

SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE BACTERIAS DIAZÓTROFAS AISLADAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS DE LA SUBFAMILIA *FABOIDEAE* EN BOSQUES ALTOANDINOS DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

SUMMARY POLYHYDROXYALKANOATE DIAZOTROPHIC BACTERIA FROM ISOLATED FROM NODULES OF LEGUMES IN THE WOODS FAMILY FABACEAE ANDEAN HIGHLANDS OF NARIÑO

Daniel Bravo Benavides*; Pablo Fernández Izquierdo *

* Departamento de Biología, Universidad de Nariño

RESUMEN

Evaluamos la producción de Polihidroxicanoatos (PHAs) en 115 aislamientos bacterianos de la familia *Rhizobiaceae* obtenidos a partir de nódulos de 121 plantas silvestres pertenecientes a 23 especies de la familia *Fabaceae*. En comparación con otros aislamientos bacterianos la cepa DPAV3T4 sintetizó altos niveles de PHAs en un caldo con manitol como fuente de carbono. La cepa fue caracterizada mediante pruebas fisiológicas y electroforesis de isoenzimas multiloci. Todos los aislamientos bacterianos sintetizaron el homopolímero Polihidroxi-butilato (PHB).

Palabras Clave: Polihidroxicanoatos, Diazótrofos, leguminosas, *Bradyrhizobium*.

ABSTRACT

The production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) was evaluated in 115 bacterial isolates of the *Rhizobiaceae* family obtained through 121 nodules of wild plants which are members of 23 species of the *Fabaceae* family. In comparison with other bacterial isolates the strain DPAV3T4 synthesized high levels of PHAs in culture medium using manitol as carbon source. The strain was characterized through physiological and electrophoresis multiloci isozyme tests. All bacterial isolates synthesized Polyhydroxybutyrate (PHB) homopolymer.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, Diazotrophs, Legumes, *Bradyrhizobium*.

Recibido: agosto 30 2009

Aceptado: septiembre 15 de 2009

Correspondencia: Universidad de Nariño Ciudadela Universitaria Torobajo, Bloque 3 Piso3. Grupo de Biotecnología Microbiana. Email: dabravob@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres de origen bacteriano con propiedades fisicoquímicas, similares a los plásticos xenobióticos con la particularidad de ser biodegradables (2, 3). Las bacterias productoras de PHAs representan nichos con adaptaciones fisiológicas particulares. Un nicho poco explorado es el gremio de los rizobios productores de PHAs (1, 12, 17, 18).

Colombia al ser un país biodiverso posee una gran variedad de ambientes que permiten la proliferación de sistemas vivos nativos. Cabe señalar que el departamento de Nariño cuenta con varios ecosistemas que permiten apreciar la diversidad biótica representativa del neotrópico. Dentro de esos ecosistemas se encuentran los páramos y los bosques altoandinos altamente conservados con especies leguminosas silvestres las cuales son los hospederos preferenciales de comunidades rizobianas. A pesar de ello el conocimiento existente con respecto a la síntesis de PHAs en bacterias diazótrofes es muy escaso en la comunidad científica (1,17,18), y se puede decir que el rol de PHAs en rizobios es poco estudiado (1, 17). En Nariño, aunque fueron descritas 478 especies de plantas nativas de la subfamilia *Faboideae* (4), no se conocía la relación fuente de carbono-metabolismo de PHAs en los endosimbiontes.

Por esa razón y por primera vez en el departamento de Nariño se investigó la producción de PHAs en bacterias

diazótrofes aisladas de plantas leguminosas silvestres de la subfamilia *Faboideae*. Para ello se identificó taxonómicamente plantas hospederas de bacterias rizobianas; se aisló bacterias rizobianas con capacidad de producción de PHAs, se determinó las condiciones de síntesis in vitro de PHA, se seleccionó un aislamiento bacteriano con mayor rendimiento de PHA en diferentes fuentes de carbono y se caracterizó el tipo de polímero sintetizado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron plantas leguminosas de siete bosques altoandinos del departamento de Nariño: Alto de Daza, Buesaco, Páramo de Laguna Negra, Páramo de Pueblo Viejo, Balalaika, Páramo de Laguna Azufral, Bosque Laguna de Telpis. En cada bosque se ubicaron parcelas de muestreo de 50m x 2m (5). Las leguminosas fueron identificadas por comparación con ejemplares del herbario PSO de la Universidad de Nariño (4) y mediante claves taxonómicas (5,6). Las muestras nodulares se transportaron al laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Nariño en donde se aislaron bacterias productoras de PHAs en agar levadura manitol (YMA) suplementado con Azul Nilo al 0,1% (8), aquellas colonias que bajo luz UV presentaron fluorescencias rojas, amarillas y verdes fueron seleccionadas como PHA positivas.

