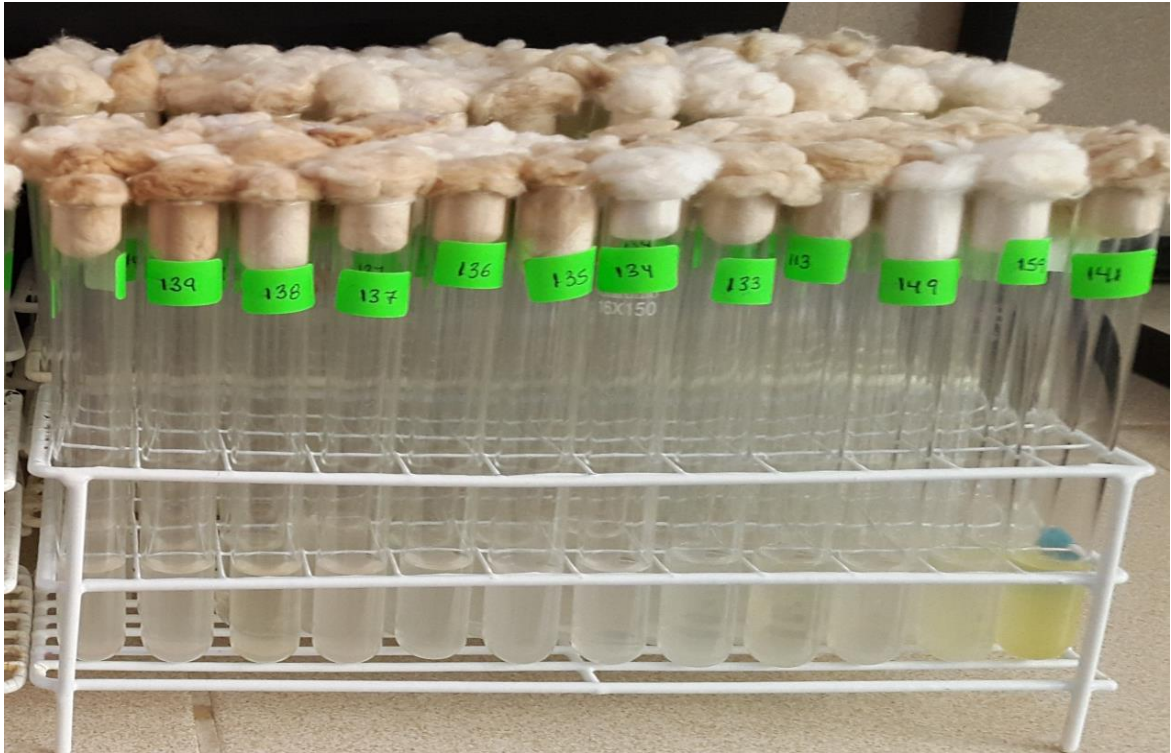
#### **d. Detección, preselección e identificación de bacterias productoras de gránulos de PHA**

Las bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno se cultivaron por triplicado en 5mL de caldo (Figura 9) para la producción de PHA: Caldo fermentación con glicerol como fuente de carbono (Becerra, 2013, anexo 3), a 30°C en aerobiosis, con agitación constante (125rpm). A las 24 y 48 horas se tomaron alícuotas de los caldos cultivados, se realizaron extensiones en láminas portaobjetos y se fijaron al calor (frotis), se colorearon con Sudan Negro B (Figura 10, anexo 3), calentando durante 30 segundos hasta antes de la emisión de vapores (Figura 11). Después de 15 minutos se decoloraron (Figura 12) con xilol (20 segundos), se secaron a temperatura ambiente (25 a 28°C) y se colorearon con safranina (Figura 13) durante 1 minuto (Cerrone, 2011).

La presencia de gránulos grisáceos en el interior de las células bacterianas rosadas se consideró positivo para la detección de gránulos de PHA (Baca et al., 2010). Se cuantificó el número de células con gránulos de PHA en cinco campos microscópicos por cultivo bacteriano y se preseleccionaron e identificaron los diez cultivos con el mayor número de células con gránulos de PHA por campo microscópico.

#### **e. Identificación fenotípica de bacterias**

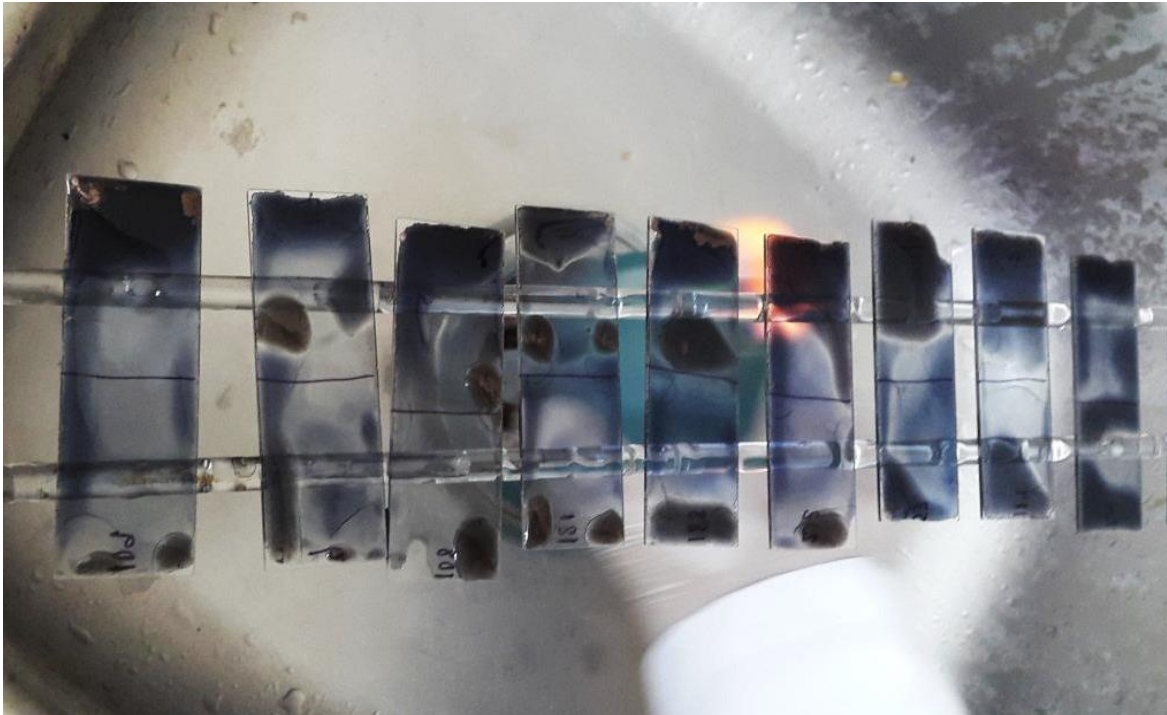
La identificación del género de los diez cultivos de bacterias seleccionadas se realizó en función a las características morfológicas y fisiológicas, según el Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa (Holt et al., 1994; Schoebitz, 2006; Garrido, 2007). Con todas las bacterias se realizaron pruebas de catalasa, oxidasa, motilidad y la utilización de glucosa, manitol, sacarosa como fuentes de carbono para la fijación de nitrógeno.



**Figura 9.** Bacterias endófitas y rizosféricas cultivadas en caldo fermentación.



**Figura 10.** Tinción de bacterias con Sudan Negro B.

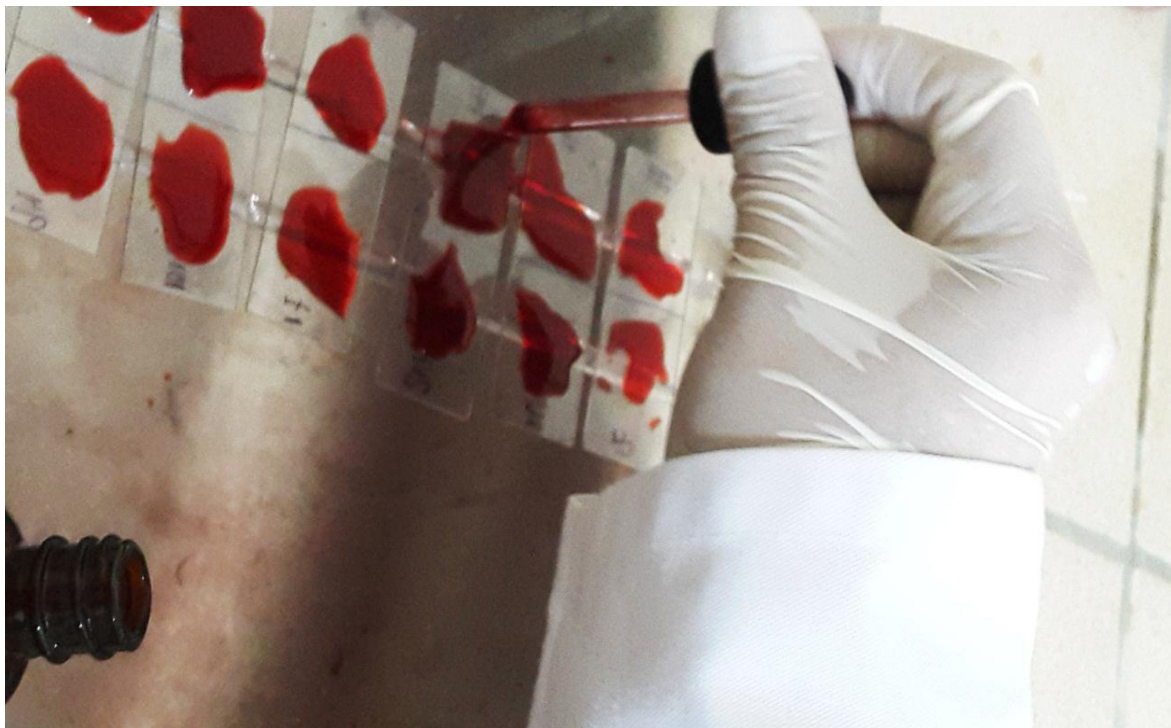


**Figura 11.** Calentamiento de bacterias sin emisión de vapores.



**Figura 12.** Decoloración de bacterias con xilol.





**Figura 13.** Tinción de bacterias con safranina.

Adicionalmente para *Azospirillum* se realizaron pruebas de hidrólisis de la urea, gelatina y reducción de nitratos y para *Herbaspirillum* pruebas de hidrólisis de la urea y crecimiento en caldo NFb. En la identificación de *Gluconacetobacter* se realizaron pruebas de hidrólisis de la urea, gelatina, almidón y reducción de nitratos y para *Burkholderia* pruebas de hidrólisis de gelatina, descarboxilación de lisina y resistencia a la Polimixina B (Altamirano et al., 2014).

**f. Determinación del tiempo requerido para alcanzar el mayor número de células de gránulos de PHA**

Las bacterias preseleccionadas se cultivaron en el caldo fermentación con glicerol como fuente de carbono, a 30°C, durante 24 horas, con agitación constante (125rpm) y se inocularon (10% v/v) en matraces (Figura 14) con 180mL de caldo (Becerra, 2013). La incubación se realizó en similares condiciones y a las 12, 24, 36, 48 y 60 horas se tomaron alícuotas para colorearlas con Sudan Negro B y determinar el tiempo requerido para alcanzar el mayor número de células con gránulos de PHA (Flores e Idrogo, 2015), seleccionándose para la siguiente fase experimental de la investigación dos cultivos de bacterias con el menor tiempo.

**3.2.4 Segunda fase**

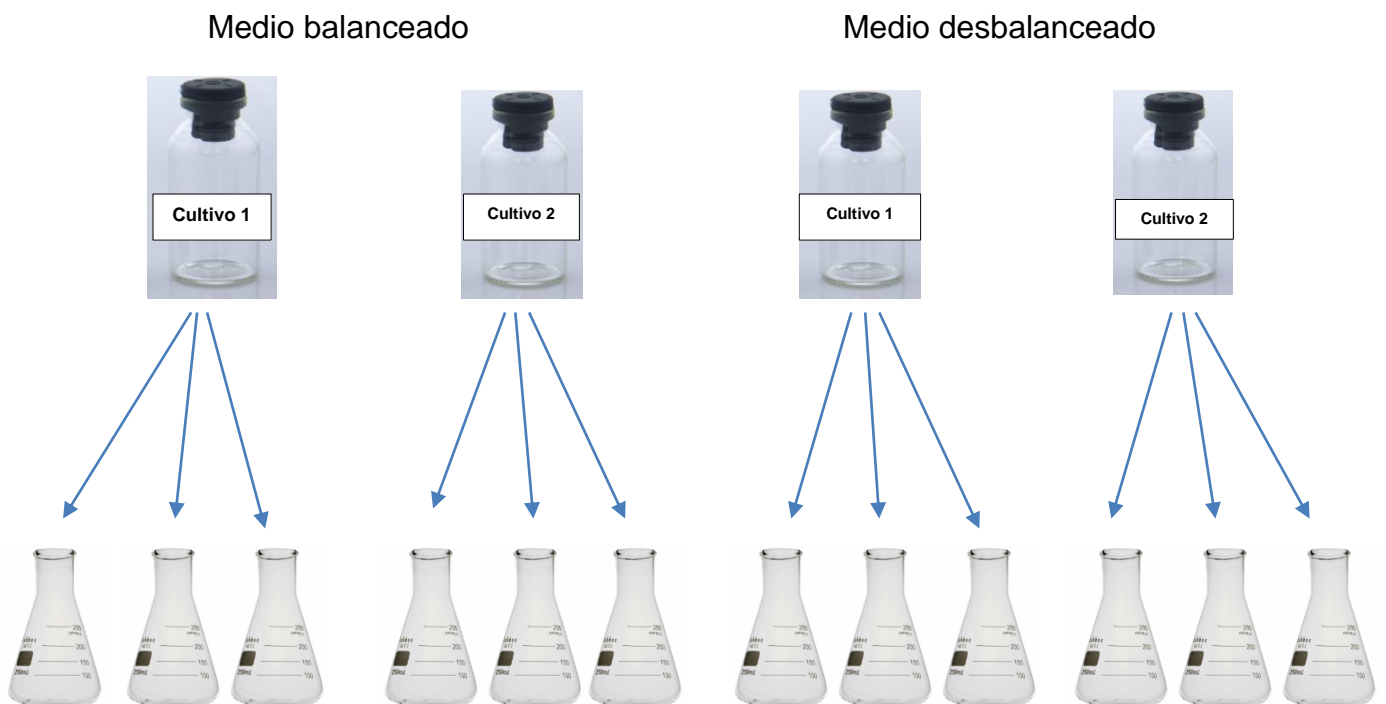
En la segunda fase de la investigación se realizaron dos ensayos: uno para seleccionar el cultivo bacteriano y el medio de producción de biomasa y PHA más adecuados y el otro para determinar la cinética de la producción de biomasa y PHA con el cultivo bacteriano y medio de cultivo seleccionados.

**a. Rendimiento de biomasa y PHA por dos cultivos bacterianos en medios balanceado y desbalanceado**

El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorio (DCA), con arreglo factorial 2x2+3, investigando dos variables independientes: correspondientes al cultivo bacteriano (A), con dos niveles 1 y 2 y medio de cultivo (B), con dos niveles: balanceado y desbalanceado. Los tratamientos fueron cuatro con tres repeticiones, totalizando 12 unidades experimentales (Figura 15).



**Figura 14.** Bacterias productoras de gránulos de PHA cultivadas en caldo fermentación.

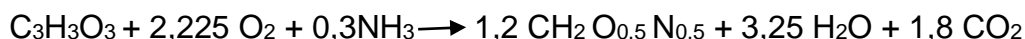


**Figura 15.** Esquema del ensayo para determinar el rendimiento de biomasa y PHA por dos cultivos bacterianos en medios balanceado y desbalanceado.

### **a.1 Obtención de la curva patrón para la cuantificación de biomasa y PHA**

Las bacterias productoras de gránulos de PHA seleccionadas se cultivaron por triplicado en los medios de fermentación balanceado y desbalanceado durante 36 horas.

Según (Becerra, 2013), asumiendo un rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) en biomasa del 40% a partir del glicerol ( $5\text{gL}^{-1}$ ), se plantea la ecuación:



Dónde: Por cada mol de carbono se necesitan 0,1 moles de nitrógeno en un medio balanceado. De esta manera, en el medio balanceado la relación C/N es de 10 con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :  $1,08\text{gL}^{-1}$  y en el medio desbalanceado la relación C/N es de 20 con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :  $0,54\text{gL}^{-1}$ .

Para la obtención del inóculo cada bacteria se cultivó en 2mL del medio correspondiente a  $30^\circ\text{C}$ , durante 24 horas y posteriormente en 70mL del mismo medio a  $30^\circ\text{C}$ , durante 24 horas (Guzmán et al., 2017). El inóculo (10%: 20mL) se depositó en matraces de 250mL de capacidad, conteniendo 180mL del caldo correspondiente (Figura 16) y se incubó a  $30^\circ\text{C}$ , durante 36 horas con agitación manual durante 10 minutos, cada 4 horas. Después, se tomaron por triplicado muestras de 2mL, (Figura 17) uno para determinar la absorbancia en el espectrofotómetro de luz visible (Model Tenso Med NV-203) a 600nm (tubo 1) y otro para realizar diluciones decimales hasta  $10^{-3}$  (tubos 2, 3, 4), a los que también se les determinó la absorbancia.

Los 194mL restantes de cada uno de los caldos de cultivo se centrifugaron (Model GT 119-200) a 3000 rpm, durante 15 minutos (Guzmán et al., 2017). El sedimento o biomasa se lavó una vez con solución salina ( $\text{NaCl}$  0,85% p/v) esterilizada, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos y deshidrató en la estufa (HINOTEK GRX-9023<sup>a</sup> Model), a  $45^\circ\text{C}$ , hasta obtener un peso constante (Baca et al., 2010).





**Figura 16.** Inoculación de bacterias en medio de fermentación.



**Figura 17.** Extracción de muestra de medio cultivado con bacterias.



La biomasa deshidratada se pesó en una balanza de precisión (Digital Scale, 500g x 0,01g) y el valor obtenido se expresó en gramos por litro ( $\text{gL}^{-1}$ ), correspondiendo a la absorbancia del tubo 1. Asimismo, el valor de la biomasa se dividió entre 10, 100, 1000, equivalentes a la absorbancia de los tubos 2, 3 y 4 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ). Con los valores obtenidos se determinó la ecuación de regresión, para calcular la biomasa de cada cultivo bacteriano.

### **a.2 Proceso fermentativo**

En el proceso fermentativo (Becerra, 2013), el inóculo (10%: 20mL) de las bacterias investigadas se llevó por triplicado a matraces de 250mL en 180mL del caldo de cultivo correspondiente, incubándose a 30°C, durante 36 horas, con agitación manual, durante 10 minutos, cada 4 horas.

A partir de la inoculación (0 horas) y cada 4 horas, hasta por 36 horas se tomaron por triplicado muestras de 1mL, para determinar la absorbancia (Figura 18) en el espectrofotómetro de luz visible (Model Tenso Med NV-203), a 600nm y los valores de la biomasa se calcularon en la ecuación de regresión de la curva patrón entre absorbancia y biomasa previamente obtenida.

