



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



**“Rendimiento de polihidroxicanoatos de *Azotobacter* spp. aisladas
de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Lambayeque, agosto-octubre,
2014”**

TESIS

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

PRESENTADO POR:

Br. Jara Ramos Irvin Gabriel Yancarlo

Br. Tafur Gonzales Jairo

LAMBAYEQUE, PERÚ

2015

“Rendimiento de polihidroxiclcanoatos de *Azotobacter* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Lambayeque, agosto-octubre, 2014”

TESIS

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

APROBADO POR:

Dr. Eduardo Julio Tejada Sánchez

PRESIDENTE

Dr. César García Espinoza

SECRETARIO

Lic. Julio César Silva Estela

VOCAL

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2015

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
2.1 Antecedentes de la investigación	3
2.2 Polihidroxiclcanoatos	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1 Material	9
3.1.1 Población y muestra de estudio	9
3.2 Métodos	9
3.2.1 Variables en estudio	9
3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis	10
3.2.3 Lugar de muestreo	10
3.2.4 Obtención de muestras de raíces con suelo rizosférico	10
3.2.5 Aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias	16
3.2.6 Identificación fenotípica de bacterias rizosféricas diazotróficas	16
3.2.7 Mantenimiento de los cultivos de <i>Azotobacter</i> spp.	26
3.2.8 Detección de gránulos de PHA en <i>Azotobacter</i> spp.	26
3.2.9 Selección de <i>Azotobacter</i> spp. según el número de células con gránulos	26
3.2.10 Rendimiento de polihidroxiclcanoatos de <i>Azotobacter</i> spp.	29
3.2.11 Análisis de datos	39
IV. RESULTADOS	42
4.1 Género <i>Azotobacter</i> identificado en bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias	42
4.2 <i>Azotobacter</i> spp. productoras de gránulos de polihidroxiclcanoatos detectadas y seleccionadas	45
4.3 Rendimiento Y (p/x) de PHA de <i>Azotobacter</i> spp.	45
V. DISCUSIÓN	55
VI. CONCLUSIONES	62
VII. RECOMENDACIONES	63
VIII. RESUMEN	64
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
X. ANEXOS	74

Índice de tablas

Tabla 1.	Posición de los campos de cultivo de <i>Zea mays</i> L., en Reque, donde se realizó el muestreo de las raíces con suelo rizosférico, durante agosto- octubre de 2014.....	12
Tabla 2.	Análisis físico- químico de muestras de suelo rizosférico de cultivos de <i>Zea mays</i> L. en Reque, Lambayeque de 2014.....	15
Tabla 3.	Características diferenciales de <i>Azotobacter</i> spp.....	25
Tabla 4.	Número de células con gránulos de PHA en primer cultivo de <i>Azotobacter</i> spp. en caldo Burk's modificado de producción por 72 horas.....	47
Tabla 5.	Número promedio de células con gránulos de PHA en segundo cultivo de <i>Azotobacter</i> spp. en caldo Burk's modificado de producción.....	48
Tabla 6.	Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de <i>Azotobacter</i> spp.....	49
Tabla 7.	Absorbancia (600nm) de biomasa de <i>Azotobacter</i> spp. cultivadas en glucosa como fuente de carbono.....	50
Tabla 8.	Concentración (gL ⁻¹) de biomasa de <i>Azotobacter</i> spp. cultivadas en glucosa como fuente de carbono.....	51
Tabla 9.	Concentración (gL ⁻¹) de polihidroxialcanoatos (PHA) de <i>Azotobacter</i> spp. a los 3 días de cultivo en glucosa como fuente de carbono.....	52
Tabla 10.	Rendimiento Y (p/x) de polihidroxialcanoatos de <i>Azotobacter</i> spp.....	54

Índice de figuras

Figura 1.	Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de Reque en Lambayeque 2014.....	11
Figura 2.	Ubicación de los campos de cultivo de <i>Zea mays</i> L. en Reque, donde se realizó el muestreo de raíces con suelo rizosférico durante agosto-octubre de 2014.....	13
Figura 3.	Cultivo de <i>Zea mays</i> L. en fase de prefloración.....	13
Figura 4.	Extracción de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	14
Figura 5.	Muestras de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. para el aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp.....	14
Figura 6.	Procedimiento para el aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	17
Figura 7.	Deshidratado bajo sombra de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	18
Figura 8.	Submuestra de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L.....	18
Figura 9	Suspensión de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en solución salina esterilizada.....	19
Figura 10.	Diluciones de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. en solución salina esterilizada.....	19
Figura 11.	Siembra en medio sólido LG.....	20
Figura 12.	Bacterias rizosféricas diazotróficas aerobias desarrolladas en medio LG.....	20
Figura 13.	Bacterias rizosféricas diazotróficas aerobias cultivadas por segunda vez en medio LG.....	21
Figura 14.	Observación microscópica de bacilos Gram negativos.....	21
Figura 15.	Prueba de catalasa positiva en <i>Azotobacter</i> sp.....	22
Figura 16.	Producción de acidez en caldo glucosa por <i>Azotobacter</i> sp.....	22
Figura 17.	Producción de acidez en caldo maltosa por <i>Azotobacter</i> sp.....	23
Figura 18.	Producción de acidez en caldo ramnosa por <i>Azotobacter</i> sp.....	23
Figura 19.	Reducción de nitratos por <i>Azotobacter</i> sp.....	24

Figura 20.	Cultivos puros de <i>Azotobacter</i> spp. en medio LG.....	27
Figura 21.	Siembra de <i>Azotobacter</i> sp en caldo de crecimiento Burk's modificado.....	27
Figura 22.	Tinciones de <i>Azotobacter</i> spp. con Sudan Negro B.....	28
Figura 23.	Flujograma del proceso de obtención de curva patrón para la cuantificación de biomasa por turbidimetría.....	30
Figura 24.	Caldo de producción Burk's modificado para el cultivo de <i>Azotobacter</i> spp.....	31
Figura 25.	Caldo de producción Burk's modificado cultivado con <i>Azotobacter</i> spp.	31
Figura 26.	Diluciones decimales de caldo de producción Burk's modificado.....	32
Figura 27.	Adición de solución salina esterilizada a la biomasa de <i>Azotobacter</i> sp.....	32
Figura 28.	Biomasa de <i>Azotobacter</i> spp.....	33
Figura 29.	Flujograma del proceso de obtención de biomasa y PHA.....	34
Figura 30.	Lectura de absorbancia a 600 nm.....	36
Figura 31.	Centrifugación de caldo Burk's cultivado con <i>Azotobacter</i> sp.....	36
Figura 32.	Peso de la biomasa seca de <i>Azotobacter</i> sp.....	37
Figura 33.	Adición de hipoclorito de sodio a la biomasa de <i>Azotobacter</i> spp.....	37
Figura 34.	Adición de cloroformo a la biomasa seca de <i>Azotobacter</i> spp.....	38
Figura 35.	Observación de dos fases, en biomasa de <i>Azotobacter</i> sp. tratada con hipoclorito de sodio y cloroformo.....	38
Figura 36.	Extracción de cloroformo más polímero PHA.....	40
Figura 37.	Polímero digerido con H ₂ SO ₄ 80%.....	40
Figura 38.	Lectura de absorbancia en espectrofotómetro con celda de cuarzo.....	41
Figura 39.	Frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. positivas al aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias.....	43
Figura 40.	Frecuencia de <i>Azotobacter</i> spp. en bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas de raíces con suelo de <i>Zea mays</i> L.....	43
Figura 41.	Colonias de <i>Azotobacter</i> spp. en medio LG.....	44

Figura 42.	Frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de <i>Zea mays</i> L. positivas al aislamiento de <i>Azotobacter</i> spp.....	44
Figura 43.	Gránulos de PHA de <i>Azotobacter</i> spp.....	46
Figura 44.	Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de <i>Azotobacter</i> spp. productoras de PHA.....	49

Índice de anexos

Anexo 1.	Cálculo de número de muestras de raíces con suelo rizosférico para el aislamiento de bacterias productoras de PHA.....	75
Anexo 2.	Medio de cultivo LG para <i>Azotobacter</i> spp.	76
Anexo 3.	Caldo Burk's modificado para <i>Azotobacter</i> spp.....	77
Anexo 4.	Técnica de coloración con Sudán Negro B.....	78
Anexo 5.	Cuantificación de polihidroxialcanoatos por espectrofotometría.....	79

I. INTRODUCCIÓN

Los plásticos son la base de la mayoría de los productos de consumo habituales, pero una vez que dejan de ser usados, se convierten en residuos permanentes, difíciles de eliminar del ambiente y al no ser biodegradables, se acumulan en los vertederos, contaminando el ambiente. Además, para la producción de plásticos tradicionales se utiliza petróleo, una fuente de energía no renovable, contaminante, causante de emisiones de gases con efecto invernadero (Baca & Sánchez, 2010). En 1950 se produjeron 1,5 millones de toneladas de plásticos, el 2010 la cifra se incrementó a 250 millones y se calcula que el 2015 llegará a 330 millones de toneladas (Gómez, 2013).

Los bioplásticos del tipo de los polihidroxialcanoatos, PHA, constituyen una alternativa de solución a la problemática de los plásticos derivados del petróleo. Los PHA son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos, en los que el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente y presentan características fisicoquímicas similares a los poliésteres sintéticos. Se depositan intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión y pueden llegar a representar más del 80% del peso celular de las bacterias productoras (Rivera & Nevárez, 2009).

Los PHA no son producidos a gran escala por sus altos costos. Producir 1kg de plástico bacteriano cuesta 16 dólares, comparado con 1 dólar por kg de plástico derivado del petróleo (Segura et al., 2007). En este contexto, se requiere aislar bacterias con un mayor rendimiento de PHA, fáciles de cultivar y que utilicen sustratos baratos y disponibles. Las bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azotobacter* spp. se encuentran en el suelo rizosférico de diferentes cultivos agrícolas y acumulan PHA durante todo el ciclo de crecimiento; sin embargo, en Lambayeque no se han investigado, con la perspectiva de utilizarlas para la producción de PHA.

La investigación de bacterias del género *Azotobacter* nativas posibilita la obtención de cultivos capaces de acumular grandes cantidades del polímero, que presenten crecimiento rápido, bajo diversas condiciones nutricionales y en sustratos de bajo costo. Las bacterias obtenidas en el presente estudio, constituirán la base para la investigación de PHA, en un proceso productivo completamente económico y ambientalmente amigable, así como también para la obtención de PHA con propiedades físicas nuevas o mejoradas, que permitan ampliar su uso en aplicaciones de alto valor agregado.

Por lo expuesto, se planteó la siguiente investigación cuyo problema fue ¿Cuál es el rendimiento de polihidroxialcanoatos, PHA, de *Azotobacter* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. “maíz” en Lambayeque?. El objetivo general fue: Determinar el rendimiento de PHA, de *Azotobacter* spp. aisladas de suelo rizosférico de maíz en Lambayeque. Los objetivos específicos fueron: Aislar bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias de raíces con suelo rizosférico de maíz, identificar el género *Azotobacter* en las bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias, detectar gránulos de PHA en las células de *Azotobacter* spp., seleccionar *Azotobacter* spp. según el número de células con PHA y determinar el rendimiento de PHA. La hipótesis planteada fue: Las especies de *Azotobacter* aisladas de suelo rizosférico de maíz alcanzan un rendimiento de PHA mayor al 60% de su peso seco.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Antecedentes de la investigación

Las bacterias diazotróficas presentan niveles altos de acumulación de PHA. En este contexto, se aislaron nueve bacterias Gram negativas de nódulos de diversos hospederos y se identificaron preliminarmente como *Rhizobium* spp. Estas bacterias fueron cultivadas en medio basal suplementado, obteniendo con dos de ellas 122 y 227mg PHA L⁻¹, volúmenes correspondientes a 18,34 y 30% del peso seco celular, respectivamente. La cepa 4033 alcanzó la mayor productividad con 0,64 mgPHA biomasa⁻¹, siendo identificada como *Mesorhizobium plurifarum*, mediante la técnica de análisis comparativo de perfiles de proteínas y RFLP. La identificación espectroscópica del polímero demostró que el PHA producido fue poli-B-hidroxitirato, PHA (Lasala *et al.*, 2004).

Se realizó una investigación con el objetivo de aislar *Cupriavidus necator* y determinar la concentración y rendimiento de PHA. Se recolectaron muestras de raíces y suelo rizosférico de *Zea mays* con las que se realizaron diluciones y se sembraron en agar Mc Conkey, seleccionándose las colonias

no fermentadoras de lactosa. Éstas fueron cultivadas en agar King-B y entre las no formadoras de fluoresceína, se identificó *C. necator*. Se obtuvieron 29 aislados que fueron llevados a un proceso de fermentación en lote discontinuo alimentado. Después de 24 horas, se inició la alimentación, cada 12 horas con una solución concentrada de fructuosa y se realizaron tinciones con Sudan negro B para seleccionar las bacterias con mayor número de gránulos de PHA. Los valores máximos en la concentración de biomasa y PHA alcanzados fueron de 626 y 3,58gL⁻¹, respectivamente. *C. necator* L45 5-4 alcanzó el mayor rendimiento, correspondiente a 0,67gg⁻¹, con un porcentaje de 67 a las 48 horas. Se demostró que las bacterias nativas son promisorias para la producción de PHA (Lisboa & Segura, 2010).

Con el objetivo de determinar la concentración de PHA de *Azospirillum* se colectaron muestras de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill y *Oryza sativa* L. Las bacterias se aislaron de fragmentos de raíces previamente desinfectadas y sembradas en medio NFb semisólido, obteniéndose 96 colonias, entre las cuales se identificó *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Las bacterias se llevaron a un proceso de fermentación en lote alimentado discontinuo, utilizando como medio de producción caldo *Azotobacter* modificado. El cultivo se alimentó con una solución saturada de ácido málico cada 12 horas y se realizaron tinciones con Sudan negro B, para seleccionar las bacterias con mayor número de gránulos de PHA. La concentración de PHA alcanzó un máximo de 0,661gL⁻¹ con *A. lipoferum* y 0,738gL⁻¹ con *A. brasilense*. Se demostró que *A. lipoferum* KMT-73 y *A. brasilense* KMT-19 son promisorias para la producción de PHA (Baca & Sánchez, 2010).

La producción de PHA se incrementa en condiciones desfavorables. En este contexto, se obtuvieron 17 aislados bacterianos en áreas urbanas contaminadas y 13 en áreas montañosas no contaminadas. Las 30 bacterias fueron Gram negativas y se identificaron como *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Enterobacter*. Mediante la tinción con Sudan Negro B se demostró la presencia de gránulos de PHA y en la cuantificación, los mayores valores alcanzados con las bacterias de áreas urbanas fueron de

50,4; 40,6 y 37%, en comparación con 45,8; 42,4 y 37,6% de las áreas no contaminadas. Los genes *phaC*₁/*C*₂ fueron amplificados en las bacterias, obteniendo un fragmento de 540 pares de bases, correspondiente al gen responsable de la síntesis de PHA (Razzaq *et al.*, 2010).

La agroindustria que produce aceite de *Olea europea* L. “olivo” genera los residuos alpeorujo y alpechin, que fueron investigados para la producción de PHA por 16 bacterias fijadoras de nitrógeno, utilizando como testigos *Azotobacter chroococcum* y *A. vinelandii* cepas 1 y 2. El 25% de las bacterias que sintetizaron gránulos de PHA, observados con la tinción Sudan Negro B y Azul de Nilo II, se cultivaron en medio Burk’s sin nitrógeno, alcanzándose 0,56 gL⁻¹ de PHA con *A. chroococcum*. La adición de NH₄Cl 0,12%, incrementó el PHA a 2,3 gL⁻¹ con *A. vinelandii* (67% del peso de la biomasa seca), después de 72 horas de incubación. En alpeorujo previamente digerido en anaerobiosis y suplementado con micronutrientes se cuantificó 1,063 gL⁻¹ de PHA, correspondiente a 33% del peso la biomasa de *A. vinelandii*, concluyéndose que este residuo se puede utilizar para la producción del polímero (Cerrone, 2011).

