

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Selección de especies del género pseudomonas potenciales
productores de biomasa a partir de metanol**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

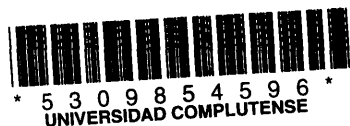
María del Carmen Avendaño Ruiz

Madrid, 2015

María del Carmen Avendaño Ruiz

TP
1981

022



X-53-224259-8

SELECCION DE ESPECIES DEL GENERO PSEUDOMONAS POTENCIALES
PRODUCTORES DE BIOMASA A PARTIR DE METANOL

Departamento de Microbiología
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© María del Carmen Avedaño Ruiz
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-27-1981

SELECCION DE ESPECIES DEL GENERO PSEUDOMONAS POTENCIA- LES PRODUCTORES DE BIOMASA A PARTIR DE METANOL

Resumen

Este trabajo ha ido orientado hacia la búsqueda de bacterias que siendo capaces de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía, produjeran un rendimiento tal, que fuera posible la obtención de proteínas a nivel industrial a partir de dichas bacterias. Debido a que según la bibliografía consultada, los resultados más satisfactorios en la obtención de proteínas bacterianas a partir de metanol, se han conseguido con especies del género Pseudomonas, la búsqueda fué dirigida principalmente hacia especies de dicho género.

A partir de 40 muestras de suelos de diversa procedencia, se han aislado por cultivo de enriquecimiento en un medio compuesto a base de sales minerales y metanol, 103 cepas bacterianas, de las cuales la mayor parte fueron identificadas como especies del género Pseudomonas. Muchas de estas bacterias pueden ser consideradas como potenciales productoras de biomasa por su buen desarrollo sobre metanol, habiéndose seleccionado para realizar los ensayos a escala semi-piloto, la cepa 5.073 por ser la que mostró mejor desarrollo en un estudio comparativo realizado en un medio compuesto a base de sales minerales y metanol.

La cepa 5.073 por sus caracteres morfológicos y fisiológicos,

se asemeja bastante al Pseudomonas stutzeri del que se diferencia además de por ser capaz de crecer en metanol, por no formar colonias rugosas y por ser capaz de utilizar arginina como única fuente de carbono y energía. De los Pseudomonas capaces de crecer en metanol, al que más se asemeja es al Pseudomonas A descrito por Miura y col. del que se diferencia por producir desnitrificación y ser capaz de crecer a pH 5 y 10.

Los ensayos a escala semi-piloto se llevaron a cabo en un fermentador Chemap a pH 6, temperatura a 30° C con una entrada de aire de 0.3 v/v/m, una agitación de 1.500 r.p.m y utilizando un medio de cultivo compuesto a base de sales minerales y metanol. Manteniendo la concentración de metanol en el medio por encima de un cierto límite, mediante sucesivas adiciones de metanol a lo largo del proceso, se consiguió alcanzar en 22 horas una producción de 3.7 g/L de materia seca y un rendimiento de 0.39 g. de biomasa por g. de metanol suministrado, valor muy próximo a los 0.4 g. de biomasa por g. de metanol calculados teóricamente por B. J. Abbot. En estas condiciones la tasa de crecimiento es 0.4 y el tiempo de generación 1.7 horas.

Por todo esto y teniendo en cuenta que la biomasa obtenida contiene un 71.8 % de proteína cruda pensamos que mejorando las condiciones de desarrollo y en cultivo continuo este microorganismo puede ser de gran interés en la producción de biomasa.

M^a del Carmen Avendaño Ruiz

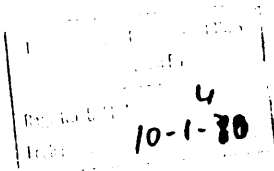
SELECCION DE ESPECIES DEL GENERO PSEUDOMONAS POTENCIALES
PRODUCTORES DE BIOMASA A PARTIR DE METANOL

Director : D. Isidro Cornejo Contreras
Doctor en Farmacia, Investigador
Científico del C.S.I.C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología
1.980



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES



- i -

JUAN DE LA CIERVA 3
MADRID-6

DON ISIDRO CORNEJO CONTRERAS, Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid, Investigador del C.S.I.C con destino en el Instituto de Fermentaciones Industriales,

HACE CONSTAR QUE : la Tesis Doctoral titulada "Selección de especies del género Pseudomonas potenciales productores de biomasa a partir de metanol" ha sido realizada bajo su dirección en dicho Instituto por D^a M^a del CARMEN AVENDAÑO RUIZ, Licenciada en Farmacia.

