



Universidad Nacional
Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN

**OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO DE *Rhizobium meliloti*
PARA LA OBTENCION DE INOCULANTE (BIOMASA) Y PARA
LA PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDO (GOMA).**

T E S I S
Que para obtener el Título de
INGENIERO EN ALIMENTOS
p r e s e n t a n

JUAN HERNANDEZ HERNANDEZ
ISABEL MERCEDES SANTILLAN ORTEGA

ASESOR: OFB SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN.	1
INTRODUCCION.	3
CAPITULO 1 GENERALIDADES	
1.1. FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO.	6
1.1.1. MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO.	7
1.2. GENERO <i>Rhizobium</i> .	8
1.2.1. UBICACION TAXONOMICA DEL <i>Rhizobium</i> .	8
1.2.2. CLASIFICACION POR EL TIPO DE CRECIMIENTO.	8
1.2.3. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS.	9
1.2.4. SIMBIOSIS LEGUMINOSA- <i>Rhizobium</i> .	10
1.2.5. PROCESO DE NODULACION.	10
1.2.6. ESPECIFICIDAD DE LA SIMBIOSIS.	13
1.3. FORMULACION DE MEDIOS DE CULTIVO.	14
1.4. CURVAS DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS BACTERIANOS.	17
1.5. INOCULANTE.	20
1.5.1. MEDIOS DE SOPORTE.	21
1.6. POLISACARIDOS MICROBIANOS.	22
1.6.1. PRINCIPALES POLISACARIDOS MICROBIANOS.	23
1.6.2. POLISACARIDOS PRODUCIDOS POR <i>Rhizobium meliloti</i> .	24
OBJETIVOS.	26
CAPITULO 2 MATERIALES Y METODOS	
2.1. AISLAMIENTO DE CEPAS.	29
2.1.1. ORIGEN DE LAS CEPAS.	29
2.1.2. PROCEDIMIENTO.	29
2.2. IDENTIFICACION DE CEPAS.	29
2.3. PRUEBA DE INFECTIVIDAD DE CEPAS DE <i>Rhizobium meliloti</i> EN PLANTAS DE ALFALFA.	30
2.4. DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO.	30
2.5. CINETICA CONTROL.	31
2.6. SELECCION DE CEPAS.	32

2.7. OPTIMIZACION DE LOS FACTORES QUIMICOS DEL MEDIO DE CULTIVO DE <i>Rhizobium meliloti</i> PARA OBTENCION DE INOCULANTEULANTE Y EXOPOLISACARIDO.-----	37
2.8. OPTIMIZACION DE LOS FACTORES FISICOS PARA LA OBTENCION DE INOCULANTE Y PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDO.-----	37
2.9. CINETICAS DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR DE 14 Lt.-----	38
2.10. DETERMINACION DEL CRECIMIENTO CELULAR.-----	39
2.11. DETERMINACION DE CARBOHIDRATO RESIDUAL.-----	40
2.12. CUANTIFICACION DE EXOPOLISACARIDO.-----	40

CAPITULO 3 RESULTADOS

3.1. AISLAMIENTO DE CEPAS.-----	42
3.2. IDENTIFICACION DE CEPAS.-----	42
3.3. PRUEBAS DE INFECTIVIDAD DE <i>Rhizobium meliloti</i> EN PLANTAS DE ALFALFA.-----	42
3.4. CINETICA CONTROL.-----	43
3.5. SELECCION DE CEPAS.-----	41
3.6. OPTIMIZACION DE LOS FACTORES FISICOS Y QUIMICOS DEL MEDIO DE CULTIVO DE <i>Rhizobium meliloti</i> PARA PRODUCCION DE INOCULANTE Y EXOPOLISACARIDO.-----	47
3.7. CINETICAS DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR DE 14 Lt.-----	74
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.-----	85
APENDICES.-----	87
BIBLIOGRAFIA.-----	96

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

DESCRIPCION	PAGINA
DIFERENCIAS BIOQUIMICAS Y MORFOLOGICAS DE LOS <i>Rhizobium</i> .-----	10
COMPOSICION ELEMENTAL DE LOS MICROORGANISMOS.-----	15
MEDIO DE CULTIVO DISEÑADO.-----	31
RELACIONES MEDIO DE CULTIVO/ALCOHOL PARA LA PRECIPITACION DE EXOPOLISACARIDO DE LAS DIFERENTES CEPAS DE <i>Rhizobium meliloti</i> .-----	32
RESULTADOS DE IDENTIFICACION DE LAS CEPAS AISLADAS.-----	38
DURACION DE LAS FASES DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE <i>Rhizobium</i> .-----	39
VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y TIEMPOS DE DUPLICACION DE LAS CEPAS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO. -----	41
CUANTIFICACION DEL EXOPOLISACARIDO PRODUCIDO POR LAS CEPAS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.-----	45
VARIACION DE LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACION PARA LA SEPARACION TOTAL CELULAR.-----	46
VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION AL VARIAR LA CONCENTRACION DE NUTRIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA OBTENER INOCULANTE.-----	57
VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION AL VARIAR LOS FACTORES FISICOS EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA OBTENER INOCULANTE.-----	58
VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO, TIEMPO DE DUPLICACION Y CUANTIFICACION DE EXOPOLISACARIDO AL VARIAR LA CONCENTRACION DE NUTRIENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA OBTENER EXOPOLISACARIDO.-----	70
VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO, TIEMPO DE DUPLICACION Y CUANTIFICACION DE EXOPOLISACARIDO AL VARIAR LOS FACTORES FISICOS EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA OBTENCION DE EXOPOLISACARIDO.-----	71
MEDIOS DE CULTIVO OPTIMOS.-----	73
VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIONAL MEDIR LA CONCENTRACION CELULAR POR ABSORBANCIA Y PESO SECO.-----	79

FIGURAS

DESCRIPCION	PAGINA
CUADRO METODOLOGICO.-----	28
CINETICA CONTROL.-----	40
CINETICA DE CRECIMIENTO DE CEPAS TEOTIHUACAN EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.-----	42
CINETICA DE CRECIMIENTO DE CEPAS LABORATORIO EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.-----	43
CINETICA DE CRECIMIENTO DE CEPAS ZACATLAN EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.-----	44
VARIACION DE K_2HPO_4 EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS LABORATORIO.-----	48
VARIACION DE $MgSO_4$ EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS LABORATORIO.-----	49
VARIACION DE $NaCl$ EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS LABORATORIO.-----	50
VARIACION DE $FeCl_3$ EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS LABORATORIO.-----	51
VARIACION DE MANITOL EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS LABORATORIO.---	52
VARIACION DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS LABORATORIO.-----	53
VARIACION DE pH DEL MEDIO DE CULTIVO CEPAS LABORATORIO.-----	54
VARIACION DE LA TEMPERATURA DEL MEDIO DE CULTIVO CEPAS LABORATORIO.-----	55
VARIACION DE LA VELOCIDAD DE AGITACION DEL MEDIO DE CULTIVO CEPAS LABORATORIO.-----	56
VARIACION DE K_2HPO_4 EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS TEOTIHUACAN.---	60
VARIACION DE $MgSO_4$ EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS TEOTIHUACAN.---	61
VARIACION DE $NaCl$ EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS TEOTIHUACAN.---	62
VARIACION DE $FeCl_3$ EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS TEOTIHUACAN.---	63
VARIACION DE SACAROSA EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS TEOTIHUACAN.--	64
SACAROSA RESIDUAL DEL MEDIO DE CULTIVO CEPAS TEOTIHUACAN.-----	65
VARIACION DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL MEDIO DE CULTIVO CEPAS TEOTIHUACAN.-----	66
VARIACION DE pH DEL MEDIO DE CULTIVO CEPAS TEOTIHUACAN.-----	67

VARIACION DE LA TEMPERATURA DEL MEDIO DE CULTIVO CEPA TEOTIHUACAN.-----	68
VARIACION DE LA VELOCIDAD DE AGITACION DEL MEDIO DE CULTIVO CEPA TEOTIHUACAN.-----	69
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO EN FERMENTADOR.-----	75
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN EN FERMENTADOR.-----	76,77,78
CORRELACION pH VS CARBOHIDRATO RESIDUAL.-----	80
CORRELACION UFC-PS-ABS DE CEPA LABORATORIO.-----	82
CORRELACION UFC-PS-ABS DE CEPA TEOTIHUACAN.-----	83
CURVA PATRON DE SACAROSA, POR EL METODO NELSON-SOMOGYI.-----	95

RESUMEN

El *Rhizobium meliloti* es un microorganismo de gran interés en la investigación biotecnológica ya que presenta dos grandes cualidades para su estudio y producción; una de ellas es que al ser un microorganismo que en vida simbiótica fija nitrógeno atmosférico fertilizando a su huésped (alfalfa), reduce la utilización de fertilizantes provocando con ello baja en los costos de producción. La otra cualidad importante que presenta es la de producción de exopolisacárido, el cual representa una posible alternativa en la industria de alimentos, donde en su proceso recurran a la utilización de polisacáridos. Algunas investigaciones realizadas mencionan que el exopolisacárido producido por *Rhizobium meliloti* presenta varias propiedades funcionales, tales como, gelificante, espesante y estabilizante.

Por las razones antes expuestas, para el aprovechamiento potencial de este microorganismo es necesario crear y optimizar las condiciones propicias para su crecimiento y reproducción, así como para la producción máxima de exopolisacárido.

Se aislaron tres cepas diferentes de *Rhizobium meliloti*, a partir de raíces nodulas de plantas de alfalfa. Las cepas aisladas una vez identificadas mediante pruebas primarias se nombraron según el lugar de procedencia. Se diseñó su medio de cultivo en base a la composición elemental de las bacterias, con el cual se preparó un inoculante con cada una de las bacterias y se inocularon semillas de alfalfa variedad Valenciana. Se realizó una cinética como control para mantener constante la concentración celular para el inóculo de las cinéticas en la optimización del medio de cultivo. También se realizó una cinética con cada una de las cepas con el fin de seleccionar la mejor cepa para producir exopolisacárido y la que proporcionará la mayor cantidad de biomasa para el inoculante.

La cepa Laboratorio obtenida de una semilla inoculada comercialmente, fue la que se seleccionó para la obtención del inoculante ya que proporcionó la mayor concentración celular y el menor tiempo de duplicación, al optimizar su medio de cultivo se tiene que este inoculante se puede utilizar en tierras semiácidas o semibásicas, así como en regiones con temperaturas entre 28 y 34°C, se obtuvo un aumento en la velocidad de crecimiento de 0.107 a 0.307h⁻¹, una disminución considerable en el tiempo de duplicación de 4.15 a 1.79 horas, con una productividad de 0.357g/l/h, obteniéndose una concentración celular de 5.95g/l en 54 horas a 10g/l en 24 horas y 2.92x10⁹ UFC/ml, lo cual es considerado por Deppler y Perlman (15) como un buen inoculante.

La cepa Teotihuacan fué la seleccionada para la obtención del exopolisacárido, el cual se precipitó con isopropanol para su cuantificación. Inicialmente se obtuvieron en 192 horas 11.39g/l de exopolisacárido, con un tiempo de duplicación de 10.6 horas. Al optimizar su medio de cultivo se obtuvieron 6.44g/l en 54 horas con una concentración celular de 7.0g/l y 8.2x10⁸ UFC/ml, con un tiempo de duplicación de 1.79 horas.

INTRODUCCION

En tiempos recientes, la creciente demanda de productos de interés para los sectores agropecuario, alimentario, farmacéutico, ambiental, industrial y energético han dado origen a nuevas áreas de investigación. Una de ellas es la biotecnología cuyas actividades se centran en la producción y utilización de los microorganismos y sus productos. (21)(38)(43)

Como todos los seres vivos, los microorganismos crecen, se reproducen y segregan algunos compuestos de importancia para el hombre. Estas han sido las características en las cuales se ha basado su utilización.

En la práctica la biotecnología constituye potencialmente la vía más rápida para dar solución a muchos de los problemas deficitarios que tiene la población mundial y principalmente la población de los países denominados subdesarrollados.

Una de las áreas en la que la biotecnología ha cobrado un gran interés es la agroalimentaria donde tiene una importante participación. En este sentido en los últimos años se ha visualizado una posible solución a la baja productividad agrícola, la cual es debida principalmente a la pobreza de los suelos de elementos indispensables para su cultivo. El empleo de variedades de alto rendimiento con el fin de acabar con ese déficit alimentario queda frenado por dos dificultades: el rápido agotamiento de los suelos, acelerado, además, por efectos climáticos adversos y el elevado costo de abonos químicos. Ante lo anterior ¿qué solución se puede dar a ambos problemas? En este caso el aprovechamiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno puede ser la solución.

Los investigadores han descubierto microorganismos capaces de transformar el nitrógeno del aire en amoníaco y con él formar aminoácidos y proteínas. Tales microorganismos son procariontes. Algunos de ellos pueden fijar nitrógeno en vida libre o en simbiosis con plantas, es decir, ceder sus compuestos nitrogenados a la planta-huésped a cambio de sustancias energéticas que ésta le proporciona.

La familia *Rhizobíae* es un grupo de bacterias que se asocian a un gran número de plantas formando nódulos en sus raíces, entre ellas está casi la totalidad de las leguminosas.

Algunas investigaciones realizadas con los *Rhizobium* mencionan que estas bacterias no solo son fijadoras de nitrógeno atmosférico, sino que también producen ciertos polisacáridos que presentan varias propiedades funcionales tales como gelificante, espesante y estabilizante de suspensiones. (32)(37)(47)

Existe una amplia variedad de polisacáridos obtenidos de tejidos de plantas, semillas, algas, frutas y árboles, los cuales han sido producidos por su importancia funcional y comercial en la industria. Sin embargo estos polisacáridos presentan gran variación en sus propiedades funcionales aún cuando los métodos de obtención sean rigurosamente estandarizados, pues están sujetos a cambios climáticos, cambio de la naturaleza del suelo de región en región, etc. Por esta razón, los polisacáridos obtenidos por microorganismos tienen posibilidad de ser ampliamente utilizados, además de que las nuevas investigaciones están explorando la producción de otros polisacáridos y sus propiedades funcionales.

El uso comercial de los polisacáridos se basa en la capacidad que presentan para cambiar las propiedades reológicas de diversos sistemas coloidales. Debido a la amplia diversidad de sus propiedades funcionales, los polisacáridos tienen aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, del papel, aceitera, textil, etc.

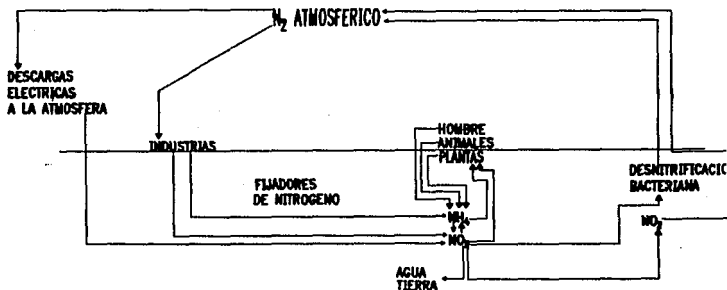
Considerando lo anterior en el presente trabajo se realiza la investigación experimental sobre dos de las características más importantes que presenta el *Rhizobium meliloti*, el cual además de fijar nitrógeno atmosférico asociándose simbióticamente con las plantas de alfalfa al formar nódulos en sus raíces, también produce algunos exopolisacáridos que potencialmente pueden ser útiles en la industria de alimentos.

CAPITULO 1
GENERALIDADES

1.1 FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

El nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre, constituyendo aproximadamente el 80% del aire presente; su abundancia sin embargo es paradójica ya que como fuente nutricional el nitrógeno es escaso. Esto se explica fácilmente ya que la forma en la que se encuentra en el aire es inerte y únicamente puede entrar al sistema biológico cuando es "fijado" o combinado con otros elementos, tales como oxígeno o hidrógeno. (6)

CICLO DEL NITROGENO



El nitrógeno es uno de los elementos más importantes en el ciclo vital de los seres vivos del planeta. La principal transformación del nitrógeno es a complejos proteicos que están presentes en los vegetales y, una vez en estos, son asimilados y utilizados como fuentes nutricionales por animales y el hombre.

En la actualidad la población mundial enfrenta un gran problema, la deficiente producción de alimentos, por la baja productividad agrícola de muchos países para producir alimentos debido principalmente a la pobreza de sus suelos.

Se ha planteado como solución alternativa a este problema el empleo de variedades de alto rendimiento con el fin de acabar con ese déficit alimentario, sin embargo enfrenta dos dificultades: el rápido agotamiento de los suelos y el elevado costo de abonos químicos. Una solución a ambos problemas es utilizar microorganismos fijadores de nitrógeno, con los cuales se reemplazará la utilización de abonos químicos y se regenerará la fertilidad de los suelos empobrecidos y erosionados. (16)

1.1.1 MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO

Existen dos tipos de microorganismos fijadores de nitrógeno, los de vida libre y los simbióticos. Los microorganismos fijadores de nitrógeno en vida libre están grandemente distribuidos en la naturaleza, encontrándoseles en el suelo, lagos y mares, rocas, madera seca y en el interior de termitas y mamíferos. Los microorganismos fijadores de nitrógeno simbióticos se encuentran asociados con plantas principalmente:

a) Vida libre

- 1.- Bacterias (*Clostridium*, *Azobacter*, *Klebsiella*, etc.).
- 2.- Alga verde azul (*Anabaena*, *Tolypothrix*).

b) Simbióticos

- 1.- Alga verde azul en hojas o líquenes.
- 2.- Bacterias en hojas o tallos (*Frankia*, *Nostoc*, *Spirillum*, etc.).
- 3.- *Rhizobium* en plantas leguminosas.
- 4.- Varios microorganismos desconocidos (*Actinomycetos*) en las raíces de angiospermas. (29)

La cantidad de nitrógeno fijada anualmente por los organismos vivos es de 10^9 toneladas en todo el mundo, de la cual la mayor parte procede de simbiosis. (8)

Una de las relaciones simbióticas más interesantes e importantes, es la que se da entre las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium*.

