

10 300627
2ej



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U. N. A. M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

“ OBTENCION, MANTENIMIENTO Y CONSERVACION
DE CEPAS MICROBIANAS PARA USO INDUSTRIAL ”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

MARIA LAURA GOMEZ RUIZ

México, D. F.

1988.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

I N D I C E

OBJETIVOS

I.- INTRODUCCION.....	1
II.- ORIGEN DE LOS CULTIVOS.....	5
III.- ORIGEN DE LOS MICROORGANISMOS PARA USO INDUSTRIAL.....	13
IV.- MANEJO Y CLASIFICACION DE LA COLECCION DE CEPAS MICROBIANAS PARA USO INDUSTRIAL.....	64
V.- COMENTARIOS.....	68
VI.- CONCLUSIONES.....	69
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	71

OBJETIVOS FUNDAMENTALES DE LA TESIS

Recopilar la información bibliográfica necesaria que permita formar una guía que sirva de apoyo a la industria que requiera de cepas microbianas; para su obtención, mantenimiento y conservación de las mismas, y esto les permita ser autosuficientes en este campo y evite la necesaria importación de cepas microbianas de uso industrial.

Despertar el interés de los profesionistas en el campo de la microbiología para crear una colección de cepas que cumplan con los requisitos y normas que requieren las cepas microbianas de uso industrial, tal como las tienen las colecciones internacionales, como por ejemplo, American Type Culture Collection, Agricultural Research Service Culture Collection, Centraalbureau Voor Schimmenculture, etc.

I.- INTRODUCCION.

La microbiología industrial no es únicamente un campo explorado por la actividad empresarial; se trata también de un factor bien asentado en la economía mundial, responsable de una producción anual que hoy se valora en decenas de millones de dólares. Y es, además, el exponente de una intensa actividad humana cuya historia arranca de milenios atrás; ya que los microorganismos proporcionaron alimentos y bebidas durante más de 800 años, sin que se tuviera noción de su existencia.

El arte de la fermentación, definido técnicamente en su sentido más amplio como la transformación química de compuestos orgánicos con la ayuda de enzimas (sobre todo los producidos por microorganismos), es muy antiguo. La capacidad de las levaduras para producir alcohol en forma de cerveza la conocían ya los sumerios y los babilonios, antes del año 6000 a.c. Más tarde, aproximadamente hacia el año 4000 a.c., los egipcios descubrieron que el dióxido de carbono generado por la acción de la levadura de cervecería podía fermentar el pan. (1, 3, 10, 12 y 15).

Hacia el siglo XV d.c., la destilación de bebidas alcohólicas a partir del grano fermentado, práctica originaria, al parecer, de China o del Medio Oriente, era común en muchas zonas del mundo. Otros procesos de fermentación de antigua raigambre

son: el cultivo de las bacterias del ácido acético para producir vinagre, las bacterias lácticas para conservar la leche (por ejemplo en forma de yogurt) y de distintas bacterias y hongos para fabricar quesos.

La industria de los microorganismos ha empleado a la biotecnología desde el año de 1929 en que se iniciaron los estudios de la penicilina por Fleming. (16, 24, 28, 41 y 42).

Actualmente, en particular en los países como Estados Unidos de Norteamérica, Japón y Canadá, se ha desarrollado una gran industria de alta tecnología basada en el uso de métodos biológicos modernos para la producción de componentes de tipo químico y biológico. Como resultado de esto, los procesos fermentativos se han diseñado para que desempeñen el papel funcional que se les debe atribuir.

Gracias a las manipulaciones genéticas se ha tenido un rápido desarrollo merced a las grandes inversiones que se han empleado en su investigación; ya que su empleo ha sido de gran ayuda para la industria de los microorganismos. La ingeniería genética es una herramienta suplementaria cuando tratamos de alcanzar la etapa de producción industrial y a un costo razonable y sin riesgo para el ser humano.

Por ello la biotecnología se caracteriza por su aspecto

to interdisciplinario y sistemático, ya que se requiere de una complementación entre diversas ciencias, tales como, la química, la bioquímica, la Ingeniería enzimática, la Ingeniería microbiológica, las matemáticas, la informática, la Ingeniería clásica y la investigación en economía entre otras.

En la industria alimentaria, el mercado de saborizantes, pigmentos, colorantes y edulcorantes es uno de los más importantes; ya que son aditivos de alto valor agregado y su disponibilidad es en algunos casos muy reducida. Por esto, se propone emplear la biotecnología para la producción comercial "in vitro" de algunos de ellos, por ejemplo el ácido cítrico y el glutamato monosódico. (52, 58, 59, 61 y 63)

Los problemas en la producción de alimentos a que se enfrenta el sector agrícola del país, son numerosos. La transferencia de recursos de este sector hacia otros componentes de la economía debilitó la capacidad productiva agrícola, en particular de alimentos básicos en la dieta nacional, lo que provocó la incapacidad del medio rural para absorber la mano de obra, y ocasionó la migración del campo hacia la ciudad en busca de empleo.

Los síntomas de agotamiento del modelo agropecuario no se hicieron esperar, ya que en los últimos años se ha recurrido a las divisas captadas v/a venta de petróleo para satisfacer la demanda interna de alimentos básicos como algunos cereales, -

leguminosas y derivados lácteos. Se estima que la biotecnología podría contribuir en gran medida a encontrar soluciones a las -- crecientes demandas de alimentos de la sociedad mexicana.

Por todo esto, las diversas aplicaciones que pueden -- enumerarse son:

- Las industrias de fermentación.
- Las industrias agroalimentarias.
- las industrias químicas y farmacéuticas.
- La producción de alimentos con concentrados de proteínas.
- El tratamiento y valoración de subproductos agrícolas e industriales y sus derivados.
- La producción de alcoholes.
- La producción de biogas. (66, 67, 70, 72 y 75).

II.- ORIGEN DE LOS CULTIVOS.

a) Nacimiento de la microbiología industrial.

Desde los tiempos más remotos el hombre ha utilizado a los microorganismos para preparar bebidas, alimentos, etc., - mucho antes de que se tuviera noción de su existencia.

El holandés Antonio Van Leeuwenhoek (1632-1723), fue el pionero de la microscopía, ya que reveló la existencia del mundo microbiano, utilizando microscopios simples. La microbiología tuvo su desarrollo en la segunda mitad del siglo XIX, gracias a los trabajos de Pasteur.

El desarrollo de la microbiología industrial en el curso del siglo XIX estuvo marcado por el descubrimiento del papel que desempeñan los microorganismos en las transformaciones de la materia orgánica, así como en la génesis de las enfermedades. (33, 37, 38, 43, 46, 55 y 60).

El estudio de las fermentaciones puso al descubierto el papel de los microorganismos, ya que a cada fermentación corresponde un microorganismo diferente o un conjunto de estos -- bien definidos. Gracias a esto progresó la técnica de preparación de diversos productos así como el evitar sus alteraciones.

Hacia el año 1815 Gay Lussac realizó estudios cualitativos y cuantitativos sobre la fermentación alcohólica. Y hacia el año 1857 Pasteur inicia los estudios sobre la fermentación láctica, al año siguiente realiza estudios más profundos sobre la fermentación alcohólica. Y hacia el año 1860 y 1866 investiga sobre la fermentación butírica y publica informes sobre el vinagre, el vino y la cerveza.

Hacia el año 1880 se inician los estudios sobre la microbiología del suelo, descubriéndose las bacterias fijadoras del nitrógeno así como las bacterias reductoras de sulfatos; y se marca también el inicio de los estudios sobre bioquímica y enzimología microbiana.

Durante los años 1900 a 1978 se profundiza en temas tan importantes como son la herencia, los cromosomas y su significado, así como la conformación de los ácidos nucleicos y más específicamente se describe "la doble hélice" (DNA).

Trabajos posteriores demostraron el papel indispensable que desarrollan los microorganismos en la naturaleza, ya que estos en gran número participan en forma fundamental en los grandes ciclos biológicos naturales del carbono, nitrógeno y azufre. (1, 17, 19, 24, 25 y 30).

b) Utilización de cepas.

La fermentación es el arte más antiguo que se practicó desde antes de la era cristiana y en la cual los microorganismos desempeñan un papel relevante. Es por tanto que la microbiología industrial se practicaba desde épocas muy antiguas sin que se le denominara como tal. La fermentación en su sentido más amplio es una transformación química de compuestos orgánicos con la ayuda de enzimas, sobre todo los producidos por microorganismos para obtener productos con características organolépticas deseables.

Se sabe que la cerveza producida por la acción de las levaduras era conocida por sumerios y babilonios y que los egipcios conocían la fermentación del pan por acción de las levaduras también, otros procesos de fermentación muy antiguos son el cultivo de bacterias acéticas para producir vinagre y el de bacterias lácticas para conservar la leche y producir quesos.

Actualmente se sabe que existen cuatro clases de microorganismos de interés industrial.

- Levaduras.
- Bacterias.
- Mohos.
- Actinomicetes.

A su vez los productos de interés comercial de estos microorganismos se encuadran en cuatro categorías principales:

- 1.- Las células microbianas propiamente dichas.
- 2.- Las macromoléculas que sintetizan, por ejemplo, enzimas.
- 3.- Los productos de su metabolismo primario (compuestos esenciales para su desarrollo).
- 4.- Los productos de su metabolismo secundario (compuestos no esenciales para su desarrollo). (27, 29, 33, 34, 35, 38 y 83).

Así pues se hacen notar dos de las aplicaciones de índole comercial que poseen las células microbianas. La primera tiene que ver con el suministro de proteínas para la alimentación, sobre todo la animal. Suele reconocerse por su forma más común de proteínas unicelulares y se refieren en realidad a la célula entera, cuyo componente principal es el protáico. Delbruc, Wohl y Hayduck, marcaron los antecedentes en el estudio de microorganismos como agentes a la alimentación animal y humana; dichas investigaciones establecieron los fundamentos para el desarrollo de procesos industriales que permitieron producir levadura alimenticia, usando para ello sales de amonio y substratos.

azucarados; tales como hidrolizados de madera, melazas de caña de azúcar o remolacha.

En el presente la producción de levadura que se utiliza como suplemento protéico o vitamínico rebasa las 300 mil toneladas.

Su segunda aplicación es el poder llevar a cabo conversiones biológicas a través de las cuales un compuesto se transforma en otro estructuralmente relacionado por intervención de una o varias enzimas aportadas por los microorganismos. En estas conversiones pueden participar células en crecimiento, células sin crecimiento, esporas y hasta células desecadas. Los microorganismos que pueden llevar a cabo casi todo tipo de reacción química gozan de muchas ventajas frente a las reacciones químicas; pues una conversión biológica transcurre a temperaturas biológicas, emplean agua como solvente y a menudo las células microbianas pueden inmovilizarse sobre una estructura soporte que viabilice un proceso continuo. Por otra parte en las conversiones biológicas se tiene especificidad para seleccionar un producto único. Gracias a estas características, el uso de los microorganismos da altos rendimientos en el producto que se desea.

Entre las conversiones biológicas de importancia Industrial se tiene a las siguientes:

- Producción de componentes activos de vacunas e insecticidas.
- Producción de esteroides.
- Producción de enzimas.
- Producción de penicilinas semisintéticas.
- Producción de polisacáridos. (14, 51, 68, 71 y 73).

Cabe destacar que la producción de enzimas representa un gran avance sobre todo en el sector alimentario, ya que su especificidad, rendimiento y potencia es realmente palpable. Esto es gracias a la asequibilidad cada vez mayor de los microorganismos y a la facilidad con que se puede mejorar su producción, ya sea por manipulación genética o por las condiciones de los cultivos. A parte de esto, la producción de enzimas microbianas requiere de tiempos cortos de fermentación, medios de cultivo baratos y una selección sencilla.

La aplicación de enzimas microbianas en la industria alimentaria abarca varios sectores, por ejemplo, las amilasas se utilizan en la industria cervecera y en la de panificación, las proteasas se utilizan como ablandadores de carnes y también en cervecería. También se pueden utilizar combinaciones de enzimas para obtener edulcorantes a partir de almidones.