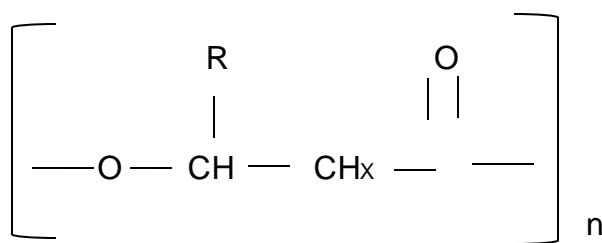
En suelos contaminados con residuos del beneficio de *Furcraea bedinghausii* se aislaron 248 colonias bacterianas, se realizaron tinciones con rojo y azul de Nilo, detección por PCR del gen *phaC* y las bacterias positivas a dichas pruebas fueron identificadas utilizando análisis filogenético de secuencias del 16S ADNr y pruebas bioquímicas. A su vez, en cultivo sumergido con medio mínimo de sales y glucosa como fuente de carbono se obtuvo el polímero, cuya naturaleza química se determinó mediante cromatografía de gases. El 1,6 % de las bacterias sintetizó PHA, identificándose *Bacillus megaterium* (50%), *B. mycoides* (25%) y *Gordonia* sp. (25%). El gen *phaC* se detectó en *B. megaterium*, cuantificándose 63,8 - 95,3 mg g⁻¹ de PHB. Las bacterias aisladas tienen potencial para la producción de PHA a partir de residuos agroindustriales, dándole un valor agregado y reduciendo su condición contaminante (Sánchez *et al.*, 2012).

La producción de polihidroxibutirato (PHB) por *A. vinelandii* se optimizó, utilizando los modelos Plackett- Burman y Box- Behnken. La bacteria se identificó a nivel molecular y se cultivó en medio con sacarosa como fuente de carbono, determinándose que la acumulación de gránulos de PHB en las células dependió de la fuente de carbono, nitrógeno, minerales, temperatura y aireación. Las variables más significativas fueron agitación (90,04% confianza), FeSO₄ (81,16%), sacarosa (78,88%) y NaNO₃ (77,27%). El valor máximo de PHB fue 0,88 gg⁻¹ de células deshidratadas. Se concluyó que las estrategias investigadas pueden ser utilizadas en la producción del polímero (El-Raheem *et al.*, 2013).

La influencia de la aireación se investigó en la producción de PHB por *A. vinelandii* mutante en el gen que codifica para la enzima II A. La bacteria y su mutante se cultivaron en 100 y 200 mL de medio con sacarosa, analizándose el PHB. Con alto nivel de aireación, *A. vinelandii* alcanzó 1,52 gPHBg⁻¹ proteína y 0,22 gPHBg⁻¹ sacarosa. Con el mutante OPN se alcanzó 2,69gPHBg⁻¹ proteína y 0,30gPHBg⁻¹ sacarosa. Se concluyó que la aireación y la mutación influyen en el PHB producido por *A. vinelandii* (Peña *et al.*, 2014)

2.2 Polihidroxicanoatos

Identificados en 1926 por Maurice Lemoigne, los PHA son poliésteres alifáticos constituidos por monómeros de 1000-3000 unidades. Según Rivera & Nevárez (2009), los monómeros de PHA poseen la estructura general siguiente:



Estructuralmente los PHA son polímeros lineales de (R) –3–hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del siguiente monómero. El radical R puede ser un átomo de hidrógeno o una cadena de hasta trece átomos de carbono, que puede contener insaturaciones, cadenas cíclicas, grupos aromáticos e incluso otros átomos como bromo, flúor o cloro. La naturaleza del radical R determina la identidad de la unidad monoméricas y junto con el valor de x (que puede variar de 600 a 35 000) las propiedades del polímero. Se han identificado más de 100 unidades monoméricas como constituyentes de estos poliésteres (Dantas, 2005).

Según la composición de los monómeros en la cadena, los PHA pueden ser clasificados en homopolímeros (un tipo de monómero) y copolímeros (más de un tipo de monómero). Dependiendo del número de átomos de carbono presentes en la cadena de un monómero, se consideran dos clases: PHA de cadena corta (3 a 5 átomos de carbono) o PHA – SCL (short chain length), con ácidos 3-hidroxibutírico (3HB) y 3-hidroxivalérico (3HV) y polímeros de cadena media (6 – 14 átomos de carbono) o PHA – MCL (medium chain length), que contienen monómeros de C6 (3-hidroxihexanoato) a C14 (3–hidroxitetradecanoato). Los PHA de cadena corta son producidos por *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *A. chroococcum* y *Methylobacterium organophilum* entre otros, mientras que los PHA de cadena media son encontrados en *Pseudomonas oleovorans*, *P. aeruginosa* y otras pseudomonas fluorescentes (Dantas, 2005; Ávila, 2007).

Las dos clases de PHA más comunes son el homopolímeros polihidroxibutirato P (3HB) y el copolímero de polihidroxibutirato y polihidroxivalerato conocido como polihidroxibutirato-valerato (PHBV). El P (3HB), presenta unidades repetidas de ácido 3-hidroxibutírico, todas en la configuración D (-), debido a la estereospecificidad de las enzimas involucradas en la síntesis, lo que lo hace totalmente cristalino y frágil. La masa molecular del P (3HB) bacteriano varía entre 10^3 a 3×10^8 Da, con una

polidispersidad en torno a 2. Las densidades del polímero amorfo y cristalino respectivamente son de 1,18 y 1,26 gcm⁻³. Es soluble en cloroformo y en hidrocarburos halogenados, con poca resistencia frente a los ácidos y las bases, pero es muy resistente a la radiación ultravioleta (Hermida y Díaz, 2004; Dantas, 2005; Avila, 2007).

Los PHA son producidos por plantas, pero el rendimiento es menor al 10% del peso seco, en cambio, algunas bacterias acumulan 80-90% de su peso en PHA. Entre las bacterias más estudiadas está *Cupriavidus necator*, *Bacillus alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Halomonas* y *Azotobacter* spp. Los PHA se acumulan en vesículas intracelulares y su formación está asociada a la deficiencia de nutrientes como N, P, K, Mg, exceso de la fuente de carbono y como respuesta a diversos factores de estrés ambiental (Nikel *et al.*, 2006).

Las bacterias del género *Azotobacter* sintetizan PHA mediante un mecanismo metabólico que involucra tres enzimas: una cetotiolasa, que condensa dos moléculas de acetilCoA para formar acetoacetil CoA, una acetoacetil-CoA reductasa, que convierte este compuesto en 3-hidroxibutiril-CoA y una polimerasa que polimeriza los monómeros. Las enzimas están codificadas por los genes *phaB*, *phaA* y *phaC*, respectivamente. También se mencionan las proteínas estructurales *fasinas*, que afectan el tamaño y pureza de los gránulos y además de los genes estructurales se ha encontrado *phaP*, que codifica para una proteína asociada a los gránulos de PHA y los genes *phaF* y *phaR*, con una posible función en la síntesis y acumulación de PHA (De Almeida *et al.*, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

Bacterias del género *Azotobacter* aisladas de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L. “maíz”.

3.1.1 Población y muestra de estudio

La población estuvo constituida por las bacterias del género *Azotobacter* productoras de polihidroxialcanoatos presentes en raíces con suelo adherido de los cultivos de maíz, en campos comerciales del distrito de Reque y se investigó una muestra de bacterias aisladas de 126 unidades de muestreo durante agosto-octubre de 2014. El número de muestra fue calculado según la fórmula mencionada por Alvitres, 2000 (Anexo 1), tomando en cuenta una prevalencia de 30% determinada por los investigadores en un estudio piloto.

3.2 Métodos

3.2.1 Variables en estudio

Independiente: *Azotobacter* spp. aisladas de raíces con suelo rizosférico de maíz.

Dependiente: Rendimiento de PHA.

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación fue descriptivo (Hernández *et al.*, 2010) y para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (1986), mencionado por Vásquez *et al.* (2012).

3.2.3 Lugar de muestreo

Se colectaron 126 muestras de raíces con suelo rizosférico en 18 campos comerciales de Reque (Figura 1), determinando la posición de los puntos de muestreo (Tabla 1, figura 2), con un GPS GARMIN e Trex Vista HCx. El distrito de Reque se encuentra a 06° 52' 47" y 06° 48' 55" de latitud sur y 79° 50' 47" y 79° 44' 59" de longitud oeste del Meridiano de Greenwich. Limita por el norte con Monsefú y Pomalca, por el sur con Lagunas, por el este con Tumán y Zaña y por el oeste con Monsefú y Zaña (Municipalidad Distrital de Reque, 2014).

3.2.4 Obtención de muestras de raíces con suelo rizosférico

En los campos de cultivo de maíz en fase de pre-floración (Figura 3) se colectaron aproximadamente 50g de raíces con suelo adherido (Figura 4), se depositaron en bolsas de polietileno (Figura 5) debidamente identificadas y se transportaron en una caja térmica ($10 \pm 1^{\circ}\text{C}$), para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

En simultáneo al muestreo de raíces con suelo adherido para el aislamiento, se colectó una muestra representativa de 1Kg de suelo para realizar el análisis físico-químico en el Instituto Nacional de Innovación y Extensión Agraria, Estación Experimental Vista Florida de Chiclayo. Según los resultados (Tabla 2), el suelo es medianamente alcalino (pH 7,6) y ligeramente salino ($\text{CE } 2,24 \text{ dSm}^{-1}$), con textura franco arenoso-arcilloso, niveles bajos de materia orgánica (2,3%), nitrógeno (0,103%) y fósforo, disponible (5,9 ppm), así como un contenido medio de potasio (300,0 ppm).

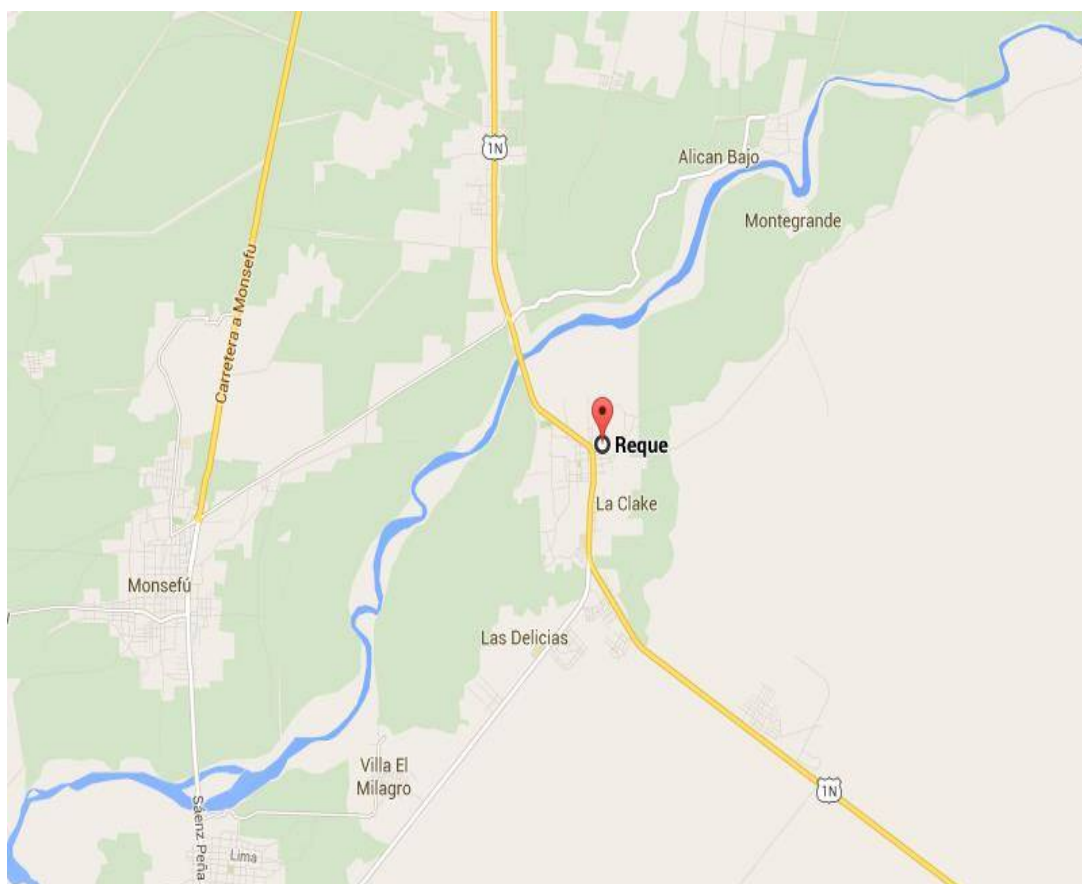


Figura 1. Ubicación del lugar de muestreo en el distrito de Reque en Lambayeque 2014
(<https://www.google.com.pe/maps/place/Tranca+de+Reque,+Reque/@>).

Tabla 1. Posición de los campos de cultivo de *Zea mays L.*, en Reque, donde se realizó el muestreo de raíces con suelo rizosférico, durante agosto- octubre de 2014

Campo agrícola	Puntos	Posición (UTM)-17M		msnm	Campo agrícola	Puntos	Posición (UTM)-17		msnm
1	1-2	629770	9241454	27	10	64-65-66	629801	9241570	27
2	3-4	629774	9241464	27	11	67-68	629877	9241571	27
3	5-6-7	629732	9241465	27	12	69-70	629867	9241577	27
4	8-9	629747	9241470	28	13	71-72-73	629867	9241577	28
5	10-11	629760	9241475	27	14	74-75-76	629844	9241579	28
6	12-13	629770	9241476	27	15	77-78	629844	9241572	28
7	14-15-16	629762	9241486	27	16	79-80	629816	9241571	27
8	17-18	629770	9241486	27	17	81-82-83	629828	9241567	27
9	19-20	629763	9241500	28	18	84-85	629830	9241559	27
10	21-22	629746	9241501	27	1	86-87	629833	9241547	26
11	23-24	629758	9241518	27	2	88-89	629836	9241528	27
12	25-26	629758	9241526	27	3	90-91	629837	9241536	27
13	27-28-29	629725	9241526	27	4	92-93-94	629843	9241532	26
14	30-31	629703	9241540	27	5	95-96	629854	9241441	29
15	32-33-34	629701	9241554	27	6	97-98	629862	9241466	29
16	35-36	629725	9241559	27	7	99-100-101	629915	9241474	29
17	37-38	629741	9241563	27	8	102-103	629901	9241470	29
18	39-40	629733	9241569	27	9	104-105-106	629888	9241485	28
1	41-42-43	629733	9241575	27	10	107-108	629886	9241497	28
2	44-45	629746	9241578	26	11	109-110	629881	9241498	28
3	46-47-48	629779	9241610	27	12	111-112	629878	9241506	28
4	49-50-51	629768	9241608	28	13	113-114-115	629867	9241515	28
5	52-53	629765	9241584	27	14	116-117	629856	9241511	27
6	54-55	629766	9241568	27	15	118-119	629819	9241517	28
7	56-57-58	629778	9241577	27	16	120-121	629789	9241518	28
8	59-60	629785	9241564	25	17	122-123-124	629870	9241430	27
9	61-62-63	629792	9241562	27	18	125-126	629870	9241445	27



Figura 2. Ubicación de los campos de cultivo de *Zea mays* L. en Reque, donde se realizó el muestreo de raíces con suelo rizosférico durante agosto – octubre de 2014.



Figura 3. Cultivo de *Zea mays* L. en fase de prefloración.



Figura 4. Extracción de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L.



Figura 5. Muestras de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L. para el aislamiento de *Azotobacter* spp.

Tabla 2. Análisis físico- químico de muestras de suelo rizosférico de cultivos de *Zea mays* L. en Reque, Lambayeque de 2014

Clase textural	pH	CE (dSm ⁻¹)	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)
Fr.Ar.Ao	7,69	2,24	2,3	0,103	5,9	300,0

3.2.5 Aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias

Las muestras de raíces con suelo rizosférico adherido se deshidrataron bajo sombra, a temperatura ambiente por 72 horas. Después, se cortaron en fragmentos de aproximadamente 5 cm, aleatoriamente se tomaron submuestras de 10g de raíces junto con el suelo adherido y se depositaron en frascos de 250mL de capacidad (Figuras 6, 7, 8), conteniendo 90mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85%, p/v). Después de agitar el contenido de los frascos (10^{-1}) manualmente durante 10 minutos se tomó 1mL y se diluyó (10^{-2}) en 9mL de solución salina esterilizada (Figuras 9, 10). Se tomó una alícuota de cada dilución y se sembró mediante la técnica de agotamiento y estría en medio sólido LG para *Azotobacter* (Figura 11, anexo 2).