Para cuantificar el PHA, los 190mL restantes del caldo cultivado a las 36 horas, se centrifugaron a 3000rpm durante 15 minutos. La biomasa celular obtenida, se lavó una vez con solución salina (NaCl 0,85% p/v), se centrifugó y deshidrató en estufa a 45°C, hasta obtener un peso constante, el cual se determinó con una balanza de precisión (Digital Scale, 500g x 0,01g). Con la biomasa (Figura 19), se recuperó el PHA producido por cada bacteria. Según el protocolo de Law & Slepecky (1961), descrito por Cholula (2005), en el tubo con la biomasa deshidratada se agregó 1mL de hipoclorito de sodio al 5%, para debilitar la membrana celular y facilitar el proceso extracción (Figura 20).

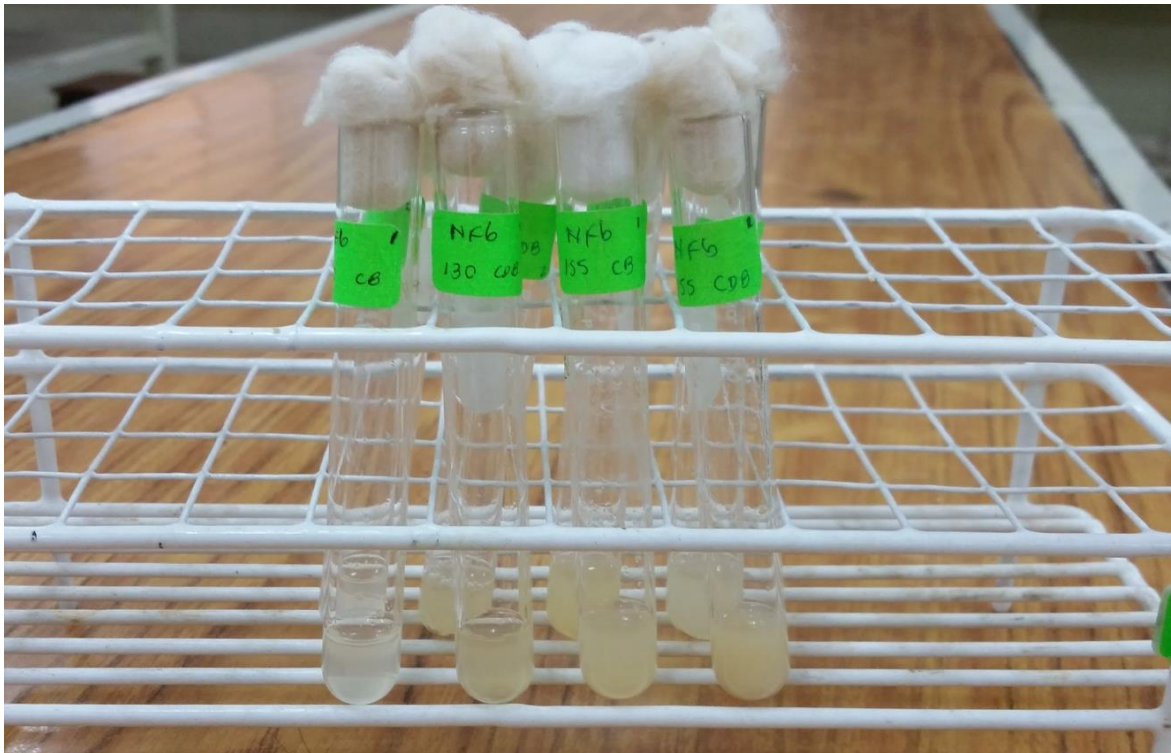
Después de 2 horas, se adicionó 1mL de cloroformo, para separar la biomasa del polímero, observándose dos fases: una inferior transparente y una superior amarillenta (Figura 21). Transcurridos 20 minutos los tubos se centrifugaron a 3500rpm, durante 5 minutos y nuevamente se observaron dos fases (Figura 22), una superior constituida por hipoclorito con restos celulares y una inferior conteniendo el cloroformo con el polímero PHA.



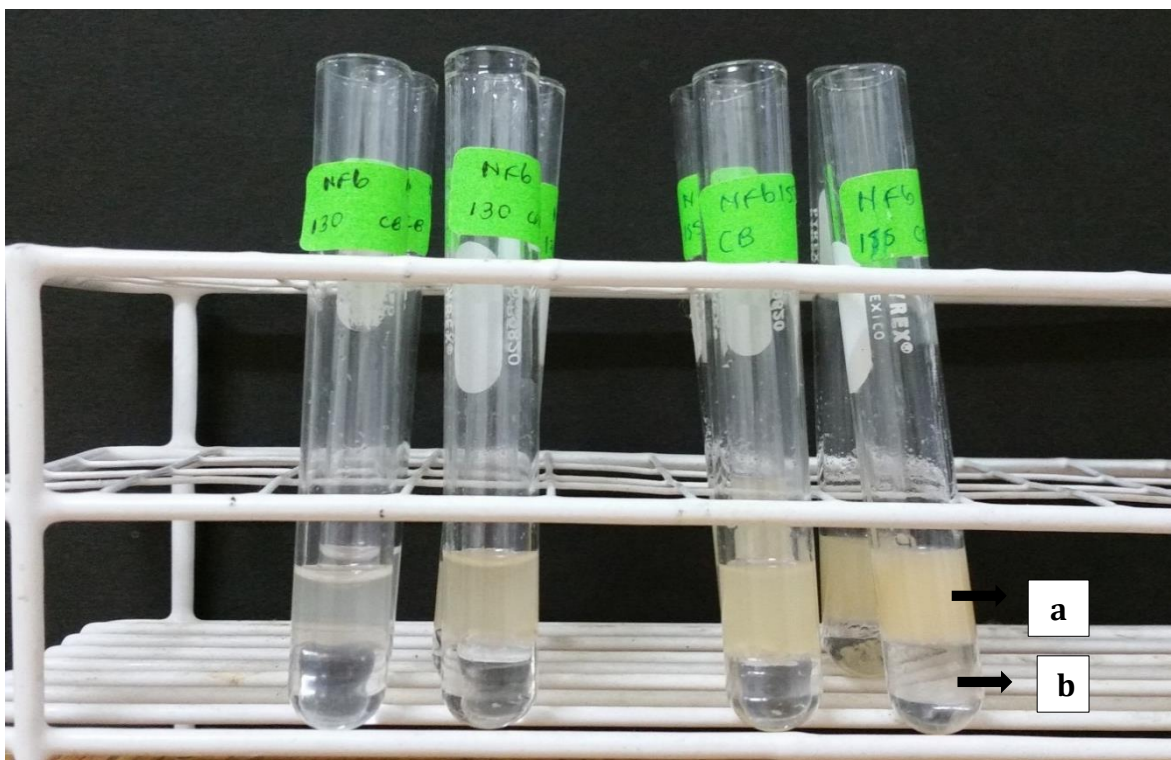
**Figura 18.** Lectura de absorbancia en espectrofotómetro de luz visible.



**Figura 19.** Biomasa de bacterias productoras de polihidroxicanoatos

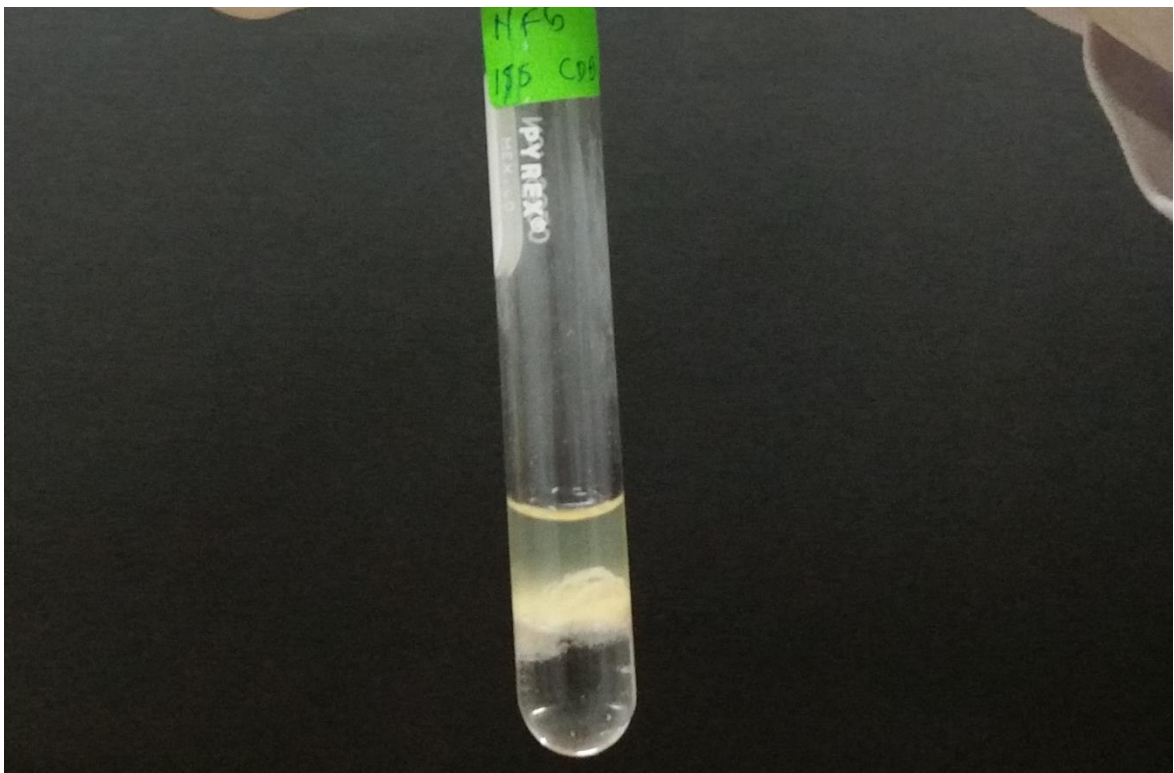


**Figura 20.** Biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio.



**Figura 21.** Biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio(a) y cloroformo (b).





**Figura 22.** Observación de dos fases en biomasa bacteriana tratada y centrifugada.

Con una pipeta Pasteur se extrajo el cloroformo con el polímero (Figura 23), se depositó en un tubo de 10x100mm, previamente pesado ( $P_i$ ) en una balanza de precisión y se llevó a estufa a 40°C, por tiempo suficiente para la evaporación del cloroformo. El tubo conteniendo el PHA se pesó ( $P_f$ ) y la diferencia entre este peso menos el peso inicial ( $P_i$ ) constituyó el PHA obtenido (Figuras 24, 25).

Para verificar la naturaleza del polímero obtenido, las muestras se diluyeron en 1,5mL de  $H_2SO_4$  80%, se calentaron por 30 minutos a 90°C en baño maría, se enfriaron a temperatura ambiente (28°C), se depositaron en celdas de cuarzo y se realizó un “barrido” en el espectrofotómetro de luz ultravioleta UNICO S-2150, en el rango de 220 a 250nm. La absorbancia de un pico máximo a 235nm fue considerada positiva para el PHA. A continuación, se leyó la absorbancia de cada muestra de PHA investigado a 235nm (Guzmán et al., 2017).

### **a.3 Cálculo del rendimiento de PHA**

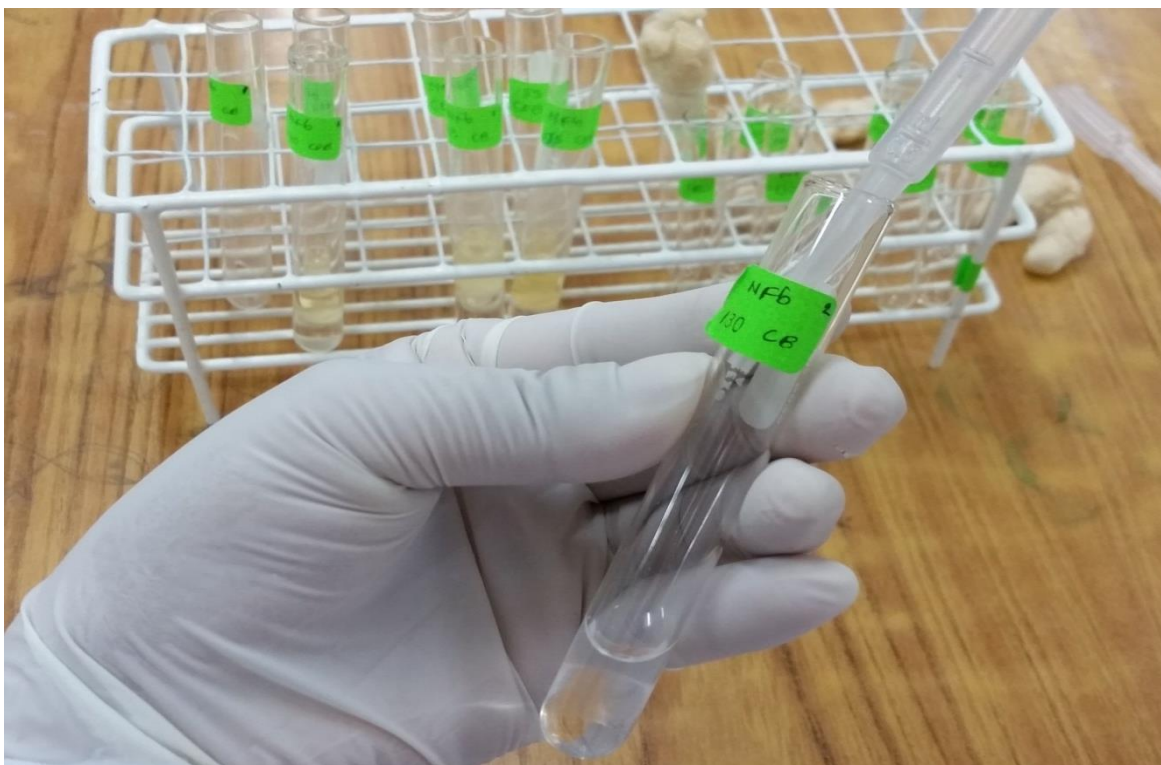
El  $Y(p/x)$  es el coeficiente de rendimiento del producto en relación a la biomasa o cantidad del producto obtenido por cantidad de biomasa formada ( $gg^{-1}$ ) y se calculó dividiendo los gramos de PHA entre los gramos de biomasa (Doran, 1998):

$$Y\left(\frac{p}{x}\right) = \frac{P - P_o}{X - X_o} = \frac{P}{X}$$

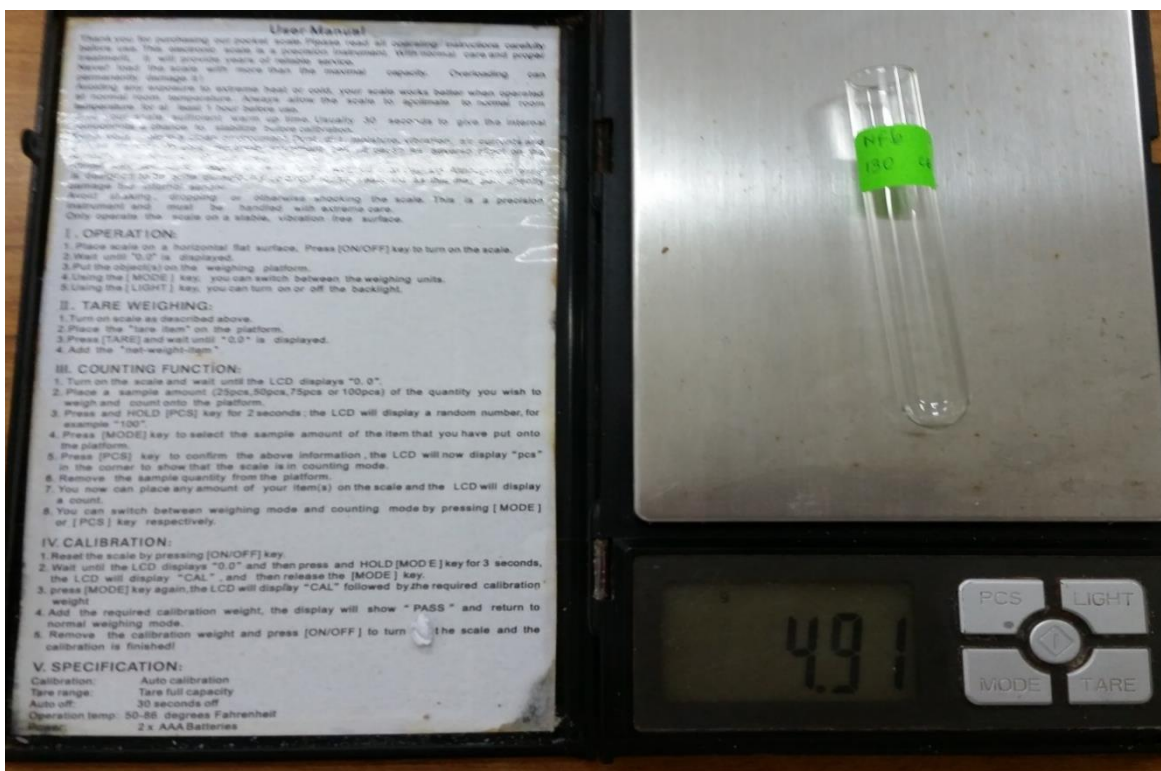
El cultivo bacteriano y el medio de cultivo con los que se alcanzaron el mayor rendimiento  $Y(p/x)$  se seleccionaron para determinar la cinética de la producción.

### **b. Cinética de la producción de biomasa y PHA**

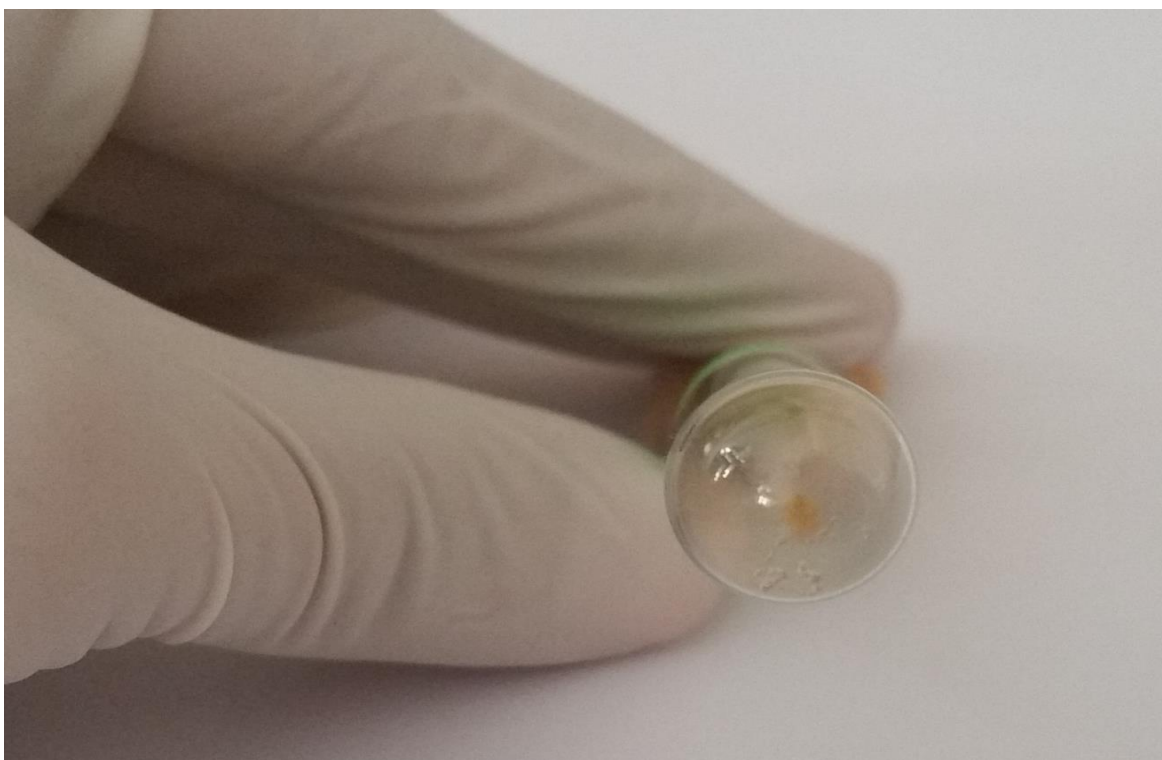
El proceso fermentativo para determinar la cinética de la producción de biomasa y PHA por el cultivo bacteriano en el medio de cultivo seleccionado se realizó de manera similar a lo explicado en el ítem a.2, pero se colectaron muestras de 40mL, por triplicado a las 0, 8, 16, 24 y 32 horas para cuantificar la biomasa y PHA obtenidos y posteriormente se calculó el rendimiento  $Y(p/x)$ .