1.2 GENERO *Rhizobium*

Los *Rhizobium* son un grupo de bacterias unicelulares que pertenecen a la familia *Rhizobiceae* cuya principal característica es que son bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico y se asocian simbióticamente con un gran número de plantas formando nódulos en sus raíces, estando entre ellas casi la totalidad de las leguminosas. (16)(32)(47)(48)

1.2.1 UBICACION TAXONOMICA DEL *Rhizobium*

El género *Rhizobium* se compone de seis especies, las cuales reciben sus nombres de acuerdo a las especies vegetales con las que se asocian. Las seis especies de *Rhizobium* reconocidas y sus respectivas leguminosas hospederas se muestran a continuación: (15)

<i>Rhizobium</i>	LEGUMINOSA
<i>leguminosarum</i>	Veza, Chicharo, Lenteja
<i>phaseoli</i>	Frijol, Alubia, Ayocote
<i>trifolii</i>	Trebol
<i>jupini</i>	Altramuz, Serradella
<i>japonicum</i>	Soya
<i>melliloti</i>	Alfalfa, Melilloto

1.2.2 CLASIFICACION POR EL TIPO DE CRECIMIENTO

De acuerdo al tipo de crecimiento o metabolismo los *Rhizobium* se dividen en dos grupos: el tipo llamado de crecimiento rápido en el que las células a la temperatura de 30°C se dividen en un lapso de tiempo muy corto (de 2 a 5 hrs), estos producen reacción ácida en medio de sales minerales-manitol; y el tipo de crecimiento lento, en el que las divisiones a 30°C se producen cada 12 a 24 hrs, estos microorganismo son también llamados *Bradyrhizobium*. (3)(16) Las especies de crecimiento lento producen reacción alcalina en un medio conteniendo carbohidratos y presentan inhabilidad para utilizar los disacáridos. (22)

Una clasificación más general, basada en la turbidez que producen las bacterias en medio líquido o la visibilidad de las colonias en medio sólido es la siguiente: grupo de *Rhizobium* de crecimiento rápido, los cuales producen gran turbidez en medio líquido y colonias muy visibles en medio sólido en un tiempo de 3 a 5 días a 28°C; en este grupo se ubican el *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium phaseoli*. En el grupo de *Rhizobium* de crecimiento lento, tenemos al *Rhizobium japonicum* y *Rhizobium lupini*, los cuales requieren de 8 a 10 días para tener un crecimiento similar. (15)

1.2.3 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

El género *Rhizobium* en cultivo puro es un bacilo Gram negativo, cuyos bastones pueden ser cortos o medianos de 1.2 a 4 μm de largo por 0.5 a 0.9 μm de ancho. Suelen ser móviles, mótricos o peritricos, y algunos poseen uno o varios flagelos. (15)(48) Algunas especies pueden presentar fimbria. (31)

Los *Rhizobium* son especies quimioorganotróficas, no forman esporas, (31) son aerobios, teniendo un excelente crecimiento a presiones parciales de oxígeno tan bajas como 0.01 atm, siendo óptima para su respiración cuando la presión es de 0.15 atm. (15) Crecen bien en rangos de temperatura entre 25 y 30°C, con excepción del *Rhizobium meliloti* que prefiere temperaturas de 35°C. (15)(16)(48) La variación en el pH para el crecimiento de los *Rhizobium* oscila entre 6 y 7. (48) El *Rhizobium meliloti* al ser una bacteria ácido-tolerante, puede variar el pH de 6.8 a 6.4 después de 144 hrs de incubación. (15)

Las colonias que producen los *Rhizobium* son circulares, convexas, semitranslúcidas, en relieve y mucilaginosas, de 2 a 4 mm crecidas de 3 a 5 días en agar- manitol - extracto de levadura - sales minerales. (31)

Las distintas especies de *Rhizobium* se distinguen entre sí por ligeras diferencias morfológicas o bioquímicas. En la tabla 1 se muestran algunas de ellas: (8)

TABLA 1.- DIFERENCIAS BIOQUIMICAS Y MORFOLOGICAS DE LOS *Rh. zobium*.

MICROORGANISMO	NUMERO DE FLAGELOS	CRECIMIENTO SOBRE		
		LECHE TORNASOL	ARABINOSA	GALACTOSA
<i>R. leguminosarum</i>	4	ALC,Z	+	+
<i>R. phaseoli</i>	4	ALC,Z	-	-
<i>R. trifolii</i>	4	ALC,Z	-	-
<i>R. lupini</i>	2-3	ALC	+	-
<i>R. japonicum</i>	1	ALC	+	-
<i>R. meliloti</i>	1	ACD	+	+

ALC: alcalinización

ACD: acidificación

Z: formación de una zona clara

1.2.4 SIMBIOSIS LEGUMINOSA-*Rhizobium*

Aproximadamente el 90% de todas las leguminosas son capaces de formar nódulos en presencia de *Rhizobium*.

Existe una marcada especificidad entre la cepa de *Rhizobium* y la especie leguminosa. Así, una sola cepa puede infectar cierta especie leguminosa pero no otras. (48) A un grupo de cepas de *Rhizobium* capaz de infectar a un grupo de leguminosas parecidas se denomina grupo de inoculación cruzada. (8)

Al penetrar el *Rhizobium* en las células de la raíz de su planta - huésped forma nódulos. En este caso se trata de una infección que se transforma posteriormente en una asociación simbiótica, es decir, en una asociación mutuamente benéfica, pues mientras las bacterias de este género utilizan solo una parte de nitrógeno fijado para su metabolismo, aportan cantidades significativas de éste a la planta - huésped a cambio de sustancias energéticas (azúcares) que la planta le proporciona. (16)(39)

1.2.5 PROCESO DE NODULACION

La nodulación empieza cuando los *Rhizobium* específicos, presentes en el suelo, entran en las raíces por el extremo de los pelos absorbentes; entonces se forma en cada pelo uno o más tubos de infección los cuales contienen las bacterias. Cuando la infección alcanza la base del pelo absorbente, en este nivel, el tubo de

infección libera las bacterias en el interior de las células de la corteza de la raíz. En este momento los *Rhizobium* se recubren con una membrana, asumiendo una morfología particular denominada bacteroide. De esta forma, convertidos en bacteroides, adquieren la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y transformarlo en nitrógeno amoniacal, el cual ha de ser compartido con la planta huésped. Como se observa en la figura del proceso de nodulación.

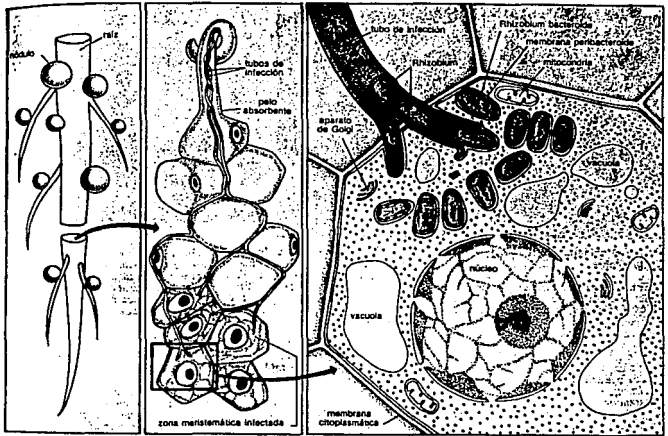
De esta manera las células vegetales infectadas se multiplican hasta formar en la superficie de las raíces excrecencias de tamaño variable (de 0.5 a 4 mm). Estos son los nódulos cuyo aspecto es propio de cada especie leguminosa infectada. En algunas leguminosas como el cacahuate, el *Rhizobium* penetra directamente en las células de la corteza de la raíz donde la infección se propaga por la división de las células infectadas y no por los tubos de infección.

La transformación de nitrógeno gaseoso atmosférico a NH_3 , es catalizada por una enzima específica, la nitrogenasa, la cual no es una enzima simple sino un complejo enzimático constituido por dos proteínas, llamadas proteínas I y II. La proteína I contiene molibdeno y hierro, se le llama molibdoferredoxina, su función es reducir el N_2 en NH_3 . La proteína II contiene únicamente hierro y es llamada azoferredoxina, su función es la de transferir a la proteína I la energía necesaria para su funcionamiento.

En el *Rhizobium*, la nitrogenasa no puede funcionar in vivo más que en presencia de una cierta concentración de oxígeno. In vitro solamente funciona en ausencia total de éste. En el nódulo la presencia de oxígeno es muy baja (0.05 a 0.01 mm Hg), si se eleva, la nitrogenasa queda inhibida y el nódulo no fija el nitrógeno; sin embargo, el nódulo es un gran consumidor de oxígeno. Esta paradoja se explica por la presencia, en los nódulos, de las leghemoglobinas, las cuales provisionan de oxígeno a las bacterias y facilitan al mismo tiempo la difusión del oxígeno a presión muy baja hacia el interior del nódulo.

Las leghemoglobinas contienen hierro como la hemoglobina, por lo que dan a los nódulos un tinte rosado o rojo. Las leghemoglobinas son sintetizadas de la siguiente manera: la porción globina es sintetizada por la planta; la porción hemo por el microorganismo simbiótico. Por tal razón las leghemoglobinas solamente aparecen cuando se ha establecido la relación simbiótica. De tal manera que cuando una cepa resulta efectiva, los nódulos formados son grandes, rojizos y

PROCESO DE NODULACION



RAIZ NODULADA

PELO ABSORBENTE

CELULA DE RAIZ INFECTADA POR

Rhizobium

fijadores de nitrógeno; por el contrario si la cepa no es efectiva los nódulos son pequeños, de color blanco-verdosos e incapaces de fijar nitrógeno. Cabe hacer mención que las leghemoglobinas aparecen en los primeros estadios de la infección de la planta. (6)(8)(16)(29)(39)

Con el tiempo, el nódulo se deteriora, liberando bacterias al suelo. Las formas bacteroides son capaces de dividirse, pero siempre hay un pequeño número de células bacilares que han permanecido inactivas; éstas proliferan ahora, usando como nutrientes algunos de los productos del nódulo deteriorado y pueden iniciar el proceso de infección en otras raíces o pueden llevar una existencia libre en el suelo. (8)

1.2.6 ESPECIFICIDAD DE LA SIMBIOSIS

Se han llevado a cabo algunas investigaciones centradas en los primeros estadios de la interacción simbiótica *Rhizobium* - leguminosa con el fin de aclarar el mecanismo por medio del cual se establece dicha asociación.

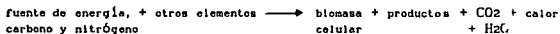
Algunas investigaciones reportan que la interacción simbiótica de las especies de *Rhizobium* involucra la presencia de heteropolisacáridos extracelulares (EPS), tales como el β -(1,2)-glucan y lipopolisacáridos (LPS). (32)(47)

Según la hipótesis de B. Bohloul y E. L. Schmidt (5) podría haber una interacción entre las glicoproteínas segregadas por las raíces de las leguminosas y los polisacáridos de la pared de la bacteria. Estos polisacáridos desempeñarían un papel de receptores respecto a las glicoproteínas. De esta manera se supone que los *Rhizobium* presentes en el suelo podrían reconocer estas glicoproteínas llamadas lectinas, sin embargo el mecanismo de esta interacción aún no está determinado claramente, aunque esté sólidamente determinada para algunas leguminosas, especialmente el trébol y la soya, la validez de esta hipótesis no ha podido ser verificada para todas las especies simbióticas fijadoras de nitrógeno conocidas y estudiadas. (16)(26)(32)(39)(47)

Tomando como base la información anterior, la producción a nivel industrial de estas bacterias y su posterior uso, aprovechando su relación simbiótica con algunas plantas leguminosas, resulta interesante un estudio de la optimización de su medio de cultivo para lograr su máxima producción.

1.3 FORMULACION DE MEDIOS DE CULTIVO

La formulación del medio de cultivo para el crecimiento microbiano es esencial tanto en el diseño de experimentos a nivel laboratorio a escala piloto, como para la manufactura de procesos. Los constituyentes del medio deben satisfacer los requerimientos elementales para la producción de biomasa celular o metabolitos y además, debe tener una adecuada fuente de energía para la biosíntesis y mantenimiento de las células. El primer paso a considerar es una ecuación basada en la estequiometría de crecimiento y formación del producto, así: (44)



Para diseñar un medio de cultivo deben tomarse en cuenta los factores ambientales, los cuales se dividen en:

- a) Ambiente físico: temperatura, humedad, pH, aireación, agitación, presión atmosférica, etc.
- b) Ambiente químico, es decir, los compuestos adicionados al medio de cultivo que permitan el crecimiento de los microorganismos, también llamados requerimientos nutricionales, tales como, Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno, Fosforo, Azufre, y otros minerales.

Al medio de cultivo también se le pueden adicionar otras sustancias dependiendo del medio en particular que se trate, como sales buffer, sustancias óxido - reductoras, agentes selectivos y sustancias solidificantes, tales como, gelatina, agar, sílica gel, etc.

La fuente de energía que se adiciona al medio de cultivo depende del tipo de bacteria que se trate, así, tenemos que las bacterias fotosintéticas requieren luz como fuente de energía, las quimiolitotróficas obtienen la energía por oxidación de moléculas inorgánicas y las quimioorganotróficas requieren compuestos de carbono como fuente de energía, los cuales frecuentemente se adicionan como fuente de carbono también. Este tipo de bacterias son las más comúnmente utilizadas en la industria de la fermentación. (37)

En el diseño del medio de cultivo de cualquier microorganismo es indispensable conocer su composición macromolecular genérica o específica. Cuando se trata de un microorganismo desconocido el diseño de su habitat óptimo resulta un tanto "complicado" y requiere de pruebas de ensayo múltiples para crearle las condiciones propicias para su desarrollo. Por lo general la composición específica de una bacteria no se reporta, a menos de que se trate de una bacteria muy estudiada, por lo cual es común diseñar el medio de cultivo en base a la composición elemental del microorganismo: (38)

COMPOSICION ELEMENTAL DE LOS MICROORGANISMOS (44)

Elemento	Bacteria	Levadura	Hongo
	% en peso seco		
Carbono	50-53	45-50	40-63
Hidrógeno	7	7	-
Nitrógeno	12-15	7.5-11	7.0-10.0
Fósforo	2.0-3.0	0.8-2.6	0.4-4.5
Azúfre	0.2-1.0	0.01-0.24	0.1-0.5
Potasio	1.0-4.5	1.0-4.0	0.2-0.25
Sodio	0.5-1.0	0.01-0.1	0.02-0.5
Calcio	0.01-1.1	0.1-0.3	0.1-1.4
Magnesio	0.1-0.5	0.1-0.5	0.1-0.5
Fierro	0.02-0.2	-	-
Cobre	0.01-0.02	-	-
Manganeso	0.001-0.01	-	-
Cloro	0.5	-	-

El requerimiento de carbono bajo condiciones aerobias se puede estimar por el coeficiente de producción celular (Y), también llamado rendimiento, el cual se define de la siguiente manera: (1)(38)(44)

$$Y = \frac{\text{cantidad de células secas producidas}}{\text{cantidad de carbón utilizado como sustrato}}$$

Cada especie microbiana presenta un rendimiento celular específico dependiendo del sustrato utilizado, sin embargo para muchos microorganismos poco estudiados, tales como el *Rhizobium*, no se tienen reportados los rendimientos celulares por ello para el cálculo de la fuente de carbono se recurre a los rendimientos celulares promedio para los microorganismos en general.

Algunos coeficientes de producción celular promedio en condiciones aerobias son: (44)

<u>Fuente</u>	<u>Y</u>
Glucosa	0.51
Metano	0.62
Acetato	0.34
Etanol	0.68

Para iniciar el cálculo del medio basal o inicial de cultivo de microorganismos, primero se debe establecer la concentración de células deseadas (g/l) además de conocer la eficiencia y tipo de sustrato a emplear como fuente de carbono.

Cada uno de los demás nutrientes que constituyen el medio de cultivo se suministran en forma de compuestos cuya cantidad se establece de la siguiente manera: considerando los gramos de células por litro a obtener, con base en la composición de la bacteria (% en peso del nutriente por gramo de células), y el peso molecular del nutriente en relación con el peso molecular del compuesto que se va a emplear como fuente de dicho nutriente, se calcula la cantidad de compuesto que proporcionará la cantidad suficiente de nutriente para que dicha bacteria crezca y se reproduzca.

Por ejemplo si se quiere obtener 15g de células secas por litro utilizando glucosa como fuente de carbono los cálculos de la composición del medio de cultivo son los siguientes:

El cálculo de la fuente de carbono apartir del despeje de la ecuación del rendimiento celular es el siguiente:

$$\text{cantidad de carbono} = \frac{15\text{g cel/litro}}{0.51\text{g cel/g glucosa}} = 29.41\text{g glucosa/litro.}$$

EL Cálculo de los demás nutrientes se ejemplificará al calcular la fuente de Fósforo.

Para calcular el requerimiento máximo de fósforo se establece que la fuente de donde se obtendrá es K_2HPO_4 por lo que tenemos:

$$(15\text{g cel})(0.03\text{g P/l}) = 0.45\text{g P/l/g cel.}$$

como se utiliza K_2HPO_4 la cantidad de un gramo/mol es:

$$\frac{30.9738\text{g P}}{174.183\text{g K}_2\text{HPO}_4} = 0.1770\text{g P/g K}_2\text{HPO}_4$$

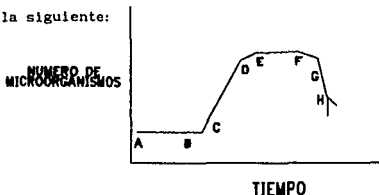
si en un gramo de K_2HPO_4 se tiene 0.1770g de fósforo y se requiere 0.45g para cubrir el requerimiento máximo ¿cuantos gramos de K_2HPO_4 hay que adicionar?

$$\begin{array}{rcl}
 1g \text{ } K_2HPO_4 & \text{---} & 0.177g \text{ P} \\
 X & \text{---} & 0.45g \text{ P} \quad X = 2.542g \text{ } K_2HPO_4/l.
 \end{array}$$

1.4 CURVAS DE CRECIMIENTO DE CULTIVOS BACTERIANOS

Cuando las condiciones del medio de cultivo son favorables para el microorganismo se inicia su multiplicación y crecimiento, que pasa por una serie de fases sucesivas.

Si se realizan conteos microbianos periódicos y los resultados del número de microorganismos se presentan gráficamente en ordenadas y las unidades de tiempo en abscisas, se obtiene una curva de crecimiento como la siguiente:



Donde de A a B es la llamada fase inicial o de latencia (lag), durante la cual no hay crecimiento o incluso disminuye el número de microorganismos. Durante estas primeras horas las células se adaptan a su nuevo medio, aumenta su índice metabólico y forman entonces un nuevo protoplasma preparándose con ello para una fase reproductiva.

De B a C, fase de aceleración positiva, ocurre un aumento continuo de la velocidad de crecimiento.

De C a D es la fase logarítmica o exponencial durante la cual el ritmo de crecimiento es máximo y constante a una velocidad (μ) gobernada por su tiempo mínimo de generación (t_d). Este ritmo o velocidad de crecimiento se mantendrá constante en tanto se disponga de nutrientes abundantes, y se conserve la acumulación de productos tóxicos de desecho bajo el nivel crítico. La fase logarítmica puede ser prolongada modificando el ambiente en que se desarrollan los microorganismos, de modo que los cambios que habrían de ocurrir no se presenten. Se puede ver afectado por la aireación del medio de cultivo, ajustes de pH, por aspiración y sustitución del medio o por

combinación de tales procesos. Cuando no se verifica tal regulación o intervención se tendrá la fase de aceleración negativa (D a E), en la que disminuye el ritmo de multiplicación.

En la fase estacionaria (E a F) se llega a un punto en el cual el número de microorganismos que muere iguala al número de los que se reproducen, es decir, el número de microorganismos viables se mantendrá en equilibrio. La duración de esta fase la determinarán la velocidad o índice de agotamiento de nutrientes y la acumulación de desechos o metabolitos.

En la fase de destrucción acelerada (F a G) y fase de destrucción final o de declive (G a H), el número de microorganismos que muere excede el número de los que se están reproduciendo. Esta fase continua hasta que todos los microorganismos del cultivo mueren. (14)(19)(41)

Para propósitos de reproducir un microorganismo o de obtener una sustancia a partir de él, lo más importante es lograr un número grande de células, lo cual se alcanza durante la fase de crecimiento exponencial, en donde la razón de cambio de la concentración celular es directamente proporcional a la concentración celular presente, y que matemáticamente se expresa:

$$dx/dt = x \quad [1]$$

donde: x = concentración celular (g/l)

t = tiempo (h)

al introducir la constante de proporcionalidad a la ecuación queda:

$$dx/dt = \mu \quad [2]$$

dado que μ se define como la velocidad específica de crecimiento que es igual a:

$$\mu = (1/x)(dx/dt) \quad [3]$$

rearrreglando la ecuación [3] se tiene:

$$\mu dt = dx/x \quad [4]$$

al integrar [4], teniendo como límites del tiempo desde cero hasta t , y de la concentración celular desde X_1 hasta X_2 .

$$\int_0^t \mu dt = \int_{X_1}^{X_2} dx/x \quad [5]$$

queda $\mu t = \text{Ln} (X_2/X_1) \quad [6]$

despejando x , que es la concentración de células en un tiempo t , se tiene:

$$X_2 = X_1 e^{\mu t} \quad [7]$$

La ecuación [7] implica que para un cultivo creciendo en forma exponencial, es posible predecir su comportamiento en un tiempo t , si se conoce la concentración inicial y la velocidad específica de crecimiento (μ).