Después de la incubación a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2 días, los morfotipos de las bacterias representativas (Figura 12) se cultivaron en el mismo medio sólido las veces requeridas para observar un desarrollo homogéneo de colonias (Figura 13), obteniéndose así los cultivos puros de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias o diazotróficas aerobias. A continuación, se realizaron tinciones de Gram y las bacterias se cultivaron en agar nutritivo y medio sólido sin nitrógeno, constituyendo los cultivos puros, que fueron guardados en refrigeración (8°C).

3.2.6 Identificación fenotípica de bacterias rizosféricas diazotróficas

La identificación del género *Azotobacter* en las bacterias rizosféricas diazotróficas aerobias se realizó en función de las características morfológicas y fisiológicas según el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Brenner *et al.*, 2005), Schoebitz (2006) y Garrido (2007). Con las bacterias se realizaron pruebas de tinción de Gram (Figura 14), catalasa (Figura 15), acidificación de glucosa (Figura 16), maltosa (Figura 17), ramnosa (Figura 18) y reducción de nitratos (Figura 19, tabla 3).

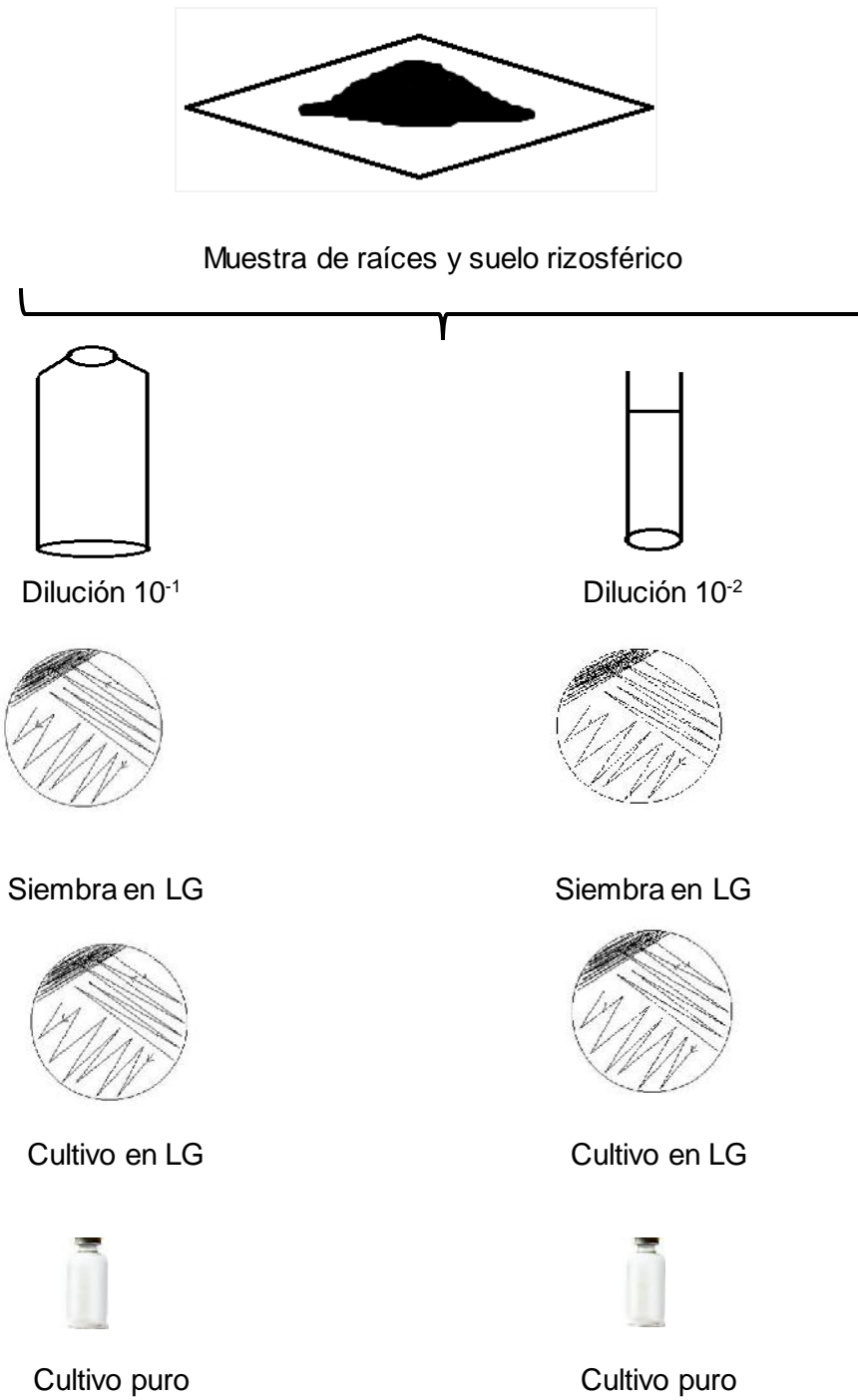


Figura 6. Procedimiento para el aislamiento de *Azotobacter* spp. de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L.



Figura 7. Deshidratado bajo sombra de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L.



Figura 8. Submuestra de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L.



Figura 9. Suspensión de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L. en solución salina esterilizada.



Figura 10. Diluciones de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L. en solución salina esterilizada.

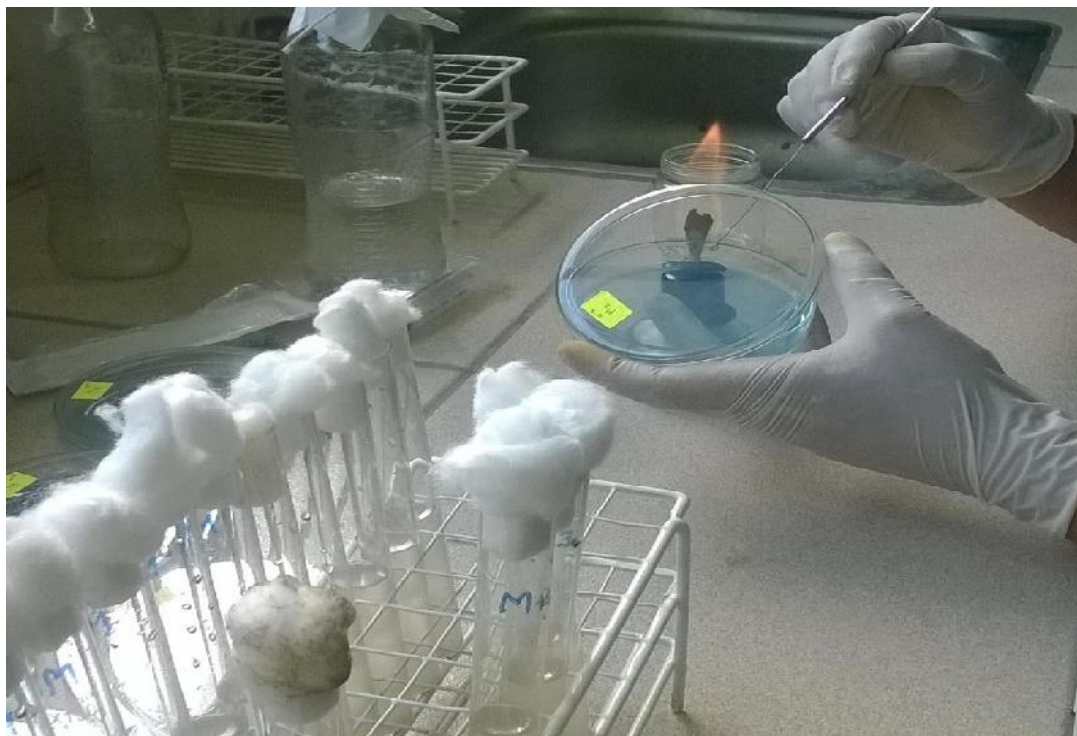


Figura 11. Siembra en medio sólido LG.

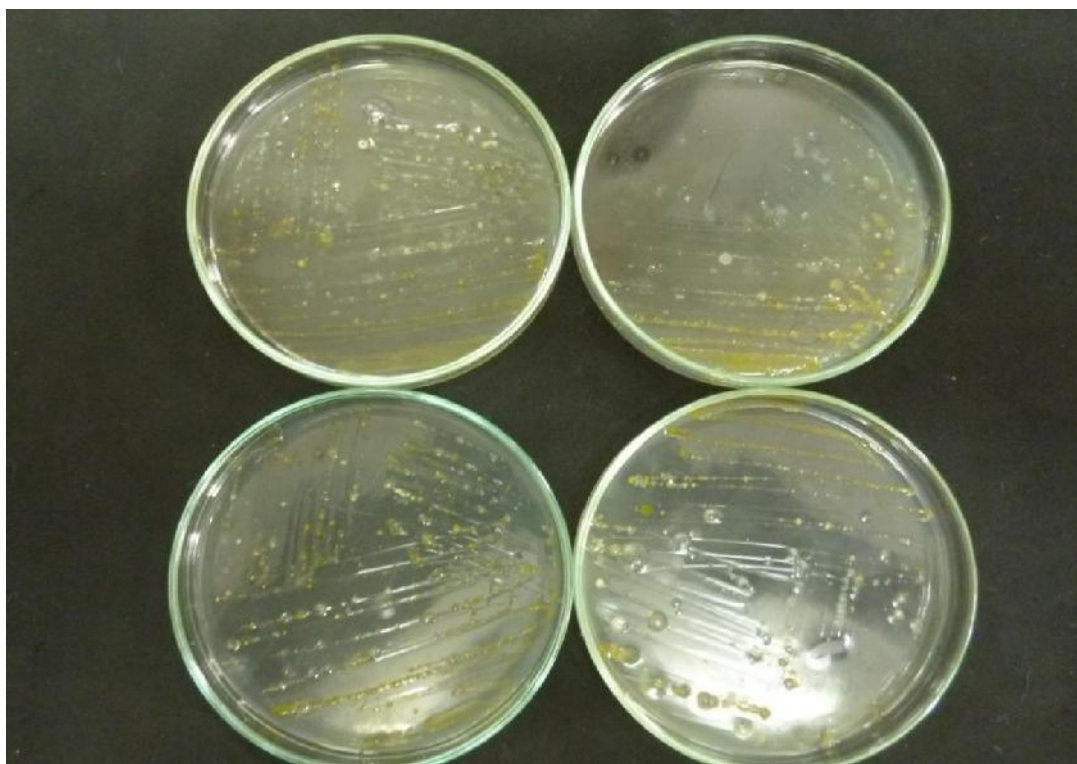


Figura 12. Bacterias rizosféricas diazotróficas aerobias desarrolladas en medio LG.

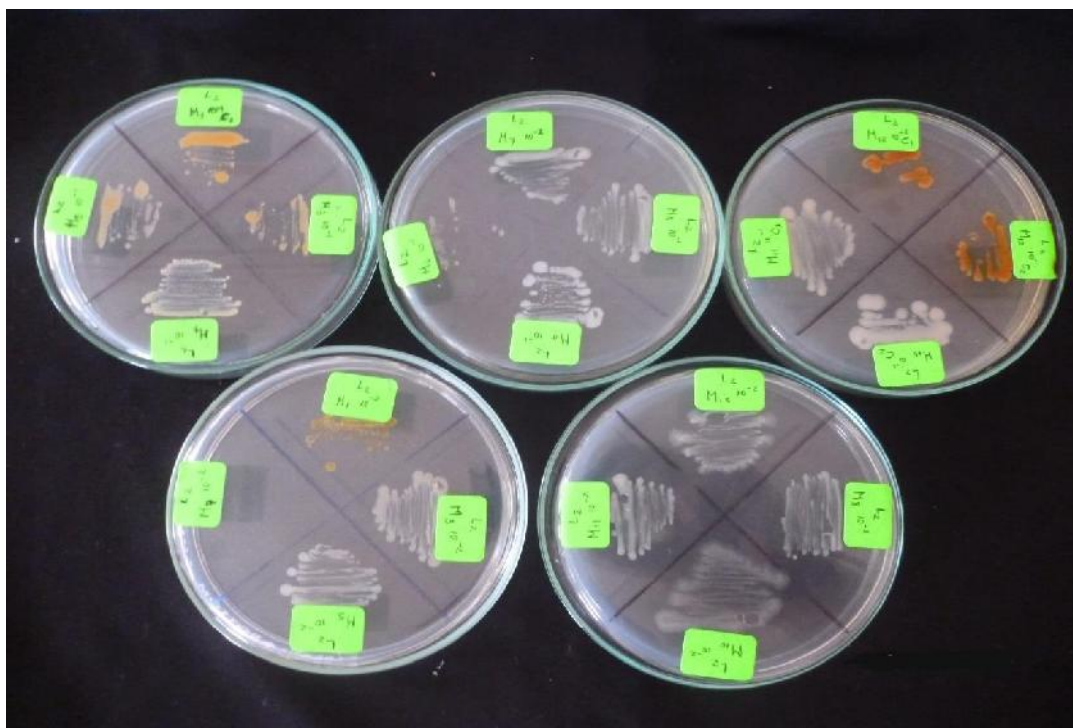


Figura 13. Bacterias rizosféricas diazotróficas aerobias cultivadas por segunda vez en medio LG.

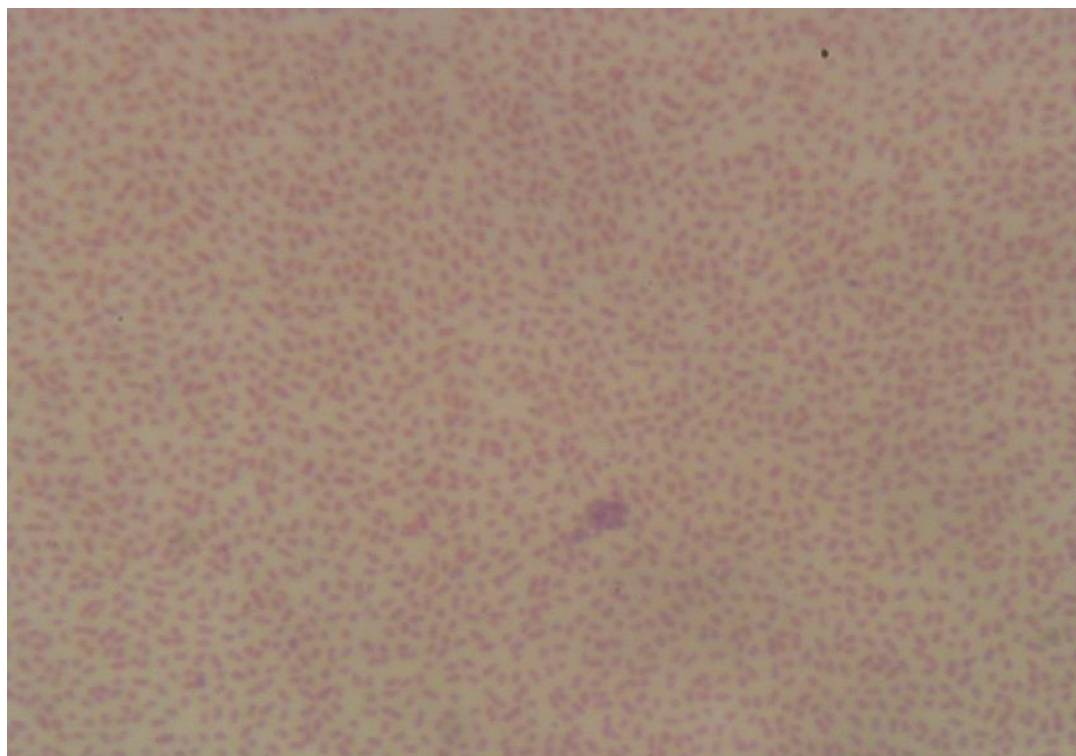


Figura 14. Observación microscópica de bacilos Gram negativos.