A los oportunos efectos, firma el presente en Madrid a diez de enero de mil novecientos ochenta.



Deseo expresar mi agradecimiento :

Al Profesor Gaston de Iriarte y Sanchez, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, ponente de esta Tesis.

Al Doctor Garrido Márquez, Director del Instituto de Fermentaciones Industriales, donde se ha realizado este trabajo.

Al Doctor Nombela Cano, por sus valiosas orientaciones y sugerencias.

Al Doctor Cornejo Contreras por su acertada dirección.

A mis compañeros :

Javier Tabera, por su asesoramiento en la planta piloto

Jose Angel Domingo, Francisco Garrido y Ernesto del Amo, que con sus asistencia técnica han facilitado la realización de este trabajo.

M^a Victoria Santamaría, por su ayuda en la realización de la parte experimental.

A todos los compañeros del Instituto de Fermentaciones Industriales que de una u otra forma han colaborado en la realización de este trabajo

INDICE

| | pag. |
|--|------|
| 1.- INTRODUCCION | |
| 1.1 Fuentes de proteínas | 1 |
| 1.2 Proteínas de origen microbiano | 2 |
| 1.3 Sustratos | 7 |
| 1.3.1 Productos residuales de la producción agrícola . | 8 |
| 1.3.2 Materias primas vegetales | 10 |
| 1.3.3 Hidrocarburos | 10 |
| 1.3.4 Etanol | 15 |
| 1.3.5 Metanol | 17 |
| 1.4 Plan de trabajo | 22 |
| | |
| 2.- PARTE EXPERIMENTAL | |
| 2.1 Toma de muestras | 23 |
| 2.2 Aislamiento de bacterias procedentes del suelo, capaces de utilizar metanol como fuente de car- bono y energía | 25 |
| 2.2.1 Cultivo en agitador | 25 |
| 2.2.2 Obtención de cultivos puros | 27 |
| 2.2.3 Resultados | 29 |
| 2.2.4 Discusión de los mismos | 36 |
| 2.3 Conservación de los cultivos puros | 37 |
| 2.4 Estudio comparativo del crecimiento de los culti- vos puros en un medio a base de sales minerales y metanol | 39 |
| 2.4.1 Cultivo en ampolla | 39 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 2.4.2 | Resultados | 40 |
| 2.4.3 | Discusión de los mismos | 46 |
| 2.5 | Estudio taxonómico de los cultivos puros | 48 |
| 2.5.1 | Estudio morfológico | 48 |
| 2.5.2 | Estudio fisiológico | 48 |
| 2.5.3 | Resultados | 54 |
| 2.5.4 | Discusión de los mismos | 67 |
| 2.5.5 | Características fisiológicas de la cepa 5073 | 71 |
| 2.6 | Características de desarrollo de la cepa 5073 como estudio previo al ensayo en planta semi-piloto | 77 |
| 2.6.1 | Efecto del ph | 77 |
| 2.6.2 | Efecto de la temperatura | 77 |
| 2.6.3 | Efecto de la concentración de inóculo | 78 |
| 2.6.4 | Efecto de la concentración de metanol | 78 |
| 2.6.5 | Efecto del extracto de levadura | 79 |
| 2.6.6 | Efecto del Corn Steep Liquor | 80 |
| 2.6.7 | Efecto de algunas vitaminas | 80 |
| 2.6.8 | Efecto de algunos aminoácidos | 80 |
| 2.6.9 | Crecimiento en diferentes medios | 81 |
| 2.6.10 | Discusión de los resultados | 94 |
| 2.7 | Desarrollo en planta semi-piloto de la cepa 5073 | 97 |
| 2.7.1 | Descripción del fermentador | 98 |
| 2.7.2 | Medio de cultivo | 100 |
| 2.7.3 | Preparación del inóculo | 101 |
| 2.7.4 | Rendimiento teórico | 105 |
| 2.7.5 | Curva de crecimiento de la cepa 5073 en fermentador | 107 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 2.7.6 | Curva de crecimiento con inóculo procedente de un cultivo en fase logarítmica | 111 |
| 2.7.7 | Curva de crecimiento sin esterilización previa .. | 114 |
| 2.7.8 | Curva de crecimiento con sucesivas adiciones de metanol | 117 |
| 3.- | CONCLUSIONES | 123 |
| 4.- | BIBLIOGRAFIA | 127 |

