

45
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ESTUDIO DE UN BIOPOLIMERO
MICROBIANO COMO POSIBLE
SUSTITUTO DE AGAR BACTERIOLOGICO
EN MEDIOS DE CULTIVO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N
NOLASCO VAZQUEZ RIGOBERTO
QUEZADA CHAVEZ CARLOS

ASESORES:
Q.F.B. ALBERTO NATAHLIEL SOTO GUEVARA
DRA. STELLA MARIS REGINENSI RIVERA
I.B.Q. NORMA CASAS ALENCASTER

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

271692



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

La elaboración de esta tesis se realizó en el laboratorio de Microbiología Industrial, ubicado en la planta baja de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AUTÓNOMA DE
 MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
 Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estudio de un biopolimero microbiano como posible sustituto
de agar bacteriológico en medios de cultivo

que presenta el pasante: Rigoberto Nolasco Vázquez
 con número de cuenta: 8811097-6 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Noviembre de 199 8

- | | | |
|------------------|---|----------------------------------|
| PRESIDENTE | <u>Q.E.I. Andrea Becerril Ospaya</u> | <u>Andrea Becerril Ospaya</u> |
| VOCAL | <u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u> | <u>Gerardo Cruz Jiménez</u> |
| SECRETARIO | <u>Q.E.B. A. Nathaniel Soto Guevara</u> | <u>A. Nathaniel Soto Guevara</u> |
| PRIMER SUPLENTE | <u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u> | <u>Susana E. Mendoza Elvira</u> |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>M.enC. Andres Romero Rojas</u> | <u>Andres Romero Rojas</u> |



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Estudio de un biopolímero microbiano como posible sustituto
de agar bacteriológico en medios de cultivo

que presenta el pasante: Carlos Quezada Chávez

con número de cuenta: 9256258-7 para obtener el TÍTULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Noviembre de 1998

PRESIDENTE

Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya

VOCAL

M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

SECRETARIO

Q.F.B. A. Natahliel Soto Guevara

PRIMER SUPLENTE

Dra. Susana E. Mendoza Elvira

SEGUNDO SUPLENTE

M.en C. Andres Romero Rojas

A mis padres:

Patrocinio Quezada López y Ma. Guadalupe Chávez Lémuz

Porque sin el apoyo y confianza que me brindaron hubiera sido posible este trabajo y estos momentos, por todo esto muchas gracias.

A dios:

Porque sin el no existe nada y sin la ayuda que siempre brinda, sin esperar respuesta, habría logrado este éxito en mi vida profesional y humana.

A mis hermanos:

Porque fueron un constante aliciente para lograra llegar al final de mi carrera.

A mis asesores:

Stella Maris Reginensi Rivera, Alberto Natahlíel Soto Guevara y a Norma Casas Alencaster que con sus conocimientos y asesoría logramos terminar este trabajo.

A mis compañeros y amigos:

Montoya Cruz Rogelio, Jaime Antonio Silva Solano, Ortega Sánchez Ma. del Carmen, Vasconcelos García Rocio, Bernal Ayala Sandra Isabel, Ricardo Montes de Oca, Cano Ortiz Laura. Calderón Vargas Blanca Estela, Díaz García Agelica, así como a todo los demás compañeros que con el apoyo que nos brindamos durante la carrera hemos llegado al final.

A mis amigos de Química Orgánica:

Enrique Angeles Anguiano, Enrique Moreno Guerrero, Ignacio Martínez Trejo y Ramírez Murcia Alberto. Por todo su apoyo que me brindaron para terminar esta tesis.

A los profesores de posgrado:

Dra. Susana Mendoza, Dr. Andres Romero Rojas y Oscar

A mis padres:

Ma. Remedios Vázquez y Rigoberto Nolasco

Porque sin su cariño y apoyo no hubiera podido lograr lo que ahora soy. Como una pequeña muestra de todo mi amor.

A mis hermanos:

Ruben Silvestre, Margarita, José Guadalupe y Luz María. Por toda la confianza que depositaron en mí y por su apoyo para que pudiera alcanzar mis metas.

A dios:

Por darme esta familia que fue mi ejemplo a seguir, por darme la vida y el tiempo suficiente para agradecerle todos los favores recibidos, sin merecerlos.

A la generación 19ava :

Por todos los momentos tan grandiosos que pasamos juntos.

INDICE GENERAL

I.- Índice de tablas	
II.- Índice de figuras	
III.- Lista de abreviaturas	
IV.-RESUMEN	1
1. - INTRODUCCIÓN	2
2. - GENERALIDADES	4
2.1. - Taxonomía de <i>Rhizobium</i> .	4
2.1.1. - Características generales del género <i>Rhizobium</i> .	6
2.2. - Simbiosis <i>Rhizobium-Leguminosa</i> .	7
2.3. - Polisacáridos.	9
2.3.1. - Fuente de obtención de los Polisacáridos.	10
2.3.1.1. - Sintéticos.	10
2.3.1.2. - Semisintéticos.	10
2.3.1.3. - Naturales	11
2.4. - Biopolímeros microbianos.	12
2.5.- Polisacáridos microbianos.	13
2.5.1. - Distribución de los polisacáridos en los microorganismos.	14
2.5.2. - Funciones de los polisacáridos microbianos.	15
2.6 - Exopolisacáridos.	16
2.6.1. - Proceso de Obtención de los exopolisacáridos microbianos a nivel laboratorio.	17
2.6.2. - Producción de exopolisacáridos (EPS) por <i>Rhizobium</i> .	18
2.6.3. - Aplicaciones de los exopolisacáridos microbianos.	19
2.6.4. - Ventajas y desventajas de los exopolisacáridos microbianos.	21
2.7. - Agar bacteriológico.	21
2.8. - Sustitutos de agar bacteriológico.	23

3.0. - Objetivos.	25
3.1. - Objetivo general	25
3.2. - Objetivos particulares	25
4.0. - Metodología	26
4.1 Materiales y Métodos	26
4.1.1 Material Biológico	26
4.1.2 Material de cristalería	26
4.1.3 Reactivos y Medios de Cultivo	27
4.2 Diagrama de actividades realizadas	28
4.3 Desarrollo Experimental	29
4.3.1. - Conservación e identificación de la cepa bacteriana	29
4.2. - Obtención del exopolisacárido	30
4.3. - Aislamiento del exopolisacárido	31
4.3.1. Determinación de la cantidad del biopolímero a partir de dos diferentes fuentes de carbono.	32
4.4. -Purificación del exopolisacárido	33
4.5. - Aplicación del exopolisacárido como posible sustituto de agar bacteriológico.	33
4.5.1. - Preparación del medio de cultivo control	33
4.5.2. - Preparación de los medios experimentales ME1 y ME2.	33
4.5.3. - Realización de cuentas viables de acuerdo al método de Milles y Mishra.	34
4.5.4 Determinación de la fuerza del gel	35
4.5.5 Determinación del punto de carbonización	36
4.5.6 Determinación del punto de gelificación	37
5.0. - Resultados.	38
5.1 Conservación e identificación de la cepa bacteriana	38
5.2 Rendimiento del exopolisacárido a partir de las fuentes de carbono utilizadas.	39

5.3 Evaluación del exopolisacárido como sustituto de agar bacteriológico.	39
5.4 Determinación de la fuerza del gel.	42
5.5 Evaluación del punto de carbonización.	45
5.6 Determinación del punto de gelificación.	46
6.0 Discusión.	47
7.0. - Conclusiones	50
8.0. - Referencias	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las diferentes especies de <i>Rhizobium</i> .	4
Tabla 2. Características principales de las cepas de <i>Rhizobium</i> de desarrollo rápido y lento.	5
Tabla 3. Fuentes de obtención de polímeros y gomas comerciales.	12
Tabla 4. Aplicaciones de polisacáridos.	20
Tabla 5. Cuentas viables del medio de cultivo control con respecto al medio experimental 1.	39
Tabla 6. Cuentas viables del medio de cultivo control frente al medio experimental 2.	40
Tabla 7. Determinación de la fuerza del gel para todos los medios utilizados.	42
Tabla 8. Determinación del punto de carbonización para el exopolisacárido obtenido de las dos fuentes de carbono, así como del agar bacteriológico.	46
Tabla 9. Determinación del punto de gelificación, para los diferentes geles preparados.	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incubación de <i>Rhizobium loti</i> para la producción del exopolisacárido en un incubador rotatorio.	30
Figura 2. Centrifuga con refrigeración, utilizada para la separación del paquete celular del sobrenadante que contiene al exopolisacárido.	32
Figura 3. Preparación de las diluciones logarítmicas, a partir de la suspensión bacteriana.	34
Figura 4. Equipo utilizado para la determinación de la fuerza del gel (Dinamómetro).	35
Figura 5. Aparato utilizado para la determinación del punto de carbonización (Fisher).	36
Figura 6. En esta fotografía se muestra la manera en la que se determino el punto de gelificación.	37
Figura 7. En esta fotografía se muestra las características morfológicas de <i>Rhizobium</i> .	38
Figura 8. Morfología colonial de <i>Staphylococcus aureus</i> , en los diferentes medios utilizados.	40
Figura 9. Comparación morfológica de <i>Escherichia coli</i> en los diferentes medios utilizados.	41
Figura 10. Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en el medio de cultivo control.	41
Figura 11a. La gráfica muestra la fuerza del gel obtenida para las diferentes muestras utilizadas.	43
Figura 11b. Obtención de la fuerza del gel para el medio experimental.	44
Figura 11c. Determinación de la fuerza del gel para el medio control.	44

Figura 11d. Aspecto de las muestras de los geles al terminar la obtención de la fuerza del gel con el dinamómetro. 44

Figura 12. Comparación del punto de carbonización del exopolisacárido del agar bacteriológico, con respecto al punto de fusión del cloruro de sodio. 45

LISTA DE ABREVIATURAS

EPS= Exopolisacárido.

MC= Medio Control.

ME1= Medio experimental uno.

ME2= Medio experimental dos.

CPS= Polisacarido Capsular.

μm = Micrómetro.

LPS= lipopolisacarido.

LPDE= Polietileno de baja densidad.

HDPE= Polietileno de alta densidad.

CMC= Carboximetilcelulosa.

MC= Metil celulosa.

HEC= Hidroxietilcelulosa.

HPC= Hidroxipropilcelulosa.

HPMC= Hidroxipropilmetilcelulosa.

ADN= Acido desoxirribonucleico.

CRC= Centro cooperativo de investigaciones.

HMW= Alto peso molecular.

rpm= revoluciones por minuto.

AST= Agar soya tripticaseina.

UFC/ml= Unidades formadoras de colonia por mililitro.

g/cm^2 = gramos por centímetro cuadrado.

g/l = gramos por litro.

CV= Coeficiente de variación

RESUMEN.

La aplicación industrial de las gomas solubles microbianas en agua se basa principalmente en la capacidad de alterar las propiedades reológicas del agua y de formar geles. El biopolímero utilizado en este trabajo fue obtenido de cultivos de *Rhizobium loti*, el cual es liberado al medio como exopolisacárido (EPS). Por lo que el objetivo del presente trabajo fue el de evaluar al exopolisacárido como posible sustituto de agar bacteriológico en medios de cultivo microbiológicos.

La cepa utilizada fue *Rhizobium loti* obtenida de cultivos de raíces de *Lotus corniculatus*. La producción del exopolisacárido se realizó en un medio de cultivo líquido óptimo para el crecimiento de las cepas del género *Rhizobium*. En el medio de cultivo se utilizaron dos fuentes de carbono (manitol y sacarosa).

La evaluación del EPS como posible sustituto de agar se realizó preparando tres medios de cultivo, el medio de cultivo control (MC) y los medios experimentales (ME1 y ME2) en los cuales se sustituye el agar bacteriológico por el EPS obtenido. El crecimiento bacteriano se evaluó por medio de cuentas viables según el método Miles y Mishra, utilizando las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25923, *Vibrio cholerae* 01 Inaba, *Micrococcus luteus* ATCC 9041 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Se utilizó un dinamómetro para determinar la fuerza de los geles obtenidos, tanto para el agar bacteriológico solo, el EPS solo, agar soya tripticaseína (MC) y para los medios experimentales (ME1 y ME2).

La producción de EPS obtenida en el medio de cultivo usando como fuente de carbono manitol fue de 10.6g/l en peso seco y de 9.5g/l a partir de sacarosa. Las cuentas viables que se obtuvieron en los medios experimentales ME1 y ME2 son muy similares con respecto al medio control, así como también la morfología, tamaño y pigmentación de las colonias de todas las cepas probadas. La fuerza del gel obtenida de los geles experimentales (ME1 y ME2), así como del gel formado por el exopolisacárido solo, fue menor a la que se obtuvo del medio control.

Los resultados indican que el exopolisacárido obtenido de *Rhizobium loti* usando manitol y sacarosa como fuentes de carbono tienen la capacidad de formar geles y muestran un comportamiento adecuado para utilizarse como sustitutos de agar bacteriológico en la industria microbiológica.

1.0. INTRODUCCIÓN.

La importancia del uso de agentes gelificantes, se debe principalmente a que los medios de cultivo sólidos han sido de fundamental importancia para la realización de investigaciones microbiológicas, desde finales de la década de los ochentas.⁽⁹⁰⁾

Al aumentar los problemas de producción y cosecha de las algas marinas, también aumentan los problemas para obtener el agar bacteriológico con las características de calidad adecuadas para su uso, por lo que se ha visto la necesidad de utilizar sustitutos gelificantes en medios bacteriológicos; tal es el caso, de los polisacáridos microbianos, los cuales, al igual que los polisacáridos de algas, son de gran interés económico, y son producidos usualmente a nivel industrial por fermentación de lote.^(50,90)

Cabe señalar que la obtención de biopolímeros microbianos, es un proceso que generalmente se inicia desde la obtención del microorganismo productor de polisacárido, de su hábitat natural; como puede ser el suelo y en algunos casos de plantas.

En la agricultura, particularmente en los cultivos de leguminosas existen microorganismos bacterianos que le ayudan a fijar el nitrógeno atmosférico. La inoculación de leguminosas con *Rhizobium* y *Bradyrhizobium spp* se practica comúnmente en todo el mundo para incrementar la producción de las cosechas de leguminosas sin la adición de fertilizantes químicos nitrogenados desde fines del siglo pasado.^(10,57)

Estos microorganismos producen polisacáridos de tres tipos distintos como son: polisacáridos extracelulares, estructurales e intracelulares. Los polisacáridos bacterianos extracelulares (EPS) aparecen en dos formas, como una cápsula, denominado polisacárido capsular (CPS) o antígeno K, en donde el polisacárido esta íntimamente asociado con la superficie celular y puede unirse covalentemente.