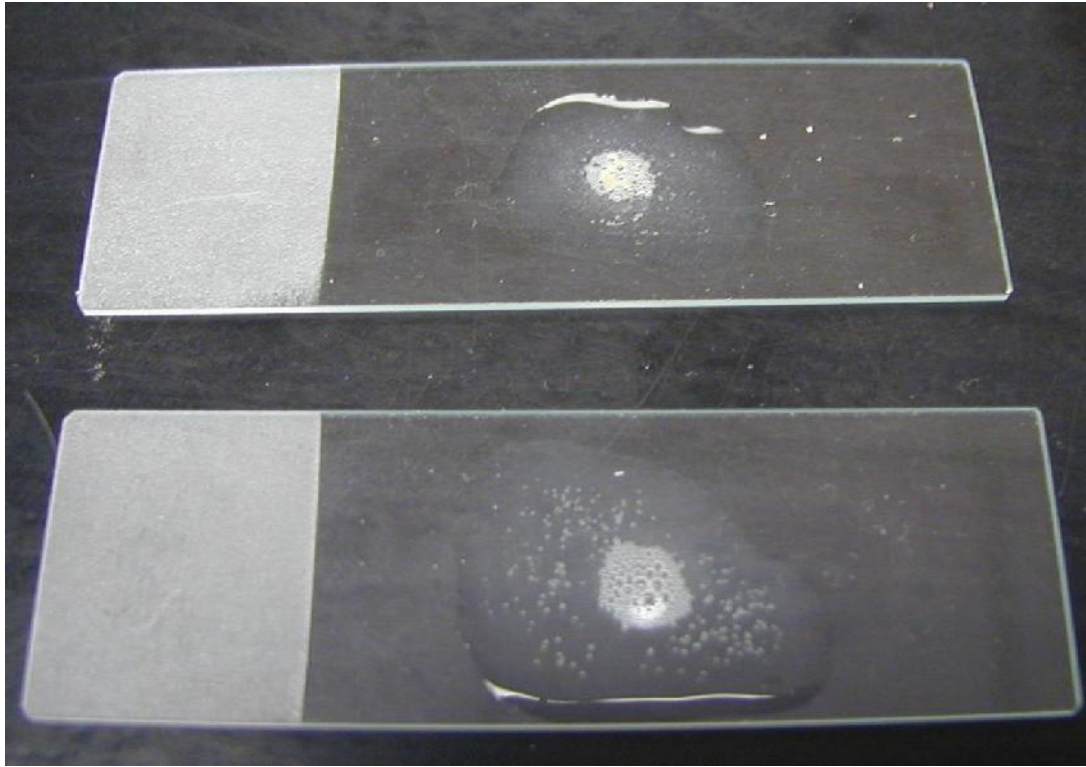


Figura 15. Prueba de catalasa positiva en *Azotobacter* sp.



Figura 16. Producción de acidez en caldo glucosa por *Azotobacter* sp.



Figura 17. Producción de acidez en caldo maltosa por *Azotobacter* sp.



Figura 18. Producción de acidez en caldo ramnosa por *Azotobacter* sp.

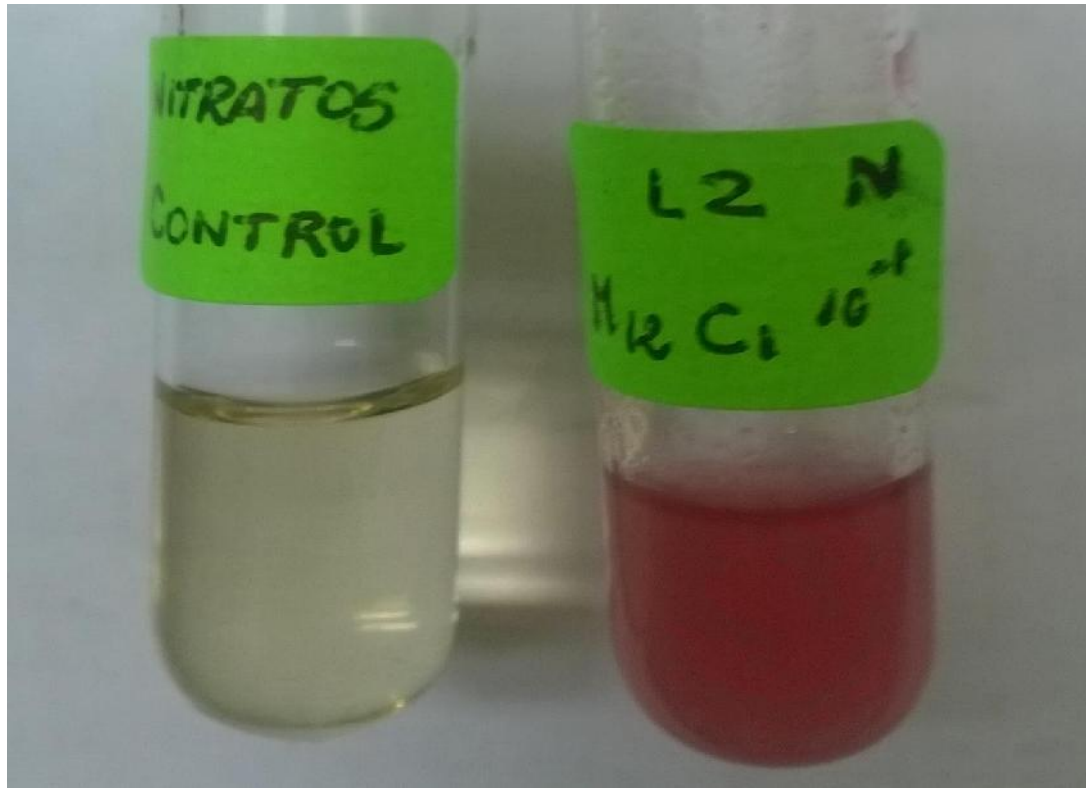


Figura 19. Reducción de nitrato por *Azotobacter* sp.

*

Tabla 3. Características diferenciales de *Azotobacter* spp.

Características	<i>Azotobacter</i> spp.
Células	Bacilos grandes
Tinción de Gram	-
Motilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	+
Acidificación de :	
-Glucosa	+
-Maltosa	+
-Sacarosa	+
-Fructosa	+
Reducción de nitrato	+

(+) positivo, (-) negativo.

* Brenner *et al.* (2005); Schoebitz (2006); Garrido (2007).

3.2.7 Mantenimiento de los cultivos de *Azotobacter* spp.

Las bacterias del género *Azotobacter* identificadas (Figura 20) se sembraron en medio sólido LG y agar nutritivo y se mantuvieron a temperatura ambiente (28°C) y refrigeración (8°C), respectivamente, realizándose subcultivos cada 30 días.

3.2.8 Detección de gránulos de PHA en *Azotobacter* spp.

Las bacterias *Azotobacter* spp. fueron cultivadas en 5mL de caldo de crecimiento Burk's modificado, CCBM (Figura 21, anexo 3) y se incubaron a 30 °C, en aerobiosis durante 48 horas. A continuación según Guzmán y Hurtado (2011) se tomaron alícuotas, se sembraron en tubos con 5mL de caldo de producción Burk's modificado, CPBM y se incubaron a 30°C, en aerobiosis y agitación constante (125 rpm), por 72 horas. Posteriormente, se realizaron tinciones con Sudan Negro B (Figura 22, anexo 4). La presencia de gránulos negros o grisáceos en el interior de células vegetativas rosadas, se consideró positivo para la detección de PHA (Baca & Sánchez, 2010).

3.2.9 Selección de *Azotobacter* spp. según el número de células con gránulos

En todos los cultivos de *Azotobacter* spp. se cuantificó el número de células con gránulos en cinco campos microscópicos y se seleccionaron las 20 bacterias que presentaron mayor número de células con gránulos por campo. Éstas se cultivaron nuevamente en 5mL de caldo de producción Burk's modificado, a 30°C, en aerobiosis, con agitación constante y se realizaron tinciones con Sudan Negro B a las 48, 72 y 96 horas, determinándose el tiempo óptimo o tiempo requerido para alcanzar el mayor número de células bacterianas con gránulos.



Figura 20. Cultivos puros de *Azotobacter* spp. en medio LG.



Figura 21. Siembra de *Azotobacter* sp. en caldo de crecimiento Burk's modificado.



Figura 22. Tinciones de *Azotobacter* spp. con Sudan Negro B.

3.2.10 Rendimiento de polihidroxicanoatos de *Azotobacter* spp.

Con los 20 cultivos de *Azotobacter* spp. seleccionados, se cuantificó la biomasa y para determinar la naturaleza, absorbancia y concentración del polímero producido, se seleccionaron las cinco bacterias que alcanzaron el mayor número de células con gránulos en el menor tiempo.

a. Obtención de la curva patrón para la cuantificación de la biomasa por turbidimetría

Para cuantificar la biomasa por turbidimetría según la metodología descrita por Guzmán & Hurtado (2011), modificada por los autores (Figura 23), cada bacteria cultivada en 5mL de caldo de crecimiento Burk's modificado a 30°C, durante 48 horas, se inoculó (5%) en frascos de 100mL de capacidad con 19mL de caldo de producción Burk's modificado (Figura 24), a 30°C, durante el tiempo óptimo previamente determinado y se tomaron submuestras de 10mL de cada cultivo, totalizando 200mL (Figura 25). A continuación, se tomaron por triplicado 2mL, uno para determinar la absorbancia a 600nm (tubo 1) y otro para realizar diluciones decimales (Figura 26), hasta 10^{-3} (tubos 2, 3, 4), a los que también se determinó su absorbancia. Los 194mL restantes de caldo de producción Burk's modificado se centrifugaron a 4000 rpm, durante 20 minutos. El sedimento o biomasa se lavó rápidamente con solución salina (NaCl 0,85%) esterilizada, se centrifugó (Figuras 27, 28) y se deshidrató a 42°C, hasta obtener peso constante.

La biomasa deshidratada se pesó y el valor obtenido se expresó en gramos por litro (gL^{-1}), correspondiendo a la absorbancia del tubo 1. Asimismo, el valor de la biomasa se dividió entre 10, 100, 1000, correspondiendo la absorbancia de los tubos 2, 3, y 4 (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}). Con los valores obtenidos se determinó la ecuación de regresión, para calcular la biomasa de cada bacteria nativa.

b. Proceso fermentativo

En el proceso fermentativo, según Guzmán & Hurtado (2011), cada bacteria productora de PHA seleccionada, se cultivó en 5mL de caldo de crecimiento Burk's modificado, a 30°C, durante 48 horas (Figura 29).

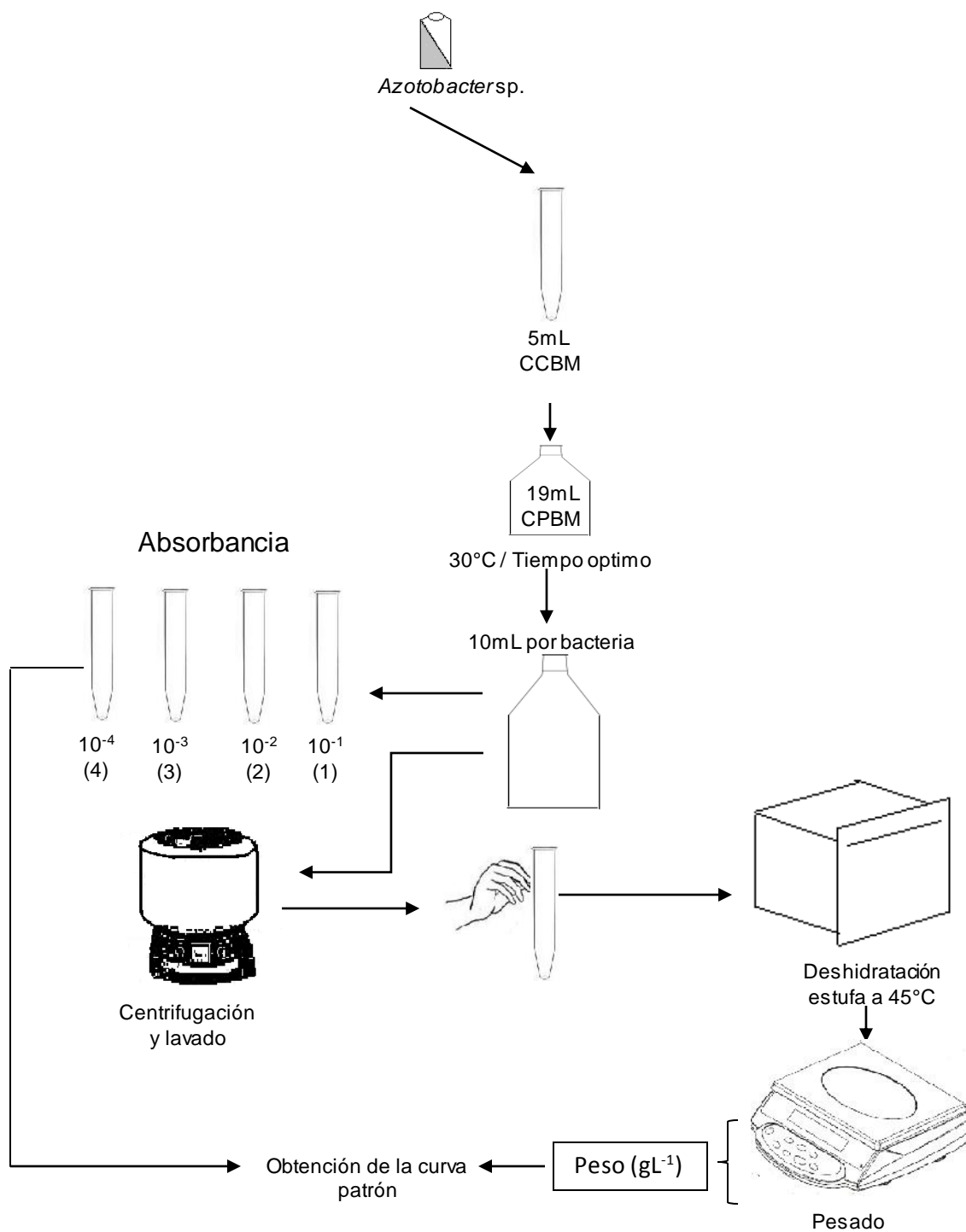


Figura 23. Flujograma del proceso de obtención de curva patrón para la cuantificación de biomasa por turbidimetría.



Figura 24. Caldo de producción Burk's modificado para el cultivo de *Azotobacter* spp.



Figura 25. Caldo de producción Burk's modificado cultivado con *Azotobacter* spp.



Figura 26. Diluciones decimales de caldo de producción Burk's modificado.



Figura 27. Adición de solución salina esterilizada a la biomasa de *Azotobacter* sp.



Figura 28. Biomasa de *Azotobacter* spp.

