

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE SISTEMAS BACTERIANOS  
MIXTOS QUE UTILIZAN EFICIENTEMENTE EL BAGACILLO DE  
CAÑA DE AZUCAR COMO SUSTRATO"

TESIS

que para obtener el título de

BIOLOGO

presenta

FACUNDO DAGOBERTO MORALES AVELINO

1985



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# C O N T E N I D O

	Página
1.0 INTRODUCCION	1
1.1. Formas tradicionales de producción de proteínas	4
1.2. Alternativas para la producción de proteína	5
1.3. Utilización de desechos agroindustriales	11
1.4. El bagacillo de caña de azúcar como sustrato lignocelulósico para la producción de biomasa microbiana	14
2.0 MATERIALES Y METODOS	19
2.1. Medios de cultivo	19
2.2. Aislamiento y selección de microorganismos	23
2.3. Separación del complejo biomasa-sustrato	24
2.4. Caracterización de las cepas seleccionadas	25
2.5. Características morfológicas	25
2.6. Características de cultivo	27
2.7. Características bioquímicas.	27
2.8. Utilización de diferentes carbohidratos y aminoácidos como fuentes de carbono	30
2.9. Estandarización de los inóculos de la cepa TE-B1025	31
2.10. Estandarización de los inóculos para sistemas mixtos	33

	Página
3.0 RESULTADOS Y DISCUSION	36
3.1. Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas	36
3.2. Crecimiento de los sistemas mixtos	44
3.3. Caracterización de las cepas	50
4.0 CONCLUSIONES	66
5.0 BIBLIOGRAFIA	68

I N T R O D U C C I O N

## 1.0 INTRODUCCION

Los seres vivos requieren ingerir en su dieta normal sustancias como carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales. Todas estas sustancias son necesarias e importantes para las diversas funciones que desempeñan estos sistemas. Entre las sustancias requeridas, sobresalen las proteínas por tener parte esencial en la estructura y función biológica y además, porque la disponibilidad de proteínas de alto valor nutritivo es menor que la de los carbohidratos y lípidos (1-5). Esta menor disponibilidad de proteínas es más crítica en los países en desarrollo debido al elevado índice de crecimiento demográfico y al precario desarrollo tecnológico que presentan; pero, sobre todo, a las formas de distribución y comercialización y al bajo poder adquisitivo de sus habitantes (4-7).

Mundialmente se consumen varios millones de toneladas de cereales, de los cuales el 50% corresponde al trigo (8).

En la tabla I, se pueden apreciar las cantidades relativas de cereales destinados al consumo humano y al consumo animal, así como las diferencias en el consumo entre países industrializados y países en desarrollo.

TABLA 1. CONSUMO ESTIMADO DE CEREALES EN LOS PAISES RICOS Y POBRES

(Millones de Toneladas)

PAISES	1970	1980	1990 <sup>a</sup>
INDUSTRIALIZADOS			
ALIMENTACION HUMANA	160.9	163.1	164.6
ALIMENTACION ANIMAL	371.5	467.9	565.7
TOTAL	532.4	631.0	730.3
TERCER MUNDO			
ALIMENTACION HUMANA	467.8	609.8	772.5
ALIMENTACION ANIMAL	50.9	99.6	163.3
TOTAL	518.7	709.4	935.8
TOTAL MUNDIAL			
ALIMENTACION HUMANA	628.7	772.9	937.1
ALIMENTACION ANIMAL	422.4	567.5	729.9
TOTAL	1051.1	1340.4	1666.1

<sup>a</sup> Volumen estimado (14).

En México, la mayor parte de la proteína consumida proviene del maíz y del frijol (9). Esto es un problema ya que estos productos agrícolas de mayor consumo en México son deficientes en uno o más aminoácidos esenciales. El número de aminoácidos esenciales varía con cada especie, para el ser humano son 9: isoleucina, leucina, lisina, metionina, valina, fenilalanina, triptófano, treonina y arginina (10).

La carencia de estos aminoácidos en la dieta causa malnutrición y enfermedades. Una enfermedad severa es el "Kwashiorkor" causado por una deficiencia de lisina en la dieta. Los cereales y vegetales son invariablemente deficientes en uno o más aminoácidos esenciales, la mayor necesidad de aminoácidos para disminuir las deficiencias en la alimentación son de lisina, metionina, treonina y triptófano (11). Cuando el trigo es la mayor fuente de proteína en la dieta, es necesaria la adición de lisina para mantener el equilibrio. Similarmente, para una dieta basada en maíz, se requiere de triptófano, lisina y treonina; para una dieta con base en raíces y vegetales, es necesario añadir metionina, lisina y triptófano y para una en base al frijol se necesita añadir metionina y triptófano (12,13).



### 1.1 FORMAS TRADICIONALES DE PRODUCCION DE PROTEINA

Los alimentos proteicos se obtienen generalmente mediante prácticas tradicionales como la agricultura, la ganadería y la explotación de los recursos marinos. Estas formas tradicionales presentan características propias en cada país, en cuanto a productividad. En algunos países o regiones se presenta una buena productividad agrícola, ganadera y una buena explotación de especies marinas asociadas a un bajo índice de población. No sucede lo mismo en los países en desarrollo que son, en general, agrícolas y con un 50 a 80% de su población en áreas rurales (14,15). En muchos de estos países la relación área cultivable/población es inferior a media hectárea por persona (16).

Los países industrializados apoyados en su desarrollo económico y técnico han aplicado sus esfuerzos a las formas tradicionales de producción de alimentos logrando productividades y rendimientos altos, a veces espectaculares. Pero, aún cuando la aplicación de técnicas modernas en la producción de alimentos hayan mejorado y aumentado los rendimientos, al aplicarse en los países subdesarrollados no siempre producen los efectos esperados, lo que en gran parte se debe al alto consumo de energía

que presentan los cultivos tecnificados (17), a la menor disponibilidad de agua y a la falta de semillas mejoradas adaptadas a las condiciones locales (16,18).

Otras condiciones limitantes que afectan a las formas tradicionales de producción de proteína en los países en desarrollo se refieren principalmente al espacio disponible para la producción de granos y forrajes y para el pastoreo (16,18,19,22); al clima, en lo que respecta a la precipitación pluvial y a la orografía (19); a las plagas de insectos, bacterias y hongos; al uso restringido de los fertilizantes (16,20,21); a la baja eficiencia de conversión de proteína vegetal a proteína animal en la producción de carne (8,14,23) y a la falta de embarcaciones con capacidad adecuada de pesca a nivel comercial (19).

## 1.2 ALTERNATIVAS PARA LA PRODUCCION DE PROTEINA

De acuerdo a los datos esbozados anteriormente resulta necesaria la búsqueda de otras fuentes de proteína no convencionales (24,25) que ayuden a mejorar la producción tradicional de alimentos proteicos, sin competir por el área cultivable de que se dispone.

Tales fuentes podrían ser, la obtención de proteína foliar y la obtención de proteína unicelular (25).

Producción de proteína foliar. Se ha intentado la extracción de proteína a partir del jugo de alfalfa (26, 27); este tipo de obtención de proteína no se ha extendido a causa de los problemas que presentan los compuestos indeseables contenidos en las hojas, sin embargo, es posible que a mediano plazo se pueda obtener la proteína proveniente de plantas cultivadas ya que, en la mayoría de los casos lo utilizable para el consumo humano representa un porcentaje bajo en relación a la planta total (28).

Producción de proteína unicelular. La producción de proteína microbiana o proteína unicelular (SCP), constituye una fuente de producción de proteína con mucho potencial, ya que se pueden producir a partir de desechos que tienen un bajo valor nutritivo, tanto para el hombre como para los animales; además, tales desechos al acumularse pueden ocasionar problemas de contaminación.

El término "PROTEINA UNICELULAR" se refiere a la biomasa microbiana rica en proteína, ya sea para consumo humano o animal, proveniente de organismos unicelulares (25).

De hecho desde hace mucho tiempo, hongos, levaduras y algas se han empleado como alimento humano directamente o en alimentos fermentados (8). Sin embargo, la proteína unicelular no parece ser fácilmente utilizable en forma directa por el hombre, por lo menos no en un futuro cercano por las razones que se mencionarán más adelante (pag. 10) (29,30); pero puede ser empleada en las dietas de animales monogástricos y rumiantes (29,31), destinados al aprovisionamiento de carne, de tal forma que disminuya la cantidad de granos que actualmente se destina a la alimentación de ganado.

En la actualidad se ha intentado la producción de proteína unicelular empleando diversos sustratos como bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), melazas, desechos de licor de sulfito proveniente del pulpeo de la madera, suero de leche, granos, casava, desechos de papa, desperdicios de madera, papel, bagazos, cáscaras o vainas, estiércol, n-alcanos, metanol y metano. En general, cualquier desecho o material biodegradable puede ser considerado como un sustrato potencialmente transformable a Biomasa.

Entre los microorganismos empleados para este fin, se incluyen varios géneros de algas, levaduras, bacterias y hongos, cuyo potencial como fuentes de proteína se basa fundamentalmente en las características que pre-

senta su crecimiento en medios de cultivo relativamente simples, por ejemplo:

- a) Su crecimiento no requiere de grandes espacios y no le afectan directamente los cambios rápidos de clima. Se puede obtener una gran población de microorganismos en tubo de ensayo, en matraz o en fermentador en cualquier estación del año (24,25,31).
- b) Presentan tiempos de duplicación de su masa celular más cortos que los tiempos de duplicación de los vegetales y animales (31), (Tabla II).
- c) Tienen un mayor contenido de protefna del 30 al 80% según el tipo de microorganismo, comparado con otros productos vegetales o animales (8,32,37).
- d) La calidad de la protefna es buena ya que presentan perfiles adecuados de aminoácidos esenciales y en muchos casos, superiores a los estándares de la F.A.O. (7,29,30).
- e) Tienen la capacidad para utilizar prácticamente cualquier sustrato orgánico como fuente de carbono (33-47,89).

TABLA II. COMPARACION DE LOS TIEMPOS DE DUPLICACION  
DE BIOMASA DE ALGUNOS ORGANISMOS

---

BACTERIAS Y LEVADURAS	10 a 120 min.
HONGOS Y ALGAS	2 a 6 hrs.
VEGETALES	
POLLOS	2 a 4 "
PORCINOS	4 a 6 "
BOVINOS	1 a 2 meses
HUMANOS	2.4 a 6 "

---

TABLA II. COMPARACION DE LOS TIEMPOS DE DUPLICACION  
DE BIOMASA DE ALGUNOS ORGANISMOS

---

BACTERIAS Y LEVADURAS	10 a 120 min.
HONGOS Y ALGAS	2 a 6 hrs.
VEGETALES	1 a 2 sem.
POLLOS	2 a 4 "
PORCINOS	4 a 6 "
BOVINOS	1 a 2 meses
HUMANOS	2.4 a 6 "

---

Por otro lado, los microorganismos también presentan desventajas, entre éstas están: su toxicidad y patogenicidad, ya sea por sí mismos o por los productos que excretan en el medio de crecimiento; la presencia de una pared celular resistente que dificulta, en algunos casos, la completa digestión de la proteína; un contenido alto de ácidos nucleicos sobre todo si se tienen microorganismos con gran velocidad de crecimiento (29,30). Asimismo, la poca aceptabilidad por consumidores humanos como consecuencia de hábitos alimenticios ya establecidos (7,25).

Actualmente existen técnicas que pueden producir el alto contenido de ácidos nucleicos de la proteína unicelular, de tal modo que ésta pueda ser utilizada con mayor seguridad, incluso por humanos (48-51).

En cuando a los procesos de fermentación en desarrollo o ya desarrollados para obtener proteína a partir de derivados del petróleo (32,37,38,52 a 55,87), de metanol (32,36,56 a 58), de licores sulfúricos (59) y melaza de caña (60) son procesos considerados como de alta tecnología. Dichos procesos requieren de una gran inversión de capital; instalaciones estratégicamente ubicadas; grandes insumos de energía; personal calificado y un mercado que consuma la producción, generalmente mayor de 100,000



toneladas/año (32,46). Los países en desarrollo difícilmente podría adoptar este tipo de procesos ya que, aún cuando dispongan de la materia prima, carecen de la infraestructura completa para realizarlos. Es por eso que se ha intensificado la investigación dirigida al diseño de procesos para producción de proteína unicelular (24, 25,31,57,58), acordes a los recursos y necesidades de los países no desarrollados.

### 1.3 UTILIZACION DE DESECHOS AGROINDUSTRIALES

La mayoría de los países en desarrollo cuentan con abundantes materiales lignocelulósicos de desecho, con gran potencial para ser empleados como fuente renovable de alimentos proteicos para consumo animal.

En estos materiales, la celulosa no se presenta en forma pura, ya que normalmente se le encuentra formando complejos resistentes de celulosa y lignina. Esto, aunado a la presencia de zonas cristalinas en la misma molécula de celulosa hacen que sea prácticamente insoluble (61,62,67), razón por la cual, la biodegradación de la celulosa en la naturaleza, por microorganismos capaces de producir enzimas celulolíticas, es lenta (63,64,71). Los complejos de celulosa y lignina están asociados a otros

compuestos vegetales, principalmente hemicelulosas (62); la capacidad celulolítica de los microorganismos se manifiesta después de la degradación de los materiales más susceptibles y después de un período de inducción del sistema enzimático celulolítico (70,72,73).

Para la utilización de los materiales lignocelulósicos sin pretratamiento físico o químico, es necesario contar con microorganismos que tengan un sistema enzimático completo y eficiente. Desde este punto de vista, entre los microorganismos más estudiados se encuentran algunos hongos (7,42 a 45,88,90,92), algunas levaduras (12, 23,39,56,65,81,85) y bacterias (40,41,65,69,70,72 a 79, 94); aún cuando el mecanismo de acción enzimática en estas últimas no ha sido tan estudiado como en hongos (63, 71,90), en la mayoría de los estudios realizados con el fin de efectuar la conversión de materiales lignocelulósicos a biomasa se han usado cultivos puros.

En la naturaleza, la degradación de materiales lignocelulósicos se lleva a cabo lentamente, con el concurso de la actividad de varios tipos de microorganismos, ya sea simultáneamente o en forma secuencial; es decir, los microorganismos en la naturaleza no funcionan como cultivos puros, por lo que es lógico pensar en la posibi

lidad de acelerar la conversión de los desechos lignocelulósicos a biomasa, mediante la utilización de sistemas microbianos mixtos.

Los sistemas mixtos pueden ser asociaciones: levadura-hongo, levadura-bacteria, bacteria-hongo, o bacteria-bacteria, levadura-levadura, etc.; sin embargo, los sistemas microbianos mixtos que más se han explorado en la conversión de desechos lignocelulósicos a biomasa son los formados por bacterias; éstos fueron más efectivos que los sistemas de un solo microorganismo celulolítico (40,66,79,80 a 82). Un ejemplo de esto se encuentra en el trabajo reportado por Han, quien empleó un sistema mixto formado por una cepa celulolítica de Cellulomonas sp., y una no celulolítica, pero capaz de consumir celobiosa, Alcaligenes fecalis. La mezcla de estas dos bacterias al ser crecidas en un sustrato celulósico presentó un mejor crecimiento que la cepa celulolítica sola (82). En los trabajos del grupo de la Universidad de Louisiana, se reportan resultados similares al usar una cepa bacteriana de Cellulomonas sp., con una levadura, para degradar el bagacillo de caña sometido previamente a tratamiento químico (66). Existen otros ejemplos de sistemas mixtos reportados, donde los resultados son similares a los anteriores (40,79,81).