**Figura 23.** Extracción del cloroformo conteniendo el polihidroxialcanoato.



**Figura 24.** Pesado del tubo de ensayo conteniendo el polihidroxialcanoato.



**Figura 25.** Polihidroxiálcanoato adherido en el fondo del tubo de ensayo.

### 3.2.5. Análisis estadístico

Los valores de la concentración de biomasa, PHA y rendimiento de las bacterias fueron ordenados en tablas para realizar las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas. El análisis de varianza determinó las diferencias entre los tratamientos y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey la significancia entre ellos (Hernández et al., 2014).

La hipótesis para el factorial 2x2+3 fueron:

Factor cultivo bacteriano (A)

$$H_0 = \mu A_1 = \mu A_2$$

$$H_0 = \mu A_1 \neq \mu A_2$$

Factor medio de cultivo (B)

$$H_0 = \mu B_1 = \mu B_2$$

$$H_0 = \mu B_1 \neq \mu B_2$$

Interacción cultivo bacteriano – medio de cultivo (AXB).

$$H_0 = \text{Al menos una media es diferente.}$$

En la presente investigación se utilizaron los programas Microsoft Office Word, Microsoft Office Excel 2013 y el software estadístico SPSS versión 15.0.



## **IV. RESULTADOS**

### **4.1 Bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de espárrago**

Las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas de raíces, tallos y suelo rizosférico de espárrago se aislaron en medios de cultivo sin nitrógeno, obteniéndose 427 cultivos puros (Figura 26). El 51,1% (218) de las bacterias diazotróficas fueron rizosféricas y el 48,9% (209) endófitas (Figura 27). Entre las rizosféricas el 49,1% (107) correspondió a bacterias aerobias y el 50,9% (111) a microaerófilas. Las endófitas fueron microaerófilas. Las bacterias aerobias diazotróficas se reconocieron por el desarrollo de colonias en medios sólidos sin nitrógeno y las bacterias microaerófilas por la formación de una película subsuperficial en medios semisólidos (Figuras 28, 29).

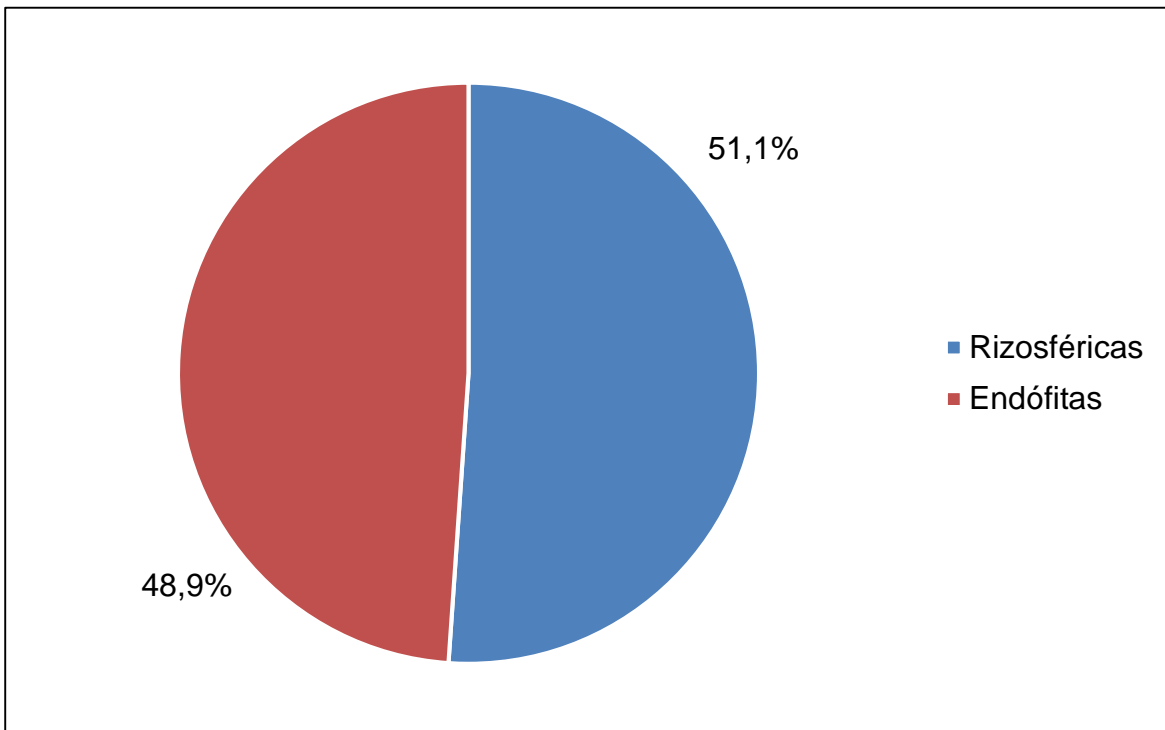
### **4.2 Bacterias productoras de gránulos de PHA**

El 57,6% (246) de bacterias fijadoras de nitrógeno desarrolló en el caldo fermentación, evidenciándose turbidez desde las 24 horas; correspondiendo el 65,9% (162) a bacterias Gram negativas y el 34,1% (84) a bacterias Gram positivas. En el 98,4% (242) de los cultivos de bacterias que desarrollaron en el caldo fermentación se observaron gránulos de PHA teñidos con Sudan Negro B, entre las 24 y 48 horas (Figuras 30, 31), tal que 56,67% (242) de las bacterias fijadoras de nitrógeno se reconocieron como productoras de gránulos de PHA.

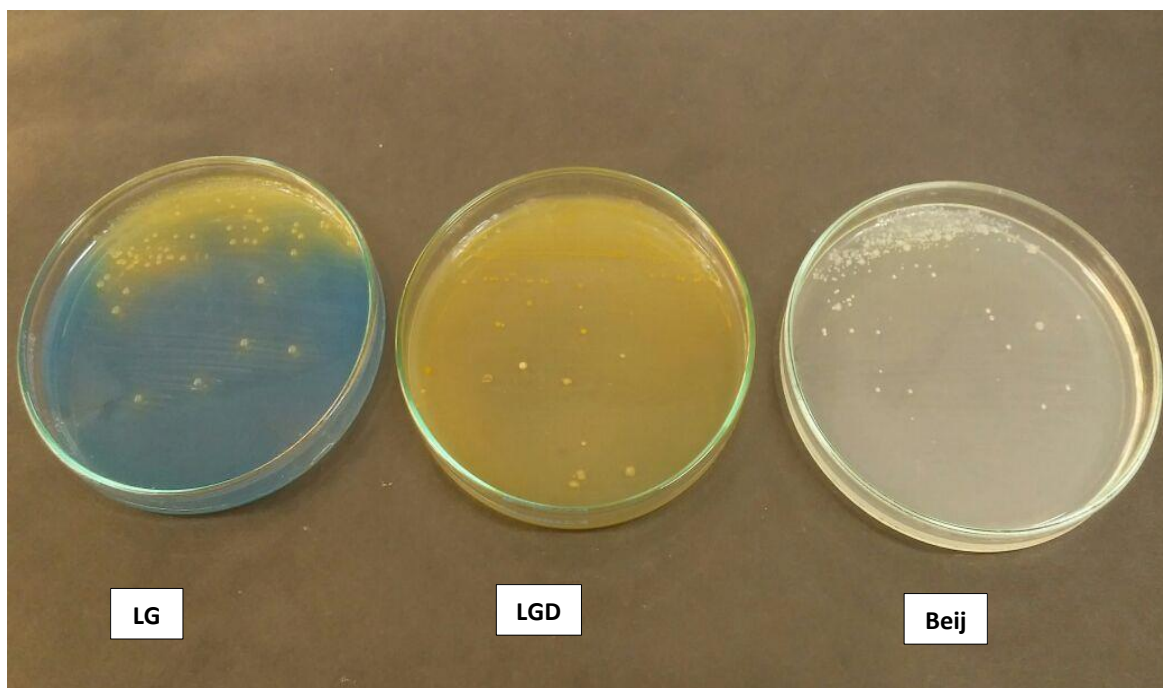
El rango en el número de células con gránulos de PHA por campo microscópico en las bacterias Gram negativas fue de 1 a 248 a las 24 horas y de 1 a 247 a las 48 horas (Tabla 2, anexo 4). En las bacterias Gram positivas el rango fue de 1 a 183 a las 24 horas y 1 a 173 a las 48 horas (Tabla 3, anexo 5).



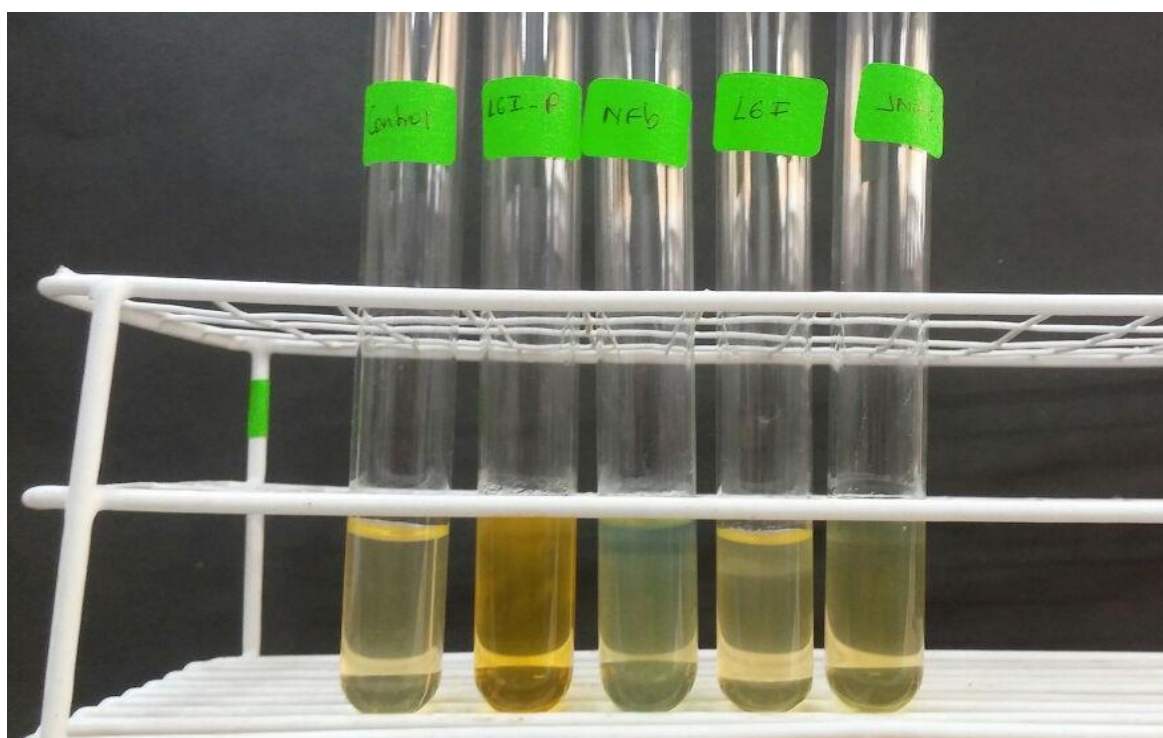
**Figura 26.** Cultivos puros de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L, 2016.



**Figura 27.** Frecuencia de bacterias fijadoras de nitrógeno rizosféricas y endófitas aisladas de *Asparagus officinalis* L, 2016.



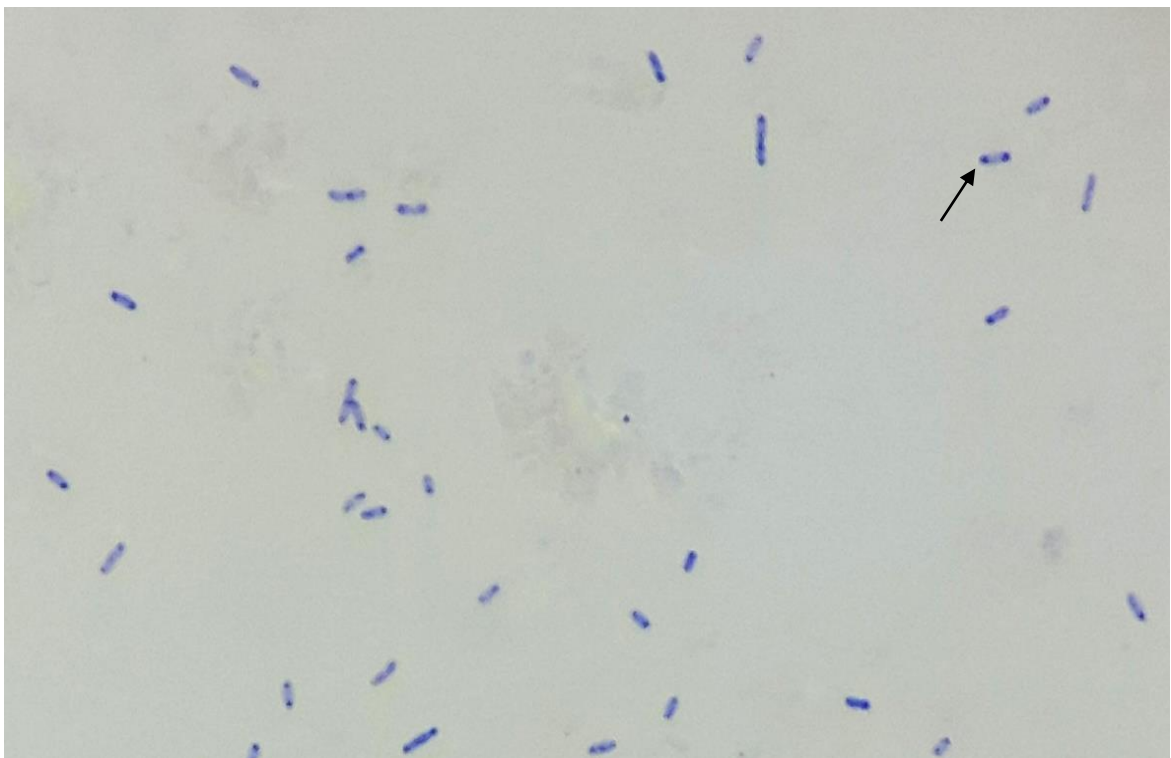
**Figura 28.** Colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno desarrolladas en medios sólidos.



**Figura 29.** Película subsuperficial desarrollada por bacterias fijadoras de nitrógeno en medio semisólido.



**Figura 30.** Gránulos de PHA en bacterias Gram negativas.



**Figura 31.** Gránulos de PHA en bacterias Gram positivas.

**Tabla 2.** Rango del número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram negativas teñidas con Sudan Negro B a las 24 y 48 horas

Rango del número de células con gránulos de PHA	Cultivos de bacterias			
	24 horas		48 horas	
	Nº	(%)	Nº	(%)
1 – 50	78	48,1	59	36,4
51 – 100	38	23,5	49	30,2
101 – 150	21	12,9	25	15,4
151 – 200	15	9,3	20	12,3
201 – 248	4	2,5	6	3,7

**Tabla 3.** Rango del número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram positivas teñidas con Sudan Negro B a las 24 y 48 horas

Rango del número de células con gránulos de PHA	Cultivos de bacterias			
	24 horas		48 horas	
	Nº	(%)	Nº	(%)
1 – 50	58	69,0	50	59,5
51 – 100	16	19,0	26	30,9
101 – 150	4	4,8	6	7,1
151 – 183	1	1,2	1	1,2

#### **4.3 Bacterias productoras de gránulos de PHA preseleccionadas e identificadas fenotípicamente**

Las bacterias fijadoras de nitrógeno y productoras de gránulos de PHA, preseleccionadas correspondieron a las endófitas NFb 155, NFb 130, JNFb 135, NFb 149, NFb 102, JNFb 151, NFb 350, JNFb 152, rizosférica microaerófila JMV 238 y rizosférica aerobia LG 86. En la identificación fenotípica el 50% de estas bacterias correspondió al género *Azospirillum* sp., el 30% a *Herbaspirillum* sp., 10% a *Azotobacter* sp. y 10% a *Burkholderia* sp., cuantificándose 170 a 248 gránulos de PHA a las 24 horas y 190 a 247 gránulos de PHA a las 48 horas (Tablas 4, 5).

En el cultivo de las bacterias productoras de gránulos de PHA preseleccionadas, el tiempo en el que se cuantificó el mayor número de células con gránulos de PHA o tiempo óptimo de incubación (Tabla 6) fue de 24 horas (*Azospirillum* sp.350; *Herbaspirillum* spp.151, 152 y *Burkholderia* sp.238) a 36 horas (*Azospirillum* spp.155, 130, 149, 102; *Herbaspirillum* spp.135 y *Azotobacter* sp.86). Transcurrido este tiempo, el número de células con gránulos de PHA disminuyó (Anexo 6). Los cultivos de *Azospirillum* spp.155 y 130 se seleccionaron para obtener la biomasa y PHA, debido a que presentaron el mayor número de células con gránulos de PHA.

#### **4.4 Biomasa y PHA producidos por *Azospirillum* spp. en dos medios de cultivo**

Con los valores de absorbancia obtenidos por triplicado con diferentes concentraciones de biomasa de *Azospirillum* spp.130 y 155 en los medios de cultivo balanceado y desbalanceado, se obtuvieron doce ecuaciones (Anexo 7), entre las que se seleccionaron las cuatro que presentaron los mayores valores en el coeficiente de determinación (Tablas 7, 8, figuras 32, 33, anexo 8), manteniendo como patrón de referencia  $R^2 > 0,9$  (Mantilla, 2007).

En el proceso fermentativo, la absorbancia de la biomasa de *Azospirillum* sp.130 osciló entre 0,059 y 0,103 en el medio balanceado, así como 0,067 y 0,130 en el medio desbalanceado (Tabla 9), valores correspondientes a 0,03125 a 0,23346gL<sup>-1</sup> y 0,05757 a 0,30100gL<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 10, figura 34).



**Tabla 4.** Características fenotípicas diferenciales de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia* y *Herbaspirillum* spp.