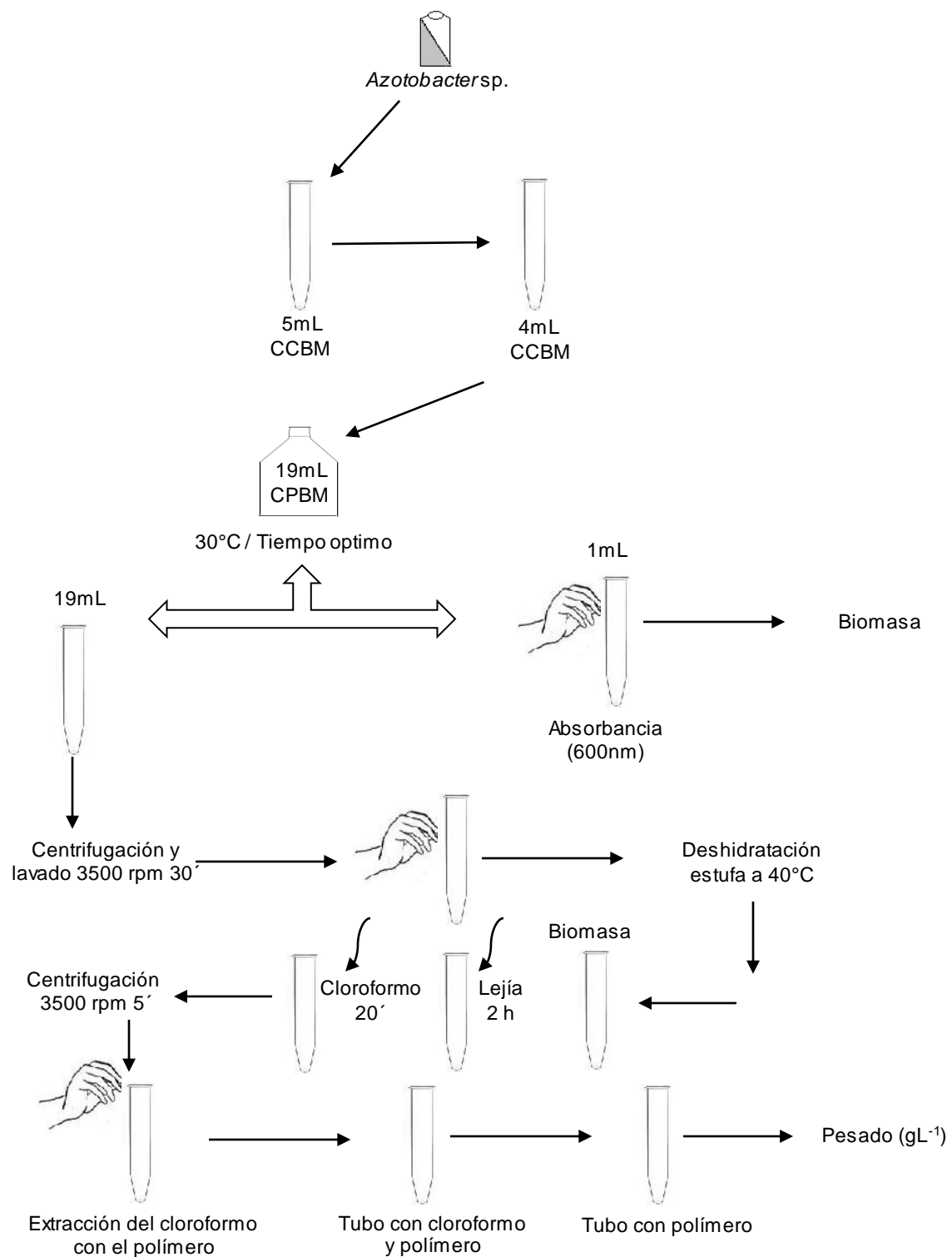


Figura 29. Flujograma del proceso de obtención de biomasa y PHA.

Para la obtención del inóculo bacteriano, se tomó una alícuota de cada tubo y se cultivó en 4mL de caldo de crecimiento Burk's modificado, durante 48 horas. A continuación, 1mL (5%) se inoculó por triplicado en frascos de 100mL de capacidad con 19mL de caldo de producción Burk's modificado y se incubó a 30°C, por el óptimo requerido para alcanzar el mayor número de células bacterianas con gránulos previamente determinado. Posteriormente, se cuantificó la biomasa y PHA producidos.

c. Determinación de la concentración de biomasa y PHA

La concentración de biomasa de cada bacteria fue determinada por turbidimetría, cada 24 horas a partir de las 48 horas por un periodo de 2 días. Se tomó 1mL de cada cultivo y se registró la absorbancia a 600nm (Figura 30). Los valores de biomasa se calcularon en la ecuación de regresión de la curva patrón entre absorbancia y biomasa seca, previamente obtenida.

Para cuantificar el PHA los 19mL del caldo se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos (Figura 31). El sedimento o biomasa celular obtenida se lavó rápidamente con solución salina (NaCl 0,85%) esterilizada, se centrifugó y deshidrató en estufa a 42°C, hasta obtener un peso constante, el cual se determinó con la balanza analítica (Figura 32).

Con la biomasa, se recuperó el PHA producido por cada bacteria. Según el protocolo de Law & Slepecky (1961), mencionado por Cholula (2005), en el tubo que contenía la biomasa deshidratada se agregó 1mL de hipoclorito de sodio al 5% (Figura 33), para debilitar la membrana celular y facilitar el proceso de extracción y después de 2 horas, se adicionó 1mL de cloroformo para separar la biomasa del polímero (Figura 34). Se observaron dos fases: una inferior transparente y una superior amarillenta (Figura 35). Después de 20 minutos, los tubos se centrifugaron a 3500 rpm, durante 5 minutos y nuevamente se obtuvieron dos fases, una superior constituida por hipoclorito con restos celulares y una inferior conteniendo el cloroformo con el polímero (PHA).

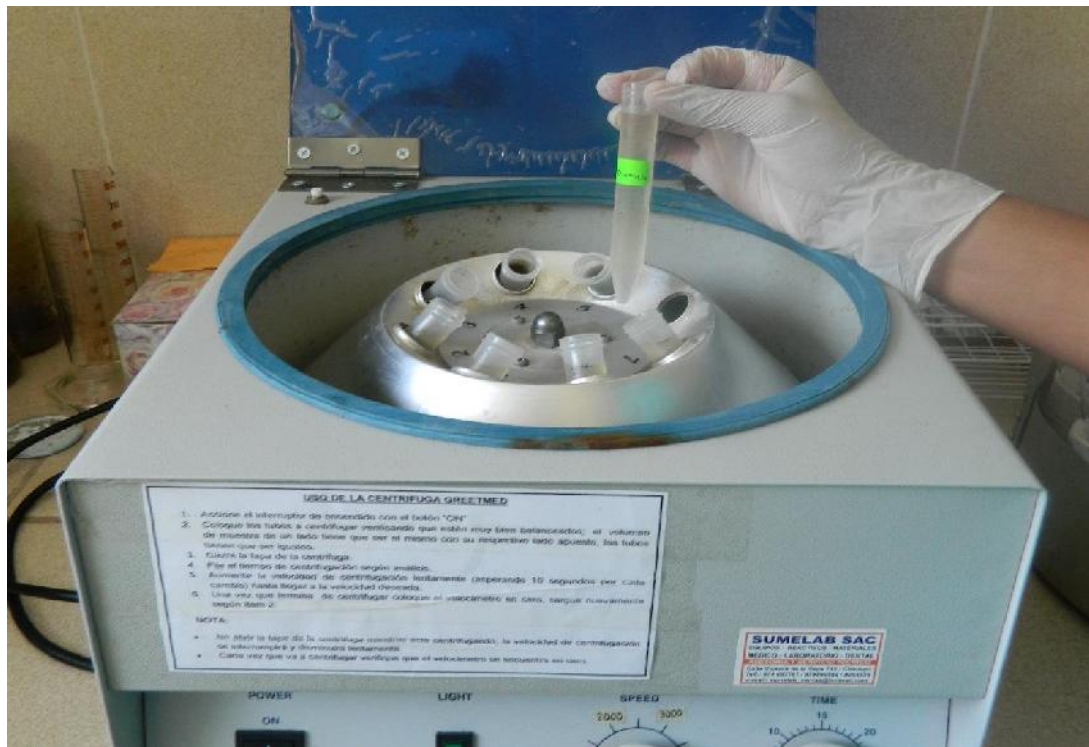




Figura 32. Peso de la biomasa seca de *Azotobacter* sp.



Figura 33. Adición de hipoclorito de sodio a la biomasa de *Azotobacter* spp.



Figura 34. Adición de cloroformo a la biomasa seca de *Azotobacter* spp.



Figura 35. Observación de dos fases, en biomasa de *Azotobacter* sp. tratada con hipoclorito de sodio y cloroformo.

Con una pipeta Pasteur se extrajo el cloroformo con el polímero (Figura 36), se depositó en un tubo de 10x 100 mm, previamente pesado (P_i) 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) en una balanza analítica y la diferencia del peso final (P_f) menos el peso inicial (P_i) constituyó el PHA obtenido.

Para verificar la naturaleza del polímero las muestras se diluyeron en 1,5mL de H_2SO_4 80% (Figura 37), 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 con luz ultravioleta UNICO S-2150, en el rango de 220 a 250 nm (Figura 38). La absorbancia de un pico máximo de 235 nm se consideró positivo para el PHA. A continuación, se leyó la absorbancia de cada muestra de PHA a 235 nm (Anexo 5).

d. Cálculo del rendimiento de PHA

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

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

3.2.11 Análisis de datos

Los valores de la concentración de biomasa, PHA y rendimiento de *Azotobacter* spp. se ordenaron en tablas y figuras que permitieron diferenciar la cinética de la producción, durante un determinado tiempo. Se utilizaron los programas de Microsoft Office Word y Microsoft Office Excel 2013.



Figura 36. Extracción de cloroformo más polímero PHA.

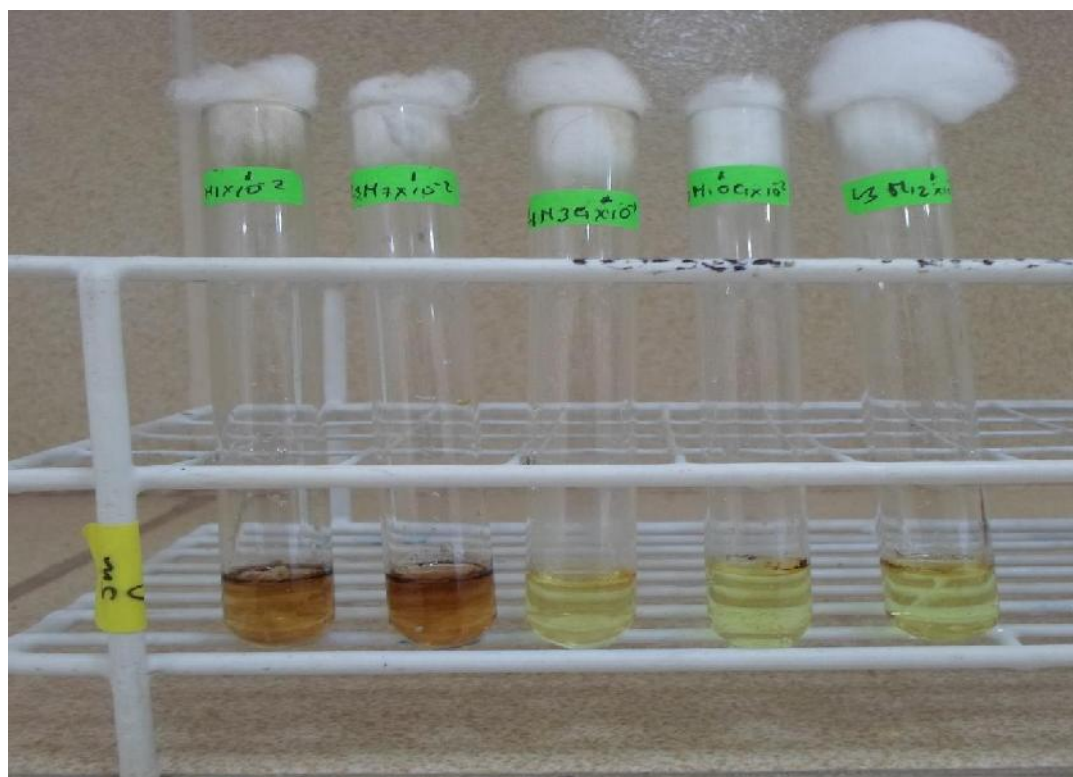


Figura 37. Polímero digerido con H_2SO_4 80%.



Figura 38. Lectura de absorbancia en espectrofotómetro con celda de cuarzo.

IV. RESULTADOS

4.1 Género *Azotobacter* identificado en bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias

El 88,89%(112), de las muestras de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L. del distrito de Reque, en Lambayeque, resultó positivo (Figura 39), para el aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno o diazotróficas aerobias, en medio LG sólido sin nitrógeno. Las colonias de bacterias con tamaño mediano y grande, forma circular con bordes enteros e irregulares, consistencia mucosa, aspecto brillante, transparente y opaco, con color amarillo, blanquecino e incoloro, se purificaron hasta obtener colonias con desarrollo homogéneo, obteniéndose 130 cultivos puros.

El 24,62%(32) de los cultivos de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias, aisladas se identificaron fenotípicamente como *Azotobacter* spp. (Figura 40). Las colonias (Figura 41) estuvieron constituidas por bacilos grandes Gram negativos, catalasa y oxidasa positivos, con producción de acidez a partir de glucosa, maltosa, sacarosa, fructuosa y reducción de nitrato. En este contexto, el 18,25%(23) de las muestras de raíces con suelo rizosférico de maíz, fue positivo para el aislamiento de *Azotobacter* spp. (Figura 42).

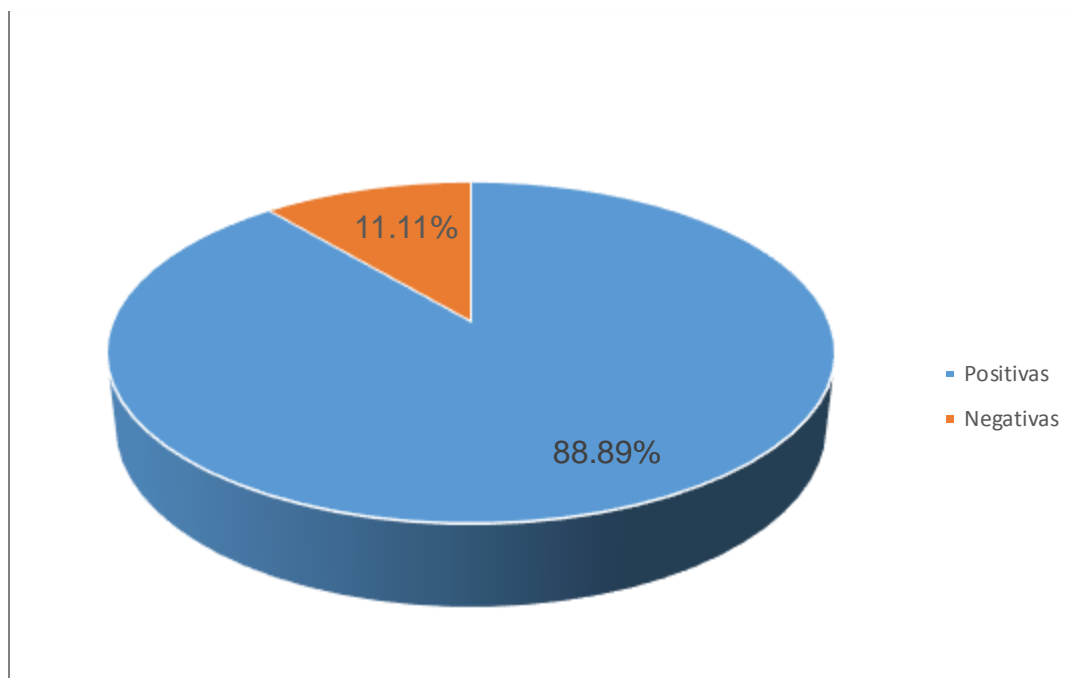


Figura 39. Frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L. positivas al aislamiento de bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias.

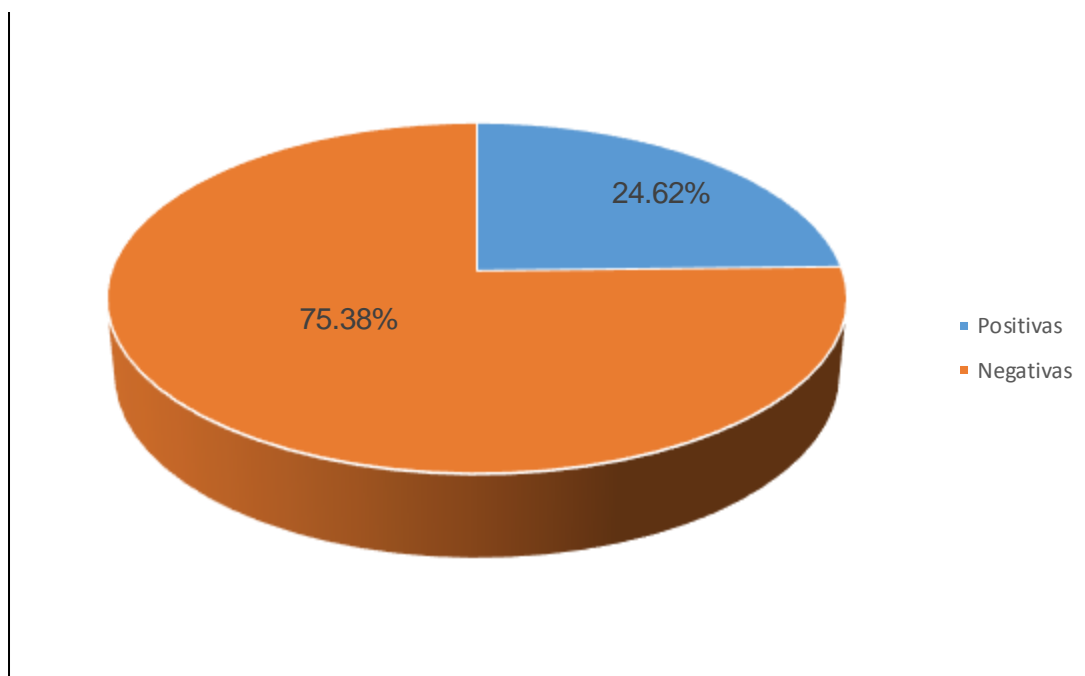


Figura 40. Frecuencia de *Azotobacter* spp. en bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas de raíces con suelo de *Zea mays* L.