La producción de polisacáridos que se emplean en la -

industria, provenían antiguamente de vegetales, pero como las cosas siguen un proceso evolutivo, ahora hay un gran interés por la producción de polisacáridos microbianos; más específicamente se tiene al " xantano ", producido por un microorganismo denominado Xanthomonas campestris. Dicha sustancia se adiciona a los alimentos como estabilizador y agente espesante y también se le puede utilizar en la industria del petróleo.

La lista de productos microbianos es muy extensa, cabe citar que entre los metabolitos primarios más importantes en la industria se tiene a los aminoácidos, nucleótidos purínicos, vitaminas y ácidos orgánicos. Y entre los metabolitos secundarios se incluye principalmente a los antibióticos, ya que aun cuando se conoce una extensa gama de ellos, la búsqueda continúa hacia otros nuevos.

Por otra parte, gracias a manipulaciones genéticas, - las bacterias son capaces hoy de producir proteínas como la Insulina y el interferón.

Se estudia también el desarrollo de cepas bacterianas capaces de convertir biomasa agrícola y forestal en combustible líquido y productos químicos.

En cuanto a la agricultura, está progresando la idea de substituir fertilizantes nitrogenados sintéticos por la poten

ciación del rendimiento de microorganismos naturales fijadores de nitrógeno y concretamente se usan cepas de Azotobacter vinelandii excretoras de amoníaco, el cual aporta el nitrógeno a las plantas y éstas a su vez proporcionan el carbono a la bacteria.

Debe mencionarse también que los microorganismos se utilizan en la detoxificación y degradación de las aguas residuales y desechos industriales, el proceso se denomina comúnmente como "lodos activados" y depende de una población de microorganismos que se forman de acuerdo a las capacidades de cada uno para degradar los materiales de desecho y además de acuerdo a su capacidad para vivir junto a otros dentro de un sistema en el cual se complementan unos a otros. Un avance en éstas técnicas es el uso de cultivos puros de un solo microorganismo capaz de degradar compuestos específicos que existan en los desechos industriales. (15, 20, 22, 23, 25 y 26).

III.- ORIGEN DE LOS MICROORGANISMOS PARA USO INDUSTRIAL.

a) Origen de los microorganismos.

El método más simple para obtener cultivos de microorganismos es recurrir a subcultivos de cultivos de microorganismos previamente aislados; que pueden obtenerse de las numerosas colecciones que existen en el mundo; tanto privadas como públicas. Y las cuales pueden mantener a miles de géneros diferentes de microorganismos.

Las colecciones privadas están por lo general asociadas con grupos especializados de investigación, en industrias, universidades o institutos; y dichas colecciones son para el uso exclusivo de estos grupos. Por ello sus cultivos no se distribuyen al público en general, sin embargo puede recurrirse a ellos por petición de científicos interesados en tales cultivos.

La necesidad de preservar y mantener microorganismos para la industria, gobiernos, escuelas, etc., fue la causa principal de que se organizaran muchas de las diversas colecciones públicas de cultivos, entre las colecciones de este tipo pueden citarse :

- Commonwealth Mycological Institute (CMI).
- Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL).
- American Type Culture Collection (ATCC).
- Centraalbureau Voor Schimmenculture (CBC).

Desde el punto de vista industrial la ATCC y la NRRL tienen mención especial, ya que estos dos organismos tienen un reconocimiento oficial de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica como depósitos oficiales de cultivos, tanto para uso local como extranjero.

Hablando más específicamente la ATCC es una organización lucrativa, la cual preserva y distribuye cultivos de microorganismos y células animales para todas las áreas de investigación y de enseñanza.

Lo importante y como se plantea en uno de los objetivos de esta tesis, es que la colección de cepas clasificadas pueda obtenerse aislando a los microorganismos de hábitats naturales, es decir que el origen fundamental de los microorganismos para uso industrial se encuentra en la naturaleza, en el estiércol, el agua, materia viva o muerta de plantas y animales, en a-

guas residuales, alimentos frescos o fermentados, hierbas, etc. Dichos materiales proveen un amplio espectro de microorganismos que pueden utilizarse para diversos propósitos. (6, 11, 24 y 49)

Los microbiólogos industriales tienen como primer objetivo encontrar un microorganismo, el cual sea capaz de elaborar el producto deseado aun cuando no este completamente regulado. Una vez que se ha elegido a un microorganismo candidato, el microbiólogo determina los parámetros físicos y nutricionales para su óptimo crecimiento y producción.

Por tanto, los microbiólogos requieren aislar, purificar, seleccionar y probar el cultivo que proviene de un hábitat natural. Muchas veces para obtener un cultivo, el microorganismo debe aislarse de un nicho especial, ya que no todos los microorganismos existen en una región particular.

En la industria de alimentos, es muy común que los -- cultivos se seleccionen de alimentos fermentados nativamente y -- que se puedan obtener con poca dificultad, tal es el caso de microorganismos como Hansenula anómala, la cual ha sido aislada de alimentos fermentados muy comunes en la India o Nepal; y también se encuentra en la misma posición Sacharomyces cerevisiae HANSEN. Existen también bacterias lácticas que se aíslan de alimentos -- fermentados, tal es el caso de géneros como Streptococcus, Leu--
conostoc, Pediococcus y Lactobacillus.

Como cada género tiene sus formas particulares de nutrición, se puede conjeturar que, en principio, todos los microorganismos se encuentran en el agua y que gracias a la desecación y a la posterior acción del viento, los microorganismos se trasladan a otros puntos o áreas, por ello no es de sorprenderse que -- los microorganismos de interés industrial que se encuentran en el suelo sean muy semejantes. Podemos citar a géneros como Streptomyces, Rhizobium, Rhizopus, Penicillium, Aspergillus, Azotobacter, Nitrobacter, Nitrosomonas y Thiobacillus entre otras.

Puede mencionarse más específicamente el origen de --- ciertos géneros, como es el caso de Acetobacter, el cual se encuentra en la masa fermentada de granos de cereales, "madre" del vinagre, cerveza, vinos y en las frutas y verduras deterioradas.

El género Lactobacillus es también muy importante y -- hay especies homofermentativas y heterofermentativas, que se encuentran ampliamente distribuidas en vegetales y productos lácteos. Su uso general es en la producción de leche fermentada, en la elaboración de queso, aunque también se les encuentra en productos cárnicos curados.

El género Micrococcus está distribuido en el suelo, en el agua y sobre todo en embutidos crudos o en productos cárnicos curados.

El género Pediococcus incluye a microorganismos homofermentadores y al igual que otros géneros acidolácticos, se les encuentra especialmente en vegetales. Su importancia radica en que se les utiliza como iniciadores en ciertos alimentos fermentados.

El género Streptococcus posee microorganismos que en la naturaleza son microaerófilos, se les encuentra extensamente en plantas y productos lácteos y también en embutidos crudos y productos cárnicos curados. Su importancia radica en que se les utiliza como cultivos lácteos y cárnicos iniciadores.

El género Streptomyces tiene su hábitat natural en la tierra, pero puede llegar a diferentes alimentos especialmente a vegetales. Es el grupo mejor estudiado pues algunas de sus especies tienen la capacidad de producir antibióticos.

Los Mohos son un grupo importante ya que sus distintas especies se encuentran ampliamente distribuidas en los alimentos deteriorados tales como pasteles, frutas y hortalizas, carnes, compotas, etc. y son capaces de producir por ejemplo proteasas y ácido cítrico en el caso de Aspergillus, antibióticos en el caso de Cephalosporium y Penicillium, fermentación alcohólica en el caso de Rhizopus.

Las levaduras son otro grupo de relevancia, ya que son responsables de muchos procesos de interés industrial, como

en el caso de encurtidos y en las industrias de cervecera, panificación y vitivinícola. Entre las especies más importantes se tiene a Candida, la cual se encuentra en carnes frescas y curadas principalmente. Hansenula se encuentra comunmente en cítricos, uvas y productos derivados. Saccharomyces se encuentra ampliamente distribuida en las frutas, sobre todo uvas y en las verduras. Otras menos populares como Endomycopsis fibuliger que posee una fuerte actividad alfa, beta amilásica y que se le encuentra en la superficie de encurtidos y en los cereales almacenados. (2, 7, 10, 17, 26, 28, 30, 33, 37, 38, 42, 46, 58 y 60).

b) Requisitos que debe cumplir un microorganismo para uso industrial.

Un sistema microbiano posee características muy favorables, ya que la tasa de crecimiento en cuanto a tiempo en los microorganismos es muy elevada en comparación con la de otros organismos tales como las plantas inferiores y los animales. Esta condición se fortalece aun más si consideramos que la característica unicelular de los microorganismos, implica la inexistencia de diferenciación de tejidos u órganos, y que por lo tanto, toda la masa celular puede ser cosechada. Gracias a los adelantos logrados en biotecnología, es posible propagar las células microbianas en gran escala mediante el empleo de unidades industriales compactas y a un nivel elevado de productividad.

Debe notarse además, que la propagación de los microorganismos, no depende de condiciones climáticas y su tasa de crecimiento puede predecirse llevando las condiciones del medio de propagación a un grado óptimo. Ya que es posible también mediante métodos de selección obtener cultivos microbianos de elevada eficiencia en la biosíntesis, debido a que su composición química es susceptible de ser modificada favorablemente variando las condiciones ambientales o por medio de alteraciones genéticas.

Existen ciertas características que comparten todos los microorganismos, una de ellas y que puede considerarse fundamental es el pequeño tamaño de la célula microbiana y su correspondiente relación de superficie a volumen. Esta característica facilita el rápido transporte de nutrientes al interior de la célula y por consiguiente permite una elevada tasa metabólica. Así pues, la tasa de producción de proteínas en las levaduras es superior que en la planta de soya, que a su vez es diez veces más alta que en el ganado. Esta velocidad de biosíntesis microbiana extremadamente alta, permite que algunos microorganismos se reproduzcan en tan solo 15 minutos.

Los microorganismos se hayan capacitados para realizar una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse así a muchas fuentes de nutrición, pero para la obtención de microorganismos, se requiere proveerlos con una fuente nitrogenada mineral, que generalmente es una sal de amonio, así como con fuentes de carbono y energía, y con una apropiada provisión de sales mi---

nerales. Una condición indispensable es suministrar al sistema microbiano una oxigenación apropiada, ya que la mayoría de los procesos son aerobios. Esto se logra introduciendo al sistema dispositivos de aireación y agitación convenientes. Independientemente de la naturaleza del sustrato que se emplee como fuente de carbono y energía, para cada sistema microorganismo-sustrato, deben establecerse las condiciones óptimas que permitan la máxima productividad de células y que incluyan el mantenimiento de la temperatura, la disponibilidad de oxígeno, así como niveles apropiados de acidez (pH) y concentración de sales. Todo esto se logra mediante el uso de reactores biológicos de diversas capacidades y de mayor a menor complejidad, provistos de sistemas de medición y control. La propagación de los microorganismos puede llevarse a cabo estableciendo un régimen intermitente, semicontinuo o continuo, dependiendo del sustrato y del microorganismo que se cultiva. En los procesos industriales se prefiere el régimen continuo, ya que es el que ha dado mejores resultados, debido a lo económico del proceso.

Gracias a la versatilidad de los microorganismos es posible que las fermentaciones industriales se puedan realizar en nutrientes baratos, por ejemplo, las melazas y el líquido de maceración del maíz, productos de desecho de la cristalización del azúcar y de la molienda del maíz respectivamente, y que por ello resultan sumamente valiosos para la producción de penicilina.

Por otra parte la microbiología industrial se vale de la mutación para competir en el rendimiento con la industria química no biológica. El microbiólogo puede tratar a un microorganismo con un agente mutagénico que aumente la frecuencia de cambios en los genes de la célula en varios ordenes de magnitud. Aunque las modificaciones genéticas que tienen lugar suelen ser perjudiciales para el microorganismo, para el hombre resultan su mamente provechosas. Para identificar dichos cambios, el microbiólogo recurre a procedimientos adecuados de selección y por lo tanto mantener por siempre la modificación deseada.

