

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Optimización de condiciones abióticas para la mayor producción de exopolisacáridos de bacterias del grupo Rizobio aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos.

Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga

KATHERINE ALEXANDRA ZALDUMBIDE SEGOVIA

Quito, 2020

CERTIFICACIÓN:

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología del Srta. Katherine Alexandra Zaldumbide Segovia ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

MSc. Fernando Santacruz

Director de la Disertación

DEDICATORIA

Le dedicado este trabajo a mi madre Yina Segovia y un amigo incondicional, Giovanni Goyes, por el apoyo incondicional a lo largo de mis años de vida, por ser los patronos a seguir y formar a la persona que soy en la actualidad. También, le hago una dedicatoria especial a mi abuelita, Sergia Loor, por darme su ejemplo de lucha, por su amor y cariño brindado.

A mi familia, tíos, primos y sobrinos por motivarme días tras días a ser un ejemplo y salir adelante, por encontrarse a mi lado en cualquier circunstancia buena o mala.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por siempre representar un apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera universitaria.

Gracias a mi director de tesis MSc. Fernando Santacruz por ser guía y apoyo durante esta investigación y por la confianza depositada en mí. También, agradezco a la directora del proyecto Verónica Luna por dejarme formar parte de su equipo de trabajo.

A mis compañeros de laboratorio durante la tesis: Nicolás Molina y Jacqueline Gonzáles, por su colaboración en mi investigación; y especialmente a David Bustos por ser un compañero incondicional en momentos difíciles.

Un extiendo un agradecimiento a investigadores que apoyaron esta tesis como: Nicole Coronel, Diana Astorga y Magaly Estrella; y a todos los profesores y amigos que conocí durante la carrera, por inculcar en mis enseñanzas y conocimientos valiosos, a lo largo mi vida como estudiante universitaria.

Finalmente, le agradezco de forma especial a mi compañero durante el proceso de mi trabajo de titulación, Leonardo Arteaga, quién me impulsó en momentos difíciles y fue mi inspiración y motivación para seguir adelante con mis metas.

Infinitas gracias.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosómico

mm: Milímetros

µg: Microgramos

YMA: Agar extracto de levadura-manitol (por sus siglas en inglés)

mL: Mililitros

PCR: Reacción en cadena de polimerasa (por sus siglas en inglés)

µL: Microlitros

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones de muestreos: número de muestras y lugares de recolección.....	17
Tabla 2. Descripción y origen de la muestra.....	17
Tabla 3. Descripción morfología colonial en medios de cultivos específicos y morfología microscópica.....	18
Tabla 4. Perfil bioquímico-fenotípico de las cepas.....	19
Tabla 5. Identificación molecular de las cepas mediante análisis del gen ADNr 16S.....	19
Tabla 6. Concentración de EPS ($\mu\text{g/mL}$) en ensayo de <i>screening</i> cualitativo de las cepas de <i>Rhizobium</i>	20
Tabla 7. Concentración de EPS ($\mu\text{g/mL}$) para ensayo de pH.....	21
Tabla 8. Concentración de EPS ($\mu\text{g/mL}$) para ensayo de fuentes de carbohidratos.....	21
Tabla 9. Concentración de EPS ($\mu\text{g/mL}$) para ensayo de fuentes de nitrógeno.....	22
Tabla 10. Concentración de EPS ($\mu\text{g/mL}$) para ensayo de condiciones combinadas de crecimiento.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Muestra: Raíces de plantas leguminosas con nódulos	37
Figura 2. Biopilas de muestreo con crecimiento visible de plantas	37
Figura 3. Observación macroscópica del crecimiento de aislados de rizobios en agar YMA+Rojo Congo.	37
Figura 4. Observación macroscópica del crecimiento de aislados de rizobios en agar YMA +Azul de Bromotimol.	38
Figura 5. Visualización de los amplicones del gen ADNr 16S en gel de agarosa.	38
Figura 6. Screening cualitativo de producción de EPS	38
Figura 7. Curva de calibración de glucosa, método fenol-ácido sulfúrico modificado.....	39
Figura 8. Concentración de EPS en modificación de fuentes de carbono en el medio de cultivo. .	39
Figura 9. Concentración de EPS en modificación de fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo.	40
Figura 10. Concentración de EPS en modificación de pH en el medio de cultivo.	40
Figura 11. Concentración de EPS en condiciones de control y condiciones de tratamiento.....	41

Optimization of abiotic conditions for the increased production of exopolysaccharides from bacteria of the rhizobium group of soils contaminated with hydrocarbons

Optimización de condiciones abióticas para la mayor producción de exopolisacáridos de bacterias del grupo rizobio aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos

Zaldumbide¹, K., Santacruz¹, F., Astorga¹, D., Hidalgo², D., Lopez², J., Yáñez², P., Urvina², J. y Luna¹, V.

¹Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, Ecuador

²PETROAMAONAS EP, Centro de Investigación de Tecnologías Ambientales, Joya de los Sachas, Ecuador

e-mail: kathe-ecu@hotmail.com

1. RESUMEN:

Los rizobios son un grupo de bacterias Gram negativas de vida libre que se encuentra de forma prominente en la rizósfera al igual que en suelos contaminados. Se destaca por formar asociaciones simbióticas con plantas leguminosas, usándolas como su nicho ecológico. Esta bacteria produce una variedad de metabolitos secundarios, entre ellos, se encuentran los exopolisacáridos (EPS) que cuentan con potencial biorremediador en suelos contaminados con hidrocarburos. En este contexto, la presente investigación evaluó la capacidad de varios aislados de bacterias rizobios para producir EPS. Para esto, se recuperaron microorganismos a partir de suelo contaminado con hidrocarburos, a nivel de laboratorio, que dio como resultado once aislados, con los que se probó la mejor producción de EPS obteniéndose tres: R020801, R021102 y R021202. Posteriormente, se probó la producción del metabolito secundario bajo variación de condiciones de crecimiento, modificando en el medio de cultivo factores como: fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y pH; de forma individual y en conjunto. En este sentido, se demostró que, la producción de exopolisacáridos aumenta cuando uno o varios factores abióticos de crecimiento se han modificado. Además, se determinó que la modificación de factores abióticos y bióticos en conjunto, para las cepas

ensayadas, aumentaron significativamente la producción de EPS frente a condiciones abióticas y bióticas en las que la bacteria crece de forma normal.

PALABRAS CLAVES: rizobios, producción, exopolisacáridos, ensayos, optimización.

2. ABSTRACT:

Rhizobia are a group of free-living Gram negative bacteria that are found prominently in the rhizosphere as well as in contaminated soils. It stands out for forming symbiotic associations with leguminous plants, using them as its ecological niche. This bacterium produces a variety of secondary metabolites, including exopolysaccharides (EPS) that have bioremediation potential in hydrocarbon-contaminated soils. In this context, the present investigation evaluated the ability of various rhizobia bacteria isolates to produce EPS. For this, the microorganisms were recovered from the hydrocarbon-contaminated soil, a laboratory level, which resulted in once isolated, with which the best EPS production was tested obtaining three: R020801, R021102 and R021202. Subsequently, the production of the secondary metabolite was tested under varying growth conditions, modifying factors such as: carbon sources, nitrogen sources, and pH in the culture medium; individually and together. In this sense, it was shown that the production of exopolysaccharides increases when one or more abiotic growth factors have been modified. In addition, the modification of abiotic and biological factors was determined together, for the strains tested, they increased the production of EPS against abiotic and biotic conditions in which the bacterium grows normally.

KEYWORDS: rhizobia, production, exopolysaccharides, tests, optimization.

3. INTRODUCCIÓN:

La actividad económica que se destaca en la Amazonía Ecuatoriana es la explotación de recursos hidrocarburíferos. En el año 2019, las ventas de petróleo ocuparon el 5,2 % del PIB en Ecuador (BCE 2019)³. Estas cifras revelan que la extracción de crudo es una fuente importante de ingresos para el país. A más de generar divisas, esta actividad causa perjuicios al medioambiente. Según Vogliano (2009)⁴³, todas las fases de extracción de crudo y procesos adyacentes afectan a una gran variedad de ecosistemas. Uno de los problemas ambientales más preocupantes en esta región son los derrames de crudo, resultado de la explotación petrolera (Becerra et al. 2013)⁴. El suelo, en la mayoría de los casos, es el cuerpo receptor de contaminación proveniente del manejo inadecuado de productos y residuos petroleros, que repercuten directamente en la baja productividad de la tierra (Maldonado y Narváez 2001)²⁴. Además, la contaminación interviene en cambios significativos en las características físicas y químicas del suelo, provocando una pérdida sustancial en la capacidad de ser el soporte de vida micro y macroscópica (Fernández y García 2013)¹¹.

Para contrarrestar los daños ocasionados por esta actividad se han implementado metodologías amigables con el medioambiente como la biorremediación, basado en la metabolización y degradación de los compuestos contaminantes por microorganismos bacterias que se encuentren de forma natural en el suelo (Agnello et al 2016; Ferreta-Cerrato et al 2006)^{2,12}. Esta metodología ha probado tener una considerable efectividad, por lo que PETROAMAZONAS-EP, a través de su Proyecto Amazonía Viva (PAV), se ha dedicado a la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos implementado dicho método. En la actualidad, el método específico utilizado es la bioestimulación de bacterias capaces de degradar petróleo a través del compostaje (PETROAMAZONAS EP 2015)²⁷. Sin embargo, la textura arcillosa del suelo amazónico es uno de los factores que dificultan las actividades de biorremediación. Esto se debe a su tendencia a la compactación y plastificación, gran

capacidad de retención de agua, mala aireación y poca permeabilidad, haciéndolo imposible de manejar e impidiendo el desarrollo tanto de microorganismos con potencial biorremediador como de plantas (Calvache 2015; Campaña 2016; FAO 2007)^{5, 6, 10}.