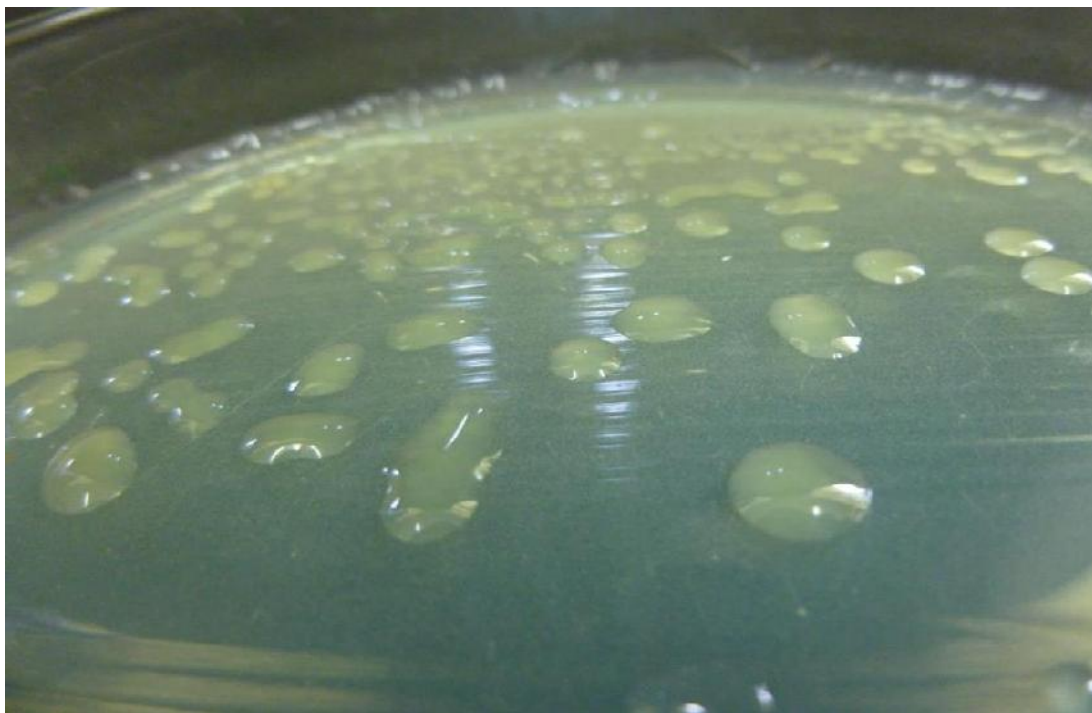


Figura 41. Colonias de *Azotobacter* spp. en medio LG.

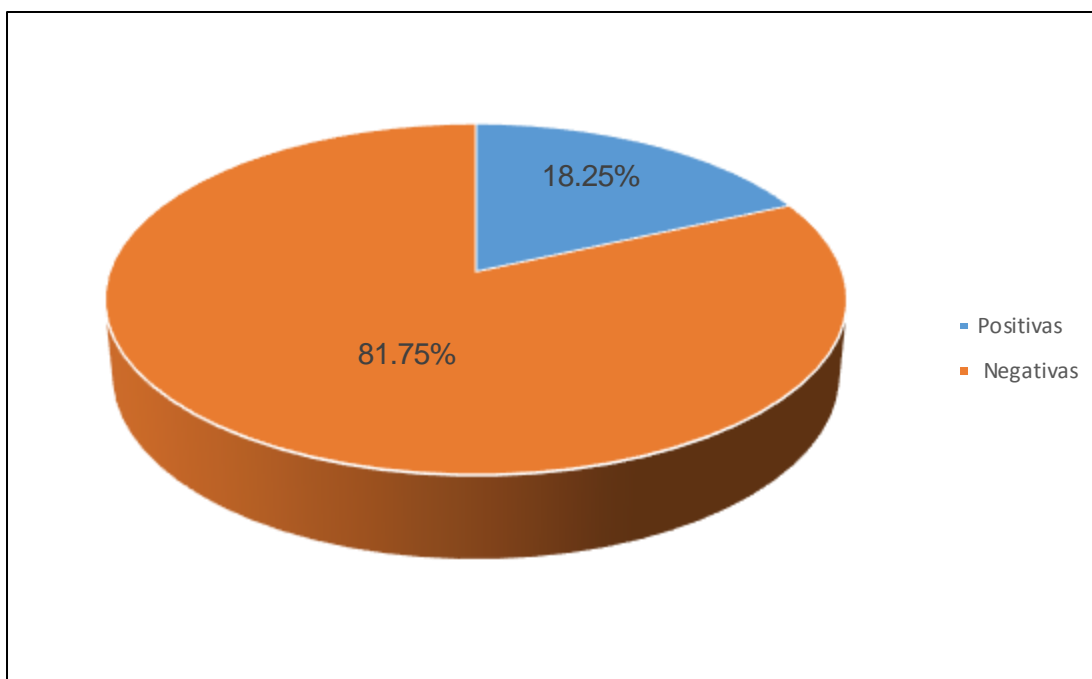


Figura 42. Frecuencia de muestras de raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L. positivas al aislamiento de *Azotobacter* spp.

4.2 *Azotobacter* spp. productoras de gránulos de polihidroxialcanoatos detectadas y seleccionadas

En el 100%(32) de *Azotobacter* spp. se observaron gránulos de PHA, mediante la tinción lipofílica de Sudan Negro B. Los gránulos de PHA se observaron negros en el interior de las células vegetativas rosadas (Figura 43).

En el primer cultivo de *Azotobacter* spp. en CPBM durante 72 horas se cuantificaron en promedio 4-16 células (Tabla 4) seleccionándose las 20 bacterias que presentaron 7-16 células con gránulos. En el segundo cultivo, todas las bacterias seleccionadas presentaron un tiempo óptimo de incubación de 72-96 horas (Tabla 5), en el cual se diferenciaron claramente las células con gránulos de PHA y después del cual el número de estas células disminuyó. En el 90%(18) de *Azotobacter* spp. el número de células con PHA fue de 7-16 a las 72 horas y en el 10%(2) de 10-14 a las 96 horas.

4.3 Rendimiento Y (p/x) de PHA de *Azotobacter* spp.

Con los valores de absorbancia (Tabla 6) obtenidos con diferentes concentraciones de biomasa de *Azotobacter* spp. cultivadas en caldo Burk's modificado de producción, se obtuvo la ecuación $y = 0,0404x + 0,0719$ (Figura 44). Debido a que el valor R^2 fue mayor a 0,9 se aceptó como patrón de referencia para el cálculo de la concentración de biomasa (Mantilla, 2007).

En el proceso fermentativo la absorbancia de la biomasa de *Azotobacter* spp. osciló entre 0,076 con L2M12C2 y 0,117 con L3M07 a las 72 horas (Tabla 7), valores correspondientes a 0,101 y 1,116 gL⁻¹ de biomasa, respectivamente (Tabla 8). Para determinar la naturaleza del polímero producido por *Azotobacter* spp. se seleccionaron cinco bacterias con la mayor biomasa.

La naturaleza del polímero PHA obtenido fue verificada, obteniendo un pico máximo de absorbancia a 235nm. Los valores de absorbancia de PHA a 235nm oscilaron entre 0,153 y 0,228 (Tabla 9). La concentración de PHA fue de 0,168 gL⁻¹ con *Azotobacter* sp.L3M10C1 y 0,678 gL⁻¹ con *Azotobacter* sp.L3M07.

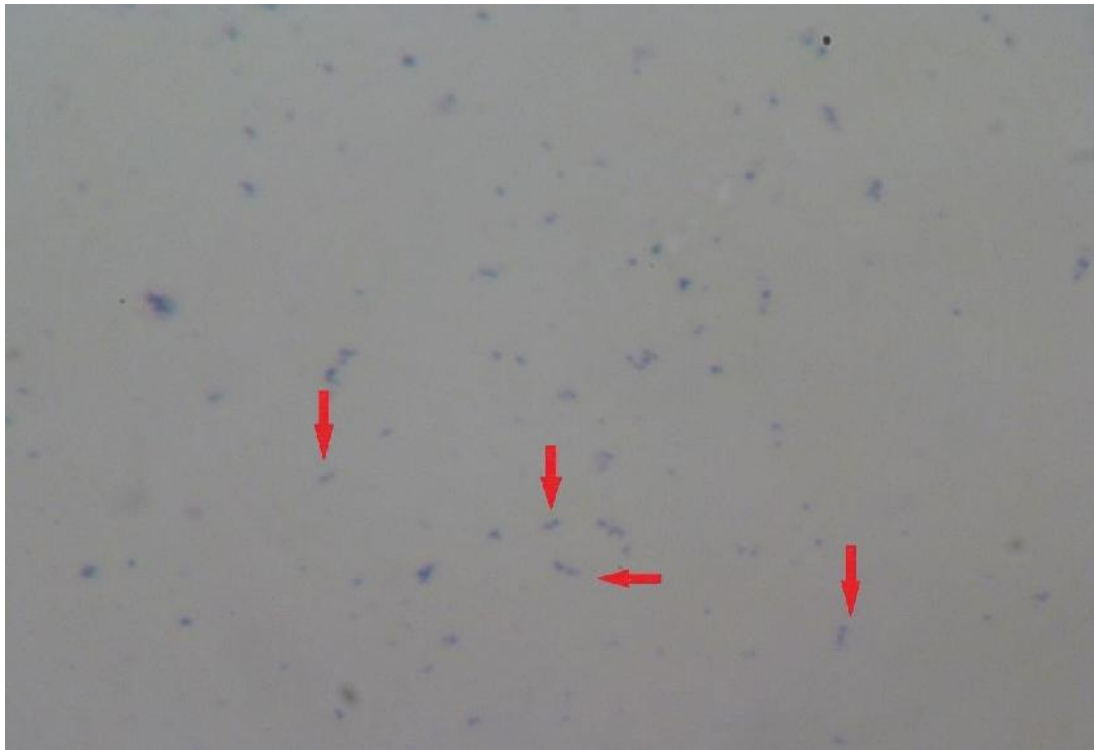


Figura 43. Gránulos de PHA de *Azotobacter* spp.

Tabla 4. Número de células con gránulos de PHA en primer cultivo de *Azotobacter* spp. en caldo Burk's modificado de producción por 72 horas

<i>Azotobacter</i> spp. código	Número de células con gránulos de PHA/campo microscópico			
	r1	r2	r3	\bar{X}
L3M07	17	15	16	16
L3M12	14	14	17	15
L1M3C1	14	12	13	13
L3M10C1	15	11	13	13
L2M01	13	14	12	13
L2M12C1	14	10	12	12
L3M10C3	13	13	11	12
L2M12	12	9	10	10
L3M08	9	10	8	9
L1M09	9	8	10	9
L1M01	8	6	13	9
L2M09	8	9	10	9
L3M7C2	9	8	10	9
L1M7C1	7	11	8	9
L3M03	10	8	6	8
L2M10	9	8	7	8
L2M12C2	9	7	7	8
L3M13	7	7	9	8
L1M13C1	8	4	8	7
L3M5C2	9	7	6	7
L2M19	7	7	5	6
L3M7C1	6	6	7	6
L1M13	5	5	7	6
L1M03	5	5	6	5
L1M3C2	4	5	6	5
L1M04	3	7	5	5
L1M02	5	4	6	5
L3M05	5	3	3	4
L3M06	6	3	3	4
L2M05	4	5	4	4
L2M08	4	6	3	4
L3M09	4	5	3	4

Tabla 5. Número promedio de células con gránulos de PHA en segundo cultivo de *Azotobacter* spp. en caldo Burk's modificado de producción

<i>Azotobacter</i> spp. código	Número de células con gránulos de PHA/horas		
	48	72	96
L3M07	6	16	8
L3M12	7	15	8
L1M3C1	5	13	14
L3M10C1	6	13	7
L2M01	7	13	6
L2M12C1	6	12	10
L3M10C3	6	12	8
L2M12	6	10	8
L3M08	7	9	10
L1M09	7	9	8
L1M01	5	9	8
L2M09	3	9	8
L3M7C2	4	9	7
L1M7C1	4	9	6
L3M03	7	8	7
L2M10	6	8	6
L2M12C2	6	8	6
L3M13	4	8	6
L1M13C1	6	7	6
L3M5C2	7	7	6

Tabla 6. Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de *Azotobacter* spp.

Biomasa (g ^L ⁻¹)	Absorbancia (600nm)
0,673	0,099
0,0673	0,076
0,00673	0,073
0,000673	0,070

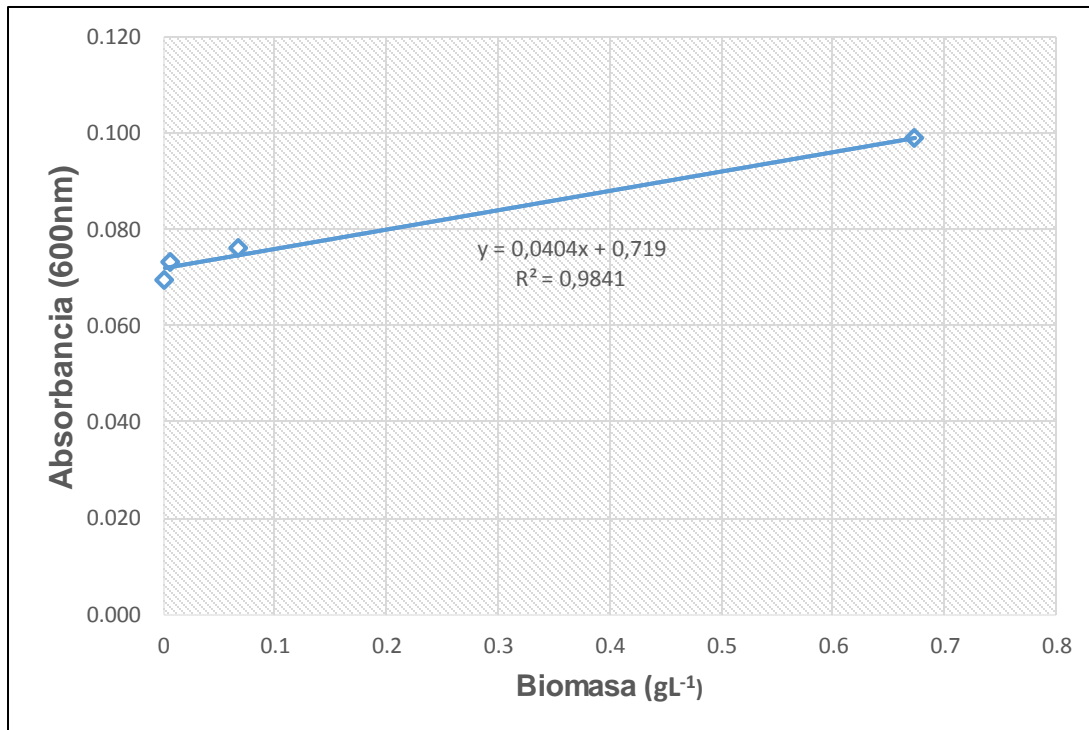


Figura 44. Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de *Azotobacter* spp. productoras de PHA.