Un avance reciente en este aspecto es la técnica denominada "biosíntesis mutacional", aunque el balance del enfoque mutagénico resulta positivo en la industria, hay que reconocer que muchas veces constituye un procedimiento lento y laborioso, sin embargo la genética microbiana avanza aceleradamente, lo que permite un conjunto nuevo de opciones y posibilidades para la microbiología industrial. Entre otras podemos citar :

- Fusión de protoplastos.
- Multiplicación de genes.
- Técnicas de recombinación de ADN.

En la naturaleza los cambios genéticos surgen por mutación y también por recombinación genética entre dos células de distinto tipo genético, produciéndose progenies con genes de uno

y otro progenitor. Hasta hace poco, la microbiología industrial apenas si hacía uso de estos fenómenos, pero esto se explica por la frecuencia extremadamente baja con que se presenta una recombinación genética en las cepas industriales de microorganismos.

La fusión de protoplastos se está explotando ahora para recombinar mutantes de crecimiento lento, pero de alta productividad, con sus antecesores de crecimiento rápido, con el fin de reproducir cepas de crecimiento rápido y de alta productividad.

La manipulación genética es un procedimiento extremadamente poderoso y con un gran futuro dentro de la microbiología industrial. Esta técnica consiste básicamente en que los genes se amplifican o duplican, forzando a los plásmidos que los contienen a reproducirse rápidamente.

La recombinación del ADN pronto ejercerá una poderosa influencia sobre la microbiología industrial, ya que ésta aumenta la diversidad de los microorganismos, agrupa la información genética para formar nuevas combinaciones estables y crear así nuevos genotipos. (22, 23, 26, 31, 35, 53, 64, 65, 75, 82 y 86).

Una vez teniendo en cuenta las consideraciones arriba mencionadas, podemos proceder a enlistar los puntos que deben tener prioridad al elegir un microorganismo que se empleara en un proceso industrial con el fin de obtener un producto de consumo -

animal o humano.

- Se considera a un cultivo como puro cuando se encuentre libre no solo de otros microorganismos, sino también debiera estar libre de fagos.
- El microorganismo que se emplee debiera ser genéticamente estable.
- El microorganismo que se elija debiera crecer vigorosa y rápidamente después de ser inoculado a los tanques de germinación o cualquier contenedor que se utilice para preparar grandes cantidades del inóculo antes de proseguir a la fermentación industrial.
- El microorganismo que se emplee debiera producir células vegetativas, esporas o cualquier otra unidad reproductiva.
- El microorganismo debiera elaborar el producto requerido dentro de un corto período de tiempo, preferentemente en tres días o menos.
- De ser posible, el microorganismo debiera ser capaz de protegerse a sí mismo contra la contaminación. Dicha protección puede tener lugar con un pH bajo, un crecimiento a alta temperatura o elaborando un in

hibidor microbiano deseable.

- El microorganismo debiera mantenerse estable por períodos de tiempo razonablemente largos.
- El microorganismo debiera elaborar el producto deseado con exclusión de todas las sustancias tóxicas para el hombre o animales.
- De preferencia el producto deseado debiera separarse fácilmente de todas las otras sustancias producidas durante el proceso fermentativo.
- El microorganismo debiera ser dócil a cambios por acción de agentes mutagénicos. Ya que un programa de mutación puede llevarse a cabo con el objeto de desarrollar microorganismos que den un mayor rendimiento en el o los productos que se desean obtener. (5, 6, 17, 19, 21, 24, 27, 32, 37, 38, 43, 58, 63, 67 y 72).

c) Procedimientos generales para el aislamiento y selección de los microorganismos provenientes de hábitats naturales.

En la mayoría de los casos el microbiólogo estudia po

blaciones que contienen miles de millones de individuos, tales poblaciones se obtienen con el incremento de los microorganismos en cultivos, hechos bajo condiciones bien definidas. Así pues se considera a un cultivo puro o axénico cuando contiene una sola clase de microorganismos. Y un cultivo que contiene más de una clase de microorganismos, se le conoce como cultivo mixto; y en el caso de que contenga solo dos clases de microorganismos, deliberadamente mantenido en una mutua asociación, será un cultivo bímembre.

Las dos operaciones fundamentales dentro de la microbiología industrial son :

- El aislamiento, que es la separación de un microorganismo determinado de las poblaciones mixtas que existen en la naturaleza.
- El cultivo, que consiste en hacer crecer a las poblaciones microbianas en medios artificiales bajo condiciones de laboratorio.

Estas dos operaciones entran en juego independientemente de la clase de microorganismos que este manejando el microbiólogo.

Los microorganismos son ubicuos y por ello la prepara

ción de un cultivo puro implica no solo el aislamiento de un determinado microorganismo a partir de una población microbiana natural mixta, sino también el mantenimiento del individuo aislado y de su progenie en un medio artificial al que se evita el acceso de otros microorganismos. Los microorganismos no necesitan mucho espacio para su desarrollo, de ahí que pueda crearse un medio artificial dentro de los confines de un tubo de ensayo, de un matraz o de una placa Petri.

Si se está operando con microorganismos que forman colonias discretas sobre medios sólidos, la manera más fácil de obtener los cultivos puros, consiste en utilizar cualquiera de las modificaciones de siembra en placa, usando medios enriquecidos, diferenciales o selectivos. Este método implica la separación e inmovilización de los microorganismos individuales sobre o dentro de un medio nutritivo solidificado con agar o algún otro agente solidificante adecuado. Al crecer, cada organismo viable da origen a una colonia cuya transferencia puede hacerse fácilmente.

Si la técnica que se utiliza es la adecuada para el aislamiento a partir de poblaciones naturales mixtas, resulta posible preparar una serie de placas o tubos sembrados por dilución, en la que muchas de las colonias quedan bien separadas entre sí. Sin embargo, un cultivo aislado así dista mucho de ser puro; esto es así porque los microorganismos varían enormemente en cuanto a sus requerimientos nutricionales y en consecuencia,

ningun medio unico o conjunto de condiciones de crecimiento, per-
mitira el desarrollo de todos los microorganismos presentes en -
una poblaci3n natural. Es muy probable que solo una pequena ---
fracci3n de los microorganismos inicialmente presentes, sea capaz
de formar colonias sobre un determinado medio. Por tanto, por -
cada colonia visible en la primera placa, puede haber miles de -
c3lulas de otras clases de microorganismos que, habiendo quedado
depositados sobre la superficie del agar, no hayan logrado, sin
embargo, un crecimiento macrosc3picamente visible, aunque aun --
sean viables. Y existe una alta probabilidad de que algunos de
estos microorganismos sean tomados y transportados cuando se ha-
ga otra transferencia.

Nunca se debe tomar de una primera placa para prepara-
rar un cultivo puro, en lugar de esto, se debe sembrar por es---
trfa una segunda placa utilizando una suspensi3n preparada a pa-
tir de una colonia bien aislada. Si todas las colonias de esta
segunda placa resultan id3nticas, puede utilizarse una de ellas,
para establecer un cultivo puro.

Por otra parte, no todos los microorganismos capaces
de crecer sobre medios s3lidos dan origen necesariamente a colo-
nias bien aisladas, ciertas bacterias flageladas m3viles pueden
extenderse r3pidamente sobre la superficie ligeramente h3meda de
la placa recién preparada. Esto puede evitarse mediante el uso
de placas con superficies bien secas, en las que las c3lulas que

dan Inmovilizadas.

La incorporación al medio de sustancias inhibidoras selectivas, es también a veces de gran utilidad, cuando se hacen aislamientos de la naturaleza. Debido a su especificidad biológica, ciertos antibióticos son especialmente útiles para este fin. Las bacterias varían mucho en cuanto a su sensibilidad al antibiótico, el cual debe de utilizarse a bajas concentraciones para impedir el desarrollo de las bacterias sensibles existentes en la población inicial. Los antibióticos son potencialmente útiles cuando queremos purificar bacterias fuertemente contaminadas.

Para crecer, los microorganismos deben tomar del ambiente todas las sustancias necesarias para la síntesis de sus materiales celulares, y para la generación de energía. Un medio de cultivo, debe contener todos los nutrientes necesarios en cantidades apropiadas a los requerimientos específicos de los microorganismos para los que ha sido preparado. Sin embargo, los microorganismos son extraordinariamente diversos en cuanto a sus propiedades fisiológicas específicas; por lo tanto, al formular un medio de cultivo, debemos basarnos en los principios de la nutrición microbiana, y lo primero que debemos tomar en cuenta es:

- La composición de una célula, que es la que nos indica los principales materiales que le son necesari-

rios para su crecimiento, y que se mantienen constantes a través de todo el mundo vivo.

- El agua, supone del 80 al 90 % del peso total de la célula, y que es siempre el principal nutriente en términos cuantitativos.
- La materia sólida, que además del hidrógeno y el oxígeno contiene carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, en orden decreciente de abundancia. Estos seis elementos suponen alrededor del 95% del peso seco de la célula; los estudios nutricionales muestran que casi todos los microorganismos precisan potasio, magnesio, calcio, hierro, manganeso, cobalto, cobre, molibdeno y cinc.

Todos los elementos metálicos referidos pueden servir como nutrientes en forma de cationes de sales inorgánicas. El potasio, el magnesio, calcio y hierro, se precisan en cantidades relativamente grandes, y deben incluirse siempre como sales en los medios de cultivo. Los requerimientos cuantitativos de manganeso, cobalto, cobre, molibdeno y cinc son muy pequeños, tan pequeños que con frecuencia resultan técnicamente difícil demostrar su esencialidad, ya que están presentes en cantidades adecuadas como contaminantes de los componentes principales de los medios. Las necesidades de carbono, nitrógeno, azufre y oxígeno

no pueden describirse en forma tan simple, porque los organismos difieren con respecto a la forma química tan específica bajo la cual se les debe de administrar dichos nutrientes. (5, 11, 18, 24, 31, 47, 49, 72, 78, 80 y 85).

FUNCIONES FISIOLÓGICAS GENERALES DE LOS PRINCIPALES ELEMENTOS. (72)

<u>ELEMENTO</u>	<u>FUNCIONES FISIOLÓGICAS</u>
Hidrógeno	Constituyente del agua celular, de materiales orgánicos celulares.
Oxígeno	Constituyente del agua celular, de materiales orgánicos celulares; como oxígeno molecular es aceptor de electrones en la respiración de los aerobios.
Carbono	Constituyente de materiales celulares orgánicos.
Nitrógeno	Constituyente de proteínas, ácidos nucleicos o enzimas.
Azufre	Constituyente de proteínas (en los aminoácidos, cisteína y metionina) de algunas coenzimas como cocarboxilasa y CoA.
Fósforo	Constituyente de ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas.
Potasio	Uno de los principales cationes inorgánicos de las células, cofactor de algunas enzimas.
Magnesio	Importante catión celular, cofactor inorgánico para muchas reacciones enzimáticas, incluyendo aquellas que implican ATP, funciona uniendo las enzimas a los sustratos.
Manganeso	Cofactor inorgánico de varias enzimas, a veces reemplazando al magnesio.
Calcio	Importante catión celular, cofactor para algunas enzimas, por ejemplo proteasas.
Hierro	Constituyente de citocromos y otras hemo y no hemo proteínas, cofactor para un cierto número de enzimas.
Cobalto	Constituyente de la vitamina B12 y de sus coenzimas derivados.
Cobre	
Cinc	Constituyentes inorgánicos de enzimas especiales.
Molibdeno	

- Requerimiento de Carbono.

Las bacterias que obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos, utilizan de modo característico la forma más oxidada del carbono, como única o principal fuente de carbono. Todos los microorganismos obtienen el carbono -- principalmente a partir de nutrientes orgánicos, los cuales además de cubrir las necesidades biosintéticas de carbono que tienen las células, los sustratos orgánicos deben aportar los requerimientos energéticos necesarios; los sustratos orgánicos tienen generalmente un doble papel nutricional, sirven a la vez, de --- fuente de carbono y de fuente de energía. Muchos microorganismos pueden utilizar un solo compuesto orgánico para satisfacer ambas necesidades. Estos nutrientes adicionales son puramente biosintéticos, y se les denominan factores de crecimiento; sin embargo, otros requieren de un número mayor de compuestos orgánicos para satisfacer ambas necesidades.