En contraste, los polisacáridos liberados están mínimamente asociados con la superficie celular en forma de macromoléculas o polisacáridos extracelular.^(60,76,92)

Desde hace algunos años, la producción de polisacáridos microbianos por fermentación ha sido una alternativa para usarse en lugar de las gomas tradicionales obtenidas de plantas y algas marinas en la industria microbiológica, en la industria cosmética, así como en la industria de alimentos. Las bacterias del género *Rhizobium*, pertenecen a la familia *Rhizobaceae* que son conocidas por producir mezclas complejas de polisacáridos extracelulares (EPS), mismos que son recuperados del sobrenadante de los cultivos. Las cepas de crecimiento rápido son conocidas por su capacidad de excretar polisacáridos solubles (EPS) que causan una alta viscosidad en medios líquidos.^(13,47,92)

Se ha reportado la capacidad de algunos microorganismos de producir exopolisacáridos (biopolímeros), mismos que tienen las características de alterar las propiedades reológicas del agua modificando sus propiedades de flujo, así como de formar geles y películas; características por las que pueden ser utilizados como un posible sustituto de agar bacteriológico en medios de cultivo. Además se sabe que las bacterias de género *Rhizobium* de desarrollo rápido, como es el caso de *Rhizobium loti* tienen la capacidad de excretar polisacáridos solubles (EPS), que causan una alta viscosidad de soluciones acuosas; por las ventajas de producción que presentan estos a diferencia de los obtenidos de algas, se propone el uso de estos para tenerlos como una alternativa más de uso de agentes formadores de gel en la industria microbiológica o para alguna otra área.

2.0 GENERALIDADES.

2.1 Taxonomía de *Rhizobium*.

Las bacterias que forman nódulos en las raíces de leguminosas, en donde llevan a cabo el proceso de fijación de nitrógeno, son clasificadas dentro de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, que durante muchos años fueron agrupadas junto con las *Agrobacterias* y *Phylobacterias* dentro de la familia de las *Rhizobaceas*. El género *Rhizobium* fue aislado en 1888 por Beijerinck de raíces noduladas y la estableció como el agente causal de la asimilación de nitrógeno atmosférico. Él propuso el nombre de *Bacillus radicolus* para este organismo, pero fue rápidamente renombrado *Rhizobium* - del griego *rhizo*: raíz y *bios*: vida - por Frank en 1889.^(25,11,58,87) La clasificación taxonómica de las bacterias del género *Rhizobium* se muestra en la Tabla 1. En donde el nombre de las especies de los microorganismos en la mayoría de los casos corresponde a la planta hospedero que nodulan, sugiriendo que la simbiosis es un proceso específico de especie.^(58,82)

Tabla 1. Clasificación de las diferentes especies de *Rhizobium*.⁽⁵⁸⁾

Especie de <i>Rhizobium</i>	Planta(s) hospedero (s)
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus y Trigonella spp</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i> , bv. <i>Trofolii</i> bv. <i>Phaseoli</i>	<i>Pisum, Vicia, Lathyrus y Lens spp.</i> <i>Trifolium spp</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> .
<i>R. loti</i>	<i>Lotus spp. (Lotus corniculatus, Lotus pedunculatus).</i>
<i>R. huakii</i>	<i>Astragalus sinicus.</i>
<i>R. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>R. sp. cepa</i> NGR234	<i>Leguminosas tropicales y Parasponia spp. (no leguminosa)</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Leucaena spp. y Macrotilium spp.</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis, G. orientalis</i>
<i>R. fredii</i>	<i>Glycine max, G. soja y otras leguminosas.</i>
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max, G. soja y otras leguminosas</i>
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max, G. soja y otras leguminosas</i>
<i>Bradyrhizobium spp cepa Parasponia</i>	<i>Parasponia spp no leguminosa</i>
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania spp (nodulación de tallos)</i>

Además de estos estudios existen otros que han llevado a una clasificación taxonómica de estas bacterias basada en la interacción planta-bacteria y a su grado de desarrollo, reconociendo dos grupos distintos. El grupo de desarrollo rápido que incluye al género *Rhizobium* con ocho especies reconocidas, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. loti*, *R. galagae*, *R. tropici*, *R. huakii*, *R. etli*, *R. fredii* y *R. ciceri*, aislada de *Cicer arietinum* y el grupo de desarrollo lento, que incluyen al género *Bradyrhizobium* contiene sólo una especie reconocida *B. japonicum*. En la Tabla 2 se muestran las deferencias principales entre las cepas del género *Rhizobium* de desarrollo rápido y lento.

Ultimamente se han reconocido dos nuevos géneros como son el género *Azorhizobium* con una especie, *A. caulinodans*, y el género *Sinorhizobium* con dos especies, *S. fredii* y *S. xinjiangensis*.⁽²⁵⁾

Tabla 2. Características principales de las cepas de *Rhizobium* de desarrollo rápido y lento.⁽²⁸⁾

CARACTERISTICAS	DESARROLLO RAPIDO	DESARROLLO LENTO
Tiempo de generación	< de 6 hrs.	> de 6 hrs.
Nutrición de carbohidratos.	Uso de pentosas, hexosas, mono-, di- y trisácaridos.	Uso solamente de pentosas y hexosas.
Presencia de flagelos.	Peritricos	Subpolares.
Localización del gen simbiótico.	Plásmidos y cromosoma.	Cromosoma.
Resistencia intrínseca a antibióticos.	Baja.	Alta.

2.1.1 Características generales del género *Rhizobium*

Las bacterias del género *Rhizobium* son bacilos gram negativos que miden de 0.5 - 0.9 μm de diámetro por 1.2 - 3.0 μm de largo, son móviles ya que presentan un flagelo polar o subpolar, o de dos a seis flagelos peritricos. Son comúnmente pleomórficos bajo condiciones adversas de desarrollo, no producen endosporas y se pueden desarrollar bajo tensiones de O_2 de 0.01 atmósferas. Su temperatura óptima de desarrollo va de 25-30°C y su rango de pH va de 5.0 a 8.0⁽¹¹⁾

Usualmente produce considerable polisacárido extracelular durante su desarrollo sobre medios que contienen carbohidratos. Las colonias son circulares, convexas, semitranslúcidas, elevadas, mucilaginosas y van de incoloras a blancas (existen algunas cepas que producen colonias rosas), en medio con manitol, sales minerales y agar. Se observa un aumento de la viscosidad, la cual se desarrolla después de 2 -3 días en los medios de cultivo líquidos en agitación.⁽¹¹⁾

Todas las especies utilizan un amplio rango de carbohidratos como son: glucosa, sacarosa y manitol. También requieren de compuestos inorgánicos que contengan nitrógeno (NH_3 y NO_3). Algunas cepas además requieren factores de crecimiento como biotina y de otras vitaminas solubles en agua.⁽¹¹⁾

Algunas cepas de *Rhizobium* tienen la habilidad de producir ácido, obteniendo un máximo de 2 - 3ml de ácido 0.1N por cada 100ml de medio líquido en 48hrs (Laird y West, 1938); esto se puede prevenir con un medio amortiguado con buffer, aunque el pH puede bajar hasta 6.8 después de 144 hrs. de incubación.^(60, 25)

2.2 Simbiosis *Rhizobium* - leguminosa.

El proceso de simbiosis implica la interacción de plantas leguminosas con bacterias del género *Rhizobium* presentes en el suelo, esta interacción comprende desde el reconocimiento de la planta hospedadora por parte de la bacteria, la penetración de la bacteria a través de los pelos radiculares hasta las células de la corteza de la raíz y la formación de un tejido denominado nódulo. En este tejido, la bacteria es capaz de reducir el nitrógeno de la atmósfera, y proporcionarlo a la planta en forma de amonio, el cual es asimilado y transportado a las partes aéreas de la planta para su utilización. A este proceso se le ha denominado fijación biológica de nitrógeno, el cual permite el crecimiento de las plantas sin la necesidad de aplicar fertilizantes químicos nitrogenados aún en suelos que carecen de este compuesto.⁽³⁷⁾

Se piensa que algunos polisacáridos de superficie de *Rhizobium* son importantes en el establecimiento de la relación simbiótica con plantas leguminosas. Ahora bien sería de gran utilidad saber cual de los polisacáridos es el más importante, ya que existen diversos polisacáridos que han sido descritos, como son: Exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (CPS), lipopolisacáridos (LPS), etc.^(33,38)

En los últimos años se han hecho avances importantes con respecto a los mecanismos que confieren la especificidad *Rhizobium*-Leguminosa, usando enfoques multidisciplinarios en las áreas de biología molecular, genética, fisiología vegetal, citología y bioquímica.

Durante los procesos de infección y nodulación, ambos simbiosites intercambian moléculas de bajo peso molecular. La planta huésped libera señales que estimulan la expresión coordinada de genes bacterianos que se requieren para la nodulación (genes Nod). Estos genes a su vez codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de los "metabolitos Nod" que son oligosacáridos modificados, los cuales inducen cambios morfológicos en las raíces de las plantas.⁽³³⁾

Las estructuras químicas de estos metabolitos Nod son determinantes de la especificidad por el huésped de una bacteria dada. Los inductores de los genes de nodulación que son liberados por las raíces de las leguminosas son de naturaleza flavonoide, pudiendo presentar varias estructuras que hacen distintos estos compuestos para cada planta. Los metabolitos Nod sintetizados por las bacterias, son oligómeros de N-acetil glucosamina con diversos sustituyentes. ^(9,37,38)

2.3. Polisacáridos.

Puesto que una gran parte de los químicos y de los ingenieros químicos se hallan involucrados en algún aspecto de la ciencia o de la tecnología de los polímeros, algunos han dado en llamar a nuestro tiempo la era de los polímeros. En realidad, siempre hemos vivido en una era de los polímeros. Desde las primeras civilizaciones sudamericanas como la azteca ya utilizaban el caucho (*Hevea brasiliensis*) para fabricar artículos elásticos o impermeabilizar tejidos.⁽⁷¹⁾ Como podemos ver todos son en su mayoría polímeros y son importantes para la vida tal y como la conocemos.

La palabra polímero se deriva del griego poli y meros, que significan mucho y partes respectivamente. Algunos científicos prefieren usar el término macromolécula, o molécula grande, en lugar de polímero. Otros sostienen que los polímeros naturales, o biopolímeros y los polímeros sintéticos deberían estudiarse en cursos diferentes. Sin embargo, los mismos principios son de aplicación a todos los polímeros. Si se descartan los usos finales, la diferencia entre los polímeros, incluyendo los plásticos, las fibras y los elastómeros o cauchos, vienen determinadas principalmente por las fuerzas intra e intermoleculares y por los grupos funcionales presentes.⁽⁸⁰⁾

Los polímeros de hidratos de carbono son importantes en la industria alimenticia debido a la demanda de ingredientes funcionales que imparten las propiedades espesantes, formadoras de geles y texturizantes, y en la recuperación terciaria del petróleo, en donde las soluciones acuosas de polímeros reducen la capacidad de flujo del agua bombeada dentro de los pozos de petróleo aumentando así la eficiencia de contacto con el petróleo y su desplazamiento. En las industrias farmacéuticas y de pesticidas. Los polímeros son ingredientes necesarios para reemplazo de carbohidratos de alto y bajo peso molecular, particularmente en alimentos formulados con reducción de calorías.^(45,79,93)

2.3.1- Fuentes de obtención de los polisacáridos.

Las gomas o hidrocoloides se pueden obtener de diferentes fuentes, ya que su producción se encuentra influenciada por sus condiciones ambientales de producción y desarrollo, por ejemplo: Variaciones de pH, temperatura, grado de humedad, presión, fuentes de nutrientes, tensión de oxígeno, etc.⁽³⁰⁾

2.3.1.1- Sintéticos.

Los polímeros sintéticos son principalmente usados en la industria de plásticos, algunos ejemplos de ellos son: Caucho, ebonita, fibras de rayón, poliéster alquídalico, plásticos de polimetacrilato de metilo, neopreno, elastómeros de polisulfuro, de estireno butadieno, de estireno-acrilonitrilo, de isobutileno-isopreno, polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno de alta densidad (HDPE), siliconas, poliuretanos, policarbonato, entre otros.⁽⁷¹⁾

2.3.1.2. Semisintéticos.

Entre los polisacáridos o gomas semisintéticos se pueden citar las celulosas modificadas como son: a) carboximetilcelulosa (CMC), b) metilcelulosa (MC), c) hidroxietilcelulosa (HEC), d) hidroxipropilcelulosa (HPC), e) hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), los almidones modificados, la pectina de bajo metoxilo y el alginato de propilenglicol.⁽³⁰⁾

2.3.1.3. Naturales.

Los polisacáridos de origen natural son los más abundantes, ya que se pueden obtener casi de cualquier fuente ⁽³⁰⁾, algunos ejemplos de ellos se enlistan a continuación:

- Exudados de plantas: goma arábiga, tragacanto, karaya y ghatti.
- Extractos de plantas: pectina y arabinogalactana.
- Extractos de algas marinas: agar, alginatos, carragenina y furcelanas.
- Semillas: goma guar, tragacanto y Psyllium tamarindo.
- Cereales: almidón.
- Origen animal: gelatinas.⁽³⁰⁾
- Origen Microbiano: Las gomas de origen microbiano son producidas por un amplio numero de microorganismos, tanto gram positivos como gram negativos.⁽⁹²⁾

Se debe hacer mención de que algunos microorganismos tienen la capacidad de secretar más de un polisacárido diferente, en la Tabla 3 se enlistan las gomas de origen microbiano más conocidas, así como tipo y fuente de obtención.

Tabla 3. Fuentes de obtención de polímeros o gomas comerciales.