En respuesta a la problemática antes planteada, existe precedente del uso de microorganismos de origen ambiental como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium*, *Bradirhizobium*, *Agrobacterium* con potencial de generar cambio en la agregación de las partículas del suelo, aprovechando compuestos de derivados de su metabolismo secundario como los exopolisacáridos (EPS). Los EPS son biopolímeros que cuentan con propiedades únicas. Según Costa, Raaijmakers y Kuramae, (2018)⁸ estas moléculas microbianas son capaces de interactuar con partículas de arcilla formando agregados de suelos más estables que impiden su desecación y aumentan su permeabilidad.

Precisamente, los microorganismos rizobios son bacterias Gram negativas de vida libre y nativas de un suelo contaminado, con capacidad de formar asociaciones simbióticas con raíces de plantas leguminosas usando como estrategia la producción de EPS (Santillán et al. 2005)³³. Dentro de este contexto, se planteó la evaluación de producción de EPS por parte de este grupo bacteriano, con el fin de promover positivamente su producción modificando condiciones químicas y físicas de crecimiento. El uso a futuro de los EPS microbianos permitirá mejorar los procesos de biorremediación mediante cambios en la estructura del suelo que fomenten la actividad degradadora de hidrocarburos. Esto se traduciría en reducción de costos y ahorro de recursos materiales y humanos en el proceso.

4. MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1.Muestra:

El muestreo en los Centros de Gestión de Pasivos ambientales (CGP), se realizó en función de la presencia de nódulos en las raíces de plantas encontradas en las biopilas. Los nódulos

son estructuras que evidencian la presencia de las bacterias simbióticas de interés para el estudio (Figura 1). Las plantas seleccionadas contaban con características típicas de leguminosas como: hojas alternadas con forma pinnada o trifoliada, con ramas a manera de enredadera.

4.2.Recolección de la muestra:

El muestreo se realizó en tres CGP pertenecientes a Petroamazonas EP ubicados en las provincias de Orellana y Sucumbíos (Tabla 1). Las muestras de cada CGP fueron tomadas de biopilas (por triplicado) seleccionadas al azar y del lugar de acopio (Figura 2). Las biopilas estaban conformadas por suelo contaminado y por compost. El acopio únicamente estaba conformado por suelo contaminado.

4.3.Aislamiento y caracterización de *Rizobios*:

El aislamiento de rizobios se lo realizó tomando 6 nódulos de las raíces de las plantas seleccionadas para desinfectarlos mediante inmersión sucesiva en etanol al 70 % por un minuto, seguida de hipoclorito de sodio al 2,5 % durante tres minutos y diez veces de enjuague con agua destilada (Rodríguez 1993; Somasegaran y Hoben 1994)^{32, 36}. Los nódulos se trituraron asépticamente, se tomaron alícuotas para realizar tinción Gram y la muestra se sembró por agotamiento en agar extracto de levadura-manitol (YMA, por sus siglas en inglés). Se incubó a 27 °C durante 3 - 5 días (López 2017)²¹. A continuación, se hicieron pases de las colonias obtenidas a medios específicos como YMA con Rojo Congo, Agar Extracto de Levadura con Azul de Bromotimol (Figura 3 y 4) para caracterizarlas fenotípicamente mediante descripción de su morfología colonial, y en YMA semisólido para observar la motilidad de la bacteria (Hernández et al. 2012)¹⁶.

La caracterización fenotípica se la realizó mediante prueba de catalasa, producción de cetolactasa y utilización del citrato (Abrar y Letebo 2017; Sosa et al. 2004)^{1,36}. También, se

efectuó prueba de sensibilidad Antibiótica mediante el método de difusión por disco, con diferentes antibióticos, con el fin de complementar el perfil fenotípico de la bacteria y (López 2017).

4.4. Caracterización molecular de los aislados:

La extracción del ADN bacteriano se realizó mediante el uso del kit AccuPrep® de la casa comercial Bioneer, siguiendo el protocolo establecido para bacterias Gram negativas sugerido por el fabricante. La concentración del ADN fue examinada a través de espectrofotometría (α 260 nm) usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)⁴¹.

Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por su siglas en inglés) se amplificó el gen ADNr 16S, utilizando los primers: 41F [5'-GCTCAAGATTGAACGCTGGCG-3'] y 1488R [5'-CGGTTACCTTGTTACG-ACTTCACC-3'], descritos por Herrera-Cervera et al. (1999)¹⁷. Para lo cual, se utilizó la premezcla GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA)²⁸, adecuando los volúmenes conforme lo determina el fabricante y considerando las condiciones determinadas por Herrera-Cervera et al. (1999)¹⁷ para los cebadores, obteniéndose así, un volumen final de 25 μ L. Las condiciones de PCR para la amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 2 min, por un ciclo; 94 °C por 1 min; 65 °C por 30 s; y 72 °C por 2 min, por 35 ciclos. Posteriormente, se revelaron los productos de PCR en gel de agarosa al 0,5%, corridos a 45 minutos y 95 voltios en una cámara de electroforesis horizontal (Thermo Scientific). Se empleó el marcador de peso molecular de 1000 bp DNA Ladder (Figura 5) (Promega, Madison, WI, USA)²⁸. A continuación, se caracterizaron molecularmente las muestras por secuenciación Sanger por MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur)²³.

Finalmente, las secuencias logradas se editaron y alinearon a través del programa MEGA X. Las secuencias consenso obtenidas fueron comparadas con las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), usando la herramienta Básica de Búsqueda y Alineación (BLAST, por su siglas en inglés), con el fin de reconocerse la identidad molecular específica de los aislados.

4.5. *Screening* de producción de EPS:

El *screening* cualitativo de producción de EPS se efectuó por observación de la textura acuosa/mucoide de las colonias obtenidas en medio de cultivo YMA (Figura 6). Por otro lado, el *screening* cuantitativo de la producción de EPS, se lo realizó en ensayos por triplicado. Para lo cual, se sembró una suspensión bacteriana a una concentración 0.5 de la escala de McFarland de cada cepa en 10 mL de caldo extracto de levadura-manitol. Se incubó a 27 °C durante 3 días (Nirmala . 2011) ²⁹.

4.6.Extracción y cuantificación de EPS:

La extracción de los exopolisacáridos se realizó centrifugando el cultivo a 10 000 rpm a 4 °C, por 20 minutos. Se tomó el sobrenadante y se añadió etanol frío a 4 °C+/-2 al 96 % en un volumen 3:1 (v/v), respectivamente. Se refrigeraron los tubos toda la noche a 4 °C y se centrifugaron a 10 000 rpm a 4 °C, por 30 minutos. Posteriormente, se evaporó el etanol excedente y se resuspendió los EPS en 1,5 ml de agua destilada estéril (Sayyed et al. 2011)³⁴.

La cuantificación de EPS se llevó a cabo empleando la metodología de fenol-ácido sulfúrico modificado, para la que se utilizó un espectrofotómetro con una longitud de onda a 485 nm que mide la reacción colorimétrica producida por la combinación de los azúcares de la muestra, el fenol y el ácido sulfúrico (Dubois et al. 1956)⁹. Para la transformación de datos en función de la densidad óptica, se efectuó con antelación una curva de calibración obtenida a partir de diferentes concentraciones de glucosa. Posteriormente, se determinó su línea de

tendencia y la respectiva ecuación de la curva que se implementó para la conversión de los datos obtenidos de densidad óptica a concentración de EPS (Figura 7).

4.7. Ensayos de optimización de condiciones de cultivo:

Los tres aislados con mayor producción de EPS fueron utilizados para los ensayos. Para esto se estableció, de forma independiente, la mejor fuente de carbono (sacarosa, glucosa, glicerol y manitol), fuente de nitrógeno (úrea, extracto de levadura y caseína) y pH (6,7 y 8). Esto dio un total de diez tratamientos para cada bacteria.

Los ensayos se realizaron por triplicado en 10 mL caldo extracto de levadura-manitol, usando como base la composición del caldo extracto de levadura-manitol, modificando las fuentes de carbono, nitrógeno y pH. El inóculo de la bacteria y condiciones de cultivo se lo realizó como se establece en la Sección 4.5. La extracción y cuantificación de EPS se lo efectuó siguiendo los protocolos fijados en la Sección 4.6.

Una vez establecida la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y pH, que promovía la producción de EPS, para cada aislado, se realizó un ensayo de condiciones de cultivo optimizadas. Para este ensayo, se modificó en el medio de cultivo las variables de crecimiento antes detalladas, de manera conjunta. Se llevó a cabo el tratamiento por triplicado, y se estableció un control, en el que se manejó condiciones de cultivo en las que la bacteria crece normalmente según López (2017)²¹ (pH 7, manitol y extracto de levadura en el medio). La inoculación de la bacteria, extracción y cuantificación de EPS, se lo realizó como se detalla en las Secciones 4.5 y 4.6.

4.8. Análisis estadístico:

Se examinaron los resultados a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA), conjuntamente con la prueba post-hoc de Tukey (0.05) usando el programa IBM SPSS

Statistics 25. También, se realizó un análisis descriptivo de los resultados a través de la elaboración de gráficos descriptivos de barras.