Todo ésto lleva a considerar que el estado actual de la utilización de los desechos agroindustriales requiere de una mayor investigación que promueva y apoye el desarrollo de nuevos enfoques en la conversión de estos materiales a proteína microbiana de alto valor nutritivo.

#### 1.4 EL BAGACILLO DE CAÑA DE AZUCAR COMO SUSTRATO LIGNOCELULOSICO PARA LA PRODUCCION DE BIOMASA MICROBIANA.

México cuenta con una gran cantidad de desechos agroindustriales y urbanos. Entre los más importantes se encuentran el bagacillo de caña de azúcar y la pulpa de henequén (67,68), los cuales son subproductos de industrias ya establecidas, por lo que son abundantes y fácilmente disponibles.

Se conoce como bagacillo o médula a la porción no fibrosa predominantemente constituida por células parenquimáticas y que resulta del proceso de extracción del jugo de caña de azúcar y durante la fabricación de papel a partir de bagazo de caña.

La disponibilidad del bagazo de caña de azúcar a nivel mundial se ha calculado en más de 104 millones de toneladas anuales y constituyen aproximadamente el 45% de la

caña seca (62,67).

En nuestro país se producen anualmente cerca de 30 millones de toneladas de caña de azúcar, que a su vez producen 12.5 millones de toneladas de bagazo, cuyo contenido en celulosa es del 51% aproximadamente, es decir, si se mantiene el nivel de producción de la caña de azúcar se dispondría, en cada ciclo anual, de casi 7 millones de toneladas de celulosa, de las cuales unos 3 millones estarían contenidas en el bagacillo (67).

En la tabla III se muestra la composición relativa del bagazo de caña de azúcar.

Entre los materiales celulósicos de desecho que se han estudiado, los mayores esfuerzos de investigación y desarrollo se han centrado en el bagacillo de caña (41, 62,63,66). Sin embargo, todavía no existen procesos a gran escala que utilicen dicho sustrato como fuente de carbono, debido a que requiere de un pretratamiento físico y/o químico para que la celulosa sea convertida adecuadamente a proteína unicelular (41,60,61,65,71); aunque los pretratamientos son técnicamente factibles a la fecha no han demostrado ser económicamente viables (67), pues son costosos y de operación compleja.

TABLA III

COMPOSICION RELATIVA DEL BAGAZO Y BAGACILLO DE CAÑA DE AZUCAR.

COMPONENTE	BAGAZO ENTERO % (Base secca)	FIBRA %	BAGACILLO %
CELULOSA	46.00	56.60	55.40
HEMICELULOSA*	24.50	26.11	29.30
GRASAS Y CERAS	3.45	2.25	3.55
CENIZA	2.40	1.30	3.02
LIGNINA	19.95	19.15	22.30
SILICIO	2.00	0.46	2.42

\* Se incluyen Arabanos, Galactenos y Xilanos.

REFERENCIA (75).

A mediano plazo es factible que se puedan desarrollar tecnológicamente los procesos de producción de proteína unicelular a partir de materiales lignocelulósicos de desecho que contemplan el uso de tecnología menos compleja y sobre todo que la producción esté dirigida a satisfacer la demanda de un mercado interno regional (42, 46); más aún, a corto plazo se podrían desarrollar procesos de enriquecimiento proteico de estos materiales por fermentación, para que puedan ser empleados como forrajes mejorados (23,43,54,60,61), sin tener que utilizar procesos de separación de la biomasa y el sustrato residual.

Estas consideraciones hacen importante el estudiar el bagacillo de caña de azúcar como modelo de sustrato lignocelulósico para la producción de biomasa microbiana, de tal forma que se aumente el contenido de proteína y, por lo tanto, el valor nutritivo del bagacillo sin haberlo tratado previamente. Por otro lado, debido a que al utilizar sistemas microbianos mixtos, se ha visto que aumenta la degradación de desechos celulósicos, es razonable pensar que, utilizando sistemas de este tipo, se podría degradar mejor el bagacillo nativo, es decir, el bagacillo sin pretratamiento químico y/o físico.

De acuerdo a los reportes, los sistemas mixtos que

se han probado han sido construidos "artificialmente". La eficiencia relativa de tales sistemas justifica la búsqueda de asociaciones mixtas naturales de microorganismos adaptados a las regiones o habitats donde el desecho es producido y acumulado.

Por todo lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo se centra en el aislamiento y caracterización de sistemas mixtos bacterianos que degraden eficientemente el bagacillo de caña de azúcar nativo, sin que éste sea sometido a ningún pretratamiento ni físico ni químico.



## MATERIALES Y METODOS

## 2.0 MATERIALES Y METODOS

### 2.1 MEDIOS DE CULTIVO

Para el aislamiento de microorganismos se empleó un medio de cultivo similar al reportado por Han y Srinivasan (83), el cual es un medio mínimo que fue denominado "F" y que contiene:

	( % )
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.01
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.017
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.05
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.05
$\text{CaCl}_2$	0.01
$\text{NaCl}$	0.6

El pH del medio se ajustó a 6.8, posteriormente se esterilizó a 24 lbs. de presión y 115°C durante 30 minutos. El  $\text{CaCl}_2$  se disolvió por separado y se adicionó después de esterilizado.

Para el crecimiento de los microorganismos se empleó el mismo medio "F", pero suplementado con 0.05% de extracto de levadura, al cual se le denominó "FS". En la preparación de inóculo y conservación de las cepas -

aisladas se emplearon los medios denominados "Z" y "MC".

El medio "MC" es un medio rico para bacterias que contiene:

	( % )
Extracto de levadura (Difco)	1.0
Glucosa (Difco)	2.0
Peptona (Difco)	2.0

El pH del medio se ajustó a 6.8 y posteriormente se esterilizó a 115°C durante 30 minutos. Para preparar medio sólido se agregó 2% de agar.

El medio de cultivo "Z" es una modificación del reportado por Han y Srinivasan (83) consistente en:

	( % )
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.017
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.05
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.05
$\text{CaCl}_2$	0.01
$\text{NaCl}$	0.6
Extracto de levadura (Difco)	0.3
Glucosa	0.5

El pH del medio se ajustó a 6.8 y se esterilizó a 115°C durante 30 minutos. Para preparar el medio sólido se agregó 2% de agar (Difco).

En los ensayos de caracterización se emplearon los siguientes medios:

Caldó Nutritivo (CN):

	( % )
Extracto de carne	0.3
Peptona	0.5
pH final	7.0 a 7.2

Gelosa Nutritiva (GN):

Contiene lo mismo que el caldo nutritivo más 1.5% de agar.

Gelatina Nutritiva (GelN):

De igual composición que el caldo nutritivo más 12% de gelatina.

## Agar Almidón (AA):

	( % )
Triptona	0.1
Extracto de levadura	0.1
$K_2HPO_4$	0.05
Almidón soluble	0.03
Agar	1.5

El almidón se solubilizó por separado calentándolo.

## Caldo Peptonado (CP):

	( % )
Proteosa-peptosa (Difco)	0.5
Glucosa	0.5
$K_2HPO_4$	0.5

## Caldo Triptófano (CT):

Triptona en agua	1.0%
------------------	------

Durante la caracterización se emplearon las siguientes soluciones:

Lugol:	( % )
Yodo	5.0
Yoduro de potasio	10.0

Solución de Cloruro Mercurico ácido:

	( % )
HgCl <sub>2</sub>	15
HCl concentrado	20
Agua destilada	100 ml

Solución indicadora de Rojo de Metilo al 0.02% en -  
etanol al 60%.

Solución de KOH al 40% en agua.

Solución de Alfa-Naftol al 5% en etanol absoluto.

## 2.2 AISLAMIENTO Y SELECCION DE MICROORGANISMOS

El aislamiento de los microorganismos celulolíticos se efectuó de la siguiente manera:

Al medio salino "F" se le adicionó papel filtro tipo Whattman No. 2, parcialmente molido al 1% P/V, como única fuente de carbono. El pH del medio fue ajustado a 6.5, varios matraces con 100 ml de este medio fueron inoculados con muestras de bagacillo seco o suelo de ingenio azucarero y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm.

De cada matraz en incubación, se tomaron alicuotas

de 0.2 ml con pipeta estéril cada 24 horas, con las que se inocularon tubos de ensayo con solución de medio "F". A éstos tubos se les sustituyó el tapón de plástico por otro de gasa y algodón al que se les adaptó una tira de papel filtro (Whattman No. 2) con uno de sus extremos sumergido en el medio, se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm.

### 2.3 SEPARACION DEL COMPLEJO BIOMASA-SUSTRATO

Muestras tomadas de 5 a 7 ml, fueron centrifugadas a 1,000 rpm durante 3 minutos, después de recuperado el sobrenadante, el paquete, compuesto por el sustrato residual y la biomasa, fue lavado con solución isotónica de NaCl, aforando cada vez al volumen inicial y posteriormente centrifugado hasta tener densidades ópticas menores de 0.1 de absorbancia en el último sobrenadante.

Los sobrenadantes así obtenidos, fueron filtrados en membranas millipore de 14  $\mu$ m, y se leyó su densidad óptica a 540 nm, antes y después de filtrar, para medir la biomasa. La densidad óptica total a un tiempo dado de fermentación, se obtuvo sumando la densidad óptica de todos los sobrenadantes filtrados y restando en cada caso el valor del tiempo cero.

## 2.4 CARACTERIZACION DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Estas pruebas se basaron principalmente en la observación de los caracteres morfológicos y de cultivo, así como en pruebas bioquímicas y utilización de diferentes fuentes de carbono.

## 2.5 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

La observación de estos caracteres se efectuó mediante micrografías, tinción de Gram, tinción de cápsula y tinción de esporas de acuerdo a los siguientes procedimientos:

La tinción de Gram se efectuó de acuerdo a las técnicas reportadas en los diversos manuales de microbiología (93). Además, se empleó la técnica consistente en colocar una gota de solución de KOH al 3% en un porta-objetos, donde se emulsiona un poco de la colonia problema empleando una asa de siembra; si al separar el asa de la emulsión se forma un filamento viscoso la prueba es positiva y se trata de un microorganismo Gram negativo, si no se forma el filamento viscoso la prueba es negativa y corresponde a un microorganismo Gram positivo (84).

La tinción de esporas se efectuó mediante el método



de Wirtz modificado por Bartholomew y Mitter (93) que a continuación se describe: un frotis de cultivo problema se fija al calor; se cubre el frotis con un pedazo de papel filtro y se le impregna hasta saturación con verde malaquita. Se calienta sobre una placa, para que el colorante actúe durante 10 minutos manteniendo en todo momento la saturación del colorante. Posteriormente se lava durante 30 segundos con agua corriente. El siguiente paso consiste en teñir el frotis con un colorante de contraste como mercurocromo o fucsina fenicada, durante un minuto. Se lava con agua corriente y el exceso de humedad se quita con papel filtro. Finalmente se deja secar al aire, una vez seco se observa el frotis al microscopio con objetivo de inmersión. Las esporas se tiñen de color verde pálido, el resto de la célula se tiñe de rojo o rosa.

La presencia de cápsulas se detectó mediante la tinción de un frotis tratando con una solución diluída de tinta china y secado a temperatura ambiente (93). Las cápsulas se ven blanquecinas al microscopio. Además, se empleó el método de Dorner para tinción de cápsulas, para el cual se preparó un frotis sin secar al calor y se trató con fucsina fenicada durante dos minutos. Después de este tiempo se lavó con un mínimo de agua y se dejó secar

al aire, una vez seco se extendió sobre el frotis una gota de nigrosina saturada y se dejó secar al aire. Al observar al microscopio con objetivo de inmersión la cápsula aparece sin teñir en tanto que la célula se tiñe de color rojo.

## 2.6 CARACTERISTICAS DE CULTIVO

En los medios "CN", "MC" y "Z" líquidos, se inocularon las cepas para determinar su crecimiento superficial, turbidez y sedimento. En los medios "GN", "MC", "Z" y "AA" sólidos, se observaron las características de las colonias como forma, color, elevación, textura, etc. En tubos con medio "GN" e inoculados por picadura se observó la movilidad y el tipo de agrupación de las colonias. La movilidad también se observó directamente a través del microscopio óptico.

## 2.7 CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS

Se llevaron a cabo las siguientes pruebas:

Hidrólisis de almidón. Varias placas de medio "AA" fueron inoculadas por picadura central y por estrías cortadas en los extremos, se incubaron a 35°C durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo se cubrió la superficie

de la caja con lugol. Las cepas que formaron un halo claro, hidrolizaron almidón.

Reducción de Nitratos. Se inocularon tubos con medio "GN" más 0.1% de  $\text{KNO}_3$  y se incubaron a  $22^\circ\text{C}$  de 2 a 5 días. Al final se añadió un mililitro de ácido sulfanílico al 0.8% en ácido acético y 5 gotas de Dimetil-alfa naftil-amina al 0.5% en ácido acético. La coloración roja o parda café indicó la presencia de nitritos.

Prueba de Rojo de Metilo. Se inocularon tubos con caldo peptonado y se incubaron a  $35^\circ\text{C}$ , durante 5 días; al final se añadieron 5 gotas de solución indicadora de rojo de metilo. Un color rojo indicó que la prueba fue positiva, el color amarillo correspondió a una prueba negativa y el color naranja a un resultado dudoso.

Prueba de Voges-Proskauer. Se inocularon tubos con caldo peptonado y se incubaron a  $35^\circ\text{C}$ , durante 48 horas; al final se tomó un mililitro de cultivo y se le agregó 0.6 ml de solución de alfa-naftol al 5% en alcohol etílico, más 0.2 ml de KOH al 40%. Una coloración roja o rosada a los 5 minutos o después de 24 horas, se tomó como prueba positiva.

Producción de Indol. Se inocularon tubos con caldo

triptófano y se incubaron a 35°C durante 24 horas; al final se agregó 0.5 ml de reactivo de Erlich. Se dejó reposar durante 10 minutos y se observó la coloración en la superficie del medio. El color rojo fue prueba positiva, el medio sin cambio en la coloración fue prueba negativa y el amarillo resultado dudoso.

Prueba de Catalasa. En un porta-objetos se puso una gota de agua oxigenada comercial y se emulsionó en ella la mitad de una colonia de bacterias. La producción de burbujas pequeñas en la emulsión se tomó como resultado positivo.

Fermentación de Glucosa, Almidón, Galactosa, Lactosa, Maltosa y Sacarosa. En tubos con medio "CN" se adicionó el azúcar respectivo al 1% P/V; en cada tubo se colocó un tubo pequeño invertido. Se inocularon e incubaron a 37°C durante 5 días; al final se añadieron varias gotas de solución de rojo de metilo a cada tubo de fermentación, la aparición de un color rojo indicó la presencia de ácido y la formación de gas se observó en el extremo del tubo invertido.