GOMA MICROBIANA	TIPO	MICROORGANISMO PRODUCTOR DEL POLISACARIDO.
Dextrana	Neutro	<i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Streptococcus viridans</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . ^(34,54)
Xantana (a)	Aniónica	<i>Xanthomonas campestris</i> . ^(30,34,39,70)
Curdian	Neutro	<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i> . ^(30,34,39,70)
Gelana (b)	Aniónica	<i>Pseudomonas elodea</i> ATCC 31461. ^(30,34,39,70)
Glucano de levadura de panificación.	Neutro	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ^(30,34,60,70)
Putulana	Neutro	<i>Aerobasidium pullulans</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> . ^(30,34,70)
Alginato microbiano		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> . ^(30,39,70)
Escleroglucano (c)	Neutro	<i>Sclerotium glucanicum</i> . ^(30,39,70)
Zanflo		<i>Erwinia tahitica</i> . ⁽³⁹⁾
Celulosa bacteriana		<i>Acetobacter xylinum</i> . ⁽³⁰⁾
PS7		<i>Beijerinckia indica</i> var. <i>myxogenes</i> (<i>azotobacter indicus</i>).
PS10, PS21, PS53		<i>Erwinia tahitica</i> . ⁽³⁰⁾
PS60 (b)		<i>Pseudomonas elodea</i> . ⁽⁴⁷⁾
S-119		<i>Agrobacterium radiobacter</i> ATCC 31643. ^(39,60)
S-130	Aniónico	<i>Alcaligenes</i> ATCC 31555. ^(39,60,70)
S-194	Aniónico	<i>Alcaligenes</i> ATCC 31961. ^(39,60,70)
S-198		<i>Alcaligenes</i> ATCC 31853. ^(39,60)
Levan (d)		<i>Acetobacter</i> , <i>Achrobacter</i> spp, <i>Aerobacter levanicum</i> , <i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Arthrobacter (corynebacterium) spp</i> <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Azotobacter indicus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Phytobacterium vitrosium</i> , <i>Pseudomonas prunicola</i> , <i>Serratia kiliensis</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Xanthomonas pruni</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> . ⁽⁶²⁾

(a) La goma xantana también es conocida en comercial como: Keltrol, Keizan o Rhodogel.

(b) La goma Gelana y la goma PS60, son sinonimos de la goma Gelrite utilizada como sustituto de agar.

(c) El Escleroglucano también es conocido como Polytran en su forma comercial.

(d) La goma Levan es el mejor ejemplo de que algunas gomas microbianas son producidas por un amplio número de microorganismos diferentes.

2.4 Biopolímeros microbianos

Un biopolímero es una macromolécula que es obtenida a partir de microorganismos por lo que las proteínas, el ADN y los polisacáridos son algunos ejemplos importantes. Estos biopolímeros son a menudo producidos en condiciones ambientales específicas, o pueden funcionar como una reserva de carbono y/o energía.^(30,35)

El Centro Cooperativo de Investigaciones (CRC) para los biopolímeros industriales de plantas ha sido formado para crear junto con expertos, otras disciplinas para la producción de polisacáridos de alta calidad con propiedades específicas tal y como establecen los requerimientos industriales. Para este fin, ya se cuenta en la actualidad con plantas piloto para producir polisacáridos con características específicas, ya sea para su uso como espesantes, emulsificantes, gelificantes, entre otros.⁽²⁵⁾

2.5. Polisacáridos microbianos.

Los polisacáridos son electrolitos aniónicos por virtud del grupo carboxilo (COO^-) y ésteres de sulfato (SO_3) en sus grupos reactivos.⁽³⁰⁾

La síntesis de polisacáridos extracelulares ha sido observada en ciertos cultivos bacterianos desde 1880. debido al incremento en la viscosidad de soluciones acuosas, lo que nos indica la liberación de los polisacáridos en forma lenta.

Los polisacáridos pueden ser clasificados de acuerdo a su composición química y estructura. En esta clasificación, los oligosacáridos que se forman de un solo tipo de monosacárido se denominan homoglicanos; los que se forman de dos, tres o más monosacáridos son determinados heteroglicanos con prefijos de di-, tri-, y también designados con el número de los diferentes tipos de azúcares.⁽⁵⁴⁾

En los últimos tiempos, los avances tecnológicos en biología molecular han creado la posibilidad de manipular las características de los polisacáridos, y con estos avances, los conocimientos de superficie celular han sido mejorados, aumentando sus aplicaciones comerciales.^(40,92)

2.5.1. Distribución de los polisacáridos en los microorganismos.

Los polisacáridos son constituyentes normales de todas las células microbianas, incluyendo bacterias, levaduras y mohos. Estos polisacáridos, que representan numerosas clases de compuestos, están presentes en forma importante en alguna o todas partes de la célula. Su localización puede ser dentro de la célula o fuera de la misma, en donde los polisacáridos proveen una base para su clasificación⁽⁵³⁾.

La distribución morfológica de los polisacáridos es como sigue:

Citoplasma: El glicógeno a menudo ocurre como una fuente de reserva de energía dispersa en solución a lo largo del citoplasma de bacterias y levaduras.

Pared Celular: Los polisacáridos que se encuentran en la pared celular proveen forma, rigidez y constituye una barrera de protección bajo condiciones naturales que aparentemente son esenciales para la viabilidad celular. Algunos ejemplos son la mureína (compuesta por cadena no ramificadas con N-acetil glucosamina en forma alternada único derivado del ácido murámico), también se pueden presentar nuevos compuestos como los ácidos teicoicos, glucomanas, quitina, etc.

Cápsula: La cápsula es una cubierta de elevada hidratación, un material gelatinoso que se adhiere externamente a la pared celular. Los materiales capsulares pueden ser designados exocelulares.

La cápsula no es esencial para la viabilidad celular, pero puede servir para preservar al microorganismo en su hábitat natural.

Extracelular: En adición a la producción de polisacáridos que se encuentran como constituyentes de la estructura celular, algunos microorganismos también sintetizan abundantes cantidades de polisacáridos extracelulares que se dispersan libremente en cultivos fluidos y no atacan a las células microbianas. Los microorganismos que producen polisacáridos extracelulares pueden o ser encapsulados.⁽⁵³⁾

2.5.2. Funciones de los polisacáridos microbianos.

Los polisacáridos extracelulares probablemente protegen a los microorganismos contra varias condiciones ambientales adversas (Wilkinson, 1958). Por ejemplo, mantener un mínimo de humedad en su medio ambiente inmediato, principalmente en sitios donde hay baja humedad. También la cápsula asociada con el polisacárido extracelular provee una definitiva protección contra bacteriofagos, simplemente por servir como una barrera física. Este hecho fue sostenido por Maxted (1952) para *Streptococcus* grupo A. La cápsula también provee una protección parcial contra la fagocitosis y al ataque por amibas (Wilkinson, 1958).⁽⁶⁰⁾

Se piensa que los polisacáridos extracelulares tienen funciones como la de acumulación de nutrientes, ataque a superficies, protección del medio ambiente, mantiene la tensión de oxígeno y patogenesis. Sin embargo, recientes trabajos muestran que este puede tener más papeles específicos, como en el caso de las interacciones planta-bacteria.⁽⁴⁹⁾

Se han propuesto varias funciones para los EPS bacterianos. Estas pueden ser divididas dentro de cuatro grupos funcionales:

- a). - Como una barrera física: Protección a la desecación, depredación y sistema inmune - fijación del complemento, resistencia a toxinas, antibióticos y venenos.
- b). - Como una respuesta a la tensión ambiental: Secuestro e importación de iones cargados, producción y poder de reducción.
- c).- Reconocimiento e interacción célula - célula: Simbiosis planta - bacteria, formación de nódulos y microcolonias, establecimiento de larvas invertebradas.
- d).- Adhesión y formación de biopelículas: Inmovilización dentro de superficies ricas en nutrientes, disociación de reducción de nutrientes.⁽⁶³⁾

2.6. Exopolisacáridos.

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros de carbohidratos que son secretados por una gran variedad de bacterias. Estos pueden estar asociados con la pared celular o pueden estar relacionados fuera de las células en forma de limo extracelular.⁽⁴⁸⁾

Los EPS bacterianos pueden ser divididos en dos grupos basados en sus propiedades químicas y las condiciones bajo las cuales han sido sintetizados. Los heteropolisacáridos (y algunos homopolisacáridos) son generalmente compuestos de estructuras repetitivas y la mayoría son aniónicos. Los homopolisacáridos neutros son también comunes en bacterias. Las bacterias representativas de los gram positivos y los gram negativos producen leván (un homopolisacárido de fructosa) y una variedad de glucanos, que incluyen dextranas y celulosa.⁽⁹²⁾

El EPS es producido por la mayoría de las bacterias gram negativas, algunas de las cuales invierten cerca del 70% de su energía en esta producción. Consecuentemente algunas especies desarrollan rápidamente sobre medios de laboratorio después de producir el EPS.⁽⁶³⁾

2.6.1. Proceso de obtención de exopolisacáridos microbianos a nivel de laboratorio.

Los microorganismos producen polisacáridos de tres tipos distintos: Extracelular, estructural y las formas Intracelulares. El desarrollo de los polisacáridos extracelulares se atribuye a la estructura gomosa de las colonias bacterianas sobre un medio sólido o causan incremento de la viscosidad en un medio líquido. Especialmente en las fermentaciones a gran escala, el marcado aumento en la viscosidad que se produce a medida que aumenta la concentración de polisacárido origina que descienda la velocidad de agitación, lo que da lugar a una reducción en la eficiencia de transferencia de masa y por lo tanto a la formación de un polímero de calidad heterogénea.^(20,60)

En un matraz erlenmeyer, al cual se agita mecánicamente (generalmente de 200rpm), de manera continua, mientras se agita produce un remolino en el líquido, sin que este moje el tapón de algodón del matraz y se forma en las paredes del mismo, por la fuerza centrífuga, una capa delgada del medio a través de la cual se produce la aireación por difusión. Los matraces con agitación de 250ml de capacidad contienen normalmente de 25 - 60ml del medio, de manera que la profundidad que alcance se halla en proporción a la aireación que se desee, si bien los matraces de 100ml no suelen contener más de 10ml del medio de cultivo.⁽⁶⁷⁾

La recuperación del polímero del caldo de fermentación implica la precipitación por tratamiento con solventes orgánicos, con una sal o con un ácido. La bacteria productora queda atrapada en el polímero que precipita y es también separada del caldo.⁽²⁰⁾

Cuando la fermentación se termina, el cultivo generalmente tiene un pH cercano a 6.0. El líquido es diluido con 2.5ml de agua; después de agregar cloruro de potasio, etanol (u otro solvente), y cloroformo que se adicionan sucesivamente con agitación vigorosa para dar concentraciones respectivas de 1% (w/v), 30% (w/v), y 0.7% (w/v), basadas en el agua total. Después se deja reposar la mezcla por una hora para inactivar a la bacteria, posteriormente se centrifuga para remover a las células bacterianas y se incrementa la concentración de etanol al 55% que causa la precipitación del polisacárido. ⁽⁵³⁾

2.6.2. Producción de exopolisacárido (EPS) por *Rhizobium*.

Las bacterias del género *Rhizobium* presentan una relación simbiótica con la planta huésped. Aunque existen bacterias patógenas que también producen exopolisacáridos los cuales juegan un papel importante en la interacción con la planta. Algunos de estos son heteropolisacáridos que contienen subunidades repetidas de monosacáridos principalmente, algunos otros son homopolisacáridos tales como, Alginato, Leván, Celulosa y Glucano. ⁽⁴⁸⁾

Las pocas especies de *Rhizobium* productoras de EPS con una estructura de unidades repetidas se han dividido en dos rangos de peso molecular, un polímero de muy alto peso molecular (HMW) y un oligómero de bajo peso molecular, los cuales pueden ser obtenidos de él sobrenadante de los medios de cultivos. ⁽⁴⁸⁾

Estos polisacáridos pueden ser divididos dentro de dos grupos: Los polisacáridos de tipo I que son excretados por la especie de *Rhizobium meliloti* y por *Agrobacterium*; están compuestos de D-glucosa, D-galactosa, ácido pirúvico y ácido succínico en un rango molar 7:1:1. Los polisacáridos de tipo II son excretados por las especies de *Rhizobium leguminosarum*, *R.trifolii* y *R.phaseoli*, y esta compuesto de D-glucosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico y ácido pirúvico en un rango molar 5:1:2:2. ⁽⁴⁷⁾

Estas bacterias producen cantidades abundantes de heteropolisacáridos ácidos. Estos heteropolisacáridos son polisacáridos que contienen de 7, 8 o 9 residuos, y son similares en su composición a los producidos por otras bacterias gram- negativas.⁽⁴⁷⁾

2.6.3. Aplicaciones de los exopolisacáridos microbianos.

Los exopolisacáridos microbianos tienen gran uso en la industria, debido a su capacidad de alterar o modificar las propiedades reológicas de las soluciones acuosas. Las soluciones resultantes pueden tener naturaleza newtoniana, pseudoplástica o tixotrópica.⁽⁹³⁾

En la Tabla 4 se enlistan los principales usos industriales de algunos polisacáridos microbianos y otras gomas conocidas, Los polisacáridos microbianos no están sujetos a variaciones en las condiciones climáticas. Además de la estabilidad en el suministro, otros factores favorecen a los polisacáridos microbianos. A menudo los polisacáridos microbianos sirven para productos comerciales superiores a los formulados con otras gomas.⁽⁵⁹⁾

Los polisacáridos son usados comercialmente como espesantes, agentes para suspensiones, o estabilizantes de sistemas acuosos. Pueden ser usados para producir geles y actuar como agentes floculantes, formadores de películas, lubricantes y reductores de la fricción.⁽⁵⁹⁾

Tradicionalmente, el uso industrial de los polisacáridos ha sido derivado de fuentes de algas y plantas, pero en forma más reciente los polisacáridos microbianos se han incrementado en cuanto a su uso.⁽⁵⁹⁾

Tabla 4. Aplicaciones de polisacáridos.