Los microorganismos, son extraordinariamente diversos respecto a la clase y al número de compuestos orgánicos que pueden usar como fuente principal de carbono y energía. Esta diversidad se manifiesta en el hecho de que no hay en la naturaleza - ningún compuesto orgánico que no pueda ser utilizado como fuente de carbono y energía por algún microorganismo. Sin embargo, los requerimientos de carbono orgánico de los microorganismos puede ser muy versátil, mientras que en otros resulta más especializa-

do. (39, 58, 60, 62 y 63).

- Requerimientos de Nitrógeno y Oxígeno.

El nitrógeno y el azufre de los compuestos orgánicos de la célula, se encuentran principalmente en forma reducida, como grupos amino y sulfhidrilos, respectivamente. Algunos microorganismos son incapaces de realizar la reducción de uno de estos dos aniones, o bien de ambos, y se les debe administrar dichos elementos en forma reducida. La necesidad de una fuente de nitrógeno reducido es relativamente común y puede cubrirse mediante la producción de nitrógeno en forma de sales de amoníaco. El requerimiento de azufre reducido es más raro, puede satisfacerse administrando un sulfuro o un compuesto orgánico que contenga un grupo sulfhidrilo, por ejemplo, la cisteína.

Los requerimientos de nitrógeno y azufre pueden cubrirse con frecuencia con nutrientes orgánicos que contienen estos dos elementos de combinación orgánica reducida (aminoácidos o productos más complejos de la degradación de las proteínas, tales como las peptonas). Estos dos compuestos pueden proporcionar fuentes de carbono y energía, cubriendo simultáneamente los requerimientos de carbono, nitrógeno, azufre y energía.

Varios grupos procarlióticos pueden utilizar también la fuente natural más abundante de nitrógeno, el N_2 , del que no pueden disponer los organismos eucarióticos. Este proceso de --

asimilación del nitrógeno se denomina "fijación del nitrógeno" e implica la reducción preliminar del N_2 a amoníaco. (39, 58, 60, 62 y 63).

- Factores orgánicos de crecimiento.

Cualquier compuesto orgánico que un microorganismo requiera como precursor o como constituyente de su material orgánico celular y que no pueda sintetizar a partir de fuentes de carbono más sencillas, debe ser administrado como nutriente. Los nutrientes orgánicos de este tipo, son conocidos colectivamente como factores de crecimiento. En cuanto a su estructura química y función metabólica, se dividen en :

1. Aminoácidos, requeridos como constituyentes de proteínas.
2. Purinas y Pirimidinas, requeridas como constituyentes de los ácidos nucleicos.
3. Vitaminas, variada colección de compuestos orgánicos que forman parte de grupos prostéticos o centros activos de ciertas enzimas. (39, 58, 60, 72 y 73).

RELACION DE ALGUNAS VITAMINAS HIDROSOLUBLES CON COENZIMAS. (72)

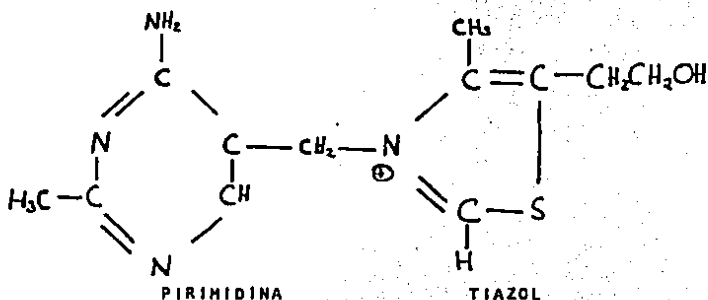
VITAMINA	COENZIMA	REACCIONES ENZIMATICAS QUE IMPLICA LA FORMA DE LA COENZIMA.
Acido Nicotínico. (niacina)	Coenzimas del Piridín Nucleótido (NAD y NADP)	Deshidrogenaciones, transporte de electrones.
Riboflavina (Vitamina B2)	Flavín nucleótidos (FAD y FMN)	Algunas deshidrogenaciones, - transporte de electrones.
Tiamina (Vitamina B1)	Pirofosfato de Tiamina (cocarboxilasa)	Las carboxilaciones y algunas reacciones de transferencias de grupos.
Piridoxina (Vitamina B6)	Piridoxal fosfato	Metabolismo de aminoácidos, - transaminación, desaminación y descarboxilación.
Acido pantoténico	Coenzima A	Oxidación de cetoácidos, metabolismo de ácidos grasos.
Acido fólico	Acido tetrahidrofólico	Transferencia de unidades de carbono.
Biotina	Grupo prostético de enzimas con biotina	Fijación de CO ₂ , transferencia de carboxilos.
Cobalamina	Enzimas con cobalamina	Reacciones de reordenación molecular.

Debido a que los factores de crecimiento cubren plenamente necesidades específicas de la biosíntesis, estos son requeridos solamente en pequeñas cantidades, en comparación con la fuente de carbono principal, que debe servir como precursor general del carbono celular. En la composición de las proteínas entran alrededor de 20 aminoácidos diferentes, por lo que evidentemente no resulta grande la necesidad de cualquier aminoácido específico que la célula sea incapaz de sintetizar.

El mismo argumento es aplicable a la necesidad específica de una purina o pirimidina, ya que en la estructura de los ácidos nucleicos entran cinco compuestos distintos de estas clases. Las necesidades cuantitativas de vitaminas son menores todavía, ya que las coenzimas de las que son precursoras desempeñan funciones catalíticas y por lo tanto están presentes a niveles de unas pocas partes por millón en la célula.

La biosíntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas y coenzimas, implica típicamente series completas de reacciones individuales escalonadas y por ello la incapacidad de realizar alguna de estas reacciones, hacen que un organismo dependa de la administración del producto final como factor de crecimiento. Sin embargo, el factor de crecimiento en sí mismo, puede ser no absolutamente esencial; si la reacción bloqueada ocurre en uno de los momentos iniciales de su biosíntesis, los precursores orgánicos que siguen al paso bloqueado, pueden ser capaces de satisfacer las necesidades de la célula como nutriente específico.

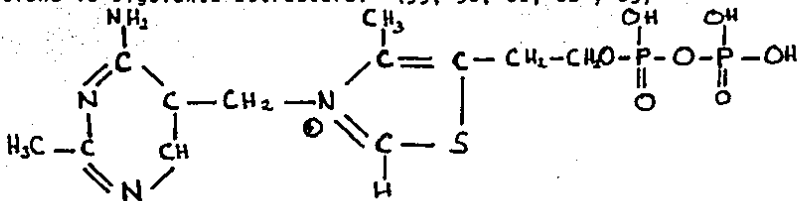
Un análisis detallado del requerimiento de un determinado factor de crecimiento, exhibido por un cierto número de microorganismos diferentes, generalmente revela que se diferencia en la forma o formas químicas particulares del factor de crecimiento que precisan, esto se puede ilustrar considerando el requerimiento de vitamina B1, que tiene la siguiente estructura.



Algunos microorganismos requieren como factor de crecimiento la molécula entera. No obstante, si reciben como nutrientes las dos mitades de la molécula, algunos microorganismos pueden unirlos. Otros requieren solo la porción correspondiente a la pirimidina, ya que pueden sintetizar el tiazol.

Por último, otros necesitan solamente la porción del tiazol, pues pueden sintetizar y añadir la porción pirimidina.

Como puede verse, existen diferentes tipos de microorganismos, y por lo tanto, es diferente el requerimiento mínimo de un factor de crecimiento. Además, en cada caso lo que el microorganismo necesita en un momento dado, es la molécula de tiamina entera, y si este compuesto se administra como nutriente, puede ser utilizado como factor de crecimiento por cualquier microorganismo. Pero la molécula entera de tiamina no es el compuesto que los microorganismos deben sintetizar como componente esencial de sus moléculas, el compuesto funcional es la coenzima cocarboxilasa que actúa de grupo prostético en varias reacciones enzimáticas. Esta coenzima es el pirofosfato de tiamina, y que tiene la siguiente estructura. (39, 58, 60, 62 y 63)



- Interacción del oxígeno en la nutrición microbiana.

Como elemento constituyente del agua y de compuestos orgánicos, el oxígeno es un componente universal de la célula y siempre se proporciona en grandes cantidades en el nutriente principal, que es el agua. Sin embargo, muchos organismos requieren además "oxígeno molecular". Se trata de microorganismos que dependen de la respiración aerobia para cubrir sus necesida-

des energéticas y en el cual el oxígeno molecular funciona como agente oxidante terminal. Tales microorganismos se denominan microorganismos aerobios obligados.

En el otro extremo fisiológico están aquellos microorganismos que obtienen energía mediante reacciones que no implican la utilización de oxígeno molecular y para los cuales esta forma química del elemento no actúa como nutriente.

Podemos decir que para muchos de estos grupos fisiológicos el oxígeno molecular es una sustancia tóxica, que los mata o inhibe su crecimiento. En algunos casos se ha demostrado que dichos microorganismos contienen enzimas que para funcionar deben permanecer en estado reducido, y que la inhibición por el oxígeno molecular refleja probablemente la inactivación de estas enzimas. Estos microorganismos son anaerobios obligados y carecen del enzima catalasa que escinde el peróxido de hidrógeno produciendo agua y oxígeno, pero poseen enzimas capaces de generar peróxido a partir del oxígeno molecular. Se ha sugerido que la muerte de tales organismos tras su exposición al oxígeno molecular esta causada por la formación intracelular y la acumulación de peróxido de hidrógeno que es un compuesto altamente tóxico.

Algunos microorganismos son aerobios facultativos, -- que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno molecular. En términos metabólicos, los anaerobios facultativos

caen dentro de dos grupos. Algunos, como las bacterias del ácido láctico, tienen un metabolismo productor de energía que es exclusivamente fermentativo, pero no son sensibles a la presencia del oxígeno. Otros pueden pasar de una forma de metabolismo respiratorio a otra fermentativa. Tales anaerobios facultativos usan oxígeno molecular como agente oxidante terminal cuando está disponible, pero en su ausencia puede también obtener energía mediante reacciones de fermentación.

Entre los microorganismos que son aerobios obligados, algunos crecen mejor a presiones parciales de oxígeno considerablemente bajas que las presentes en el aire. A tales microorganismos se le denomina microaerófilos. Esto refleja probablemente la posesión de enzimas que se inactivan bajo condiciones fuertemente oxidantes y que por lo tanto pueden mantenerse en un estado funcional solo a bajas presiones parciales de oxígeno molecular. Muchas bacterias que obtienen energía por oxidación de hidrógeno molecular muestran esta conducta, y se sabe que la hidrogenasa, enzima implicada en la utilización del hidrógeno, es fácilmente inactivada por el oxígeno. (39, 58, 60, 62 y 63).

- Preparación de medios de cultivo.

Al preparar un medio de cultivo para cualquier microorganismo, debemos tener en cuenta las consideraciones antes mencionadas, así como el objetivo principal que consisten en proporcionar una mezcla equilibrada de los nutrientes referidos, a con-

centraciones que permitan un buen crecimiento. De primera impresión parece razonable preparar un medio lo más rico posible, aportando todos los nutrientes en exceso. Sin embargo, esto no es lo más correcto, ya que en primer lugar al elevar su concentración muchos nutrientes se hacen inhibidores del crecimiento o resultan tóxicos. Esto ocurre así con sustancias orgánicas tales como las sales de los ácidos grasos e incluso con los azúcares, si la concentración es suficientemente elevada. Algunos constituyentes inorgánicos pueden hacerse también inhibidores si se suministran en exceso.

En segundo lugar, aun cuando el crecimiento pudiera tener lugar en un medio concentrado, las actividades metabólicas de la población microbiana en crecimiento, acabarían por cambiar la naturaleza del medio ambiente, hasta el punto de hacerlo altamente desfavorable, con lo que la población se haría fisiológicamente anormal o moriría. Esto puede ocurrir debido a un cambio drástico de la concentración del ion hidrógeno, por acumulación de metabolitos tóxicos o en el caso de los aerobios estrictos, por agotamiento del oxígeno. Como el fin que se persigue es estudiar las propiedades y el comportamiento de los microorganismos sanos, es por tanto nefasto limitar el crecimiento total de los cultivos proporcionándoles cantidades limitantes de un nutriente. (5, 39, 49 y 62).