Hidrólisis de la Gelatina. En tubos con medio "Gel-N", las bacterias se inocularon por picadura. Se

incubaron a 35°C durante 5 días. La prueba de hidrólisis se efectuó de dos maneras; sumergiendo los tubos de prueba en agua helada; la solidificación de la gelatina fue prueba negativa. La otra manera de probar la hidrólisis se efectuó incubando a 22°C durante 5 días; al final se adicionó cloruro mercurico ácido, la gelatina no hidrolizada precipita.

## 2.8 UTILIZACION DE DIFERENTES CARBOHIDRATOS Y AMINOACIDOS COMO FUENTE DE CARBONO.

Se prepararon dos series de cajas petri con medio "F" sólido a las que se agregaron, por separado, las siguientes fuentes de carbono al 0.5% P/V.

- a) Monosacáridos: Glucosa, Fructosa, Galactosa, L-Sorbosa, L-Ramposa, Ribosa, Xilosa, Arabinosa.
- b) Disacáridos: Sacarosa, Maltosa, Celobiosa y Trehalosa.
- c) Trisacáridos: Rafinosa.
- d) Polisacáridos: Almidón, Pectina, Acido Poligalacturónico y Xilanas.
- e) Alcoholes: Metanol y Etanol.

f) Alcoholes de Azúcar: Glicerol, D-manitol e Inositol.

g) Otros: Salicina y Acetato de Sodio.

Aminoácidos: 20 Aminoácidos, excepto Cistina.

A una de las series de cajas petri se les adicionó las siguientes vitaminas:

Biotina	2	microgramos / litro
Tiamina	400	" "
Piridoxal	400	" "
Mio-Inositol	400	" "
Acido Pantoténico	400	" "

Las vitaminas se esterilizaron por filtración y se adicionaron al medio antes de vaciar a cajas.

## 2.9 ESTANDARIZACION DE LOS INOCULOS DE LA CEPA TE-B1025 CELULOLITICA.

Para la estandarización del inóculo de la cepa TE-B1025 se determinó su curva de crecimiento en medio "Z" líquido. La cepa TE-B1025 forma parte de los sistemas mixtos utilizados en este trabajo.

Como se puede observar en la Figura 1, el máximo de

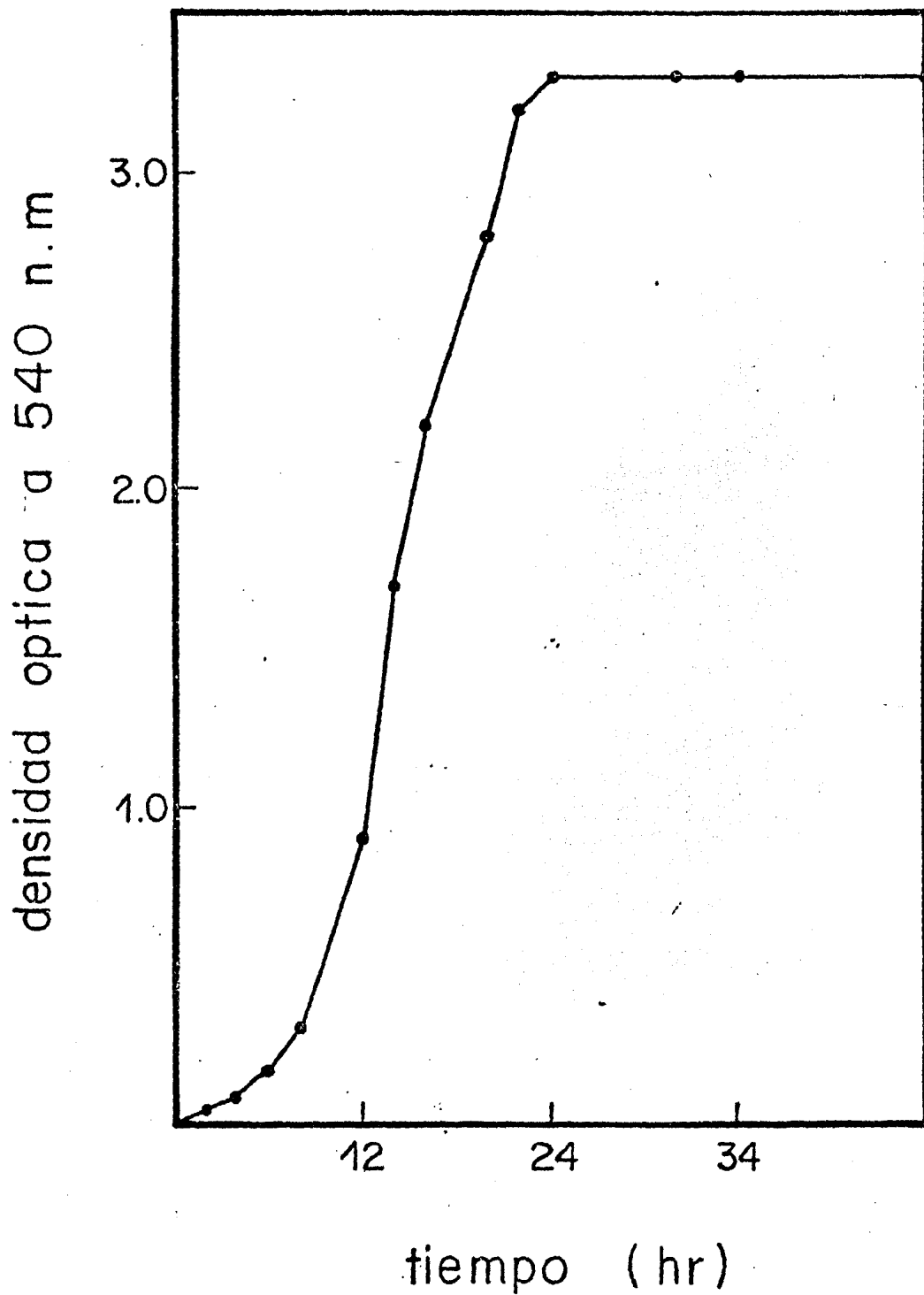


FIGURA 1. Curva de crecimiento de la cepa TE-B1025 en medio "Z" a 37°C, pH 6.5, con una agitación de 200 rpm.

crecimiento en fase exponencial, se obtuvo alrededor de las 15 horas, por lo que se estimó conveniente estandarizar la preparación de los inóculos para los experimentos realizados con este microorganismo de la manera siguiente:

- a) Crecer la cepa TE-B1025 en placas con medio "Z" durante 24 horas para asegurar la viabilidad de las células.
- b) Resembrar a matraces con 100 ml de medio "Z" líquido e incubar a 37°C con una agitación de 200 rpm durante 14 horas, es decir, hasta alcanzar el máximo de crecimiento aún en fase exponencial, una vez transcurrido este tiempo se usaron estas células como inóculo.

## 2.10 ESTANDARIZACION DE INOCULOS PARA SISTEMAS MIXTOS.

Para encontrar la relación de inóculo óptima para los sistemas mixtos formados por la cepa celulolítica TE-B1025 y las no celulolíticas TE-B1025 PA y TE-B1025 PP, se hizo necesario poder trabajar de una forma en que se supiera rápidamente la cantidad de células que se tenía en los inóculos, ésto se logró midiendo la densidad de



cada inóculo a 540 nm y leyendo en una curva estandar el valor de peso seco.

Para hacer estas curvas estandar (Figura 2), se dejó crecer a cada una de las cepas durante 14 horas, en medio "Z" líquido a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  y 220 rpm, posteriormente, se recuperó el paquete celular centrifugando a 10,000 rpm durante 30 minutos, y con éste se prepararon suspensiones de diferente concentración celular, en solución salina isotónica, a las que se les leyó su densidad óptica a 540 nm.

Posteriormente, se filtraron de cada una, volúmenes iguales sobre membranas Millipore previamente lavadas que, posteriormente, se pusieron a secar a  $70\pm 1^\circ\text{C}$  para evitar que tanto las células como las membranas se quemaran, una vez secas se pesaron y se calculó el peso de células, en gramos por litro, correspondiente a cada densidad óptica; los valores obtenidos fueron ajustados por el método de mínimos cuadrados.

densidad optica a 540 n.m.

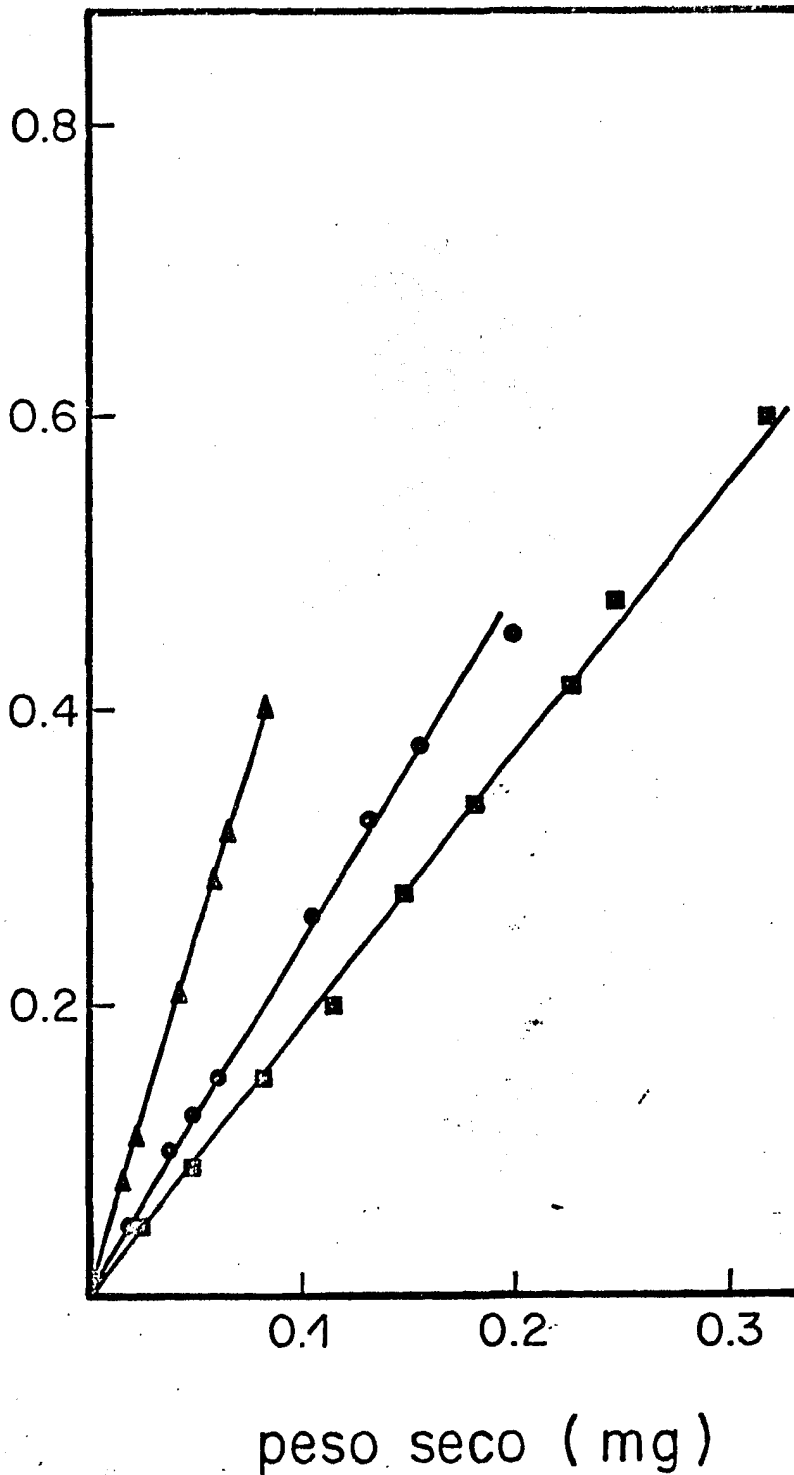


FIGURA 2. Curva patrón de peso seco Vs. D.O. de las cepas TE-B1025 (●); TE-B1025 PP (■) y TE-B1025 PA (▲) crecidas en medio "Z" a 37°C, pH 6.5 con una agitación de 200 rpm.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.0 RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 AISLAMIENTO Y SELECCION DE BACTERIAS CELULOLITICAS.

De acuerdo con el objetivo de este trabajo, se aislaron bacterias celulolíticas capaces de degradar celulosa microcristalina, a partir de muestras de suelo de un ingenio azucarero, donde se ha acumulado bagacillo de caña por muchas décadas.

Como fue mencionado anteriormente el aislamiento se enfocó a bacterias por su mayor velocidad de crecimiento, elevado contenido proteico y perfil balanceado de aminoácidos.

Para el aislamiento de bacterias celulolíticas verdaderas, se utilizaron tubos de ensayo con tiras de papel filtro como única fuente de carbono y medio salino "F". Los tubos en que se presentó una rápida disgregación del papel filtro fueron usados para llevar a cabo una preselección de cepas, debido a que en éstos había mayor posibilidad de encontrar las bacterias celulolíticas, con mayor capacidad para degradar celulosa organizada en menor tiempo.

La purificación de cepas se efectuó usando placas con medio "Z" y todas las colonias que fueron diferentes entre sí se volvieron a probar sobre papel filtro, escogiéndose solamente aquellas que lo disgregaron en menos de 24 horas.

Las cepas así seleccionadas fueron las denominadas TE-B1016, TE-B1018, TE-B1019, TE-B1025, TE-B1027 y TE-B1029.

Dado que el crecimiento de microorganismos sobre celulosa microcristalina es un medio para evaluar el tipo de sistema celulolítico que poseen, así como su capacidad para utilizar, como sustrato, celulosa altamente organizada, sin ningún pretratamiento físico o químico que aumente su susceptibilidad al ataque enzimático y, además, como las pruebas anteriores fueron solamente cualitativas para seleccionar la mejor cepa celulolítica, se cuantificó su crecimiento sobre celulosa microcristalina en medio "F"; usando matraces agitados, de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos, se encontró que la cepa TE-B1025 fue la que presentó un mayor crecimiento, (Figura 3), razón por la cual fue seleccionada para realizar los estudios de bioconversión del bagacillo de caña de azúcar a biomasa bacteriana.