5. RESULTADOS:

5.1. Aislamiento y caracterización de Rizobios:

Se obtuvieron 11 aislados presuntivos de pertenecer al grupo Rizobio (Tabla 2). Se procedió a describir la morfología colonial de los aislados en base a los siguientes parámetros: tamaño, forma, color, aspecto y textura. Las colonias aisladas en Agar YMA con Rojo Congo en general tenían las siguientes características macroscópicas: un radio entre 1 - 3 mm, forma circular, textura acuosa-mucoide, aspecto transparente, color blanco y bordes lisos (Figura 3). También, en este medio de cultivo se observó la falta o poca absorción del colorante por parte de las colonias una característica típica del grupo de los rizobios que permitió diferenciar entre colonias de *Agrobacterium* que sí absorben el rojo congo. Por otro lado, las características de las cepas en Agar Extracto de Levadura con Azul de Bromotimol fueron: un radio entre 1 - 3 mm; forma circular; textura acuosa-mucoide; aspecto semitranslucido y bordes lisos (Figura 4). Asimismo, en este medio se identifica el origen ácido o básico de los compuestos producidos por las colonias, que permite de manera aproximada la diferenciación entre los grupos de Rizobios. Las características microscópicas generales de los aislados fueron: bacilos cortos, Gram negativos (Tabla 3).

En cuanto al perfil bioquímico de la bacteria, se logró establecer que son productoras de enzima catalasa, son mótils y capaces de utilizar citrato como fuente de carbono. Por otro lado, se determinó que la bacteria es indol negativo y cetolactasa negativa. Esta última es una prueba que confirma la diferencia entre bacterias del género *Agrobacterium* que son fenotípicamente muy similares a las bacterias del grupo Rizobio por pertenecer a la familia *Rhizobiaceae*. El género *Agrobacterium* es capaz de fermentar lactosa a través de la

producción de enzima cetolactasa, una característica con la que no cuentan los Rizobios (Sosa et al. 2004; Pérez et al 2008)^{37, 30}. Respecto al perfil antibiótico de las cepas se puede identificar resistencia a ampicilina en la totalidad de las cepas analizadas (colocar el número de cepas (Tabla 4).

5.2. Caracterización molecular de los aislados:

La amplificación del gen ADNr 16S de los once aislados presuntivos de pertenecer al género *Rhizobium*, dieron como resultado amplicones de peso molecular entre 900-1000 pb aproximadamente, como se lo puede observar en la Figura 5.

La identidad de las secuencias consenso obtenidas fueron analizadas mediante la herramienta informática BLAST, que determinó que del total de los once aislados, siete presentaron un porcentaje de identidad entre el 97 - 99% con el género *Rhizobium* y cuatro de los aislados un porcentaje de identidad entre el 98 - 99% con el género *Mesorhizobium* (Tabla 5).

5.3. Screening de Rizobios productores de EPS

Se identificó la producción de EPS por parte de todos los rizobios aislados de forma cualitativa (aspecto mucoide de la colonia) y cuantitativa (método de fenol-sulfúrico modificado) (Figura 6). Mediante el programa SPSS Statistics 25, se identificaron diferencias significativas entre las bacterias. Se destacaron los aislados: R020801, R021102 y R021202; como los mayores productores de la sustancia de interés dentro del grupo, dando un promedio de: 13,05 ug/mL; 13,94 ug/mL; y 20,77 ug/mL, respectivamente (Tabla 6). Estos aislados fueron usados para los ensayos de optimización de condiciones de cultivo.

5.4. Optimización de condiciones de cultivo:

Según Ribiero y Bukert (2016)³¹, la producción de polisacáridos está ligada a la presencia de ciertos nutrientes en el medio de cultivo, así como también, a las condiciones físicas y

químicas de crecimiento. Dentro de este contexto, se probaron diferentes condiciones abióticas con el fin de optimizar la producción de EPS bacterianos y se determinó la mediante pruebas estadísticas (ANOVA y test post hoc de Tukey) las diferencias en los resultados obtenidos en cada tratamiento:

5.4.1 Ensayo de fuentes de carbono: Para los aislados R020801 y R021202, en las pruebas estadísticas, se establecieron diferencias significativas referentes a la producción del metabolito secundario, cuando se modifica la fuente de carbono. Se identificó a la sacarosa como promotor para ambas bacterias. Por otro lado, para el aislado R021102 no existió diferencias estadísticamente significativas relativas a este término, sin embargo, se determinó una tendencia al aumento de la cantidad de EPS en un medio cultivo suplementado con manitol (Tabla 8, Figura 8).

5.4.2 Ensayo de fuentes de nitrógeno: Para este ensayo se realizaron los análisis estadísticos correspondientes y se determinaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de EPS generados, cuando se modifica la fuente de nitrógeno (úrea y extracto de levadura) para los aislados R020801 y R021102, de forma respectiva. En el caso del aislado R021202, no se establecen diferencias significativas en la producción de EPS, no obstante, se observó una tendencia positiva a la promoción de EPS en presencia de urea en el medio de cultivo (Tabla 9, Figura 9).

5.4.3 Ensayo de pH: se expusieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la producción de EPS, cuando se modificó el pH. Se identificó el pH óptimo para cada uno de los aislados: R020801, R021102 y R021202 en: 7, 8, 7; respectivamente (Tabla 7, Figura 10).

El anterior análisis a través de la significancia de los datos obtenidos y sus tendencias, se establecieron las condiciones que promovían de forma positiva la producción del metabolito de interés, de manera que para la cepa R020801 se establecieron como condiciones óptimas

pH 7, sacarosa y urea en el medio. Para la cepa R021102 pH 8, glicerol y extracto de levadura en el medio. Finalmente, para la cepa R021202 las condiciones identificadas fueron pH 7, sacarosa y caseína/urea en el medio. Teóricamente combinando estas condiciones de cultivo, existiría un aumento significativo en la producción de EPS (Tabla 10, Figura 11).

5.5. Ensayo de combinación de condiciones de cultivo:

Se realizó el ensayo con condiciones de control (pH 7, manitol, extracto de levadura) y condiciones de tratamiento (mejores condiciones abióticas para cada cepa). Los resultados obtenidos fueron analizados a través de la prueba ANOVA, en la que se determinó que al menos uno de los tratamientos generaba diferencias estadísticamente significativas en la producción de EPS. Por medio del test de Tukey, se confirmó el supuesto y además se determinó que las condiciones de tratamiento provocaban un aumento significativo en la producción de EPS para los tres aislados.

6. DISCUSIÓN:

Los Rizobios son bacterias de vida libre que aprovechan una gran variedad de nutrientes que se encuentren en su nicho ecológico, siendo capaces de degradar hidrocarburos carbonados policíclicos. Cuentan con características que les permiten vivir en ambientes hostiles, gracias a su capa externa compuesta por EPS que protege a la célula contra la desecación y otros factores de estrés (Sridevi et al 2007)³⁸. En general, todas las características juntas antes mencionadas conceden a estas bacterias el poder habitar en diversas matrices.

En esta investigación, los resultados mostraron que a partir de los nódulos extraídos de las plantas leguminosas fue posible recuperar once aislados con los siguientes parámetros fenotípicos: producción de enzima catalasa; motilidad; poca o falta de absorción de rojo congo; utilización de citrato como fuente de carbono; no producción de enzima cetolactasa e indol; y resistencia a ampicilina. Estas características concuerdan con las establecidas para

el género *Rhizobium* y *Mesorhizobium* por Hernández, Cubillos, y Millán (2012)¹⁶; Martínez et al. (2005)²⁵; y Sosa et al. (2004)³⁷. Así mismo, se establece una concordancia con los géneros *Rhizobium* y *Mesorhizobium* en cuanto a la descripción de la morfología colonial de los aislados como lo determinada Vincent (1970)⁴²; Jarvis, et al. (1997)¹⁸; Kuykendall et al. (2005)²⁰; Wang et al. (1999)⁴⁴. Así mismo, los resultados del perfil fenotípico, bioquímico y morfológico, en conjunto, permitieron determinar de forma preliminar que las bacterias aisladas podrían pertenecer a los géneros *Rhizobium* y *Mesorhizobium*. Este supuesto se confirmó a través de herramientas moleculares, que además de, ratificar la identificación fenotípica de los aislados, corroboró la preeminencia del género *Rhizobium* en las muestras (nódulos) analizadas. Zhang (2012)⁴⁵ realizó una investigación enfocada en el aislamiento de Rizobios de suelos contaminados y determinó, asimismo, una buena recuperación de estas bacterias, identificando a *Rhizobium* como el género más frecuente en este tipo de matrices, dentro de su estudio. Esta premisa, conjuntamente con nuestra investigación, representa un antecedente de la preeminencia del género en mención, en este tipo de hábitat.

En el presente estudio, además de la recuperación de estas bacterias, se buscó identificar y evaluar su producción de EPS. En publicaciones anteriores, se detalla que la producción de EPS en ciertos rizobios y se lleva a cabo únicamente como estrategia para constituir simbiosis con una planta hospedera (Guianeya 2008)¹⁴. En contraste, Sutherland (1972)⁴⁰ y Janczarek et al. (2015)¹⁹ señalan que los rizobios, sin necesidad de interacción simbiótica, pueden producir importantes cantidades en medios de crecimiento, sólidos o líquidos. Para probar la afirmación planteada por Sutherland (1972)⁴⁰ y Janczarek et al (2015)¹⁹; en esta investigación, se experimentó la producción del metabolito de interés mediante un *screening* cualitativo, en el que se estableció que los once aislados, independientemente del género, eran capaces de generarlos.