Tabla 7. Absorbancia (600nm) de biomasa de *Azotobacter* spp. cultivadas en glucosa como fuente de carbono

<i>Azotobacter</i> spp. código	Absorbancia 600nm/ horas		
	48	72	96
L3M07	0,101	0,117	0,112
L3M12	0,083	0,091	0,084
L1M3C1	0,080	0,087	0,090
L2M01	0,077	0,082	0,075
L3M10C1	0,077	0,080	0,077
L1M7C1	0,074	0,079	0,076
L2M09	0,074	0,079	0,075
L2M12	0,075	0,079	0,079
L3M5C2	0,075	0,079	0,078
L1M09	0,075	0,078	0,077
L2M10	0,075	0,078	0,076
L3M03	0,074	0,078	0,079
L3M10C3	0,074	0,078	0,075
L1M13C1	0,074	0,077	0,076
L1M01	0,074	0,077	0,076
L2M12C1	0,074	0,077	0,075
L3M7C2	0,074	0,077	0,076
L3M13	0,075	0,077	0,075
L3M08	0,074	0,077	0,083
L2M12C2	0,074	0,076	0,075

Tabla 8. Concentración (gL⁻¹) de biomasa de *Azotobacter* spp. cultivadas en glucosa como fuente de carbono

<i>Azotobacter</i> spp. código	Biomasa (gL ⁻¹) / horas		
	48	72	96
L3M07	0,720	1,116	0,993
L3M12	0,275	0,473	0,300
L1M3C1	0,200	0,374	0,448
L2M01	0,126	0,250	0,077
L3M10C1	0,126	0,200	0,126
L1M7C1	0,052	0,176	0,101
L2M09	0,052	0,176	0,077
L2M12	0,077	0,176	0,176
L3M5C2	0,077	0,176	0,151
L1M09	0,077	0,151	0,126
L2M10	0,077	0,151	0,101
L3M03	0,052	0,151	0,176
L3M10C3	0,052	0,151	0,077
L1M13C1	0,052	0,126	0,101
L1M01	0,052	0,126	0,101
L2M12C1	0,052	0,126	0,077
L3M7C2	0,052	0,126	0,101
L3M13	0,077	0,126	0,077
L3M08	0,052	0,126	0,275
L2M12C2	0,052	0,101	0,077

Tabla 9. Concentración (gL⁻¹) de polihidroxicanoatos (PHA) de *Azotobacter* spp. a los 3 días de cultivo en glucosa como fuente de carbono

<i>Azotobacter</i> spp. código	Absorbancia (235nm)	PHA (gL⁻¹)
L3M07	0,228	0,678
L1M3C1	0,165	0,228
L2M01	0,159	0,200
L3M12	0,159	0,189
L3M10C1	0,153	0,168

El rendimiento Y (p/x) osciló entre $0,400 \text{ gg}^{-1}$ con *Azotobacter* sp.L3M12 y $0,840 \text{ gg}^{-1}$ con *Azotobacter* sp.L3M10C1, correspondientes a 39,96 y 84%, respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Rendimiento Y (p/x) de polihidroxialcanoatos de *Azotobacter* spp.

<i>Azotobacter</i> spp. código	Biomasa (gL ⁻¹)	PHA (gL ⁻¹)	Rendimiento Y (p/x)	
			(g g ⁻¹)	(%)
L3M10C1	0,200	0,168	0,840	84,00
L2M01	0,250	0,200	0,800	80,00
L1M3C1	0,374	0,228	0,610	60,96
L3M07	1,116	0,678	0,608	60,75
L3M12	0,473	0,189	0,400	39,96

V. DISCUSIÓN

En muestras de raíces con suelo rizosférico se aislaron bacterias rizosféricas, coincidiendo con Garrido (2007) y Escobar *et al.* (2011). La rizósfera es el volumen de suelo adherido a las raíces, que se encuentra a 1-5mm de la superficie y está bajo la influencia de compuestos orgánicos, producto de la fotosíntesis, que son exudados por las raíces (Loredo *et al.* 2004; Aguado, 2012). Las bacterias que habitan en la superficie y colonizan las raíces son rizobacterias y si tienen la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas son rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, PGPR (Guzmán *et al.*, 2012).

Uno de los mecanismos benéficos de las PGPR es la fijación de nitrógeno o diazotrofia. En este contexto, se utilizó el medio sólido LG sin nitrógeno para aislar bacterias rizosféricas diazotróficas aerobias, coincidiendo con Garrido (2007), Menezes (2009) y Ramírez & Ugaz (2014), quienes aislaron estas bacterias en *Panicum maximum*, *Dichanthium aristatum*, *Oryza sativa* y *Zea mays*.

Las colonias de tamaño mediano y grande y consistencia mucosa se seleccionaron para identificar *Azotobacter* spp., coincidiendo con Escobar *et al.* (2011), Rojas (2013) y Rojas & Vásquez (2014). Al respecto Luque *et al.* (2010), concluyeron que el aspecto colonial mucoso indica producción de exopolisacáridos. Esta característica es propia de la especie de *Azotobacter* productoras de polisacáridos extracelulares como el alginato, que protege la enzima nitrogenasa y cuya biosíntesis esta interconectada a los PHA (Cerrone, 2011).

Las bacterias rizosféricas diazotróficas se purificaron mediante cultivos sucesivos en medio sólido sin nitrógeno. De esta manera, se evitó el crecimiento de saprofitos, se purificaron los cultivos y se minimizó la presencia de falsos positivos, coincidiendo con Rico (2009), Rojas (2013), Ramírez & Ugaz (2014) y Rojas & Vásquez (2014).

En las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias aisladas de maíz se identificó al género *Azotobacter*, coincidiendo con Rojas & Vásquez (2014). Estas bacterias también han sido reportadas en la rizósfera de *Musa paradisiaca* L. “plátano” y pastos (Lara *et al.*, 2007), *Bambusa bamboo* “bambú” (Dhamangaonkar, 2009), *Pinus patula* “pino” (Orozco & Martínez, 2009), *Solanum tuberosum* L. “papa” (Rico, 2009), *Lactuca sativa* “lechuga” (Vélez & Orellana, 2010), *Eucalyptus* sp. (Obando *et al.*, 2010), *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” (Escobar *et al.*, 2011) y malezas (Rojas, 2013).

El género *Azotobacter* se identificó fenotípicamente, coincidiendo con Escobar *et al.* (2011), Rojas (2013), Ramírez & Ugaz (2014) y Rojas & Vásquez (2014). Las características fenotípicas ofrecen una visión detallada de la variación de los microorganismos de una o diferentes especies; no obstante, no permiten evidenciar la localización exacta de los microorganismos cuando se investiga la capacidad de colonización o distribución dentro del hospedero (Rives *et al.*, 2007). En este contexto, las técnicas convencionales de identificación no se pueden subestimar, sino que deben ser complementadas con técnicas moleculares (Bou, 2011).

Según su localización las bacterias diazotróficas son rizosféricas y endófitas. Las rizosféricas como *Azotobacter* spp. son de vida libre habitando, ya sea en la superficie de las raíces o el suelo rizosférico, aunque bajo ciertas circunstancias pueden ser asociativas y ocupar espacios intercelulares superficiales (Aguado, 2012). Las especies de *Azotobacter* en estado libre fijan en promedio 1-5kg de nitrógeno por hectárea por año, mientras que asociadas con las poaceas, anteriormente denominadas gramíneas fijan 20kg Nha⁻¹ (Kisilkaya, 2009). Estas bacterias incrementan el desarrollo vegetativo y rendimiento de los cultivos agrícolas (Borda *et al.*, 2009; Aly *et al.*, 2012; Ghilavizadeh *et al.*, 2012; Sarajuoghi *et al.*, 2012); no obstante, el efecto benéfico observado no se atribuye exclusivamente a la fijación de nitrógeno por las bacterias sino también a la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento como las auxinas, citoquininas, vitaminas y aminoácidos (Rojas, 2013; Rojas & Vásquez, 2014).

La fijación no simbiótica de nitrógeno no está restringida a las especies de *Azotobacter*; no obstante, son pocos los que como ellas pueden fijar 10mg de nitrógeno atmosférico por gramo de carbohidrato consumido (Abat, 2006). La fijación de nitrógeno por *Azotobacter* ha sido reportada en *A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. agilis*, *A. beijerinckii*, *A. paspali* y *A. macrocytogenes* (Lara *et al.*, 2007; Kisilkaya, 2009; Obando *et al.*, 2010; Escobar *et al.*, 2011).

Todos los microorganismos reductores de nitrógeno presentan actividad del complejo enzimático nitrogenasa, constituido por dos metaloproteínas. El complejo II o ferroproteína dinitrogenasa reductasa, codificado por el gen *nifH* tiene como función transportar los electrones desde el donador ferredoxina o flavodoxina hacia el componente I, proteína del MoFe o dinitrogenasa que a su vez, cede los electrones al nitrógeno molecular (Coyne, 2000). En este contexto, los electrones circulan a través de la ferredoxina, flavodoxina, proteína del hierro, proteína del MoFe y finalmente reducen al N₂. Cada electrón transferido requiere dos ATP. Por cada mol de N₂ se forman 2NH₃, con un gasto de 16ATP (Coyne, 2000). En

la actualidad, la diazotrofia es verificada con la presencia del gen *nifH* en el ADN (Mayz, 2004; Ramírez & Ugaz, 2014).

La técnica de coloración con Sudan Negro B resultó adecuada para la detección *in vivo* de gránulos de PHA, que se observaron grisáceos o negruzcos en las células vegetativas rosadas de *Azotobacter* spp. coincidiendo con Cerrone (2011). Tradicionalmente, la detección de gránulos de PHA en células microbianas se realiza mediante la tinción con el colorante Sudan Negro B, debido a la naturaleza lipofílica de los PHA. También existen otros colorantes con mayor afinidad y especificidad como el azul de Nilo A y Rojo Nilo, con los que los gránulos de PHA son reconocidos por una fluorescencia naranja (460nm) y amarillo dorado (450nm) o rosa – rojo (515 – 560nm), respectivamente (González *et al.*, 2013); sin embargo, no son completamente efectivos para la selección, porque los colorantes pueden formar cuerpos fluorescentes con los compuestos afines a los biopolímeros como son las inclusiones lipídicas (Sánchez *et al.*, 2012).

En el 100% de las bacterias diazotróficas del género *Azotobacter* se observaron gránulos de PHA por cuanto la síntesis y acumulación de este polímero es característica del género (Cerrone, 2011; El-Raheem *et al.*, 2013; Peña *et al.*, 2014). Los PHA son poliésteres sintetizados y acumulados en forma de gránulos en el citoplasma por una variedad de procariotas, siendo utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes, por lo que constituyen una estrategia desarrollada para incrementar la supervivencia (de Almeida *et al.*, 2004; López, 2010). De esta manera, bacterias productoras de PHA se han aislado en ambientes extremos como las salinas (Guzmán & Hurtado, 2011; Llontop, 2012), suelo, agua y sedimentos de hábitats con 15 -18% p/v de salinidad (Luque *et al.*, 2010), aunque también se han reportado aislados en ambientes contaminados (Razzaq *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2012), residuos industriales (Cardona *et al.*, 2013) y suelo rizosférico de cultivos agrícolas (Baca & Sánchez, 2010; Lisboa & Segura, 2010).

El número máximo de células con gránulos de PHA a las 72 horas en el primer y segundo cultivo fue 16; sin embargo, el valor disminuyó conforme transcurrió el tiempo, siendo de 7 a las 48 horas, 16 a las 72 horas y 14 a las 96 horas. Esta disminución es explicada por la degradación intracelular de PHA como respuesta endógena de las bacterias, para hidrolizar sus reservas de carbono acumuladas en forma de PHA a monómeros hidroxialcanoatos, mediante la participación de despolimerasas intracelulares ancladas en la superficie de los gránulos (Segura *et al.*, 2007). Estudios en *P. oleovorans* demostraron que antes que la bacteria complete la utilización de la fuente de carbono, la célula disminuye 12 -20% la concentración de polimerasa e incrementa 10 – 15% la despolimerasa. Este comportamiento representa la respuesta de la célula a un ambiente metabólico cada vez menos permisible, preparándose las células a movilizar las reservas de carbono para su supervivencia (Fernández, 2012).

Las bacterias *Azotobacter* spp. sintetizaron los gránulos de PHA en caldo con glucosa como fuente de carbono, coincidiendo con Guzmán & Hurtado (2011) y Llontop (2012), aunque también se puede usar sacarosa (El-Raheem *et al.*, 2013; Peña *et al.*, 2014). 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, O₂) para sintetizar PHA a partir de un exceso de carbono en la fase estacionaria de crecimiento. En el segundo grupo donde está *Azotobacter* spp., las bacterias acumulan PHA durante la fase de crecimiento, sin necesidad de que se agote un nutriente esencial. Estas bacterias acumulan grandes cantidades del polímero durante la fase exponencial de crecimiento (>50%), a diferencia del primer grupo que durante esta fase acumula muy baja concentración del polímero (González *et al.*, 2013).

Las bacterias del género *Azotobacter* spp. sintetizaron PHA, cuya naturaleza fue verificada mediante el método espectrofotométrico, basado en la conversión del polímero a ácido crotónico, mediante el uso de ácido sulfúrico concentrado y la aplicación del calor. El ácido crotónico producido

se cuantifica por espectrofotometría UV, alcanzando un pico máximo a 230 – 235nm (González *et al.*, 2013). De igual manera, Baca & Sánchez (2010) verificaron la naturaleza de PHA producido por bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum*.

La biomasa de *Azotobacter* spp. se cuantificó por turbidimetría, por cuanto bajo las condiciones del presente estudio no se podían cuantificar mínimas cantidades de biomasa y se requería determinar el tiempo con la mayor biomasa para recuperar el polímero. Según Fernández (2012) en condiciones de producción de PHA, la monitorización de la turbidimetría no es un reflejo directo del número de células. El valor de la D_{0600} es un parámetro complejo que permite tener una idea inicial del perfil de crecimiento y producción de PHA, pero hay que tener en cuenta que se ve afectado no solo por el número de células de un cultivo, sino también por la cantidad de polímero acumulado por cada célula.

Concluido el proceso fermentativo y debido a que los gránulos de PHA son intracelulares, se realizó la extracción a través de una digestión química de la membrana celular, utilizando hipoclorito de sodio. Se coincide con Salmiati *et al.* (2009), quienes demostraron que este agente químico en bajas concentraciones (<10%) disuelve los componentes celulares, excepto gránulos de PHA y permite alcanzar el 86% de pureza. A continuación, para facilitar la recuperación del PHA se utilizó cloroformo como solvente orgánico, que solubiliza el polímero, siendo preferido por su rapidez y eficacia en la extracción del polímero (Naranjo, 2010; Cerrone, 2011). El valor máximo de PHA ($0,678 \text{ gL}^{-1}$) correspondió a *Azotobacter* sp.L3M07. Según Fernández *et al.* (2005) bacterias con más de $0,3 \text{ gL}^{-1}$ de PHA se consideran con potencial industrial para la producción de PHA, tomando en cuenta que el medio de cultivo empleado aún no ha sido optimizado.

El rendimiento Y (p/x) no estuvo relacionado directamente con la concentración de biomasa, como sucedió con *Azotobacter* sp.L3M07 al que le correspondió el mayor valor de biomasa ($1,116 \text{ gL}^{-1}$) y un rendimiento de $0,608 \text{ gg}^{-1}$, coincidiendo con Lasala *et al.* (2004), Guzmán & Hurtado (2011),

Llontop (2012) y Ríos & Rivera (2012). Al respecto, Fernández (2012) demostró que el perfil de crecimiento de *P. putida* kt 2442 es alterado por la presencia de PHA. Investigando esta bacteria y el mutante en el gen que codifica para la polimerasa pha C1 se determinó que en condiciones de producción de PHA las células utilizan parte de su materia y energía para la producción de PHA, alcanzando menor masa celular, en comparación con la biomasa del mutante no acumulador del polímero.