MERCADO Y APLICACIONES.	PROPIEDADES.	POLISACARIDOS.
AGRICULTURA. - Pesticidas fluidos. - Fertilizantes líquidos. - Suplementos líquidos para comida.	Control de dirección en suspensiones. Suspensiones. Suspensiones.	Goma Xantana. Goma Xantana. Goma Guar, Goma Xantana.
DETERGENTES.	Antiredeposición, antisuelo.	Carboximetilcelulosa.
PETROLEO. - Limo para taladros. - Favorece la recuperación de petróleo por polímeros fluidos. - Estimulación de fractura hidráulica. - Acidificación.	Viscosidad, suspensiones. Viscosidad. Suspensiones, pérdida de fluidez, reducción de la viscosidad por química enzimática, rompimiento, cruzamiento. Suspensiones, Estabilización de ácidos fuertes a temperaturas elevadas	Goma Xantana, Eteres de celulosa. Goma xantana. Goma Hidroxipropil Guar, Hidroxietilcelulosa, Goma Xantana, Carboximetilcelulosa. Goma Xantana
PINTURA: - Industria de la venta de látex. - Capas de recubrimiento. - Recubrimientos industriales	Reología Suspensiones.	Hidroxietil celulosa, Metilcelulosa, Biopolímeros microbianos
PAPEL. - Uniones finales de encuadernación. - Capas de recubrimiento. - Tamaños de superficie. - Tableros particulados y corrugados.	Formación del pegado auxiliar Reología. Formación de películas, pérdida de agua, Impresión. Pegamento.	Almidón modificado, derivados de goma guar, goma locust bean y goma karaya. algina, carboximetilcelulosa. almidón, almidón modificado y algina.
FOTOGRAFIA.	Recubrimiento antiestático, extensiones.	Sulfato de celulosa de sodio.
POLIMERIZACION. - Emulsiones - Suspensiones.	Coloide protectoro. suspensiones.	Hidroxietilcelulosa. Goma Xantana.
GELES DESODORANTES PARA HABITACION.	Geles estables.	Carragenina.

2.6.4. Ventajas y desventajas de los exopolisacáridos microbianos.

Las gomas obtenidas mediante procesos microbianos tienen ciertas ventajas respecto de las que se extraen de fuentes naturales como son las de algas o plantas. En primer lugar su producción no depende de condiciones climáticas, contaminación o fallas en las cosechas. Por otra parte, los productos son menos susceptibles a variabilidad en su calidad y su producción puede ser controlada cuidadosamente.^(8,21)

Las gomas microbianas tienen como principal desventaja su elevado costo. Esto se debe a que los procesos para producirlos son intensivos en capital y en energía y en general, debido a las elevadas viscosidades que se logran, la concentración en la que se pueden obtener es relativamente baja.^(8,21) Además de que no tienen procesos industriales para su obtención, ya que es más barato obtener de otras fuentes, pero estas gomas microbianas pueden ser más baratas si se mejoran sus procesos de obtención y producción.

2.7. Agar bacteriológico.

El agar es un complejo polisacárido soluble en agua. De acuerdo a la farmacopea de los Estados Unidos, el agar es un coloide hidrofílico extraído de ciertas algas marinas de la clase *Rhodophyceae*. Generalmente son producidos dos tipos de agar, uno de la especie *Gelidium* y otro de la especie *Gracilaria*.^(21,91)

El agar puede ser obtenido de varios géneros y especies de algas marinas rojo-púrpuras, en donde este produce como un carbohidrato estructural de la pared celular y probablemente también cumple una función en el intercambio iónico y procesos de dialisis de la alga.⁽⁹²⁾

Estas algas marinas son encontradas en zonas de más de 40 metros de profundidad. Se desarrollan más en áreas turbulentas y de marcada altura.⁽⁹¹⁾

Trabajos preliminares sobre la estructura del agar muestran que este contiene dos componentes, uno que forma un fuerte gel denominado Agarosa (Agaran en nomenclatura preferente) y una fracción no gelificante denominada Agaropectina. El agaran (agarosa) forma una cadena lineal que es la imagen especular de las carrageninas iota (ϕ) y kappa (κ), miembros de las algas marinas rojas y esta compuesto de unidades repetidas alternadas de β -D-Galactopiranosil y 3,6-Anhidro, α -L-Galactopiranosil, unidas por enlaces 1 \rightarrow 3.^(21,91)

Las principales impurezas que pueden encontrarse en los agares comerciales son gomas no agar, compuestos nitrogenados (Proteínas), sales solubles e insolubles, azúcares libres, metales pesados y ocasionalmente almidón. El manitol ha sido detectado en extractos metanólicos de agar.⁽⁹¹⁾

El agar es de gran importancia en microbiología. El agar ideal es bajo en sustancias metabolizables o microbianas, detritus y esporas termorresistentes, tiene una temperatura de gelificación de 35-40°C y una temperatura de fusión de 75-80°C; es relativamente insoluble en agua fría se disuelve en agua caliente, presenta una fuerza de gel adecuada para su uso en los medios microbiológico, resistencia, claridad óptica y estabilidad. En bajas concentraciones, el agar previene la entrada de oxígeno dentro de medios líquidos, por lo que es utilizado en la elaboración de cultivos de anaerobios viables en caldos expuestos al aire.^(21,91)

Pocos organismos metabolizan el agar o elaboran enzimas agarolíticas, por ejemplo: *Vibrio purpureus*, *Vibrio agarlicuefaciens*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, especies de *Cytophaga* y ciertas Diatomeas son la excepción.⁽⁹¹⁾

A 25°C. el Agar de alta pureza es prácticamente insoluble en agua. Es ligeramente soluble en etanolamina y soluble en formamida. El agar es único entre los polisacáridos, ya que su gelificación ocurre a una temperatura por debajo de la temperatura de fusión del gel. La temperatura de fusión del gel de agar esta en función de su concentración y su peso molecular. Los geles de agar y agaroides con 1.5% de sólidos funden de 60 - 95°C.⁽⁹¹⁾

La producción de agar de algas marinas muestra marcadas diferencias en su calidad basadas sobre las especies de alga, cepa, condiciones de cultivo y cambios climáticos en el medio ambiente. La posibilidad de tener agares con buenas propiedades de gelificación es principalmente debido al tipo de algas marinas usadas, efectos climáticos y procesos de extracción. Algo que no ocurre en el caso de los biopolímeros de origen bacteriano.^(85,86)

2.8. Sustitutos de agar.

Desde Koch que fué el primero en introducir el agar como agente gelificante en medios bacterianos en 1882, este se ha convertido en el primer material para medios sólidos por todo el mundo. Sin embargo, el elevado costo y la reciente escasez han tenido más facilidad para el uso de sustitutos de agar en forma deseable.^(1,50,90)

La calidad deseable de un agente solidificante para una medio sólido incluye solidez sobre un rango de temperatura de desarrollo bacteriano, resistencia a la digestión por bacterias, ausencia de sinéresis, transparencia y la habilidad de formar un coloide reversible. El medio debe ser bastante firme pero que permita el uso de técnicas comunes tales como rayado de cultivos, placas y replicación. Además, esto es de gran importancia si el agente gelificante es relativamente barato y fácil de obtener.⁽⁹⁰⁾

Idealmente un medio bacteriológico sólido debe cumplir con los siguientes factores: 1) Se pueden realizar pruebas abajo de 40°C; 2) Poseen un declive a 37°C; 3) Muestran muy poca sinéresis; 4) Forman una superficie firme para ser forzada mediante fractura; 5) Desarrolla un soporte bacteriano que no posee efectos de promoción o inhibición del desarrollo; 6) Requieren un bajo peso o concentración en volumen por razones económicas y prácticas. Todas las gomas semejantes al agar pero que no cumplen todas las especificaciones de esta definición son determinadas agaroides.^(1,90)

De los sustitutos de agar bacteriológico conocidos se pueden citar, las sales de K²⁺ de carragenina, una alga marina conocida como *Chondrus crispus* o *Irish moss*, la goma gelana y gelrite producida por la especie de *Pseudomonas elodea*, La goma xantana, obtenida de *Xanthomonas campestris* y la goma PS60 entre otras.^(22,26,33,41,50,73,79,90)

3.0. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL.

◆ Evaluar la posibilidad de utilizar el biopolímero obtenido de *Rhizobium loti* como posible sustituto de agar bacteriológico en medios de cultivo microbiológicos.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

◆ Obtención del biopolímero de *Rhizobium loti*, a partir de dos diferentes fuentes de carbono.

◆ Evaluar el biopolímero como un posible sustituto de agar bacteriológico en un medio de cultivo control (AST).

◆ Obtener algunas propiedades físicas, tanto para el gel formado (punto de gelificación); como para el EPS obtenido (Punto de carbonización).

◆ Determinar algunas de las características de textura del gel formado (dureza o fuerza del gel).

4.0. METODOLOGIA

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Microbiología Industrial, ubicado en la planta baja de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM.

La cepa bacteriana utilizada para este trabajo fue *Rhizobium loti*, el cual pertenece a la colección de la cátedra de Rhizobiología.

4.1 MATERIALES Y METODOS

4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

CEPAS BACTERIANAS

- *Rhizobium loti*.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- *Escherichia coli* ATCC 10536.
- *Vibrio cholerae* 01 Inaba.
- *Micrococcus luteus* ATCC 9341.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

4.1.2 MATERIAL DE CRISTALERIA

- Cajas de Petri de 100 X 15 mm.
- Cajas de Petri de 60 X 15mm.
- Matraces Erlenmeyer de 500 y 1000ml.
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10ml.
- Tubos de Kahr
- Tubos de fondo redondo para centrifuga de 50ml.

4.1.3 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

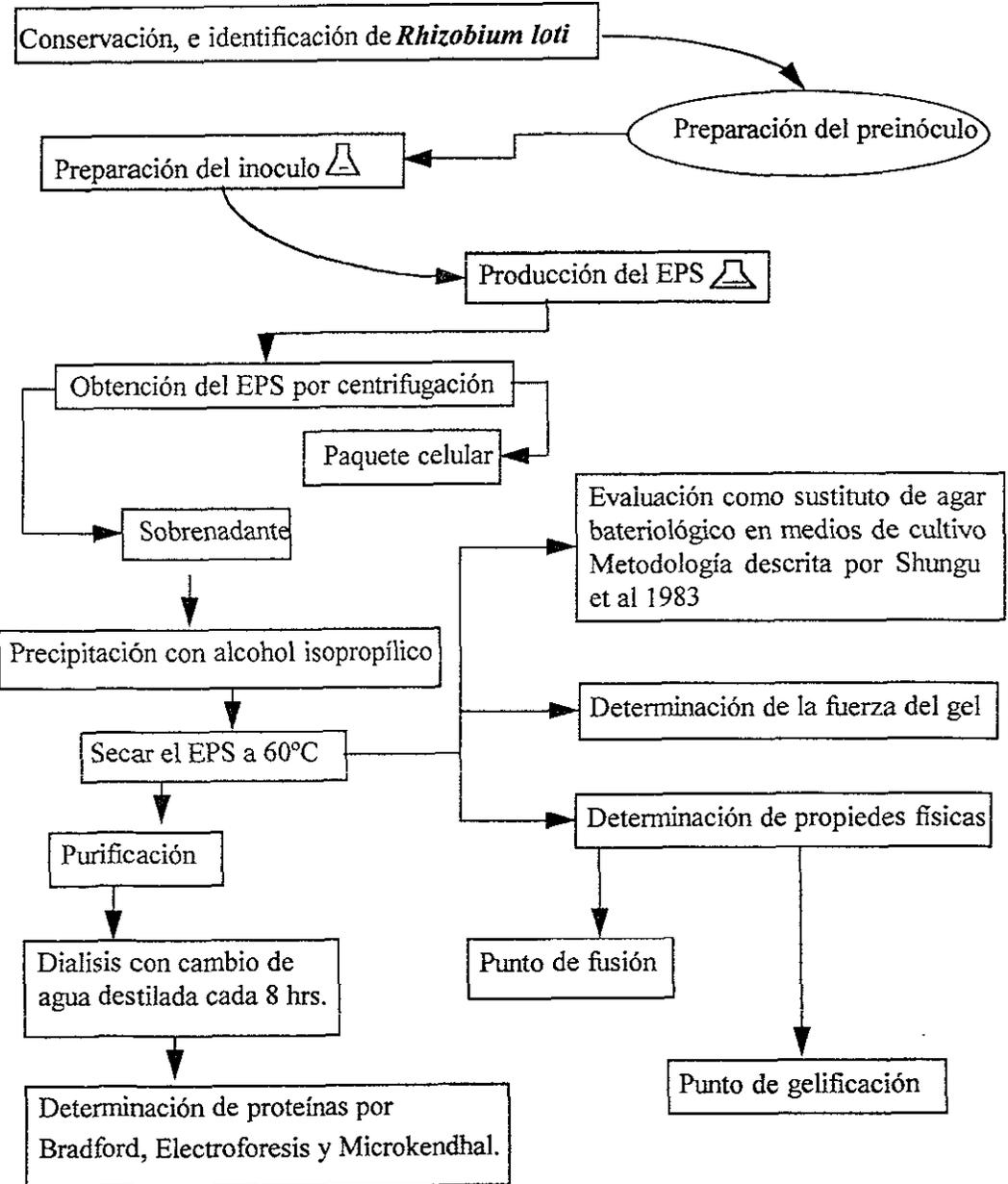
- Rojo congo.
- Cloruro de sodio.
- Cloruro férrico.
- Extracto de levadura.
- Sulfato de magnesio.
- Fosfato de potasio dibásico.
- Manitol.
- Sacarosa.
- Agar bacteriológico.
- Carbonato de calcio.
- Sulfato de manganeso.
- Alcohol isopropílico.
- Peptona de soya.
- Peptona de caseína.
- Agar soya tripticaseína.

EQUIPO:

- Incubador con agitación (New Bruns Wick Scientific Co. Inc).
- Centrifuga Sorvall (RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge).
- Incubadora.
- Dinamómetro (Digital Force Gauge Shimpo FG-2.5R Japan).
- Aparato de Fisher (Mel-Temp II Inc. USA).
- Termómetro graduado
- Potenciómetro.

4.2 DIAGRAMA DE FLUJO

Producción y aplicación de EPS de *Rhizobium loti*



4.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.3.1 Conservación e identificación de la cepa bacteriana

La cepa bacteriana fue sembrada en cajas petri con medio de cultivo rojo congo, el cual se utilizó para llevar a cabo la purificación de *Rhizobium*, el medio esta constituido por rojo congo 0.002g/l; cloruro de sodio 0.26g/l; cloruro férrico 0.1g/l; extracto de levadura 1.0g/l; Sulfato de magnesio 0.76g/l; fosfato de potasio 1.66g/l; manitol 20g/l y agar bacteriológico 20g/l. Una vez inoculadas, las cajas se incubaron a 30°C por 5 días.

La identificación de la cepa de trabajo se realizó en base a las siguientes pruebas bioquímicas:

1. Morfología bacteriana y colonial.
2. Tinción de Gram.
3. Motilidad.
4. Reacción a la leche tornasolada.
5. Producción de ácido.
6. Nodulación en *Lotus corniculatus*.
7. Aislamiento de los nodulos de *Lotus corniculatus*.