Características	<i>Azospirillum</i> spp.	<i>Azotobacter</i> spp.	<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Herbaspirillum</i> spp.
Células	Pleomórficas	Bacilos	Bacilos rectos	Bacilos curvos
Tinción de Gram	-	-	-	-
Motilidad	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+/-
Oxidasa	+	+	+	+
Hidrólisis de la úrea	+			+/-
Hidrólisis de gelatina	-/+		+	
Reducción de nitratos	+	+		
Utilización de citrato		+/-		
Crecimiento en 1% peptona		-		
Producción de indol		-		
Descarboxilación de lisina			+	
Crecimiento en caldo NFb				+
Fuente de C(fijación de N):				
▪ Ácido málico	+		+	+
▪ Glucosa	-/+	+	+	+
▪ Manitol	-/+	+	+	+
▪ Sacarosa	-/+	+	+	+
Gránulos de PHA	+	+	+	+
Resistencia a la Polimixina B(300J)			+	

\* (+) positivo; (-) negativo

**Tabla 5.** Características de las bacterias fijadoras de nitrógeno Gram negativas seleccionadas por el mayor número de células con gránulos de PHA

Bacterias fijadoras de nitrógeno	Procedencia	Requerimiento de Oxígeno	Número de gránulos de PHA/ horas	
			24	48
<i>Azospirillum</i> sp.155	Endófito	Microaerófila	191	247
<i>Azospirillum</i> sp.130	Endófito	Microaerófila	188	239
<i>Herbaspirillum</i> sp.135	Endófito	Microaerófila	175	232
<i>Azospirillum</i> sp.149	Endófito	Microaerófila	179	215
<i>Azotobacter</i> sp.86	Rizosférica	Aerobia	170	208
<i>Azospirillum</i> sp.102	Endófito	Microaerófila	175	202
<i>Herbaspirillum</i> sp.151	Endófito	Microaerófila	240	200
<i>Burkholderia</i> sp.238	Rizosférica	Microaerófila	239	195
<i>Azospirillum</i> sp.350	Endófito	Microaerófila	248	190
<i>Herbaspirillum</i> sp.152	Endófito	Microaerófila	235	190

**Tabla 6.** Número de células bacterianas con gránulos de PHA en diferentes tiempos de incubación

Bacterias fijadoras de nitrógeno	Número de células con gránulos de PHA/horas				
	12	24	36	48	60
<i>Azospirillum</i> sp.155	40	185	300	240	100
<i>Azospirillum</i> sp.130	38	170	290	235	110
<i>Herbaspirillum</i> sp.135	95	180	284	232	108
<i>Azospirillum</i> sp.149	39	183	250	210	90
<i>Azotobacter</i> sp.86	21	160	270	205	80
<i>Azospirillum</i> sp.102	13	185	245	190	23
<i>Herbaspirillum</i> sp.151	93	230	200	185	49
<i>Burkholderia</i> sp.238	15	239	215	182	30
<i>Azospirillum</i> sp.350	21	245	200	175	82
<i>Herbaspirillum</i> sp.152	52	225	190	150	20

\* Promedio de tres repeticiones

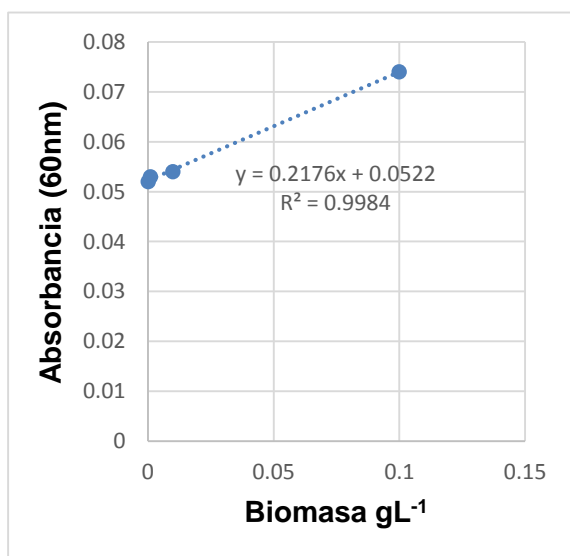


**Tabla 7.** Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de *Azospirillum* sp.130 en medios de cultivo balanceado (a) y desbalanceado (b)

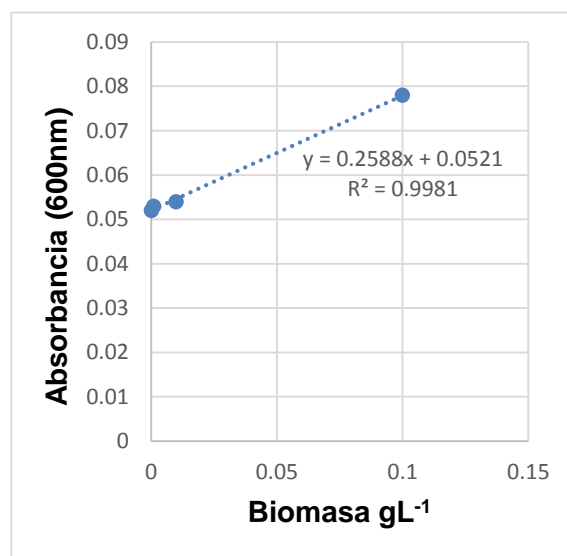
Biomasa (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	Absorbancia (600nm)	Biomasa (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	Absorbancia (600nm)
0,1	0.074	0,1	0,078
0,01	0.054	0,01	0,054
0,001	0.053	0,001	0,053
0,0001	0.052	0,0001	0,052

(a)

(b)



(a)



(b)

**Figura 32.** Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de *Azospirillum* sp.130 en medios de cultivo balanceado (a) y desbalanceado (b)

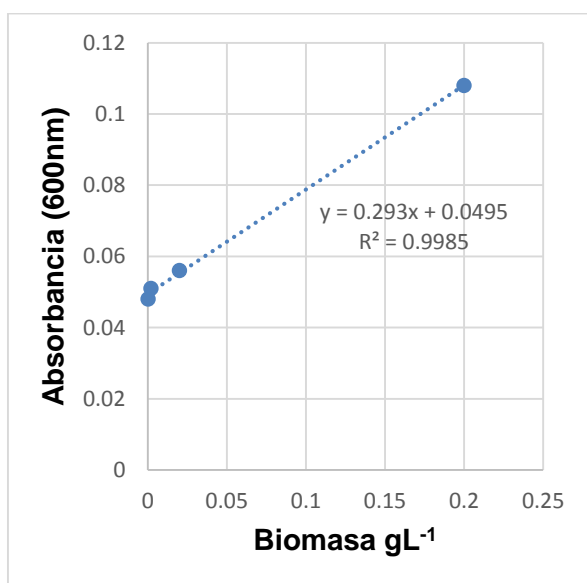
**Tabla 8.** Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de *Azospirillum* sp.155 en medios de cultivo balanceado (a) y desbalanceado (b)

Biomasa (gL <sup>-1</sup> )	Absorbancia (600nm)
0,2	0,108
0,02	0,056
0,002	0,051
0,0002	0,048

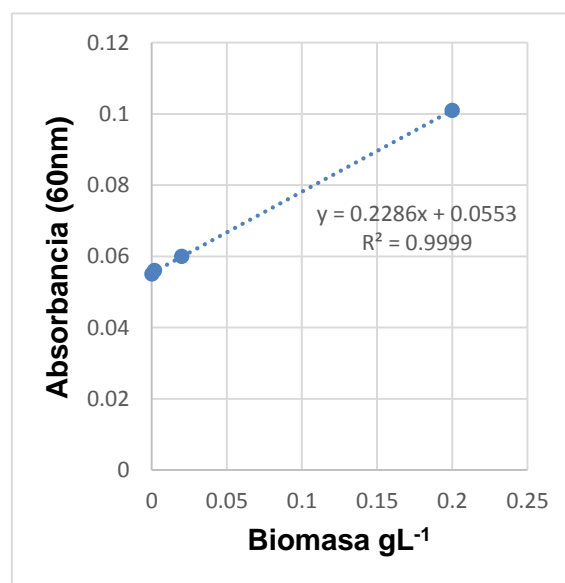
(a)

Biomasa (gL <sup>-1</sup> )	Absorbancia (600nm)
0,2	0,101
0,02	0,060
0,002	0,056
0,0002	0,055

(b)



(a)



(b)

**Figura 33.** Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de *Azospirillum* sp.155 en medios de cultivo balanceado (a) y desbalanceado (b).

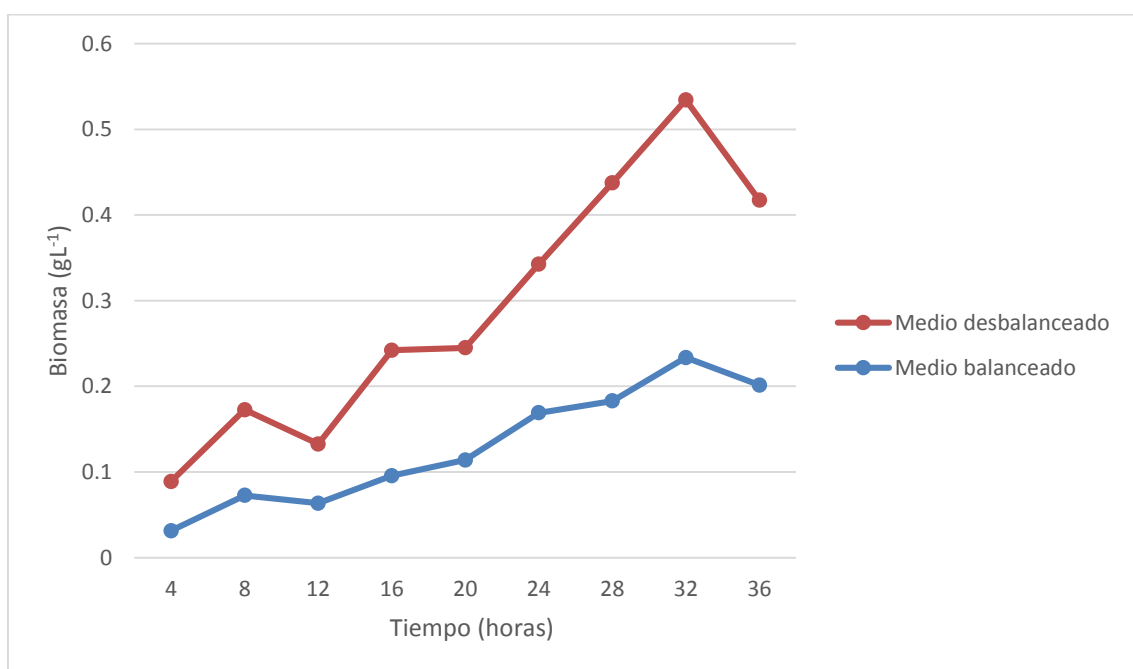
**Tabla 9.** Absorbancia (600nm) de biomasa de *Azospirillum* spp. en medios de cultivos balanceado y desbalanceado durante 36 horas

Tiempo horas	Medio balanceado		Medio desbalanceado	
	NFb 130	NFb 155	NFb 130	NFb 155
4	0,059	0,092	0,067	0,100
8	0,068	0,107	0,078	0,117
12	0,066	0,104	0,070	0,120
16	0,073	0,115	0,090	0,124
20	0,077	0,119	0,086	0,131
24	0,089	0,108	0,097	0,142
28	0,092	0,110	0,118	0,130
32	0,103	0,118	0,130	0,169
36	0,096	0,108	0,128	0,164

**Tabla 10.** Concentración (gL<sup>-1</sup>) de biomasa\* de *Azospirillum* spp. en medios de cultivo balanceado y desbalanceado durante 36 horas

Tiempo horas	Medio balanceado		Medio desbalanceado	
	<i>Azospirillum</i> sp.130	<i>Azospirillum</i> sp.155	<i>Azospirillum</i> sp.130	<i>Azospirillum</i> sp.155
4	0,03125	0,14505	0,05757	0,19554
8	0,07261	0,19624	0,10008	0,26990
12	0,06342	0,18601	0,06917	0,28303
16	0,09559	0,22355	0,14645	0,30052
20	0,11397	0,23720	0,13099	0,33115
24	0,16912	0,19966	0,17349	0,37927
28	0,18290	0,20648	0,25464	0,32677
32	0,23346	0,23379	0,30100	0,49738
36	0,20129	0,19966	0,21600	0,47550

\* Promedio de tres repeticiones



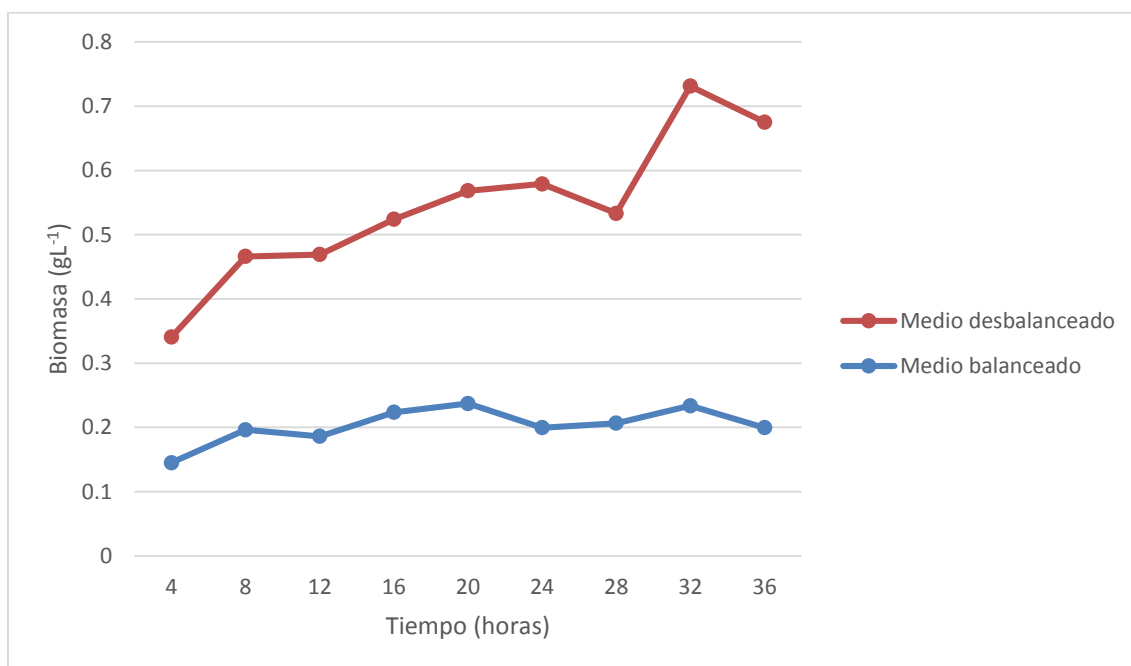
**Figura 34.** Variación de la concentración de biomasa de *Azospirillum* sp.130 en medios de cultivo balanceado y desbalanceado.

La absorbancia de la biomasa de *Azospirillum* sp.155 osciló entre 0,092 y 0,118 en el medio balanceado, así como 0,100 y 0,169 en el medio desbalanceado (Tabla 9), valores correspondientes a 0,14505 a 0,23379gL<sup>-1</sup> y 0,19554 a 0,49738gL<sup>-1</sup> respectivamente (Tabla 10, figura 35).

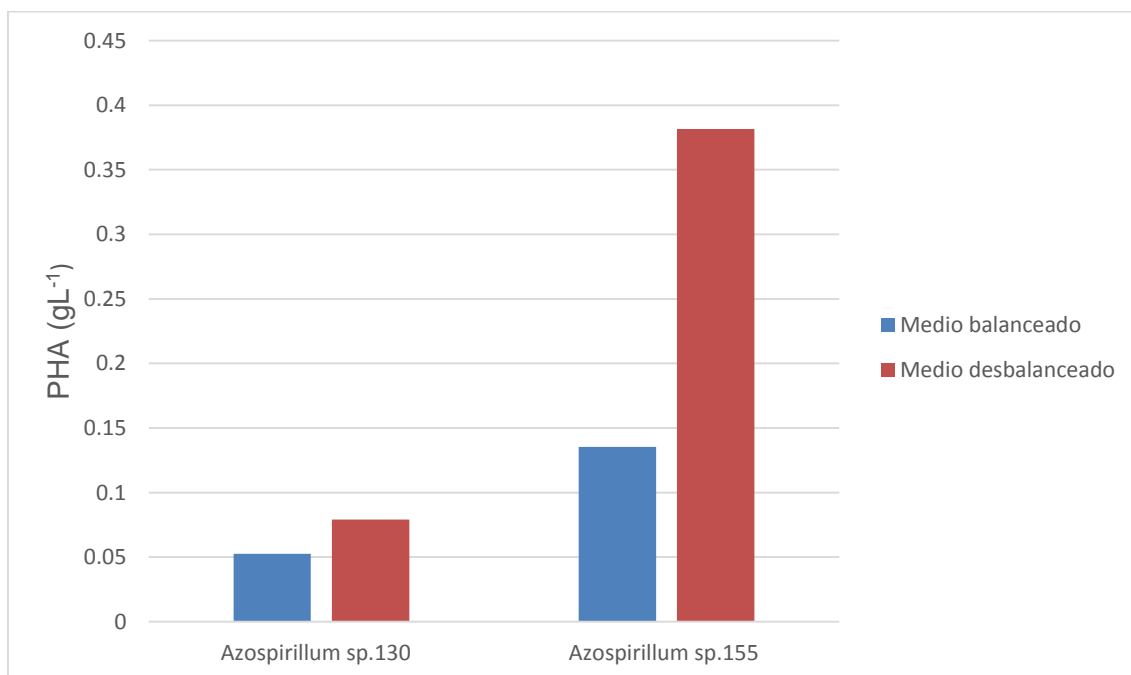
La concentración de PHA producido por *Azospirillum* sp.130 después de 32 horas de fermentación fue de 0,05263gL<sup>-1</sup> en el medio balanceado y 0,07895gL<sup>-1</sup> en el medio desbalanceado. La concentración de PHA producido por *Azospirillum* sp.155 fue de 0,13526gL<sup>-1</sup> en el medio balanceado y 0,38158gL<sup>-1</sup> en el medio desbalanceado (Figura 36). El rendimiento Yp/x a las 32 horas de fermentación osciló entre 0,57855 a 0,76718gg<sup>-1</sup> con *Azospirillum* sp.155-Balanceado y *Azospirillum* sp.155-Desbalanceado (Tabla 11).

El análisis de varianza del rendimiento Yp/x del factorial 2<sup>2</sup> demostró alta significancia para el cultivo bacteriano (factor A), medio de cultivo (factor B) y la interacción AxB. Respecto al cultivo bacteriano (A) el mayor rendimiento correspondió a *Azospirillum* sp.155; en cuanto al medio de cultivo (B) el mayor rendimiento se alcanzó con el desbalanceado. En la interacción AxB el mayor rendimiento se obtuvo con *Azospirillum* sp.155 medio desbalanceado, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos (Tablas 12 a 15, anexo 9).

*Azospirillum* sp.155 en glicerol como fuente de carbono alcanzó un rendimiento Yp/x de 0,77908gg<sup>-1</sup> o 77,9% a las 32 horas de fermentación (Tablas 16, 17).



**Figura 35.** Variación de la concentración de biomasa de *Azospirillum* sp.155 en medios de cultivo balanceado y desbalanceado.



**Figura 36.** Concentración de PHA producido por *Azospirillum* spp en medios de cultivo balanceado y desbalanceado durante 32 horas.