A continuación se detallan algunas de las consideraciones que deben tenerse en cuenta cuando se cultiva a los micro

organismos.

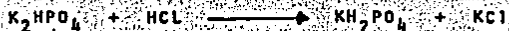
- Control del pH.

Aunque un medio determinado sea adecuado para la iniciación del crecimiento, el subsiguiente desarrollo de una población bacteriana puede resultar severamente limitado por los cambios químicos que se producen debido al crecimiento y metabolismo de los propios organismos. Así, por ejemplo, en los medios que contienen glucosa, los ácidos grasos que pueden producirse como resultado de la fermentación llegan a veces a inhibir el crecimiento.

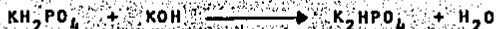
Por el contrario, la descomposición o utilización por los microorganismos de componentes aniónicos de un medio tiende a ser este medio más alcalino, así pues si tenemos una molécula de succinato sódico y le oxidamos, libera dos iones de sodio en forma de una sal muy alcalina, el carbonato sódico. La descomposición de las proteínas y aminoácidos puede también alcalinizar el medio, como resultado de la producción de amoníaco.

Para evitar cambios excesivos en la concentración del ion hidrógeno, con frecuencia se añaden al medio amortiguadores o tampones, o bien carbonatos insolubles. Los amortiguadores a base de fosfatos, que constan de mezclas de fosfatos monobásicos y dibásicos (por ejemplo K_2HPO_4 y KH_2PO_4) son los más útiles.

El KH_2PO_4 es una sal débilmente ácida, mientras que el K_2HPO_4 es ligeramente alcalina, por lo que una solución equimolecular de los dos está muy cerca de la neutralidad con un pH de 6.8, si se añade a esta solución una cantidad limitada de un ácido fuerte, parte de la sal básica se convierte ligeramente ácida:



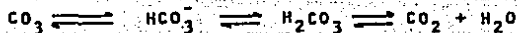
Sin embargo, si se añade una base fuerte, tiene lugar la conversión contraria:



Por tanto, la solución actúa de amortiguador en cuanto que resiste cambios radicales en la concentración del ion hidrógeno, cuando se produce ácido o álcali en el medio. Utilizando diferentes proporciones de fosfato ácido y básico, pueden establecerse diferentes valores de pH, que oscilan entre 6.0 y 7.6, sin embargo, una buena acción amortiguadora solo se obtiene en la escala más estrecha del pH, comprendido entre 6.4 y 7.2, ya que la capacidad de una solución amortiguadora está limitada por las cantidades de sus iones gradientes básicos y ácidos. Por lo tanto, cuanto más ácida es la solución amortiguadora inicial, menor es su capacidad de evitar incrementos en la concentración de iones hidrógenos y mayor su capacidad de reaccionar con los álcalis. Inversamente, cuanto más alcalina es la solución amortiguadora,

dora inicial, menor es su capacidad de evitar incrementos en el pH, y mayor su capacidad para evitar la acidificación.

Los fosfatos son ampliamente utilizados para la preparación de medios, pues son los únicos agentes inorgánicos que tienen acción amortiguadora en la escala en torno a la neutralidad fisiológicamente importante, y porque son relativamente atóxicos para los microorganismos. Además proporcionan una fuente de fósforo que es un elemento esencial para el crecimiento. Pero a concentraciones elevadas, el fósforo se hace inhibitorio, de tal manera que la cantidad de fosfato que se utiliza como amortiguador en un medio, está limitada por la tolerancia del organismo que en particular se desea cultivar. Generalmente, las bacterias y hongos pueden tolerar unos 5 gramos de fosfato de potasio por litro de medio. Cuando en un cultivo se produce una gran cantidad de ácido, las cantidades limitadas del amortiguador de fosfato que pueden ser utilizadas, resultan insignificantes para el mantenimiento de un pH conveniente. En tales casos, se pueden añadir al medio carbonatos, como "álcalis de reserva" para neutralizar los ácidos que se van formando. En presencia de iones hidrógeno, el carbonato es transformado a bicarbonato, y el bicarbonato es convertido posteriormente en ácido carbónico, que se descompone espontáneamente dando CO_2 y agua. Esta sucesión de reacciones, todas ellas libremente reversibles, pueden resumirse así:



Debido a que el H_2CO_3 es un ácido extremadamente débil y a que se descompone con la pérdida de CO_2 que va a la atmósfera, la adición de carbonatos impide la acumulación de iones hidrogeno en el medio. Los carbonatos solubles, tales como el Na_2CO_3 son fuertemente alcalinos, por lo tanto, no es adecuado su uso en los medios de cultivo, se prefiere en cambio el uso de carbonatos insolubles tales como el CaCO_3 (finamente pulverizado) ya que su insolubilidad no crea en el medio condiciones fuertemente alcalinas, especialmente si se le utiliza al mismo tiempo que otros amortiguadores. Sin embargo, cuando el pH del líquido cae por debajo de 7.0 aproximadamente, el carbonato se descompone con desprendimiento de CO_2 . Actúa por lo tanto, de agente neutralizante de cualquier tipo de ácido que aparezca en un cultivo, convirtiéndolo en sus sales cálcicas.

La adición de CaCO_3 a los medios con agar, utilizados para el aislamiento y cultivo de bacterias productoras de ácidos ayuda a conservar las condiciones neutras; además como las colonias productoras de ácidos disuelven la caliza precipitada y quedan rodeadas por zonas claras, pueden ser fácilmente reconocidas sobre el fondo opaco del medio.

En algunos casos, ni los amortiguadores ni los carbonatos insolubles pueden ser utilizados para mantener un pH relativo

vamente constante en un medio de cultivo. Surgen problemas especiales, por ejemplo cuando en un medio la presencia de carbonatos es indeseable y por lo tanto se forman grandes cantidades de ácidos.

Se presentan problemas más serios cuando se trata de controlar el pH en medios ligeramente alcalinos en los que se producen sustancias básicas como resultado del crecimiento bacteriano. Esto se debe a que los amortiguadores de fosfatos no son efectivos entre los valores 7.2 y 8.5 de pH, y no se dispone de ningún otro amortiguador adecuado en dicho rango.

Por lo tanto, en ciertos casos, es necesario ajustar el pH del cultivo periódicamente o de una manera continua mediante la adición aseptica de ácidos o bases fuertes. En algunos laboratorios y en plantas industriales se usan para esto, dispositivos mecánicos, los cuales hacen una continua titulación del medio y el pH se mantiene casi constante. (5, 39, 49 y 62).

- Control de precipitados mediante el uso de agentes quelantes.

Un problema molesto que se encuentra con frecuencia en la preparación de medios sintéticos, es la formación de un precipitado después de la esterilización, especialmente si el medio tiene una concentración relativamente alta de fosfatos. Es-

to es resultado de la formación de complejos insolubles entre -- los fosfatos y ciertos cationes, especialmente y hierro. Aunque generalmente no afectan el valor nutritivo del medio, pero pueden hacer difícil la observación y la valoración cuantitativa -- del desarrollo microbiano. Este problema puede evitarse esterilizando por separado las sales de calcio y de hierro, en solu-- ción concentrada y añadiéndolas después al medio ya estéril y -- frío, alternativamente, se puede incorporar al medio, una pequeña cantidad de un agente quelante que forme un complejo soluble con estos metales y de esta forma les impida crear un complejo - insoluble con los fosfatos. El agente quelante más común para - este fin, es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a una con centración de 0.01% aproximadamente. (5, 39, 49 y 62).

- Control de la concentración de oxígeno.

El oxígeno es un nutriente esencial para las bacte-- rias aerobias obligadas. Los microorganismos aerobios pueden -- crecer fácilmente sobre las superficies de placas de agar y en - capas superficiales de medios líquidos. En los cultivos líqui-- dos en reposo, el crecimiento generalmente ocurre en la superfi-- cie. Bajo la superficie las condiciones se hacen anaerobias y - por lo tanto el crecimiento es imposible. Para obtener grandes poblaciones en cultivos líquidos, es necesario airear el medio; para uso de laboratorio, existen varios tipos de máquinas vibra-- doras que agitan constantemente y airean el medio. Otro método

de aireación consiste en el paso continuo de una corriente de aire a través del cultivo para asegurar una extensa superficie de contacto entre gas y líquido, el aire puede ser introducido a -- través de un "dispersor" poroso que lo distribuye en forma de flmas burbujas.

Para un manejo adecuado de los anaerobios obligados, los microorganismos deben estar expuestos lo menos posible al -- oxígeno. Frascos con tapón de vidrio esmerilado y completamente llenos de medio, son los recipientes más adecuados para dichos - cultivos, siempre que el medio se haya desoxigenado previamente por ebullición. El cultivo de bacterias anaerobias sobre medios sólidos, puede elaborarse ya sea en placas de agar ordinarias, - pero incubadas en una atmósfera libre de oxígeno o dentro de un medio de agar desoxigenado sólido. Para la incubación anaerobia de cultivo en placa, se utilizan recipientes de diversos tipos, en general se emplean desecadores de vacío, de los cuales se -- puede evacuar el aire y llenarlos con nitrógeno puro, hidrógeno o una mezcla de cualquiera de estos gases y CO_2 . A veces, el aire es reemplazado por hidrógeno, y las últimas trazas de oxígeno son eliminadas por combustión, lo cual se efectúa con ayuda de - un catalizador calentado por electricidad, que va incorporado al recipiente, el oxígeno del aire de éste, puede eliminarse también en forma química usando una mezcla de soluciones concentradas de ácido pirogálico y carbonato de sodio que se mantienen separados hasta que el recipiente sea cerrado.

El cultivo de bacterias anaerobias se ha facilitado enormemente al descubrir que pueden ser protegidas de los efectos tóxicos del oxígeno mediante la adición al medio de agentes reductores fuertes.

La adición de ascorbato, tioglicolato sódico, cisteína o trazas de sulfito sódico al medio de cultivo, permiten manejar anaerobios aun en condiciones en donde el oxígeno está rigurosamente excluido. En un medio que contenga tioglicolato sódico (1 gramo por litro) pueden establecerse condiciones fuertemente reductoras mediante ebullición o tratamiento en un autoclave. El medio puede protegerse del contacto con el aire utilizando una capa de aceite mineral. A tales medios se les suele incorporar una pequeña cantidad de agar (0.5-2.0 gramos por litro) para aumentar su viscosidad. Esto evita la libre circulación del medio por agitación mecánica y por corrientes de convección, y contribuye de este modo a conservar las condiciones anaerobias.

El sulfuro de sodio que queda convertido en H_2S en las soluciones neutras, establece condiciones fuertemente reductoras poco después de su adición a los medios. Como el H_2S aun en concentraciones relativamente bajas, es tóxico para las bacterias, la cantidad que se puede añadir con seguridad es de 0.1 -- gramos por litro o menos. (5, 39, 49 y 62).

- Requerimientos de dióxido de carbono.

Aunque la difusión de dióxido de carbono de la atmósfera dentro del medio de cultivo, permite el desarrollo de los microorganismos, la concentración de este gas, es aun muy baja (0.03% en la atmósfera abierta y algo superior dentro de los edificios) y la tasa de crecimiento de los autotrofos esta con frecuencia limitada por la disponibilidad del dióxido de carbono bajo estas condiciones. La solución a esto consiste en gasear el cultivo con aire, el cual ha sido artificialmente enriquecido con dióxido de carbono y contiene de 1 a 5% de este gas. El control del pH se vuelve un problema, ya que pueden formarse carbonatos de calcio, los cuales son fuertemente alcalinos y si se adopta esta solución debe tenerse cuidado en modificar la composición del amortiguador del medio. En el caso de los autotrofos que pueden cultivarse en condiciones anaeróbicas en frascos cerrados (por ejemplo, las bacterias púrpuras y verdes del azufre), el requerimiento de CO_2 puede abastecerse mediante la incorporación de NaHCO_3 al medio. Los bicarbonatos solubles no pueden ser utilizados en los medios expuestos al aire, porque la rápida pérdida de CO_2 , que pasa a la atmósfera ocasiona que el medio se haga extremadamente alcalino.