La generación de EPS es una propiedad que se encuentra influenciada por ciertos factores. El primer factor de influencia es el género y la especie de la bacteria con la que se esté trabajando. Investigaciones preliminares reflejan la variación en la cantidad de EPS generados para diferentes cepas de rizobios, bajo las mismas condiciones de crecimiento (Luque et al. 2014)²². Esta premisa se pudo constatar a través del *screening* cualitativo de la producción de la sustancia en cuestión. En los resultados, se notó una variabilidad en la cantidad de EPS que cada aislado generó, haciendo énfasis que las bacterias estuvieron sometidas a las mismas condiciones de crecimiento. A partir de este hecho, se logró, además, establecer a R020801, R021102 y R021202, como los aislados que mayor cantidad de EPS produjeron. Cabe destacar que los tres aislados pertenecen al género *Rhizobium*. De acuerdo con la bibliografía, este género en particular, es capaz de producir cantidades considerables de EPS en condiciones óptimas de crecimiento (Luque et al 2014)²². Como se señaló anteriormente, los EPS son estructuras que protegen a la bacteria de factores externos desfavorables, permitiéndole sobrevivir mayor tiempo en estas condiciones y posibilitando su recuperación a nivel de laboratorio.

Del mismo modo, existe evidencia experimental respecto a la influencia de factores abióticos como: fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, pH, entre otros; en la producción de EPS, siendo los de mayor influencia los mencionados (Janczarek et al., 2015; Sayyed et al. 2011; Sridevi y Mallaiah, 2007)^{19, 34, 35}. Con el fin de probar este supuesto, en este trabajo, se ensayó la modificación de condiciones abióticas, de manera independiente (fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y pH), para evaluar su síntesis.

Inicialmente, se experimentó con cuatro fuentes de carbono. Los aislados R020801 y R021202 en medio de cultivo con sacarosa produjeron mejores cantidades de EPS; en el aislado R021102, el carbohidrato que provocó este efecto fue el glicerol. De forma semejante, Sayyed (2011)³⁴ modificando la fuente de carbono en sus ensayos de producción

de EPS en bacterias del género *Rhizobium*, estableció que la dextrosa, respectivamente, promovían una mayor cantidad de EPS.

De la misma manera, se ensayaron tres fuentes de nitrógeno, entre las que se destacó la urea para los aislados R020801 y R021202; y el extracto de levadura para R021102, como sustrato promotor en la producción del metabolito secundario. Mukherjee et al. (2011)²⁶, en su estudio estableció que la glicina aumentaba la cantidad de EPS generados por bacterias del género *Rhizobium*.

Otro parámetro ensayado fue el pH. Los aislados R020801 y R021202 dieron una respuesta positiva a pH 7; mientras que para R021102 a pH 8 se consiguió un resultado similar. Staudt et al (2012) establece que el pH óptimo para que las bacterias del género *Rhizobium* puedan producir mayor cantidad de EPS es 6.9.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de modificación de fuente de carbono, nitrógeno y pH, se puede concluir que existe influencia de cada uno de los parámetros para promover la producción de EPS por parte de las bacterias. Además, se determinó que para lograr una generación óptima de la sustancia de interés en cada uno de los aislados, se necesitaban requerimientos bióticos y abióticos diferentes. Se pudo contrastar este resultado con los encontrados en las investigaciones citadas anteriormente, para los que en cada caso, los parámetros óptimos fueron diversos. Los rizobios es un grupo bacteriano que cuenta con una alta tolerancia a los cambios a nivel de salinidad, pH, temperatura, también son capaces de usar una gran variedad de nutrientes para conseguir energía. Todas estas características juntas le confieren a la bacteria una capacidad de adaptación a condiciones abióticas y bióticas de la matriz en la que se encuentren; por esta razón los requerimientos nutricionales de las bacterias aisladas en nuestra investigación no son iguales en las bacterias aisladas en otros estudios.

Finalmente, para comprobar si existe una influencia positiva de los parámetros experimentados anteriormente pero, en esta ocasión de forma combinada; se ensayaron condiciones de cultivo optimizadas (tratamientos) y condiciones de cultivo normales para el género *Rhizobium*, con el fin de contrastar los resultados conseguidos en ambos entornos. El ensayo manifestó que para los tres aislados, la mayor cantidad de la sustancia de interés, se consiguió en condiciones de tratamiento. También, se logró identificar a uno de los aislados (R021102) como la bacteria que mayor cantidad de EPS produjo dentro del grupo con 39,17 ug/ml, bajo condiciones de tratamiento. De forma semejante, Sayyed (2016)³⁴ evaluó la producción de EPS en bacterias del género *Rhizobium* y estableció condiciones óptimas para la promoción de la sustancia como: la dextrosa, el extracto de levadura a pH 8; en el que se logró una cantidad máxima de 2 600 ug/ml. Por su parte, Nirmala (2011)²⁹ realizando ensayos similares con *Rhizobium* estableció que, en un medio de cultivo suplementado con manitol y nitrato de potasio, se produjo una mayor cantidad de EPS (1 680 ug/ml). A partir de los datos arrojados en las investigaciones citadas y en la nuestra, se puede concluir que para que las bacterias, al menos del género *Rhizobium*, puedan generar una mayor cantidad del metabolito secundario en cuestión, es necesario determinar condiciones nutricionales específicas que necesitan ser incorporadas en su medio de crecimiento; con el fin de que el microorganismo pueda usarlos de forma óptima en su metabolismo secundario. Estos estudios en conjunto, también, establecen un precedente de la variabilidad de los requerimientos nutricionales de bacterias del género *Rhizobium*, tanto para un objetivo en general, como lo es su sobrevivencia en ambientes hostiles, así como también para un objetivo específico, como la producción de EPS en el microorganismo. Sin embargo, hay que recalcar la diferencia en la cantidad de EPS generados con los estudios citados con respecto al nuestro. Esto puede deberse a las variaciones en la metodología usada en los ensayos de optimización; en las investigaciones citadas, se aplicaron mayor tiempo de

incubación, mayor volumen de cultivo e inoculo, y otros parámetros como la agitación del medio de cultivo, lo que en consecuencia, provoca una mayor generación de EPS. Otro factor que interviene en la cantidad de EPS producida es la especie o la cepa con la que se esté trabajando. Las bacterias usadas en nuestra investigación y en los estudios citados pertenecen al mismo género (*Rhizobium*) pero, difieren en especie y cepas.

7. CONCLUSIONES:

El desarrollo del proyecto de investigación permitió el aislamiento de rizobios a partir de suelos contaminados con hidrocarburos y además evaluar la producción de EPS por parte de este grupo de bacterias. Se logró determinar que los microorganismos rizobios obtenidos son productores del metabolito secundario en cuestión. Además, se consiguió identificar a los aislados que tenían la capacidad de generar en mayor cantidad los EPS (R020801, R021102 y R021202). También, a través de diversos experimentos, se confirmó la influencia en la producción de EPS, cuando en el medio de crecimiento bacteriano se modifica la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y pH. A partir de estas pruebas, se logró optimizar las condiciones de crecimiento de las bacterias y se probó su producción de EPS en estas condiciones. El análisis estadístico demostró que las bacterias en medio de cultivo suplementado con los nutrientes óptimos producen de cantidades estadísticamente significativas de EPS. En consecuencia, la información obtenida es una prueba experimental de la influencia de las condiciones de abióticas y bióticas de crecimiento sobre la producción de EPS en este grupo de bacterias, obtenidas a partir de suelos contaminados. Además, esta investigación es una pauta para la realización a futuro de investigaciones destinadas a la bioprospección mediante el estudio de este grupo de bacterias, que por ser de vida libre tienen un gran potencial biotecnológico y ambiental, así como también, el potencial de biorremediación de los metabolitos secundarios que producen.

8. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es resultado de la colaboración y apoyo financiero entre el proyecto “Amazonía Viva” de Petroamazonas EP, y la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Adicionalmente, un especial agradecimiento al laboratorio del Centro de Tecnologías Ambientales del Proyecto Amazonia Viva, Petroamazonas EP, por permitir uso de sus equipos e instalaciones en el desarrollo de esta investigación y a los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica por abrir las puertas para que esta investigación se lleve a cabo.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Abrar, T, Letebo, A. 2017 ¹. Isolation and Characterization of Rhizobia from Rhizospher and Root Nodule of Cowpea, Elephant and Lab Lab Plants. International Journal of Novel Research in Interdisciplinary Studies, 4(4); 1-7. Novelty Journals. [Internet]. [citado 2018 Nov 4]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/318642628_Isolation_and_Characterization_of_Rhizobia_from_Rhizospher_and_Root_Nodule_of_Cowpea_Elephant_and_Lab_Lab_Plants
- Agnello A, Bagard M, VanHullebusch E, Esposito G, Huguenot D. 2016 ². Comparative bio-remediation of heavy and petroleum hydrocarbons co-cotaminated soil by natural attenuation, phytore-mediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. Science of the Total Environment: 693-703.
- [BCE] Banco Central del Ecuador. 2019 ³. Reporte del Sector Petrolero. [Internet]. Quito (Ec). [citado 2019 dic 20]. Disponible en: <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Estadisticas/Hidrocarburos/ASP201906.pdf>