**Tabla 11.** Coeficiente de rendimiento del producto en función de la biomasa por *Azospirillum* spp. 155 y 130 cultivados por 32 horas en medios balanceado y desbalanceado

Tratamientos	X Biomasa (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	P PHA (g <sup>L</sup> <sup>-1</sup> )	Yp/x Rendimiento (gg <sup>-1</sup> )
<i>Azospirillum</i> sp.155 - Balanceado	0,23379	0,13526	0,57855
<i>Azospirillum</i> sp.155 - Desbalanceado	0,49738	0,38158	0,76718
<i>Azospirillum</i> sp.130 - Balanceado	0,23346	0,05263	0,22543
<i>Azospirillum</i> sp.130 - Desbalanceado	0,30100	0,07895	0,26229

**Tabla 12.** Análisis de varianza del rendimiento de PHA en función de la biomasa (Yp/x) de dos cultivos bacterianos en dos medios de cultivo

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	Fc	P	Sign.
Modelo corregido	0,608	3	0,203	2852,983	0,000	**
Intersección	2,521	1	2,521	35517,368	0,000	**
Cultivo bacteriano (A)	0,552	1	0,552	7778,347	0,000	**
Medios de cultivo(B)	0,038	1	0,038	537,226	0,000	**
Interacción de primer orden AxB	0,017	1	0,017	243,374	0,000	**
Error	0,001	8	7,098			

**Tabla 13.** Prueba de la Diferencia Mínima Significativa, DMS ( $\alpha=0,05$ ) del rendimiento de PHA en función de la biomasa ( $Y_{p/x}$ ) de dos cultivos bacterianos

Cultivo bacteriano	$Y_{p/x}$ ( $g\cdot g^{-1}$ )	Sign.
<i>Azospirillum</i> sp.155	0,672865	a
<i>Azospirillum</i> sp.130	0,243860	b

**Tabla 14.** Prueba de la Diferencia Mínima Significativa, DMS ( $\alpha=0,05$ ) del rendimiento de PHA en función de la biomasa bacteriana  $Y_{p/x}$  en medios de cultivo balanceado y desbalanceado

Medio de cultivo	$Y_{p/x}$ ( $g\cdot g^{-1}$ )	Sign.
Desbalanceado	0,514735	a
Balanceado	0,401990	b

**Tabla 15.** Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del rendimiento de PHA en función de la biomasa de dos cultivos bacterianos en dos medios de cultivo

Cultivo bacteriano - Medio de cultivo	$Y_{p/x}$ ( $g\cdot g^{-1}$ )	Sign.
<i>Azospirillum</i> sp.155 – Desbalanceado	0,76718	a
<i>Azospirillum</i> sp.155 – Balanceado	0,57855	b
<i>Azospirillum</i> sp.130 – Desbalanceado	0,26229	c
<i>Azospirillum</i> sp.130 – Balanceado	0,22543	d



**Tabla 16.** Absorbancia y biomasa de *Azospirillum* sp.155 cultivado en medio desbalanceado durante 32 horas

Tiempo Horas	Absorbancia (600nm)	Absorbancia corregida	Biomasa (gL <sup>-1</sup> )
0	0,001	-	-
8	0,120	0,119	0,27865
16	0,126	0,125	0,30490
24	0,148	0,147	0,40114
32	0,170	0,169	0,49738

**Tabla 17.** Cinética de la producción de biomasa y PHA por *Azospirillum* sp. 155 cultivado en medio desbalanceado durante 32 horas

Tiempo Horas	X Biomasa (gL <sup>-1</sup> )	P PHA (gL <sup>-1</sup> )	Yp/x	
			(gg <sup>-1</sup> )	(%)
8	0,27865	0,0075	0,02692	2,69
16	0,37927	0,0175	0,05740	5,74
24	0,40114	0,1475	0,36770	36,8
32	0,49738	0,3875	0,77908	77,9

## V. DISCUSIÓN

El aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas fue reportado previamente en el suelo rizosférico de la monocotiledónea arroz (Ramírez y Ugaz, 2014) y dicotiledónea tomate (Baca et al., 2010), así como también en los tejidos de maíz (Altamirano y Plasencia, 2014) arroz (Hernández, 2015), tomate (Baca et al., 2010) y espárrago (Delgado y Suyón, 2017). Las bacterias fijadoras de nitrógeno reducen o fijan el nitrógeno atmosférico a una forma asimilable que es el amonio (Mayz, 2004) y pueden ser rizosféricas y endófitas, es decir pueden encontrarse en el suelo rizosférico (Cárdenas et al., 2010) o en el interior de los tejidos (De la Cruz y Mestanza, 2014). Según el requerimiento de oxígeno, las endófitas son microaerófilas y las rizosféricas son aerobias o microaerófilas (Altamirano et al., 2014).

La presencia de gránulos de PHA en las bacterias fijadoras de nitrógeno coincide con los reportes de Baca et al. (2010) en *Azospirillum* spp.; Rubio, (2012) en *Azotobacter chroococcum* y *Rhizobium etli*; Jara y Tafur (2015) en *Azotobacter* spp.; Cerrone (2011) en *Azotobacter chroococcum* y *A. vinelandii*; Fuentes (2012) en *Herbaspirillum seropedicae* y Becerra (2013) en *Burkholderia cepacia*. Los PHA son polímeros de reserva de carbono y energía, relacionados con la adaptación y supervivencia en condiciones nutricionales desfavorables (Serrano, 2010), formación de esporas y quistes, fijación de nitrógeno (Castillo 2008, Fuentes 2012, Becerra, 2013), formación de biopelículas y con la relación tipo simbiote entre plantas y microorganismos rizosféricos (Fernández, 2012).

En las bacterias fijadoras de nitrógeno, el PHA sirve de protección al complejo nitrogenasa, actúa como un compuesto oxidable y también es un constituyente de la membrana citoplasmática (Anderson & Dawes, 1990;

Filipov, 2000; Almeida et al., 2004). El complejo enzimático nitrogenasa requiere un donador de electrones de bajo potencial, la hidrólisis del ATP y un ambiente anaerobio (Baca et al., 2010). La fijación biológica de nitrógeno requiere un gasto considerable de energía (Serrano, 2010). Las bacterias nitrificadoras acumulan el PHA como estrategia de supervivencia y regulación del metabolismo energético, tanto en simbiosis como en vida libre (Martínez et al., 2004).

El PHA sintetizado y acumulado por las bacterias fijadoras de nitrógeno se observó en forma de gránulos teñidos con Sudan Negro B, al igual que Baca et al. (2010) y Guzmán et al. (2017). Los PHA son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos o poliésteres de ácidos (R)-3-hidroxicarboxílicos (R)-HA que algunas Bacteria y Archaea acumulan intracelularmente (Gómez, 2013), en forma de gránulos, rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene polimerasas y despolimerasas (González et al., 2013). La membrana lipídica de los gránulos de naturaleza hidrofóbica facilita la tinción con el Sudan Negro B. Este colorante lipofílico (Castillo, 2008) permite la detección *in vivo* de los PHA, evidenciando la naturaleza lipídica de los gránulos, que se colorean de gris a negro, en contraste con el rosado de las células vegetativas (Guzmán et al., 2017).

El Sudan Negro B tiene afinidad por las sustancias lipídicas en general, pero no es selectivo para la detección específica de PHA y también se une a moléculas diferentes a los PHA (Page et al., 1996 mencionados por Fernández y Bravo, 2009). Los colorantes con mayor especificidad para detectar bacterias acumuladoras de PHA son el Nilo Rojo y el Nilo azul, por la ventaja de fluorescer en presencia de los poliésteres bacterianos (Fernández y Bravo, 2009). Las colonias de las bacterias productoras de PHA desarrolladas en medio base suplementado con Nilo rojo al 0,01% emiten fluorescencia naranja en el transiluminador de luz ultravioleta (Fernández et al., 2005). En todos los casos, el potencial de las bacterias para producir PHA se verifica identificando el gen *phaC* (Sánchez et al., 2012), encargado de codificar las PHA sintasas que unen los monómeros para formar el polímero (Serrano, 2010).

El número máximo de 248 células bacterianas con gránulos de PHA fue superior a 85 y 118 registrados por Flores e Idrogo (2015) y Garnique y Sandoval (2016) para Archaea aisladas de salinas y bacterias de bagazo de caña de azúcar, respectivamente. Según González et al. (2013) el número de gránulos de PHA por célula se define en las primeras etapas de acumulación y la producción del polímero termina cuando su contenido alcanza en promedio el 80% del peso celular en base seca, concluyéndose que existen restricciones físicas, que impiden a la célula acumular más polímero, a pesar de la disponibilidad de sustrato y actividad de la PHA polimerasa.

Los géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno con el mayor número de células con gránulos de PHA fueron reportados previamente como productoras del polímero por Baca et al., 2010 (*Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum*), Fuentes, 2012 (*Herbaspirillum seropedicae*), Becerra, 2013 y Méndez, 2016 (*Burkholderia cepacia*), Rubio, 2012 (*Azotobacter chroococcum*), El – Raheem et al., 2013 y Peña et al., 2014 (*Azotobacter vinelandii*).

La disminución del número de células con gránulos de PHA después de alcanzar el máximo también fue observada por Guzmán et al. (2017). Esta disminución es consecuencia de la degradación intracelular, como respuesta endógena de las bacterias para hidrolizar sus reservas de carbono acumuladas en formas de PHA, con la participación de las despolimerasas localizadas en la superficie de los gránulos (Segura et al., 2007). En *Pseudomonas oleovorans* se observó que antes que se termine la fuente de carbono, la concentración de polimerasa disminuyó en 12 a 20% y la despolimerasa aumentó en 10 a 15%. La acción conjunta de polimerasas, despolimerasas y sintetasas da lugar al ciclo del PHA o “ciclo metabólico amortiguador” que canaliza los intermediarios del metabolismo hacia la síntesis de PHA o hacia otros destinos, según la demanda celular (Fernández, 2012).

La acumulación de gránulos de PHA por bacterias fijadoras de nitrógeno en glicerol como fuente de carbono fue demostrada previamente por Becerra (2013), aunque también se puede utilizar ácido málico (Baca et al., 2010), fructosa (Lisboa y Segura, 2010), glucosa (Jara y Tafur, 2015), brácteas de alcachofa (Rubio, 2012), residuos agroindustriales (Naranjo, 2010), de la industria del aceite (Cerrone, 2011) y producción de biodiésel (Becerra, 2013).

El mayor rendimiento de PHA alcanzado en el medio desbalanceado se atribuye a que bajo condiciones desfavorables, las bacterias acumulan el polímero, como estrategia para regular la concentración de carbono y consumir poder reductor (Grothea et al., 1999, mencionados por Fernández y Bravo, 2009). La síntesis de gránulos de PHA es favorecida en medios de cultivo con exceso de carbono (Baca et al., 2010) y déficit de aeración (Martínez et al., 2004; Peña et al., 2014), nitrógeno (Becerra, 2013), fósforo, magnesio (Serrano, 2010) y azufre (Castillo, 2008).

*Burkholderia cepacia*, una bacteria fijadora de nitrógeno presentó similar patrón de crecimiento y consumo de sustrato en los medios balanceado y desbalanceado (mitad de nitrógeno) con glicerol como fuente de carbono; no obstante, los valores de la concentración de PHA ( $0,61\text{g/L}^{-1}$ ), productividad ( $0,014\text{g/L}^*\text{h}$ ), acumulación (16,086%) y rendimiento de sustrato en polímero  $Y_{\text{PHA/S}}$  (0,055) fueron mayores en el medio desbalanceado, en comparación con el balanceado con  $0,51\text{g/L}^{-1}$ ;  $0,011\text{g/L}^*\text{h}$ ; 15,081% y 0,043 respectivamente (Becerra, 2013).

*Azospirillum* sp.155 alcanzó un rendimiento  $Y_{\text{p/x}}$  de  $0,77908\text{gg}^{-1}$  lo que significa que 77,91% del peso de la biomasa correspondió al PHA, superando 59 y 67% reportado para las bacterias fijadoras de nitrógeno *Burkholderia cepacia* y *Azotobacter vinelandii* por Becerra (2013) y Cerrone (2011), respectivamente. La rentabilidad en la producción de PHA requiere que la cepa bacteriana acumule por lo menos 60% de masa celular con PHA (Dalcanton, 2006). En este contexto, *Azospirillum* sp.155 se considera con potencial industrial, cuyo rendimiento aumentará con la optimización del medio de cultivo (Fernández et al., 2005), condiciones de cultivo (Gómez, 2013) y separación del producto (Dalcanton, 2006).

## VI. CONCLUSIONES

- Las bacterias fijadoras de nitrógeno se aislaron de raíces, tallos y suelo rizosférico de espárrago, obteniéndose 427 cultivos puros, entre las que 51,1% correspondió a bacterias rizosféricas y 48,9% a endófitas.
- En el 56,67% de las bacterias fijadoras de nitrógeno se detectaron gránulos de PHA utilizando la tinción de Sudan Negro B.
- Los diez cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno que alcanzaron el mayor número de células con gránulos de PHA se identificaron en los géneros *Azospirillum* (50%), *Herbaspirillum* (30%), *Azotobacter* (10%) y *Burkholderia* (10%), seleccionándose *Azospirillum* sp.155 y 130 con 300 y 290 células con gránulos de PHA a las 36 horas.
- El rendimiento de PHA en función de la biomasa  $Y_{p/x}$  fue de  $0,57855\text{gg}^{-1}$  (*Azospirillum* sp.155) y  $0,22543\text{gg}^{-1}$  (*Azospirillum* sp.130) en el medio balanceado y  $0,76718\text{gg}^{-1}$  (*Azospirillum* sp.155) y  $0,26229\text{gg}^{-1}$  (*Azospirillum* sp.130) en el medio desbalanceado.
- El rendimiento  $Y_{p/x}$  de *Azospirillum* sp.155 fue de  $0,77908\text{gg}^{-1}$  en medio desbalanceado con glicerol como fuente de carbono durante 32 horas de fermentación.

## VII. RECOMENDACIONES

- Identificar a nivel molecular *Azospirillum* sp.155.
- Determinar las características físicas y químicas del PHA producido por *Azospirillum* sp.155.
- Producir PHA con *Azospirillum* sp.155 en biorreactores a escala piloto.
- Investigar residuos orgánicos como sustratos para la producción de PHA por *Azospirillum* sp.155.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allsopp, M., Walters A., Santillo D. y Johnston P. (2007). *Contaminación por plásticos en los océanos del mundo*. Madrid, España: Greenpeace.
- Almeida, A., Ruiz, J., López, N., y Pettinari, J. (2004). Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Revista Química Viva* 3(3), 122-133.
- Altamirano, C. y Plasencia R. (2014). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de Zea mays L., en Lambayeque, marzo-mayo de 2014*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Altamirano, C., Carreño, C., Plasencia, V., Ramírez, L., Silva, J. y Ugaz, F. (2014). *Bacterias rizosféricas y endófitas fijadoras de nitrógeno*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Anderson, A. & Dawes, E. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polihidroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450 – 472.
- Arroyave, A., Cardona, M. y Agudelo, L. (2013). Identificación de cepas nativas con potencial para obtención de polihidroxiclcanoatos-(PHAs) en lodos activados. *Biotecnología en el Sector agropecuario y Agroindustrial*, 2, 69-76.
- Baca, B., Soto, L., y Pardo, M. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos*, 38, 43-49.
- Baca, K., Sánchez, M., Carreño, C. y Mendoza, G. (2010). Polihidroxiclcanoatos de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 213-224.
- Becerra, J. (2013). *Producción de un polímero tipo polihidroxiclcanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.



- Bello, D., Zinn, M., Brandl, H. y Otero, M. (2008). Aislamiento y caracterización de poli-B-hidroxibutirato obtenido por vía fermentativa a partir de *Bacillus megaterium*. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, XLII (1-3), 101-105.
- Boland, R. & Donohue, M. (2003). Marine debris accumulation in the nearshore marine habitat of the endangered Hawaiian monk seal, *Monachus schauinslandi* 1999-2001. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 1385-1394.
- Calvo, S. (2011). *Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno*. Salamanca, España: Universidad de Salamanca.
- Cárdenas, D., Garrido, R., Bonilla, R. y Beldani, V. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximun* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33 (3), 1-17.
- Cardona, A., Mora, A. y Marin, M. (2013). Identificación molecular de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos en subproductos de lácteos y caña de azúcar. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 66 (2), 7129-7140.
- Castillo, D. (2008). *Efecto del gen fadH1 en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por Pseudomonas putida*. (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Sao Paulo, Brasil.
- Cholula, L. (2005). *Estudio de la producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) en Azospirillum brasilense Sp7*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Tamaulipas, México.
- Cerrone, F. (2011). *Producción de poliésteres biopoleméricos (PHAs) desde alpeorujos por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- Coyne, M. (2000) *Microbiología del Suelo. Un enfoque exploratorio*. España: Editorial Paraninfo.

- Cuesta, F. (2014). *Evaluación de los niveles de remoción en demanda química y bioquímica de oxígeno y sólidos suspendidos totales de efluentes industriales con bacterias productoras de polihidroxialcanoatos y exopolisacáridos a escala de laboratorio en empresas del sector de alimentos de la ciudad de Manizales*. (Tesis de Maestría). Universidad de Manizales, Colombia.
- Dalcanton, F. (2006). *Produção, extração e caracterização de poli (3-hidroxibutirato) por Ralstonia eutropha em diferentes substratos*. (Tesis de Maestría). Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.
- Delgado, J. y Suyón, J. (2017). *Bacterias endófitas y rizosféricas fijadoras de nitrógeno aisladas de Asparagus officinalis L. en virú, región La Libertad y su potencial como promotoras de crecimiento en plantas*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- De la cruz, E. y Mestanza, A. (2014). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de raíces de Oryza sativa L., arroz, en Lambayeque, 2014*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Derraik, J. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 842-852.
- Doran, P. (1998). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.
- El-Raheem, A., El-Shanshoury, Kenawy, E., Amro, A., Salama, A. & Kishk, S. (2013). Optimization of Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azotobacter vinelandii* using experimental design. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(11), 227-241.
- Fernández, P., Ortiz, F. y Edmundo, J. (2005). Caracterización de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides* FLB2. *Revista Centro de Estudios en Salud*, 1 (6), 5-12.
- Fernández, P. y Bravo, D. (2009). Abundancia de bacterias productoras de Polihidroxialcanoato en suelos de la Región Andina de Nariño, Colombia. *Revista Centro de Estudios en Salud*, 1(11), 31-42.

- Fernández, I. (2012). *Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en Pseudomonas putida: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados*. (Tesis de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Filipov, M. (2000). *Obtencao e caractericao de mutantes de Burkholderia sp. IPT 101 deficientes na síntese ou no reconsumo de poli-3-hidroxi-butirato- un plástico biodegradável*. (Tesis de Maestría). Universidad de Sao Paulo, Brasil.
- Flores, A. e Idrogo, E. (2015). *Rendimiento de polihidroxicanoatos, PHA, de bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas en Mórrope, Lambayeque, 2014*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Fuentes, L., (2012). *Optimización y refinamiento de la producción de polihidroxicanoatos a partir de Herbaspirillum seropedicae Z67*. (Tesis de Pregrado). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Garnique, L y Sandoval, J. (2016). *Rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por bacterias aisladas de bagazo de Saccharum officinarum L. en Lambayeque, 2015*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Garrido, R. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociados a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas*. (Tesis de Maestría). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia.
- Gómez, J. (2013). *Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos*. (Tesis de Maestría) Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- González, Y., Meza. J., González, O. y Córdova, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29 (1) 77-115.