INTRODUCCION

Debido al rápido crecimiento de la población mundial, la actual deficiencia en proteínas alimenticias se verá incrementada en las próximas décadas. Los intentos realizados para resolver el problema de la escasez mundial de alimentos, aumentando al máximo la productividad de las fuentes tradicionales de proteínas, han encontrado muchas dificultades, tanto de tipo científico y tecnológico, como de tipo socio-económico y político, por lo que muchos investigadores de diferentes puntos del planeta, han centrado su atención en la posibilidad de utilizar fuentes no convencionales de proteínas, de entre las que podemos destacar como más prometedoras: los concentrados de proteínas de pescados de baja calidad, los productos proteínicos de semillas oleaginosas (soja, girasol, algodón, etc...) y las proteínas suministradas por microorganismos unicelulares, (SCP) siendo respecto a la producción cuantitativa, estas últimas las de mayor importancia.

En el Instituto de Fermentaciones Industriales, desde 1950, se ha venido estudiando la posibilidad de producir levadura alimento a partir de diversos substratos como hidrolizados de maíz, (71) esparto (34), bacazo de caña de azúcar, (35) alpechin (31), cáscara de almendra (32,99), extractos de garrofa (11), lejías bisulfíticas procedentes de la Sniace (Torrelavega) (97,98,99), madera de olivo (100, 101, 102, 103), residuos de destilación vínica y de güisqui (29), y etanol de síntesis (122), lo que demuestra la enorme importancia que dicho Instituto ha concedido a la producción de proteínas a partir de microorganismos unicelulares.

El término Single Cell Protein (SCP) (proteínas de microorganismos unicelulares) fué utilizado por primera vez en el Massachusetts Institute of Technology por el profesor C.L. Wilson en 1966, para designar las células de algas, bacterias, levaduras y hongos que se van a intentar utilizar como alimento por su contenido proteínico. Este término que ha sido ampliamente aceptado aunque conveniente, según S.L. Oser (85), no es muy adecuado porque :

1º) La biomasa de origen microbiano no contiene solo proteínas sino también hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos, vitaminas y minerales.

2º) Ha sido empleado para designar no solo bacterias y levaduras, sino también algas y hongos que no son unicelulares.

Sería necesario idear un sistema de nomenclatura de SCP que permitiera identificar, además del tipo de organismo, el substrato en el que se desarrolla éste, así como superar las influencias de los abogados del consumidor, basadas en prejuicios emocionales y nada científicos.

Proteínas de origen microbiano

Como productores de proteínas, los microorganismos presentan sobre las plantas y animales las ventajas siguientes :

1º) Los microorganismos tienen un tiempo de generación corto, por lo que proporcionan un rápido incremento de la masa celular. Según Reinhold Kihlberg (54) los tiempos de generación, en condiciones favorables

son los siguientes :

Para bacterias de 0.5 a 2 horas

Para levaduras de 1 a 3 horas

Para algas de 2 a 6 horas

Para hongos filamentosos de 4 a 12 horas.

29) Los microorganismos se pueden modificar genéticamente con facilidad. Mutaciones producidas por agentes químicos y físicos, seguidas de programas de investigación a gran escala, darán variantes con determinadas cualidades, por ejemplo mayor tasa de crecimiento, habilidad para crecer a elevada temperatura, etc.

39) El contenido proteico de los microorganismos es alto. La mayor parte de ellos contienen entre 7 - 12 % de nitrógeno sobre la base de peso seco, lo que aún después de la corrección para purinas, pirimidinas, etc... indica que el contenido en proteínas es más elevado que el de los alimentos más comunes.

49) La producción de SCP se puede basar en materias primas que se pueden obtener localmente en grandes cantidades como celulosa, petróleo, gas natural, etc...

59) La producción de SCP se puede llevar a cabo en cultivo continuo, independientemente de los cambios climáticos, ocupando un pequeño espacio de terreno y con escaso requerimiento de agua.