Un caso particular de la ecuación [7] se obtiene cuando se mide el tiempo que un microorganismo emplea para duplicar su masa celular, y esto es:

$$X_2 = 2X_1 \quad [8]$$

por tanto el tiempo de duplicación (t_d), de un microorganismo, puede calcularse por sustitución de la ecuación [8] en la ecuación [6] tomando $t = t_d$.

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad [9]$$

J. Monod (1942) mostró que cuando la concentración de sustrato es baja, existe una relación lineal entre ésta y la velocidad específica de crecimiento, pero a altas concentraciones, alcanza un valor de saturación similar al de la ecuación de Michaelis-Mentel. Lo anterior matemáticamente implica:

$$\mu = \mu_{\max} (S/K_s + S) \quad [10]$$

donde: K_s = constante de saturación (g/l)

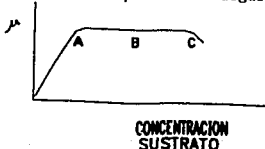
μ_{\max} = velocidad específica de crecimiento máxima (hrs^{-1})

S = saturación

si $K_s = S$, implica que:

$$\mu = \mu_{\max} / 2 \quad [11]$$

La influencia de la concentración del sustrato (S) sobre μ se describe en forma de esquema en la siguiente curva.



En la fase A existe limitación por la falta de sustrato, en la fase B no hay limitación y la reacción ocurre en forma exponencial, en la fase C existe inhibición por exceso de sustrato.

Así pues, cuando S tiende a cero, μ es proporcional a S, cuando S esta en exceso (y no es inhibidor), μ es independiente de S y $\mu = \mu_{max}$.

Al ser K_s una constante de saturación, cuanto menor sea, mayor es la afinidad sustrato-microorganismo y con ello aumenta la fracción de crecimiento que corresponde a la fase exponencial. (10)

El parámetro más importante de una fermentación, y de cualquier proceso en general, es la productividad (P), que significa la producción (p) obtenida por unidad de tiempo.

En una fermentación por lote, en donde lo que importa es la concentración celular a un tiempo t, se tiene:

$$P = \frac{p}{t} = \frac{X}{t} = \frac{Y_s/X (S)}{t} \quad [12]$$

para calcular t en un cultivo por lote, es necesario tomar en cuenta el tiempo que lleva, por separado, cada actividad involucrada en su preparación, dentro de cada una de las fases.

El tiempo en la fase log, está dado por:

$$t_2 = (1/\mu) \ln (X_2/X_1) \quad [13]$$

por lo que la productividad final queda:

$$P = \frac{Y_x/s (S_0)}{(1/\mu) \ln(X_2/X_1) + T} \quad [14]$$

Donde:

T = tiempo duración fase lag + tiempo duración fase estacionaria y fase de muerte. (38)

1.5 INOCULANTES

Un inoculante se puede definir como un cultivo concentrado de bacterias vivas en medio líquido o soportado en algún compuesto orgánico. Las especies de *Rhizobium* para el inoculo son seleccionadas en base a las siguientes cualidades:

a) Formación de muchos nódulos fijadores de nitrógeno, esto es nódulos grandes y rojos en las raíces de la planta en particular.

- b) El microorganismo debe ser competitivo frente a otras especies infectivas de *Rhizobium*.
- c) La nodulación debe ocurrir en un rango de temperatura bajo la cual la planta pueda crecer.
- d) El *Rhizobium* debe ser capaz de crecer bien en el medio de cultivo, en el medio de soporte y en la tierra después que la semilla ha sido sembrada.
- e) El microorganismo debe ser capaz de sobrevivir en la tierra de una estación a otra y en suelos de pH variantes. (15)

En base a su aplicación existen dos tipos de presentación de los inoculantes: a) los diseñados para aplicarse en las semillas leguminosas y b) los diseñados para aplicarse directamente en la tierra. Siendo los más comunes aquellos que son aplicados a las semillas. (15)

Los inoculantes mantienen la viabilidad de las bacterias a temperaturas ambientales durante un periodo de tiempo relativamente corto (aproximadamente 6 semanas), sin embargo se pueden conservar por 2 meses o más si se mantienen a temperaturas de refrigeración iguales o menores a 4°C. (15)

1.5.1 MEDIOS DE SOPORTE

Un medio de soporte es todo material excipiente que por sus características tanto físicas como químicas es capaz de mantener viable a los *Rhizobium* el tiempo necesario para llevar a cabo la inoculación de las semillas de leguminosas sin que se pierdan sus propiedades infectantes o mueran. (24)

Las cualidades de un buen medio de soporte para *Rhizobium* son: 1) No ser tóxico a las especies de *Rhizobium*, 2) Tener buenas cualidades de absorción, 3) Ser de fácil pulverización y esterilización, 4) Tener buena adhesión a las semillas, 5) Que se pueda mantener a temperatura ambiente o en refrigeración, 6) Ser de fácil disponibilidad y costo moderado, 7) Debe contener material orgánico suficiente para que exista en el soporte, una propagación del microorganismo. (15)

Para la selección de un material de soporte, además de considerar sus cualidades, es importante determinar la capacidad del *Rhizobium* para incrementar el número de unidades formadoras de colonias en un tiempo razonable, de 2 a 3 semanas para *Rhizobium* de crecimiento rápido y de 4 a 5 semanas para *Rhizobium* de crecimiento lento (a temperatura ambiente), y se mantengan viables y/o disminuyan lentamente una vez aplicados al soporte.

Los medios de soporte que han sido usados son: Las turbas, las mezclas de polvo de carbón, la bentonita, alfalfa molida, el bagazo de caña, carbón fósil pulverizado, entre otros. (15)

1.6 POLISACARIDOS MICROBIANOS

Los microorganismos, al igual que los organismos superiores, sintetizan oligosacáridos y polisacáridos. Las cantidades de estos compuestos que se encuentran en los microorganismos varían considerablemente. Mientras que los polisacáridos intracelulares pueden representar hasta un 60 % del peso seco del microorganismo, los polisacáridos extracelulares pueden superar la cantidad de peso seco.

Muchos de los polisacáridos que actualmente tienen importancia industrial son obtenidos de tejidos de plantas, semillas, algas, frutos y árboles. Sin embargo algunos de estos polisacáridos enfrentan diversas dificultades entre ellas el mantener sus características específicas estables, pues los requerimientos metabólicos de las plantas, así como los cambios ambientales que varían de región a región, pueden manifestarse en diferencias de funcionalidad en un mismo tipo de polisacárido. (15)(45)(46)

Ante estas variaciones, la producción de polisacáridos por fermentación microbiana para su uso comercial ofrece varias ventajas potenciales comparada con la extracción de polisacáridos de plantas y algas, o la síntesis química (9)(15)(44), siendo algunas de ellas las siguientes:

La producción de los polímeros es independiente de las condiciones climáticas, su cantidad es segura, su calidad es uniforme si la fermentación se conduce en forma controlada y si se utilizan materias primas de calidad constante, la composición y propiedades del polisacárido se pueden modificar si se cambian las condiciones de la fermentación. Por ello se puede tener una amplia diversidad de polisacáridos producidos por un mismo microorganismo.

Como muchos polisacáridos son extracelulares su extracción es más simple pues no se necesitan técnicas complejas de extracción las cuales además de tener un cierto costo, pueden degradar en parte al producto durante la recuperación.

La penetración de los polisacáridos microbianos en el mercado ha sido lenta debido principalmente al poco conocimiento de su naturaleza física y química y al desconocimiento de sus potenciales aplicaciones. (46)

Los polisacáridos al presentar interacciones iónicas tanto con otros elementos del sistema en el que se encuentran como con ellos mismos tienen la capacidad de modificar la viscosidad de la solución que los contienen y con ello cambiar sus propiedades reológicas, así mismo por la composición y estructura de los polisacáridos pueden presentar una o más de las siguientes propiedades funcionales: espesante, gelificante, emulsificante, estabilizante (de espumas, de emulsiones, de suspensiones), las cuales son de gran importancia en la industria alimentaria, farmacéutica, acelitera, textil, etc. (46)

Una desventaja de la producción de polisacáridos por microorganismos es el elevado costo de instalación y escalamiento del equipo de fermentación. (46)

1.6.1 PRINCIPALES POLISACARIDOS MICROBIANOS

Los polisacáridos microbianos que han cobrado mayor interés son los exopolisacáridos debido a que son los que se obtienen en mayor cantidad y son recuperados con facilidad del caldo de cultivo. Los exopolisacáridos se encuentran en dos formas diferentes: ya sea unidos a las células microbianas formando parte de la cápsula; o secretados por las células al medio ambiente que las rodea en forma de "fango" soluble.

La producción de polisacáridos inició con gran interés alrededor de la década de los 50's como una alternativa a la producción de polímeros tradicionalmente obtenidos de fuentes naturales (plantas, semillas, frutos, algas, etc.). El primer polisacárido microbiano que se comercializó fue el dextrano, un polímero producido por bacterias como *Leuconostoc sp*, *Klebsiella sp*, *Streptococcus sp*, entre otros. El dextrano se utiliza en la formación de geles como el Sephadex, el cual se utiliza para purificar y fraccionar sustancias biológicas, incluyendo la recuperación de proteínas, además de tener un amplio uso clínico en tratamientos sanguíneos. (28)(42)

Algunos otros polisacáridos que exhiben propiedades interesantes son el curdlan que forma un gel a temperaturas de 110 a 130°C producido por *Alcaligenes faecalis* var. *mixogenes*; el alginato producido por *Azobacter vinelandii*, el cual es un estabilizante de emulsiones, gelificante, estabilizante de espumas y espesante; (46) el PS-7 producido por *Beijerinckia indica*, el cual presenta mayor poder espesante que la goma xantana. (46) El pululano es otro polisacárido interesante, ya que con él se pueden formar películas protectoras de alimentos, estas películas son impermeables al oxígeno por lo que pueden prevenir la oxidación tanto de alimentos como de productos farmacéuticos, este polisacárido es producido por *Aureobasidium pullulans*. (42) El escleroglucan es secretado por *Sclerotium sp* el cual se utiliza como gelificante, espesante, estabilizante de suspensiones, en películas protectoras de semillas, entre otros. (4)(15)

A pesar de la gran variedad de propiedades que presentan los polímeros microbianos antes mencionados ninguno de ellos ha sido producido en gran escala comercial. En la actualidad los únicos polisacáridos microbianos que han alcanzado y mantenido una producción a escala comercial es la goma xantana, polisacárido producido por la bacteria *Xantomona campestris* y el dextrano. (4)(15)

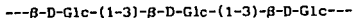
Otros polisacáridos que constituyen un grupo de polisacáridos económicamente interesantes son los succinoglucanos producidos por bacterias tales como *Agrobacterium*, *Alcaligenes* y *Rhizobium*. En solución acuosa, los succinoglucanos exhiben propiedades tales como espesante, estabilizante de suspensiones y emulsificante. (18)

1.6.2 POLISACARIDOS PRODUCIDOS POR *Rhizobium meliloti*

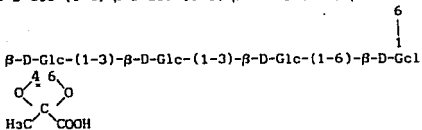
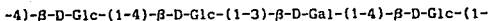
Como se mencionó en la página 11 los *Rhizobium* también excretan exopolisacáridos los cuales tienen una función importante en el momento en que la bacteria infecta las raíces de la planta. Otras investigaciones mencionan que los exopolisacáridos son segregados por el *Rhizobium* tanto para defenderse del medio ambiente que los rodea, como para atrapar ciertos nutrientes. Los exopolisacáridos excretados no se encuentran adheridos a la superficie de la célula.

Estudios realizados con diferentes especies de *Rhizobium meliloti* mencionan que los polisacáridos extracelulares de estas bacterias están compuestos por glucosa, galactosa y ácido glucurónico en porcentajes que varían de 82 a 86, 13 a 16 y 0.4 a 1.2 respectivamente. (2)

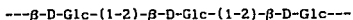
Otras investigaciones dan como resultados que algunas especies de *Rhizobium meliloti* producen tres exopolisacáridos diferentes, tales como, curdlan, succinoglucan y $\beta(1-2)$ -glucan. Las estructuras de los exopolisacáridos antes mencionados se muestran a continuación: (18)(20) (23)(31).



CURDLAN



SUCCINOGLUCAN



$\beta(1-2)$ -GLUCAN

Glc: Glucosa

Gal: Galactosa

CURDLAN: es un polisacárido insoluble en agua fría, el cual presenta la característica de formar un gel con calentamiento cercano a los 54°C. La firmeza del gel depende de la temperatura aplicada, mostrando que la resistencia es casi constante entre los 60 y 80°C, incrementándose entre 80 y 100°C. (23)(35)

SUCCINOGLUCAN: es un heteropolisacárido soluble en agua, las suspensiones que forma exhiben propiedades funcionales de espesante, y emulsificante. Estudios reológicos del medio de cultivo que contiene este exopolisacárido mostraron que las suspensiones se comportan de acuerdo a la ecuación general de Hershel-Buckley $\tau = \tau_0 + k\gamma^n$. (18)(46) (45)

$\beta(1-2)$ -GLUCAN es un polisacárido con el que no se han realizado estudios para su posible aplicación en la industria.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el comportamiento cinético de cepas de *Rhizobium meliloti* para obtener un inoculante (biomasa) y para la producción de exopolisacárido (goma), al optimizar su medio de cultivo.

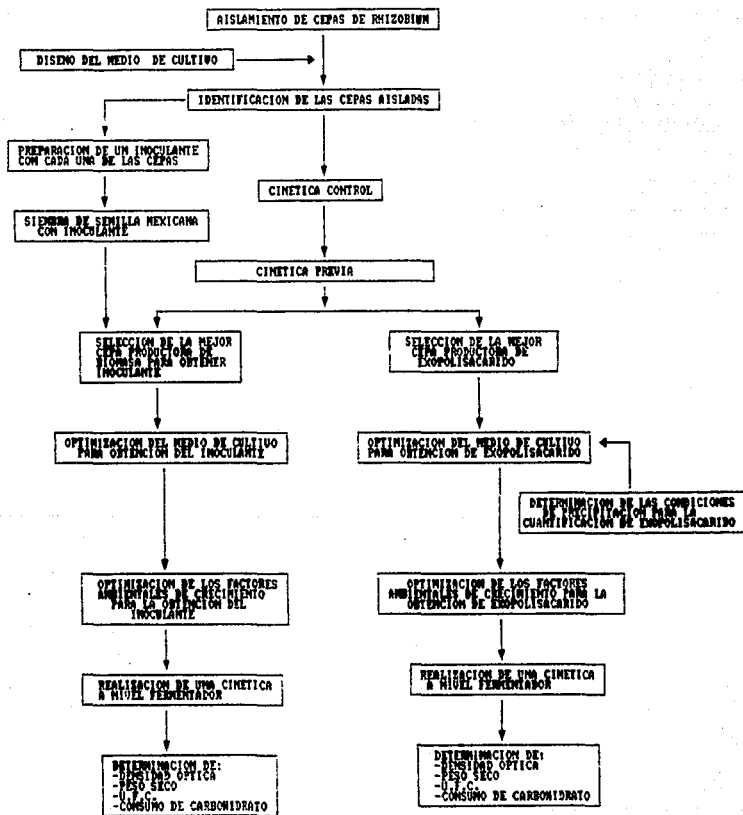
OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Aislamiento de cepas de *Rhizobium meliloti* de diferentes lugares.
- 2.- Seleccionar las cepas de *Rhizobium meliloti* que posean cualidades para ser empleadas como inoculante en los sembradíos de alfalfa y las cepas con buena capacidad productora de exopolisacárido.
- 3.- Optimización de las condiciones nutricionales para la producción del inoculante y del exopolisacárido en un cultivo por lote.
- 4.- Establecimiento de las condiciones óptimas de crecimiento de *Rhizobium meliloti*, para la producción de inoculante y para la producción de exopolisacárido en cuanto a pH, temperatura, velocidad de agitación y aireación en un cultivo por lote.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

CUADRO METODOLOGICO



2.1. AISLAMIENTO DE CEPAS

2.1.1. ORIGEN DE LAS CEPAS

Se aislaron tres cepas de *Rhizobium*, dos procedentes de nódulos de raíces de alfalfa de diferentes regiones del país (Teotihuacan Edo. Méx. y Zacatlán Puebla) y la tercer cepa fue aislada de los nódulos de la raíz de plantas de alfalfa nacidas de una semilla inoculada comercialmente con la que se contaba en el laboratorio.

2.1.2. PROCEDIMIENTO

El aislamiento de *Rhizobium* a partir de raíces nóduladas se realizó de la siguiente manera:

- a) Se extrajo la planta de alfalfa con todo y raíz.
- b) Se transportó al laboratorio en algodón húmedo.
- c) Se lavó la raíz con agua y se desinfectaron externamente los nódulos con una solución de cloro al 5%
- d) Se seleccionaron los nódulos de mayor tamaño y coloración rojiza.
- e) Se abrió el nódulo y se sembró el contenido sobre placas de agar - extracto de levadura - manitol y rojo congo. (Apéndice 1)
- f) Se incubó a 30°C, durante 24 horas aproximadamente.
- g) Se purificaron las colonias gomosas. (48)

2.2 IDENTIFICACION DE LAS CEPAS

La identificación primaria o caracterización de las cepas de aisladas, se realizó por las siguientes pruebas: (12)(31)(33)(48)

- a) Características de las colonias en medio sólido. (medio basal para *Rhizobium*). (37)
- b) Tinción de Gram. (Apéndice 2)
- c) Prueba de motilidad por el método de la gota suspendida. (Apéndice 3)
- d) Crecimiento en leche tornasolada a 30°C por 6 semanas. (Apéndice 4)

Las bacterias de *Rhizobium meliloti* aisladas, fueron denominadas de acuerdo a su lugar de origen teniéndose así la cepa Teotihuacan, la cepa Zacatlán y la cepa Laboratorio, la cual se obtuvo de la semilla inoculada comercialmente.

2.3 PRUEBA DE INFECTIVIDAD EN PLANTAS

Se realizaron pruebas de infectividad de las tres cepas aisladas de *Rhizobium meliloti* en semillas de alfalfa para lo cual se prepararon inoculantes colocando colonias puras con una asa de platino en medio de cultivo líquido. Los cultivos se crecieron a 30°C y 200 rpm de agitación durante 72 horas.

Las semillas de alfalfa se rociaron uniformemente con cada uno de los inoculantes y se sembraron en tierra previamente esterilizada, cuyo pH fué de 7.2[±] 0.1. Para comparar la efectividad de cada inoculante se sembraron semillas de alfalfa como patrón de referencia las cuales no se inocularon. En este caso se evaluó el número de nódulos por planta y el follaje de la misma.