- Grados, R., Álvarez, M., Gimenez, A. y Mattiasson, B. (2008). Degradación anaeróbica de desechos agrícolas por consorcios microbianos para la producción de polihidroxialcanoatos. *Biofarbo*, 16, 28-35.
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C. y Casos, I. (2017). Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. *Scientia Agropecuaria*, 8(2), 109-118.
- Guzmán, C. y Hurtado, A. (2011). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos de bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de Solanum tuberosum*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Hernández, R., Fernández, C. y Bautista, P. (2014). *Metodología de la Investigación*. (6<sup>ta</sup> ed). México: Mc Graw, Hill Interamericana Editores S.A.
- Hernández, E. (2015). *Caracterización de bacterias endófitas diazotróficas aisladas de tallos y hojas de Oryza sativa L. "arroz", Lambayeque, marzo-mayo de 2014*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Hernández, M. & Guzmán, B. (2009). Biopolymers used in the manufacture of food packaging. *Revista Publicaciones e Investigación*, 3(1), 103- 122.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. & Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed). Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins.
- Jara, I. y Tafur, J. (2015). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos de Azotobacter spp. aisladas de suelo rizosférico de Zea mays L. en Lambayeque, agosto-octubre, 2014*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Jha, B., Thakur, M., Gontia, I., Albrecht, V., Stoffels, M., Schmid, M. & Hartmann, A. (2009). Isolation, partial identification and application of diazotrophic *rhizobacteria* from traditional Indian rice cultivars. *European Journal of Soil Biology*, 45, 62-72.

- Lisboa, C. y Segura, S. (2010). *Rendimiento de polihidroxicanoatos de cepas de Cupriavidus necator aisladas de rizósfera de Zea mays “maíz” en Reque, Lambayeque, 2010*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Llontop, M. (2012). *Rendimiento de polihidroxicanoatos de bacterias halófilas extremas aisladas de salinas en Lambayeque, 2012*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en periodo de enraizamiento*. (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Mantilla, A., Cardona, G., Peña, C., Murcia, U., Rodríguez, M. y Zambrano, M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonía colombiana. *Revista de Biología Tropical*, 57 (4), 915 -927.
- Martínez, J., Rodríguez, M., Fernández, A., Villaverde, M., López, A., Marín, D., et al. (2004). Producción de polihidroxicanoatos en bacterias diazotófas I. Influencia de la aeración en la síntesis de poliBhidroxibutirato en *Azospirillum brasilense* cepa 7. *Revista Biología*, 18 (1), 87-95.
- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4 (1), 1-20.
- Méndez, D. (2016). *Modelamiento matemático y optimización del proceso de producción de polihidroxicanoatos empleando la bacteria Burkholderia cepacia B27 a partir de ácidos grasos*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Colombia.
- Menezes, C. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazotóficas asociadas a maíz (Zea mays) variedad PAU 871*. (Tesis de Pregrado). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

- Naranjo, J. (2010). *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.
- Peña, C., López, S., García, A., Espín, G., Romo, A. & Segura, D. (2014). Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). *Annals of Microbiology*, 64, 39-47.
- Pérez, A, Rojas., J. y Fuentes, J. (2010). Diversidad de bacterias endófitas asociadas a las raíces del pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa*) en tres localidades del /departamento de Sucre, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 15(2), 219-228.
- Ramírez, L. y Ugaz, J. (2014). *Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en Oryza sativa L. "arroz", Lambayeque, 2014*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Razzaq, A., Jamil, N., Naheed, N. & Hasnain, S. (2010). Bacteria from contaminated urban and hilly areas as a source of polyhydroxyalkanoates production. *African Journal of Biotechnology*, 9(13), 1919-1925.
- Ríos, D. y Rivera, M. (2012). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos (PHAs) producidos por bacterias halófilas aisladas de agua de mar en los distritos de Pimentel y Santa Rosa en Lambayeque, 2011*. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Rubio, G., (2012). *Efecto de las brácteas pulverizadas de Cynara scolymus "alcachofa" sobre el crecimiento y producción de polihidroxibutirato por Azotobacter chroococcum y Rhizobium etli*". (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad, Trujillo, Perú.
- Sánchez, S., Marín, M., Mora, A. y Yepes, M. (2012). Identificación de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV (2), 89-100.

- Segura, D., Noguez, R. y Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14, 361-372.
- Serrano, J. (2010). Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Revista Teoría y Praxis Investigativa*, 5 (2), 79-84.
- Schoebitz, M., (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de Lolium perenne L. de suelo volcánico modelo género Azospirillum spp.* (Tesis de Pregrado). Universidad Austral de Chile, Chile.
- Vásquez, A., Díaz, N., Vásquez, O. y Vásquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

## **ANEXOS**



## ANEXO 1

### **Cálculo del número de muestras para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno (en Vásquez et al., 2012)**

$$n = \frac{Z^2 p \cdot q}{T^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90 \cdot 0,10)}{(0,06)^2}$$

$$n = 96,04 \text{ muestras}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra

Z = 1,96 ( $\alpha = 0,05$ ) valor estándar

p = Prevalencia de bacterias endófitas y rizosféricas promotoras de crecimiento en plantas (0,90).

q = 1-p, ausencia (0,10).

T= Error estimado (6%).

## ANEXO 2

**Medios de cultivo y soluciones para el aislamiento, identificación y mantenimiento de bacterias rizosféricas y endófitas (en Garrido, 2007; Jha *et al.*, 2009)**

**a. Medio de cultivo NFb (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* y *A. halopraeferens*)**

Componentes	g <sup>L</sup> <sup>-1</sup>
Ácido málico DL	5,0
K <sub>2</sub> .HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.02g
Solución de micronutrientes I	2mL
Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0,2N)	2mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
KOH	4,5g

Pesar los compuestos en el orden indicado, posteriormente completar el volumen a 1000mL con agua destilada y ajustar el pH a 6,5 - 6.8. Para el medio semisólido agregar 1,75 - 1.8g de agar agarL<sup>-1</sup> y para el medio sólido 15g de agar agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

### **Solución de micronutrientes I:**

Componentes	g <sup>L</sup> <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub>	0,04
ZnSO <sub>4</sub>	1,20
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1,40
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,175

Completar el volumen a 1000mL con agua destilada.

FeEDTA (Solución 1,64%)

Preparar una solución madre con 7,0g de Fe SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O y 2g de EDTA dipotásico en 1L de agua destilada. Luego, tomar 1,17mL de la solución madre y completar a 1L con agua desmineralizada, para obtener la solución 1,64% de Fe deseada.

**b. Medio de cultivo LGI (*Azospirillum amazonense*)**

El medio de cultivo LGI, fue desarrollado a partir del medio LG (Lipman, 1904). La I hace referencia al investigador J. Ivo Baldani. Este medio promueve el aislamiento de *Azospirillum amazonense*.

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Cristales de azúcar	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
MgSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
Azul de bromotimol (0,5% en KOH 0,2N)	5mL
FeEDTA (Solución 1,64%)	4mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 6,0–6,2. Para medio semisólido adicionar 1,75g de agar agarL<sup>-1</sup>, para medio sólido 15g de agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**c. Medio de Cultivo JNFb (*Herbaspirillum* spp.)**

El medio JNFb fue desarrollado por la investigadora Johanna Döbereiner a partir del medio NFb. La J hace referencia a la investigadora.

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Acido málico	5.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0.1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
Solución de micronutrientes I	2mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	2mL
FeEDTA (Solución 1,64 %)	4mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
KOH	4,5
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 5,8. Para medio semisólido agregar 1,8g de agarL<sup>-1</sup>, para medio sólido 18g de agar agarL<sup>-1</sup>, 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y 6mL de azul de bromotimol.

**d. Medio de cultivo LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)**

Este medio fue desarrollado a partir del medio de cultivo LGI (Baldani, 1984), en donde la P hace referencia a Pernambuco, lugar de aislamiento de la primera cepa de *Acetobacter diazotrophicus*.

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Cristales de azúcar	100
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	5mL
FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,01mL
Solución de vitaminas I (Biotinol)	1mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 5.5. Para medio semisólido agregar 1,8g de agarL<sup>-1</sup>, para medio sólido 17g de agar agarL<sup>-1</sup> y 20mgL<sup>-1</sup> de extracto de levadura como fuente de nitrógeno.

**e. Medio de cultivo JMV (*Burkholderia* spp.)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Manitol	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	2mL
FeEDTA (solución 1,64%)	2,1mL
Solución de micronutrientes II	2mL
Solución de vitaminas II	2mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 5,0.

Para obtener la solución de vitaminas II, diluir una pastilla de complejo B comercial en 10mL de agua destilada.

**Solución de micronutrientes II:**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub>	0,1
MnCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03
Agua destilada csp	1000mL

**f. Solución tampón fosfato de potasio, 0,05 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9,304
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,709
Agua destilada csp	1000mL

Verificar el pH 7,0 y autoclavar

**g. Medio de cultivo LG (*Azotobacter* spp. y *Azomonas* spp.)**

El medio LG fue elaborado por Lipman (1904)

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20
CaCl <sub>2</sub>	0,02
Fe Cl <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15
CaCO <sub>3</sub>	1,00
Sacarosa	20,0
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	5,00mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 7,0 con NaOH y adicionar 15g de agar agar.

**h. Medio de cultivo BEIJERINCKIA (*Beijerinickia* spp.)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,80
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,10
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,005
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
ZnSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005
CuSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,004
Glucosa	10,0
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 6,5 con NaOH y adicionar 15g de agar agar. Esterilizar la glucosa por separado (10g en 50mL de H<sub>2</sub>O) y mezclar después de frío.

**i. Medio de cultivo LGD (*Derxia* spp.)**

El medio LGD o medio LG (Lipman, 1094) fue modificado por Campêlo & Döbereiner (1970)

Componentes	gL <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,20
CaCl <sub>2</sub>	0,01
Fe Cl <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,002
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15
NaHCO <sub>3</sub>	1,00
Glucosa	20,0
Azul de bromotimol (0,5 % en KOH 0,2N)	5,00mL
Agua destilada en cantidad suficiente	1000mL

Ajustar el pH a 7,0 con NaOH y adicionar 15g de agar agar.

**j. Agar nutritivo (AN)**

Componentes	gL <sup>-1</sup>
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar agar	15,0
Agua destilada csp	1000mL

**ANEXO 3**  
**Caldo Fermentación**  
(Becerra, 2013)

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,08g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
MgSO <sub>4</sub>	0,5g
Solución de microelementos	1mL
Glicerol	5mL

**Solución de microelementos:**

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
FeSO <sub>4</sub>	2,0g
CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	2,0g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2g
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01g
NiCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,03g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1g
H <sub>2</sub> BO <sub>4</sub>	0,3g
NaMoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,03g



## **Preparación de Sudán Negro B**

(Guzmán & Hurtado, 2011)

- Pesar 0,3 de Sudán Negro B.
- Disolver en 75 mL de etanol al 95%.
- Enrasar a 100 mL con agua destilada.
- Filtrar.

## ANEXO 4

**Número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram negativas  
cultivadas en caldo Fermentación por 24 horas**

<b>Bacteria Código</b>	<b>Número de células con gránulos de PHA/campo microscópico</b>					
	<b>r1</b>	<b>r2</b>	<b>r3</b>	<b>r4</b>	<b>r5</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>
NFb 350	230	280	270	212	248	248
JNFb151	215	263	230	222	270	240
JMV 238	238	250	245	220	242	239
JNFb152	240	230	260	212	283	235
NFb 155	200	190	197	188	180	191
NFb 130	182	190	185	188	195	188
JNFb 149	180	184	161	152	218	179
NFb 102	180	185	170	165	175	175
JNFb 135	158	175	183	169	190	175
LG 86	180	148	144	176	202	170
LGD 37	200	210	180	125	120	167
LGD 24	144	154	186	152	194	166
Beij 20	150	134	175	163	198	164
LGI 126	162	134	170	166	178	162
LGD 44	158	185	105	212	145	161
JNFb 108	182	162	128	150	168	158
LGI 103	120	135	180	200	150	157
NFb 143	131	165	176	155	148	155
NFb 168	103	195	112	168	197	155
JNFb 418	150	140	160	155	145	150
NFb 172	150	155	190	120	125	148
JNFb 129	105	139	125	173	193	147
JNFb 122	196	106	144	123	96	133
Beij 19	101	103	135	151	160	130
LGD 11	130	135	125	128	117	127
LGI 154	128	142	131	123	111	127
LGI 224	150	96	103	132	154	127
NFb 167	162	104	122	97	130	123
LGD 71	165	114	123	97	111	122
NFb 118	150	135	121	98	86	118
LGD 3	95	115	105	130	135	116
LGI 138	116	120	115	112	117	116
Beij 2	90	100	115	117	118	108
Beij 48	118	100	116	108	98	108
NFb 119	90	110	115	130	95	108
Beij 7	116	100	110	104	105	107
LGD 43	81	87	90	90	182	106
LGD 34	120	105	100	105	90	104
LGD 74	130	145	80	60	100	103
NFb 124	108	100	94	98	105	101

NFb 204	67	89	113	124	97	98
LGD 55	124	73	66	115	102	96
LGD 59	96	80	100	104	90	94
D 230	89	75	92	104	95	91
LGD 90	97	90	95	80	88	90
JMV 291	98	80	78	94	85	87
JNFb 109	93	70	120	84	63	86
JNF b 352	74	85	89	90	92	86
JMV 235	80	95	78	85	87	85
NFb 170	62	83	49	88	128	82
JNFb 185	85	78	82	90	75	82
NFb 125	55	84	85	79	77	76
LGI 127	39	75	110	93	58	75
NFb 181	79	80	65	81	70	75
LGD 13	80	75	83	72	60	74
NFb 254	82	68	75	65	70	72
Beij 63	58	78	83	60	76	71
LGI 128	57	61	72	76	89	71
JNFb 285	75	67	80	78	50	70
LGI 320	79	60	80	75	56	70
NFb 357	97	75	50	78	50	70
LGD 15	70	61	71	68	75	69
JMV 262	42	70	78	80	75	69
JMV 270	60	68	70	73	69	68
JMV 145	53	90	55	76	61	67
JNFb 192	55	44	84	81	71	67
JMV 242	54	69	64	80	67	67
NFb 183	83	60	72	65	50	66
Beij 75	96	45	89	44	51	65
LGD 76	71	64	30	100	50	63
JNFb 144	56	48	55	59	92	62
LGD 14	65	57	60	70	53	61
Beij 33	79	41	33	66	86	61
LGD 12	32	80	70	68	50	60
LGD 23	36	56	61	72	70	59
Beij 39	57	54	40	71	68	58
JMV 169	77	31	35	38	94	55
Beij 18	25	51	30	60	89	51
Beij 64	67	55	58	30	40	50
LGD 8	60	55	50	45	35	49
JNFb 141	66	35	43	51	40	47
LGD 218	73	50	32	35	20	42
JMV 282	28	36	45	43	48	40
JMV 284	40	38	45	35	42	40
NFb 426	40	45	38	34	43	40
NFb 139	25	22	44	51	38	36
Beij 29	34	19	42	46	34	35

Beij 72	24	28	30	43	50	35
JMV 325	8	48	39	42	38	35
NFb 365	28	35	38	40	34	35
Beij 62	35	33	45	26	31	34
NFb 111	35	32	37	40	26	34
LGI 177	31	21	44	32	42	34
LGD 22	19	25	38	42	36	32
LGI 165	35	41	27	24	18	29
LGD 31	32	15	34	29	30	28
JNFb 158	8	29	19	32	52	28
JMV 345	35	20	25	33	27	28
Beij 28	41	20	17	35	17	26
NFb 196	22	26	27	24	31	26
E 278	38	28	16	26	22	26
LGD 54	19	23	25	32	16	23
LGI 205	32	31	10	16	11	20
JMV 117	25	17	18	20	15	19
NFb 381	10	10	25	20	28	18.6
Beij 222	12	20	15	18	25	18
JNFb 261	20	18	22	17	13	18
JNFb 153	23	16	21	14	11	17
Beij 70	11	12	15	20	22	16
JNFb 240	13	18	14	20	15	16
JMV 266	20	18	12	13	17	16
LGD 69	13	15	10	17	20	15
LGD 73	20	15	12	21	7	15
JMV 225	10	15	11	18	16	14
JMV 283	16	15	14	13	12	14
LGD 87	8	15	13	19	10	13
JNFb 355	6	2	25	11	21	13
LGD 46	13	11	9	12	15	12
JMV 134	6	12	16	19	7	12
JNFb 174	8	17	13	10	12	12
NFb 188	12	15	7	10	16	12
NFb 349	12	9	15	13	11	12
LGD 66	15	10	13	8	9	11
NFb 207	10	15	7	12	11	11
JNFb 419	8	15	10	9	13	11
Beij 80	10	15	12	8	5	10
Beij 81	14	10	13	8	5	10
A 239	14	11	5	7	13	10
JMV 275	10	8	11	12	9	10
JMV 420	13	8	10	12	7	10
LGD 53	6	10	8	12	9	9
LGD 219	5	6	14	6	4	7
LGD 50	4	7	6	8	5	6

JNFb 197	4	6	5	3	7	5
NFb 237	9	8	5	1	2	5
JMV 406	3	8	7	6	1	5
JNFb 331	5	4	7	3	1	4
Beij 26	3	4	5	2	1	3
Beij 65	1	2	5	4	3	3
NFb 173	3	0	1	8	3	3
LGD 220	5	0	2	3	5	3
JNFb 324	2	8	4	1	0	3
JNFb 412	5	2	0	2	6	3
LGD 85	5	0	4	1	0	2
JMV 236	0	4	2	1	4	2
NFb 241	0	1	5	2	1	2
LGI- P 390	5	0	1	2	3	2
NFb 424	2	0	5	3	0	2
LGD 51	0	3	1	1	0	1
LGD 83	0	1	0	3	1	1
NFb 227	1	0	1	0	1	1
LGI 346	2	0	1	0	3	1
LGI- P 377	1	1	0	1	0	1
NFb 395	1	0	3	2	0	1
JNFb 401	0	1	1	1	0	1
JNFb 407	0	0	1	1	0	1
NFb 226	0	0	0	0	0	0
JNFb 229	0	0	0	0	0	0
JNfb 243	0	0	1	1	0	0
NFb 258	0	0	0	0	0	0
LGI 347	0	0	1	0	0	0
LGI 383	0	0	0	0	0	0

**Número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram negativas cultivadas en caldo Fermentación por 48 horas**

<b>Bacteria Código</b>	<b>Número de células con gránulos de PHA/campo microscópico</b>					
	<b>r1</b>	<b>r2</b>	<b>r3</b>	<b>r4</b>	<b>r5</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>
NFb 155	231	282	260	216	246	247
NFb 130	250	285	220	225	215	239
JNFb 135	231	230	228	240	231	232
JNFb 149	200	220	227	210	218	215
LG 86	205	215	200	195	225	208
NFb 102	190	200	195	215	210	202
JNFb 151	200	195	189	200	216	200
JMV 238	198	200	196	191	190	195
NFb 350	190	193	185	182	200	190
JNFb 152	185	195	196	194	180	190
NFb 167	190	179	198	185	188	188
NFb 168	200	186	172	184	198	188
NFb 357	192	175	190	178	200	187
LGD 34	200	190	165	181	194	186
NFb 172	202	200	193	185	150	186
NFb139	190	210	185	160	180	185
NFb 143	190	188	180	172	185	183
LGI 126	182	163	170	177	208	180
JMV 345	158	180	195	172	185	178
JNFb 419	180	168	172	190	160	174
LGD 37	180	200	185	170	100	167
LGD 44	97	150	190	188	195	164
JMV 420	149	165	170	178	158	164
LGD 43	180	150	175	165	145	163
LGI 224	170	150	165	140	180	161
LGI 103	180	150	170	140	145	157
JMV 325	122	114	174	187	153	150
NFb 119	130	180	170	112	128	144
D 230	120	124	150	167	159	144
LGI 205	105	150	130	155	160	140
JNFb 331	150	134	115	130	171	140
JMV 235	142	151	120	109	163	137
LGI 154	142	135	128	120	150	135
Beij 19	100	160	99	171	140	134
LGD 3	117	114	130	140	159	132
NFb 118	120	164	112	99	155	130
LGI 165	120	140	125	128	102	123
LGD 11	100	125	120	130	135	122
LGD 59	110	120	112	114	154	122
LGD 71	150	100	115	117	128	122