Los microorganismos que se utilicen para la producción de SCP deberán de reunir las características siguientes :

1º) Capacidad para aprovechar el substrato deseado.

2º) El microorganismo no debe de ser patógeno ni producir toxinas.

3º) El contenido en proteínas tiene que ser por lo menos comparable al de las fuentes de proteínas convencionales, siendo ante todo decisiva la cantidad de aminoácidos esenciales, aunque según M. Kamazawa (51) existe la posibilidad de variar algo el contenido de cada aminoácido mediante mutación.

4º) El contenido de ácidos nucleicos ha de ser muy bajo, pues si se sobrepasan los límites aceptables, aumentan los niveles de ácido úrico en plasma y orina, originando la aparición de gota y formación de piedras en el riñón. El Protein Advisory Group (PAG) ha aceptado que se pueden tomar como máximo 2 mg de ácido ribonucleico procedente de microorganismos al día. Las investigaciones de J.H. Litchfield (67) así como otros numerosos trabajos (15, 107, 47, 82, 84) han demostrado que el contenido en ácidos nucleicos se pueden reducir por degradación enzimática, o por procesos químicos.

5º) Elevado rendimiento celular (peso de células producidas por unidad de peso de substrato)

6º) Periodo de multiplicación lo más breve posible.

7º) Estabilidad genética.

8º) Digestibilidad y palatabilidad adecuadas.

9º) Caracteres organolépticos agradables para el consumidor.

Entre los microorganismos más utilizados para la producción de SCP destacan las algas de los géneros Chlorella, Scenedesmus, y Spirulina, los hongos filamentosos pertenecientes a los géneros : Fusarium, Penicillium, Graphium y Monilia, levaduras de los géneros : Candida, Rhodotryula, Hansenula y Saccharomyces, y bacterias de los géneros : Bacillus, Hydrogenomonas, Methylomonas, Methanomonas y Pseudomonas

De los trabajos de J.S. Burlew (12) se deduce que en la década de los cuarenta ya se consideraban las algas como posibles fuentes de alimentación, habiéndose incrementado el cultivo de algas unicelulares durante los últimos veinte años (86). Recientemente la idea de utilizar las algas como alimento ha cobrado un gran impulso al emprender G.Clement y col. en el Institut Francais du Petrole (17) un estudio acerca del género Spirulina por no ser tóxica. Esta especie que crece espontáneamente en ciertas áreas del lago Chad (Africa) y del lago Texcoco (Méjico) ha sido tradicionalmente empleada como alimento por los habitantes de estas dos regiones y según C.C. A Baron y G. Clement (8) puede ser considerada como posible fuente de proteínas útiles para el consumo humano. En otros trabajos publicados, las especies utilizadas son del género Scenedesmus (81) y del género Chlorella, generalmente Chlorella pyrenoidosa (123) que tienen una velocidad de crecimiento muy superior a la de otras algas. Cuando estos microorganismos

son cultivados en condiciones apropiadas, constituyen una fuente rica en proteínas, integradas por aminoácidos, esenciales para el crecimiento animal, presentando además un aporte de hidratos de carbono, grasas y vitaminas, - por lo que, según R.K. Robinson (94) pueden tener amplia aplicación, bien directamente en la alimentación animal, o como aditivo a piensos. Sin embargo parece que la digestibilidad y aceptabilidad de las algas, están limitadas por las altas concentraciones de clorofila y otros pigmentos en las células y en el caso de algas eucarióticas verdes por la composición de la pared celular, habiendo propuesto H. Mitsuda y col. (76) diferentes tratamientos para remediar estos inconvenientes.

También se ha estudiado la posibilidad de utilizar hongos filamentosos como fuente de proteínas (138, 124, 14) pero presentan frente a las levaduras y bacterias las desventajas siguientes :

1º) El contenido en nitrógeno y en aminoácidos esenciales, es inferior al de las levaduras y bacterias.

2º) Cuando se cultivan a gran escala hongos filamentosos, la dificultad para airear eficientemente es enorme. Se necesita una fuerza tres o cuatro veces mayor para airear y agitar, cuando se utilizan hongos que cuando se emplean levaduras o bacterias. Esto es debido a que las suspensiones de micelios de hongos, son similares a las de pulpa de papel, siendo muy difícil de lograr una rápida transferencia de oxígeno de las burbujas de aire a las células.