4.2 Obtención del exopolisacárido

Una vez realizada la identificación de la cepa bacteriana, esta se sembró en cajas petri con medio de cultivo base para el crecimiento del género *Rhizobium* compuesto por (cloruro de sodio 0.45 g/l; cloruro férrico 0.15 g/l; extracto de levadura 1.5 g/l; sulfato de magnesio 1.01 g/l; fosfato de potasio dibásico 1.16 g/l; sacarosa o manitol 10 g/l y agar bacteriológico 15 g/l). Estos medios se incubaron a 30°C por 5 días.

Una vez crecida la bacteria se preparó un inóculo en 2 matraces Erlenmeyer de 1000ml con 300ml de medio de cultivo líquido. Estos matraces fueron colocados en un incubador rotatorio (equipo New Bruns Wick Scientific Co. Inc) durante 3 días a 30°C con agitación constante de 200 rpm. Como se observa en la Figura 1.

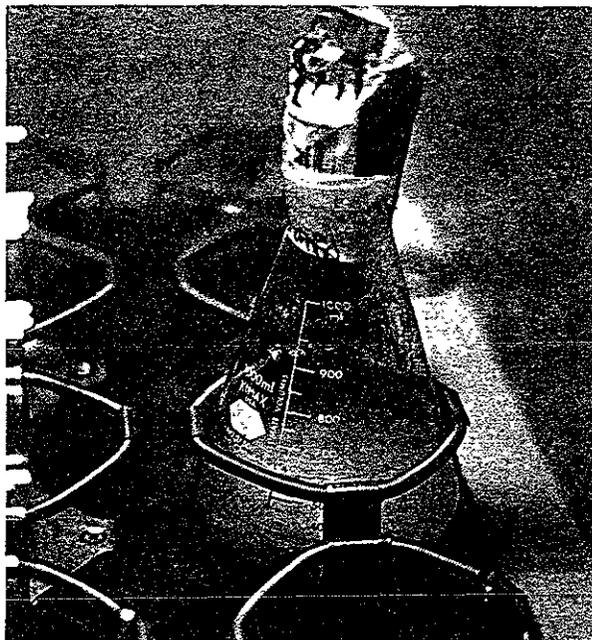


Figura 1. Incubación de *Rhizobium loti* para la producción del exopolisacárido en un incubador rotatorio.

Finalmente se prepararon 15 matraces Erlenmeyer de 1000ml con 300ml de medio de cultivo líquido optimizado, compuesto por (cloruro de sodio 0.26 g/l; cloruro férrico 0.1 g/l; extracto de levadura 1.5 g/l; sulfato de magnesio 0.4 g/l; fosfato de potasio dibásico 1.66 g/l; sacarosa o manitol 10 g/l; carbonato de calcio 1.5 g/l y sulfato de manganeso 120 μ moles) a pH de 8.0; a los cuales se les agregó 10ml del inóculo anterior e incubados a 30°C y agitación constante de 200 rpm durante 11 días, al término de los cuales se obtiene la máxima producción del biopolímero.

Para producir el exopolisacárido se prepararon medios de cultivo líquidos, utilizando dos fuentes de carbono diferentes, las cuales fueron manitol y sacarosa a las mismas concentraciones (1.5%), manteniendo los demás componentes del medio de cultivo constantes, así como las condiciones de temperatura y agitación.

4.3 Aislamiento del exopolisacárido

Al terminó del tiempo de incubación, el contenido de cada matraz fue diluido con agua destilada en relación 1:3 respectivamente y centrifugado a 20,000 g por 15 min. a 4°C en una centrifuga RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, ver Figura 2. El paquete celular fue separado del sobrenadante, al cual se le adicionó alcohol isopropílico frío en proporción 1:3 respectivamente para precipitar al exopolisacárido. Finalmente se separo al exopolisacárido del alcohol isopropílico y se seco a 60° C en una estufa, para luego obtener su peso.



Figura 2. Centrifuga con refrigeración, utilizada para la separación del paquete celular del sobrenadante que contiene al exopolisacárido.

4.3.1 Determinación de la cantidad de biopolímero obtenido a partir de dos diferentes fuentes de carbono

Para obtener la producción del biopolímero a partir de las dos fuentes de carbono, se tomó un matraz Erlenmeyer que había sido incubado por 11 días, 30°C a 200 rpm. El contenido se centrifugó, de acuerdo al punto 4.3 y se colocó el biopolímero en un papel filtro para finalmente secarlo a 60°C y obtener la cantidad del biopolímero en gramos por litro de cada una de las fuentes utilizadas.

4.4 Purificación del exopolisacárido

El exopolisacárido obtenido fue dializado por 4 días con cambios de agua destilada cada 8 hrs. y agitación constante. Al final se determinó la presencia de proteínas por la técnica de Bradford, Electroforesis y Microkendhal⁽⁶²⁾.

4.5 Aplicación del exopolisacárido como sustituto de agar bacteriológico.

El estudio del exopolisacárido como agar bacteriológico se realizó mediante la metodología descrita por Shungu et al, 1983. La cual consiste en la preparación de 2 medios de cultivo (Medio de cultivo control (AST) y los medios de cultivo experimentales (ME1 y ME2), los cuales contienen al exopolisacárido obtenido de *Rhizobium loti* a partir de las dos diferentes fuentes de carbono).

4.5.1 Preparación del medio de cultivo control

Se prepararon cajas con agar soya tripticaseína como medio de cultivo control (MC) que contiene peptona de soya 5g/l; peptona de caseína 15 g/l; cloruro de sodio 5g/l; agar bacteriológico 15g/l y agua destilada a un pH de 7.0.

4.5.2 Preparación de los medios experimentales ME1 y ME2.

Se prepararon cajas petri con los medio experimentales ME1 y ME2 los cuales contienen peptona de soya 5g/l; peptona de caseína 15g/l; cloruro de sodio 5g/l; y agua destilada a un pH de 7.0, sustituyendo al agar bacteriológico por el exopolisacárido de *Rhizobium loti* obtenido a partir de manitol(ME1) y sacarosa(ME2) como fuentes de carbono, a una concentración de 15 g/l.

4.5.3 Realización de cuentas viables de acuerdo al método de Milles y Mishra.

Se realizó la evaluación del crecimiento bacteriano por medio de cuentas viables, empleando para ello diferentes cepas bacterianas de interés clínico como son: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 10536; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Vibrio cholerae* 01 Inaba; *Vibrio cholerae* Inaba humana; *Micrococcus luteus* ATCC 9341 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Las cuentas viables se realizaron por triplicado a partir de una suspensión bacteriana igual al tubo 0.5 del nefelometro de MacFarland, inoculando varios tubos de ensayo con solución salina fisiológica estéril, como se ilustra en la Figura 3. De los tubos con las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} se tomo 0.1 ml y se inocularon en cajas petri con agar soya tripticaseína (Medio control) y en los medios experimentales ME1 y ME2 haciendo un sembrado masivo con una varilla de vidrio en forma de "L" e incubando a 37°C por 24hrs. Esto se realizó con todas las cepas bacterianas de interés clínico empleadas.

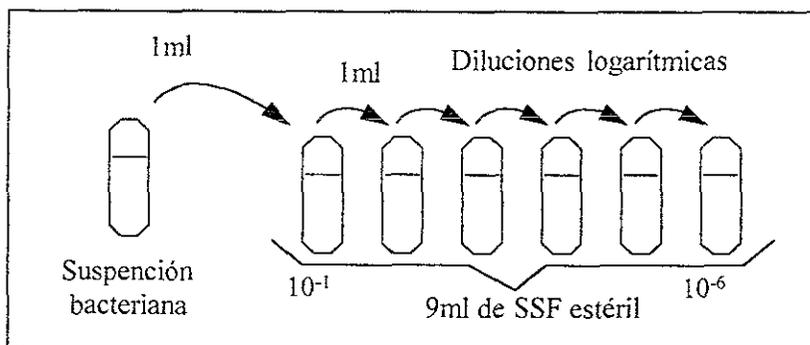


Figura 3 Preparación de las diluciones logarítmicas, a partir de la suspensión bacteriana

Una vez que se cumplió el tiempo de incubación se realizó la comparación morfológica y la pigmentación colonial. Finalmente se realizó el conteo bacteriano para obtener las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

4.5.4 Determinación de la fuerza del gel.

Para determinar la fuerza del gel se prepararon cajas de petri de 60 X 15mm, las cuales se llenaron hasta el borde con una solución de agar bacteriológico únicamente, con una solución del exopolisacárido obtenido de manitol y sacarosa también solos; finalmente se prepararon otras cajas con el medio control (agar soya tripticaseína) y con los medios experimentales ME1 y ME2 con la composición ya antes descrita. Una vez preparados los geles, se determinó la fuerza del gel, con la ayuda de un dinamómetro (Digital Force Gauge SHIMPO FG-2.5R. Japan), ver Figura 4; a 25°C y a una velocidad constante de 6-7seg. En cada gel preparado se realizaron 5 determinaciones, para finalmente hacer un análisis estadístico de los datos y obtener la fuerza del gel.

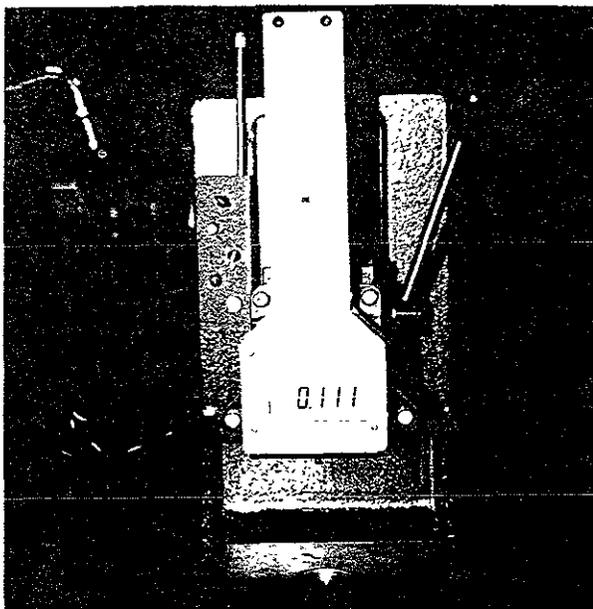


Figura 4. Equipo utilizado para la determinación de la fuerza del gel (Dinamómetro)

4.5.5 Determinación del punto de carbonización.

Se determinó el punto de carbonización en un aparato de Fisher (Mel-Temp II INC, USA), mostrado en la Figura 5; para el EPS obtenido de manitol y sacarosa como las dos fuentes de carbono utilizadas y para el agar bacteriológico, para esto se llenaron varios tubos capilares con cada una de las muestras antes mencionadas y se colocaron en el aparato de Fisher, aumentando la temperatura gradualmente. Realizando 5 repeticiones por cada muestra.

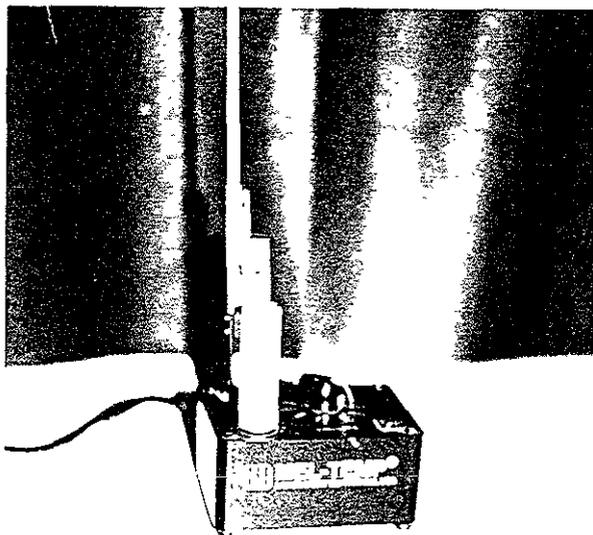


Figura 5. Aparato utilizado para la determinación del punto de carbonización (Fisher).

4.5.6 Determinación del punto de gelificación

Se prepararon una serie de 3 soluciones al 1.5% en tubos de ensaye del exopolisacárido obtenido del medio de cultivo conteniendo manitol, del exopolisacárido obtenido del medio de cultivo conteniendo sacarosa, del agar bacteriológico, del agar soya tripticaseína (medio control) y de los medios experimentales ME1 y ME2. Estas soluciones fueron autoclaveadas por 15min a 15lb de presión y a 121°C y dejando posteriormente enfriar las mismas a temperatura ambiente, colocando un termómetro dentro de cada una para obtener la temperatura a la cual la solución se gelifica completamente (Figura 6) y así obtener el punto de gelificación para cada sistema preparado.

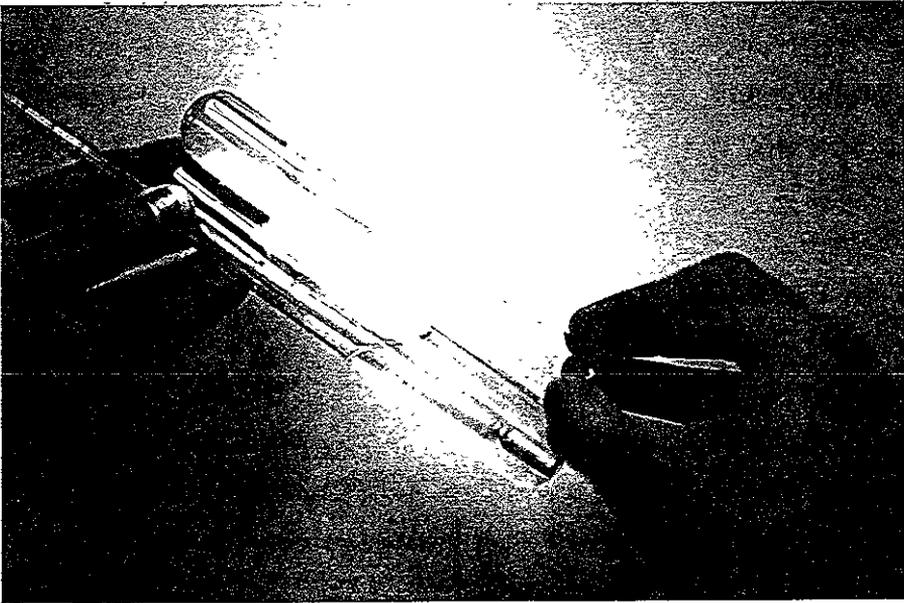


Figura 6. En esta fotografía se muestra la manera en la que se determino el punto de gelificación.