JNFb 122	180	100	110	122	98	122
JNFb 108	120	130	125	108	112	119
LGI 320	103	112	143	127	95	116
JNFb 158	102	130	135	110	98	115
LGD 76	129	125	100	96	110	112
LGD 24	137	100	98	110	95	108
Beij 48	124	110	96	101	99	106
LGD 74	100	117	90	98	120	105
NFb 124	120	110	105	92	98	105
JNFb 129	100	118	98	89	105	102
Beij 2	95	100	105	98	107	101
Beij 7	96	102	98	110	94	100
LGD 55	149	106	85	78	82	100
Beij 65	82	95	98	120	100	99
JNFb 197	100	105	110	80	95	98
LGD 218	105	92	98	100	95	98
LGD 73	100	104	95	88	98	97
LGI 138	98	100	95	91	96	96
JNFb 141	100	120	92	85	78	95
JNF b 352	100	83	94	100	93	94
LGD 90	95	82	100	98	85	92
Beij 63	90	85	67	100	113	91
JMV 291	99	95	80	89	92	91
JNFb 109	82	79	84	110	95	90
JNFb 418	80	100	116	94	60	90
JNFb 144	90	97	85	78	80	86
LGI 127	100	90	80	85	70	85
NFb 125	62	78	95	100	75	82
LGI 128	60	57	90	100	98	81
JNFb 185	76	80	85	89	65	79
JNFb 285	78	75	80	82	70	77
LGD 54	75	80	100	65	60	76
Beij 64	85	75	82	70	68	76
NFb 170	68	75	54	87	91	75
NFb 181	80	75	70	85	65	75
JMV 134	47	70	68	90	85	72
Beij 39	55	80	78	69	68	70
JMV 262	70	80	75	57	68	70
JMV 242	72	68	76	80	49	69
JMV 270	65	62	68	70	75	68
LGD 13	70	68	74	60	63	67
Beij 75	52	55	68	70	90	67
JMV 145	65	62	67	68	73	67
JNFb 192	68	52	71	74	70	67
JMV 169	90	65	70	50	55	66
JMV 282	90	70	78	45	42	65

JMV 406	63	45	92	37	88	65
LGD 15	55	68	65	60	72	64
Beij 33	70	75	52	48	60	61
JMV 283	60	48	60	67	70	61
A 239	58	51	73	64	49	59
NFb 183	70	75	50	47	48	58
NFb 426	52	26	91	62	59	58
LGD 12	38	50	64	58	70	56
LGD 14	65	50	55	63	47	56
LGD 23	60	48	55	52	65	56
Beij 81	50	55	68	59	48	56
NFb 204	52	48	55	60	65	56
Beij 18	48	52	59	60	56	55
JMV 236	35	42	72	51	65	53
JMV 275	42	40	45	58	55	48
JNFb 412	54	34	59	35	53	47
LGD 8	50	48	54	38	40	46
LGD 66	32	45	50	48	55	46
LGD 85	40	52	48	35	55	46
NFb 365	47	28	43	45	62	45
NFb 188	37	45	36	50	47	43
Beij 62	30	38	45	50	47	42
LGD 22	30	42	38	45	50	41
JMV 284	42	40	45	35	43	41
JMV 266	40	45	38	35	27	37
Beij 29	32	28	40	45	35	36
JMV 117	30	38	27	40	45	36
JNFb 355	38	25	35	45	37	36
Beij 72	30	35	25	40	45	35
Beij 80	27	30	28	45	40	34
NFb 111	30	38	35	40	27	34
Beij 28	45	30	25	28	37	33
LGD 69	25	30	37	40	28	32
LGI 177	25	20	35	38	42	32
NFb 196	30	28	35	37	25	31
NFb 424	40	28	26	32	19	29
LGD 31	32	28	21	34	25	28
JNFb 240	30	28	35	20	27	28
JNFb 407	39	13	35	26	27	28
JNFb 153	30	28	25	34	18	27
E 278	28	43	22	24	18	27
NFb 349	31	16	25	21	42	27
NFb 254	26	28	23	30	23	26
JNFb 261	25	15	17	20	28	21
Beij 20	18	23	25	14	20	20
Beij 26	21	18	16	20	25	20



LGD 51	40	15	25	12	8	20
NFb 381	12	19	23	16	25	19
Beij 222	20	25	15	12	18	18
LGI- P 390	30	12	10	20	13	17
Beij 70	25	10	8	14	18	15
JNFb 401	10	28	15	13	9	15
LGD 87	10	12	19	16	13	14
JMV 225	18	17	16	10	9	14
LGD 53	18	10	15	13	9	13
LGD 83	22	12	10	8	13	13
JNFb 174	12	14	9	15	10	12
LGI- P 377	14	10	8	11	17	12
LGD 46	14	12	8	10	11	11
NFb 207	10	13	9	15	8	11
JNfb 243	8	6	10	14	12	10
LGI 346	8	6	9	12	15	10
LGD 50	5	13	10	8	9	9
NFb 173	15	3	7	10	5	8
LGD 219	8	4	9	12	2	7
LGI 347	8	4	6	5	2	5
JNFb 324	4	8	5	3	0	4
NFb 258	2	0	5	7	1	3
LGD 220	5	3	0	0	2	2
NFb 237	0	1	6	3	0	2
NFb 395	2	1	0	4	3	2
NFb 227	0	0	1	1	3	1
NFb 241	0	1	1	1	0	1
NFb 226	0	0	0	1	0	0
JNFb 229	0	0	0	0	0	0
LGI 383	0	0	0	0	0	0

## ANEXO 5

**Número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram positivas  
cultivadas en caldo Fermentación por 24 horas**

<b>Bacteria codigo</b>	<b>número de células con gránulos de PHA/campo microscópico</b>					
	<b>r1</b>	<b>r2</b>	<b>r3</b>	<b>r4</b>	<b>r5</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>
NFb 379	190	185	195	180	165	183
NFb 184	136	125	121	140	138	132
LGD 178	110	108	123	116	168	125
JNFb 123	166	94	54	86	150	110
NFb 140	118	104	123	76	109	106
LGD 6	97	95	100	110	88	98
LGD 35	73	88	85	94	140	96
LGD 97	93	102	95	100	90	96
JMV 223	127	98	105	74	66	94
JMV 107	114	82	73	86	95	90
JMV 175	74	75	102	83	106	88
Beij 57	85	76	90	95	89	87
JNFb 142	64	97	88	101	75	85
LGD 36	113	60	59	77	81	78
Beij 67	52	103	90	65	80	78
JMV 306	70	78	80	82	75	77
NFb 202	85	60	68	57	70	68
LGD 41	90	75	50	70	40	65
LGD 49	51	58	53	75	68	61
LGD 45	73	55	69	61	42	60
LGI 199	63	47	87	43	40	56
JNFb 263	50	55	48	45	52	50
NFb 193	55	50	52	27	61	49
JNFb 338	36	55	48	60	46	49
LGI 147	29	46	48	52	40	43
LGD 16	91	57	15	18	24	41
NFb 200	32	29	36	52	56	41
LGI 203	60	55	35	20	25	39
NFb 373	45	38	28	32	37	36
JNFb 186	17	22	60	40	31	34
LGI 106	32	42	26	25	35	32
LGI 299	55	18	37	20	25	31
LGD 68	44	25	12	23	46	30
JMV 201	29	25	21	34	41	30
NFb 363	55	22	20	25	28	30
LGI 191	20	24	23	47	26	28
JMV 208	18	30	33	16	38	27
JMV 316	20	28	24	30	33	27
LGI 189	20	22	16	26	41	25
NFb 176	13	20	17	29	26	21

NFb 198	27	25	18	15	20	21
JMV 371	20	25	18	27	15	21
LGD 4	20	12	18	30	15	19
LGD 10	23	25	18	14	10	18
LGD 21	7	17	30	18	13	17
LGI 322	15	17	16	13	19	16
LGI - P 391	20	25	12	8	10	15
LGD 60	15	21	5	20	9	14
LGD 82	20	12	10	6	22	14
NFb 308	10	12	11	15	17	13
LGI 362	10	13	9	18	15	13
JNFb 297	10	15	12	7	11	11
NFb 112	17	6	9	5	3	8
JNFb 187	10	8	9	5	3	7
LGD 25	10	2	6	4	8	6
LGD 32	7	9	6	2	6	6
LGI 110	6	3	5	10	6	6
LGD 94	7	9	5	3	1	5
JNFb 307	2	8	6	5	4	5
LGI 360	1	8	5	4	7	5
LGD 1	7	5	4	3	1	4
LGD 5	3	5	7	4	1	4
NFb 247	7	4	0	6	3	4
LGD 93	4	2	5	3	1	3
JMV 148	8	0	1	4	2	3
LGD 9	1	4	3	0	2	2
LGD 17	2	1	0	3	4	2
Beij 98	2	0	1	4	3	2
JNFb 343	5	3	1	0	1	2
NFb 344	1	5	0	4	0	2
Beij 52	0	0	1	0	2	1
JNFb 114	0	1	1	1	0	1
JMV 358	0	1	2	0	1	1
LGI 384	0	0	1	1	1	1
LGI- P 385	1	1	1	0	0	1
LGI - P 386	0	1	0	1	1	1
LGI - P 388	2	0	1	3	1	1
LGI- P 389	2	0	1	0	1	1
LGI 394	1	0	2	0	2	1
JMV 215	0	0	0	0	0	0
JNFb 321	0	0	0	0	0	0
JNFb 332	0	0	0	0	0	0
JMV 396	0	0	1	1	0	0
LGI - P 400	1	0	1	0	0	0

**Número de células con gránulo de PHA en bacterias Gram positivas cultivadas en caldo Fermentación por 48 horas**

<b>Bacteria codigo</b>	<b>número de células con gránulos de PHA/campo microscópico</b>					
	<b>r1</b>	<b>r2</b>	<b>r3</b>	<b>r4</b>	<b>r5</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>
NFb 379	187	160	189	154	175	173
NFb 373	135	171	119	167	143	147
JNFb 142	150	120	135	145	160	142
NFb 184	135	130	155	150	140	142
JMV 201	102	120	98	130	135	117
JNFb 123	110	117	100	123	110	112
JMV 148	100	127	115	98	110	110
LGD 6	98	95	100	105	97	99
LGD 178	100	112	95	85	103	99
LGD 97	100	92	96	104	98	98
NFb 140	109	100	98	78	105	98
LGD 16	110	130	81	90	69	96
Beij 57	100	98	78	89	90	91
JMV 175	82	75	100	98	95	90
LGD 35	80	85	90	95	70	84
Beij 67	100	109	58	75	78	84
LGD 94	80	90	75	60	85	78
JNFb 338	97	87	90	63	53	78
NFb 202	98	65	72	82	68	77
JMV 223	100	65	68	70	57	72
LGI 189	128	90	50	42	40	70
LGD 41	60	68	81	71	65	69
LGD 45	80	70	72	60	58	68
LGI 203	60	48	65	77	70	64
NFb 112	50	60	55	80	70	63
LGI 322	49	83	52	66	60	62
NFb 193	75	55	50	65	60	61
LGD 49	70	52	48	60	65	59
NFb 363	56	62	49	64	59	58
LGD 93	85	75	32	50	23	53
LGI 199	60	64	42	45	49	52
JNFb 263	59	60	38	55	43	51
JMV 306	42	55	50	48	60	51
LGI 147	35	40	45	52	48	44
NFb 200	33	35	50	47	45	42
JMV 107	50	46	30	37	42	41
JNFb 186	40	28	45	38	49	40
NFb 198	26	53	24	65	32	40
JNFb 307	43	57	30	45	20	39
LGD 21	39	31	42	38	35	37
LGI 106	35	45	40	25	20	33

---

JNFb 114	25	32	35	28	40	32
JMV 316	40	35	28	25	32	32
LGI 191	24	32	28	21	50	31
LGD 68	22	35	25	30	38	30
LGI 299	20	39	31	27	33	30
JMV 358	27	31	35	28	29	30
LGD 5	31	53	21	18	22	29
LGD 36	30	23	32	25	35	29
LGI 394	37	14	16	41	32	28
JMV 208	32	19	34	20	25	26
JMV 371	17	24	26	30	33	26
JMV 396	10	11	31	53	15	24
LGI - P 391	23	25	19	21	27	23
NFb 308	20	17	19	31	23	22
LGI 384	11	17	22	32	28	22
NFb 344	25	14	18	21	17	19
LGD 10	20	18	25	15	12	18
NFb 176	12	15	20	18	25	18
JNFb 297	6	8	15	21	30	16
LGD 17	10	12	20	18	15	15
LGD 60	10	18	11	21	15	15
LGI 360	10	9	22	19	15	15
LGD 4	10	15	8	17	20	14
JNFb 343	9	5	13	19	24	14
LGD 32	17	9	10	18	11	13
LGI- P 389	7	15	9	21	13	13
LGD 1	13	9	11	14	8	11
LGD 82	10	15	9	5	16	11
LGD 9	18	10	9	6	7	10
Beij 52	10	5	13	8	9	9
JNFb 187	12	14	10	6	3	9
LGI 110	5	5	8	7	10	7
LGI 362	8	5	4	3	15	7
LGI - P 388	11	9	3	5	7	7
LGI - P 400	9	12	5	6	3	7
LGD 25	4	5	7	3	1	4
JMV 215	3	5	1	7	4	4
Beij 98	3	5	2	5	0	3
JNFb 332	4	5	2	3	1	3
LGI- P 385	3	0	2	7	3	3
LGI - P 386	5	1	1	0	3	2
NFb 247	0	1	1	1	0	1
JNFb 321	0	0	0	0	0	0

---

## ANEXO 6

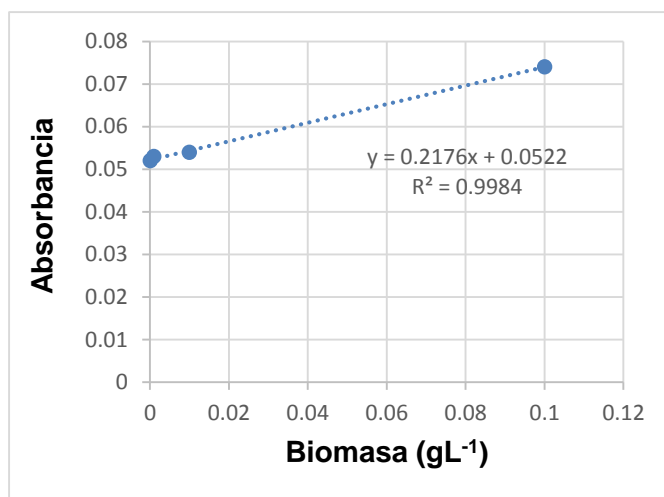
### Determinación del tiempo requerido para alcanzar el mayor número de células con gránulos de PHA

Bacterias Código	Tiempo																														
	12 horas						24 horas						36 horas						48 horas						60 horas						
	r1	r2	r3	r4	r5	x	r1	r2	r3	r4	r5	x	r1	r2	r3	r4	r5	x	r1	r2	r3	r4	r5	X	r1	r2	r3	r4	r5	x	
NFb 155	M1	29	43	45	61	47	45	185	165	170	150	180	170	306	290	310	293	299	300	240	242	240	246	230	240	92	95	105	98	110	100
	M2	45	28	32	30	40	35	197	212	200	179	247	207	318	302	310	298	290	304	254	251	232	236	252	245	99	106	108	112	100	105
	M3	43	27	35	55	40	40	175	190	189	160	176	178	286	298	300	302	292	296	232	247	238	226	230	235	77	90	95	115	98	95
NFb130	M1	45	50	37	28	30	38	145	154	186	152	198	167	289	293	288	291	294	291	238	231	233	229	234	233	115	102	106	110	117	110
	M2	37	34	30	30	44	35	177	179	170	164	175	173	303	287	290	293	295	294	238	232	239	241	235	237	125	130	115	104	101	115
	M3	46	54	42	35	28	41	170	163	187	150	180	170	275	282	300	276	290	285	235	232	240	238	228	235	100	92	114	107	112	105
JNFb 135	M1	95	82	100	98	85	92	166	188	191	186	194	185	308	322	292	237	230	278	216	263	251	198	230	232	106	130	135	111	98	116
	M2	69	91	113	122	95	98	179	183	170	163	175	174	299	290	297	288	281	291	220	264	257	199	235	235	97	102	104	98	109	102
	M3	90	82	110	100	93	95	185	190	172	178	180	181	303	300	290	250	270	283	227	265	230	200	221	229	87	120	113	110	100	106
NFb 149	M1	40	45	36	38	31	38	190	197	171	175	187	184	255	246	250	251	248	250	201	209	220	210	215	211	107	97	84	79	103	94
	M2	41	50	48	41	30	42	169	182	184	190	175	180	235	254	248	246	252	247	205	235	208	220	195	213	69	101	80	92	88	86
	M3	30	44	38	33	40	37	180	175	185	190	195	185	260	255	245	240	265	253	220	213	208	200	190	206	70	100	105	95	80	90
LG 86	M1	26	19	24	20	31	24	155	175	146	166	158	160	260	271	265	268	275	268	200	210	195	190	220	203	90	70	78	96	76	82
	M2	16	18	14	25	22	19	175	165	150	171	154	163	276	265	260	280	279	272	204	211	202	213	206	207	79	75	90	82	74	80
	M3	11	19	15	30	25	20	153	147	170	155	160	157	255	268	270	276	280	270	200	212	189	216	210	205	86	89	90	65	60	78
NFb 102	M1	10	9	15	12	14	12	180	184	170	161	215	182	290	238	219	282	256	257	197	203	215	192	188	199	15	23	28	19	30	23
	M2	13	17	22	8	10	14	185	191	181	195	198	190	241	244	220	235	225	233	194	190	173	187	161	181	41	22	19	35	18	27
	M3	12	15	18	8	12	13	191	188	170	166	200	183	255	248	210	260	250	245	190	180	205	198	177	190	23	18	27	11	16	19
JNFb 151	M1	92	95	79	99	100	93	225	230	220	218	237	226	181	190	193	177	209	190	182	194	200	175	213	193	42	46	40	62	55	49
	M2	70	90	125	109	81	95	228	233	244	230	240	235	221	200	198	217	213	210	190	170	162	188	174	177	63	51	68	43	35	52
	M3	75	88	110	85	97	91	234	227	240	220	224	229	195	210	190	200	206	200	165	187	196	198	180	185	32	50	60	47	41	46
JMV 238	M1	15	17	12	18	23	17	245	238	230	227	250	238	221	211	215	202	216	213	179	188	186	184	183	184	34	42	36	30	28	34
	M2	17	11	15	13	19	15	220	224	259	250	262	243	218	215	212	217	223	217	188	174	179	181	178	180	28	23	33	26	40	30
	M3	10	15	9	18	13	13	228	230	245	225	252	236	217	205	218	220	215	215	175	197	165	180	194	182	18	31	34	25	22	26
NFb 350	M1	25	17	19	21	28	22	249	275	220	245	231	244	197	202	190	213	183	197	168	177	194	186	190	183	100	90	82	98	80	90
	M2	28	29	12	16	15	20	252	224	260	256	268	252	182	238	225	167	203	203	170	180	185	174	131	168	90	85	75	65	100	83
	M3	22	25	18	27	13	21	235	228	250	237	245	239	215	198	210	200	175	200	168	194	180	173	155	174	65	57	90	82	71	73
JNFb 152	M1	61	56	32	40	36	45	212	238	233	207	225	223	188	196	190	175	180	186	136	150	140	146	155	145	23	17	18	20	12	18
	M2	70	41	36	60	78	57	231	238	225	228	213	227	185	190	180	195	191	188	150	157	160	145	140	150	15	28	16	31	20	22
	M3	55	50	43	57	65	54	220	235	240	200	230	225	195	210	215	178	180	196	145	169	150	155	158	155	18	20	10	28	24	20