2.4 DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

En este trabajo se estableció que la cantidad de células de *Rhizobium meliloti* a obtener sería de 15 g/l. Los sustratos utilizados fueron glicerol, manitol y sacarosa, los cuales presentan eficiencias de 0.75, 0.5 y 0.5 respectivamente. (1)(39)(44)

El medio de cultivo diseñado para la obtención de 15 gramos de células por litro, se basó en los requerimientos nutricionales máximos, medios y mínimos, de la composición elemental de las bacterias y en la sugerencia que Vincent (48) da para el cultivo de *Rhizobium*. En la tabla 2 se presenta el medio de cultivo diseñado y los diferentes niveles de variación de cada uno de los nutrientes.

El calcio no se consideró en el cálculo del medio de cultivo ya que Vincent(48) observó que la adición de pequeñas cantidades de calcio (0.001 a 0.016% Ca⁺²) frena el desarrollo de colonias de *Rhizobium meliloti*.

Los niveles de variación de pH y temperatura se establecieron en función del rango reportado para el crecimiento del *Rhizobium*. (15)(31)(48)) La velocidad de agitación se tomó en base a la capacidad de funcionamiento del fermentador (mínimo 100 rpm, máximo 600rpm). Referente a las fermentaciones a nivel matraz se consideró una velocidad de agitación de 200 rpm dado que A. Rhodes (40) sugiere que una fermentación a nivel matraz con agitación mecánica, sea realizada a velocidad próxima 220 rpm.

TABLA 2.- MEDIO DE CULTIVO DISEÑADO PARA LA OPTIMIZACION DEL CRECIMIENTO Y OBTENCION DE EXOPOLISACARIDOS DE CEPAS AISLADAS DE *Rhizobium meliloti*

Sustrato	Máximo g/l	Medio g/l	Minimo g/l
K ₂ HPO ₄	2.542	2.108	1.800
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.153	0.691	0.152
NaCl	0.381	0.305	0.190
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.145	0.079	0.014
Extracto levadura	3.125	2.812	2.500
y como fuente de carbono cualquiera de los siguientes:			
Manitol	40.0	30.0	20.0
Sacarosa	40.0	30.0	20.0
Glicerol	30.0	20.0	10.0

TABLA 3.-VARIACIONES DE LOS FACTORES FISICOS PARA LA OPTIMIZACION DEL CRECIMIENTO Y OBTENCION DE EXOPOLISACARIDO DE CEPAS DE *Rhizobium*.

pH	7.5	7.0	6.5
Temperatura(°C)	32.0	30.0	28.0
Agitación(rpm)	500	300	200

2.5 CINETICA CONTROL

Se llevó a cabo una cinética de crecimiento como "control" con la cepa Laboratorio para obtener el tiempo de duración de la fase logarítmica el cual fue utilizado para mantener constante la concentración de células que sirvieron de inóculo para posteriores variaciones de nutrientes en la optimización. Esta cinética fue realizada en matraz Erlenmeyer, utilizando el medio de cultivo calculado como máximo utilizando manitol como fuente de carbono y manteniendo el pH de 7.0, la temperatura a 30°C y la velocidad de agitación de 200 rpm. El crecimiento celular fue medido mediante peso seco y absorbancia; debido a que algunas lecturas de absorbancia rebasaban el rango máximo de lectura del espectrofotómetro fue necesario realizar diluciones consecutivas del medio de cultivo antes de la toma de lectura.

2.5 SELECCION DE LA MEJOR CEPA

Se realizaron cinéticas con cada una de las cepas aisladas, variando la fuente de carbono (glicerol, sacarosa, y manitol), en el medio de cultivo calculado para requerimientos máximos a pH 7, temperatura 30°C y 200 rpm con el fin de seleccionar de entre las tres cepas, aquella con la que se obtuviera la mayor cantidad de biomasa para la preparación del inoculante, se evaluaron concentración celular, velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación celular y cantidad de exopolisacárido producido. En esta fase experimental también se seleccionó la fuente de carbono a utilizar con cada una de las cepas. El crecimiento celular fue medido mediante absorbancia.

La cantidad de exopolisacárido producido se evaluó mediante su precipitación con diferentes alcoholes los cuales fueron: metanol (MEOH); etanol (ETOH); e isopropanol (ISOP). Las diferentes relaciones de medio de cultivo:alcohol fueron ensayadas y establecidas considerando el volumen suficiente para la precipitación total del exopolisacárido. La tabla 4 muestra las relaciones de volumen medio de cultivo/volumen de alcohol utilizadas para las diferentes cepas, crecidas en diferentes fuentes de carbono. Los análisis estadísticos utilizados en estas pruebas fueron un análisis factorial y una prueba Tukey con una $P < 0.05$. (13)(30)

TABLA 4.- RELACIONES CULTIVO - ALCOHOL UTILIZADOS EN LA PRECIPITACION DE EXOPOLISACARIDOS.

	TEOTIHUACAN			ZACATLAN			LABORATORIO		
	MEOH	ETOH	ISOP	MEOH	ETOH	ISOP	MEOH	ETOH	ISOP
M	1:4	1:2	1:2	1:8	1:4	1:2	1:10	1:4	1:2
S	1:4	1:2	1:2	1:8	1:4	1:2	1:10	1:4	1:2
G	1:4	1:2	1:2	1:8	1:4	1:2	1:10	1:4	1:2

M: Manitol MEOH: Metanol
 S: Sacarosa ETOH: etanol
 G: Glicerol ISOP: isopropanol

2.6 OPTIMIZACION DE LOS FACTORES QUIMICOS DEL MEDIO DE CULTIVO DE *Rhizobium meliloti* PARA OBTENCION DEL INOCULANTE Y EXOPOLISACARIDO

Se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 130 ml de medio calculado manteniendo constantes todos los nutrientes, excepto el nutriente en variación.

El medio de cultivo se inoculó con un 10% respecto al volumen total del medio, según preparación de inóculo en la cinética control. Las concentraciones del nutriente en variación fueron las marcadas como máximo, medio y mínimo en la tabla 1, se mantuvieron constantes el pH de 7.0, temperatura 30 C y 200 rpm. Estas cinéticas se realizaron por duplicado. El crecimiento celular fue medido por absorbancia.

En la optimización de los nutrientes para obtener el inóculo se tomó como base la mayor concentración celular, la mayor velocidad específica de crecimiento y el menor tiempo de duplicación celular.

Para la obtención de exopolisacárido se optimizó en función de la mayor concentración del polímero producido.

La optimización en ambos casos se realizó nutriente por nutriente aplicándose un análisis de varianza para cada uno y prueba tukey [$P < 0.05$] (13)(30) a las diferentes variaciones. Los nutrientes fueron variados de acuerdo al orden mostrado en la tabla 2, excepto la concentración de la fuente de carbono la cual se varió antes que la fuente de nitrógeno (extracto de levadura). Una vez optimizado el nutriente en variación, se tomó en cuenta la concentración óptima para la variación del siguiente nutriente.

2.7 OPTIMIZACION DE LOS FACTORES FISICOS PARA OBTENCION DE INOCULANTE Y PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS

Para la optimización de los factores físicos de crecimiento, se realizaron cinéticas de crecimiento con el medio de cultivo óptimo donde se varió pH, temperatura y agitación. No se varió el flujo de aire introducido, ya que con la compresora con que se contaba no fue posible controlarlo.

Las cinéticas realizadas en esta etapa de experimentación se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 130 ml de medio optimizado tanto para producción de biomasa (inoculante), como para la producción de exopolisacárido, variando en cada cinética diferentes concentraciones de iones hidrógeno (pH), (6.5, 7.0, 7.5). Después se varió la temperatura entre 28, 30 y 32 °C. La optimización de la velocidad de agitación se llevó a cabo con los nutrientes optimizados, temperatura y pH óptimos a nivel de fermentador. Las velocidades variadas fueron 200, 300 y 500 rpm. Los matraces y el fermentador se inocularon con un 10% del volumen total empleado, según preparación de inóculo en la cinética control. El crecimiento celular se midió mediante absorbancia.

La optimización de los factores físicos de crecimiento también se realizó de uno en uno, considerando los mismos criterios y midiendo las mismas variables de respuesta que para la optimización de los nutrientes, así como el análisis de varianza y prueba Tukey [$P < 0.05$]. (13)(30)

En la optimización del medio de cultivo (factores nutricionales y físicos) para obtención de inoculante las cinéticas de crecimiento se realizaron hasta la fase de aceleración negativa, ya que durante la fase logarítmica se obtiene el máximo crecimiento celular. Durante la optimización del medio de cultivo para obtener exopolisacárido el crecimiento del microorganismo se realizó hasta la fase de destrucción acelerada, ya que el *Rhizobium* produce la mayor cantidad de exopolisacárido durante la fase estacionaria.

2.9 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR DE 14 LTS

Una vez optimizado el medio de cultivo en cuanto a los factores físicos y químicos que afectan al crecimiento microbiano y producción de exopolisacáridos, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento y producción a nivel de fermentador de 14 lts con algunos controles automáticos.

El fermentador se utilizó al 60% de su capacidad inoculándose con un 10% de inóculo respecto al volumen total del medio. Terminada la fermentación para ambos casos se procedió a determinar algunos parámetros como: carbohidratos residuales, peso seco del microorganismo, cantidad de exopolisacárido producido y cuantificación de biomasa viva utilizando el conteo de UFC. (Apéndice 5)

2.9 DETERMINACION DEL CRECIMIENTO CELULAR

La cuantificación del crecimiento celular se puede realizar mediante varios métodos, entre ellos se distinguen los que miden el número total de individuos de una población, tantos vivos como muertos, y los que miden solo el número de los organismos viables, en este caso el recuento se realiza sembrado en placa de un medio apropiado, una porción de suspensión celular diluida o de un cultivo contando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) después de un período de incubación. Se sabe que cada una de estas colonias se originan de un solo microorganismo, de modo tal que por el número de colonias que aparezcan, se puede calcular el número de organismos viables que hay en la suspensión o cultivo original. Los recuentos totales se pueden determinar por observación directa contando el número de organismos en una porción, utilizando el portaobjetos. Con frecuencia se utiliza el peso seco de los microorganismos como medida de su número total y se relacionan con las medidas que se obtienen a través del cálculo de crecimiento microbiano por turbidimetría, por medio de una curva patrón. La turbidimetría se basa en el efecto que un compuesto presenta, en un cultivo líquido, el cual es medido por un incremento o decremento de la turbidez asociada con la velocidad de crecimiento o el crecimiento total de los microorganismos. Una cantidad de medio líquido se distribuye en una serie de tubos o matraces, los cuales son inoculados con una pequeña y constante cantidad de un cultivo vigoroso de los microorganismos de prueba, después se incuban a temperatura constante y se van realizando las determinaciones por un período determinado de tiempo. La turbidez se puede determinar visualmente, sin embargo en esas determinaciones se emplea un espectrofotómetro con filtro de difracción a una determinada longitud de onda de luz visible. La longitud de onda se determina por el color del medio, así que en esa longitud de onda el color del medio tendrá pequeño efecto en la medida. Existen también métodos indirectos para la cuantificación del crecimiento celular, esto es mediante la medición de algún compuesto químico de los microorganismos, de un producto metabólico que sea excretado al líquido de cultivo o mediante el consumo de algún nutriente del medio de cultivo. (11)(41)(49).

2.10 DETERMINACION DE CARBOHIDRATO RESIDUAL

La determinación del carbohidrato residual para las fermentaciones de las cepas Teotihuacan y Laboratorio, se evaluó mediante el método colorimétrico Nelson-Somogyi para azúcares reductores con previa hidrólisis de la sacarosa mediante la enzima invertasa; también se utilizó el método colorimétrico fenol - sulfúrico, el cual es aplicable a monosacáridos, disacáridos y polisacáridos. (17)(36). (Apéndice 6)

2.11 CUANTIFICACION DE EXOPOLISACARIDO

La cuantificación de exopolisacárido se realizó mediante su extracción del medio de cultivo, utilizando diferentes alcoholes como agentes precipitantes, con previa separación de las células mediante dilución y centrifugación. El exopolisacárido una vez precipitado se centrifugó a 5,000rpm por 15 minutos, separándose del sobrenadante y secándose a 50°C por 6 horas. Se decidió realizar la precipitación con alcoholes de bajo peso molecular y solubles en agua debido a que eliminan del polisacárido impurezas, tales como pigmentos y sales. (42)(46)

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS

Se aislaron 3 cepas provenientes de nódulos de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) de diferentes zonas: una proviene de Zacatlán Puebla; otra de Teotihuacan estado de México, y la tercera proviene de una semilla inocuada comercialmente. Las plantas presentaban diferentes tipos de nódulos, unos eran grandes y rojos, otros de color blanquecino o verdosos.

3.2 IDENTIFICACION DE LAS CEPAS

A las cepas aisladas se les practicaron las pruebas primarias de identificación, mencionadas con anterioridad, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 5.

TABLA 5.- RESULTADOS DE IDENTIFICACION DE CEPAS DE *Rhizobium meliloti*.

	TEOTIHUACAN	ZACATLAN	LABORATORIO
OBSERV. DE COLONIAS	COHOSAS Y BLANQUECINAS	COHOSAS Y BLANQUECINAS	COHOSAS Y BLANQUECINAS
TINCIÓN GRAM	GRAM -	GRAM -	GRAM -
MOTILIDAD	POSITIVA	POSITIVA	POSITIVA
LECHE TORNASOL	FERMENTACION DE LACTOSA, REACCION ACIDA, SIN GAS	FERMENTACION DE LACTOSA, REACCION ACIDA, SIN GAS	FERMENTACION DE LACTOSA, REACCION ACIDA, SIN GAS

3.3 PRUEBAS DE INFECTIVIDAD O NODULACION DE *Rhizobium meliloti* EN PLANTAS DE ALFALFA.

Las pruebas de infectividad del *Rhizobium meliloti* se realizaron con el fin de determinar si presentaba la capacidad de nodular plantas de alfalfa, al ser aplicado como inoculante, en sus semillas.

El tipo de semilla empleada fué la conocida como Valenciana, la cual es la más comunmente comercializada y sembrada. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

TABLA 6. - RESULTADOS DE INFECTIVIDAD DE CEPAS AISLADAS DE *Rhizobium*.

CARACTERÍSTICAS DE SEMILLA	CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA	NUMERO NODULOS	NUMERO NODULOS EFECTIVOS
Sin inocular	Poco follaje color verdoso	0	0
Inoculada comercialmente	Abundante follaje color verde	15	10
Inoculada cepa Laboratorio	abundante follaje color muy verde	22	18
Inoculada cepa Zacatlán	follaje semiabundante color verde	19	9
Inoculada cepa Teotihuacan	poco follaje color amarillento	13	5

Como se observa la cepa más efectiva fué la Laboratorio. debido a que fué la que presentó mayor número de nódulos efectivos.

3.4 CINETICA CONTROL

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7 y figura 1.

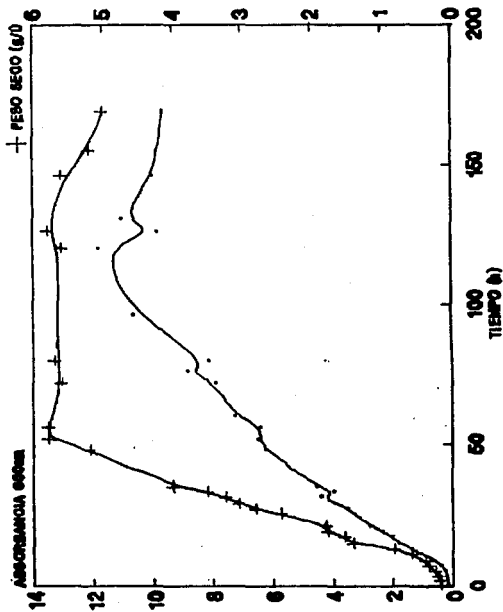
TABLA 7.- DURACION DE LAS FASES DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium meliloti* cepa Laboratorio

Fase de crecimiento	Duración (horas)
Lag	0 a 8
Logarítmica	8 a 52
Estacionaria	52 a 167

En los datos anteriores vemos que la fase logarítmica se encuentra entre las 8 y 52 horas de crecimiento. Se consideró siempre la fase logarítmica tardía para la obtención del inóculo, ya que en ese momento se tiene la máxima producción de células.

Como se observa en la figura 1 el crecimiento medido mediante absorbancia continua aún después de las 52 horas, lo cual fue atribuido a que la producción de exopolisacárido interfiere en la lectura durante la fase estacionaria, sin embargo con ambos métodos se llega al mismo tiempo a la fase de destrucción acelerada.

FIGURA 1
CINETICA CONTROL Rhizobium
meliloti CEPA LABORATORIO



3.5 SELECCION DE LA MEJOR CEPA

Los tiempos de duplicación, así como las velocidades de crecimiento de las diferentes cepas crecidas en diferentes fuentes de carbono se muestran en la tabla 8. En las figuras 2, 3 y 4 se muestran las gráficas de crecimiento.

TABLA 8.- VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPOS DE DUPLICACION DE CINETICAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

	TEOTIHUACAN			ZACATLAN			LABORATORIO		
	M	S	G	M	S	G	M	S	G
μ	0.067	0.066	0.062	0.070	0.069	0.038	0.107	0.092	0.072
td	10.36	10.60	11.09	10.08	10.16	13.68	6.42	7.88	9.48
	a	b	c	d	e	f	g	h	i

*Letras diferentes denotan diferencias significativas.

M: Manitol

μ : Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

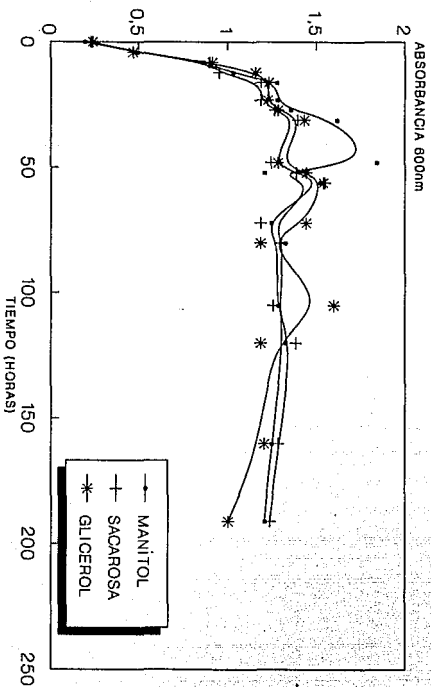
S: Sacarosa

td: Tiempo de duplicación (h).

G: Glicerol

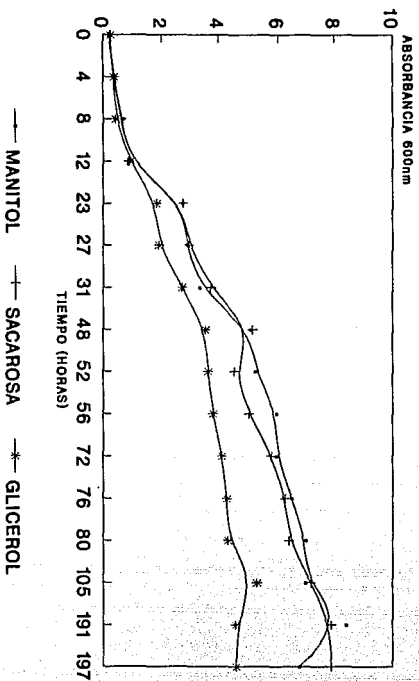
Para la cuantificación del exopolisacárido (g/l) se realizó su separación del medio de cultivo, utilizando alcoholes como agentes precipitantes en diferentes proporciones con respecto al volumen del caldo de cultivo. Cabe hacer mención que esta precipitación llevaba consigo las células del microorganismo. Los resultados obtenidos de estas cinéticas se muestran en la tabla 9.