Inicialmente se asignaron como rizobios aquellos aislamientos que formaron colonias después de tres días de cultivo, y que presentaron

características culturales similares a las descritas por Trujillo y colaboradores (11), posteriormente estos aislamientos se cultivaron bajo condiciones de anaerobiosis en medio de cultivo carente de sales de nitrógeno (11). Finalmente se realizó una caracterización mediante tinciones de gram, perfil de antibióticos (con: Amikacina, Ampicilina, Bacitracina, Ceftazidima, Ácido Fuscídico, Lincomicina, Novobiocina, Tirmetroprim Sulfametoxazol, Vancomicina) (16), pruebas bioquímicas (como: Citrato de Simmons, ureasa, bilis esculina, reducción de nitrato, reducción de D-Manosa, Maltosa, Ramnosa y Manitol) (12) y por electroforesis de tres isoenzimas multiloci: Alanina Deshidrogenasa (ALD), Fosfatasa Alcalina (FAK) y Peroxidasa (POX) (11,15). Mediante la matriz obtenida con los marcadores descritos se realizó un dendrograma de similitud poblacional usando el paquete bioinformático NTSys versión 5.01, aplicando el método de distancia UPGMA y una matriz Euclidiana (23). Las condiciones de la corrida electroforética se realizaron según la metodología propuesta por Eardly (24).

Todos los experimentos de fermentación se realizaron en Erlenmeyers de 500mL con 210 ml de caldo de cultivo constituido por (en g.L⁻¹ de agua destilada) Manitol, 10g; Extracto de levadura, 0,2 g; Peptona, 0,8 g; MgSO₄ 7.H₂O, 0,5 g; K₂HPO₄, 0,5 g; NaCl, 0,1 g. Concentración final de nitrógeno: 1 g.L⁻¹; pH: 6,8 Esterilización a 121°C x 15 min. 15 Lbs

/ presión con agitación constante en agitador orbital termostado a 250 rpm durante 48 horas a una temperatura de 30°C (1, 17). Se seleccionó aislamientos bacterianos como productores de PHAs aquellos que resultaron positivos a la prueba de azul nilo y tinción con sudan negro II (8, 13). Para estimar la síntesis de PHAs en los aislamientos seleccionados se utilizó el medio de cultivo líquido levadura manitol YM (1), y se determinó como variables de respuesta la biomasa total medida por gravimetría, la producción de PHAs calculado por CG y el rendimiento producto /biomasa (Y_p/x) (10, 17). El aislamiento bacteriano con mayor producción de PHAs fue cultivado con diferentes fuentes de carbono (19) glucosa, sacarosa, galactosa y xilosa, cada una a concentración de 10 g.l⁻¹ en medio base compuesto por los nutrientes mencionados en el párrafo anterior.

El polímero se extrajo de acuerdo con la metodología propuesta por Hesse (9) y modificada por Fernández (10). La muestra de polímero se esterificó mediante la metodología propuesta por Braunegg (25) y se identificó por cromatografía de gases utilizando las condiciones de corrida de Fernández (14) que consistieron en inyectar 1 µL de muestra en cromatógrafo de gases (CGSM) marca Shimadzu GC-17^a, versión 3, con puerto de inyección Split/Splitless, se utilizó un detector FiD, Split: 80:1, con una columna DB5 (30 mt x 0.25 mm de diámetro; 25 µm de espesor); el gas de arrastre fue Helio a 100 KPascales de Presión, con velocidad lineal de 40 cm.seg⁻¹; flujo