5.0. RESULTADOS

5.1 Conservación e identificación de la cepa bacteriana

Después de realizadas las pruebas de identificación para *Rhizobium loti*, encontramos que la prueba de la leche tornasolada es negativa en 31 días, es una bacteria que presenta motilidad, gracias a la presencia de flagelos peritricos o subpolares como ya se ha descrito en la literatura; es un bacilo gram negativo ya que toma el color de la safranina, las colonias son blancas, convexas, opacas con producción de un polisacárido extracelular, ver Figura (7). El aislamiento de *Lotus corniculatus* es positivo, al igual que la nodulación de *corniculatus* y la producción de ácido da positiva en 48 horas. ⁽¹³⁾

Finalmente y después de la identificación de la cepa de trabajo, se conservó en refrigeración a 4°C en placas con medio de cultivo base, para el crecimiento de *Rhizobium loti*.

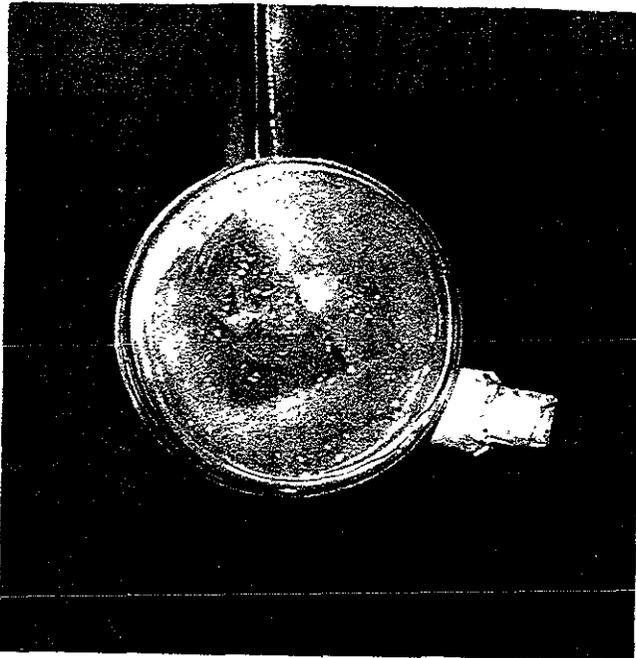


Figura 7. En esta fotografía se muestra las características morfológicas de *Rhizobium loti*

5.2 Rendimiento del exopolisacárido a partir de las fuentes de carbono utilizadas.

De la producción del exopolisacárido observamos que el rendimiento para el medio de cultivo que contiene manitol como fuente de carbono fue de 10.6 g/l en peso seco del exopolisacárido y que el medio de cultivo que contenía sacarosa como fuente de carbono solo proporcionó 9.45 g/l en peso seco, por lo cual podemos decir que el manitol es la mejor fuente de carbono, para la producción en *Rhizobium loti*, aunque se sabe que también se pueden utilizar otras fuentes de carbono como son glucosa y sacarosa. La mayor producción con manitol se debe principalmente a que existe una mejor afinidad por parte de *Rhizobium loti* hacia este carbohidrato ⁽¹³⁾

5.3 Evaluación del exopolisacárido como sustituto de agar bacteriológico.

De acuerdo a las cuentas viables obtenidas en UFC/ml para todas las cepas bacterianas utilizadas en los diferentes medios empleados se puede observar que no hay diferencias entre los medios experimentales ME1 y ME2 con respecto al medio control, excepto cuando usamos las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* (tablas 5 y 6) esto se debe a que el exopolisacárido obtenido de *R. loti*, no presenta alguna característica de inhibición o promoción del crecimiento bacteriano, es decir, no altera las condiciones de crecimiento de las bacterias.

Tabla 5. Cuentas viables del medio de cultivo control con respecto al medio experimental 1.

CEPAS	MC (UFC/ ml)	ME1 (UFC/ ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	110 x 10 ⁵	110 x 10 ⁵
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1.9 x 10 ⁶	2.2 x 10 ⁶
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	53 x 10 ⁵	29 x 10 ⁵
<i>E. coli</i> ATCC 10536	3.9 x 10 ⁶	2.8 x 10 ⁶
<i>Vibrio cholerae</i> 01 Inaba	19 x 10 ⁵	9.8 x 10 ⁵
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	600 x 10 ⁵	350 x 10 ⁵

MC: Medio de Control (AST).

ME1: Medio con exopolisacárido obtenido con fuente de carbono manitol.

Tabla 6. Cuentas viables del medio de cultivo control frente al medio experimental 2.

CEPAS	MC (UFC/ ml)	ME2 (UFC/ ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	110×10^6	120×10^6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	160×10^6	180×10^6
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	29×10^6	38×10^6
<i>E. coli</i> ATCC 10536	2.4×10^6	2.7×10^6
<i>Vibrio cholerae</i> Inaba humana	44×10^6	32×10^6
<i>E. coli</i> ATCC 25922	180×10^6	160×10^6

MC: Medio de Control (AST).

ME2: Medio con exopolisacárido obtenido con fuente de carbono sacarosa.

Como se puede observar en las figuras (8,9,10), el crecimiento bacteriano es muy similar en casi todos los medios utilizados, también se observó que la morfología colonial así como la pigmentación de las colonias bacterianas fueron semejantes en los medios de cultivo preparados. Vale la pena resaltar que estos resultados son solo el promedio de las repeticiones de las cuentas viables realizadas.

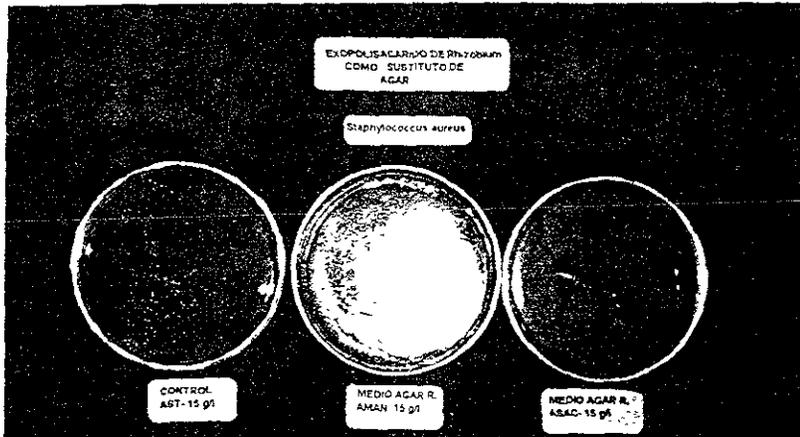


Figura 8 Morfología colonial de *Staphylococcus aureus*, en los diferentes medios utilizados



Figura 9. Comparación morfológica de *Escherichia coli* en los diferentes medios utilizados.

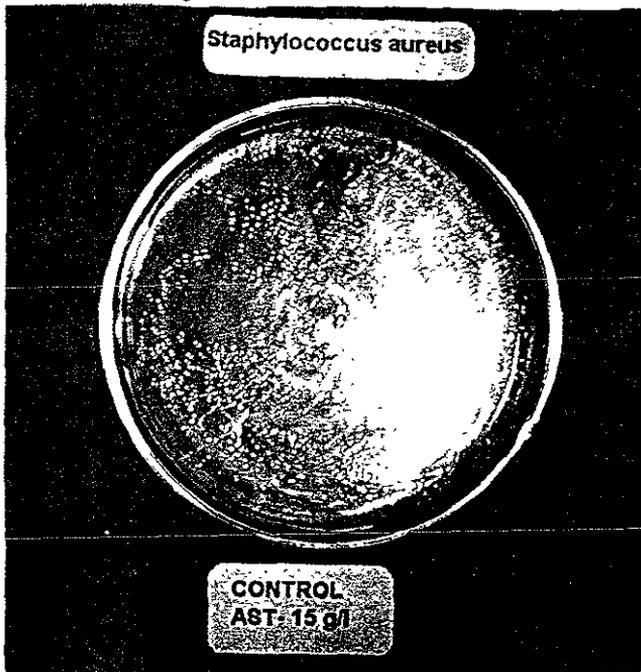


Figura 10. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en el medio de cultivo control

5.4 Determinación de la fuerza del gel.

La fuerza del gel se obtuvo a partir del análisis de 25 resultados por muestra del gel formado, en libras, unidades que proporciona el dinamómetro, ver figura 4. Estas unidades fueron convertidas a gramos por centímetro cuadrado (gr/cm^2) para finalmente obtener los resultados promedio mostrados en la tabla 7.

Tabla 7. Determinación de la fuerza del gel para todos los medios utilizados.

	MEDIA (lb)	DESVIACIÓN ESTANDAR (S)	C.V (%)	FUERZA DEL GEL g/cm^2
Agar Bacteriológico	0.492	0.048	9.825	398.021-484.079
EPS (manitol)	0.139	0.010	7.194	115.641-133.570
EPS (sacarosa)	0.114	0.006	5.263	96.816-107.573
MC (AST)	0.695	0.042	6.043	585.377-660.678
ME1 (manitol)	0.238	0.022	9.244	193.632-233.075
ME2 (sacarosa)	0.267	0.014	5.243	226.800-251.900

La fuerza de gel del agar bacteriológico es mayor que la del exopolisacárido obtenido tanto de sacarosa como de manitol. La presencia de los nutrientes, aumenta la fuerza del gel en el caso de los medios experimentales, siendo aun menor que la del medio control, y observando que con el exopolisacárido obtenido a partir de sacarosa aumentaba, ver Figura 11a. Pudo notarse que en los geles de agar bacteriológico y de medio control, el gel se fracturaba, mientras que en el caso de los geles con exopolisacárido solo y los geles con nutrientes (ME1 y ME2) el gel solo se comprimía pero sin fracturarse, lo que nos indica que son mas elásticos, como se observa en la figuras 11b,11c y 11d.

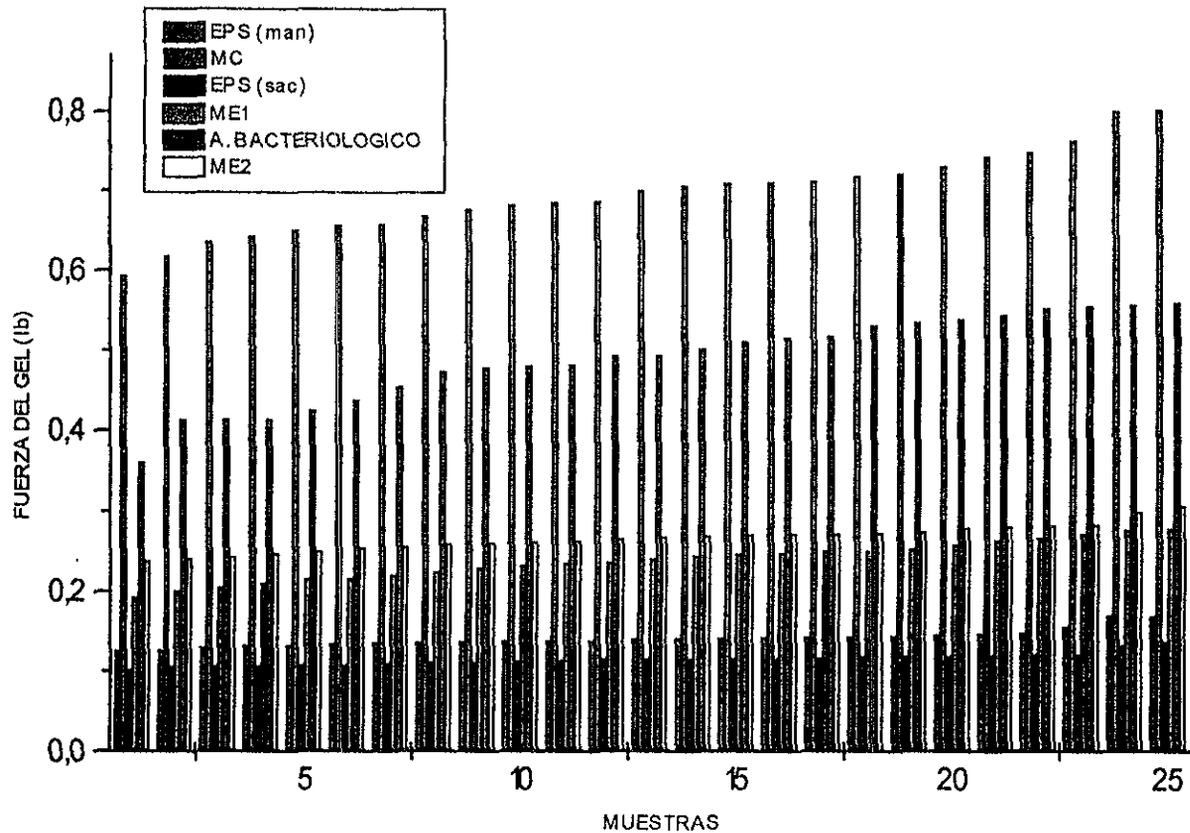


Figura 11a. La gráfica muestra la fuerza del gel obtenida para las diferentes muestras utilizadas.

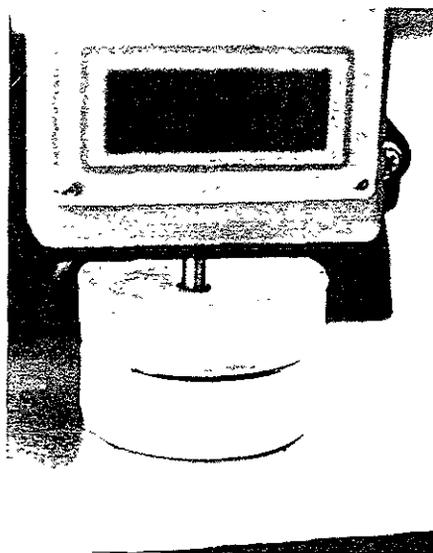


Figura 11b

Aquí se observa la obtención de la fuerza del gel del medio experimental.