La elección entre bacterias y levaduras es algo más difícil. Las bacterias, por ser más pequeñas que las células de levaduras, son mucho más difíciles de separar del medio de cultivo por centrifugación, que es el

método generalmente empleado para la recuperación de levaduras. Además las bacterias tienen mayor contenido de ácidos nucleicos que las levaduras, lo cual es indeseable. Sin embargo el empleo de bacterias como posible fuente de proteínas, puede ser una solución para el futuro, pues el rendimiento es tan elevado que compensa sobradamente los mayores gastos de centrifugación. Esto unido a que la productividad por volumen de instalación es más alta cuando se emplean bacterias, como consecuencia de los mayores rendimientos y de la mayor velocidad de crecimiento, hace realmente atractivo el camino de las proteínas bacterianas.

Sustratos

La elección del sustrato también es muy importante, pues la rentabilidad de un proceso de obtención de SCP, que en esencia abarca el cultivo, separación y secado de la masa celular, depende fundamentalmente de la clase de sustrato que se utilice durante el proceso, como fuente de carbono y energía.

El sustrato ideal para la producción de SCP ha de reunir las características siguientes :

- 1º) Ha de poderse utilizar a gran escala y en un fermentador de diseño avanzado.
- 2º) Ha de poderse obtener con facilidad en estado puro y estar disponible a largo plazo en la cantidad necesaria.

3º) Ha de ser compatible con el organismo elegido.

4º) El requerimiento de oxígeno para que el sustrato pueda ser utilizado por el microorganismo elegido ha de ser mínimo.

5º) No debe de tener riesgo de explosión.

6º) Preferiblemente deberá de ser soluble en agua y tener una temperatura de evaporación alta.

Los sustratos que se pueden considerar para la producción de SCP se pueden dividir en tres categorías :

1º) Productos residuales de la producción agrícola, como por ejemplo melazas, suero de la industria láctea, residuos de cítricos, etc...

2º) Primeras materias vegetales como almidón, azúcar, celulosa, etc...

3º) Sustancias de elevado contenido energético como n-alcenos, metano, etanol, metanol.

Productos residuales de la producción agrícola

Hasta la introducción de los hidrocarburos hace una década, la producción comercial de SCP estaba basada en la utilización de hidratos de carbono como sustrato.

Los hidratos de carbono que normalmente se han utilizado como sustrato, para la producción de SCP han sido subproductos y desechos agrícolas. Estos sustratos tienen la ventaja de ser muy abundantes y tener bajo precio, aunque la disponibilidad de estos materiales sufre fluctuaciones, debido a las cosechas estacionales y a las condiciones climáticas. Además pueden estar dispersos por una gran región y el coste de la recolección encarecer la materia prima.

Las melazas constituyen el sustrato hidrocarbonado más abundante y de fácil obtención, que se puede utilizar para la producción de proteínas microbianas, pero por sí solas constituyen una fuente de energía, que como tal, puede sustituir a los cereales en las dietas de los animales y añadiéndole nitrógeno en forma de urea, y fósforo, puede sustituir a fuentes de proteínas, especialmente a semillas de soja.

El suero que se obtiene de la fabricación del queso, es otra materia prima, potencialmente atractiva para la producción de proteínas microbianas, pero la producción comercial de queso está limitada a las economías altamente desarrolladas, donde compiten otras muchas fuentes de proteínas, Además recientes descubrimientos en las técnicas de separación, han hecho posible fraccionar directamente el suero en una serie de productos relativamente puros y de fácil venta.

Las lejías sulfíticas han sido ampliamente utilizadas para la producción de levaduras en Europa y Norte de América, pero recientes cambios en la tecnología de las pulpas de madera, han reducido la disponibilidad de las lejías sulfíticas.

Los otros muchos materiales que conteniendo hidratos de car-

bono, son productos de desecho de la producción agrícola y de los procesos de elaboración de alimentos, no pueden ser considerados como posibles sustratos para la producción de proteínas a gran escala, debido a que su disponibilidad es muy limitada.

Materias primas vegetales

Los cereales, aunque son materias primas muy adecuadas para la producción de SCP, son demasiado valiosos como alimento para ser utilizados como sustrato en la obtención de proteínas microbianas.