- Métodos operatorios de cultivo.

La condición previa y básica para el logro de un proceso microbiológico, es que se trabaje en condiciones estériles. Los sustratos nutritivos, los líquidos diluyentes, etc., que se utilicen deben estar estériles. Los instrumentos con los que se trabaje, deben esterilizarse mediante flameado o de cualquier otro modo. En la ejecución de trabajos microbiológicos deben observarse las medidas de precaución siguientes :

- 1.- El local de trabajo debe estar lo más limpio posible y el aire debe mantenerse en quietud, por lo tanto no debe haber pasillos, puertas o ventanas abiertas, no se debe hablar innecesariamente, toser, etc.
- 2.- El lugar de trabajo debe estar asépticamente limpio, es decir, se debe lavar con una solución al 1 por 1000 de una base desinfectante de amonio cuaternario o con alcohol de 60^o. Estos y otros desinfectantes deben utilizarse, como es natural, de forma que no entren en contacto con los sustratos nutritivos o cultivos.
- 3.- En atención a la contaminación del aire, todas las manipulaciones deben realizarse con rapidez,

pero no negligentemente, según un plan establecido de antemano. De acuerdo con esto todos los objetos que quieren emplear, deben estar preparados sobre la mesa de trabajo en un orden determinado, de manera que no se pierda tiempo en su búsqueda. (39 y 62).

- Métodos de placa.

Bajo un sistema de placa, se entiende una forma de cultivo mediante la cual sobre o en una capa de sustrato nutritivo mezclado con agar o gelatina, se distribuye una suspensión de microorganismos, de manera que estos se encuentren aislados sobre o en el sustrato solidificado y a una distancia suficiente entre sí. Mediante el cultivo a la temperatura correcta, crece una colonia de cada célula aislada; el sistema de placas se puede realizar de dos formas diferentes:

- 1.- Distribución sobre sustratos nutritivos solidificados, también llamado de la extensión, se aplica solamente en los trabajos de agar, pues los de gelatina son demasiado blandos para una extensión perfecta. El sustrato de agar se funde en baño María a 90°C , y cuando la temperatura del baño ha ya descendido a unos 50°C se saca y se vierte a placas de Petri. Cuando se le ha solidificado,

debe desecarse para que no se forme agua de condensación.

La extensión misma se realiza colocando tres placas en fila, tras lo cual en el centro de la primera placa se coloca 0.1 cc aproximadamente del material inicial o una dilución adecuada del mismo. Se distribuye el material cuidadosamente por toda la placa, la distribución se logra mejor cuando la placa se gira sobre su eje con la mano izquierda y con la derecha se estría el agar en todas direcciones. Se cierra la placa y con la misma asa se repite la operación en las otras dos placas, de esta forma obtenemos tres diluciones, y debe tenerse en cuenta que no debe levantarse el asa del agar en ningún momento. Así obtenemos a las bacterias bien aisladas; para este método se puede partir de un cultivo inclinado, de un cultivo previo en placa o de un habitat natural. Cuando se ha distribuido el material en las placas, estas se colocan en una incubadora con temperaturas superiores a los 30°C, las placas deben estar colocadas con el fondo hacia arriba.

- 2.- Distribución en el sustrato nutritivo fundido. -
Esta técnica se inicia colocando los tubos con --

el medio de cultivo en un baño María, que se calienta hasta las temperaturas de fusión necesarias, mientras que se funden, se obtiene una serie de diluciones decimales a partir del material inicial, agitándolo ligeramente en el tubo, antes de pasar la cantidad medida al primer tubo de dilución, esto se realiza para separar a los microorganismos, que podrían estar unidos en agregados. De cada dilución se pasa 1 ml a un tubo con el medio fundido y se marca con un lápiz de cera el número de dilución, en el trabajo rutinario, solo se escribe el exponente de la dilución; por lo tanto 1 significa 1/10, 2 significa 1/100, y así sucesivamente. No debe pegarse etiquetas de papel pues se desprenden en la incubadora.

Cuando el medio de cultivo se ha enfriado, hasta unos 42°C, se pasa por la flama y se vierte en las placas Petri, se adiciona el material de la dilución y se cierra la placa, mediante movimientos basculares y suaves se mezcla el medio de cultivo con el inóculo. Esto debe hacerse rápidamente, pero con precaución para evitar que el medio se solidifique durante el proceso de mezcla. (39 y 62).

- Métodos de diluciones.

Cuando mediante los métodos de cultivo se quieren identificar, aislar o contar microorganismos, muchas veces se tiene que diluir el material líquido del cual se parte, en caso de que el material a estudiar no sea líquido, sino sólido, tiene que ser disuelto, suspendido o agitado con agua estéril en una proporción conocida, y la suspensión obtenida es el material de partida que eventualmente debe ser diluida.

La forma simple de una dilución, es llevar con una pipeta Pasteur, un par de gotas del material de partida a 10 ml de una solución de cloruro de sodio al 0.9% y pasando algunas gotas de esta dilución a otros 10 ml de solución salina. Como puede observarse, este procedimiento no sirve cuando se trata de trabajos cuantitativos. Por esta razón, en la obtención de diluciones debe trabajarse con una pipeta calibrada de 1 ml y en 0.1 ml, y debe también trabajarse con diluciones decimales el material de partida, es decir, 1-9, 1-99, etc.. El procedimiento a seguir es:

Colocar en una gradilla una serie de tubos - teniendo cada uno 9 ml de diluyente adecuado. El mejor resultado lo dan los tubos de cultivo sin borde de 130mm de longitud y 18mm de diámetro, los tubos se proveen de etiquetas, en las cuales se escribe 10^{-1} , 10^{-2} , etc., ya que con esta indica

ción del grado de dilución se impiden los errores, y mediante una pipeta calibrada se adiciona 1 cc del material inicial al primer tubo, los líquidos se mezclan y con una nueva pipeta se pasa 1 cc de esta dilución al segundo tubo, y así sucesivamente hasta que se haya logrado la dilución conveniente. (39 y 62).

- Método de célula única.

Aunque el sistema de placas ofrece en muchos casos -- cultivos puros, a veces fracasa cuando se trata de levaduras. Las células de levadura se aglomeran y a veces entran en contacto con bacterias. Estudios realizados mostraron que el 8% de -- las colonias sobre una placa, proceden de más de una célula; por ello Hansen elaboró una técnica con la cual se puede determinar directamente si el cultivo proviene de una sola célula. Este método tiene la máxima importancia del cultivo puro dentro de la -- industria fermentativa, se emplea una suspensión acuosa de levaduras que contiene de 60000 a 100000 células por ml. El recuento se realiza mediante la cámara de Thoma. De dicha suspensión se toma 0.1 ml y se adiciona a 10 ml de gelatina-mosto fundidos y que por lo tanto da una dilución que contiene de 600 a 1000 células por ml. La suspensión de levaduras se distribuye en la ge -- latina fundida, mediante movimientos cuidadosos de manera que no se formen burbujas de aire o espuma. Por otra parte, la distribución debe de ser tan perfecta que la levadura no forme grumos. Mediante la adición de azul de metileno a una concentración de

1:10000 a la gelatina o al mosto se puede facilitar el análisis, o mejor aun con la adición de tres gotas de una solución de Rodamina B al 1:500, agregada a 100 cc de sustrato, pueden observarse las células muertas de levadura con extrema claridad. (39 y 62).

d) Mantenimiento de los cultivos.

Los cultivos de microorganismos que se conservan sobre los sustratos usuales, se tienen que "resembrar", por regla general, en breves intervalos de tiempo a sustratos frescos, debido al rápido crecimiento y al acúmulo de productos metabólicos que de aquí se derivan. Para impedir estas frecuentes resiembras, se pueden utilizar sustratos que no favorezcan el crecimiento rápido, y que los cultivos se puedan conservar a temperaturas que se encuentran por debajo de su temperatura óptima.

- Caldos y medios sólidos.

Entre los medios líquidos que se utilizan frecuentemente en la industria de la fermentación, el que mayor éxito ha tenido es el de una solución de sacarosa al 10% que se mantiene en la oscuridad a una temperatura de 10 a 15°C, los recipientes se cierran con algodón y se cubren con parafina. Deben sembrarse pocas células para evitar el crecimiento excesivo, este medio es muy útil para conservar levaduras.

Un medio de conservación sólido es la tierra estéril y el tiempo de almacenamiento es relativamente largo y a temperatura ambiente. Las unidades reproductoras se mezclan con la tierra estéril y se cierran con algodón (dichos tapones deben estar impregnados con una solución coloreada y deben colocarse antes de que dicha solución se seque) y un capuchón metálico. Este medio es ideal para la conservación de microorganismos esporulados como hongos filamentosos, actinomicetos y bacterias. Otro medio sólido es la gelosa simple que se deja solidificar como agar inclinado. Sobre este se coloca el microorganismo puro y cuando ha alcanzado el desarrollo correspondiente, se vierte sobre él una capa de parafina previamente esterilizada. Se le coloca un tapón de algodón y un capuchón que puede ser de papel, vidrio, parafilm o metálico. Dicho capuchón se utiliza para impedir al máximo la desecación. El agar de Sabouraud es muy útil para la conservación de cultivos miceliales, ya que sobre este medio de cultivo solo se realiza un desarrollo escaso de las unidades vegetativas, por lo que no se intoxica dicho medio.

Todos los cultivos se deben conservar en una habitación no calentada. Deben conservarse en frío, en el mejor de los casos en el cuarto de refrigeración. La resiembra de los cultivos para controlarlos en cuanto a su capacidad vital, se realiza de forma que el material se saca con un asa de platino y se extiende sobre el agar enriquecido para su desarrollo. Mediante esta técnica, -

las levaduras y los hongos filamentosos, pueden conservar su capacidad vital durante dos o tres años, las bacterias deben resembrarse cada seis meses. (36, 45, 48 y 69).

- Congelación.

La congelación empieza donde la refrigeración y el almacenamiento en frío terminan. En las soluciones acuosas, cuando aumentan su concentración de sólidos disueltos, baja el punto de congelación, así pues cuanto mayor sea la cantidad de proteínas en solución, más bajo será su punto de congelación y por lo tanto tardará mucho más en congelarse el producto. La congelación se efectúa paulatinamente de afuera hacia adentro y para conservar una buena calidad durante el almacenamiento, el producto debe estar completamente congelado, evitando la presencia de núcleos sin congelar.

Los factores que favorecen la congelación y que deben tomarse en cuenta son :

- 1.- Debe existir una gran diferencia entre la temperatura del producto que va a congelarse y el refrigerante utilizado.
- 2.- Una mayor velocidad del aire refrigerante.

- 3.- Que el contacto entre el producto y el refrigerante sea lo más íntimo posible.
- 4.- Que la capacidad térmica del refrigerante sea --- grande.

Los métodos de congelación son :

- 1.- Congelación por aire.- En la congelación por aire, puede usarse aire a bajas velocidades con temperatura en la cámara de -23 a -29°C , o aire forzado con velocidades de 600 a 900m/min y con temperaturas entre -29 y -45°C . Las cámaras de congelación pueden tener túneles con carros transportadores que se mueven continuamente con un flujo de aire a contracorriente. También se puede hacer un preenfriamiento con aire a temperatura de -4°C y con una humedad relativa elevada y pasar posteriormente a una congelación rápida.
- 2.- Congelación por contacto indirecto.- En este tipo de congelación, el producto se coloca sobre charolas, bandas transportadoras u otras paredes frías, y éstas son enfriadas mediante un refrigerante circulante. De ésta forma el producto está en contacto con una pared fría y en contacto indi

recto con el refrigerante. La efectividad de este método depende del contacto entre las placas y el producto. (36, 45, 48 y 69).

- Nitrógeno líquido.