interno de 1 mL.min⁻¹; la rampa de temperatura fue de 60° (@6°C.min⁻¹ hasta 90°C 5 minutos), el total de corrida fue de 12 minutos. Los tiempos de retención calculados se compararon con patrones de copolímero Poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato de marca Supelco®, según las condiciones del método de Hesse y Saroul (8), se utilizó como muestra patrón derivados metilados de copolímero BIOPOL Poli-(Hidroxibutirato-co-Hidroxivalerato 80:21) disponibles en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Nariño. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Statgraphics plus 5.1.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se muestrearon 101 plantas pertenecientes a 23 especies de leguminosas de la subfamilia *Faboideae*, en 7 bosques correspondientes a las tres zonas de altamontaña del departamento de Nariño. Para todos los bosques, el muestreo se realizó en época seca, durante los meses de Junio a Octubre. Entre las especies observadas se destacaron *Desmodium uncinatum* (Jacq D.C.), la cual presentó nódulos indeterminados. *Phaseolus vulgaris* (L.) que presentó nódulos determinados y grandes; y *Lupinus pubescens* (Benth) el cual formó nódulos indeterminados.

De las 23 especies de plantas colectadas, 13 correspondieron a los bosques alto de Daza y Buesaco ubicados al noreste del departamento de Nariño, lo cual equivale al 65% del

muestreo total; 6 especies correspondieron a los bosques aledaños a la Laguna Negra y Laguna de Telpis al sur este del departamento, valor equivalente al 21%; y 4 especies correspondieron a la los bosques de Balalaika, Laguna Azufral y Pueblo viejo, valor equivalente a un 15% del esfuerzo total de muestreo. Lo anterior evidenció que en los bosques Alto de Daza y Buesaco, se presentó una mayor cantidad de especies.

De las 23 especies de plantas fabáceas, 16 presentaron nódulos determinados; y 7 presentaron nódulos indeterminados. Se obtuvo un total de 115 aislamientos bacterianos nodulares. Cabe destacar que todos los aislamientos bacterianos fueron gram negativos, con formación de colonias mucoides, de borde regular y elevación cóncava. En nódulos determinados se aislaron colonias separadas y pequeñas; y en nódulos indeterminados se obtuvo colonias grandes y mucoides. La descripción macroscópica se ajustó a las descripciones realizadas por Dowling (11) y Trujillo (12) para bacterias fijadoras de nitrógeno simbiotes de leguminosas. Los resultados de las pruebas confirmatorias con tinción de azul nilo y sudan negro son iguales a las reportadas por Vásquez-Arroyo (15) y Vinuesa (16), quienes afirman que éstas características ubican a los aislamientos seleccionados dentro de la familia *Rhizobiaceae*.

De los 115 aislamientos 15 resultaron PHA positivos por fluorescencia en azul nilo y se utilizaron para estimar la producción de PHAs. De acuerdo con

el primer diseño experimental, a partir de los 15 aislamientos bacterianos se realizaron fermentaciones por triplicado para un total de 45 fermentaciones. Para cada réplica en el experimento se obtuvo resultados para las variables del diseño como biomasa, PHB y rendimiento $Y_{p/x}$, las cuales se promediaron como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Estimación de la producción de PHAs a partir de 15 aislamientos bacterianos obtenidos de nódulos de plantas silvestres de la subfamilia *Fabaceae* en la zona andina del Departamento de Nariño.

AISLAMIENTO	X g/L	PHB g/L	Y p/x
ALANT5fi2	0,05±0,33	0,03±0,22	0,60
ALANT2c3	0,03±0,00	0,01±0,57	0,33
ALANT2m	0,05±0,35	0,02±0,85	0,40
DCRO2T2	0,05±0,36	0,02±0,04	0,40
DPAV3T4	0,11±0,00	0,10±0,02	0,91
ALANT5fi1	0,02±0,27	0,01±0,18	0,50
DERY2T4	0,01±0,57	0,00±0,00	0,00
DCRO2T4	0,06±0,00	0,02±0,66	0,33
TLCA2T1G	0,05±0,41	0,01±0,89	0,21
TLCA2T1	0,08±0,33	0,01±0,85	0,13
DERY2T5	0,03±0,66	0,00±0,00	0,00
TLCA2T1g	0,07±0,66	0,01±0,81	0,14
TTCA3T3g	0,03±0,33	0,01±0,55	0,33
DPAV2T3	0,02±0,66	0,01±0,00	0,50
TTCA3T5g	0,21±0,47	0,00±0,00	0,00