Las materias primas que contienen celulosa, son muy abundantes y baratas en el punto de origen, pero tienen la desventaja de que para asimilar los azúcares es necesario hidrolizar la celulosa, y los métodos para lograr esta hidrólisis, son muy caros, con lo que se eleva enormemente el precio del sustrato.

Hidrocarburos

Entre los hidrocarburos y sus derivados químicos que han sido considerados como sustratos para la producción de SCP a escala comercial, se encuentran: el metano, n-alcanos purificados, petróleo y fracciones obtenidas del petróleo como gas-oil, queroseno, etanol y metanol (66, 68)

El metano ha sido utilizado como sustrato en la producción de

SCF, debido a que se puede obtener en un alto grado de pureza en comparación con otros hidrocarburos y a que puede ser recuperado fácilmente de los medios de cultivo, sin dejar ningún residuo.

Existen numerosas bacterias capaces de utilizar metano como -- fuente de carbono y energía. Entre ellas se encuentran : Methanomonas methanica, Methanomonas methanoxidans (40), Methylococcus capsulatus (30,27 46, 128), Pseudomonas methanica (26, 62) y una variedad de cultivos mezclados de microorganismos (121, 108, 9, 131, 43)

También un hongo identificado como perteneciente al género Grappium crece en gas natural, (etano y metano) siendo etano el sustrato preferido (124). Sin embargo no se ha encontrado en la bibliografía ningún trabajo sobre el crecimiento de levaduras que utilicen metano, como fuente de carbono y energía.

En la producción a escala comercial de SCP a partir de metano, los sistemas de cultivo continuo, son mucho más atractivos que los de cultivo discontinuo, pues la productividad (peso de células por unidad de volumen de medio por unidad de tiempo) es mucho mayor en un cultivo continuo de bacterias que utilizan metano, que en un cultivo discontinuo (9,39). Además en los cultivos discontinuos una parte importante del metano puede no ser utilizado, mientras que en los sistemas continuos se puede reciclar el sustrato no usado.

La Shell Research Ltd. ha desarrollado en Inglaterra un proceso de obtención de SCP a partir de metano, a nivel de planta piloto, utilizando Methylococcus capsulatus (39, 45) y cultivos mezclados de bacterias (43,131)

Aunque en la producción de proteínas bacterianas a partir de metano en cultivo continuo, se pueden alcanzar coeficientes de producción elevados, la productividad está limitada por la transferencia de oxígeno y metano de la fase gaseosa a las células bacterianas (39).

Otros problemas que se presentan en la obtención de SCP a partir de metano son: el riesgo de explosión, que hace necesario operar con un volumen de oxígeno inferior al 12,1% y la producción de gran cantidad de calor cuando los niveles de productividad son elevados. También pueden aparecer productos inhibitorios durante el crecimiento de bacterias sobre metano en cultivo continuo, como se observa en el caso de M. capsulatus (27, 46) Debido a los requerimientos para evitar los riesgos de explosión y para enfriar el fermentador durante la operación, la inversión de capital para la producción de SCP a partir de metano puede ser significativamente más alta, que si se emplean hidrocarburos líquidos como sustrato.

Varios procesos han sido desarrollados por la Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. en Japón para producir SCP a partir de hidrocarburos gaseosos. En particular Brevibacterium ketoglutamicum ATCC nº 15.587 crece en hidrocarburos gaseosos, tales como metano, etano, propano, n-butano, isobutano, propileno, butileno, o mezclas de estos. También el gas de petróleo puede ser utilizado por Candida rigida nº 113, el n-butano por Nocardia paraffinica KY 4334, y el Arthrobacter simplex B 129 puede utilizar n-propano y otros n-alcenos y alquenos. Estos estudios han sido realizados en fermentadores a escala de laboratorio, pero no a nivel comercial.

Son muchos los microorganismos capaces de utilizar aerobiamente hidrocarburos líquidos como fuentes de carbono y energía.

En general el gas-oil y las n-parafinas purificadas son los hidrocarburos líquidos más prometedores, como posibles sustratos para procesos comerciales. El petróleo, fuel oil y queroseno han sido estudiados como -- sustratos para la producción de SCP por bacterias y levaduras a nivel de escala piloto (56), pero los procesos basados en estos hidrocarburos no han sido lo suficientemente prometedores, como para justificar un posterior desarrollo comercial.