Los valores máximos ($0,608 - 0,840 \text{ gg}^{-1}$) en el rendimiento $Y (p/x)$, correspondientes a 60,75 - 84,0% se alcanzaron con *Azotobacter* spp. L3M10C1, L2M01, L1M3C1 y L3M07. Estas bacterias son consideradas promisorias, por cuanto el contenido de PHA afecta la eficiencia de extracción. Para que el proceso sea rentable es necesario que la bacteria acumule por lo menos 60% de masa celular en PHA. El rendimiento y la pureza en el proceso de extracción son dependientes del contenido de PHA y cuanto mayor es éste, menor es el costo de insumos requeridos (Dalcanton, 2006). Si las condiciones de fermentación son mejoradas, es posible que se incremente la acumulación de PHA. Adicionalmente esta bacteria autóctona puede ser mejorada genéticamente para aumentar la viabilidad económica en el proceso de producción del polímero (Naranjo, 2010).

VI. CONCLUSIONES

- En muestras de raíces con suelo rizosférico de maíz se aislaron 130 bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias.
- El género *Azotobacter* se identificó en el 24,62% de las bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias.
- En el 100% de *Azotobacter* spp. se observaron gránulos de PHA mediante la tinción con Sudan Negro B.
- Las bacterias de *Azotobacter* spp. en las que se cuantificó el mayor número (7-16) de células con gránulos de PHA se seleccionaron.
- Los mayores rendimientos Y (p/x) fueron $0,840 \text{ gg}^{-1}$ con *Azotobacter* sp.L3M10C1; $0,800 \text{ gg}^{-1}$ con *Azotobacter* sp.L2M01; $0,610 \text{ gg}^{-1}$ con *Azotobacter* sp.L1M3C1 y $0,608 \text{ gg}^{-1}$ con *Azotobacter* sp.L3M07 correspondientes a 84; 80; 60, 96 y 60,75% respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

- Identificar a nivel molecular *Azotobacter* spp.L3M10C1, L2M01, L1M3C1 y L3M07.
- Determinar las características físico-químicas del PHA producido por *Azotobacter* spp.L3M10C1, L2M01, L1M3C1 y L3M07.
- Optimizar el proceso fermentativo para producir PHA con *Azotobacter* spp.L3M10C1, L2M01, L1M3C1 y L3M07.

VIII. RESUMEN

Los polihidroxialcanoatos, PHA, son polímeros de ácidos R-hidroxialcanoicos con propiedades físico-mecánicas comparables a la de los plásticos de origen petroquímico, con la diferencia que son biodegradables y no contaminan el ambiente. En este contexto, se realizó la presente investigación, cuyo objetivo fue determinar el rendimiento de PHA de *Azotobacter* spp. aisladas de suelo rizosférico de *Zea mays* L. en Lambayeque. En medio sólido LG sin nitrógeno se aislaron 130 bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno aerobias, entre las que 24,62% se identificó como *Azotobacter* spp. Las bacterias se cultivaron en caldo de producción Burk's modificado, durante 72 horas y en todas se observaron gránulos de PHA, mediante la tinción con Sudan Negro B, seleccionándose los 20 cultivos con los que se cuantificó el mayor número (7-16) de células con gránulos. En fermentación discontinua con glucosa como fuente de carbono los mayores rendimientos $Y(p/x)$ fueron $0,840\text{ gg}^{-1}$ con *Azotobacter* sp.L3M10C1; $0,800\text{ gg}^{-1}$ con *Azotobacter* sp.L2M01; $0,610\text{ gg}^{-1}$ con *Azotobacter* sp.L1M3C1; $0,608\text{ gg}^{-1}$ con *Azotobacter* sp.L3M07, correspondientes a 84; 80; 60,96 y 60,75%, respectivamente. Se demostró que *Azotobacter* spp. nativas tienen potencial como productoras de PHA.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abat, B. (2006). *Growth of agriculturally important Pseudomonas spp. and Azotobacter chroococcum on beer waste and observation of their survival in peat*. (Thesis of Master). Middle East Technical University, Ankara, Turkey.
- Aguado, S. (Ed).(2012). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. México. Recuperado de www.inifab.gob.mx.
- Alvitres, V. (2000). *Metodo Científico. Planificación de la Investigación*. Lambayeque,Perú: Editorial Ciencia.
- Aly, M., El-Sayed, H. & Jastaniah, S. (2012). Synergistic effect between *Azotobacter vinelandii* and *Streptomyces sp.* isolated from saline soil on seed germination and growth of wheat plant. *Journal of American Science*, 8(5), 667-676.
- Ávila, I. (2007). *Determinación del efecto producido por diferentes tipos de aceites vegetales y combinaciones en la biosíntesis y composición del polihidroxicanoato producido por Pseudomonas putida IPT046 y Pseudomonas aeruginosa IPT171*. (Tesis de Microbiólogo). Pontificia Universidad Javeriana, Sao Paulo, Brasil.

- Baca, K. & Sánchez, M. (2010). *Polihidroxialcanoatos de cepas nativas de Azospirillum spp. aisladas de raíces de Lycopersicon esculentum Mill "tomate" y Oryza sativa L "arroz"*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Borda, D., Pardo, J., Martínez, M. & Montaña, J. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitas Scientiarum*, 14(1), 71-78.
- Bou, G. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601.
- Brenner, D., Krieg, N. & Staley, J. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The proteobacteria part B the Gammaproteobacteria*. 2(2) USA: Springer Dordrecht Heidelberg.
- Cardona, A., Mora, A. & Marín, 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.
- Cerrone, F. (2011). *Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alpeorajo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, España.
- Cholula, L. (2005). *Estudio de la producción de poli B-hidroxibutirato (PHB) en Azospirillum brasilense sp7*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Tamaulipas, México.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del Suelo*. Un enfoque exploratorio. España: Editorial Paraninfo.
- Dalcanton, F. (2006). *Produção, extração e caracterização de poli (3-hidroxibutirato) por Ralstonia eutropha em diferentes substratos*. (Tesis de Maestría). Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

- Dantas, A. (2005). *Estudo da produção de polihidroxibutirato por Cupriavidus necator em fermentação no estado sólido*. (Tesis de Maestría). Universidad Federal Rio de Janeiro, Maio, Brasil.
- De Almeida, A., Ruiz, N., Lopez, N. & Pettinari, J. (2004). Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Revista Química Viva*, 3, 122-133.
- Dhamangaonkar, S. (2009). Effect of *Azotobacter chroococcum* (PGPR) on the Growth of Bamboo (*Bambusa bamboo*) and Maize (*Zea mays*) Plants. *Biofrontiers*, 1(1), 24-31.
- Dorán, P. (1988). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. España: Editorial Acribia, S.A.
- El- Raheem, A., El-Shanshoury, Kenawy, E., Amara, 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.
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C. & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39-49.
- Fernández, P., Ortiz, F., Burbano, O., Guerrero, M. & Edmundo, J. (2005). Caracterización de poli-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides* FBL2. *Revista Centro de Estudio en Salud*, 1(6), 5-12.
- Fernández, I. (2012). *Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos con Pseudomonas putida: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de plásticos funcionalizados*. (Tesis de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Garrido, R. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas*. (Tesis de Maestría). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia.

- Ghilavizadeh, A., Taghi, M., Haj, M. & Rejali, F. (2012). Influence of plant growth promoter bacteria and plant density on yield components and seed yield of ajowan (*Carum copticum*). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(17), 1255-1260.
- Gómez, C. (2013). *Producción y caracterización de polihidroxialcanoatos sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- González, E. (2009). *Actividad antifúngica de Burkholderia cepacia aislada de maíz amarillo (Zea mays L.) bajo diferentes condiciones de cultivo*. Modalidad: Investigación. Universidad de Oriente Núcleo de Sucre, Cumaná, Venezuela.
- González, Y., Meza, J., González, O. & Córdova J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*, 29(1), 77-115.
- Guzmán, C. & Hurtado, A. (2011). *Producción de polihidroxialcanoatos por bacteria halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de Solanum tuberosum L.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Guzmán, A., Obando, M., Rivera, D. & Bonilla, R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 182-190.
- Hermida, E. & Díaz, G. (2004). Cambios microestructurales durante la cristalización de poliésteres biodegradables. Recuperado de <http://www.materiales-sam.org.ar/sitio/biblioteca/laserena/173.pdf>.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. México: Editorial Mc Graw. Hill Interamericana Editores S.A.

- Kizilkaya, R. (2009). Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. *Journal of Environmental Biology*, 30(1), 73-82.
- Lara, C., Villalba, M., & Oviedo, L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, IX(2), 6-14.
- Lasala, F., Martínez, J., Nuñez, R., Rozsa, Ch., Galego, N., Carballo, M., & Solano, R. (2004). Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por bacterias diazótrofes II. Estudio de la síntesis a escala de zaranda con *Mesorhizobium plurifarum* (4033). *Revista Biología*, 18(2), 136-146.
- Lisboa, C. & Segura, S. (2010). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos de cepas de Cupriavidus necator aisladas de rizósfera de Zea mays L. "maíz", en Reque, Lambayeque, 2010.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Llontop, M. (2012). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos de bacterias halófilas extremas aisladas de salinas en Lambayeque, 2012.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- López, A. (2010). Bioprospección de bacterias marinas productoras de polihidroxialcanoatos en tapetes microbianos contaminados . XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, México.
- Loredo, C., López, L & Espinoza, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. *Una Revisión. Terra Latinoamericana*, 22(2), 225-239.
- Luque, R., Quesada, E., Béjar, V. & Llamas, I. (2010). Aislamiento de cepas del género *Halomonas* con interés biotecnológico en Rambla Salada (Murcia). *Ars Pharmaceutica*, 51, 453-462.

- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de cristanteno (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en período de enraizamiento*. (Tesis de Microbiología). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Martínez, J. (2004). Producción de polihidroxialcanoatos en bacterias diazótrofes I. Influencia de la aireación en la síntesis de poli- β -hidroxibutirato en cepas de *Azospirillum brasilense* cepa 7. *Revista Biología*, 18(1), 87-95.
- Mayz, L. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- Menezes, C. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazótrofes asociadas a maíz (Zea mays) variedad PAU 871*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Mora, E. & Toro, M. (2007). Estimulación del crecimiento vegetal por *Burkholderia cepacia*, una cepa nativa de suelos ácidos de sabanas Venezolanas. *Agronomía Tropical*, 57(2), 123-128.
- Municipalidad Distrital de Reque (2014). Recuperado de: http://www.peru.gob.pe/Nuevo_Portal_Municipal/portales/Municipalidades/1244/entidad/pm_municipalidad.asp.
- Naranjo, J. (2010). *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.
- Nikel, P., De Almeida, A., Melillo, E., Galvagno, M. & Pettinari, M. (2006). New Recombinant *Escherichia coli* Strain Tailored for the Production of Poly (3- Hydroxybutyrate) from Agroindustrial By- Products. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3949-3954.
- Obando, D., Burgos, L., Rivera, D., Rubiano, M., Diván, D. & Bonilla, R. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus sp.*) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biología Colombiana*, 15(3), 107-120.

- Orozco, C. & Martínez, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque* 30(2), 70-77.
- Peña, C., López, S., García, A., Espín, G., Romo, A. & Segura, D. (2014). Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). *Annals of Microbiology*, 64, 39-47.
- Ramírez, L. & Ugaz, H. (2014). *Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en Oryza sativa L. "arroz" Lambayeque, 2014*. (Tesis de Licenciatura). 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.
- Rico, M (2009). *Capacidad promotora del crecimiento vegetal por bacterias del género Azotobacter y Actinomicetos aisladas de cultivos de Solanum tuberosum Linnaeus, 1753(papa) cultivadas en zonas altoandinas del Perú*. (Tesis de Biología). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Rios, D. & Rivera, M. . (2012). *Rendimiento de polihidroxiclcanoatos (PHAs) producidos por bacterias halófilas aisladas de agua de mar en los distritos de Pimentel y Santa Rosa en Lambayeque, 2011*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Rivera, L., & Nevárez, G. (2009). Fuentes de carbono económicas para la producción de bioplásticos bacterianos. *TECNOCENCIA Chihuahua*, III,(2), 58-62.
- Rives, N., Acebo, Y. & Hernández, A. (2007). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*, 28(2), 29-38.

- Rojas, L. (2013). *Potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Azotobacter aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Rojas, H. & Vásquez, V. (2014). *Determinación del potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Azotobacter aisladas de la rizósfera de Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Salmiati, Z., Salim, R. & Olsson, G. (2009). *Recovery of pololyhydroxyalkanoates (PHAs) from mixed microbial cultures by simple digestion and saponification*. Malaysia: University Teknology, Institute of Environmental and water Resource Management.
- Sánchez, S; Marin, M; Mora, A. & 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.
- Sarajuoghi, M., Ardakani, M., Nurmohammadi, G., Kashani, A., Rejali, F. & Mafakheri, S. (2012). Response of Yield and Yield Components of Maize (*Zea mays* L.) to Different Biofertilizers and Chemical Fertilizers. *American Eurasian Journal Agriculture & Environmental Science*, 12(3), 315-320.
- 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 Licenciatura). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Segura, D., Noguez, R. & Espino, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14, 361-372.

- Vásquez, Z., Díaz, N., Vásquez, O. & Vásquez, W. (2012). *Metodología de la Investigación Científica*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Vélez, L. & Orellana, H. (2010). *Evaluación de cepas de Azotobacter spp. en el cultivo de lechuga (Lactuca sativa var. Green Salad Bowl)*. Tumbaco, Pichincha. (Tesis de Ingeniería). Universidad Central de Ecuador, Ecuador.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo de número de muestras de raíces con suelo rizosférico para el aislamiento de bacterias productoras de PHA (Alvitres, 2000).

$$n = \frac{Z^2(p \cdot q)}{t^2}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra.

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

p = Prevalencia o presencia de bacterias productoras de PHA en raíces con suelo rizosférico de *Zea mays* L. (0,30).

q = Ausencia (0,70).

t = Error permitido (8%)

$$n = \frac{(1,96)^2(0,30 \times 0,70)}{(0,08)^2}$$

$$n = 126.05 \text{ muestras}$$

ANEXO 2

Medio de cultivo LG para *Azotobacter* spp.

El medio LG fue elaborado por Lipman (1904)

Componentes	gL ⁻¹
Sacarosa	20.00g
K ₂ HPO ₄	0,05g
KH ₂ PO ₄	0,15g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,013g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,02g
CaCO ₃	1.00g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.016g
Sol. Azul de bromotimol	2.00mL
Agar agar	15.00g
Agua destilada	1000mL

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

ANEXO 3

Caldo Burk's modificado para *Azotobacter* spp. (Lara *et al.*, 2007)

a. Caldo de crecimiento Burk's modificado (CCBM)

Componentes	gL ⁻¹
Glucosa	5,00g
K ₂ HPO ₄	0,64g
KH ₂ PO ₄	0,16g
NaCl	0,20g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20g
CaSO ₄ 2H ₂ O	0,05g
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,01g
FeSO ₄	0,003g
Agua destilada c.s.p	1000mL

El pH se ajusta a 7.00 y las condiciones de incubación se realizan en aerobiosis a 28 – 30 °C durante 48 horas.

b. Caldo de producción Burk's modificado (CPBM)

Componentes	gL ⁻¹
Glucosa	5,00g
K ₂ HPO ₄	0,64g
KH ₂ PO ₄	0,16g
NaCl	0,20g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20g
CaSO ₄ 2H ₂ O	0,05g
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,01g
FeSO ₄	0,003g
Citrato férrico	0,00743g
Acetato de amonio	0,00057g
Agua destilada	1000mL

El pH se ajusta a 7.00 y las condiciones de incubación se realizan en aerobiosis a 28 – 30 °C.

ANEXO 4

Técnica de coloración con Sudán Negro B

(Según Martínez, 2004; modificado por Guzmán & Hurtado, 2011)

- Realizar un frotis.
- Cubrir con solución de Sudán Negro B durante 15 minutos.
- Decolorar con Xilol, secar a temperatura ambiente
- Contrateñir con Safranina durante 50 segundos.
- Lavar con agua.
- Observar con lente de inmersión: los gránulos de PHA se colorean gris negro y las células vegetativas de rosado.

ANEXO 5

Cuantificación de polihidroxialcanoatos por espectrofotometría

(Según Law & Slepecky, 1961; mencionado por Cholula, 2005)

- Colocar el polímero obtenido en un tubo de ensayo.
- Agregar 1mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Llevar a baño maría a una temperatura de 90 – 95 °C por 10 minutos en agitación constante.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Depositar el polímero tratado en una celda de cuarzo y leer la absorbancia a 235nm.