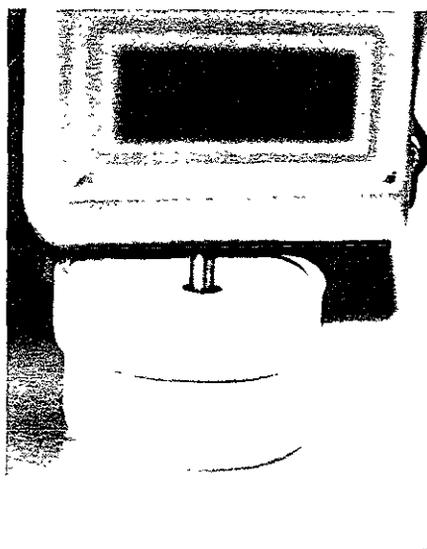


Figura 11c

Determinación de la fuerza del gel para el medio control.

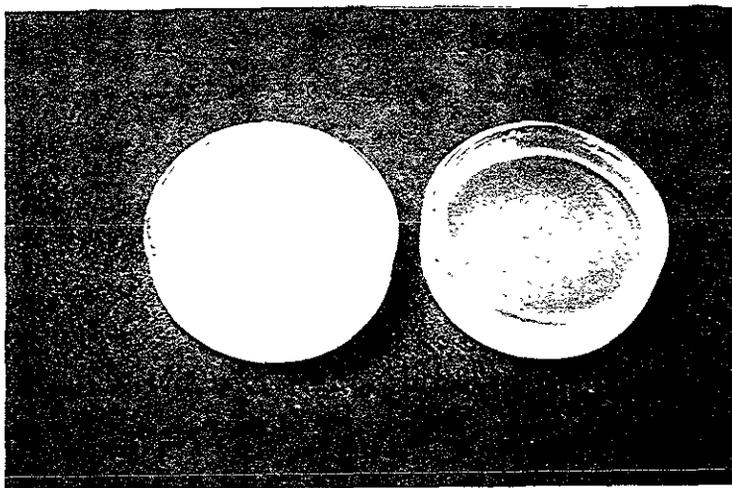


Figura 11d. Aspecto de las muestras de los gels al terminar la obtención de la fuerza del gel con el dinamómetro.

5.5 Evaluación del punto de carbonización.

Dentro de las propiedades físicas que se realizaron, esta la determinación del punto de carbonización para el agar bacteriológico, para el exopolisacárido obtenido de manitol y para el exopolisacárido obtenido de sacarosa. Obteniendo los resultados mostrados en la tabla 8.

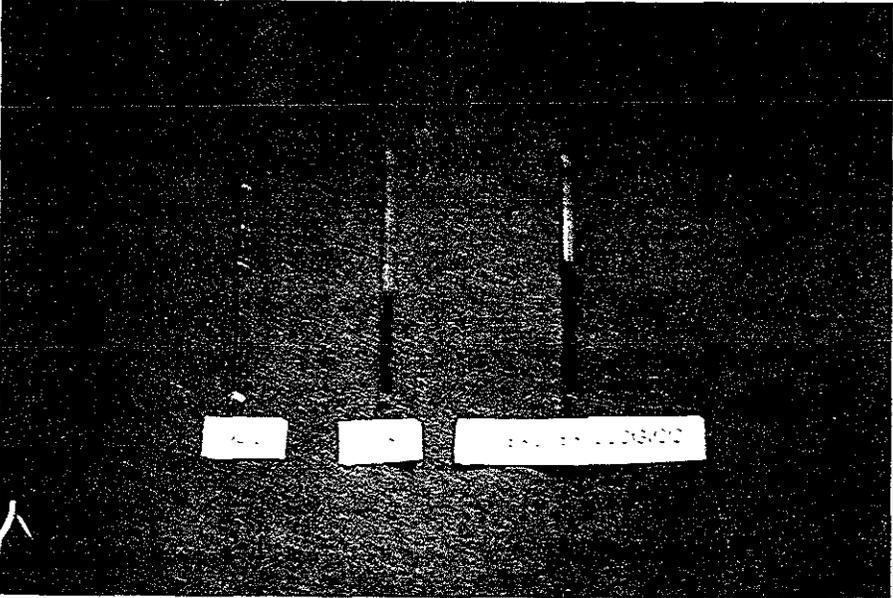


Figura 12. Comparación del punto de carbonización del exopolisacárido, agar bacteriológico, con respecto al punto de fusión del cloruro de sodio.

Se conoce que los compuestos de origen carbohidrato, no tienen punto de fusión, sino que presentan un punto de carbonización, que es lo único que se observó al realizar las determinaciones, ver figura (12).

Tabla 8. Determinación del punto de carbonización para el exopolisacárido obtenido de las dos fuentes de carbono, así como del agar bacteriológico.

Agar bacteriológico	Exopolisacárido obtenido de manitol	Exopolisacárido obtenido de sacarosa
260°C	230°C	265°C
250°C	218°C	270°C
258°C	230°C	273°C
260°C	250°C	280°C
254°C	220°C	273°C
Promedio = 256.4	Promedio = 229.6	Promedio = 272.2
s = 4.3358	s = 12.6806	s = 5.4497
C.V. = 1.69%	C.V. = 5.52%	C.V. = 2%
Limites (247.72-265.07)	Limites (204.24-254.96)	Limites (261.3-283.09)

5.6 Determinación del punto de gelificación.

Los resultados del punto de gelificación se muestran en la tabla 9. Haciendo una comparación entre las muestras utilizadas podemos observar que los medios experimentales tienen un punto de gelificación más elevados que el medio control, lo cual es una desventaja para su uso en medios de cultivo enriquecidos como el agar sangre, ya que los eritrocitos se lizarían a esta temperatura, y los medios que contienen ingredientes de naturaleza proteica.

Tabla 9. Determinación del punto de gelificación, para los diferentes geles preparados.

	PUNTO DE GELIFICACIÓN
Agar bacteriológico	34 – 37°C
EPS (manitol)	52 – 53°C
EPS (sacarosa)	53 – 54°C
MC (AST)	34 – 37°C
ME1 (manitol)	52 – 53°C
ME2 (sacarosa)	53 – 54°C

6.0 DISCUSION

Cuando un microorganismo crece en un ambiente en el cual todos sus nutrientes esenciales están en exceso, estos nutrientes se transforman en los productos finales del metabolismo energético, en calor, o bien en los compuestos requeridos para la reproducción, para dar lugar a nuevas células. Estas dos categorías de compuestos requeridos para el crecimiento se conocen como metabolitos primarios, algunos de estos y los más importantes incluyen al alcohol y otros disolventes industriales, aminoácidos y otros ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos, grasas, vitaminas y enzimas, entre muchos otros compuestos.

Un cierto número de programas de desarrollo industrial están investigando la posibilidad de reemplazar los polisacáridos de plantas y algas por compuestos microbianos. También está teniendo lugar en la actualidad el desarrollo de nuevos procesos microbianos que utilizan polisacáridos. Los polisacáridos tienen un gran uso industrial, debido a su capacidad de alterar o modificar las propiedades reológicas de las soluciones acuosas. Las soluciones resultantes pueden tener naturaleza newtoniana, pseudoplástica o tixotrópica. El único polisacárido microbiano que ha alcanzado un nivel comercial y se sigue produciendo a gran escala es la goma xantana, producido por *Xanthomonas campestris*.⁵³

De acuerdo a los resultados obtenidos en la producción para las dos diferentes fuentes de carbono utilizadas, podemos decir que el rendimiento del biopolímero, aún es menor que la del agar bacteriológico, el cual se obtiene a partir de algas marinas, debido a que la elevada viscosidad del medio dificulta el proceso de obtención del polisacárido. Pero no se descarta la posibilidad de poder aumentar la producción del mismo por medio de procesos de fermentación en gran escala, apoyados además por modificaciones genéticas de la cepa de trabajo.

Las cuentas viables obtenidas en los medios de cultivo experimental utilizados, tuvieron valores similares con respecto al medio de cultivo control, así como las características morfológicas de las colonias, por lo que se puede decir que el biopolímero obtenido a partir de *Rhizobium loti*, puede ser una alternativa para sustituto de agar bacteriológico en medios de cultivo. Aunque faltaría hacer un estudio mas completo utilizando el polisacárido obtenido de *Rhizobium loti* como sustituto de agar en otros medios de cultivo, y utilizar otras metodología descritas para algunos polisacárido como la Carragenina y Gelrite.^(50,73)

De acuerdo a los ensayos de textura de las muestras de biopolímero obtenido, se observo que el gel formado presentaba un comportamiento elástico, a diferencia del agar que presentaba fractura al realizar el ensayo de fuerza del gel, lo que pudo producir que fuera menor en los medios experimentales como lo muestra la gráfica. Sin embargo esto no descarta la posibilidad de poder utilizarlo como una alternativa de agar bacteriológico en medios de cultivo.

El punto de gelificación de los medios experimentales, es bastante alto, por lo que no se podría utilizar en todos los medios de cultivo en general, algunas excepciones serian el agar sangre, y otros medios de cultivo enriquecidos con proteínas ya que las desnaturizaría.

Nosotros proponemos que se estudien más a fondo las propiedades fisicoquímicas del exopolisacárido , así como el punto de fusión y el punto de gelificación para el gel formado, sinéresis, turbidez y otras pruebas de textura, mediante parámetros reológicos, los cuales son mas exactos para poder obtener mejores resultados, con los cuales apoyar más su uso como agente gelificante en los medios de cultivo microbiológicos y poder introducirlo al mercado.

Para aumentar la fuerza del gel para nuestro polisacárido proponemos que se hagan estudios adicionando cationes divalentes como son Ca^{++} , Mg^{++} , etc, cuando se preparen los medios de cultivo para la obtención del biopolímero.⁸⁰

Otra propuesta es hacer estudios genéticos de la bacteria que produce este exopolisacárido, que en nuestro caso es *Rhizobium loti* para aumentar la producción y el rendimiento del exopolisacárido y por lo tanto disminuir los costos de producción, los cuales actualmente son muy elevados. Esto se puede lograr apoyándonos de otras áreas, como son: ingeniería genética, bioquímica y biología molecular principalmente.

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

7.0. CONCLUSIONES

1. El rendimiento del polisacárido es menor en comparación al rendimiento que se obtiene de las algas marinas, pero hay que estudiar la posibilidad de aumentar el rendimiento por medio de la ingeniería genética y otras disciplinas.
2. Todas las pruebas realizadas: como son fuerza del gel, punto de carbonización, y punto de gelificación nos dieron la pauta para comprobar si las características del polisacárido obtenido son las más adecuadas para ser usado en medios de cultivo como sustituto de agar bacteriológico, pero habría que apoyarnos con estudios mas completos, como es el caso de parámetros reológicos más específicos.

8.0.- REFERENCIAS

1. I.A Chapman, F:A; 1981; Evaluation of Kappa Carrageenan as a Substitute for Agar in Bacteriological Media; *Arch. Microbiol.*; 128:355-359.
2. Allen and Bevington; 1989; *Comprehensive Polymer Science: The Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymer*; Volume 2: *Polymer Properties*; Pergamon Press.
3. Allen and Bevington; 1989; *Comprehensive Polymer Science: The Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymer*; Volume 6: *Polymer Reactions*; Pergamon Press.
4. A. García de los Santos. et al; 1996; *Rhizobium* Plasmids in Bacteria- Legume Interactions; *World J. Microbiol. Biotechnol.*; 12:119-125.
5. A. Nussinovitch, M.M.AK, M.D. Normand and M. Peleg; 1990; Characterization of gellan gels by uniaxial compression, Stress relaxation and creep; *J. Text. Stud.*; 21:37-49.
6. A. Nussinovitch and M. Peleg; 1990; Strength-time relationships of Agar and Alginate Gels; *J. Text. Stud.*; 21:51-60.
7. A.S. Nandi and S.P. Sen; 1981; Mutants of *Rhizobium* capable of fixing N₂ in the Free-Living conditions; *Arch. Microbiol.*; 130: 147-149.
8. A. T. Bull; 1981; *Microbial Technology: Current State, Future Prospects*; Twenty-ninth Symposium of the Society for General Microbiology. Heald at the University of Cambridge; *Publised for the Society for General Microbiology*, Cambridge University Press; pp: 107-150.
9. Bauer, W.D; 1981; Infection of legumes by Rhizobia; *Ann. Rev. Plant. Physiol.*; 32:407-449.
10. Breedveld M.W, Jill A.H. and Karen J.M.; 1995; A Novel Cyclic β -1.2-Glucan mutant of *Rhizobium meliloti*; *J. Bacteriol.*; 177(22): 6346-6351.

11. Buchanan, R.E and Gibbons, N.e; 1975; *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*; Eighth Edition; The Williams and Wilkins Company/Baltimore; pp:261-264.
12. Carnali, J.O; 1992; Gelation in physically association biopolymer systems; *Rheol. Acta.*; 31(5): 399-412.
13. C. Coronado, B. Sanchez Andujar and A J. Palomares; 1996; *Rhizobium* extracellular structures in the symbiosis; *World J. Microbiol. Biotechnol.*; 12:127-136.
14. C. E. Pankhurst, A.S. Craig and W. T. Jones; 1979; Effectiveness of Lotus Root Nodules. I; *J. Exp. Bot.*; 30(119):1085-1093.
15. C. E. Pankhurst and W. T. Jones; 1979; Effectiveness of Lotus Root Nodules. II; *J. Exp. Bot.*; 30(119):1095-1107.
16. C. E. Pankhurst and W. T. Jones; 1979; Effectiveness of Lotus Root Nodules. III; *J. Exp. Bot.*; 30(119):1109-1118.
17. C. E. Pankhurst et al; 1982; Bactericidal effects of *Lotus pedunculatus* Root flavolan on Fast-Growing Lotus Rhizobia; *J. Gen. microbiol.*; 128:1567-1576.
18. C. E. Pankhurst D.H. Hopcroft and W.T. Jones ; 1987; Comparative morphology and flavolan content of *Rhizobium loti* induced effective and ineffective root nodules on Lotus species, *Leuceana leucocephala*, *Caarmichaelia flagelliformis*, *Ornithopus sativus* and *Clianthus puniceus*; *Can. J. Bot.*; 65:2676-2685.
19. Cheffel, J. C; 1983; *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos*; Volumen II; Editorial Acribia; pag.: 61-72.
20. Crueger, W y Crueger, A; 1993; *Biotecnología, Manual de Microbiología Industrial*; Tercera Edición; Editorial Acribia; pp:379-383.
21. Davidson, R. L; *Agar*; In, *Hanbook of Water-Soluble Gums and Resins*; Mc Graw Hill Company; Chapter: 7.
22. Davidson, R. L; *Xanthan Gum*; In, *Hanbook of Water-Soluble Gums and Resins*; Mc Graw Hill Company; Chapter: 24.
23. Dooley J.J and Stephen P.H.; 1993; Phylogenetic grouping and identification of *Rhizobium* isolates on the basis of random amplified polymorphic DNA profiles; *Can. J. Microbiol.*; 40:39:665-673.