- Becerra, S., Paichard, E., Sturma, A. y Maurice. L. 2013 ⁴. Vivir con la contaminación petrolera en el Ecuador: percepciones sociales del riesgo Sanitario y capacidad de respuesta. Revista Líder. [Internet]. [citado 2018 Nov 4].
- Calvache, A. 2015 ⁵. Suelos del Ecuador [Internet]. Guayaquil (Ec): Congreso Sudamericano de Agronomía; [citado 2018 Nov 4]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/301701400_los_suelos_del_ecuador
- Campaña, S. 2016 ⁶. Tipos de Suelos. [Internet]. Guayaquil (Ec): Scribd; [citado 2018 Nov 18]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/311163645/Tipos-de-Suelos-en-El-Ecuador>
- Castellane T, Otononi A, Lemos E. 2015 ⁷. Characterization of Exopolysaccharides Produced by Rhizobia Species. Revista Brasileira de Ciência do Solo. [Internet]. [citado 2018 Nov 18]; 39(6): 1566-1575. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1590/01000683rbc20150084>
- Costa O, Raaijmakers J, Kuramae E. 2018 ⁸. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. Frontiers in microbiology- [Internet]. [citado 2018 Nov 18]; 9: 1636. Disponible en: [doi:10.3389/fmicb.2018.01636](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636)
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J.K, Rebers P.A, Smith F. 1956 ⁹. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry. [Internet]. [citado 2018 Nov 18]; 28: 350-356. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>
- [FAO] Food and Organization of the United Nations. 2007 ¹⁰. Tema 3: El suelo, diferencias según su aspecto físico y químico. [Internet]. FAO; [citado 2019 ene 14]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/009/ah645s/AH645S04.htm>

Fernández V, García V. 2013 ¹¹. Apuntes de clase de la asignatura Balances de masa en suelos contaminados, especialización Ingeniería Sanitaria UNAM. México D.F. (Mex): UNAM; [citado 2018 nov 20]. Disponible en: <https://www.unamenlinea.unam.mx/recurso/82746-apuntes-y-notas-de-clase-de-la-facultad-de-ingenieria>

Ferrera R, Alarcón A. 2007 ¹². Microbiología agrícola. Primera edición. México D.F. (Mex): Editorial Trillas. p. 225-236

Ferrera-Cerrato R, Rojas- Avelizapa N, Poggi- Va-raldo H, Alarcón A, Cañizares-Villanueva R. 2006 ¹³. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista Latinoamericana de Microbiología; 48(2):179 – 187

Guianeya P, Gómez G, Nápoles M, Morales B. 2008 ¹⁴. Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. Pastos y Forrajes. Scielo. [Internet]. [citado 2019 dic 15]; 31(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942008000200005&lng=es&tlng=es.

Guamán F, Torres R, Granda K, Nápoles M. 2016 ¹⁵. Aislamiento y caracterización de rizobios de *Crotalaria* sp. en el sur de Ecuador. Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba. [Internet]. [citado 2019 dic 17]; 37(1): 40-47.

Hernández J, Hinojosa J, Miliann P. 2012 ¹⁶. Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociadas a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. Rev. Col. Microb. Trop. [Internet]. [citado 2019 dic 15];2: 84-89. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/298069900_Aislamiento_de_cepas_de_R

hizobium_spp_asociados_a_dos_leguminosas_forrajeras_en_el_Centro_Biotecnologico_del_Caribe_Isolation_of_Rhizobium_spp_associated_two_forage_leguminous_in_the_Caribbean_Biotech

- Herrera-Cervera J, Caballero-Mellado J, Laguerre G, Tichy H, Requena N, Amarger N, Martínez-Romero E, Olivares J, Sanjuan J. 1999 ¹⁷. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a spanish soil. FEMS Microbiol. Lett. 30: 87-97
- Jarvis B, Van Berkum P, Chen WX, Nour SM, Fernandez MP, Cleyet-Marel JC, Gillis M. 1997 ¹⁸. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*; 47:895-898.
- Janczarek, M., Rachwał, K., Cieśla, J, Ginalska G, Bieganowski A. 2015 ¹⁹. Production of exopolysaccharide by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in bacterial attachment and surface properties. *Plant and Soil*. [Internet]. [citado 2019 oct 06]; 388: 211–227. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2320-5>
- Kuykendall D, Young J, Martínez E, Kerr A, Sawada H. 2005 ²⁰. *Rhizobium*. Frank 1889, 338. *Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology*. Editorial Springer (US).
- López-Alcocer J, Lépiz-Ildefonso R, González-Eguiarte D, Rodríguez-Macias R, López-Alcocer E, Olalde-Portugal V. 2017 ²¹. Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Rev. Fitotec*. [Internet]. [citado 2019 oct 16]; 40 (1). Disponible en: <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/40-1/8a.pdf>
- Luque T, Franco M, Macedo- Lemos E. 2014 ²². Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production, Carbohydrate

- Polymers. ELSEVIER. [Internet]. [citado 2019 may 20]; 111: 191-197. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714004238I>.
- Macrogen Inc. [Internet]. 2018 ²³. Seúl (Corea): Macrogen Inc.; [citado 2019 jun 20]. Disponible en: <https://dna.macrogen.com/esp/>
- Maldonado A, Narváez, A. 2001 ²⁴. Ecuador ni es ni será ya país amazónico. Inventario de impactos petroleros 1 [Internet]. Quito (Ec): Acción Ecológica; [citado 2018 nov 12]. Disponible en: <http://www.accionecologica.org/images/docs/petroleo/Inventarioimpac.doc>
- Martínez, M. 2005 ²⁵. Aislamiento e identificación de Rhizobium en Lupinus silvestres por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Scientia- CUCBA. [Internet]. [citado 2019 oct 17]; 7(2):175—181. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/279941626_Aislamiento_e_identificacion_de_Rhizobium_en_Lupinus_silvestres_por_la_tecnica_de_reaccion_en_cadena_de_la_polimerasa_PCR_Mariana_Martinez_Pelayo_Hugo_Castaneda_Vazquez_Juan_Manuel_Moreno_Martinez_Mar
- Mukherjee S, Ghosh S, Sadhu S, Ghosh P, Maiti T. 2010 ²⁶. Extracellular Polysaccharides Production by a Rhizobium sp. Isolated from Legume Herb Crotalaria Saltiana Andr. Indian Journal of Biotechnology. [Internet]. [citado 2019 may 16]; 10, 340-345.
- PETROAMAZONAS Empresa Pública (EP) [Internet]. 2015 ²⁷. Ecuador. Comunicado: Petroamazonas EP eliminó 180 fuentes de contaminación en 14 meses; [citado 2018 oct 24]. Disponible en: <https://www.petroamazonas.gob.ec/?p=4387>
- Promega. 2019 ²⁸. 100bp DNA Ladder [Internet]. Wisconsin (Estados Unidos): Worldwide Promega; [citado 2019 Mar 03]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/>

/media/files/resources/white-papers/quality-and-stability-of-dna-ladders-shipped-at-ambient-temperature.pdf

Promega. 2018 ²⁸. GoTaq® Green Master Mix [Internet]. Wisconsin (Estados Unidos): Worldwide Promega; [citado 2019 Mar 14]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf?la=en>

Nirmala P. 2011 ²⁹. Production of Extracellular Polysaccharides by a Rhizobium Species from Root Nodules of Vigna mungo (Hepper). International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. [Internet]. [citado 2018 nov 15]; 2(4): 1209-1214. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/2263/b19ae050f6eac547f0479f2869d274025cd9.pdf>

Pérez R, Camacho M, Gómez J, Rodríguez A, Viñas M, Cantero R. 2008 ³⁰. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. Revista CENIC: Ciencias Biológicas [Internet]; 39(1): 44. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237027084_Aislamiento_y_seleccion_de_una_cepa_bacteriana_degradadora_de_hidrocarburos_a_partir_de_suelos_contaminados_con_petroleo

Ribeiro V, Burkert C. 2016 ³¹. Exopolysaccharides Produced by *Rhizobium*: Production, Composition and Rheological Properties. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*. [Internet]. [citado 2018 oct 26]; 4(1):1-6. Disponible en: <http://pubs.sciepub.com/jpbpc/4/1/1>

- Rodríguez M. 1993 ³². Asociación *Rhizobium*-leguminosa In: Manual de Agromicrobiología. R. Ferrera C., M. C. A. González C. y M. N. Rodríguez M. (eds.). Editorial Trillas. México D.F. (Mex): 11-51
- Santillán N, Arellano C, Zúñiga D. 2005 ³³. CAPACIDAD DEL *Rhizobium* DE PROMOVER EL CRECIMIENTO EN PLANTAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Miller). Revista Ecología Aplicada. [Internet]. [citado 2019 ene 17]: 4(1). Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v4n1-2/a07v4n1-2.pdf>
- Sayed R, Jamadar D, Patel P. 2011 ³⁴. Production of Exo-polysaccharide by *Rhizobium* sp. Indian journal of microbiology. [Internet]. [citado 2019 ene 06]; 51(3): 294–300. Disponible en: 10.1007/s12088-011-0115-4
- Sridevi M, Mallaiah K. 2007 ³⁵. Production of Extracellular Polysaccharide by *Rhizobium* Strains from Root Nodules of Leguminous Green Manure Crop, *Sesbania sesban* (L.) Merr. International Journal of Soil Science [Internet]. [citado 2019 ene 06]; 2: 308-313. Disponible en: DOI: 10.3923/ijss.2007.308.313
- Somasegaran P, Hoben, J. 1994 ³⁶. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology. NifTAL Project. University of Hawaii. Hawaii (USA). Springer.
- Sosa A, Elías A, García A, Sarmiento M. 2004 ³⁷. Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. Revista Cubana de Ciencia Agrícola [Internet]. [citado 2019 ene 10]; 38(2):197-20. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193017901014.pdf>
- Sridevi M, Mallaiah K, Yadav C. 2007 ³⁸. Phosphate Solubilization by *Rhizobium* Isolates from *Crotalaria* Species. Journal of Plant Sciences [Internet]. [citado 2019 may 23]; 2: 635-639. Disponible en: 10.3923/jps.2007.635.639