FIGURA 2
 CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN
 EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO



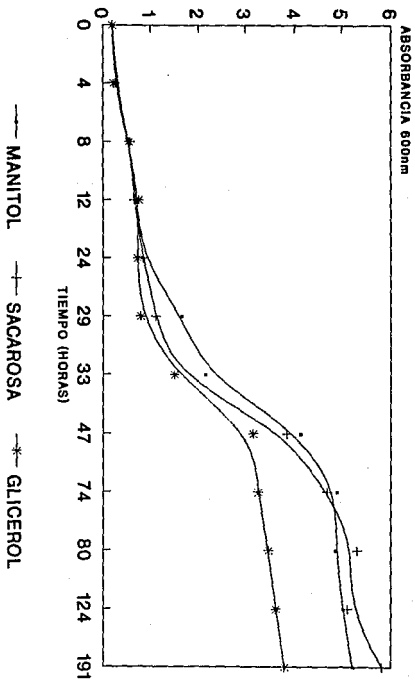
MANITOL m:0.087 id:10.5h-1
 SACAROSA m:0.085 id:10.8h-1
 GLICEROL m:0.082 id:11.0h-1

FIGURA 3
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO
EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO



MANITOL m:0.180h-1 td:6.42h
 SACAROSA m:0.092h-1 td:9.77h
 GLICEROL m:0.072h-1 td:9.48h

FIGURA 4
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA ZACATLAN
EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO



MANITOL m:0.069h⁻¹ id:10.08h
 SACAROSA m:0.069h⁻¹ id:10.16h
 GLICEROL m:0.038h⁻¹ id:13.68h

TABLA 9.- CUANTIFICACION DEL EXOPOLISACARIDO PRODUCIDO (g/l) POR LAS CEPAS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

v/v	TEOTIHUACAN			ZACATLAN			LABORATORIO		
	MEOH	ETOH	ISOP	MEOH	ETOH	ISOP	MEOH	ETOH	ISOP
	1:4	1:2	1:2	1:8	1:4	1:2	1:10	1:4	1:2
M	8.3 a	10.0 b	10.4 c	9.3 d	11.2 e	11.0 f	5.9 g	9.7 g	6.7 g
S	2.7 h	11.2 l	11.4 j	3.0 k	8.5 l	7.0 m	5.8 g	6.4 g	6.5 g
G	9.0 n	9.8 o	7.2 p	#	8.8 l	6.8 m	7.1 g	8.8 g	5.2 g

* letras diferentes denotan diferencia significativa.

M: manitol MEOH: metanol

S: sacarosa ETOH: etanol

G: glicerol ISOP: isopropanol

#: no se alcanzó a precipitar

v/v: relación de alcohol con respecto al caldo de cultivo (ml/ml).

La cepa Laboratorio fue la que se seleccionó para obtención del inoculante, utilizando como fuente de carbono manitol, debido a que presentó la mayor concentración celular y el menor tiempo de duplicación, además los *Rhizobium* crecidos en manitol presentan mayor infectividad provocando la aparición de nódulos fijadores de nitrógeno en las plantas que infectan. (27)

Para producción de exopolisacárido la cepa seleccionada fue la Teotihuacan creciendo en sacarosa como fuente de carbono, ya que es la cepa que mayor cantidad de exopolisacárido proporciona; además dicho polímero presenta características de gel en medio sólido y en medio líquido, propiciando con ello un alto grado de espesamiento al mismo. Esto nos hace inferir sobre la funcionalidad que puede tener dicho polímero, que es la de espesamiento y estabilizante de suspensiones.

En términos generales los mejores agentes precipitantes fueron etanol e isopropanol. De ambos, se seleccionó el isopropanol debido a que con éste se obtiene mayor cantidad de exopolisacárido, requiriéndose menor relación de volumen; además la FDA permite la utilización de isopropanol como agente precipitante de polisacáridos microbianos, para la utilización en alimentos.

Dado que el ensayo de precipitación de exopolisacárido reportado en la tabla 9, se llevo a cabo con células, se procedió a realizar ensayos de eliminación celular por centrifugación. Para ello se tomó como referencia tiempo y velocidad reportados, (18)(45) realizando pruebas de separación celular, hasta obtener la pastilla celular completa y finalmente la separación del exopolisacárido de las células. En la tabla 10 se presentan las velocidades que se variaron para tal propósito.

TABLA 10.- VARIACION DE VELOCIDADES DE CENTRIFUGACION PARA LA SEPARACION TOTAL CELULAR.

Velocidad(rpm)	Tiempo(min)	Apariencia del caldo
5,000	15	sin separación celular
12,000	10	separación celular parcial
17,000	20	separación celular parcial
17,000	40	separación celular parcial
17,000	60	separación total celular
17,000	80	separación total celular

Al obtener la separación total de las células a 17,000 rpm por 60 minutos, se decidió facilitar esta operación diluyendo la muestra del caldo de cultivo con agua en relación 1:1 v/v. Con esto se logró reducir la velocidad a 15,000 rpm por 40 minutos, con separación total de las células.

La separación celular se realizó por este método con el fin de no modificar la estructura del exopolisacárido o de contaminarlo con células o sales.

Una vez reaalizado el experimento de eliminación celular se procedió a precipitar el exopolisacárido producido por la cepa Teotihuacan crecida en sacarosa como fuente de carbono, obteniendo 11.39g/l.

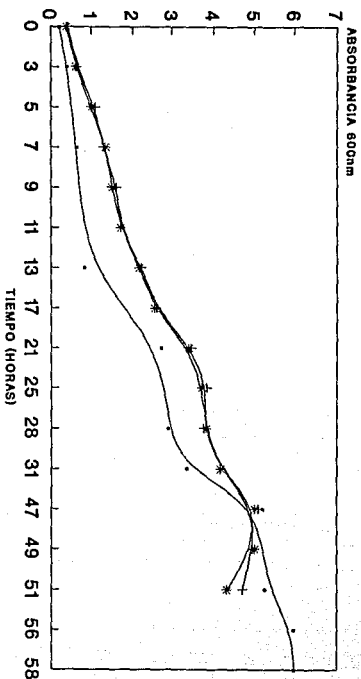
Las precipitaciones posteriores (para la optimización del medio de cultivo)se realizaron con previa eliminación celular, de modo tal que no influyera en la cuantificación del exopolisacárido.

3.6 OPTIMIZACION DE LOS FACTORES QUIMICOS Y FISICOS DEL MEDIO DE CULTIVO DE *Rhizobium meliloti* PARA PRODUCCION DE BIOMASA (INOCULANTE) Y PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDO.

En la optimización del medio de cultivo para la obtención del inoculante se tomó como base el tiempo de duplicación, así como el análisis de varianza y prueba Tukey ($P < 0.05$) realizados para cada una de las variaciones de los nutrientes. Cuando no se encontró diferencia significativa se tomó como óptima la concentración menor del nutriente en variación, ya que al considerar una concentración menor se bajan los costos para producir el inoculante, también es preferible tener una menor cantidad de solutos ya que se tendrá menor presión osmótica y con ello se evita la plasmólisis de las células. (42) Estudios realizados por Tyler (47) han demostrado que la producción del $\beta(1-2)$ glucan se incrementa, al tener en el medio de cultivo bajas concentraciones de sales; este exopolisacárido tiene un papel importante en el ingreso del *Rhizobium meliloti* en la raíz de alfalfa y en la formación de nódulos. (32) Por el contrario al existir diferencia significativa se estableció como óptima la concentración que proporcionó el menor tiempo de duplicación.

Los resultados cinéticos para la obtención del inoculante se presentan en la tabla 11, 12 y figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

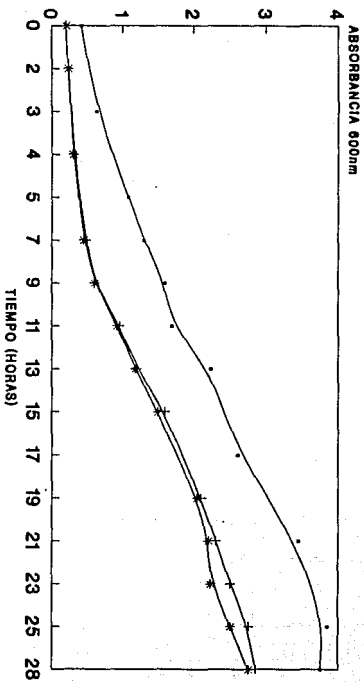
FIGURA 5
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO
VARIACION DE K2HPO4



—•— 2.542g/l +— 2.108g/l *— 1.800g/l

2.542g/l m:0.107h⁻¹ td:6.42h
 2.108g/l m:0.141h⁻¹ td:4.87h
 1.800g/l m:0.108h⁻¹ td:6.40h

FIGURA 6
 CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO
 VARIACION DE $MgSO_4$



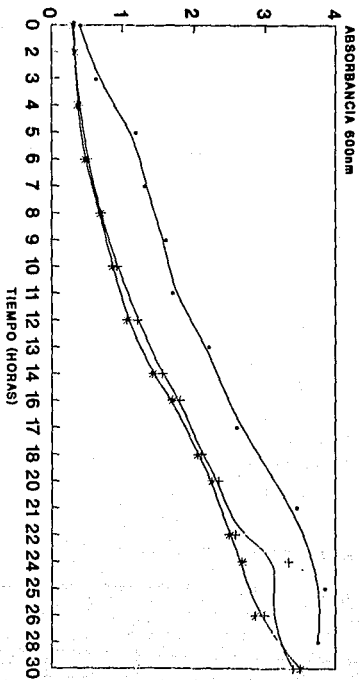
—*— 1.153g/l

—+— 0.691g/l

—x— 0.152g/l

1.153g/l m:0.14h-1 td:4.87h
 0.691g/l m:0.114h-1 td:6.07h
 0.152g/l m:0.109h-1 td:6.32h

FIGURA 7
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO
VARIACION DE NACI



—•— 0.381g/l

—+— 0.305g/l

—*— 0.190g/l

0.381g/l m.O. 14.1h-1 t.c. 4.87h
 0.305g/l m.O. 14.0h-1 t.c. 4.91h
 0.190g/l m.O. 12.5h-1 t.c. 3.58h

FIGURA 8
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO
VARIACION DE FECIS

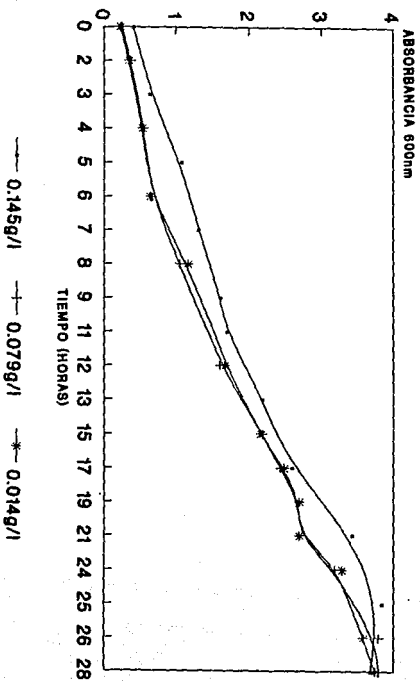


FIGURA 9
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO
VARIACION DE MANITOL

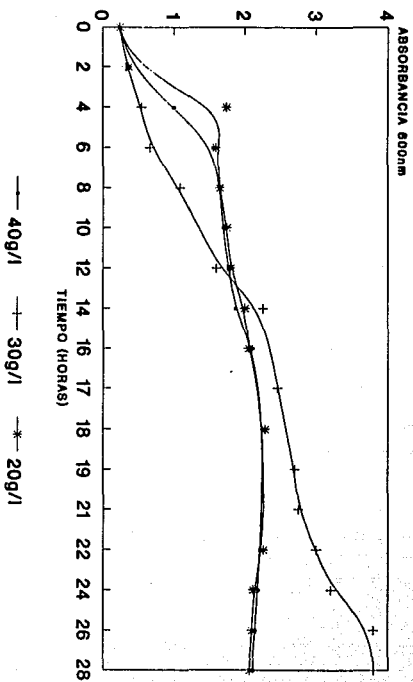
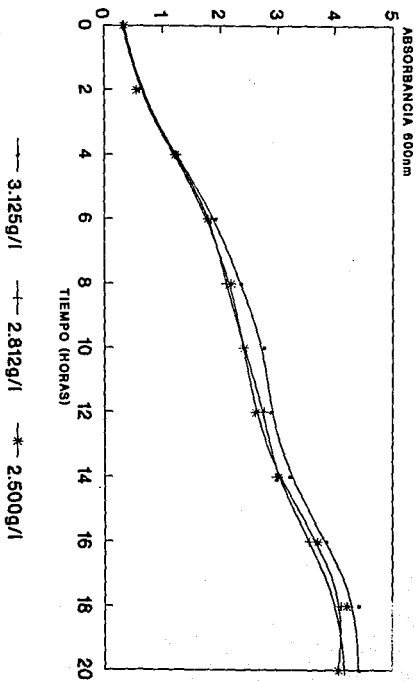


FIGURA 10
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO
VARIACION DE EXTRACTO DE LEVADURA



3.125g/l m:0.214h⁻¹ td:3.22h
2.812g/l m:0.197h⁻¹ td:3.51h
2.500g/l m:0.209h⁻¹ td:3.30h

FIGURA 11
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO
VARIACION DE PH

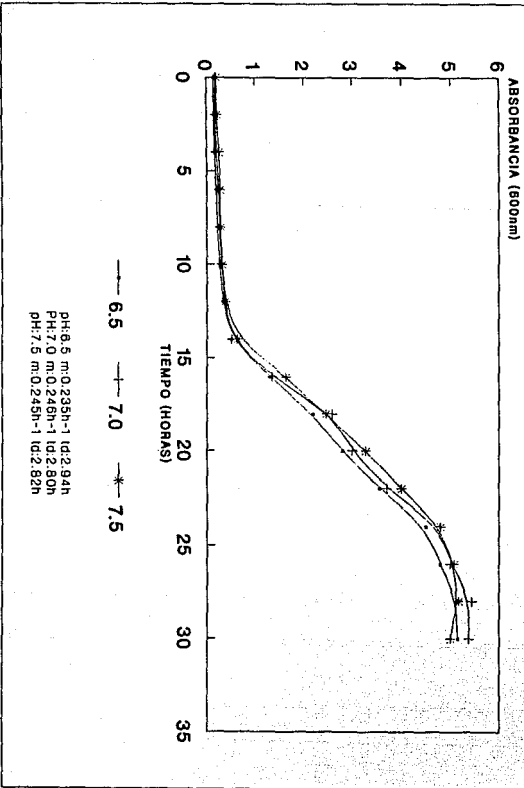
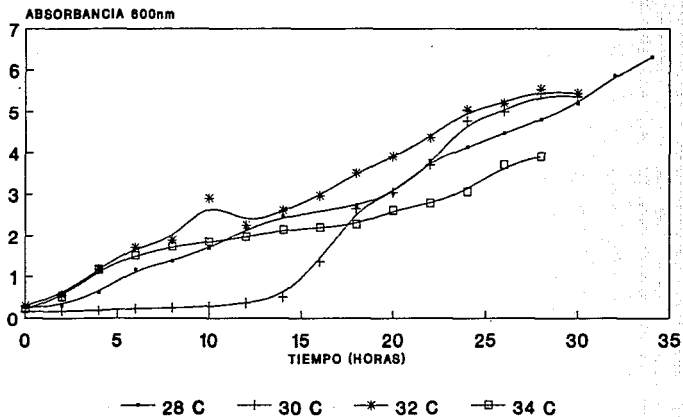
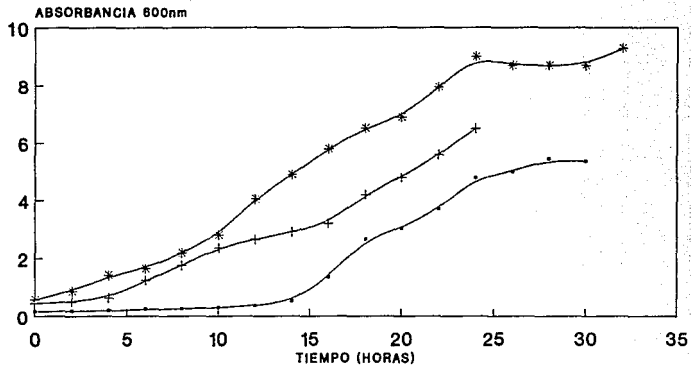


FIGURA 12
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO
VARIACION DE TEMPERATURA



28C m:0.178h⁻¹ td:3.93h
 30C m:0.244h⁻¹ td:2.80h
 32C m:0.185h⁻¹ td:3.72h

FIGURA 13
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA LABORATORIO
VARIACION DE LA VELOCIDAD DE AGITACION



—•— 200rpm —+— 300rpm —*— 500rpm

200rpm m:0.246h-1 td:2.80h
300rpm m:0.263h-1 td:2.63h
500rpm m:0.378h-1 td:1.83h

TABLA 11.- VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION AL VARIAR LA CONCENTRACION DE LOS NUTRIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA OBTENCION DE INOCULANTE.

K ₂ HPO ₄	2.542g/l	2.108g/l	1.800g/l
$\mu(h^{-1})$	0.107	0.141	0.108
td(h)	6.42	4.87	6.40
	a	b	a
MgSO ₄	1.153g/l	0.691g/l	0.152g/l
$\mu(h^{-1})$	0.141	0.114	0.109
td(h)	4.87	6.07	6.32
	a	b	c
NaCl	0.381g/l	0.305g/l	0.190g/l
$\mu(h^{-1})$	0.141	0.140	0.123
td(h)	4.87	4.91	5.58
	a	a	b
FeCl ₃	0.145g/l	0.079g/l	0.014g/l
$\mu(h^{-1})$	0.141	0.146	0.142
td(h)	4.87	4.72	4.86
	a	a	a
MANITOL	40g/l	30g/l	20g/l
$\mu(h^{-1})$	0.192	0.146	0.108
td(h)	6.34	4.72	6.62
	a	b	a
EXT. LEV.	3.125g/l	2.812g/l	2.500g/l
$\mu(h^{-1})$	0.214	0.197	0.209
td(h)	3.22	3.51	3.30
	a	a	a

*letras diferentes denotan diferencia significativa.

TABLA 12.- VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y TIEMPOS DE DUPLICACION AL VARIAR LOS FACTORES FISICOS DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA OBTENCION DE INOCULANTE.

pH	6.5	7.0	7.5	
$\mu(h^{-1})$	0.235	0.246	0.245	
td(h)	2.94 a	2.80 b	2.82 b	
T^0	28	30	32	34
$\mu(h^{-1})$	0.178	0.244	0.185	0.107
td(h)	3.93 a	2.80 b	3.72 a	6.42 c
rpm	200	300	500	
$\mu(h^{-1})$	0.246	0.263	0.378	
td(h)	2.80 a	2.63 a	1.83 b	

* letras diferentes denotan diferencia significativa.

Al existir diferencia significativa entre los tiempos de duplicación al variar la concentración del nutriente K_2HPO_4 , se decidió trabajar con la concentración de 2.108g/l ya que es con la que se presenta el menor tiempo de duplicación.