El uso del nitrógeno líquido, es una variante de la congelación, ya que se le puede encontrar en la bibliografía como congelación por inmersión. El producto que se desea preservar, se sumerge en el medio refrigerante o bien puede rociarse con el refrigerante. Por otra parte, el nitrógeno líquido (-195°C) y el dióxido de carbono líquido (-78°C), denominados líquidos criogénicos y que no son otra cosa que gases licuados, y que deben su fuerza enfriadora a su propia evaporación. Además sirven a su vez para enfriar a otros refrigerantes tales como las soluciones concentradas de sal, azúcares y la glicerina, que son líquidos con bajo punto de congelación. Una característica importante y que determina el uso de estos refrigerantes, es que no deben ser tóxicos. Por otro lado, su gran ventaja es que existe un mayor contacto entre el producto y el refrigerante, lo que reditua en una mejor calidad de procedimientos. Su limitante es que es muy caro y su uso más general es en la conservación de líneas celulares. (36, 45, 48 y 69).

- Liofilización.

La liofilización es una operación en la cual el agua es removida del producto, del estado sólido (hielo) al estado gaseoso (vapor de agua), sin pasar por la fase líquida, esta operación se denomina sublimación, gracias a la ausencia de la fase líquida, la estructura del producto no se ve muy afectada, sin embargo los cambios estructurales pueden ocurrir si la temperatura aumenta hasta la denominada temperatura de colapso. La desecación congelada impide toda alteración importante en las células, por ello se emplea en microbiología para la conservación de los microorganismos, que quedan en estado de vida latente después de la deshidratación y pueden conservarse así ilimitadamente. Sin embargo, su elevado costo limita mucho su uso.

El proceso de liofilización consta de las siguientes etapas :

- 1.- Congelación previa.
- 2.- Desecación primaria.
- 3.- Desecación secundaria.
- 4.- Empacado.

1.- Congelación Previa.- El agua contenida en el producto se encuentra principalmente libre y también ligada, por lo tanto, el agua libre se va separan-

do formando cristales de hielo y aumentando la ad
sorbidad sobre la estructura del producto.

- 2.- Desecación Primaria. - Hay que disminuir la pre-
sión de 0.1 a 0.01 mmHg para que el hielo sublime.
Por otro lado debe administrarse calor externo pa
ra que la temperatura del producto no disminuya,
el vapor formado debe ser eliminado por medio de
un condensador con una temperatura inferior a la
del producto congelado. El agua se va eliminando
de la parte externa a la interna hasta que todo -
el producto queda seco.
- 3.- Desecación Secundaria. - El agua ligada debe ser
eliminada para asegurar la concentración del pro-
ducto, esto se logra aumentando la temperatura has
ta 30 o 50°C y la humedad residual debe ser apro-
ximadamente del 2%. La presión se disminuye a --
0.01 mmHg. El proceso de desadsorción es largo y
por ello se limita a conseguir dicha humedad res
dual.
- 4.- Empacado. - El empacado del producto es una etapa
importante, ya que los productos liofilizados son
porosos y sensibles a los agentes mecánicos, al -
vapor de agua y al oxígeno, por lo tanto, se nece

sita un tipo de envase que los proteja y aisle de dichos factores, para aumentar así su poder de conservación. Se suelen emplear latas, cajas de cartón estratificado o provistas de bolsas interiores de hojas compuestas, bolsas flexibles del mismo tipo (generalmente se emplea aluminio y PVC) y ampollitas de vidrio selladas al vacío. (36, 45, 48 y 69).

IV.- MANEJO Y CLASIFICACION DE LA COLECCION DE CEPAS MICROBIANAS PARA USO INDUSTRIAL.

Las clasificaciones se fundamentan en cualesquier característica conveniente que pueda diferenciar a un organismo de otro. La clasificación y la nomenclatura de las bacterias está regulada por un comité de la Asociación Internacional de Sociedades Microbiológicas. Por lo tanto deben seguirse las siguientes reglas para evitar así errores y ambigüedades:

- 1.- Tender a la fijeza de los nombres.
- 2.- Evitar o rechazar el uso de nombres que puedan conducir a error, provocar ambigüedad o dar lugar a confusión.

- 3.- Se han tomado los nombres científicos de todas -- las clasificaciones de palabras latinas o griegas. Para la latinización de las palabras griegas, y - de otros vocablos no latinos, deben seguirse las reglas del latín clásico.
- 4.- Se trata a cada individuo como perteneciente a un número de categorías de orden consecutivo y subordinadas consecutivamente; de éstas la básica es - especie. Las categorías principales en la secuencia ascendente son : especie, género, familia, orden, clase, división.
- 5.- Cada categoría, rango o grado, recibe el nombre - de taxón, debe usarse lo menos posible la palabra grupo y solo de ser posible para designar serotipos relacionados.

Estos principios han dado lugar a las siguientes aplicaciones :

- 1.- Cada clase distinta de bacterias se denomina especie.
- 2.- Cada especie recibe un nombre, el cual se compone de dos palabras. La primer palabra es el título

genérico y siempre se escribe con mayúscula inicial, es el nombre del género al cual pertenece la especie. Es una palabra latina o vocablo latinizado, y sea cual sea su derivación o ascendencia, debe tratarse con el nombre en latín. El título genérico describe por lo general la morfología del organismo, aunque esto no es absolutamente necesario, ya que otros títulos genéricos se han dado en honor de personas o lugares. El nombre del género es un nombre en singular, no es un nombre colectivo y jamás se debe usar en plural. La segunda palabra es el apellido de la especie y jamás debe ponerse con mayúscula inicial, es por lo general aunque no necesariamente un adjetivo que modifica el título genérico.

Finalmente los criterios que se usan por lo general para la clasificación de las bacterias son:

- 1.- Cualesquier propiedad peculiar de un organismo, que lo distingan de otro y que se usan para fines de diferenciación, siempre que dichas propiedades sean razonablemente constantes.
- 2.- Las diferencias estructurales distintivas, tales como las esporas y las reacciones de tinción fun-

damentales, es decir, las coloraciones de Gram y acidorresistentes, que se emplean como base primaria para establecer las principales subdivisiones.

- 3.- Las actividades bioquímicas, los requerimientos metabólicos, la estructura antigénica, que se emplean para diferenciar aun más en especies y variedades.

Finalmente, para organizar el cepario se debe asignar una clave a cada cepa para facilitar su manejo, esta clave puede formarse con la primera letra del género y la primer letra de la especie, seguida por tres dígitos. Además cada cepa deberá contar con un expediente en donde estará contenida toda la información de dicha cepa, así como las condiciones de cultivo y mantenimiento de la misma. (6).

V.- COMENTARIOS.

El hecho de que las Instituciones Educativas presenten un cepario ya clasificado y que en un momento dado puedan proporcionar cepas de trabajo, el número de estas no abarca las necesidades para todas las ramas industriales. Ya que proporcionan solamente cepas que se utilizan a nivel de investigación y no satisfacen las demandas industriales, dichas industrias recurren a las colecciones internacionales, lo que provoca una dependencia tecnológica y a su vez una fuga de divisas tan negativa para el país.

El crear una colección de cepas clasificadas, no implica hacerlo de una forma total, sino paso a paso y esto da como resultado una creación de fuentes de trabajo tan necesarias en estos tiempos de crisis económica y que por lo tanto absorbería la mano de obra tanto técnica como calificada que existe en el país.

VI.- CONCLUSIONES.

1.- Para obtener un microorganismo de características idóneas para el proceso o para el producto que se desea en particular, debemos proveer un medio que contenga todos los nutrientes esenciales en las proporciones óptimas. Así como establecer y controlar las condiciones fisicoquímicas que dicho microorganismo requiera.

2.- El crecimiento microbiano es función de muchas variables, sin embargo el conocimiento actual permite iniciar una fermentación y poco a poco ir la mejorando y dirigiendo el crecimiento y el metabolismo microbiano en el sentido que se desea.

3.- El uso de la selección genética en la producción de microorganismos de uso industrial, da como resultado características genéticas superiores a las especies utilizadas para que produzcan compuestos bioquímicos de valor e importancia superiores, estables y de requerimientos nutricionales conocidos.

4.- El cultivo continuo ha probado ser útil en estudios microbiológicos, genéticos y bioquímicos. Y se le utiliza para enriquecer o seleccionar una cepa, ya que hace constantes las condiciones ambientales.

5.- Al elegir un método de preservación, se debe tener en cuenta el minimizar la pérdida de viabilidad durante el -- proceso y el almacenamiento, ya que la cepa debe conservarse por periodos largos de tiempo. La preservación debe evitar los cambios genéticos ya sea por mutación o por pérdida de plásmidos.

6.- Aunque se requiere de un gran capital para invertir en equipo y material en un proceso de liofilización, es en general el método de conservación más conveniente pues reduce -- los costos de almacenamiento, de espacio. Y su estabilidad reduce la frecuencia de intervenciones manuales.

7.- Se considera mucho más práctico desarrollar tecnología a pequeña escala, pues requiere de una menor inversión y son ideales para probar todas las variables hasta establecer una tecnología definitiva.

8.- La microbiología industrial es la respuesta a la necesidad de producir grandes cantidades de antibióticos, enzimas, aminoácidos y proteínas para consumo humano y animal, ya -- las fuentes convencionales no satisfacen totalmente la demanda -- de dichos productos.

VII.- BIBLIOGRAFIA BASICA.

- 1.- Abbot B. J., (1979). Some New Approaches to Biotransformation. Dev. Ind. Microbiol. 20: 345-365.
- 2.- Admassu W. Korus R., Heimafh R. and Lemmel S., (1981). Growth of *Saccharomycopsis fibuligera* In a Continuous Stirret-Tank - Fermentor. Biotech. and Bioeng. 23: 2361-2371.
- 3.- Agar D. and Bailey J., (1981). Continuous Cultivation of ---- Fission Yeast: Analysis of Single-Cell Protein Synthesis ---- Kinetics. Biotech. and Bioeng. 23: 2316-2331.
- 4.- Aharonowitz Y., (1980). Nitrogen Metabolite Regulation of --- Antibiotic Biosynthesis. Ann. Rev. Microbiol. 34: 209-215.
- 5.- Ahdelberg E., Stanier R., Ingraham J., General Microbiology. Ed. Prentice Hall Inc. (1976).
- 6.- American Type Collection Catalog of Strains (1984).
- 7.- Bailey M. and Nevalainen K., (1981). Induction, Isolation and Testing of Stable Trichoderma reesei. Mutants with Improved - Production of Solubilizing Cellulose. Enzyme Microbiol. ---- Technol. 3: 153-157.

- 8.- Baltz R., (1980). Genetic Recombination by Protoplast Fusion In Streptomyces. Dev. Ind. Microbiol. 21: 43-45.
- 9.- Ban S., Glanser S. and Samilagic M., (1979). Rapid ----- Biodegradation of Calcium Hlgrosulfonate by Means of a Mixed Culture of Microorganisms. Biotech. and Bioeng. 21: 1917-1928.
- 10.- Banwart G., Basic Food Microbiology. Ed. AVI Publishing Co. (1977).
- 11.- Brenner S., Hartley B. and Rodger P., New Horizons In ----- Industrial Microbiology. Ed. The Royal Society. (1980).
- 12.- Briffaud J., (1979). Citric Acid Production from Glucose. -- Growth and Excretion. Kinetics in a Stirred Fermentor. ---- Biotech. and Bioeng. 21: 2083-2092.
- 13.- Briffaud J., (1979). Citric Acid Production from Glucose. -- Growth and Excretion, Kinetics in a Trickle-Flow Fermentor. Biotech. and Bioeng. 21: 2093-2111.
- 14.- Brown D. and Zalnudeen M., (1977). Growth Kinetics and ----- Cellulase Biosynthesis in a Continuous Culture of Trichoderma viride. Biotech. and Bioeng. 19: 941-958.
- 15.- Bull D., (1981). Enhanced Product Formation in Continuous --

- Fermentations with Microbial Cell Recycle. Biotech. and ---
Bioeng. 23: 373-389.
- 16.- Cape E., (1980). Molecular Biology is Finally Being -----
Exploited-Let Us Count Some Ways. Dev. Ind. Microbiol. 21:
29-35.
- 17.- Carr J., Cullin C. and Witting C., Lactic Acid Bacteria In
Beverage and Food. Ed. Academic Press. (1975).
- 18.- Carrizales V., Rodriguez H. and Sardinia I., (1981). -----
Determination of the Specific Growth of Molds on Semi-Solid
Culture. Biotech. and Bioeng. 23: 321-335.
- 19.- Casida L., Industrial Microbiology. Ed. John Wiley and Sons.
(1981).
- 20.- Constantinides A., Bathia D. and Vieth W., (1981). -----
Immobilization of Brevibacterium flavum Cell on Collagen for
the Production of Glutamic Acid in Recycle Reactor. Biotech.
and Bioeng. 23: 899-916.
- 21.- Cheng-Shung C., Ladish R. and Tsao T., (1977). Cellulase -
from Trichoderma viride: Purification, Properties, Kinetics
and Mechanisms. Biotech. and Bioeng. 19: 959-981.