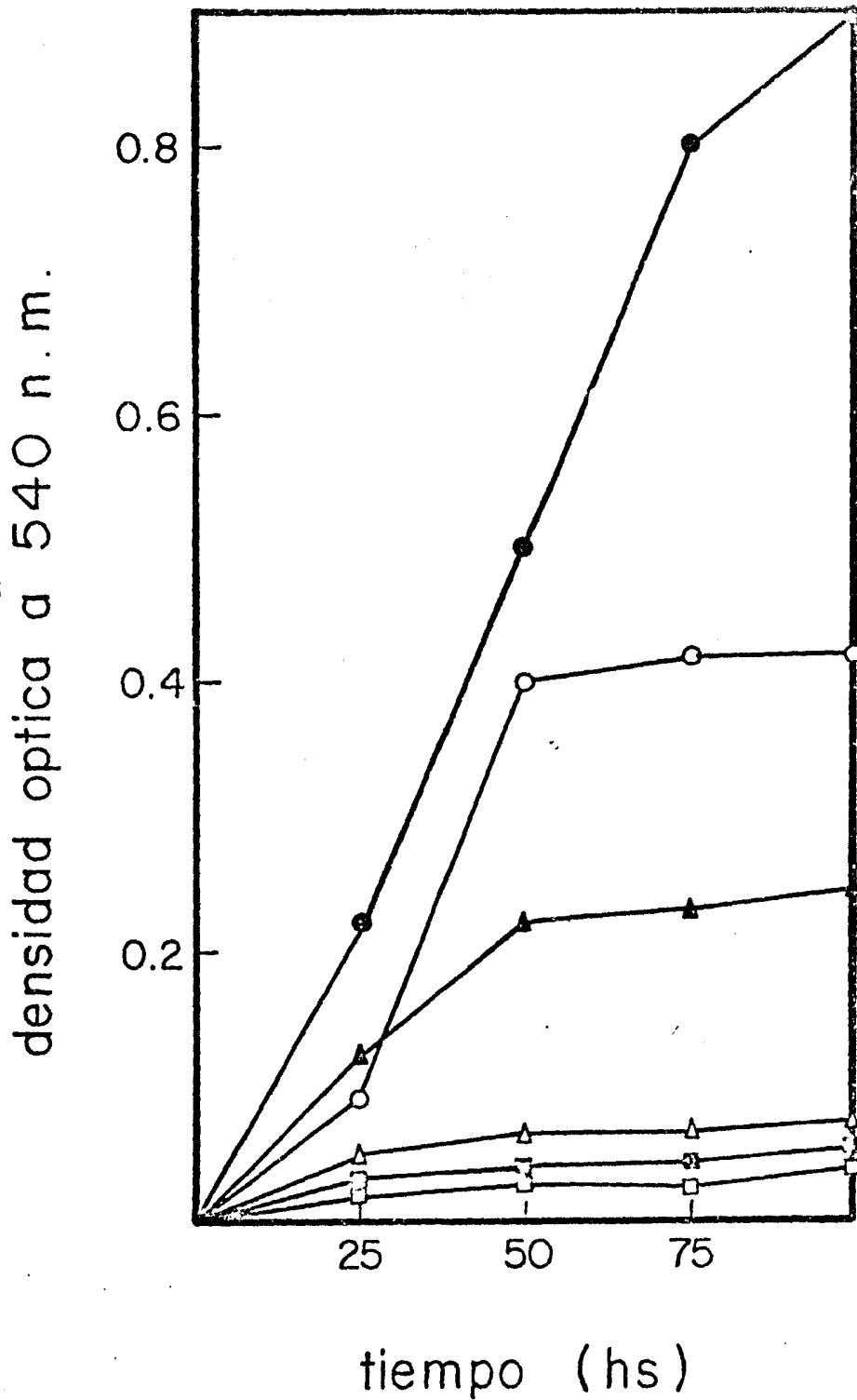


FIGURA 3. Crecimiento de las cepas TE-B1025 (●); TE-B1016 (○); TE-B1027 (▲); TE-B1029 (△); TE-B1019 (■) y TE-B1018 (□) sobre celulosa microcristalina al 1% en medio "F" a 37°C; pH 6.5 con una agitación de 200 rpm.

Durante la etapa de purificación se observó que la cepa TE-B1025 estaba muy asociada con dos cepas no celulolíticas, que fueron clasificadas como TE-B1025 PP y TE-B1025 PA, razón por la que se decidió manejar estas cepas como un solo sistema bacteriano.

Bajo el criterio de que la eficiencia de un sistema bacteriano mixto, para que degrade celulosa, depende en mucho de la capacidad celulolítica de por lo menos una de las cepas asociadas, y como el material de interés en nuestro estudio es el bagacillo de caña de azúcar, se probó el crecimiento de la cepa TE-B1025 sobre este material, sometido a un pretratamiento ácido (BT) y en forma nativa (BNT), en medio "F", comparándolo contra un control de celulosa microcristalina; se observó que el crecimiento en BNT fue menor que en la celulosa microcristalina, esto quizá se debió a una interferencia por lignina; esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el crecimiento sobre BT fue mayor y más rápido que sobre BNT y celulosa microcristalina, (Figura 4).

En la Figura 5 se puede ver que la cepa TE-B1025 fue capaz de utilizar como sustrato otros desechos agroindustriales abundantes en nuestro país, así como materiales celulósicos altamente cristalinos como CMC-23 y algo

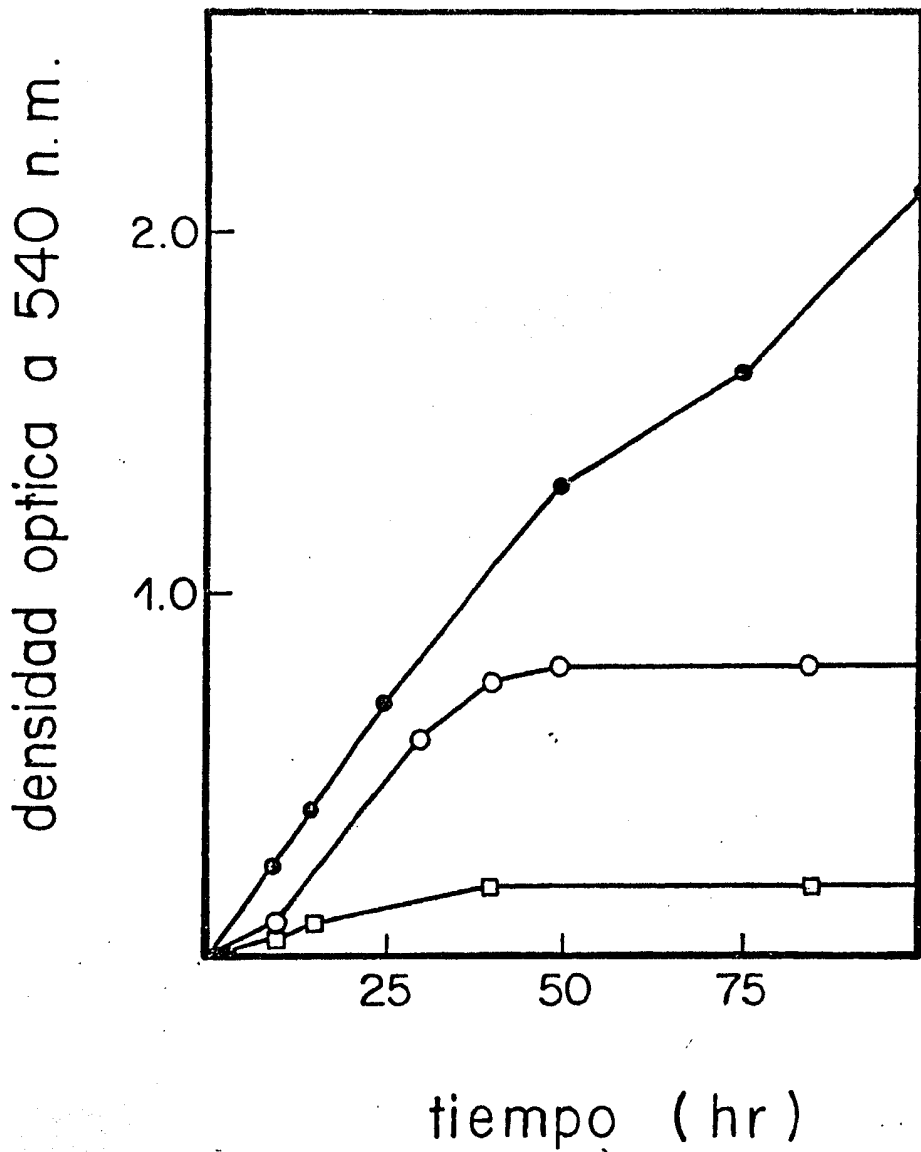


FIGURA 4. Crecimiento de la cepa TE-B1025 sobre bagacillo tratado (●); bagacillo no tratado (○); celulosa microcristalina al 1% en medio "F" (□) a 37°C; pH 6.5 con una agitación de 200 rpm.



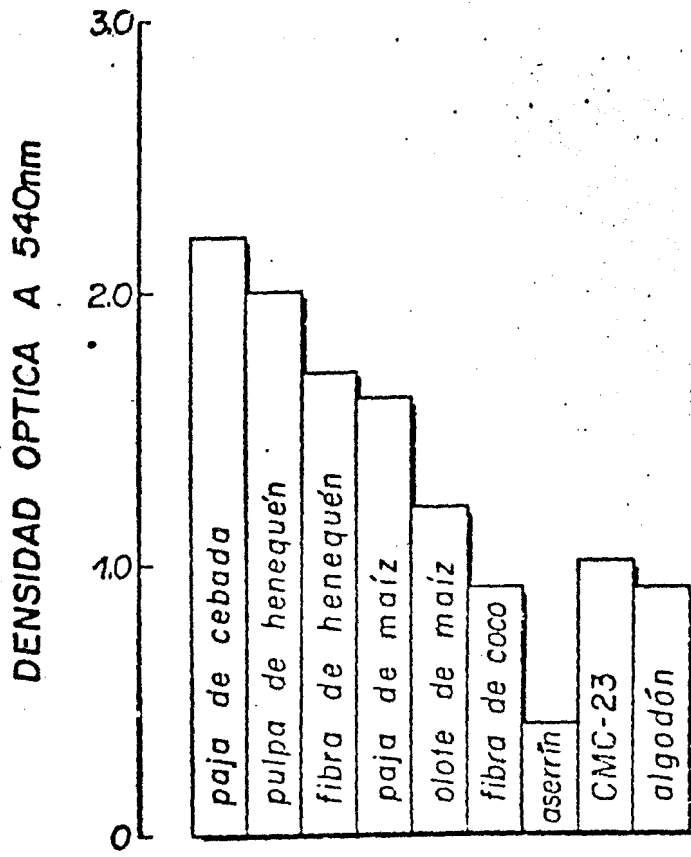


FIGURA 5. Crecimiento en matraz agitado de la cepa TE-B1025 sobre diferentes materiales celulósicos al 1%, en medio "F", incubados durante 72 horas a 37°C y 200 rpm.

dón, razón por la que consideramos que esta cepa posee un alto potencial de aplicación para la bioconversión de otros desechos agroindustriales, además del bagacillo de caña de azúcar, a biomasa microbiana.

La Figura 6 muestra que a pesar de que las cepas TE-B1025 PP y TE-B1025 PA no fueron capaces de disgregar el papel filtro y tampoco crecieron sobre celulosa microcristalina, si pudieron aprovechar como sustrato de crecimiento a la pulpa de henequén y a la fibra de coco, aunque en el caso de la cepa TE-B1025 PP, este crecimiento fue inferior al logrado por la cepa TE-B1025, quizá debido a que solo puede aprovechar los azúcares solubles presentes en estos sustratos.

En lo concerniente a la cepa TE-B1025 PA, se puede observar que aunque no pudo crecer en celulosa microcristalina, si lo logró sobre bagacillo de caña de azúcar no tratado y fibra de coco quizá debido a que, a pesar de no ser celulólitica, si posea el sistema enzimático necesario para poder utilizar las hemicelulosas y azúcares solubles presentes en estos materiales; por otro lado, esta gráfica deja ver que esta cepa es capaz de utilizar la pulpa de henequén como sustrato de crecimiento de forma similar a como lo hace la cepa TE-B1025.

densidad optica a 240 n.m.

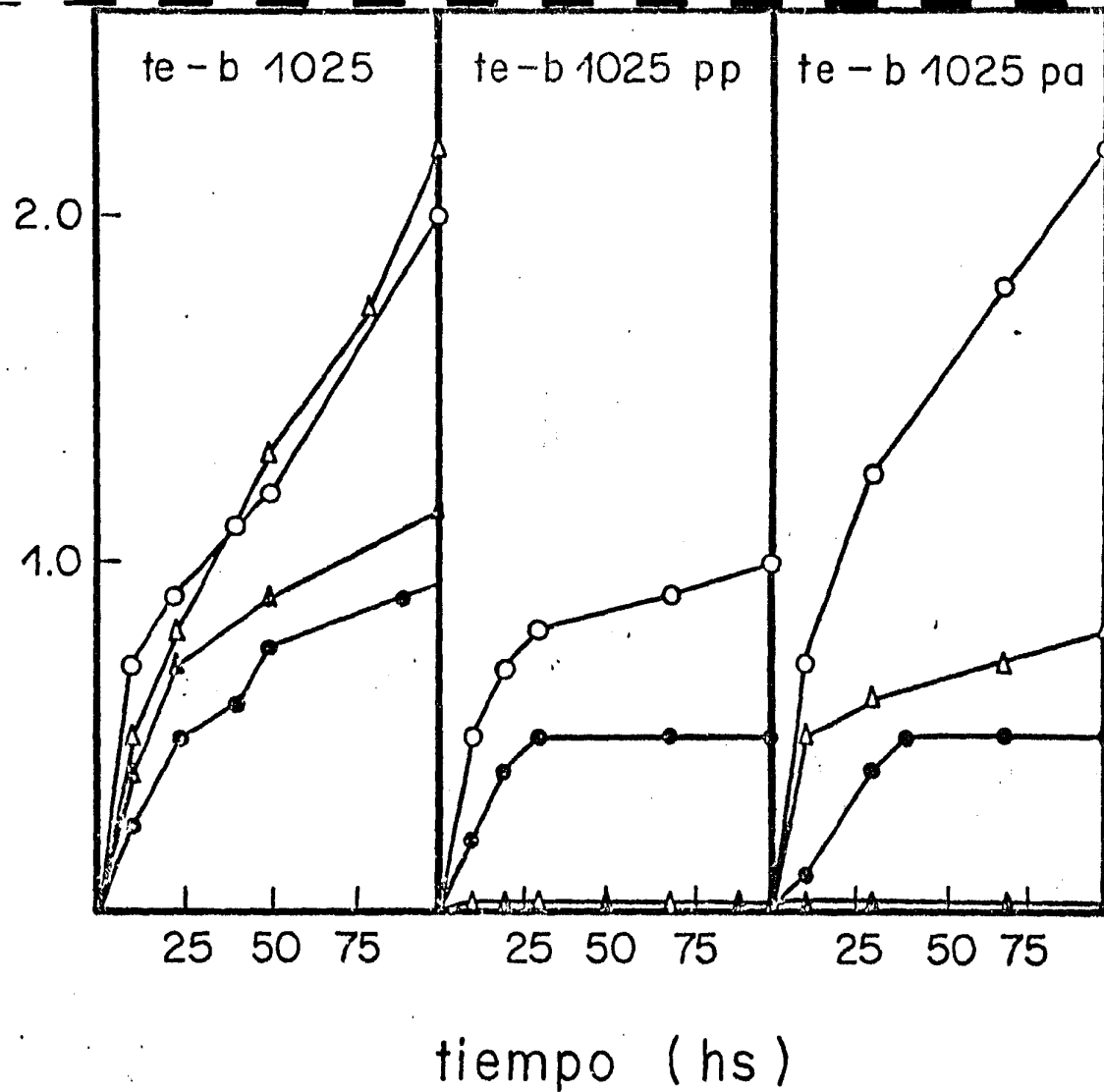


FIGURA 6. Crecimiento de las cepas TE-B1025, TE-B1025 PP y TE-B1025 PA sobre celulosa microcristalina (▲); bagacillo de caña no tratada (△); pulpa de henequén (○) y fibra de coco (●) al 1% en medio "F" a 37°C, pH 6.5 con una agitación de 200 rpm.