- Staudt AK, Wolfe LG, Shrout JD. 2012 ³⁹. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. *Arch Microbiol.*[Internet]. [citado 2020 may 15]; 194(3):197-206. Disponible en:10.1007/s00203-011-0742-5
- Sutherland I. 1972 ⁴⁰. Bacterial exopolysaccharides. Microbial Physiology, Academic Press Inc., London.
- ThermoScientific. 2015 ⁴¹. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometers [Internet]. Wilmington (Estados Unidos): Thermo Fischer; [citado 2019 ene 14]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND2000CLAPTOP?SID=srch-hj-ND2000CLAPTOP>
- Vincent, J. M. 1970 ⁴². A Manual for the Practical Study of Root NoduleBacteria. Oxford: Blackwell Scientific.
- Vogliano, S. 2009 ⁴³. Ecuador-Extracción petrolera en la Amazonía. [Internet]. Quito (Ec): FUHEM; [citado 2018 nov 16]. Disponible en: http://www.fuhem.es/media/ecosocial/image/culturambiente/fichas/ECUADOR_combustibles_n22.pdf
- Wang E, Martinez-Romero J, Martinez-Romero, E. 1999 ⁴⁴. Genetic diversity of rhizobia from *Leucaena Leucocephala* nodules in Mexican soils. *Molecular Ecology* 8, 711–724.
- Zhang J, Liu J, Meng L.2012 ⁴⁵. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat roots by wheat germ agglutinin labeled with fluorescein isothiocyanate. *J Microbiol.* [Internet]. [citado 2020 may 12]; **50**, 191–198. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1472-3>

TABLAS:**Tabla 1.** Especificaciones de muestreos: número de muestras y lugares de recolección.

Número de muestreo	Número de muestras	Lugar	Coordenadas
1	14	Bloque 60, Petroamazonas EPS - Sacha Central (biopilas)	(0,326405) (-76.876559)
2	16	Bloque 57, Petroamazonas EP-Shushufindi (biopilas)	(-0,192267) (-76,655437)
2	8	Bloque 61, Petroamazonas EP- Yuca (biopilas)	(-0,536471) (-76,889177)

Tabla 2. Descripción y origen de la muestra.

Número de muestreo	Código de la muestra	Lugar de muestreo	Origen de la muestra	Planta de origen	Código de la cepa
1	CGP-SA-01 1 API	Bloque 60, Petroamazonas EPS -Sacha Central	Raíces de leguminosas	<i>N.I.</i>	R011001
1	CGP-SA-01 2 API			<i>N.I.</i>	R010301
1	CGP-SA-01 3 API			<i>N.I.</i>	R010601
1	CGP-SA-01 2 LIMPIO			<i>N.I.</i>	R011301
1	CGP-SA-01 4 LIMPIO			<i>N.I.</i>	R010901
2	CGP- SHS-03 (8.1)	Bloque 57, Petroamazonas EP-Shushufindi		<i>Trifolium repens</i>	R020801
2	CGP- SHS-03 (8.1)			<i>Desmodium sp.</i>	R020802
2	CGP- YUCA-04 (11.1)	Bloque 61, Petroamazonas EP- Yuca		<i>Desmodium sp</i>	R021101
2	CGP- YUCA-04 (11.2)			<i>Arachis pintoii</i>	R021102
2	CGP- YUCA-04 (12.1)			<i>Stylosanthes sp</i>	R021201
2	CGP- YUCA-04 (12.2)			<i>Stylosanthes sp</i>	R021202

*NI= No identificada

Tabla 3. Descripción morfología colonial en medios de cultivos específicos y morfología microscópica.

Código de la cepa	Morfología macroscópica												Morfología microscópica	
	Agar YMA						Agar YMA+Rojo Congo			Agar YMA+Azul de Bomotimol			Tinción Gram	
	Forma	Tamaño (mm)	Borde	Color	Asp.	Text.	Color	Asp.	Text.	Color/Reacción	Asp.	Text.	Tinción Gram	Forma
R011001	Circular irregular	4,00	Liso	Blanco tenue	c*	+++*	Semitransparente No absorbe RC*	c	+++	Semitransparente Reacción: ácida	d*	+++	-	BC*
R010301	Circular	4,00	Liso	Blanco crema	b*	+++*	Semitransparente No absorbe RC	b	++	Semitransparente Reacción ácida	a	++	-	BC
R010601	Circular	2,00-2,5	Liso	Transparentes	a*	+++	Rosado Poca absorción RC	a	+++	Transparente Reacción ácida	a	+++	-	BC
R011301	Circular irregular	4,00	Liso	Blanco tenue	b	+*	Semitransparente No absorbe RC	b	+	Semitransparente Reacción ácida	b	+	-	BC
R010901	Circular irregular	4,00	Liso	Blanco tenue	b	+	Rosado Poca absorción RC	b	+	Semitransparente Reacción ácida	b*	+	-	CB*
R020801	Circular irregular	2,5- 3,00	Liso	Transparente	a	++	Rosado Poca absorción RC	a	++	Transparente Reacción ácida	a	++	-	CB
R020802	Circular	4,00	Liso	Blanco crema	b	+++	Semitransparente No absorbe RC	b	+++	Semitransparente Reacción: ácida	b	+++	-	BC
R021101	Circular irregular	3,8	Liso	Blanco tenue	c	+	Blanco tenue No absorbe RC	c	+	Semitransparente Reacción ácida	c	+	-	BC
R021102	Circular	3,5-3,9	Liso	Transparente	a	+	Blanco tenue No absorbe RC	a	+	Semitransparente Reacción ácida	a	+	-	BC
R021201	Circular	2,00	Liso	Blanco crema	b	+	Rosado Poca absorción RC	b	+	Semitransparente Reacción ácida	b	+	-	BC
R021202	Circular	2,00-2,5	Liso	Blanco tenue	b	+	Rosado Poca absorción RC	b	+	Semitransparente Reacción ácida	b	+	-	BC

*Asp. =aspecto; a=traslucida; b=brillante; c=opaco brillante; d=semitranslucida; Text. =textura; + = acuosa; ++ = mucoide; +++ =gomosa; BC=bacilo; CB=coco bacilo; RC=rojo Congo.

Tabla 4. Perfil bioquímico-fenotípico de las cepas.

Código de la cepa	Catalasa	Prueba de cetolactasa	Motilidad	Indol	Citrato	Sensibilidad antibiótica					
						AMP*	NA*	TE*	AK*	CN*	C*
R011001	+	-	+	-	+	R	R	R	R	R	R
R010301	+	-	+	-	+	R	S	S	S	S	S
R010601	+	-	+	-	+	R	R	R	R	R	R
R011301	+	-	+	-	+	R	S	S	S	S	S
R010901	+	-	+	-	+	R	R	R	R	R	R
R020801	+	-	+	-	+	R	S	S	S	S	S
R020802	+	-	+	-	+	R	S	S	S	S	S
R021101	+	-	+	-	+	R	S	S	S	S	S
R021102	+	-	+	-	+	R	S	R	S	R	S
R021201	+	-	+	-	+	R	S	R	R	S	S
R021202	+	-	+	-	+	R	R	R	S	R	R

*AMP=ampicilina; NA=ácido nalidíxico; TE=tetraciclina; AK=kanamicina; CN=gentamicina; C=cloranfenicol.

Tabla 5. Identificación molecular de las cepas mediante análisis del gen ADNr 16S.

Código de la cepa	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Bacteria identificada	Número de referencia GenBank
R011001	100	98	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	U229386
R010301	89	99	<i>Rhizobium sp.</i>	FJ39677
R010601	99	98	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	CQ167297
R011301	89	99	<i>Mesorhizobium sp.</i>	EU748938.1
R010901	89	99	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	AY945955
R020801	89	97	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	U229386
R020802	89	99	<i>Mesorhizobium plurifarum</i>	CQ167297
R021101	89	99	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	EF153401
R021102	99	98	<i>Rhizobium sp.</i>	FJ39677
R021201	89	97	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	AY945955
R021202	89	97	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	AY945955

Tabla 6. Concentración de EPS ($\mu\text{g/mL}$) en ensayo de *screening* cualitativo de las cepas de *Rhizobium*.

Cod. Aislado	Concentración EPS
R011001	4,95 +/- 0,99*
R010301	5,37 +/- 0,73
R010601	6,13 +/- 0,43
R011301	5,37 +/- 0,57
R010901	8,11 +/- 3,50
R020801	13,01 +/- 4,13
R020802	9,55 +/- 1,65
R021101	6,34 +/- 0,99
R021102	16,22 +/- 2,54
R021201	9,04 +/- 0,84
R021202	9,80 +/- 1,57

* Desviación estándar

Tabla 7. Concentración de EPS ($\mu\text{g/mL}$) en ensayo de *screening* cualitativo de las cepas de *Rhizobium*.