- 22.- Daum J. and Lenke J., (1979). Mutational Biosynthesis of --
New Antibiotics. Ann. Rev. Microbiol. 33: 177-202.
- 23.- Demain A., (1973). Mutation and Production of Secondary ---
Metabolites. Adv. Appl. Microbiol. 16: 177-202.
- 24.- Demain A., (1981). Industrial Microbiology. Science. 214:--
987-995.
- 25.- Dimmling W. and Selpenbush R., (1978). Raw Materials for the
Production of SCP. Process Biochem. 13:9-15.
- 26.- Edwards G., Holt G. and Mac Donald K., (1974). Mutants of -
Aspergillus nidulans Impaired in Penicillin Biosynthesis. J.
Gen. Microbiol. 84: 420-422.
- 27.- Flores H. and Sánchez S., (1983). Producción Fermentativa -
del Aminoácido L-triptofano por la Levadura Hansenula poly-
morpha. Rev. Tecnología de Alimentos. 18: 12-17.
- 28.- Frazier W., Microbiología de los Alimentos. 2ª Ed. Ed. Acri-
bia. (1977).
- 29.- Gaden E., (1983). Anaerobic Growth of Alcaligenes faecalis
var. denitrificans at the Expense of Ether Glycols and Non-
Ionic Detergents. Biotech. and Bioeng. 25: 627-630.

- 30.- Gawel J. and Kosikowsky J., (1978). Application of Acid Lactase to wine Making from Cottage Cheese Whey Concentrates. J. Food Sci. 43: 1031-1032.
- 31.- Ghosh A. and Sengupta S., (1978). Studies on Biochemistry of Higher Fungi. II. Submerged Growth of few Mushrooms in Synthetic Media. J. Food Sci. and Technol. 15: 237-242.
- 32.- Gong C., Fu L. and Tsao G., (1980). Purification and Properties of Glucose Isomerase of Actinoplanes missouriensis. Biotech. and Bioeng. 22: 833-845.
- 33.- Hadisepoetro E., Takada N. and Oshima Y., (1979). Microflora In Ragl an Usar. J. Ferme. Technol. 57: 251-259.
- 34.- Harish V. and Joseph R., (1978). Xylanase Production by Ultra-Violet Induced variants of Streptomyces fradiae SCF-5. J. Food Sci. 15: 243-246.
- 35.- Hass J., (1984). Methods Applications of Genetic Engineering. Food Technol. 38: 69-77.
- 36.- Heckly R., (1978). Preservation of Microorganisms. 24: 1-47.
- 37.- Hesseltine C., (1981). A Microbes View of Fermentation. Dev. Ind. Microbiol. 22: 1-18.

- 38.- Hesseltine C., (1983). Microbiology of Oriental Fermented Foods. Ann. Rev. Microbiol. 37: 575-601.
- 39.- Hobson P., Growth of Mixed Cultures and their Biological Control. 2^oEd. Ed. Prentice Hall Inc. (1978).
- 40.- Holmberg A., Sievanen R. and Carlberg G., (1980). -----
Fermentation of Bacillus thuringiensis for Exotoxin -----
Production: Process Analysis Study. Biotech. and Bioeng. -
22: 1707-1724.
- 41.- Huitrón C., Biotecnología de Enzimas. 1^oEd. Ed. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. (1983).
- 42.- Jay J., Microbiología Moderna de los Alimentos. 2^oEd. Ed. Acribia. (1978).
- 43.- Kharatyae S., (1978). Microbes as Food for Human. Ann. Rev. Microbiol. 32: 301-327.
- 44.- Killian S., Prior B., Lategan P. and Kruger W., (1981). ---
Temperature Effects on Ethanol and Isopropanol Utilization
by Candida krusei. Biotech. and Bioeng. 23: 267-275.
- 45.- Kirsop B. and Snell J., Maintenance of Microorganisms a ---
Manual of Laboratory Methods. 1^oEd. Ed. Academic Press Inc.
(1984).

- 46.- Kosikowski F., Cheese and Fermented Milk. 2nd Ed. Ed. Edward Brothers Inc. (1978).
- 47.- Kristiansen B. and Sinclair C., (1978). Production of ----- Citric Acid in Batch Culture. Biotech. and Bioeng. 22: --- 1711-1722.
- 48.- Lapage S. and Shelton J., Culture Collection and ----- Preservation of bacteria, Ed. Academic Press. (1970).
- 49.- Litsky W. and Miller B., Industrial Microbiology. Ed. Mc. - Graw Hill Book Co. (1978).
- 50.- Malfait J., Wilcox D. and Barker L., (1981). Cultivation of Filamentous Mold In a Glass Pilot-Scale Airlift Fermentor. Biotech. and Bioeng. 23: 863-877.
- 51.- Martin J. and Demain A., (1980). Control of Antibiotic ---- Biosynthesis. Microbiol. Rev. 44: 230-251.
- 52.- Matthews H. and Wade B., (1977). Pharmacologically Active -- Compounds from Microbiology Origin. Adv. Appl. Microbiol. 21: 269-288.
- 53.- Miller L. and Thayer D., (1979). Influence of Substrate on the Aminoacid Profile and Macromolecular Composition of --- Brevibacterium Species. Biotech. and Bioeng. 21: 1981-1994.

- 54.- Moo-Young M., Chahal D. and Ulach D., (1978). Single Cell - Protein from Various Chemically Pretreated Wood Substrates Using Chaetomium cellulolyticum. Biotech. and Bioeng. 20: 107-118.
- 55.- O'Leary V., Green R., Sullivan B. and Holsinger V., (1977). Alcohol Production by Selected Test Strains in Lactase ---- Hidrolyzed Acid Whey. Biotech. and Bioeng. 19: 1019-1035.
- 56.- Pamment N., Robinson C. and Moo-Young M., (1978). Solid State Cultivation of Chaetomium cellulolyticum on Alkali ----- Pretreated Sawdust. Biotech. and Bioeng. 20: 1735-1744.
- 57.- Payne W. and Wiebe W., (1978). Growth Yield and Efficiency Chemosynthetic Microorganisms. Ann. Microbiol. Rev. 32: -- 155-161.
- 58.- Pelczar Jr. M., Red R. and Cean E., Microbiología. 2ªed. - Ed. Mc Graw Hill. (1982).
- 59.- Peña A., Biotecnología. 1ªEd. Ed. Dirección General de Difusión Cultural. UNAH. (1983).
- 60.- Peppler H. and Pelman D., Fermentation Technology. Vol 1 y II. 2ªEd. Ed. Academic Press. (1979).

- 61.- Perlman D., (1980). Some Problems on the New Horizons of -
Applied Microbiology. Dev. Ind. Microbiol. 21: XV-XIX.
- 62.- Pirt S., Microbial Growth and Product Formation. 2^{ed.} Ed.
Prentice Hall Inc. (1974).
- 63.- Prescott and Dunn's. Industrial Microbiology. Ed. AVI -----
Publishing Co., Inc. (1983).
- 64.- Quener S., Sebeck O. and Vézina C., (1978). Mutants and ---
Antibiotic Synthesis. Ann. Rev. Microbiol. 32: 593-599.
- 65.- Quintero R. Ingeniería Bioquímica. 1^{ed.} Ed. Alhambra Mexi-
cana. (1981).
- 66.- Rav T., (1980). Developments in Industrial and Food -----
Microbiology. J. Food Sci. Technol. 17: 83-88.
- 67.- Reed G. Industrial Microbiology. Ed. AVI Publishing Co. Inc.
(1983).
- 68.- Reedy O., Singh H., Pathak H. and Barvak J., (1983). -----
Isolation and Functional Characterization of Hidrocarbon --
Emulsing and Solubilizing Factors Produced by Pseudomona --
Species. Biotech. and Bioeng. 25: 387-401.

ESTA YES'S NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 69.- Redviang K. and Lapage S. Preservation of Bacteria with ---
Notes on Other Microorganisms. Ed. Public Health Laboratory
Service Board. (1974).
- 70.- Rither J. and Goldman J., (1975). Microbes as Food In -----
Mariculture. Ann. Rev. Microbiol. 29: 429-433.
- 71.- Ryu D., Andreotti R., Handels H., Gallo B. and Reese E., --
(1979). Studies on Quantitative Physiology of Trichoderma -
reesei with Two-Stage Continuous Culture for Cellulase ----
Production. Biotech. and Bioeng. 21: 1887-1903.
- 72.- Scriban R. Biotechnologie. 2^eEd. Ed. Technique et -----
Documentation. (1984).
- 73.- Shanthamman R. and Murphy V., (1977). Isolation of Strepto-
myces Having High Glucose Isomerase Activity and Assessment
of their Efficiency in the Production of Fructose Groups.
J. Food Sci. 14: 73-77.
- 74.- Shvinka J., Viestrus U. and Rukliska H., (1980). Yield ---
Regulation of Lysines Biosynthesis in Brevibacterium flavum.
Biotech. and Bioeng. 22: 897-912.
- 75.- Siaskey A. and Car A., (1984). Use of Biotechnologie in the
Production of Single Cell Protein. Food Technol. 39: 108-
111.

- 76.- Salomon B. and Erickson L., (1981). Application of Data --- Consistency Test and New Parameter Estimation Methods to -- Microbial Growth on Corn Dust in Batch Culture. Biotech. -- and Bioeng. 23: 2332-2360.
- 77.- Screenath H. and Joseph R., (1978). Simulation of Glucose - Isomerase Production in Streptomyces fradiae SCP-5 by Enzyme Hydrolyzed Wheat Bran. J. Food Sci. 15: 246-249.
- 78.- Stanffer K. and Leader J., (1978). Extracellular Microbial Polysaccharide Production by Fermentation of Whey or ----- Hydrolyzed Whey. J. Food Sci. 43: 756-758.
- 79.- Whitaker A., (1978). Reed-Batch Culture. Process Biochem. 15: 10-15.
- 80.- Wilder C., Cadman T., and Hatch R., (1980). Feed Back Control of Competitive-Mixed Culture System. Biotech. and Bioeng. 22: 869-918.
- 81.- Windass J., Worsey M., Pioli E., Bart P., and Senior P., - (1980). Improved Concertion of Methanol to Single Cell --- Protein by Methilophilus methulotropus. Nature. 287: 396-401.
- 82.- White T., Meade J., and Innis M., Enzyme Clonimg for the -

Fermentation In Industry. Food Technol. 38: 90-98.

- 83.- Woodruff H., (1980). Natural Products from Microorganisms. Science. 208: 2133-2145.
- 84.- Yamane T., Hakatani H. and Fukui S., (1979). Steroid -----
Bioconversion in Water-Insoluble Organic Solvents: -----
Dehydrogenation by free Microbial Cells and by Cells -----
Entapped in Hydrophilic or Lipophilic Gels. Biotech. and -
Bioeng. 21: 2133-2145.
- 85.- Zaika L. and Kissinger J., (1981). Inhibitory a Stimulatory
Effects of Orđano on Lactobacillus plantarum and Pedioco-
ccus cerevisae. J. Food Sci. 46: 1205-1210.
- 86.- Zee J. and Simard R., (1975). Simple Process for the -----
Reduction in the Nucleic Acid Content in Yeast. Appl. ---
Microbiol. 29: 59-62.
- 87.- Zeikus J., (1980). Chemical and Fuel Production by Anaerobic
Bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34: 423-464.
- 88.- Zetliaki H. and Vas K., (1981). Effect of Oxygen Transfer -
Rate on the Composition of the Pectolytic Enzyme Complex of
Aspergillus niger. Biotech. and Bioeng. 23: 2231-2241.