Existen evidencias de que las bacterias celulolíticas del género Cellulomonas son dependientes de vitaminas, - por lo que se probó un medio suplementado con extracto de levadura como fuente de vitaminas, el cual se denominó "FS", y como puede observarse en la Figura 7, el crecimiento fue mejor en todos los casos por lo que se usó es te medio para los experimentos subsecuentes.

### 3.2 CRECIMIENTO DE LOS SISTEMAS MIXTOS.

Una vez seleccionadas las cepas y medios se procedió a realizar ensayos de crecimiento de las cepas TE-B1025, TE-B1025 PA, TE-B1025 PP y los sistemas mixtos de TE-B1025/TE-B1025 PA y TE-B1025/TE-B1025 PP sobre bagacillo de caña tratado (Figura 8), y bagacillo de caña de azúcar no tratado (Figura 9) al 1% en medio salino "FS".

En este último ensayo, el crecimiento de las cepas no celulolíticas alcanzó una densidad óptica de 0.5, tal parece que dicho crecimiento se debe sólo al extracto de levadura presente en el medio, ya que las mismas cepas crecidas en bagacillo no tratado pero con medio "F", los valores de crecimiento alcanzados fueron aproximadamente de 0.2 de densidad óptica.

densidad optica a 540 n.m

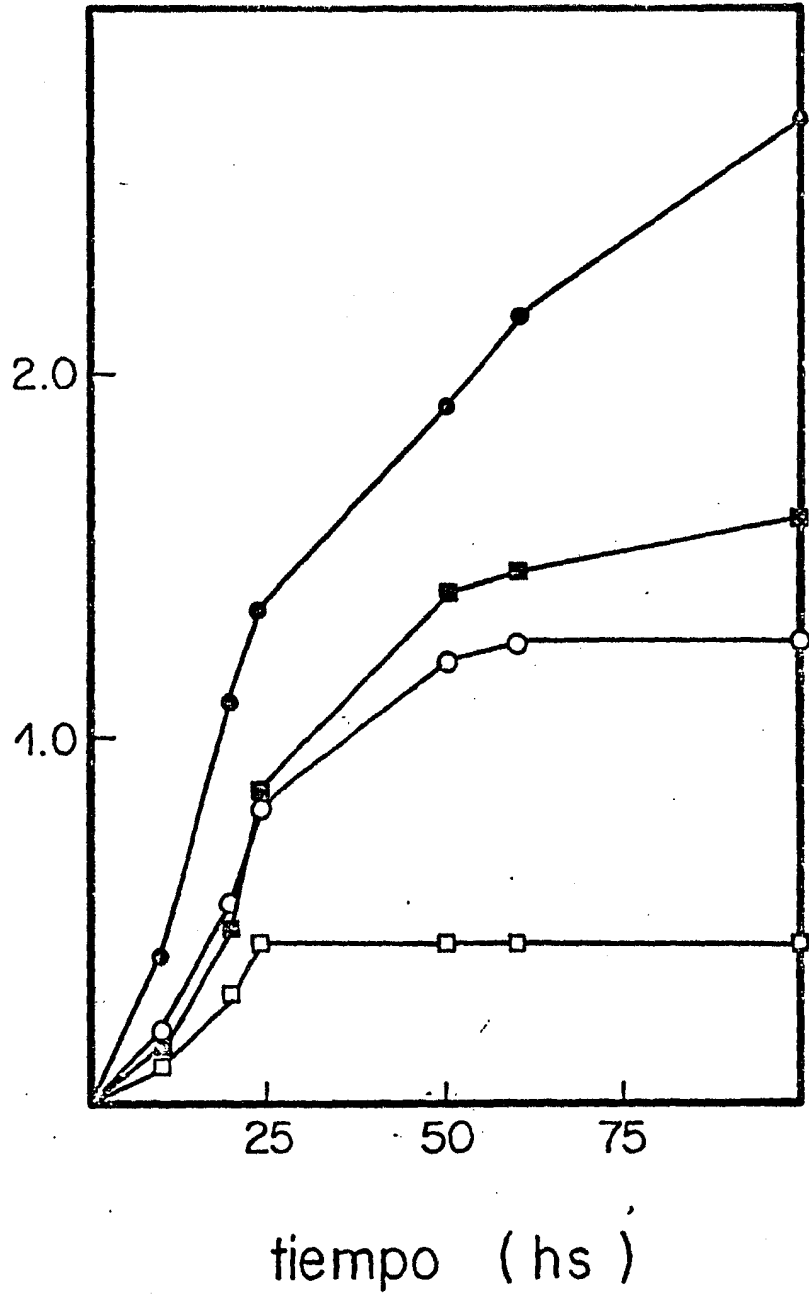


FIGURA 7. Crecimiento de la cepa TE-B1025 sobre baqacillo tratado (●); baqacillo no tratado (○); celulosa microcristalina (■) al 1% y en medio "FS" (□) a 37°C; pH 6.5 con una agitación de 200 rpm.

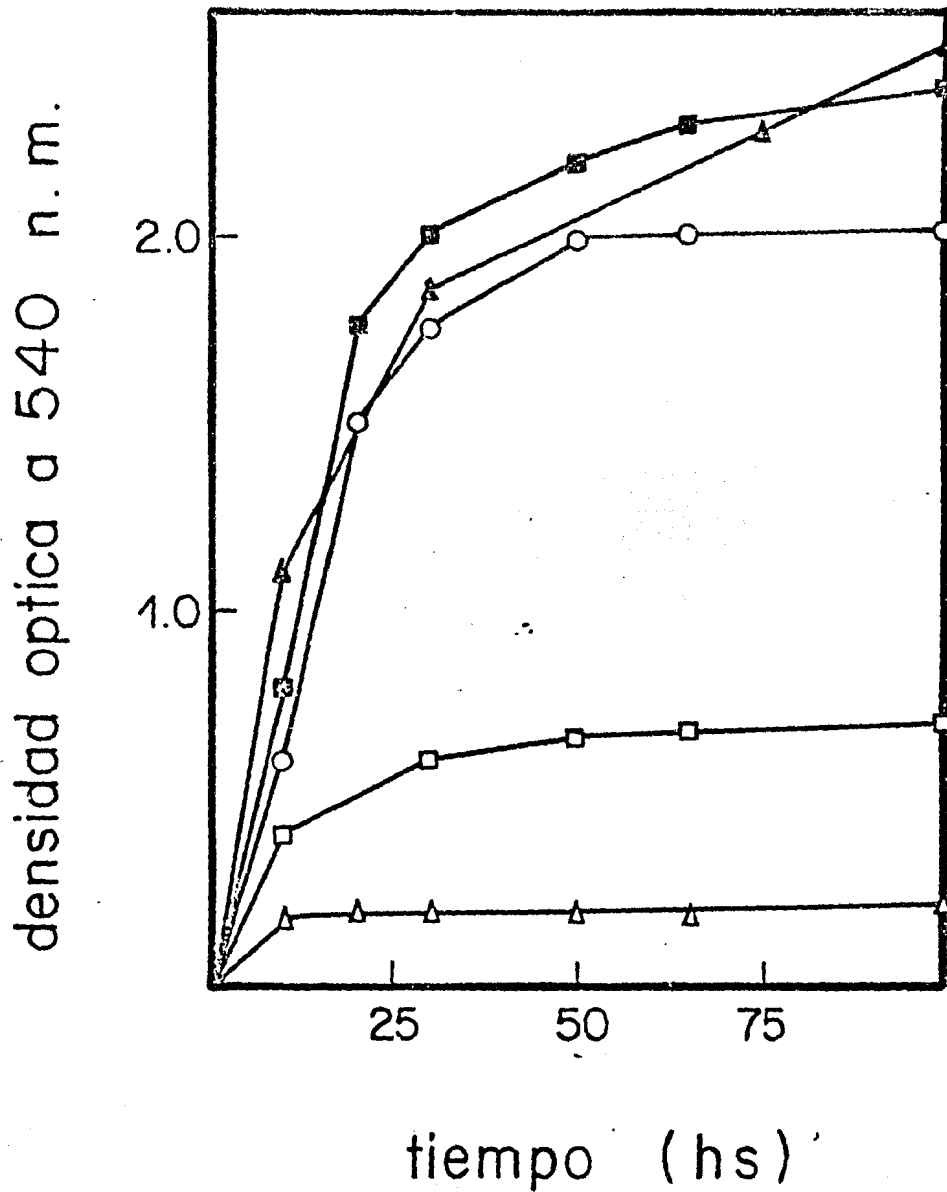


FIGURA 8. Crecimiento de las cepas TE-B1025 (○); TE-B1025 PA (◻); TE-B1025 PP (△) y los sistemas mixtos TE-B1025/TE-B1025 PA (◼) y TE-B1025/TE-B1025 PP (◻) sobre baqacillo de caña tratado, al 1% en medio "FS" a 37°C, pH 6.5, con una agitación de 200 rpm.

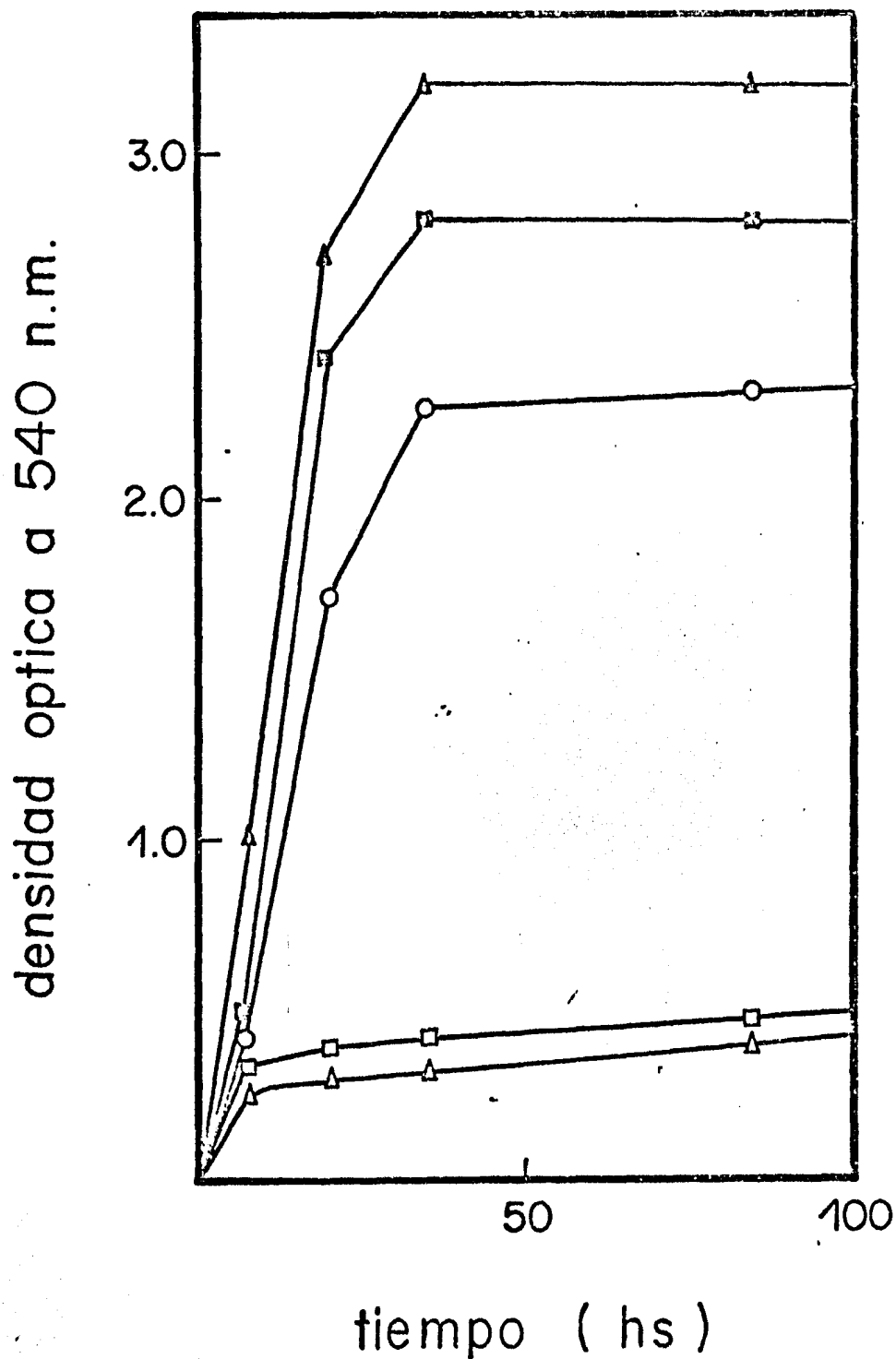


FIGURA 9. Crecimiento de las cepas TE-B1025 (o); TE-B1025 PA (□); TE-B1025 PF (Δ) y los sistemas mixtos TE-B1025/TE-B1025 PA (◊) y TE-B1025/TE-B1025 PF (▽) sobre bagacillo de caña no tratado al 1% en medio "FS" a 37°C, pH 6.5 con una agitación de 200 rpm.

En la misma figura se puede observar que, por el crecimiento alcanzado, los sistemas mixtos fueron más eficientes en la degradación del bagacillo no tratado que la cepa celulolítica TE-B1025.

Con base en el resultado anterior, se realizaron en sayos con las cepas TE-B1025, TE-B1025 PP, TE-B1025 PA y sus sistemas mixtos correspondientes crecidos sobre bagacillo de caña no tratado y medio "FS", variando las proporciones de inóculo de la cepa TE-B1025 PP y manteniendo constante la cantidad inoculada de la cepa TE-B1025 en 2.3 mg, en base seca (Figura 10).

En el Cuadro a de la Figura 10, la relación de inóculo para el sistema mixto fue de 1 a 0.5, es decir, se inocularon 2.3 mg de la cepa TE-B1025 y 1.2 mg de la cepa TE-B1025 PP; en el Cuadro b, la relación de inóculo fue de 1 a 1, 2.3 mg de la cepa TE-B1025 y 2.3 mg de la cepa TE-B1025 PP; en el Cuadro c las cantidades inoculadas fueron de 2.3 mg de la cepa TE-B1025 y 4.6 mg de la cepa TE-B1025 PP, es decir, una relación de 1 a 2.

En esta figura, se puede observar que el crecimiento logrado por la cepa TE-B1025 PP fue menor de 0.5 de densidad óptica, aún cuando la concentración inicial del



densidad optica a 540 n. m.