Cod. Aislado	pH 6	pH 7	pH 8
R020801	6,43 +/- 0,47*	10,43 +/- 0,33	9,00 +/- 1,25
R021102	5,08 +/- 0,27	7,90 +/- 1,55	9,63 +/- 1,39
R021202	6,05 +/- 1,45	10,86 +/- 0,63	7,31 +/- 0,69

* Desviación estándar

Tabla 8. Concentración de EPS ($\mu\text{g/mL}$) para ensayo de fuente de carbohidratos.

Cod. Aislado	Glucosa	Glicerol	Manitol	Sacarosa
R020801	7,23+/- 1,09*	7,65 +/- 0,69	5,84 +/- 0,85	13,18 +/- 3,58
R021102	5,88+/- 0,62	6,97 +/- 0,45	5,88 +/- 0,49	5,79 +/- 0,42
R021202	4,95+/- 0,27	5,67 +/- 0,26	7,40 +/- 0,47	12,71 +/- 1,38

* Desviación estándar

Tabla 9. Concentración de EPS ($\mu\text{g/mL}$) para ensayo de fuente de nitrógeno.

Cod. Aislado	Extracto de levadura	Caseína	Urea
R020801	13,35 +/- 2,47*	7,14 +/- 1,11	14,02 +/- 1,40
R021102	11,95 +/- 1,76	6,30 +/- 1,21	6,64 +/- 1,31
R021202	7,61+/- 1,27	9,46 +/- 1,47	9,46 +/- 3,13

* Desviación estándar

Tabla 10. Concentración de EPS ($\mu\text{g/mL}$) para ensayo de condiciones combinadas de crecimiento.

Cod. Aislado	Control	Tratamiento
R020801	16,05 +/- 1,92*	21,24 +/- 0,87
R021102	17,90 +/- 1,88	39,17 +/- 2,53
R021202	14,15 +/- 2,42	26,26 +/- 1,92

* Desviación estándar

FIGURAS:



Figura 1. Muestra: Raíces de plantas leguminosas con nódulos



Figura 2. Biopilas de muestreo con crecimiento visible de plantas

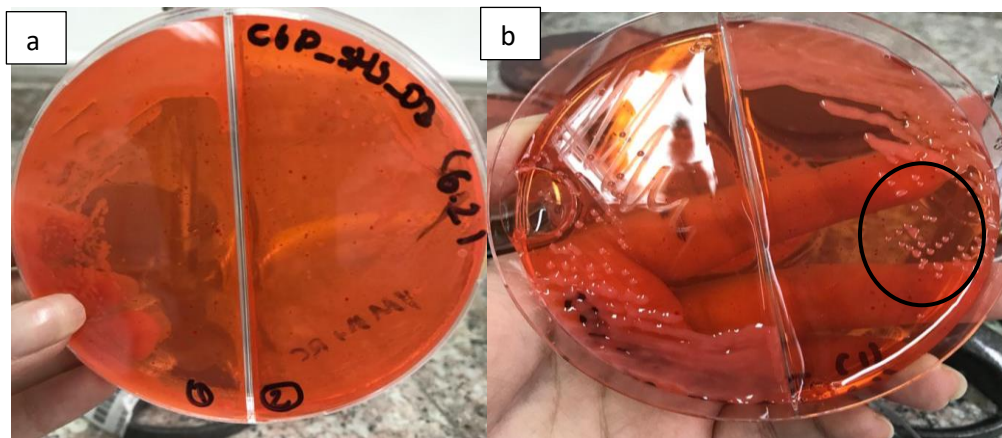


Figura 3. Observación macroscópica del crecimiento de aislados de rizobios en agar YMA+Rojo Congo. a) reverso; b) anverso

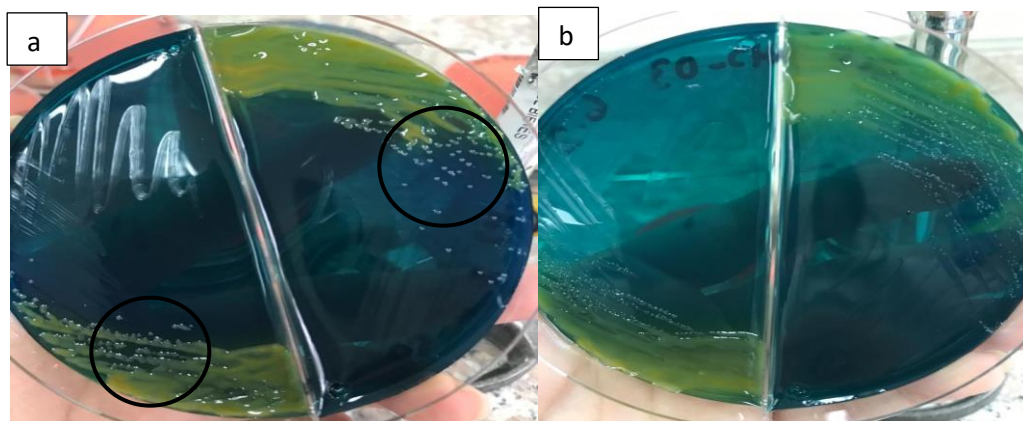


Figura 4. Observación macroscópica del crecimiento de aislados de rizobios en agar YMA +Azul de Bromotimol. a) anverso; b) reverso.

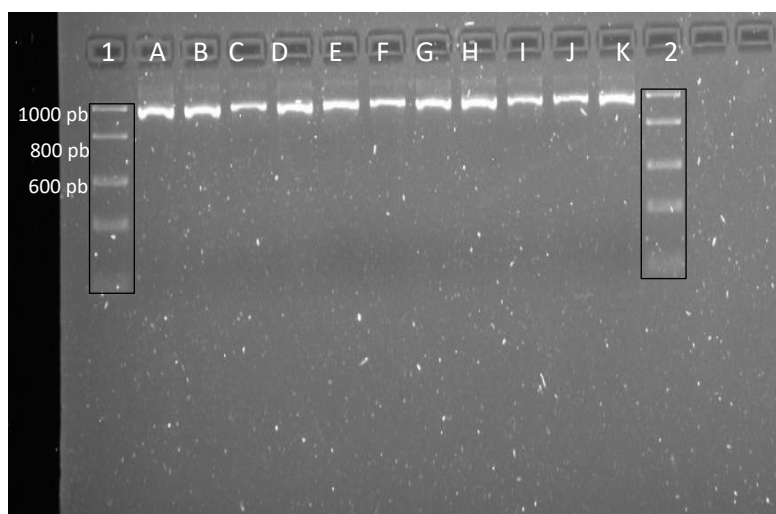


Figura 5. Visualización de los amplicones del gen ADNr 16S en gel de agarosa. 1= marcado de peso molecular 1000 pb; 2= escalera molecular 1000 pb; A= R011001; B= R010301; C= R010601; D= R011301; E= R010901; F= R020801; G= R020802; H= R021101; I= R021102; J= R021201; K= R021202



Figura 6. Screening cualitativo de producción de EPS: siembra de la bacteria en método de césped, aspecto mucoso y brillante.

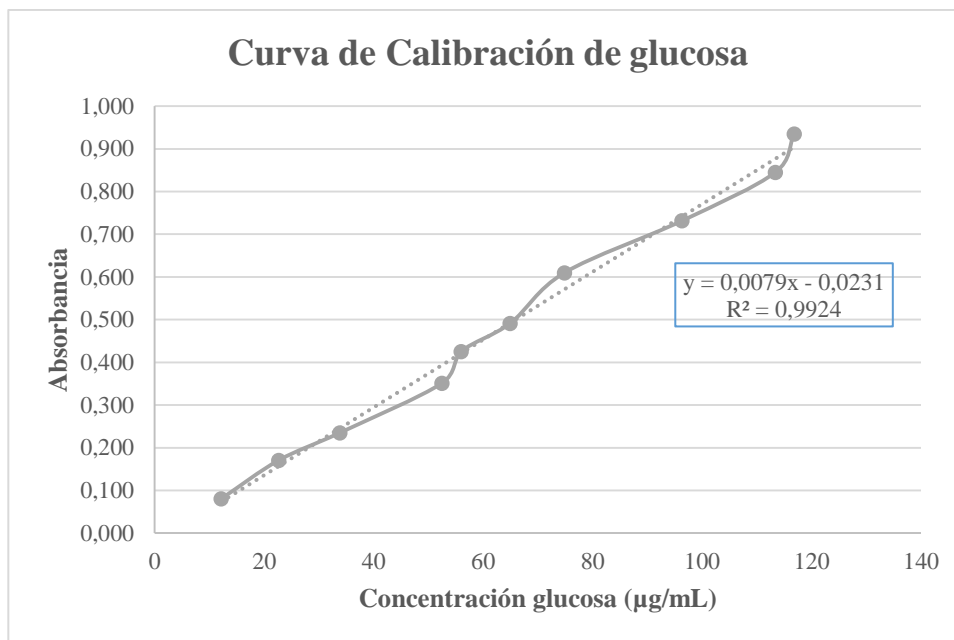


Figura 7. Curva de calibración de glucosa, método fenol-ácido sulfúrico modificado. Se observa la curva de calibración de glucosa, conjuntamente con la fórmula de la pendiente usada para el cálculo de la concentración de EPS.