Para la variación de $MgSO_4$, al existir diferencia significativa entre las concentraciones y teniendo que la concentración de 1.151g/l es la que presentó el menor tiempo de duplicación, se decidió tener como óptima esa concentración.

Al variar las concentraciones de NaCl se observa que no existe diferencia significativa entre las concentraciones 0.381g/l y 0.305g/l, pero si con respecto a la concentración de 0.190g/l, por lo que se tomó la concentración de 0.305g/l como la óptima.

Para las variaciones de la concentración de $FeCl_3$ no existió diferencia significativa, por lo cual se tomó la concentración menor.

En la variación de extracto de levadura, tampoco existió diferencia significativa por lo que se tomó la concentración menor, ya que al adicionar gran cantidad de nitrógeno al medio de cultivo que se destine para inoculante, se producirá menor número de nódulos fijadores de nitrógeno, debido a que la presencia de nitrógeno en gran cantidad causa inhibición de la enzima nitrogenasa. (7)

En la variación de la concentración de manitol existe diferencia significativa únicamente con la concentración de 30g/l, dando con esta concentración el menor tiempo de duplicación, por lo cual se tomó esa concentración como la óptima.

Como se observa existe diferencia significativa en los tiempos de duplicación al variar el pH del medio de cultivo, pero aún así la concentración celular es similar por lo que este inoculante se podría utilizar tanto para tierras semiácidas o semibásicas. El *Rhizobium meliloti* se caracteriza por crecer en amplio rango de pH, siendo esta una característica que facilita su aislamiento y purificación. El pH seleccionado fue de 7 debido a que con el se presentó el menor tiempo de duplicación y la mayor velocidad específica de crecimiento.

En cuanto a la temperatura se observó que existe diferencia significativa, por lo que se seleccionó la de 30°C. Debido a que la concentración celular es similar para estas temperaturas, el inoculante se podría utilizar en regiones templadas y semicálidas.

El menor tiempo de duplicación que se tiene es con la velocidad de agitación de 500 rpm, debido probablemente a que se tiene mayor contacto de las bacterias con los nutrientes y por la mayor transferencia de oxígeno.

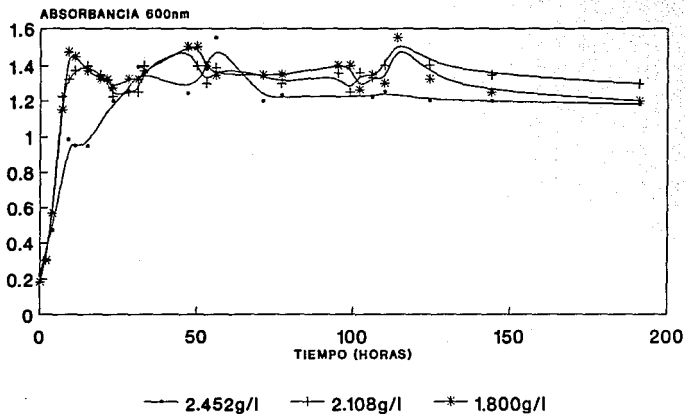
Según reportes de la literatura consultada (8) se tiene que el tiempo de generación de *Rhizobium meliloti*, en condiciones óptimas es de 1.8 horas, por lo que comparándolo con el tiempo de duplicación que obtuvimos al optimizar el medio de cultivo y las condiciones físicas, estos son prácticamente los mismos.

Al optimizar el medio de cultivo se obtuvo una mejora en el tiempo de duplicación de 4.6 horas, ya que el tiempo inicial era de 6.42 horas y el tiempo final de 1.83 horas.

En el caso de la optimización del medio de cultivo para obtención de exopolisacárido, debido a que casi siempre existió diferencia significativa en los gramos de exopolisacárido por litro de cultivo obtenidos, se decidió trabajar con la concentración del nutriente que proporcionaba la mayor cantidad de dicho polisacárido, además esa concentración también proporcionaba el menor tiempo de duplicación.

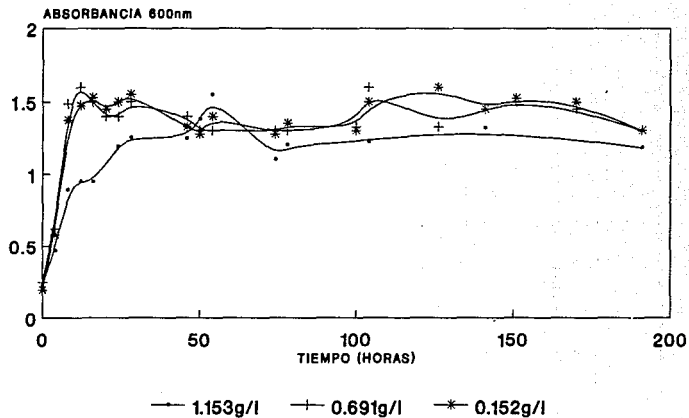
Los resultados de las cinéticas para obtención de exopolisacárido se presentan en la tabla 13, 14 y figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23.

FIGURA 14
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN
VARIACION DE K₂HPO₄



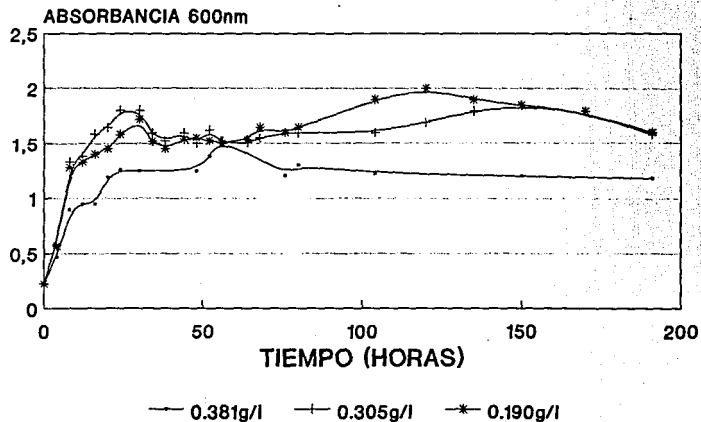
2.452g/l m:0.166h-1 td:4.15h
2.108g/l m:0.129h-1 td:5.32h
1.800g/l m:0.150h-1 td:4.51h

FIGURA 15
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN
VARIACION DE $MgSO_4$



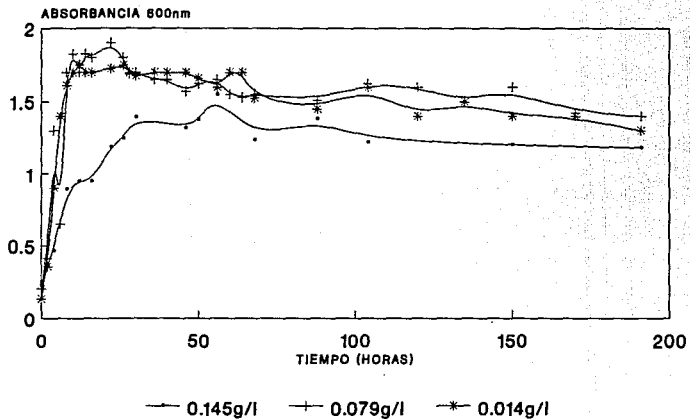
1.153g/l m:0.168h⁻¹ td:4.14h
0.691g/l m:0.133h⁻¹ td:5.20h
0.152g/l m:0.090h⁻¹ td:7.66h

FIGURA 16
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN
VARIACION DE NaCl



0.381g/l m:0.185h-1 td:4.18h
0.305g/l m:0.053h-1 td:13.14h
0.190g/l m:0.035h-1 td:19.83h

FIGURA 17
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN
VARIACION DE FeCl_3

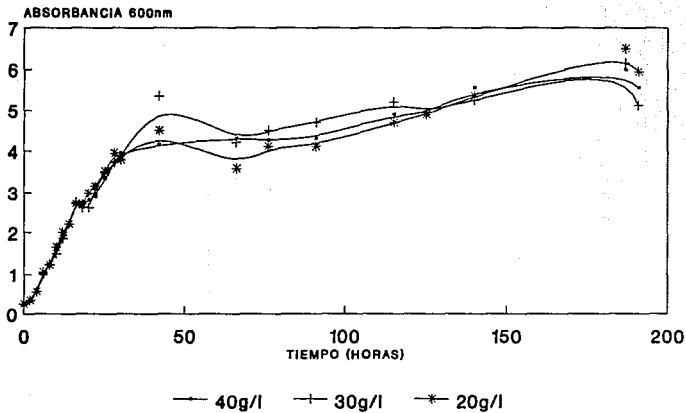


0.145g/l m:0.166h-1 td:4.15h

0.079g/l m:0.166h-1 td:4.16h

0.014g/l m:0.104h-1 td:6.63h

FIGURA 18
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN
VARIACION DE SACAROSA



40g/l m:0.121h-1 td:5.34h
30g/l m:0.166h-1 td:4.15h
20g/l m:0.137h-1 td:5.01h

FIGURA 19
SACAROSA RESIDUAL DEL MEDIO DE CULTIVO
CEPA TEOTIHUACAN

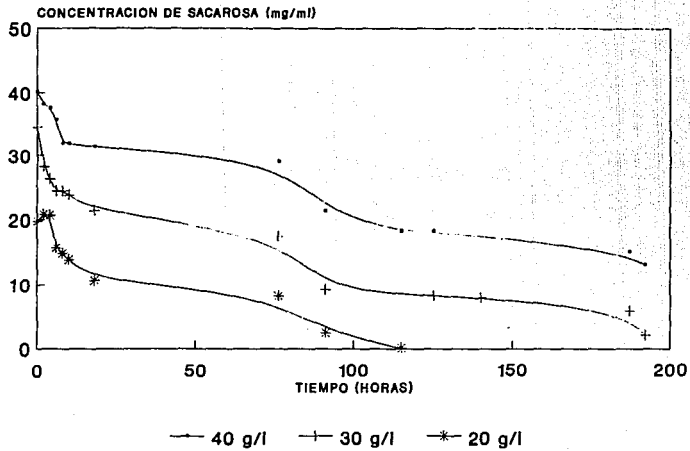
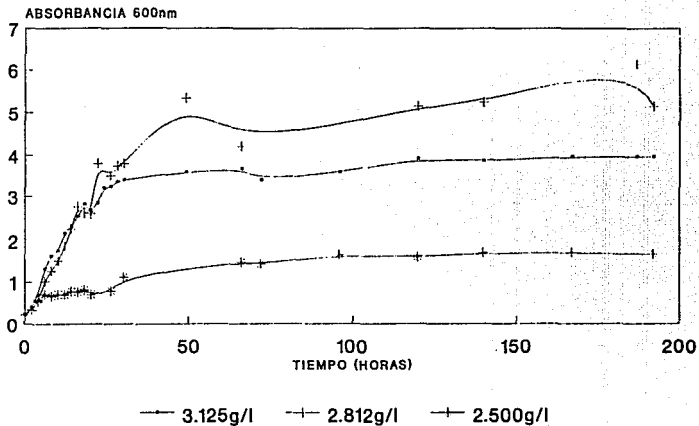
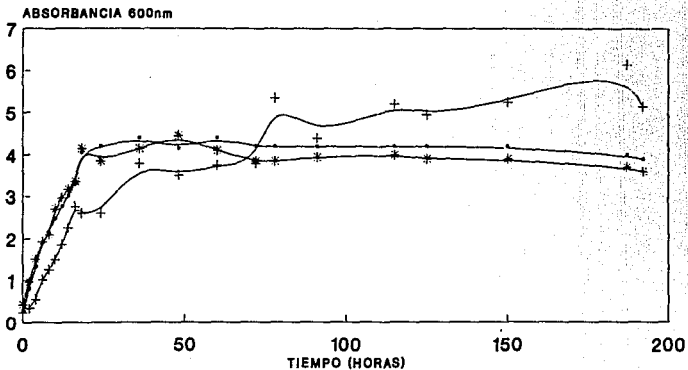


FIGURA 20
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN
VARIACION DE EXTRACTO DE LEVADURA



3.125g/l m:0.146h-1 td:4.70h
2.812g/l m:0.106h-1 td:4.41h
2.500g/l m:0.087h-1 td:7.86h

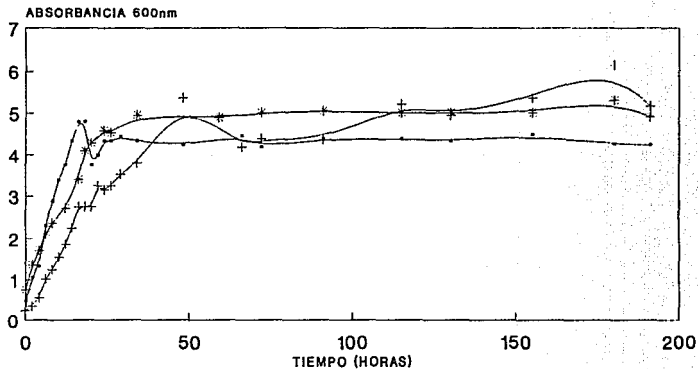
FIGURA 21
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN
VARIACION DE pH



—+— 6.5 —*— 7.0 —x— 7.5

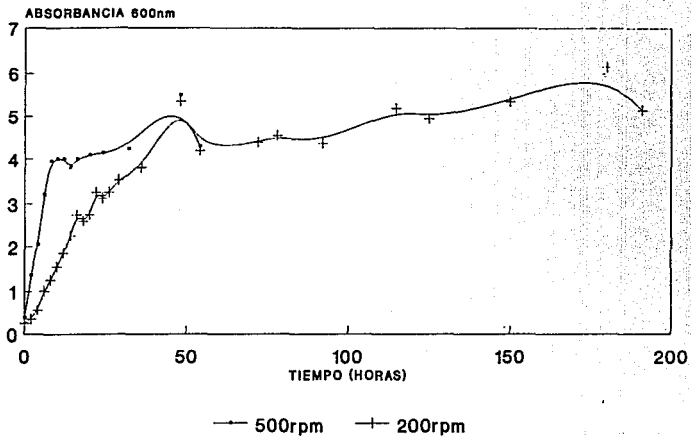
6.5 m:0.165h-1 td 4.21h
 7.0 m:0.168h-1 td 4.15h
 7.5 m:0.179h-1 td 3.84h

FIGURA 22
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN
VARIACION DE TEMPERATURA



28C m:0.275h-1 td:2.51h
30C m:0.160h-1 td:4.15h
32C m:0.147h-1 td:4.69h

FIGURA 23
CINETICA DE CRECIMIENTO CEPA TEOTIHUACAN
VARIACION DE VELOCIDAD DE AGITACION



500rpm m:0.386h-1 ld:1.79h
200rpm m:0.168h-1 ld:4.15h

TABLA 13. - VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO, TIEMPOS DE DUPLICACION Y CUANTIFICACION DE EXOPOLISACARIDO AL VARIAR LA CONCENTRACION DE LOS NUTRIENTES DEL MEDIO DE CULTIVO.

K ₂ HPO ₄	2.542g/l	2.108g/l	1.800g/l
μ (h ⁻¹)	0.166	0.129	0.150
td(h)	4.15	5.32	4.51
exopol(g/l)	11.39 ^a	6.64 ^b	6.83 ^c
MgSO ₄	1.153g/l	0.691g/l	0.152g/l
μ (h ⁻¹)	0.166	0.133	0.090
td(h)	4.14 ^a	5.20 ^b	7.66 ^c
exopol(g/l)	11.40 ^a	7.98 ^b	7.47 ^c
NaCl	0.381g/l	0.305g/l	0.190g/l
μ (h ⁻¹)	0.165	0.053	0.035
td(h)	4.16 ^a	13.14 ^b	19.63 ^c
exopol(g/l)	11.39 ^a	4.35 ^b	5.54 ^b
FeCl ₃	0.145g/l	0.079g/l	0.014g/l
μ (h ⁻¹)	0.166	0.166	0.104
td(h)	4.15 ^a	4.16 ^a	6.63 ^b
exopol(g/l)	11.40 ^a	4.22 ^b	5.08 ^c
SACAROSA	40g/l	30g/l	20g/l
μ (h ⁻¹)	0.121	0.166	0.137
td(h)	5.34 ^a	4.15 ^b	5.01 ^c
exopol(g/l)	12.95 ^a	11.39 ^b	7.70 ^c
EXT. LEV	3.125g/l	2.812g/l	2.50g/l
μ (h ⁻¹)	0.146	0.106	0.087
td(h)	4.70 ^a	4.41 ^b	7.86 ^c
exopol(g/l)	11.39 ^a	11.46 ^a	7.45 ^b

* letras diferentes denotan diferencia significativa

TABLA 14.- VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO, TIEMPOS DE DUPLICACION Y CUANTIFICACION DE EXOPOLISACARIDO OBTENIDO AL VARIAR LOS FACTORES FISICOS DE CRECIMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO.

pH	6.5	7.0	7.5
$\mu(h^{-1})$	0.164	0.179	0.166
td(h)	4.21	3.81	4.15
exopol(g/l)	a 5.9	a 11.96	a 9.88
	a	b	c
T^0	28	30	32
$\mu(hr^{-1})$	0.274	0.166	0.147
td(h)	2.51	4.15	4.69
exopl(g/l)	a 6.45	b 11.46	c 7.19
	a	b	c
rpm	500	200	
$\mu(h^{-1})$	0.386	0.166	
td(h)	1.79	4.15	
exopl(g/l)	a 6.44	b 11.85	
	a	b	

* letras diferentes denotan diferencia significativa.

Como se observa en la mayoría de los casos cuando se presenta un tiempo de duplicación menor, se produce mayor cantidad de exopolisacárido. En el caso de NaCl se trata de un sustrato importante para el crecimiento celular, ya que al variar las concentraciones de 0.305g/l y 0.190g/l se presentan tiempos de duplicación 3 y 5 veces mayor respectivamente que con la concentración de 0.381g/l; pero no lo es para la producción de exopolisacárido, que como se observa en las concentraciones de 0.305g/l y 0.190g/l existe diferencia solo de 1.2g/l. El FeCl₃ es importante para la producción de exopolisacárido, en concentraciones diferentes (0.145g/l y 0.079g/l) de este sustrato se presentan tiempos de duplicación similares, pero no se produce la misma cantidad de exopolisacárido, teniéndose una diferencia de 7.1g/l.

En la variación de sacarosa existió diferencia significativa tanto para los tiempos de duplicación como para la cantidad de exopolisacárido obtenido, por lo que siguiendo el mismo criterio, se debió haber tomado la concentración de 40 g/l, sin embargo al observar que con 40 g/l sacarosa se obtiene 1.5 g/l de exopolisacárido más que con 30g/l, no se justifica económicamente el empleo de 10 g/l más de sustrato. Teniéndose además que el menor tiempo de duplicación corresponde a la concentración de 30 g/l. En la figura 20 se presenta el consumo de carbohidrato determinado por el método Nelson-Somogyi (36) con hidrólisis enzimática.

La mayor cantidad de exopolisacárido producido se obtiene con pH de 7.0, aún cuando con pH 7.5 se obtiene buena cantidad, existe diferencia significativa por lo que se decidió trabajar con pH de 7.0.

Como se observa en la tabla 12, el microorganismo crece mejor a temperatura de 28°C, pero a esa temperatura produce poca cantidad de exopolisacárido (casi la mitad en comparación a 30°C).