En la década de los sesenta, la British Petroleum Company (BP) desarrolló una serie de procesos para producir SCP a partir de gas-oil, utilizando levaduras. Los primeros trabajos demostraron que Cándida lipolytica, Candida tropicalis y otras levaduras semejantes, eran capaces de utilizar el 60-75% de los n-alcanos del gas-oil (16).

En los procesos basados en gas-oil no es necesario operar asepticamente, aunque si en condiciones de extremada limpieza. Las contaminaciones pueden ser evitadas manteniendo el ph del medio entre 2.9-5.0 (16).

También se ha estudiado la posibilidad de producir SCP a partir de levaduras, empleando como sustrato n-alcanos purificados, derivados del gas-oil o del queroseno. Entre las levaduras utilizadas se encuentran : Candida lipolytica (BP) (16, 60), Candida kofuensis (Mitsui Toatsu Chemicals Inc.) (117, 118, 119), Candida novellus (Liquichemica Biosintesi s.p.a) (36), Candida tropicalis (Gulf Research & Development Co.) (19), Candida (Kanegafuchi Chemical Industry Co. Ltd) (51), y una levadura inespecifica (Dainippon Ink & Chemicals Inc) La BP trabajaba en condiciones asepticas, -- mientras que otros procesos de obtención de levaduras a partir de n-alcanos purificados, como los desarrollados por la Gulf, Kanegafuchi y Liquichimica se llevaban a cabo en condiciones no asepticas, evitándose las contaminacio

nes al mantener el pH entre 3-4. Como los n-alcanos son utilizados casi completamente por las levaduras, la separación y eliminación de los hidrocarburos residuales, es más fácil que en el caso del gas-oil (19) (51).

También hay bacterias tales como Acinetobacter cerificans, Achromobacter delvayate nº 5.301 y especies del género Pseudomonas (72, 28 133, 65) y Actinomicetos pertenecientes a los géneros Norcadia y Mycobacterium (126) que son capaces de producir SCP a partir de n-alcanos purificados. Sin embargo ninguno de estos procesos ha sido desarrollado a escala comercial.

Los hidrocarburos presentan la ventaja de poderse obtener en gran cantidad, independientemente de los factores climáticos. Además la producción de masa celular, y el contenido en proteínas de la biomasa son superiores cuando se utilizan hidrocarburos, que cuando se emplean hidratos de carbono como sustrato. Sin embargo los hidrocarburos tienen los inconvenientes siguientes :

- 1º) Son poco solubles en agua
- 2º) Son relativamente caros
- 3º) La cantidad de oxígeno necesaria para que los hidrocarburos puedan ser metabolizados por microorganismos, es muy elevada.
- 4º) La cantidad de calor producida por un cultivo de microorganismos sobre n-alcanos, es mucho mayor que la producida cuando se emplean hidratos de carbono como sustrato.

Los hidrocarburos con cadenas formadas por más de veinte átomos de carbono, son sólidos a las temperaturas empleadas en el crecimiento microbiano. Los hidrocarburos sólidos son insolubles en agua y por tanto muy difíciles de dispersar en los medios de cultivo. Una mezcla de Candida lipolytica y C. intermedia ha sido cultivada en un medio de sales minerales, conteniendo n-alcanos sólidos como fuente de carbono (73) pero todas las investigaciones realizadas sobre procesos en los que intervienen n-alcanos sólidos como fuente de carbono y energía, se han llevado a cabo exclusivamente a escala de laboratorio.

Etanol

En la obtención de SCP usando etanol como sustrato, son mucho más numerosos los procesos que se han llevado a cabo utilizando levaduras que los que emplean bacterias.

Entre los microorganismos de interés en la producción de SCP a partir de etanol destacan los siguientes: Acinetobacter calcoaceticus (61) Candida acidothermophilum, Candida etanothermophilum, Candida utilis, y Hansenula anomala (33)

En la actualidad la Amoco Foods Co. está produciendo C. utilis a partir de etanol en Hutchinson, (Minnesota) obteniendo 5.000 toneladas al año. En este proceso que se lleva a cabo en cultivo continuo y condiciones asepticas, la concentración de etanol se mantiene en 200 ppm. La fuente de nitrógeno (amonio) es suministrada continuamente para mantener el ph deseado.

La temperatura a que se trabaja es de 30° C, el ph 4.6 y la aireación y agitación lo suficiente para mantener la tasa de absorción de oxígeno entre 100 y 140 mM por litros y hora.