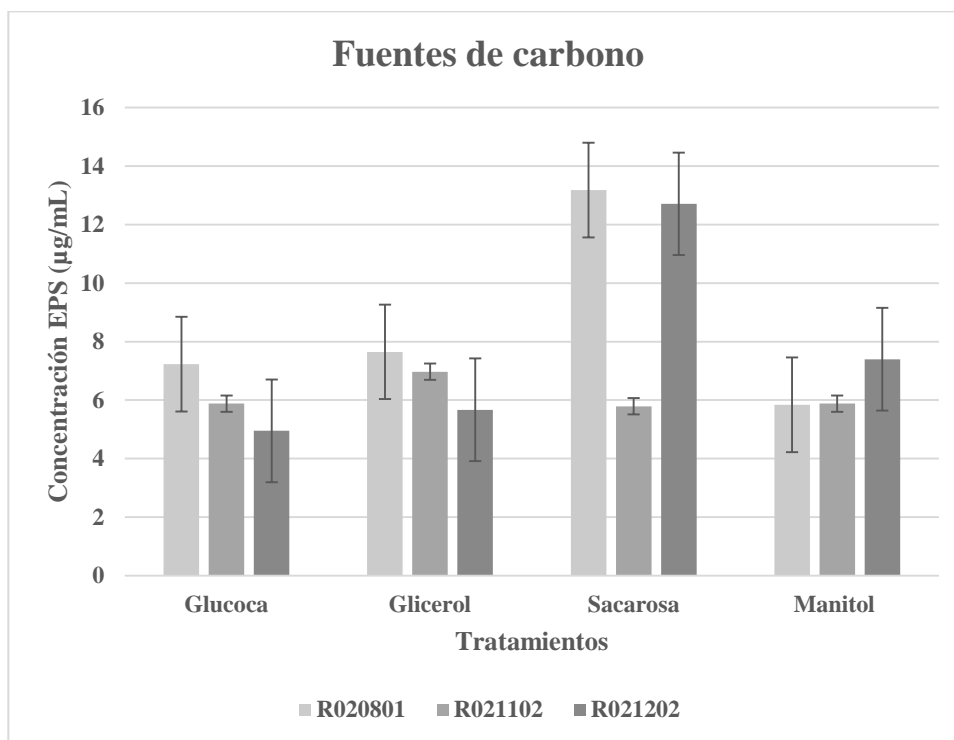


Figura 8. Concentración de EPS en modificación de fuentes de carbono en el medio de cultivo. Existe una tendencia positiva en la producción de EPS en presencia de sacarosa para la cepa R020801 y R021202.

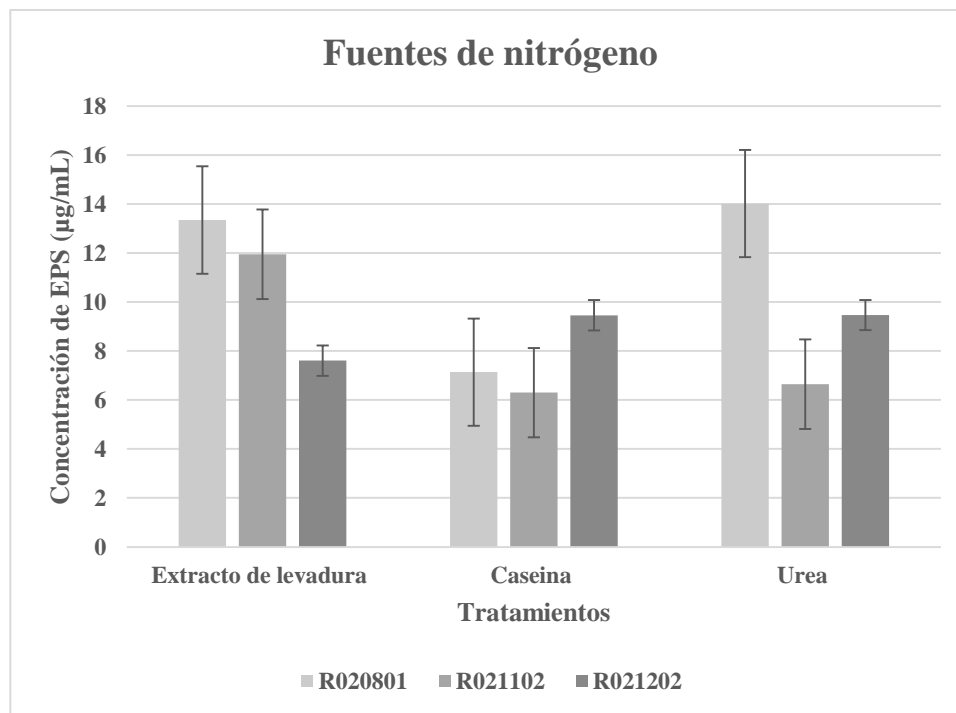


Figura 9. Concentración de EPS en modificación de fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo. La tendencia de producción de exopolisacáridos para las cepas se visualiza en presencia de urea y extracto de levadura.

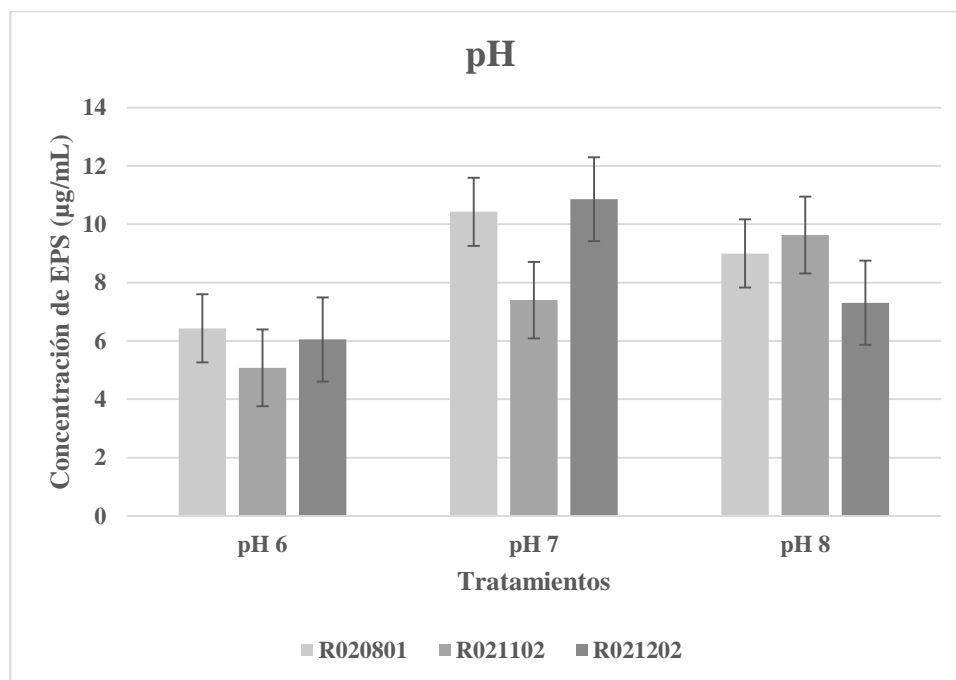


Figura 10. Concentración de EPS en modificación de pH en el medio de cultivo. Existe tendencia al incremento de EPS a pH 7 para todas las cepas.

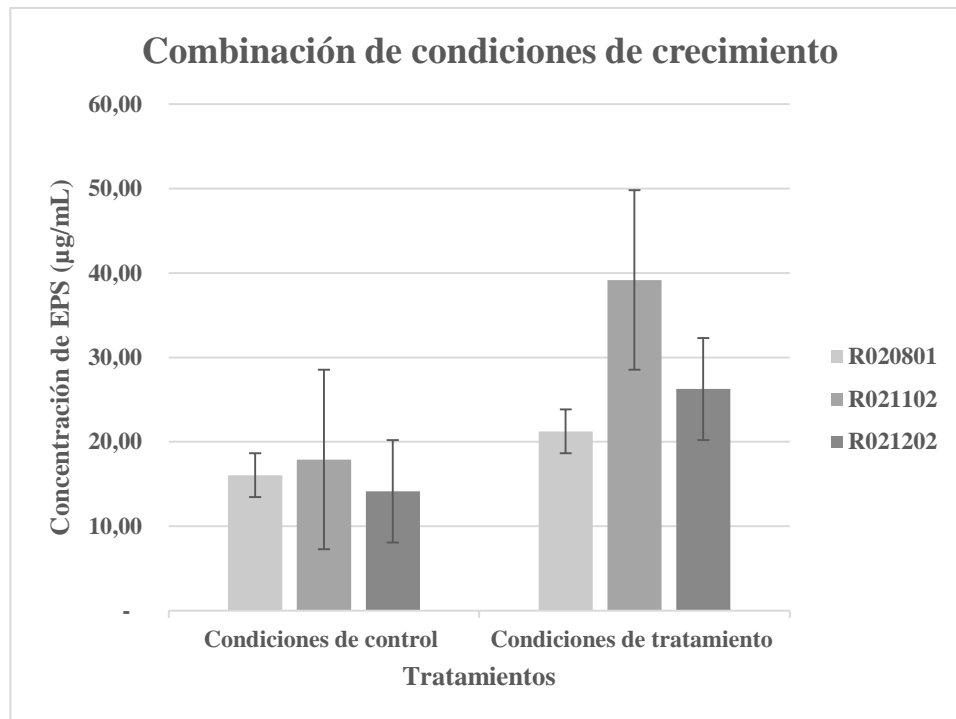


Figura 11. Concentración de EPS en condiciones de control y condiciones de tratamiento. En general, se observa una tendencia a la mayor producción de EPS en condiciones de tratamiento.