A través de un análisis de varianza se estableció que el aislamiento bacteriano con mayor producción de biomasa y de PHA fue DPAV3T4 obtenido a partir de *Phaseolus vulgaris* (L.). Se determinó que la máxima concentración de PHB de bacterias diazótrofes asociadas a leguminosas silvestres de Nariño fue de 0.10 g.L^{-1} en un medio sin optimizar con manitol. Este es un buen reporte inicial para la producción de polímero en función de

las fuentes de carbono en aislamientos silvestre de rizobios nodulantes comparándolo con otros reportados (17,18).

Se destaca la alta producción del aislado DPAV3T4, comparado con los otros aislamientos nativos, ya que el PHA en rizobios, además del rol tradicional cumple con otras funciones como por ejemplo, controla el estado celular del potencial redox, disminuye las concentraciones de oxígeno y permite un concurrente incremento en los niveles celulares de NADP (18), además activa la inhibición de la enzima isocitrato deshidrogenasa NADP dependiente y citrato sintasa. Esta inhibición enzimática, dirige el Acetil-CoA y niveles de NADP y electrones desde el ciclo de Krebs hacia la síntesis de PHB. Por tanto, la producción de PHA en DPAV3T4 probablemente está asociado con la condición fisiológica de bacterias de nódulos determinados, como es el caso de los obtenidos a partir de *Phaseolus vulgaris* (L) (18, 26). El efecto de las fuentes de carbono a partir del segundo diseño experimental planteado se puede apreciar en la tabla 2.

Tabla 2. Efecto de las fuentes de carbono en la síntesis de PHB en el aislamiento DPAV3T4

Fuente de Carbono	Biomasa g/L	PHA g/L	μ	Yp/x
Glucosa	1,02±0,03	0,13±0,02	0,94	0,13
Sacarosa	0,99±0,02	0,07±0,01	0,92	0,07
Galactosa	0,88±0,01	0,05±0,03	0,73	0,06
Xilosa	0,26±0,04	0,01±0,01	0,69	0,04

En DPAV3T4, la cinética de crecimiento con glucosa como fuente de carbono (Figura 1), permite observar dos fases de crecimiento:

exponencial y estacionaria. La glucosa es un carbohidrato sencillo y la mayoría de los organismos vivos pueden catabolizarlo y en el caso de las bacterias la glucosa es fácilmente transportada a través de la membrana citoplasmática y puede ser transformada en polímeros de reserva intracelular (21, 21).

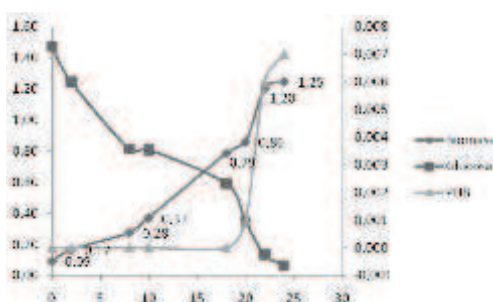


Figura 1. Cinéticas de crecimiento en Glucosa de la cepa DPAV3T4

Una característica que se puede observar en la producción de PHB (Figura 1) es que se inicia cuando el crecimiento celular llega a la fase estacionaria, aproximadamente a las 18 horas de fermentación. Por lo tanto, las fermentaciones son no asociadas al crecimiento (21; 21); pero a pesar de ello, no es un metabolito secundario porque no es excretado al medio ni es tóxico para la bacteria (1,17).

En la evaluación de las fuentes de carbono, el mejor rendimiento se dio bajo las fermentaciones que contenían glucosa como fuente de carbono (Y_p/x 0,13). Se encontraron diferencias significativas en la síntesis de PHB en función de la biomasa con los diferentes tratamientos empleados; por

lo cual, las fuentes de carbono influyen directamente en el nivel de síntesis de PHB en el aislamiento DPAV3T4.