24. Dowling and Broughton; 1986; Competition for nodulation of legumes; *Can. J. Microbiol.*; 40:131-157.
25. Elkan, G. H; 1992; Taxonomy of the Rhizobia; *Can. J. Microbiol.*; 38:446-450.
26. E. R. Arndt and E. S. Stevens; 1996; Vacuum ultraviolet circular dichroism of gellan-family polymer films for water and dimethyl sulfoxide; *Carbohydr. Res.*; 280:15-26.
27. F. Paul, A. Morin and P. Mosan; 1986; Microbial Polysaccharides with actual potential Industrial Applications; *Biotech. Adv.*; 4:245-259.
28. Fuerst, R; 1984; *Microbiología de Frobisher y Fuerst*; 14ª Edición; Nueva Editorial Interamericana; pp: 155-157.
29. G. Challa; 1993; *Polymer Chemistry an Introduction*; Ellis Horwood Series in Polymer Science.
30. Garibay, M. G. Ramirez , R.Q. and Munguia Morales; 1993; *Biopolímeros: En, Biotecnología Alimentaria*; Limusa Noriega Editores; pp:423-451.
31. Garcia, M. Y; 1993; Evaluación de una cepa de *Rhizobium* en cultivos de *Lotus corniculatos*; Fes-Cuautitlán; U.N.A.M; *Tesis de Licenciatura*.
32. Gebelcin, Ch. G; 1990; Bacterial Polysaccharides for use in food and agriculture *Lotus corniculatus*: In, *Biotechnology and Polymers*; Plenum Press; pp: 135-146.
33. G. Sworn, G.R., Sanderson and W. Gibson; 1995; Gellan gum fluid gels; *Food Hydr.*; 9(4):265-271.
34. Hotter and Scott; 1991; Polysaccharide Mutants of *Rhizobium loti* are fully effective on a determinate nodulating host; *J. Bacteriol.*; 173(2):851-859.
35. I. J. Higgins, D.J. Best and J. Jones; 1988; Biopolymers: In, *Biotechnology Principles and Applications*; First Reprinted; *Blackwell scientific Publications*; pp:186-201.
36. I. J. Law and B. W. Strijdom; 1977; Some observations on plant lectins and *Rhizobium* specificity; *Soil Biol. Biochem.*; 9:79-84.
37. Instituto de Biotecnología; *Informe 1995; Genética y Biología molecular de la interacción Microorganismo- Planta*; U.N.A.M; pp:60-66.
38. J. A. Muñoz, A.J. Palomares and P. Ratet; 1996; Plant genes induced in the *Rhizobium*-Legume symbiosis; *World J. Microbiol. Biotechnol.*; 12:189-202.

- 39.J. Brandrup and H. E. Immergut; 1989; Gelation properties of Polymer Solutions: In, *Polymer Handbook*; Third Edition; John Wiley and Sons; pp: 591-595.
- 40.J. Ramus and B. E. Kenney; 1989; Shear degradation as a probe of microalgal Exopolymer structure and Rheological Properties; *Biotechnol. Bioen.*; 34:1203-1208.
- 41.Kang K.S., George T.V., Peter J.M., Tatsuo K. and Lan W.C.; 1982; Agar-like Polysaccharide Produced by a Pseudomonas Species: Production and Basic Properties; *Appl. Environ. Microbiol.*; 43(5): 1086-1091.
- 42.Kannenbergh, E. L and Brewin, N. J; 1994; Host-Plant invasion by **Rhizobium**: The role of Cell-Surface components; *Trends. Microbiol.*; 2(8):277-283.
- 43.Krieg, N. R and Holt, J. G; 1984; *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume I; Editorial Board; Williams and Wilkins; pp:234-242.
- 44.K. M. To, J.R. Mitchel, S.E. Hill, L.A. Bardon and P. Matthews; 1994; Measurement of hydration of Polysaccharides; *Food Hidr.*; 8(3/4): 243-249.
- 45.K. V. Rajeshwari, G. Prakash and P. Gosh; 1995; Improved process for Xanthan production using modified media and intermittent feeding strategy; *Letf. Appl. Microbiol.*; 21:173-175.
- 46.L.P.T.M. Zevenhuizen; 1981; Cellular glycogen, β -1,2-Glucan, Poly- β -hydroxybutiric acid and extracellular polysaccharides in fast- growing species of **Rhizobium**; *Antonie Van Leeuwenhoek*; 47:481-497.
- 47.L.P.T.M. Zevenhuizen; 1984; Gel - Forming Capsular Polysaccharide of Fast-Growing **Rhizobia**: Occurrence and Rheological Properties; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 20:393-399.
- 48.Leigh and Coplín; 1992; Exopolysaccharides in Plant-Bacterial interactions; *Ann. Rev. Microbiol.*; 46:307-346.
- 49.Leigh, J. A and Walker, G. C; 1994; Exopolysaccharides of **Rhizobium**: Synthesis, Regulation and Symbiotic Functions: *Trends Genect.*;10(2):63-67.
- 50.Lines, A. D; 1977; Value of the K^+ Salt of carrageenan as an Agar substitute in routine microbiological media; *Appl. Environ. Microbiol.*; 34(6):637-639.

51. M. E. Bushell; 1983; Some Novel Bacterial Polysaccharides of Recent Development: In, *Progress in Industrial Microbiology*; Volume: 18; Elsevier Scientific Publishing Company; pp: 231-253.
52. M. Schuitze and A. Kondorosi; 1996; The role of Nod Signal structures in the determination of host specificity in the *Rhizobium*- Legume symbiosis; *World J. Microbiol. Biotechnol.*; 12:137-149.
53. Mark, H. F and Gaylord, N. G; 1969; *Polysaccharides: In, Encyclopedia of Polymer Science and Technology; Plastics, Resins, Rubbers; Fibers*; Volume: 8; Editorial Board; pp: 693-717.
54. Mark, H. F and Gaylord, N. G; 1969; *Microbial Polysaccharides: In, Encyclopedia of Polymer Science and Technology; Plastics, Resins, Rubbers; Fibers*; Volume: 11, Editorial Board; pp: 396-424.
55. Mena, R. H and Friend, P. L; 1993; Analysis of Microbial Exopolysaccharides from Industrial Water Systems; *J. Ind. Microbiol.*; 12: 109-113.
56. Milas M., X. Shi and M. Rinaudo; 1990; On the Physicochemical Properties of Gellan Gum; *Biopolymers*; 30: 451-464.
57. N. Toro; 1996; Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*- Legume symbiosis; *World J. Microbiol. Biotechnol.*; 12: 157-162.
58. Nour S.M., Cleyet-Marel J.C., Beck D. and Effosse A.; 1994; Genotypic and Phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from Chickpea (*Cicer arietinum* L); *Can. J. Microbiol.*; 40:345-354.
59. P. A. Sanford, Y.W. Cottrell and D.J. Pettit ; 1984; Microbial Polysaccharides: New products and their applications; *Pure and Appl. Chem.*; 56(7): 879-892.
60. Peppler, H. J and Perlman, D; 1979; *Microbial Technology, microbial processes*; Second Edition; Volume: I; Academic Press; pp: 41-43, 418-425.
61. Pierre-Gilles de Gennes; 1979; *Polymer Gels: In, Scaling Concepts in polymer Physics*; Cornell University Press (Ithaca and London); pp: 128-137.
62. R.S. Kirk, R.Sawyer, H. Egan. 1996. *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*. 2a. edición, Compañía editorial Continental, S.A. de C.V. México.

- 63.R. Weiner, S. Langille and E. Quintero; 1995; Structure; Function and Immunochemistry of bacterial Exopolysaccharides; *J. Ind. Microbiol.*; 15:339-346.
- 64.Reginensi, S. R; 1991; Optimización de dos medios de cultivo para *R. meliloti* C1 y *R. japonicum* CP89A14; "XX Congreso Nacional de Microbiología".
- 65.Reginensi, S. R; 1992; Producción de Inoculantes de Leguminosas usando como soporte bagacillo de caña de azúcar; Fes-Cuautitlán; U.N.A.M; Tesis de Maestría.
- 66.Reginensi, S. R; 1996; "Análisis por HPLC de un Exopolisacárido Bacteriano"; "X Foro de Investigación Multidisciplinario"; Fes-Cuautitlán; U.N.A.M.
- 67.Rhodes, A. y Fletcher, D. L; 1969; *Principios de Microbiología Industrial*; Editorial Acribia; pp: 60-63, 83-85.
- 68.Rosenberg, E; 1993; Microbial diversity as a source of useful biopolymers; *J. Ind. Microbiol.*; 131-137.
- 69.S. Batista, S. Castro, M. Ubalde and G. Martinez-Drets; 1994; Effect of divalent cations on succinate transport in *Rhizobium tropici*, *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* and *R. loti*; *World. J. Microbiol. Biotechnol.*; 10: 249-255.
- 70.S. K. Ghai, M. Hisamatsu, A. Amemura and T. Harada; 1981; Production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*; *J. Gen. microbiol.*; 122:33-40.
- 71.Seymour, R. B y Carraher, C. E; 1995; *Introducción a la química de los Polímeros*; Editorial Reverte. S.A; pp: 1-19, 59-89, 181-207.
- 72.Shantharam and Wong; 1982; Recognition of leguminous host by a promiscuous *Rhizobium* strain; *Appl. Environ. Microbiol.*; 43(3): 677-685.
- 73.Shungu D., Valiant M., Tutlane V., Weinberg E., Weissberger B., Koupal L., Gadebusch H. and Stapley E.; 1983; Gelrite as an Substitute in bacteriological media; *Appl. Environ. Microbiol.*; 46(4): 840-845.
- 74.Soto, G. N; 1996; " Caracterización Química por Cromatografía en Capa Fina de un Biopolímero Bacteriano"; " X Foro de Investigación Multidisciplinario"; Fes-Cuautitlán; U.N.A.M.
- 75.Stacey, G; 1992; *Biological Nitrogen Fixation*; Chapman & Hall Inc.

76. Stevens, M. P; 1990; *Natural Polymers: In, Polymer Chemistry an Introduction*; Second Edition; Oxford University Press; pp: 553-600.
77. Sutherland, I. W; 1985; Biosynthesis and Composition of Gram- negative Bacterial Extracellular and Wall Polysaccharides; *Ann. Rev. Microbiol.*; 39:243-270.
78. T. A. Lie, A.D. Akkermans and A.W.S. Van Egeraat; 1984; Natural variation in symbiotic nitrogen fixing *Rhizobium* and *Frankia spp*; *Antonie Van Leeuwenhoek*; 50:489-503.
79. Tang, J., Lelievre J., Tung M.Á. and Zeng Y.; 1994; Polymer and Ion Concentration effects on Gellan Gels Stregth and Strain; *J. Food. Sci.*; 59(1): 216-219.
80. Tang, J., Tung M.A. and Zeng Y; 1995; Mechanical Properties of Gellan Gels in relation to divalents cations; *J. Food. Sci.*; 60(4): 748-752.
81. Tipson, R. S and Horton, D; 1974; *Dextrans: In, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Volume: 30; Academic Press; pp: 371-444.
82. Tipson, R. S and Horton, D; 1976; *Noncytotoxic; Antotumor Polysaccharides: In, Advenaces in Carbohidrate Chemistry and Biochemistry*; Volume: 32; Academic Press; pp: 235-277.
83. Tipson, R. S and Horton, D; 1979; *Exocellular, Microbial Polysaccharides: In, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Volume: 35; Academic Press; pp: 266-314.
84. V. Crescenzi, I.C.M. Dea and S. Paoletti; 1988; Chitosans and other Polysaccharides as wound dressing materials: In, *Biomedical and Biotechnological advances in Industrial Polysaccharides*; Third Edition; Gordon and Breach Science Publishers; pp: 365-373.
85. V. Crescenzi, I.C.M. Dea and S. Paoletti; 1988; Variability in Agar Gel Behavior and Cvhemistry as affected by algal Growth unden different Environmental Conditions: In, *Biomedical and Biotechnological advances in Industrial Polysaccharides*; Third Edition; Gordon and Breach Science Publishers; pp: 365-373.

- 86.V. Crescenzi, I.C.M. Dea and S. Paoletti; 1988; Preliminary evaluation of an agar fraction obtained from *Gracilaria verrucosa*: In, *Biomedical and Biotechnological advances in Industrial Polysaccharides*; Third Edition; Gordon and Breach Science Publishers; pp: 365-373.
- 87.Van Rhijn and Vanderleyden; 1995; The *Rhizobium*- Plant symbiosis; *Microbiol. Rev.*; 59(1): 124-142.
- 88.W. De Vries H. Stam and A. H. Stouthamer; 1984; Hydrogen oxidation and nitrogen fixation in Rhizobia with special attention focused on strain ORS571; *Antonie Van Leeuwenhoek*; 50: 505-524.
- 89.Walter, W. G; 1984; *Introducción a la Microbiología*; Tercera Reimpresión; Cia. Editorial Interamericana; pp: 266-271.
- 90.Watson and Apirion; 1976; Substitute for Agar in Solid Media for common Usages in Microbiology; *Appl. Environ. Microbiol.*; 31(4): 509 - 513.
- 91.Whistler, R. L and BeMiller, J. N; 1993; *Agar: In, Industrial Gums and their derivatives*; Third Edition; Academic Press Inc; Chapter: 5; pp: 87-103.
- 92.Whitfield, C; 1988; Bacterial extracellular Polysaccharides; *Can. J. Microbiol.*; 34: 415-420.
- 93.Wiseman, A; 1986; *Principios de Biotecnología*; Editorial Acribia; pp: 6-7, 24-27.
- 94.Wolfrom, M. L and Tipson, R. S; 1969; Structure, Conformation and mechanism in the Formation of Polysaccharide Gels and Networks: In, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*; Volume: 24; Academic Press; pp: 267-332, 333-381.