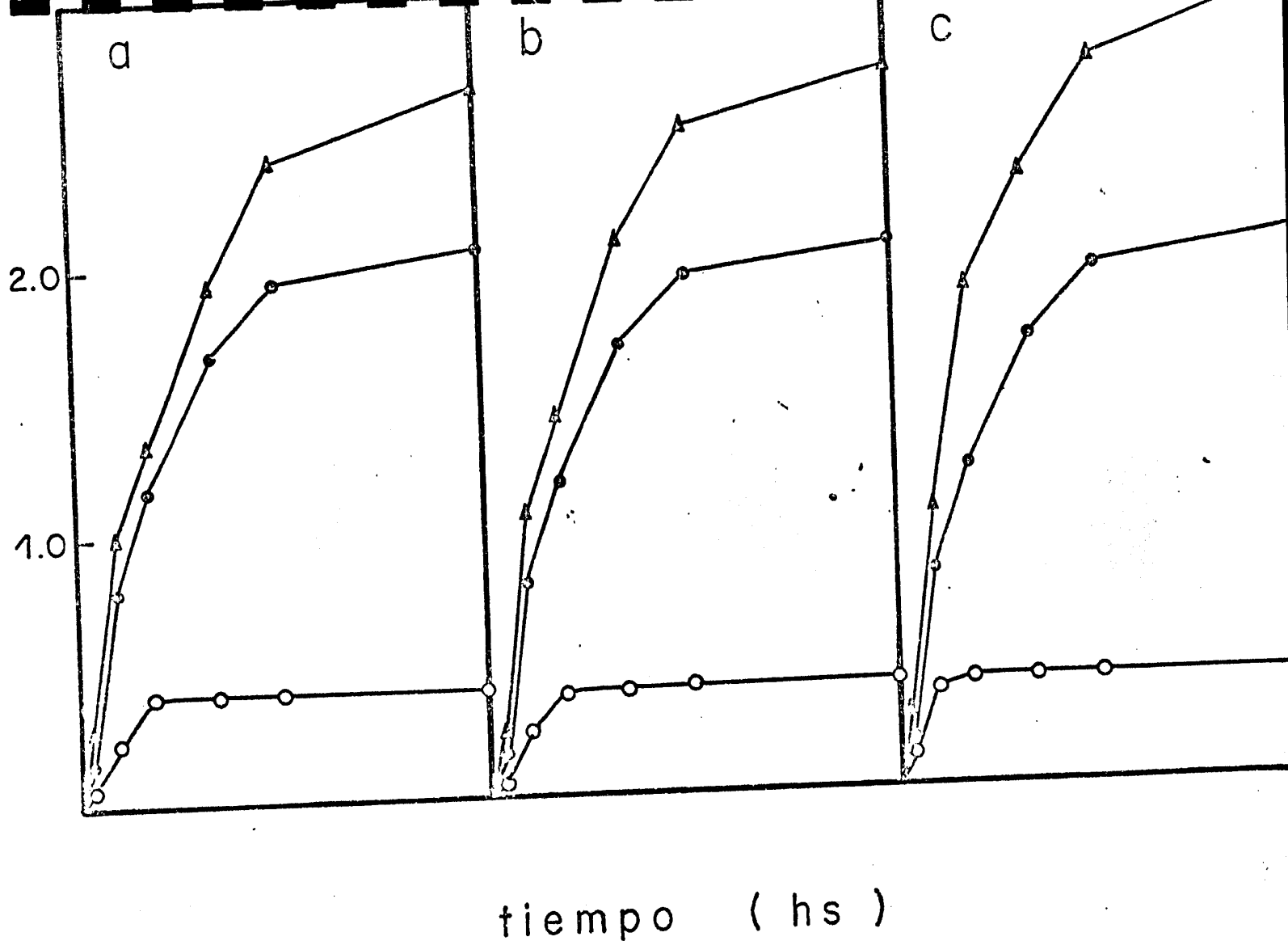


FIGURA 10. Crecimiento de las cepas TE-B1025 (●); TE-B1025 PP (○); y el sistema mixto TE-B1025/TE-B1025 PP (▲) a diferentes relaciones de inóculo en peso; 1; 0.5 (a); 1:1 (b) y 1:2 (c) sobre bagacillo no tratado al 1% en medio "FS", a 37°C; pH 6.5; con una agitación de 200 rpm. El inóculo usado en la cepa TE-B1025 fue de 2.3 mg.

inóculo aumentó de 1 a 4 veces (Cuadros a y c).

En tanto que el del sistema mixto TE-B1025/TE-B1025 PP presentó un incremento, sobre todo, en el sistema con una relación de inóculo de 1 a 2 (Cuadro c), observándose un efecto sinérgico entre las cepas TE-B1025 y TE-B1025 PP.

En el ensayo con el sistema mixto TE-B1025/TE-B1025 PA (Figura 11), crecido en las mismas condiciones que TE-B1025/TE-B1025 PP, se presentó un comportamiento similar al de la Figura 10, es decir, el sistema mixto alcanzó valores de densidad óptica crecientes, de acuerdo a la proporción inoculada de la cepa no celulolítica TE-B1025 PA. Por otro lado, esta cepa tampoco sobrepasó a 0.5 de densidad óptica.

En ambos ensayos, se muestra claramente que los sistemas mixtos utilizan el bagacillo de caña no tratado de manera más eficiente que la cepa TE-B1025.

### 3.3 CARACTERIZACION DE LAS CEPAS

Las pruebas de caracterización para cada cepa fueron realizadas como se indica en la sección de materia-

densidad optica a 540 n.m.

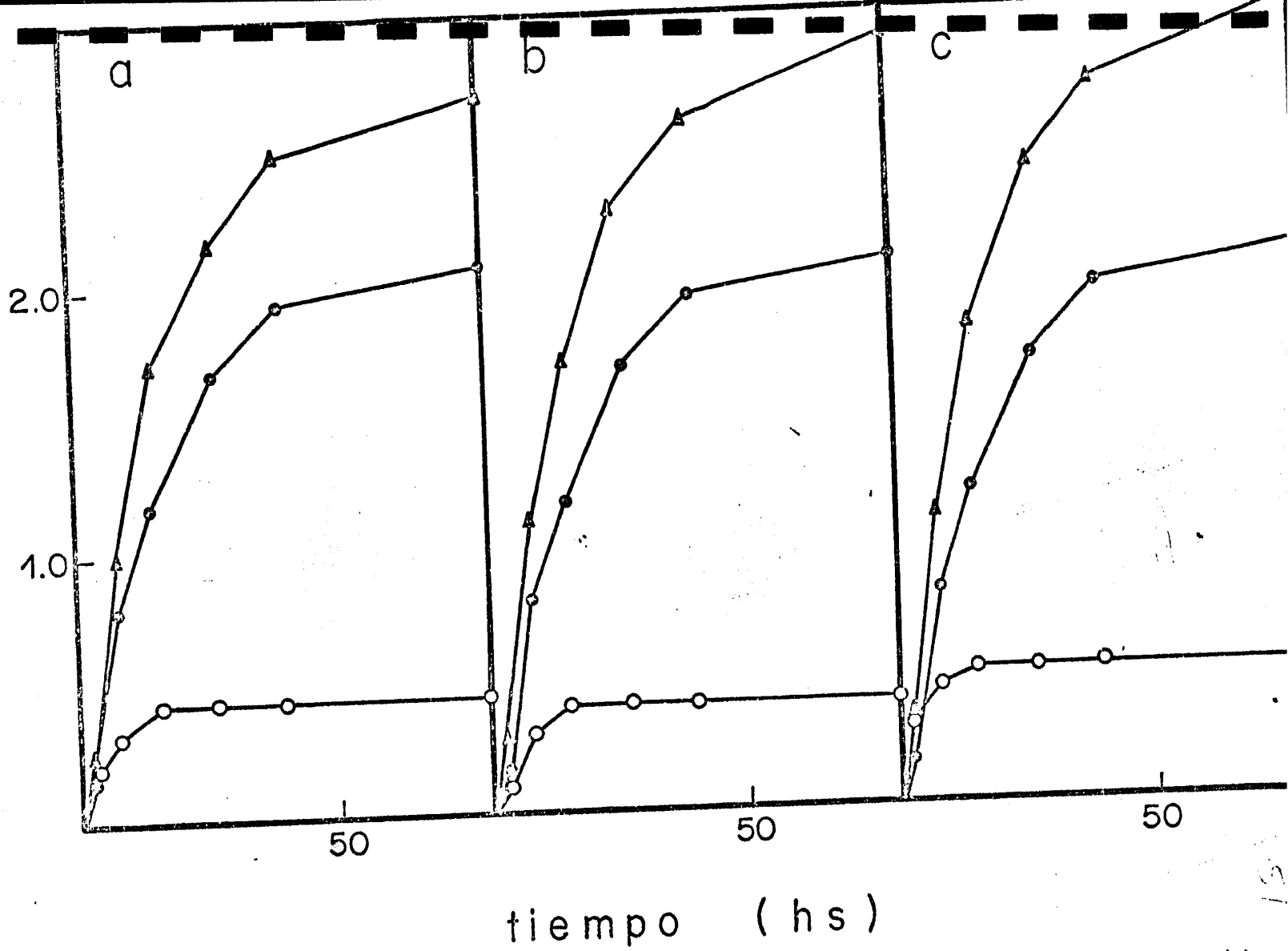


FIGURA 11. Crecimiento de las cepas TE-B1025 (●); TE-B1025 PA (○) y el sistema mixto TE-B1025/TE-B1025 PA (▲) a diferentes relaciones de inóculo en peso: 1:0.5 (a); 1:1 (b); 1:2 (c) sobre bagacillo no tratado al 1% en medio "FS" a 37°C; pH 6.5; con una agitación de 200 rpm. El inóculo usado de la cepa TE-B1025 fue de 2.3 mg.

les y métodos, los resultados se presentan en la Tabla IV.

La cepa TE-B1025 tiene forma bacilar es Gram negativo, con movilidad y con cápsula; como característica principal está su capacidad de desmenuzar el papel filtro, hidroliza lentamente la gelatina, hidroliza almidón, reduce nitratos, es catalasa positiva y fermenta azúcares como glucosa, galactosa, maltosa, lactosa y sacarosa. Las pruebas de Voges-proskauer, la de rojo de metilo y la producción de indol resultaron negativas, tanto para esta cepa como para las TE-B1025 PP y TE-B1025 PA.

La determinación de la morfología colonial de la cepa TE-B1025 crecida en Gelosa Nutritiva fue la siguiente: colonias blanco-amarillentas, de borde redondo, elevadas, brillantes, translúcidas, de superficie lisa, crecimiento lento, sin olor característico y con textura semiviscosa.

Varias de estas características se compararon con las reportadas por otros autores para Cellulomonas, (Tabla V), de tal manera que, la cepa TE-B1025, parece pertenecer a este género, (83,85,86,91,95).

TABLA IV

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS, DE CULTIVO Y BIOQUIMICAS DE LAS CEPAS QUE INTEGRAN EL SISTEMA MIXTO TE-B1025.

1. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	TE-B1025	TE-B1025 PP	TE-B1025 PA
Forma	bacilo	bacilo corto	coco
Movilidad	+	+	-
Reacción de Gram	-	-	+
Presencia de Cápsula	+	+	+
Presencia de Esporas	-	-	-
2. CARACTERISTICAS DE CULTIVO			
Caldo Nutritivo	+	+	+
Agar Nutritivo	+	+	+
Desmenuzamiento de papel filtro	+	-	-
3. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS			
Hidrólisis de Gelatina	lenta	lenta	lenta
Hidrólisis de Almidón	+	-	+
Reducción de Nitrato a Nitrito	+	+	-
Prueba de Voges-Proskaver	-	-	-
Prueba de Rojo de Metilo	-	-	-
Prueba Catalasa	+	+	+
Producción de Indol	-	-	-
Fermentación de Glucosa	+	+	+
Fermentación de Galactosa	+	+	-
Fermentación de Maltosa	+	+	+
Fermentación de Lactosa	+	+	-
Fermentación de Sacarosa	+	+	+

TABLA V

DESCRIPCION COMPARATIVA DE MICROORGANISMOS QUE UTILIZAN CELULOSA

	Celulomonas Flavigena	ASLADO DE HAN Y SRINIVASAN (8?)	TE-B1025
MORFOLOGICAS	FORMA	BACILOS, CURVOS	BACILOS, CORTOS BACILOS
	TAMAÑO	0.4-0.6 µm x 0.7-1.8 µm	0.3-0.5 µm x 0.8-1.2 µm --
	MOTILIDAD	INMOVIL	INMOVIL MOVIL
	GRAM	VARIABLE	NEGATIVO NEGATIVO
DE	AGAR INCLINADO	LISO, AMARI- LLO, OPACO BRILLANTE	LISO, AMARILLO OPACO, BRILLANTE LISO, AMARILLO BRILLANTE, TRANS- LUCIDO.
C	CALDO	TURBIDEZ UNIFORME	TURBIDEZ UNIFORME TURBIDEZ UNIFORME
U	GELATINA	LICUEFAC- CION LENTA	LICUEFACCION LENTA LICUEFACCION LENTA
L	DESMENUZAMIENTO DEL PAPEL FIL- TRO	EN AGITA- CION LIGERA	EN AGITACION LIGERA EN AGITACION LIGERA
T	COLONIAS EN PLACA		Azulosas, transparentes, lisas, planas, cir- culares, creci- miento lento en gelosa. Amarillentas, translúcidas, lisas, elevadas, circula- res, crecimiento lento en gelosa.
I	TEMPERATURA	28-33°C	25-35°C 29-39°C
O	ALMIDON	HIDROLIZA	HIDROLIZA HIDROLIZA
Q	NITRATO	REDUCE	REDUCE REDUCE
U	PRUEBA DE ROJO DE METILO	--	NEGATIVA NEGATIVA
I	PRUEBA DE VO- GES-PROSKAVER	NEGATIVA	NEGATIVA NEGATIVA
M	PRODUCCION DE INDOL	--	NEGATIVA NEGATIVA
I	GLUCOSA	ACIDO	ACIDO ACIDO
C	LACTOSA	ACIDO	ACIDO ACIDO
A	SACAROSA	ACIDO	ACIDO ACIDO
S	MALTOSA	ACIDO	-- ACIDO
	DEXTRINA	--	ACIDO --
	ALMIDON	ACIDO	-- ACIDO

La cepa TE-B1025 PP es un bacilo corto, casi de forma cocobacilar, Gram negativa, móvil y con cápsula; no desmenuza el papel filtro, hidroliza lentamente la gelatina, no hidroliza almidón, reduce nitratos, es catalasa positiva y fermenta azúcares como glucosa, galactosa, maltosa, lactosa y sacarosa; su morfología colonial es la siguiente: colonias blanquecinas, redondas, elevadas, brillantes, translúcidas, excepto en el centro, superficie lisa, crecimiento rápido, con olor característico y textura viscosa.

De acuerdo con algunos autores (85,95), la cepa TE-B1025 PP presenta características semejantes a la familia Pseudomonadaceae y probablemente pertenece al género Pseudomonas; esta cepa requiere de pruebas adicionales para su mejor ubicación taxonómica.

La cepa TE-B1025 PA tiene forma cocoide, es Gram positiva, sin movilidad y con cápsula; no desmenuza el papel filtro, hidroliza lentamente la gelatina, hidroliza almidón, no reduce nitrato, es catalasa positiva, fermenta algunos azúcares como glucosa, maltosa y sacarosa, su morfología colonial es la siguiente: colonias amarillas, redondas, convexas, brillantes, opacas, de superficie li

sa, crecimiento lento, con olor característico y textura cremosa.