Con los perfiles bioquímicos de antibióticos e isoenzimáticos se demostró que el aislamiento DPAV3T4 tiene un patrón de respuestas similar a la cepas comerciales de *Bradyrhizobium* sp. (16, 18). Se realizó un dendrograma de similitud para determinar el grado de cercanía entre la cepa evaluada en este trabajo DPAV3T4 (Figura 2) con la cepa comercial *Bradyrhizobium japonicum* DSMZ144 (11). Se utilizó como Outgroup dos cepas de referencia utilizadas por Trujillo, pertenecientes a diferentes géneros: *Ochrobactrum lupini* LUP21T y *Mesorhizobium mediterraneum* Rch-984 (12).

Los aislamientos bacterianos ALANT5f1 (de *Lupinus pubescens* Benth) Y DERY2T5 (de *Desmodium uncinatum* Jacq D.C.) mostraron dos movilidads electroforéticas peroxidasa diferentes a las reportadas por la literatura, indicando la posibilidad de que cada uno de los aislamientos presente dos tipos de isoenzimas diferentes correspondientes a los dos productos proteicos observados en el patrón electroforético: Haloperoxidasas y Alquilhidropoxidadas D (22). Mediante las pruebas realizadas se puede establecer que el aislamiento DPAV3T4 pertenece al género *Bradyrhizobium* y se puede reportar como cepa *Bradyrhizobium* sp. DPAV3T4

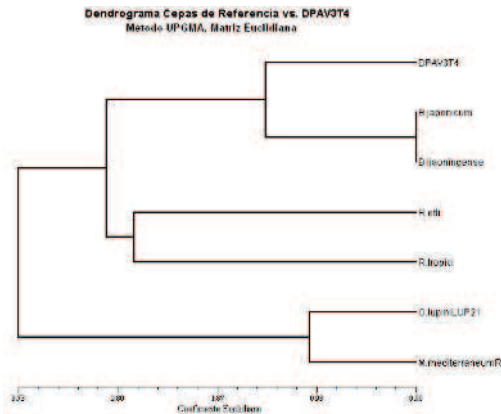


Figura 2. Caracterización de la cepa DPAV3T4 mediante perfil de bioquímicas, antibióticos e isoenzimas

En los cromatogramas de las muestras de polímero producido por *Bradyrhizobium* sp. DPAV3T4 se observa el pico representativo de la fracción butirato con un tiempo de retención de 4.84 minutos (Figura 3), similar al tiempo de retención del patrón, por lo cual es posible afirmar que *Bradyrhizobium* sp. DPAV3T4 sintetiza el homopolímero poli-3-hidroxi butirato.

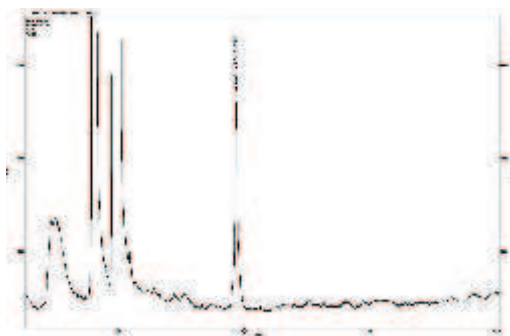


Figura 3. Cromatograma del aislamiento DPAV3T4 correspondiente al homopolímero Poli-3-hidroxi butirato (P-3-HB)

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

4. CONCLUSIONES

- En 7 bosques altoandinos se obtuvo un total de 23 especies vegetales pertenecientes a la subfamilia *Faboideae*.
- De 115 aislamientos bacterianos obtenidos en esta investigación, 15 presentaron características fenotípicas de la familia *Rhizobiaceae* y también fueron productores de PHAs.
- De 15 aislamientos bacterianos productores de PHA, DPAV3T4 fue el mayor productor con 110 mg por litro y alcanzó una producción de 130mg por litro en un medio de cultivo que utiliza glucosa como fuente de carbono.
- En el aislamiento DPAV3T4, las fuentes de carbono utilizadas influyen en el nivel de síntesis de polihidroxi butirato y no afectan la composición monomérica del polímero.