Para la variación de la velocidad de agitación se observa que existe diferencia significativa tanto en el tiempo de duplicación como en la cantidad de exopolisacárido producido. En este caso los resultados obtenidos con 500 rpm muestran que en 54 horas se obtiene 6.46 g/l de exopolisacárido. Comparando con la velocidad de agitación de 200 rpm donde en 192 horas se obtiene 11.90 g/l de exopolisacárido, podemos ver que se realizarían 3.5 cinéticas aproximadamente a 500 rpm para un lapso de tiempo similar (54 horas x 3.5 = 189 horas) y se obtendría mayor cantidad de exopolisacárido (6.46 x 3.5 = 22.54 g/l). La razón por la que no se continuó más tiempo la fermentación a 500 rpm, fué debido a que la concentración de sacarosa se agotó y a que la consistencia del medio de cultivo se incrementó lo cual provocó fallas mecánicas en el fermentador.

El medio de cultivo optimizado para obtención del inoculante se muestra en la tabla 15. El medio de cultivo optimizado para obtención de exopolisacárido se muestra en la tabla 16.

TABLA 15.- MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO PARA LA OBTENCION DE INOCULANTE UTILIZANDO *Rhizobium meliloti* CEPA LABORATORIO.

SUSTATO	g/l
K ₂ HPO ₄	2.108
MgSO ₄	1.153
NaCl	0.381
FeCl ₃	0.014
MANITOL	30
EXTRACTO DE LEVADURA	2.50
TEMPERATURA (°C)	30
pH	7.0
AGITACION (rpm)	500

TABLA 16.- MEDIO DE CULTIVO OPTIMIZADO PARA LA OBTENCION DE EXOPOLISACARIDO UTILIZANDO *Rhizobium meliloti* CEPA TEOTIHUACAN.

SUSTRATO	g/l
K ₂ HPO ₄	2.542
MgSO ₄	1.153
NaCl	0.381
FeCl ₃	0.145
SACAROSA	30
EXTRACTO DE LEVADURA	2.812
TEMPERATURA (°C)	30
pH	7
AGITACION (rpm)	500

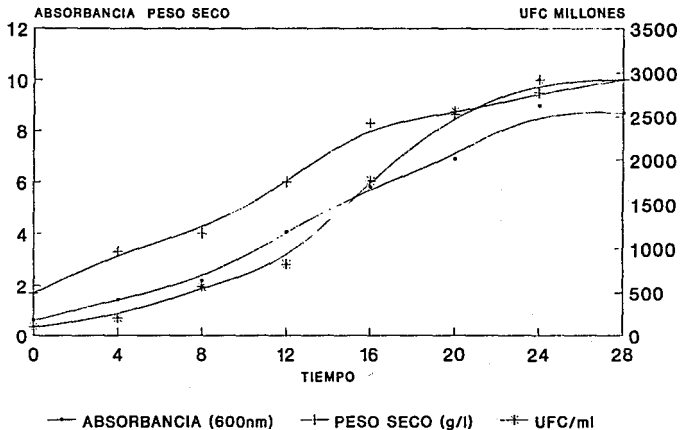
3.7 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR DE 14 Lt.

Una vez optimizados los factores químicos y los factores físicos se realizaron cinéticas de crecimiento tanto para la obtención de inoculante como para la obtención de exopolisacárido a nivel fermentador. Para la cepa laboratorio se determinó peso seco y unidades formadoras de colonia (UFC) presentándose los resultados en la figura 24. La concentración celular obtenida fué de 2.92×10^9 UFC/ml. Tomando en cuenta que se considera como buen inoculante aquel que presenta como mínimo 2.1×10^9 UFC/ml (15), se tiene que el inoculante obtenido sobrepasa esa concentración, pudiéndolo considerar como un buen inoculante.

Para esta cepa fué difícil evaluar consumo de carbohidrato. Se trató de evaluar utilizando la técnica de fenol-sulfúrico (apéndice 6), pero como esta técnica determina todo tipo de azúcares, se presentaba un aumento del contenido de carbohidrato, lo cual fué atribuido a que se produce exopolisacárido durante la fase logarítmica aunque en menor cantidad que en la fase estacionaria. También se probó otro método el cual consistió en extraer el exopolisacárido con alcohol isopropílico, de la misma forma que se realizó para cuantificarlo, evaluando al líquido sobrenadante la concentración de manitol por el método fenol-sulfúrico, presentándose el mismo comportamiento (aumento) que sin la extracción del exopolisacárido lo que se debió a que con esta técnica también es posible la determinación de alcoholes. El método Nelson - Somogyi no fué aplicable ya que cuantifica azúcares reductores y el manitol es un azúcar reducido a alcohol por lo que no presenta el grupo aldehído, el cual es el que se reduce a grupo acetona que es en lo que se basa esta técnica. Para la cepa Laboratorio al no tener los datos de consumo de carbohidrato, no fué posible evaluar el rendimiento, pero sí se toma como base que se trata de bacterias de la misma especie y para poder hacer comparaciones entre las cepas estudiadas, se tomó el mismo comportamiento de consumo de carbohidrato de la cepa Teotihuacan dando rendimiento celular de 0.32 y productividad celular de 0.357g/lh.

Para la cepa Teotihuacan se evaluó peso seco, unidades formadoras de colonias, carbohidrato residual, producción de exopolisacárido y variación de pH. Los resultados se muestran en las figuras 25, 26 y 27.

FIGURA 24
CINETICA DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR
CEPA LABORATORIO MEDIO OPTIMO



ABSORBANCIA $m:0.378h^{-1}$ $td:1.83h$
 PESO SECO $m:0.342h^{-1}$ $td:2.02h$

FIGURA 25
CINETICA DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR
CEPA TEOTIHUACAN

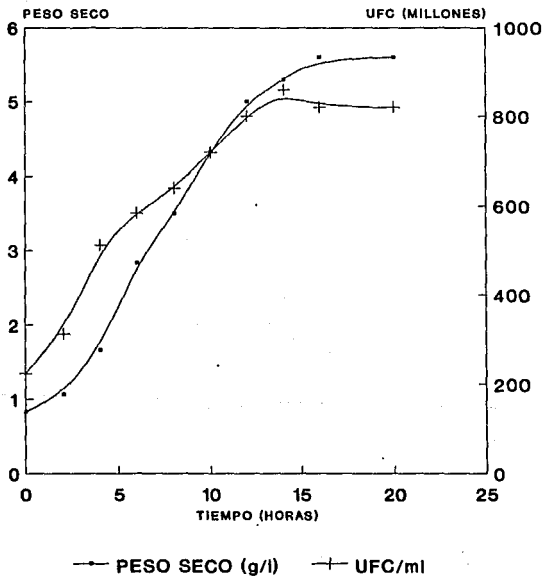


FIGURA 26
CINETICA DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR
CEPA TEOTIHUACAN

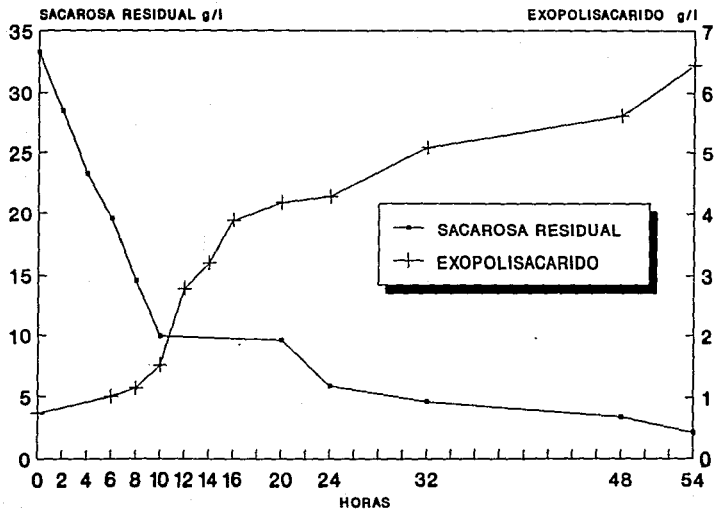
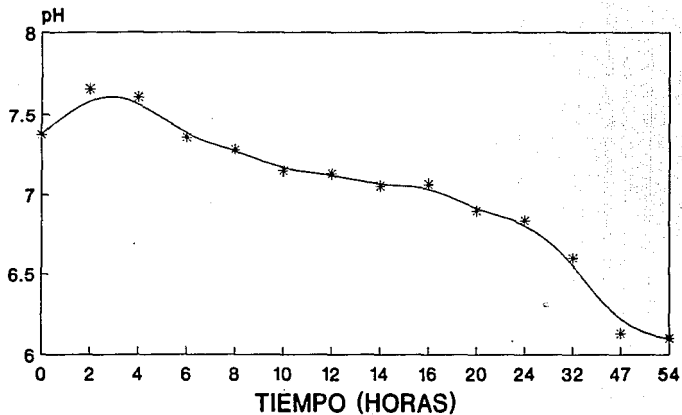


FIGURA 27
CINETICA DE CRECIMIENTO EN FERMENTADOR
CEPA TEOTIHUACAN



Para ambas cepas se comparó la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (td) resultantes al medir el crecimiento microbiano por peso seco y por absorbancia, observándose que son similares ya que en ambos métodos se miden células totales (vivas y muertas).

TABLA 17. VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION DE LAS CEPAS LABORATORIO Y TEOTIHUACAN AL MEDIR EL CRECIMIENTO CELULAR MEDIANTE ABSORBANCIA Y PESO SECO.

	LABORATORIO	TEOTIHUACAN
$\mu(h^{-1})$	0.378	0.386
ABSORBANCIA td(h)	1.83	1.79
$\mu(h^{-1})$	0.342	0.364
PESO SECO td(h)	2.02	1.89

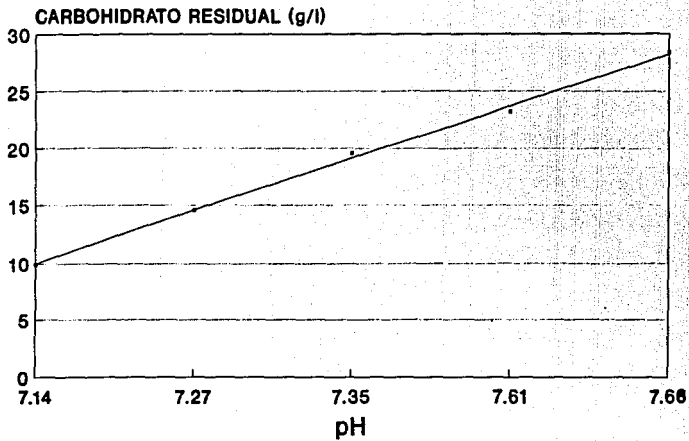
No fué posible controlar la variación del pH del medio de cultivo a lo largo de la cinética de crecimiento debido a fallas en el electrodo del fermentador, por lo que se llevó a cabo la medición del pH en un potenciómetro digital, observándose una disminución similar a la curva de carbohidrato residual, dicho comportamiento es natural en esta bacteria dado que la bibliografía reporta que el *Rhizobium meliloti* produce una reacción ácida durante su crecimiento en medio de cultivo que contenga sales minerales y cualquier carbohidrato. (31)(48)

Se relacionaron pH y sacarosa residual como se muestra en la figura 28, la utilidad es que con esta gráfica y midiendo el pH del medio de cultivo, para la cepa Teotihuacan podremos conocer la concentración de sacarosa residual sin tener la necesidad de realizar la técnica de cuantificación del carbohidrato.

La evaluación de carbohidrato consumido, se realizó mediante la técnica colorimétrica de Nelson-Somogyi. Considerando que para esta cepa la fuente de carbono fué sacarosa y que este carbohidrato tampoco es reductor, se realizó una hidrólisis enzimática previa a la determinación de la concentración del carbohidrato para convertir la sacarosa en glucosa y fructosa, los cuales si son carbohidratos reductores. Las condiciones de hidrólisis fueron las siguientes: concentración de la enzima 1%, temperatura 50°C, tiempo 15 minutos. (Según especificaciones del proveedor).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

FIGURA 28
CORRELACION pH-CARBOHIDRATO
CEPA TEOTIHUACAN



r: 0.989
m: -31.61
b: 247.6

Se realizó otra prueba la cual consistió en aplicar la técnica Nelson-Somogy con previa hidrólisis enzimática al polisacárido que produce esta cepa, con el fin de cerciorarse de que la enzima no lo hidroliza y con ello cuantificar el exopolisacárido producido como sacarosa residual, lo que daría como resultado aumento en el contenido del carbohidrato determinado. El resultado que se obtuvo es que el polisacárido no se hidroliza.

Para la cepa Teotihuacan con los datos obtenidos se tuvo como resultado los siguientes rendimientos:

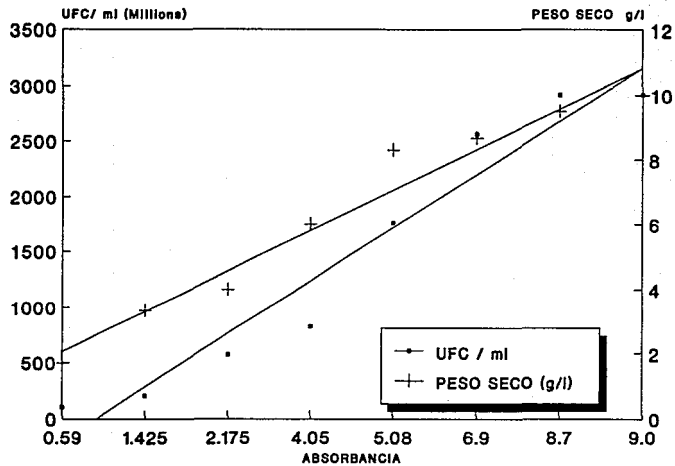
Rendimiento celular	0.224g/l
Rendimiento de polisacárido obtenido	0.206g/l
Suma de los rendimientos anteriores	0.430g/l

Como se observa los rendimientos de células y de producción de exopolisacárido son similares, y al ser similar la suma de rendimientos al rendimiento teórico, es lo que hace pensar que esta bacteria emplea un 52% del sustrato consumido para producción celular, el 48 % para producción de exopolisacárido y el resto lo emplea para su metabolismo (producción de CO₂), con una productividad celular y de exopolisacárido de 0.165g/l/h y 0.152g/l/h respectivamente.

Analizando los rendimientos celulares, se tiene que la cepa Teotihuacan es la que presenta el menor rendimiento teniendo ésta un tiempo de duplicación similar al de la cepa Laboratorio; por lo que se confirma que la cepa Laboratorio es mejor productora de biomasa.

Se realizaron correlaciones entre absorbancia y peso seco o UFC (como se observa en las figuras 29 y 30) para cada una de las cepas estudiadas con el fin de tener mediciones de forma indirecta del peso seco microbiano o de UFC sin necesidad de realizar estos métodos con el respectivo costo y empleo de tiempo, midiendo el crecimiento únicamente por absorbancia e introduciendo ese dato a la gráfica para tener la concentración celular en el momento requerido. Cabe hacer mención que las gráficas correlacionadas son útiles únicamente para obtención de datos en la fase logarítmica y únicamente válidas para los microorganismos con las que se realizaron, crecidos en el medio de cultivo optimizado. Las mejores correlaciones se obtuvieron con absorbancia y peso seco lo cual es atribuido principalmente a que en ambos se mide células vivas y muertas.

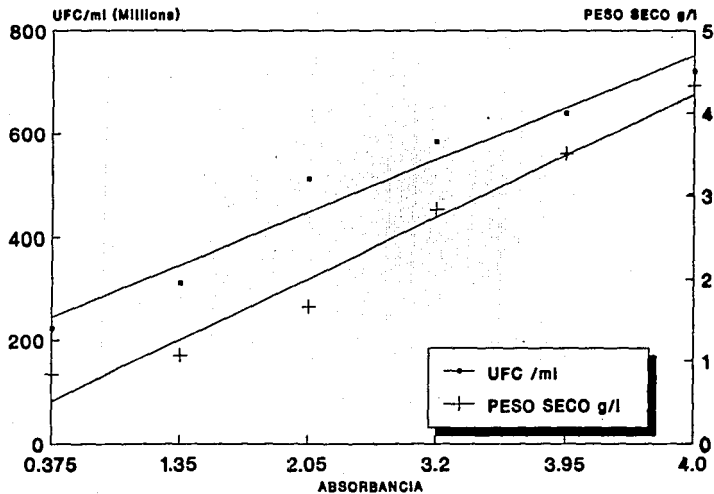
FIGURA 29
 CEPA LABORATORIO
 CORRELACIONES UFC-P.S.-ABS.



+ r: 0.991 m: 1.105 b: 1.474

* r: 0.981 m: 3.6×10^8 b: 2.62×10^8

FIGURA 30
 CEPA TEOTIHUACAN
 CORRELACIONES UFC-P.S.-ABS



Se caracterizó reológicamente el medio de cultivo de la cepa Teotihuacan una vez terminada la fermentación en el fermentador de 14 litros. La caracterización se realizó a dos temperaturas diferentes utilizando un viscosímetro Brookfield RVT con el huso 4, el intervalo de $\dot{\gamma}$ fue de 0.746 a 149.2 S⁻¹ los datos fueron tratados mediante el método propuesto por Mitschka, (34) dando un comportamiento tipo Hershel - Buckley $\tau - \tau_0 = K\dot{\gamma}^n$:

30°C	10°C
$\tau_0 = 8 \text{ Pa}$	$\tau_0 = 9 \text{ Pa}$
$K = 10.8 \text{ Pa} \cdot \text{S}^n$	$K = 11.20 \text{ Pa} \cdot \text{S}^n$
$n = 0.12$	$n = 0.11$

Donde:

τ = Esfuerzo cortante. (Pa)

τ_0 = Esfuerzo cortante inicial (punto de cedencia). (Pa)

$\dot{\gamma}$ = velocidad de cizallamiento. (S⁻¹)

K = índice de consistencia. (Pa.Sⁿ)

n = índice de comportamiento al flujo.

Como se puede observar, el comportamiento reológico del medio de cultivo no es muy diferente en esas dos temperaturas, estos valores se pueden aplicar para el diseño de un fermentador y su posterior aplicación en el diseño de una planta piloto. Sin embargo es necesario caracterizar las propiedades funcionales del polímero purificado para poder aplicarlo industrialmente.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como se pudo observar las cepas nativas fueron menos efectivas en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, siendo por el contrario, más productoras de exopolisacárido. Lo cual nos hace inferir que la cepa Laboratorio pudo haber sido modificada o preparada especialmente para la producción de inoculante.

Al optimizar el medio de cultivo para la obtención de inoculante de *Rhizobium meliloti* cepa laboratorio se obtuvo una mejora considerable en el tiempo de duplicación y en la concentración celular. El tiempo de duplicación inicial fué de 6.42 horas con una concentración celular de 5.95g/l obteniéndose en 54 horas, el tiempo de duplicación con el medio optimizado es de 1.83 horas con una concentración celular de 10g/l y 2.92×10^9 UFC/ml obtenidos en 24 hrs.

Debido a los resultados obtenidos, este inoculante puede ser utilizado en regiones con temperatura de suelo entre 28 y 32°C, que son las temperaturas ambientales promedio en la región central del país y ser viable su crecimiento y desarrollo en las plantas de alfalfa. Así también puede ser utilizado en tierras cuyo pH esté entre 6.5 y 7.5, que son los rangos donde se encuentra la mayoría de las tierras para cultivos.