Comparando las características de la cepa TE-B1025 PA con las de otros géneros afines, (Tabla VI), se observa la posibilidad de que dicha cepa pertenezca al género Micrococcus (85,95).

Se probó para cada una de las cepas, la utilización de diferentes carbohidratos como únicas fuentes de carbono, (Tablas VIIaIX), además, se probaron los aminoácidos, excepto cistina, como fuentes de carbono, (Tablas Xa.XII). En ambos casos se utilizaron también vitaminas con el objeto de observar su efecto en la utilización de las fuentes de carbono.

La cepa TE-B1025, (Tabla VII), en general, presentó mejor crecimiento sobre medio F y vitaminas; tuvo un crecimiento regular sobre xilanos sin vitaminas. En ribosa y acetato no hubo crecimiento. Se puede decir, con base en estos resultados, que la cepa TE-B1025 requiere de vitaminas para una mayor utilización de los diferentes carbohidratos como fuente de carbono.

La cepa TE-B1025 PP, (Tabla VIII), en general, presenta crecimiento bajo o nulo sobre varios de los carbohi-



TABLA VI. CARACTERISTICAS COMPARATIVAS ENTRE BACTERIAS DE AFINIDAD  
 PROBABLE CON LA CEPA TE-B1025 PA.

Característica	Micrococcus	Staphylococcus	TE-B1025 PA
FORMA	Cocos en té- tradas	Coco	Cocos en té- tradas
TAMAÑO	0.5a3.5 um	0.5a1.5 um	
MOTILIDAD	inmóvil	inmóvil	inmóvil
ESPORULACION	-	-	-
GRAM	+	+	+
INDOL	-	-	-
CATALASA	+	+	+
TEMPERATURA DE CRECIMIENTO	25 a 30°C	35 a 40°C	25 a 40°C
HABITAT	Suelos, agua piel humana y de animal No patógeno	Piel, glándulas de piel o mucos- sas de animal Potencialmente patógeno	Suelos  No patógeno en ratas
COLONIAS	Convexas de borde regular	No determinado	Convexas, borde entero
COLOR	Amarillo, na- ranja o ver- de-amarillen- to.	Pigmentos caro- tenoides.	Amarillo.
TURBIDEZ	Uniforme	No determinado	Escasa, no uniforme.
SEDIMENTO	Granular fi- no o viscoso	No determinado	Escaso y viscoso.

TABLA VII

ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS COMO UNICA FUENTE DE CARBONO POR LA CEPA TE-B1025

1. MONOSACARIDOS	CON VITAMINAS	SIN VITAMINAS
Glucosa	++++	+
Galactosa	++++	±
Xilosa	++	-
Fructosa	±	-
Ribosa	-	-
2. DISACARIDOS		
Celobiosa	++++	±
Maltosa	++++	-
Sacarosa	++++	±
Lactosa	+++	-
3. POLISACARIDOS		
Almidón	++++	-
Pectina	+	+
Xilanos	+	++
Agar	-	-
4. ALCOHOLES		
Glicerol	++++	±
Manitol	+	-
Etanol	+	+
Metanol	+	+
5. ACIDOS ORGANICOS		
Acido Poligalacturónico	++++	±
Acido Maléico	++	-
Acido Cítrico	++	±
Acido Acético	-	-

TABLA VIII

ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS COMO UNICA FUENTE DE CARBONO POR LA CEPA TE-B1025 PP

1. MONOSACARIDOS	CON VITAMINAS	SIN VITAMINAS
Glucosa	±	-
Galactosa	-	-
Xilosa	+	-
Fructosa	+	+
Ribosa	±	++
2. DISACARIDOS		
Celobiosa	-	-
Maltosa	-	-
Sacarosa	-	-
Lactosa	±	-
3. POLISACARIDOS		
Almidón	-	-
Pectina	++	+
Xilanos	+++	+++
Agar		
4. ALCOHOLES		
Glicerol	+	+
Manitol	±	±
Etanol	±	±
Metanol	+	++
5. ACIDOS ORGANICOS		
Acido Poligalacturónico	++	+
Acido Maléico	+++	++++
Acido Cítrico	++++	++++
Acido Acético	-	-

dratos utilizados, sin embargo, se puede apreciar un buen crecimiento sobre ribosa, xilanos, metanol, ácido maléico y citrato en la serie sin vitaminas, lo cual podría indicar menor dependencia de los factores de crecimiento; en xilanos y ácido cítrico, el crecimiento no parece ser afectado por la ausencia de vitaminas.

La cepa TE-B1025 PA<sup>2</sup>, (Tabla IX), utilizó más carbohidratos que la cepa TE-B1025 PP, su crecimiento sobre algunos de ellos no se ve afectado por la ausencia de vitaminas y, en general, se puede decir que no es muy dependiente de ellas.

La utilización de los aminoácidos como fuentes de carbono también se llevó a cabo en dos series, una con vitaminas y otra sin vitaminas.

La cepa TE-B1025, (Tabla X), utilizó mejor los aminoácidos en presencia de vitaminas. La treonina, valina e isoleucina fueron utilizados aún sin vitaminas; la fenilalanina y el triptófano no fueron utilizados sin vitaminas.

La cepa TE-B1025 PP, (Tabla XI), utilizó varios aminoácidos aún en ausencia de vitaminas, es decir, la utilización de tales aminoácidos no parece depender de las

TABLA IX

ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS COMO UNICA FUENTE DE CARBONO POR LA CEPA TE-B1025 PA

1. MONOSACARIDOS	CON VITAMINAS	SIN VITAMINAS
Glucosa	++++	++
Galactosa	+	+
Xilosa	±	-
Fructosa	+++	-
Ribosa	-	-
2. DISACARIDOS		
Celobiosa	++	+
Maltosa	+++	++
Sacarosa	++++	++
Lactosa	±	±
3. POLISACARIDOS		
Almidón	±	±
Pectina	+	+
Xilanos	++++	++++
Agar		
4. ALCOHOLES		
Glicerol	++++	++++
Manitol	+++	+++
Etanol	++	-
Metanol	-	-
5. ACIDOS ORGANICOS		
Acido Galacturónico	+	+
Acido Maléico	++	++
Acido Cítrico	±	-
Acido Acético	++++	±

TABLA X

ASIMILACION DE AMINOACIDOS COMO UNICA FUENTE DE CARBONO POR LA CEPA TE-B1025

AMINOACIDO	CON VITAMINAS	SIN VITAMINAS
Treonina	+++	++
Valina	+++	+++
Isoleucina	+++	++
Cisteina	+++	+
Alanina	+++	±
Arginina	++	±
Fenilalanina	++	-
Acido Glutámico	++	±
Histidina	++	±
Leucina	++	±
Lisina	++	±
Prolina	++	±
Serina	++	±
Asparagina	++	±
Acido Aspártico	++	±
Glicina	+	±
Glutamina	+	±
Metionina	+	±
Tirosina	+	±
Triptófano	+	-

TABLA XI

ASIMILACION DE AMINOACIDOS COMO UNICA FUENTE DE CARBONO POR LA CEPA TE-B1025 PP

AMINOACIDO	CON VITAMINAS	SIN VITAMINAS
Treonina	-	-
Valina	-	-
Isoleucina	-	-
Cisteina	+	++
Alanina	++++	+++
Arginina	-	-
Fenilalanina	++++	++++
Acido Glutámico	++++	++++
Histidina	+	+
Leucina	-	-
Lisina	±	±
Prolina	++++	++++
Serina	+++	+++
Asparagina	+++	+++
Acido Aspártico	+++	+++
Glicina	-	-
Glutamina	+++	++++
Metionina	-	-
Tirosina	++++	++++
Triptófano	++++	++++

vitaminas; por otra parte; llama la atención que no utilice treonina, valina e isoleucina, leucina, glicina y metionina aún en presencia de vitaminas.

La cepa TE-B1025 PA, (Tabla XII), utiliza mejor el ácido glutámico y la glutamina en presencia de vitaminas; la treonina, valina, isoleucina y el ácido aspártico no se ven afectados, en su utilización, por la ausencia de vitaminas; por otra parte, no fueron utilizados los aminoácidos: cisteína, alanina, histidina, serina, treonina y triptófano en medio con vitaminas.

En un ensayo posterior se determinó que, en la utilización de los carbohidratos, las vitaminas que más influyen fueron tiamina y biotina.



TABLA XII

ASIMILACION DE AMINOACIDOS COMO UNICA FUENTE DE CARBONO POR LA CEPA TE-B1025 PA

AMINOACIDO	CON VITAMINAS	SIN VITAMINAS
Treonina	++	++
Valina	+	+
Isoleucina	+	+
Cisteina	-	-
Alanina	-	-
Arginina	±	-
Fenilalanina	±	-
Acido Glutámico	++++	±
Histidina	-	-
Leucina	±	-
Lisina	+	-
Prolina	+	±
Serina	-	-
Asparagina	+	±
Acido Aspártico	+	+
Glicina	±	-
Glutamina	+++	±
Metionina	±	-
Tirosina	-	-
Triptófano	-	-

#### 4.0 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pueden considerar las conclusiones siguientes:

- a) Las características y la estrecha asociación mostradas en el aislamiento de las cepas integrantes de los sistemas mixtos, llevó a considerarlos como sistemas mixtos naturales, susceptibles de ser optimizados en su actividad degradadora y de ser aprovechados en la utilización de otros sustratos agroindustriales.
  
- b) En la utilización del bagacillo de caña no tratado, los sistemas mixtos fueron más eficientes que la cepa celulolítica TE-B1025 y se pudo observar, en el crecimiento de tales sistemas, un efecto sinérgico que fue más apreciable cuando la proporción inoculada de la cepa no celulolítica fue mayor respecto a la cepa TE-B1025. Lo anterior, sugiere la existencia de una relación óptima de inóculo de los sistemas mixtos cuyo efecto puede ser observado en una utilización más eficiente del sustrato.

- c) Los diferentes grados de utilización de los compuestos como fuentes de carbono, incluyendo los aminoácidos, que mostraron cada una de las cepas de los sistemas mixtos, así como la dependencia de la cepa TE-B1025 hacia determinadas vitaminas, sugieren una posible explicación del efecto sinérgico observado en el crecimiento de los sistemas mixtos. Profundizar en este punto, llevará a comprender mejor la conformación constitutiva de estos sistemas mixtos, al diseño y formación de otros sistemas "artificiales" con igual o mayor eficiencia que los ya reportados.
- d) Aún cuando no se trató de una clasificación taxonómica de las tres cepas de los sistemas mixtos, las pruebas de caracterización llevaron a considerar a la cepa TE-B1025 como perteneciente al género Cellulomonas y a la cepa TE-B1025 PA como perteneciente al género Micrococcus. La ubicación taxonómica de la cepa TE-B1025 PP no fue muy clara, se requieren de más pruebas adicionales antes de poder asignarla a un género en especial; sin embargo, por las pruebas realizadas en el presente trabajo se podría ubicar tentativamente en la familia Pseudomonadaceae.

B I B L I O G R A F I A

## B I B L I O G R A F I A

1. Scrimshaw, S.V. and V.R. Young. THE REQUIREMENTS OF HUMAN NUTRITION. *Sci. Am.* 235: (3) 27-40 (1976).
2. Janick, J.; C.H. Noller and Ch.L. Rhykerd. THE CYCLES OF PLANT AND ANIMAL NUTRITION. *Sci. Am.* 235: (3) 43-53 (1976).
3. Harlan, J.R. THE PLANTS AND ANIMALS THAT NOURISH MAN. *Sci. Am.* 235: (3) 88-97 (1976).
4. Ramírez Hernández, J.; P. Arroyo y A. Chávez. ASPECTOS SOCIOECONOMICOS DE LOS ALIMENTOS Y LA ALIMENTACION EN MEXICO. *Comercio Exterior.* 8: 675 (1971).
5. Rodríguez Cisneros, M. LA DEMANDA DE ALIMENTOS PROTEINICOS EN MEXICO. *Rev. Tecnol. Aliment.* 11: 118-123 (1976).
6. Mayer, J. THE DIMENSIONS OF HUMAN HUNGER. *Sci. Am.* 235: (3) 40-49 (1976).
7. Spicer, A. PROTEINS FROM CARBOHIDRATES. *Chemistry in Britain*, 9 (3): 100-103 (1973).
8. Bhattacharjee, J.K. MICROORGANISMS AS POTENTIAL SOURCES OF FOOD. *Adv. Appl. Microbiol.* 13: 139-161 (1970).
9. DOCUMENTO: NUTRICION Y DESARROLLO AGROINDUSTRIAL. *Comercio Exterior.* 28 (3): 313-323 (1978).
10. Rose, N.C.; R.L. Nixon; H.B. Lockhart and G.F. Lambert. *J. Biol. Chem.* 217: 987 (1955).
11. Flodin, N.W. *J. Agr. Food. Chem.* 1°, 222, (1953).
12. Reed, G.; H.J. Pepler. YEAST TECHNOLOGY. A. Publ. Co. Westport, Conn. (1973).
13. Harpstead, D.D. HIGH-LYSINE CORN. *Sci. Am.* 225: (2) 34-42 (1971).

14. Paredes-López, O. EL DOMINIO DE LOS PAISES PODEROSOS SOBRE ALIMENTOS. Ciencia y Desarrollo. 11 (2): 16-24. México. (1977).
15. Wortman, S. FOOD AND AGRICULTURE. Sci. Am. 235 (3): 30-39 (1976).
16. Jiménez, S.L. CONFERENCIA EN ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA PRODUCTIVIDAD AGRICOLA EN ZONAS DE MINIFUNDIO. CIMMYT, (1970).
17. Steinhart, J.S. and C. Steinhart. ENERGY USE IN THE U.S. FOOD SYSTEM. Science 184: 307-316 (1974).
18. Wellhausen, E.J. THE AGRICULTURE OF MEXICO. Sci. Am. 235 (3): 128-150 (1976).
19. López Rosado, D.G. PROBLEMAS ECONOMICOS EN MEXICO. UNAM, (1975).
20. FERTILIZANTES: UNA INDUSTRIA CON FUTURO. Sección Sector Industrial. Comercio Exterior. 28 (11): 1317 (1978).
21. Vázquez-Yáñez, C. y F.G. Dorbecker. LA AGRICULTURA MODERNA. Naturaleza. 9 (5) (69): 282-289 (1978).
22. Mujica Vales, T. ALIMENTOS O INSUMOS, LA CRITICA COYUNTURA. Comercio Exterior. 28 (11): 1308-1311 (1978).
23. Henry, D.P.; P.F. Greenfield; E.A. Quano; R.H. Thompson and G. Fleming. EFFICIENCY OF PROTEIN PRODUCTION FROM YEAST GROWN IN LIQUOR DERIVED FROM ANAEROBICALLY FERMENTED TROPICAL PASTURE. Nature. 274: 619-620 (1978).
24. Humprey, A.E. PRODUCTION OF FOOD AND FEED BY FERMENTATION. University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania. (1974).
25. Moo-Young, M. A SURVEY OF SCP PRODUCTION FACILITIES. Process Biochemistry. 11 (10): 32-34 (December, 1976).
26. Parada-Arias, E. ELABORACION RURAL E INDUSTRIAL DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE HOJAS. Rev. Tecnol. Aliment. 11: 269-275 (1976).