5. REFERENCIAS

1. Encarnación S. Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etli*. *Journal of Bacteriology*. Cuernavacas Mexico 1995; 177:3058-3066

2. Pettinari J. et al. Bioplásticos: Una Alternativa Ecológica. Revista Química Viva. Argentina 2104; 3:1-10
3. Steinbüchel A. Mikrobiologische Hydroxyalkanoate Säure Vielfalt: Die Zukunft.(MiniReview) Springer Verlag. Berlin Germany 2100; 4:456-498
4. Universidad De Nariño, Base de Datos Herbario PSO Actualizado Marzo 31 de 2106. Colombia 2106.
5. Gentry A. The Family Guide To The Family And Genera of Woody Plant of Northwest South America (Colombia – Ecuador – Perú). The Conservation International Press. Washington, D.C. USA 1993; 2:1-1216
6. Forero E.; Romero C. Estudio en Leguminosas Colombianas. ACCEFÍN. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colombia 2105; 5:1-225
7. Tellez O. Clave Taxonómica Dicotómica subfamilia Fabaceae. Flora de Nicaragua. MOBOT Press. Missouri. USA 2106; 1:1-12
8. Spiekermann P. et al. A Sensitive, Viable-Colony Staining Method Using Nile Red for Direct Screening of Bacteria that Accumulate Polyhydroxyalkanoic Acids and Other Lipid Storage Compounds. Springer-Verlag. Münster. Germany 1999; 171:73-80
9. Hesse G., Saruul M. Absortions Methods in Chemish Laboratorium. Groiter Verlag. Berlin. Germany 1943; 1:234-262
10. Fernández P, Ortíz F, España J. Caracterización de poli-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de Bacillus mycoides, FLB2. Revista Centro de Estudios en Salud Pasto. Colombia 2105; 1:72-76
11. Dowling F, Broughton C. Morphological change in rhizobial cultures. England 1986; 36:254-262
12. Trujillo M. et al. Nodulation of Lupinus albus by Strains of Ochrobactrum lupini sp. nov. Applied and Environmental Microbiology Journal. Córdoba Argentina 2105; 71:1318-1327
13. Ostle A, Holt J. Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-β-Hydroxybutyrate. Applied and Environmental Microbiology. Germany 1982; 44:238-241
14. Fernández P, Ortíz F, Burbano O, Guerrero M, España J. Influencia de Fuentes de Carbono y Nitrógeno en el Crecimiento Bacteriano y Síntesis de Polihidroxialcanoato de una Cepa de Bacillus mycoides FLB2. Revista Centro de Estudios en Salud Pasto. Colombia 2106; 1:34-42
15. Vásquez-Arroyo M. A rapid method for rhizobial detection in cultures. Spain 1998; 32:285-294
16. Vinuesa P. et al. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in Bradyrhizobium species cohesion and delineation.

- Molecular Phylogenetics and Evolution. Elsevier. Margburg, Germany 2105; 1:29-54
17. Dunn M. et al. Biochemical characterization of a *Rhizobium etli* and the monovalent cation-stimulated acyl-coenzyme A carboxylase with a high substrate specificity constant for propionyl-coenzyme A. *Microbiology*. Cuernavaca, México 2104; 1:399-406
 18. Trainer M, Charles T. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. Mini-Review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Springer Verlag. Germany 2106. 1:377-386
 19. Yüsekdağ Z. et al. Effect of Carbon and Nitrogen Sources and Incubation Times on Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) Synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. *African Journal of Biotechnology*. Denizli Turkey 2104; 3:63-66
 20. Garden E. Fermentation Process Kinetics. *Journal of Biochemistry Microbiology*. Germany 1959; 1:413-429
 21. Crueger W, Crueger A. *Biotechnología: Manual de Microbiología Industrial*. Oldenbourg, München 2th Ed. Germany Editorial Acribia; 1989
 22. Anderson N, Ascher P, Haghghi K. Root peroxidases and *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* nodulation affinities of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius*. A. Gray congruity backcross. *Kluwer Academic Publishers*. UK 2102; 126:379-390.
 23. Nei, M.; Kumar, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. 2100. Oxford University Press. pp. 1-333.
 24. Eardly, B. et al. Species Limits in *Rhizobium* Populations That Nodulate the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Applied and Environmental Microbiology Journal*. Pennsylvania USA, 1995, pp 507-512 Vol. 61, N. 2.
 25. Braunegg, G. et al. A rapid chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *ASM Journal*. USA. 1978. 26-32 Vol. 4, No. 150.
 26. Hadri A, Spaink HP, Bisseling T, Brewin NJ. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. 1998. Dordrecht press.