Este inoculante representa una sustitución de los fertilizantes químicos y abonos de excrementos animales. Su aplicación es de relativa facilidad ya que solo se necesita rociar las semillas y dejarlas secar, con el fin de facilitar el manejo de la semilla en la siembra. Un litro de inoculante es suficiente para un terreno de cultivo de aproximadamente una hectarea. Una vez que se realiza la rotación de cultivo, esta tierra puede ser utilizada para el cultivo de maíz u otras gramíneas.

Para la mejor aplicación del inoculante en el terreno sería conveniente el estudio del soporte apropiado, así como su forma de conservación.

La cepa Teotihuacan fue la seleccionada para la producción de exopolisacárido, al optimizar su medio de cultivo se obtuvo 6.46 g/l de exopolisacárido en 54 horas.

Con el exopolisacárido obtenido se pueden realizar estudios para su uso potencial en industria de alimentos, farmacéutica, etc., así como la determinación de su estructura química y de pruebas de toxicidad para su posible uso comercial.

Para su mejor aprovechamiento se sugiere realizar la caracterización de las propiedades funcionales del exopolisacárido y de sus posibles aplicaciones industriales, así como también el diseño de un fermentador o una planta productora de dicho polisacárido.

Para la posible aplicación del polisacárido en la industria es necesario realizar pruebas de su comportamiento reológico a diferentes concentraciones, temperaturas, pH, etc.

Al comparar la producción de polisacárido producido por *Rhizobium meliloti* cepa Teotihuacan con los datos bibliográficos del polisacárido producido por *Xantomona campestris* se observa que es mucho menor. Para tener mayor productividad se podría recurrir a la mutación del microorganismo de manera similar a lo realizado por Heyraud (25) quien al mutar una especie de *Rhizobium meliloti* obtuvo 20g/l en 2 días de fermentación.

En general para las cepas Laboratorio y Teotihuacan, la variación de pH del medio de cultivo no afectan el crecimiento celular, por lo cual el control durante el proceso no necesariamente deberá ser estricto, por tal razón el equipo empleado para la explotación biotecnológica de estos microorganismos no requerirá de sistemas de control complicados.

APENDICES

APENDICE 1 TECNICAS DE SEMBRADO

Para el aislamiento primario de bacterias se recomienda la técnica de sembrado por dilución:

- Con un asa de inoculación esterilizada, se coloca la toma del material cerca del borde de la placa y se realiza una estria inicial.
- Se esteriliza el asa en la llama y se deja enfriar.
- Después se emplea el asa para distribuir la muestra en la placa en estrias perpendiculares a la estria inicial.
- A partir del extremo de la primer estria, se realiza una segunda y así sucesivamente hasta completar a cuatro estrias en total, esterilizando la asa de inoculación entre cada realización de estrias.

APENDICE 2

TINCION DE GRAM

La tinción de Gram se emplea como método habitual para el examen de cultivos a fin de determinar su pureza y con fines de identificación. Esta técnica proporciona información sobre propiedades estructurales de las bacterias que permiten separarlas en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas.

Los cultivos utilizados para ser teñidos por el método de Gram deben ser jóvenes (máximo 24 horas), ya que en cultivo viejos hay liberación de enzimas por autólisis, las enzimas atacan la pared celular y modifican sus propiedades estructurales convirtiendo así microorganismos Gram positivos a Gram negativos.

REACTIVOS:

A) Colorante cristal violeta

Cristal violeta	2.0g
Etanol al 95%	20.0ml
Oxalato de amonio	0.8g
Agua destilada	80.0ml

se disuelve el cristal violeta en el metanol, por separado disolver el oxalato de amonio en agua destilada y mezclar ambas soluciones, se almacena por 24 horas y se filtra.

B) Solución de lugol

Yoduro de potasio	2.0g
Agua destilada	100.0ml
Iodo metálico	1.0g

Disolver el yoduro de potasio en agua destilada, después agregar el iodo metálico y disolver, aforar a 100 con agua destilada.

C) Solución de alcohol-acetona

Acetona	1 volúmen
Etanol al 95%	2 volúmenes

D) Colorante safranina

Safranina	0.5g
Agua destilada	100.0ml
Disolver la safranina en 20ml y aforar a 100ml.	

TECNICA DE TINCIÓN

- 1.- Preparar un frotis para tinción de la siguiente manera:
 - Colocar en portaobjetos limpios, una gota de agua destilada.
 - Tomar con asa estéril una colonia y realizar una suspensión homogénea en la gota de agua, extendiéndola para formar una película delgada.
 - Dejar secar al aire.
 - Fijar el frotis al calor, para lo cual se pasa el portaobjetos por su parte posterior sobre la flama del mechero.
- 2.- Cubrir el frotis con cristal violeta durante 1 minuto. Escurrir el colorante y lavar con un chorro de agua corriente.
- 3.- Cubrir el frotis con lugol durante 1 minuto. Escurrir sin lavar.
- 4.- Decolorar con alcohol-acetona (de 5 a 15 segundos) y lavar con agua corriente.
- 5.- Cubrir el frotis con safranina por un minuto, lavar y dejar secar al aire.
- 6.- Observar las preparaciones al microscopio con el objetivo de inmersión.

RESULTADOS:

Los microorganismos Gram positivos se tifen de color azul o púrpura, y los Gram negativos de rojo.

APENDICE 3

PRUEBA DE MOTILIDAD POR EL METODO DE GOTA SUSPENDIDA

Este método determina si un microorganismo es móvil o inmóvil.

Las bacterias tienen movimiento por medio de su(s) flagelo(s), y su localización varía dependiendo de la especie bacteriana.

- 1) Se coloca una suspensión de una colonia o una gota de cultivo líquido (de 4 a 6 horas de crecimiento) en un cubreobjetos.
- 2) Se coloca un pequeño anillo de plastilina sobre el portaobjetos, procurando que la suspensión quede en el centro.
- 3) Se aproxima el portaobjetos sobre el cubreobjetos de manera que la gota del líquido quede entre ambas superficies de vidrio, separadas por el grosor de la plastilina.
- 4) Se presiona suavemente para formar una cámara y se invierte rápidamente la preparación.
- 5) Se observa en el microscopio con el objetivo de inmersión.

RESULTADOS:

Prueba positiva: Se aprecia un desplazamiento de los microorganismos que se mueven en todas direcciones.

Prueba negativa: Sin desplazamiento, movimiento browniano, en el cual las células oscilan con ligereza. (12)

APENDICE 4

CRECIMIENTO EN LECHE TORNASOL

Esta técnica determina la acción que presentan las bacterias sobre la leche, demostrando la producción de ácido, coagulación o proteólisis de caseína en la identificación de cultivos puros. (33)

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Se pesan cantidades exactas de acuerdo a la marca comercial.
- 2.- Se rehidrata con agua destilada.
- 3.- Se distribuye en tubos (3 a 5ml en cada uno).
- 4.- Se esteriliza en autoclave a 121°C (15 lb) por 15 minutos.
- 5.- Se enfrían e inoculan por asada y se incuban a 30°C por 6 semanas aproximadamente.

INTERPRETACIONES:

A) Rojo rosado:

- 1.- Reacción ácida.
- 2.- Fermentación de la lactosa.

B) Azul púrpureo:

- 1.- No hay fermentación de la lactosa.
- 2.- No hay cambio en el indicador de pH tornasol; igual que en tubo no inoculado.

C) Azul

- 1.- Reacción alcalina.
- 2.- No hay fermentación de la lactosa.
- 3.- El organismo ataca las sustancias nitrogenadas que se encuentran en el medio.

D) Blanco: reducción del tornasol a leucobase.

E) Formación de coágulo: coagulación de la proteína.

F) Digestión (peptonización):

G) Gas (CO₂ y H₂)

H) Fermentación turbulenta: el coágulo ácido es fragmentado por la abundante producción de gas.

APENDICE 5

CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

Se realizan series de diluciones (hasta 10^{-9}) del medio de cultivo crecido, de cada una de las diluciones se toman $10\mu\text{l}$ y se distribuye sobre placa de agar-extracto de levadura-manitol con ayuda de una varilla de vidrio doblada en angulo recto estéril, se mantiene la placa sin mover hasta que el inóculo sea absorbido por el agar; se invierten las placas y se incuban a 30°C por 24 horas, contandose el número de colonias que aparecen y se multiplica el resultado por el inverso de la dilución. Se recomienda que el número de colonias por placa sea menor de 300 y mayor de 10. El resultado se reporta como UFC/ml.

APENDICE 6

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS

METODO NELSON-SOMOGLYI

Se basa en la capacidad que presentan algunos azúcares para reducir el cobre +2 a ion cuproso.

REACTIVOS:

A) Reactivo de cobre	
Carbonato de sodio anhidro	40.0g
Acido tartárico	7.5g
sulfato de cobre pentahidratado	4.5g
agua destilada	1000.0ml

PREPARACION:

Disolver el carbonato de sodio en 400ml de agua destilada, añadir y disolver al ácido tartárico, enfriar si es necesario, agregar y disolver el sulfato de cobre, aforar a 1 litro, envasar en frasco ambar, utilizar la solución después de dos semanas de preparada.

B) Reactivo de arsenomolibdato	
Molibdato de amonio	50.0g
Acido sulfurico concentrado	42.0ml
Ortoarseniato disódico al 12%	50.0ml
Agua destilada	900.0ml

Disolver el molibdato de amonio en el agua destilada, añadir lentamente el ácido sulfúrico concentrado y adicionar la solución de ortoarseniato disódico, mezclar e incubar a 37°C durante 48 horas en frasco ambar.

C) Solución patrón

Disolver 20mg del azúcar patrón en 100ml de agua destilada.

TECNICA DE DETERMINACION

1.- Preparar tubos como se indica:

	1	2	3	4	5	6
Patrón de glucosa (ml)	-	0.25	0.50	0.75	1.0	-
Problema (ml)	-	-	-	-	-	1.0
Agua destilada (ml)	1.0	0.75	0.50	0.25	-	-
Reactivo de cobre (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

2.- Colocar a los tubos perlas de ebullición, ponerlos en baño maría hirviente por 20 minutos y enfriar.

3.- Agragar a cada tubo 1ml de arsenomolibdato.

4.- Agregar a cada tubo 7.5ml de agua destilada.

5.- Mezclar cada tubo y leer en espectro a 520nm, usando como blanco el tubo número 1.

Esta técnica es sensible de 25 a 250 μ g de azúcar/ml. (36)

METODO FENOL-SULFURICO

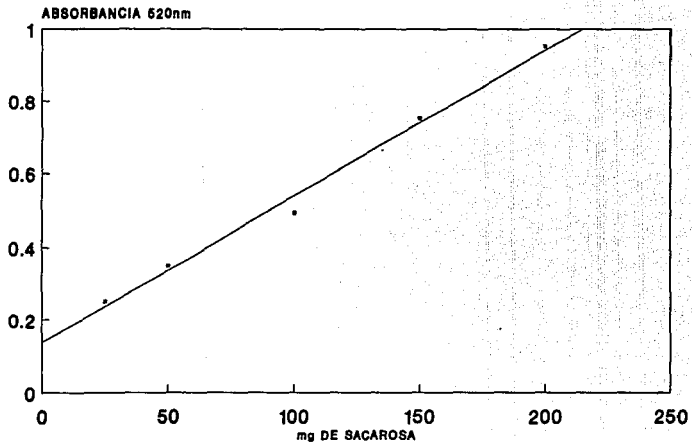
Método colorimétrico, útil para determinación de azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados, dando una reacción amarillo-naranja estable.

CURVA PATRON:

Se vierten de 1 a 2ml de solución de azúcar en tubos, de manera que contengan entre 10 y 70 μ g de azúcar, se les adiciona a cada uno de ellos 1ml de fenol al 5% y 5ml de ácido sulfúrico concentrado en forma de chorro directo contra la superficie del líquido, se dejan verticales durante 10 minutos, se agitan colocándose después en baño maría de 25 a 30°C por 10 a 20 minutos. Se toman lecturas de absorbancia a 490nm para hexosas y 480 para pentosas, el blanco se prepara de igual manera donde es sustituida la solución de azúcar por agua destilada. Se construye la gráfica concentración de azúcar vs absorbancia.

Para la solución problema se sigue el mismo procedimiento, teniendo el valor de absorbancia se entra a la curva patrón y se obtiene el valor correspondiente a la concentración del azúcar.

FIGURA 31
CURVA PATRON DE SACAROSA POR EL METODO
NELSON-SOMOGYI CON HIDROLISIS ENZIMATICA



r: 0.995
m: 4.014 E-3
b: 0.138

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aiba S., Humphrey A. E., Millis N. F.
Biochemical engineering.
Academic press, 2^a edición, 1973.
- 2.- Amarger Noëlle, Obaton M., Blachère H.
Polysaccharides extracellulaires de *Rhizobium meliloti*.
Canadian Journal of Microbiology, 13, 1967.
- 3.- Anad R. C., Dogra R. C.
Physiological and biochemical characteristics of fast and slow
growing *Rhizobium* spp.
The Journal of Applied Bacteriology 70 (3), 1991.
- 4.- Blanshad J. M. V., Mitchell J. R.
Polysaccharides in food.
Butterworths, 1979
- 5.- Bohlool B., Schmidt E. L.
Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume
root nodule symbiosis.
Science 185: 269-271, 1974.
- 6.- Brill J. Winston.
Biological nitrogen fixation.
Scientific American 236 (3), 1977.
- 7.- Brill J. W.
A treatise on nitrogen.
Ed. Wiley Interscience, 1975.
- 8.- Brock D. Thomas, Madigan T. Michel
Biology of microorganisms.
Ed. Prentice Hall 1991.

- 9.- Brown C. M., Campbell F., Priest F. G.
Introducción a la biotecnología.
Ed. Acribia, 1989.
- 10.- Bu'lock J., et al
Biotecnología básica
Ed. Acribia 1992.
- 11.- Casida J. R. L. E.
Industrial microbiology
Ed. John Wiley and sons 1968.
- 12.- Cowan, Steel's
Manual para la identificación de bacterias de importancia médica.
Ed. CECSA, 1976.
- 13.- Daniel W. Wayne.
Bioestadística.
Ed. Limusa, 1983.
- 14.- Delaat N. C. Adrian.
Microbiología.
Interamericana S.A. de C.V., 1985.
- 15.- Deppler H. J., Perlman D.
Microbial technology
Academic press, 2ª edición, 1979.
- 16.- Domergues Y., Dreyfus B., Gia Diem Hoang, Duhoux E.
Fijación de nitrógeno y agricultura tropical.
Mundo científico 5: 276-85, 1984.
- 17.- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., et al.
Colorimetric method for determination of sugar and related
substances.
Anal Chem. 28: 350-356, 1956.

- 18.- Dussap C. G., Devita D., Pons A.
Modeling growth and succinoglucan production by agrobacterium
radiobacter NCIB 9042 in batch cultures.
Biotechnology and Bioengineering 38: 65-74, June 1991.
- 19.- Frazier C. W., Westhoff C. D.
Microbiología de los alimentos.
Ed. Acribia, 1978.
- 20.- Geesey G. Gill.
Microbial exopolimers: Ecological and Economic considerations.
ASM News 48 (1): 9-14, 1982.
- 21.- Giron Hurtado Elvia.
Biotecnología alimentaria.
Información científica y tecnológica 11 (154): 32, 1989.
- 22.- Glenn A. R., Dliworth M. J.
The uptake and hidrolisis of disaccharides by fast and slow
growing species of *Rhizobium*.
Archives of Microbiology 129: 233-239, 1981.
- 23.- Harada T.
Curdian: a gel-forming β -1,3-glucan.
Ed. Butterworths 1979.
- 24.- Hernández G. R.
Estudio comparativo de soportes para la elaboración de
inoculantes de leguminosas en México.
Tesis, UNAM Facultad de Química, 1980
- 25.- Heyraud A., Courtois J., Dantas L., Morel C. P., Courtis B.
Structural Characterization and rheological properties of an
extracellular glucuronana produced by a *Rhizobium meliloti* MSN1
mutant strain.
Carbohydrate research, 240: 71-78, 1993.

- 26.- Hrabak E. M., Urbano M. R., Dazzo F. B.
 Growth-phase-dependent immunodeterminants of *Rhizobium trifolii* lipopolisaccharide which bind trifillin A, a white clover lectin.
 J. of Bacteriology 148 (2), 1981.
- 27.- Kaykendall L. D., Elkan G. H.
 Some features of mannitol metabolism in *Rhizobium japonicum*.
 Journal of General Microbiology 98: 291-95, 1977.
- 28.- Kenneth C. B. W.
 Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry 36: 265.
- 29.- Kleiener D.
 Fixation of atmospheric nitrogen by microorganisms.
 Angw. Chem. Internat. Edit. 14 (2), 1975.
- 30.- Kreyszing Erwin.
 Introducción a la bioestadística matemática.
 Ed Limusa, 1984.
- 31.- Krieg R. Noel, Holt G. Jhon, et al.
 Bergey's manual of systematic bacteriology.
 Ed. Williams & Wilkins 1986.
- 32.- Leigh John A., Chi Chang Lee.
 Characterization of polysaccharides of *Rhizobium meliloti* exo mutants that form ineffective nodules.
 Journal of Bacteriology 170 (8): 3327-32, 1988.
- 33.- Mac Faddin, Jean F.
 Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica.
 Ed. Panamericana, 1ª edición, 1980.
- 34.- Mitschka P.
 Simple conversion of Brookfield RVT readings into viscosity functions.
 Reologica acta 21 (2), 1982.

- 35.- Nakao Y., Konn A., Taguchi T., Tawada T., Kasai H.
Curdlan: Properties and application to foods
J. of Food Science 56 (3):769-772, 1991.
- 36.- Nelson Norton.
A photometric adaptation of the Somogyi method for the
determination of glucose.
J. Biolo. Chem. 153: 375-380, 1944.
- 37.- Norris J. R., Ribbons D. W.
Methods in microbiology, vol 5A.
Academic press, 1970.
- 38.- Quintero Ramírez Rodolfo.
Ingeniería bioquímica: Teoría y aplicaciones.
Alhambra, 1981.
- 39.- Quintero Ramírez Rodolfo.
Prospectiva de la biotecnología en México.
Fundación Javier Barrios Soria. CONACYT 1985.
- 40.- Rhoded A., Fletcher L. D.
Principios de microbiología industrial.
Ed. Acribia, 1969.
- 41.- Rose H Anthony, Ph I.
Microbiología química.
Ed. Alhambra, 2ª edición, 1977.
- 42.- Rose A. H., Sutherland W. I.
Primary products of metabolism economic microbiology.
Academic press, vol 2, 1978.
- 43.- Savar Susana, Blancas Abel.
Escalamiento de procesos biotecnológicos.
Información científica y tecnológica 11 (154): 48, 1989.

- 44.- Stanbury F. Peter, Whitaker Allan.
Principles of fermentation technology.
Ed. Pergamon Press, 1984.
- 45.- Sutherland W. I.
Biosynthesis of Microbial Exopolisaccharides.
Adv. Microbiol. Physiol. 23: 79, 1982.
- 46.- Sutherland I. W.
Industrially useful microbial polysaccharides
Microbiological Sciences 3 (1), 1986.
- 47.- Tyler Dylan, Helinski D. R., Ditta Gary S.
Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires
 β -(1-2)-glucan.
Journal of Bacteriology 132 (3): 1400-08, 1990.
- 48.- Vincent J. M.
Manual práctico de Rhizobiología.
Ed. Hemisferio sur, 1ª edición, 1975.
- 49.- Wang, Cooney, Demain.
Fermentation and enzyme technology
1979.