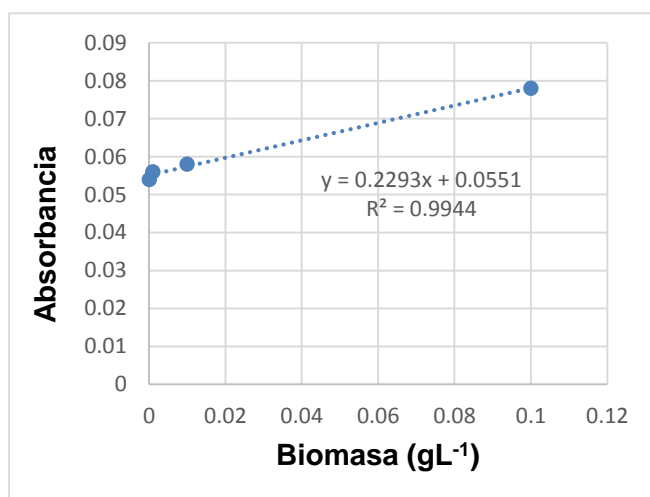
## ANEXO 7

**Absorbancia de biomasa de *Azospirillum* sp.130 y curva patrón para determinar la concentración en medio de cultivo balanceado ( $r_1$ ,  $r_2$ ,  $r_3$ ).**

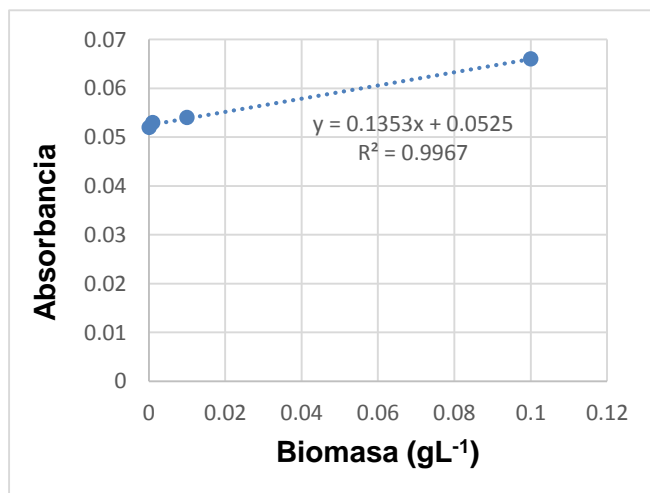
$r_1$	
Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,1	0.074
0,01	0.054
0,001	0.053
0,0001	0.052



$r_2$	
Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,1	0,078
0,01	0,058
0,001	0,056
0,0001	0,054



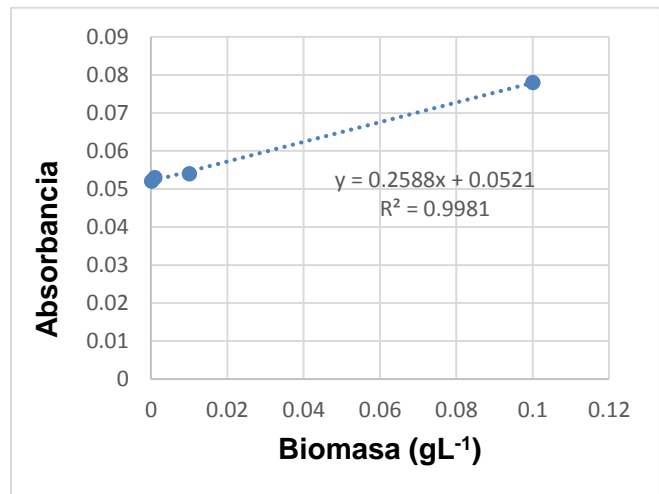
$r_3$	
Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,1	0,066
0,01	0,054
0,001	0,053
0,0001	0,052



**Absorbancia de biomasa de *Azospirillum* sp.130 y curva patrón para determinar la concentración en medio de cultivo desbalanceado ( $r_1$ ,  $r_2$ ,  $r_3$ ).**

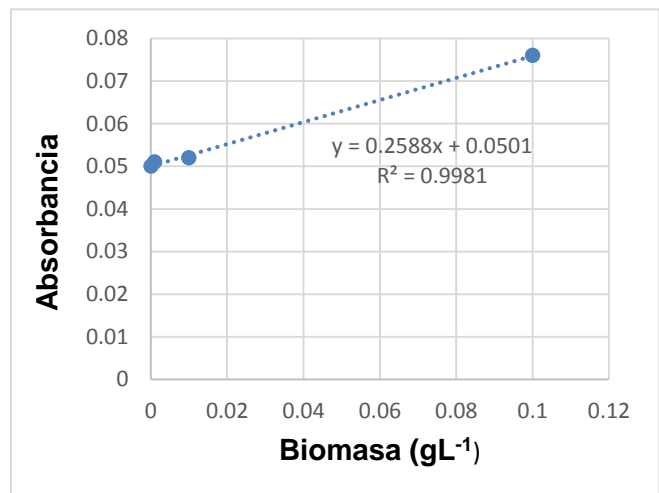
**$r_1$**

Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,1	0,078
0,01	0,054
0,001	0,053
0,0001	0,052



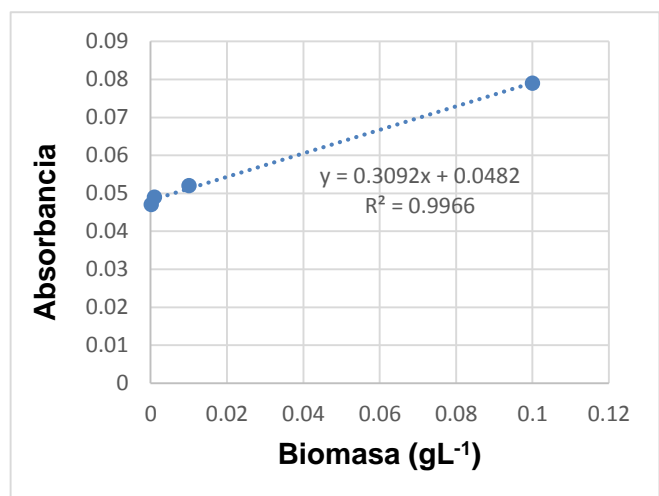
**$r_2$**

Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,1	0,076
0,01	0,052
0,001	0,051
0,0001	0,050



**$r_3$**

Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,1	0,079
0,01	0,052
0,001	0,049
0,0001	0,047

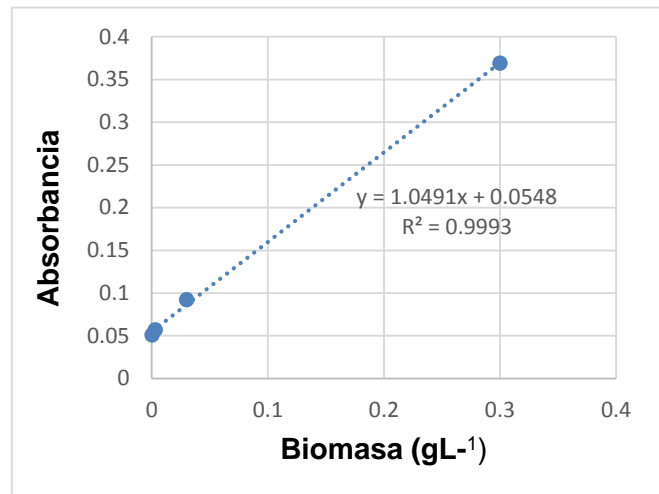




**Absorbancia de biomasa de *Azospirillum* sp.155 y curva patrón para determinar la concentración en medio de cultivo balanceado ( $r_1$ ,  $r_2$ ,  $r_3$ ).**

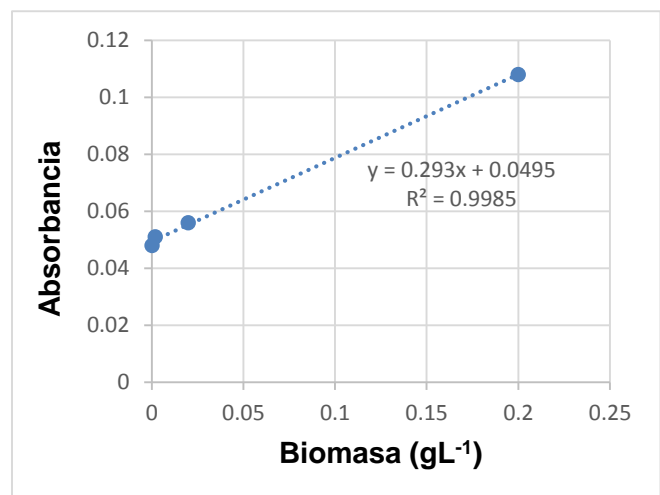
**R1**

Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,3	0,369
0,03	0,092
0,003	0,057
0,0003	0,051



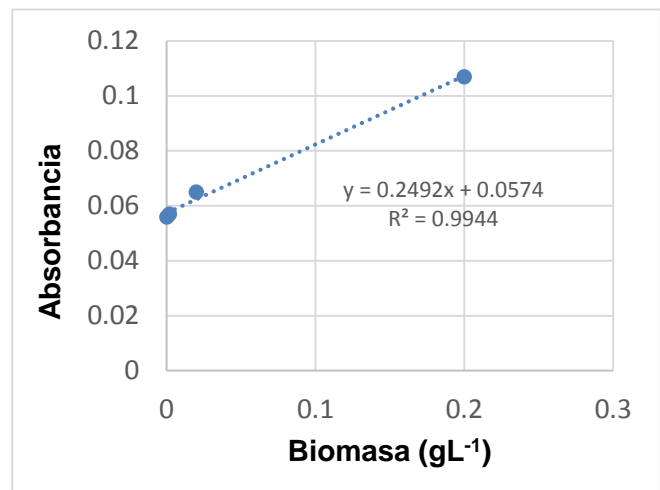
**r<sub>2</sub>**

Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,2	0,108
0,02	0,056
0,002	0,051
0,0002	0,048



**r<sub>3</sub>**

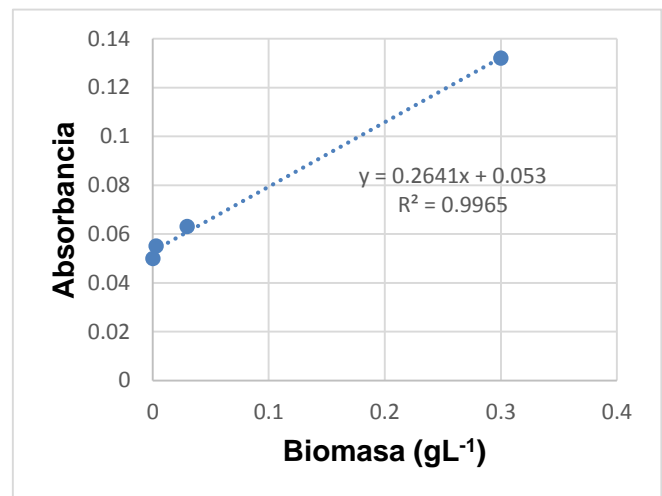
Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,2	0,107
0,02	0,065
0,002	0,057
0,0002	0,056



**Absorbancia de biomasa de *Azospirillum* sp.155 y curva patrón para determinar la concentración en medio de cultivo desbalanceado ( $r_1$ ,  $r_2$ ,  $r_3$ ).**

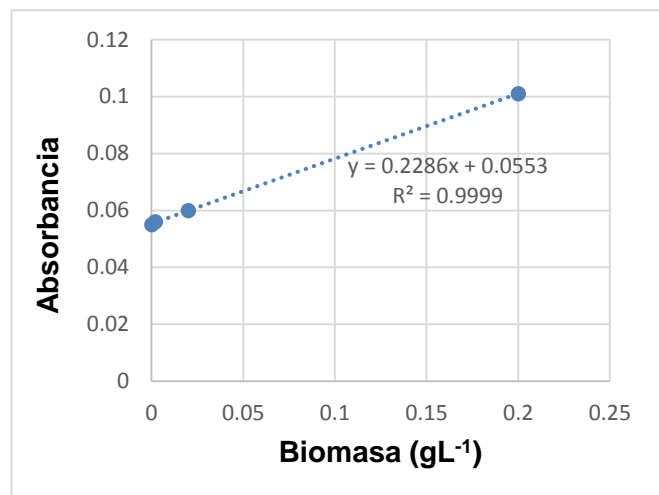
**$r_1$**

Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,3	0,132
0,03	0,063
0,003	0,055
0,0003	0,050



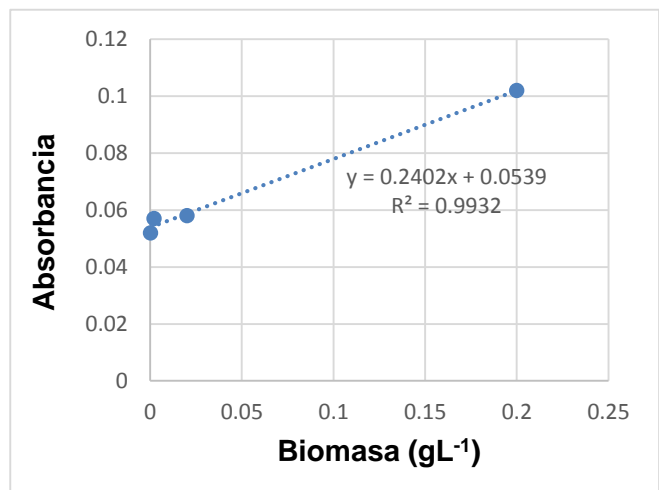
**$r_2$**

Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,2	0,101
0,02	0,060
0,002	0,056
0,0002	0,055



**$r_3$**

Biomasa (g $L^{-1}$ )	Absorbancia (600nm)
0,2	0,102
0,02	0,058
0,002	0,057
0,0002	0,052



## ANEXO 8

### Absorbancia de la biomasa de *Azospirillum* spp. en el proceso fermentativo

Tiempo horas	Medio Balanceado							
	NFb 130				NFb 155			
	M1	M2	M3	$\bar{X}$	M1	M2	M3	$\bar{X}$
4	0,062	0,055	0,060	0,059	0,095	0,090	0,091	0,092
8	0,075	0,060	0,069	0,068	0,107	0,107	0,107	0,107
12	0,068	0,063	0,067	0,066	0,108	0,100	0,104	0,104
16	0,071	0,072	0,076	0,073	0,114	0,115	0,116	0,115
20	0,079	0,075	0,077	0,077	0,120	0,118	0,119	0,119
24	0,095	0,082	0,090	0,089	0,114	0,102	0,108	0,108
28	0,096	0,087	0,093	0,092	0,116	0,104	0,110	0,110
32	0,108	0,099	0,102	0,103	0,120	0,116	0,118	0,118
36	0,097	0,096	0,095	0,096	0,110	0,106	0,108	0,108

Tiempo horas	Medio Desbalanceado							
	NFb 130				NFb 155			
	M1	M2	M3	$\bar{X}$	M1	M2	M3	$\bar{X}$
4	0,066	0,067	0,068	0,067	0,100	0,100	0,100	0,100
8	0,076	0,080	0,078	0,078	0,123	0,110	0,118	0,117
12	0,069	0,071	0,070	0,070	0,124	0,115	0,121	0,120
16	0,089	0,091	0,090	0,090	0,144	0,138	0,141	0,124
20	0,090	0,081	0,087	0,086	0,134	0,128	0,131	0,131
24	0,107	0,087	0,097	0,097	0,144	0,139	0,143	0,142
28	0,117	0,118	0,119	0,118	0,128	0,132	0,130	0,130
32	0,128	0,130	0,132	0,130	0,170	0,168	0,169	0,169
36	0,126	0,128	0,130	0,128	0,165	0,162	0,165	0,164

**ANEXO 9**  
**Pruebas de normalidad**

Tests of Normality  
Prueba de Kolmogorov-Smirnov

<i>Azospirillum</i> sp.155, medio balanceado		Rendimiento
N		3
Parámetros normales <sup>b,c</sup>	Media	,5785500
	Desviación típica	,00969155
	Absoluta	,177
Diferencias más extremas	Positiva	,175
	Negativa	-,177
Z de Kolmogorov-Smirnov		,307
Sig. asintót. (bilateral)		1,000

<i>Azospirillum</i> sp.155, medio balanceado		Rendimiento
N		3
Parámetros uniformes <sup>b,c</sup>	Mínimo	,56896
	Máximo	,58834
	Absoluta	,333
Diferencias más extremas	Positiva	,333
	Negativa	-,333
Z de Kolmogorov-Smirnov		,577
Sig. asintót. (bilateral)		,893

<i>Azospirillum</i> sp.155, medio desbalanceado		Rendimiento
N		3
Parámetros normales <sup>b,c</sup>	Media	,7671800
	Desviación típica	,00903042
	Absoluta	,176
Diferencias más extremas	Positiva	,176
	Negativa	-,173
Z de Kolmogorov-Smirnov		,305
Sig. asintót. (bilateral)		1,000

<i>Azospirillum</i> sp.155, medio desbalanceado		Rendimiento
N		3
Parámetros uniformes <sup>b,c</sup>	Mínimo	,75810
	Máximo	,77616
	Absoluta	,333
Diferencias más extremas	Positiva	,333
	Negativa	-,333
Z de Kolmogorov-Smirnov		,577
Sig. asintót. (bilateral)		,893

<i>Azospirillum</i> sp.130, medio balanceado		Rendimiento
N		3
Parámetros normales <sup>b,c</sup>	Media	,2254300
	Desviación típica	,00512535
	Absoluta	,317
Diferencias más extremas	Positiva	,227
	Negativa	-,317
Z de Kolmogorov-Smirnov		,549
Sig. asintót. (bilateral)		,924

<i>Azospirillum</i> sp.130, medio balanceado		Rendimiento
N		3
Parámetros uniformes <sup>b,c</sup>	Mínimo	,21961
	Máximo	,22927
	Absoluta	,474
Diferencias más extremas	Positiva	,333
	Negativa	-,474
Z de Kolmogorov-Smirnov		,821
Sig. asintót. (bilateral)		,510

<i>Azospirillum</i> sp.130, medio desbalanceado		Rendimiento
N		3
Parámetros normales <sup>b,c</sup>	Media	,2622900
	Desviación típica	,00906593
	Absoluta	,177
Diferencias más extremas	Positiva	,177
	Negativa	-,173
Z de Kolmogorov-Smirnov		,306
Sig. asintót. (bilateral)		1,000

<i>Azospirillum</i> sp.130, medio desbalanceado		Rendimiento
N		3
Parámetros uniformes <sup>b,c</sup>	Mínimo	,25315
	Máximo	,27128
	Absoluta	,333
Diferencias más extremas	Positiva	,333
	Negativa	-,333
Z de Kolmogorov-Smirnov		,577
Sig. asintót. (bilateral)		,893