27. Guerrero-Leqarreta, I. ALGUNOS ASPECTOS SOBRE CONCENTRADOS PROTEICOS DE HOJAS. POSIBILIDADES Y DESVENTAJAS DE EXTRACCION. Rev. Tecnol. Aliment. 11: 114-116 (1976).
28. Loomis, R.S. AGRICULTURAL SYSTEMS. Sci. Am. 235 (3): 98-105 (1976).
29. Kihlberg, R. THE MICROBE AS A SOURCE OF FOOD. Ann. Rev. of Microbiol. 26: 427-466 (1972).
30. Kharatyan, S.G. MICROBES AS FOOD FOR HUMANS. Ann. Rev. Microbiol. 32: 301-327 (1978).
31. Moo-Young, M. THE FOOD CRISIS AND THE CHEMICAL INDUSTRY. Chemistry in Canada. 27 (6): 14 (1975).
32. Dimmling and R. Seipenbusch. RAW MATERIALS FOR THE PRODUCTION OF SCP. Process Biochemistry. 13 (3): 9-15 (March, 1978).
33. Gaden, E.L. Jr. SUBSTRATES FOR SCP PRODUCTION. In single-cell protein, proceedings of the International Symposium held in Rome 1973 Ed. by P. Davis. Academic Press. (1974).
34. Humprey, A.E.; A. Moreira, W. Armger and D. Zabriskie. PRODUCTION OF SINGLE-CELL PROTEIN FROM CELLULOSIC WASTES. University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania. (1974).
35. Morgan, J.T. PROTEIN PRODUCTION BY MICROORGANISMS FROM CARBOHIDRATE SUBSTRATES. In the biological efficiency of protein production. Ed. by J.G.M. Jones. Cambridge, at the University Press (1973).
36. Slater, LL.D.E. SCP: THE METHANOL WAY. Food Engineering: 68-71 (July, 1974).
37. Watts, H. SINGLE-CELL PROTEIN: A NEW SOURCE OF FOOD FROM HIDROCARBON FERMENTATION. Chemistry and Industry. 537-540 (1976).
38. Shacklady, C.A. PROTEIN FROM PARAFFINS. New Scientist. 5-7 (September, 1969).

39. Lane, A.G. PRODUCTION OF FOOD YEAST FROM WHEY FILTRATE BY DIALYSIS CULTURE. J. Appl. Chem. Biotechnol. 27: 165-169 (1977).
40. Kristensen, T.P. CONTINUOUS SINGLE-CELL PROTEIN PRODUCTION FROM Cellulomonas sp. AND Candida utilis GROWN IN MIXTURE ON BARLEY STRAW. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5: 155-163 (1978).
41. Osman, H.G.; A. Herrera; G. Casado; E. Llama y A. Bell. UTILIZACION DEL BAGAZO PARA LA PRODUCCION DE BIOMASA BACTERIANA. Ciencias, Serie 5, No. 9: 1-29. Universidad de la Habana. (1972).
42. Imrie, F.K.E. and A.J. Vlitos. PRODUCTION OF FUNGAL PROTEIN FROM CAROB (Ceratonia siliqua L.).
43. Morris, G.G.; F.K.E. Imrie and K.C. Phyllips. THE PRODUCTION OF ANIMAL FEEDSTUFFS BY SUBMERGED CULTURE TO FUNGI ON AGRICULTURAL WASTES.
44. Reade, A.E. and K.F. Gregory. HIGH-TEMPERATURE PRODUCTION OF PROTEIN ENRICHED FEED FROM CASSAVA BY FUNGI. Appl. Microbiol. 30(6): 897-904 (1975).
45. Zadrazil, F. THE CONVERSION OF STRAW INTO FEED BY BASIDIOMYCETES. European. J. Appl. Microbiol. 4: 273-281 (1977).
46. Imrie, F.K.E. SCP FROM AGRICULTURAL WASTES. New Scientist. 458-460 (May. 1975).
47. Tudge, C. WHY TURN WASTE INTO PROTEIN? New Scientist. (April, 1975).
48. Threvelyan, W.R. PROCESSING YEAST TO REDUCE ITS NUCLEIC ACID CONTENT. INDUCTION OF INTRACELLULAR RNase ACTION BY A SIMPLE HEAT-SHOCK PROCEDURE, AND AN EFFICIENT CHEMICAL METHOD BASED ON EXTRACTION OF RNA BY SALT SOLUTIONS AT LOW pH. J. Sci. Fd. Agric. 29: 141-147 (1978).
49. Yang, H.H.; D.W. Thayer and S.P. Yang. REDUCTION OF ENDOGENOUS NUCLEIS ACID IN A SINGLE-CELL PROTEIN. Appl. and Environm. Microbiol. 38 (1): 143-147 (1979).



50. Maul, S.B.; A.J. Sinskey and S.R. Tannenbaum. NEW PROCESS FOR REDUCING THE NUCLEIC ACID CONTENT OF YEAST. *Nature*. 228: 181 (1970).
51. Daly, W.H. and L.P. Ruiz. REDUCTION OF RNA IN SINGLE-CELL PROTEIN IN CONJUNCTION WITH FIBER FORMATION. *Biotech. and Bioeng.* XVII: 285-287 (1974).
52. FULL SCALE SINGLE-CELL PROTEIN PLANT. *Process Biochemistry*. 12 (1): 30 (Jan/Feb, 1977).
53. LIQUICHIMICA MAKES READY IT'S FIRST GENERATION SCP FACTORY. *Food Engineering* (July, 1974).
54. ICI SANCTIONS MICROBIAL PROTEIN FEEDSTUFFS PLANT. *Chemistry and Industry*. 859 (October, 1976).
55. Birckenstaed, J.W.; U. Faust and W. Sambeth. PRODUCTION OF SCP FROM n-PARAFFIN PROCESS AND PRODUCTS. *Process Biochemistry*. 12 (9): 7-10 (November, 1977).
56. Levine, D.W. and C.L. Cooney. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A THERMOTOLERANT METHANOL-UTILIZING YEAST. *Appl. Microbiol.* 26 (6): 982-990 (1973).
57. Sherwood, M. SINGLE-CELL PROTEIN COMES AGE. *New Scientist*. 634-639 (November, 1974).
58. Romantschuk, H. and M. Lehtomäki. OPERATIONAL EXPERIENCES OF FIRST FULL SCALE PEKILO SCP-MILL APPLICATION. *Process Biochemistry*. 13 (3): 16-21 (March, 1978).
59. Fenc1, Z. PRODUCTION OF MICROBIAL PROTEIN FROM CARBON SOURCES. *Biotech. and Bioeng. Symp. No. 1*: 63-70 (1969).
60. Moo-Young, M.; A.R. Moreira; A.J. Daugulis and C.W. Robinson. BIOCONVERSION OF AGRICULTURAL WASTES INTO ANIMAL FEED AND FUEL GAS. *Biotech. and Bioeng. Symp. No. 8*: 205-218 (1978).
61. Bellamy, D.M. BIOTECHNOLOGY REPORT: SCP CELLULOSIC WASTES. *Biotech. and Bioeng.* XVI: 869-880 (1974).

62. Srinivasan, V.R. and Y.W. Han. UTILIZATION OF BAGASSE. In cellulase and their application. Am.Chem. Soc. 95: 447-460. Ed. by R. Gould (1969).
63. Cyswski, G.R. and Ch.R. Wilke. UTILIZATION OF CELLULOSIC MATERIALS THROUGH ENZYMATIC HYDROLYSIS. I. FERMENTATION OF HYDROLYZATE TO ETHANOL AND SINGLE-CELL PROTEIN. Biotech. and Bioeng. XVIII: 1296 - 1313 (1976).
64. Ladisch, M.R. CELLULOSE TO SUGAR: NEW PATH GIVES QUANTITATIVE YIELD. Science. 201: 743-745 (1978).
65. Rockwell, P.I. LSU PROYECT DESCRIPTION. IN SINGLE-CELL PROTEINS FROM CELLULOSE AND HYDROCARBONS. Noyes Data Corporation, London. (1976).
66. Rockwell, P.I.. SOURCES AND CHARACTERISTICS OF CELLULOSE. In single-cell proteins from cellulose and hydrocarbons. Noyes Data Corporation, London. (1976).
67. Campos Castillo Ma. y M. Gutiérrez Rojas. ESTUDIO DE VIABILIDAD PARA LA PRODUCCION DE PROTEINAS UNICELULARES A PARTIR DE DESECHOS CELULOSICOS. Tesis Profesional, Facultad de Química, UNAM. (1977).
68. CONACyT: ANALISIS TECNICO SOBRE EL APROVECHAMIENTO INTEGRAL DEL HENEQUEN (Agave fourcroydes) Y AGAVES SIMILARES COMO SISAL (Agave sisalana). Informe Unico. Elaborado por el Centro Mexicano de Información Química. LANFI. México (1976).
69. Ivanova, N.P.; L.I. Erokina and E.S. Morozova. COMPARATIVE STUDY OF THE ABILITY OF VARIOUS BACTERIAL CULTURES TO SYNTHESYZE CELLULOLYTIC ENZYMES. Appl. Biochem. and Microbiol. 432-437 (January, 1978).
70. Brewil, C. and D.J. Kushner. CELLULASE INDUCTION AN THE USE OF CELLULOSE AS A PREFERRED GROWTH SUBSTRATE BY Cellvibrio gilvus. Can. J. Microbiol. 22: 1779-1781 (1976).
71. Han, Y.W. and C.D. Callihan. CELLULOSE FERMENTATION: EFFECT OF SUBSTRATE PRETREATMENT ON MICROBIAL GROWTH. Appl. Microbiol. 27: 159-165 (1974).

72. Crawford, D.L.; E. McCoy; Harkin and Jones. PRODUCTION OF MICROBIAL PROTEIN FROM WASTE CELLULOSE BY Thermomonospora fusca, A THERMOPHILIC ACTINOMYCETE. Biotech. and Bioeng. XV: 833-843 (1973).
73. Hagerdal, N.G.R.; J.D. Ferchak and E. Kendall Pye. CELLULOLYTIC ENZYME SYSTEM OF Thermoactinomyces sp. GROWN ON MICROCRYSTALLINE CELLULOSE. Appl. and Environm. Microbiol. 36 (4): 606-612 (1978).
74. Thayer, D.W. and C.A. David. GROWTH OF "SEEDED" CELLULOLYTIC ENRICHMENT CULTURES ON MESQUITE WOOD. Appl. and Environm. Microbiol. 36 (2): 291-296 (1978).
75. Osman, H.G.; A. Bello; M. Quintana y G. Casado. UTILIZACION DEL BAGAZO PARA LA PRODUCCION DE BIOMASA BACTERIANA. Ciencias, Serie 5, No. 12: 1-19, Universidad de la Habana (1975).
76. Beguin, P.; H. Eisen and A. Roupas. FREE AND CELLULOSE BOUND CELLULASE IN A CELLULOMONAS SPECIES. J. of Gen. Microbiol. 101: 191-196 (1977).
77. Khan, A.W. ANAEROBIC DEGRADATION OF CELLULOSE BY MIXED CULTURE. Can. J. Microbiol. 23: 1700-1705 (1977).
78. Weimer, P.J. and J.G. Zeikus. FERMENTATION OF CELLULOSE AND CELLOBIOSE BY Clostridium thermocellum IN THE ABSENCE AND PRESENCE OF Methanobacterium thermoautotrophicum. Appl. and Environm. Microbiol. 33 (2): 289-297 (1977).
79. Summers, R.J.; D.P. Boudreaux and V.R. Srinivasan. CONTINUOUS CULTIVATION FOR APPARENTE OPTIMIZATION OF DEFINED MEDIA FOR Cellulomonas sp. AND Bacillus cereus. Appl. and Environm. Microbiol. 38 (1): 66-71 (1979).
80. Paredes-López, O. and Y. González. UTILIZATION OF WASTE PAPER BY MIXED CULTURES FOR BIOMASS PRODUCTION A PRELIMINARY EVALUATION. J. Ferment. Tech. no1. 15: 619-623 (1973).

81. Paredes-López, O.; J.E. Mendoza-Madrid and E. Cargano. PRODUCTION OF SINGLE-CELL PROTEIN FROM WASTE PAPER BY A MIXED CULTURE. *Experiencia* 30(2) (Specialia): 205-206 (1974).
82. Han, Y.W. MICROBIAL FERMENTATION OF RICE STRAW: NUTRITIVE COMPOSITION AND *in vitro* DIGESTIBILITY OF FERMENTATION PRODUCTS. *Appl. Microbiol.* 29 (4): 510-514 (1975).
83. Han, Y.W. and V.R. Srinivasa. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULOSE-UTILIZING BACTERIUM. *Appl. Microbiol.* 16 (8): 1140-1145 (1968).
84. Gregersen, T. RAPID METHOD FOR DISTINCTION OF GRAM NEGATIVE FROM GRAM-POSITIVE BACTERIA. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5: 123-127 (1978).
85. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eighth Edition. The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1977).
86. Thayer, D.W. and J.O. Murray. PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MESQUITE WOOD-DIGESTING BACTERIA. *J. of Gen. Microbiol.* 101: 71-77 (1977).
87. Hug, H. and A. Fiechter. ASSIMILATION OF ALIPHATIC HYDROCARBONS BY *Candida tropicalis*. *Arch. Mikrobiol.* 68: 77-86 (1973).
88. RHM Research Ltd. Lord Rank Research Center. (1974).
89. Thorne, J.G.M. LOW COST ANIMAL FEED FROM CARBOHYDRATE WASTE. *Processing.* 201-202 (May, 1975).
90. Eklund E., A. Hatakka, A. Mustanda and P. Nybergh. ACID HYDROLYSIS SUNFLOWER SEED HUSKS FOR PRODUCTION OF SINGLE CELL PROTEIN. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 2: 143-152 (1976).
91. Kaufman, A.; J. Fegan; P. Duleac; C. Gainer; D. Wittich and A. Glann. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A CELLULOLYTIC ISOLATE. *J. of Gen. Microbiol.* 94: 405-408 (1976).

92. Moo-Young, M.; D.S. Chahal; J.E. Swan and C.W. Robinson. SCP PRODUCTION BY Chaetomium cellulolyticum A NEW THERMOTOLERANT CELLULOLYTIC FUNGUS. Biotech. and Bioeng. XIX: 527-538 (1977).
93. Salle, A.J. FUNDAMENTAL PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY. Sixth Edition, McGraw-Hill Book Co. (1967).
94. Osman, H.G.; A. Bell y M. Quintana. UTILIZACION DEL BAGAZO PARA LA PRODUCCION DE BIOMASA BACTERIANA. Composición química de la bacteria celulolítica del género Cellulomonas obtenida a partir de materiales celulósicos. Ciencias, Serie 5, No. 10: 1-13 (1974).
95. THE PROKARYOTES a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Vol. I y Vol. II. Springer-Verlag. N.Y. Edited by Mortimer P. Starr. (1981).