En Kojetin (Checoslovaquia) se ha cultivado C. utilis en etanol a nivel de planta piloto, obteniéndose 1.000 toneladas por año y se ha planeado la producción a escala industrial, que permitirá obtener 60.000 toneladas al año. Sin embargo no se ha publicado ninguna información sobre las condiciones de cultivo empleadas en este proceso.

La Mitsubishi Petrochemical Co Ltd, está llevando a cabo un proceso a nivel de planta piloto, para producir C. acidothermophilum y C. ethanothermophilum a partir de etanol, pero no se ha alcanzado una producción a escala comercial. Este proceso tiene la ventaja de que se opera a un ph entre 2.5 y 4.0 y a una temperatura superior a los 40°C.

La Exxon Corporation en combinación con Nestle Alimentana S. A ha realizado estudios en planta piloto sobre la producción Acinetobacter calcoaceticus a partir de etanol (61). Una información detallada sobre este proceso no ha sido publicada.

En España, en el Instituto de Fermentaciones Industriales se ha llevado a cabo un proceso para cultivar Hansenula anomala sobre etanol a nivel de planta piloto, con el fin de obtener SCP, lográndose resultados muy satisfactorios. (122)

El etanol como sustrato para la producción de SCP presenta muchas ventajas tecnológicas, pero tiene el inconveniente de que en muchos países

el mercado del etanol está controlado por los gobiernos, a fin de proteger al etanol de fermentación, que procede de excedentes agrícolas, lo que eleva considerablemente el precio del etanol.

Metanol

El metanol como sustrato para la producción de SCP presenta las ventajas siguientes :

- 1º) Posee una composición relativamente constante y alto grado de pureza.
- 2º) Es muy soluble en agua
- 3º) La mezcla metanol-oxígeno carece de riesgo de explosión en comparación con la mezcla metano-oxígeno.
- 4º) El metanol se elimina fácilmente del producto final, no presentando los problemas de separación, que aparecen cuando se emplean hidrocarburos como sustrato, en cuyo caso es necesario recurrir a procedimientos de extracción adicionales.
- 5º) La cantidad de oxígeno requerida por los microorganismos, para metabolizar el metanol es inferior a la necesaria para metabolizar los hidrocarburos.
- 6º) El precio del metanol es muy bajo, en comparación con el de otros sustratos. El precio del metanol obtenido a partir del gas natural,

es aproximadamente la cuarta parte del precio de las n-parafinas.

7º) Los costos de instalación son bajos.

Varios trabajos han sido publicados sobre el metabolismo de los compuestos monocarbonados por microorganismos (93, 91) y sobre la utilización del metanol por levaduras y bacterias (18, 58)

Las bacterias que utilizan metano como fuente de carbono y energía para su crecimiento, tales como, Pseudomonas methanica (48), Methanomonas methanoxidans (10), Methylococcus capsulatus (30, 87), y Methylococcus M2 (79) pueden utilizar metanol (128). Sin embargo hay otras bacterias, que aunque no utilizan metano, son capaces de utilizar metanol como fuente de carbono y energía, por ejemplo: Pseudomonas extorquens (25,42, 44) Hyphomicrobium sp. (41, 129, 130, 131), Methylomonas methanolica (2, 23, 116) y Pseudomonas utilis y P. inaudita (137), Pseudomonas achinensis (77)

Entre los actinomicetos y levaduras que utilizan metanol, destacan: Streptomyces sp. (53), Torulopsis glabrata (6), T. methanosorba y T. methanodomecquii (135), Kloeckera sp. n° 2201 (83), Candida boidinii (92, 95) y Hansenula polymorpha (57).

Los cultivos de bacterias, en los que se utiliza metanol como sustrato, tienen sobre los cultivos de levaduras, la ventaja de presentar mayores tasas de crecimiento y coeficientes de producción y productividad. La oxidación del metanol por bacterias, es llevada a cabo por un sistema enzimático, que depende de la nicotinamida adenin dinucleotido; (NAD), mientras

que la oxidación de metanol por levaduras, aparentemente tiene lugar a través de una alcohol oxidasa, que requiere flavin adenin dinucleotido (FAD)(93, 95, 96). El coeficiente de producción más bajo que se obtiene en el crecimiento de levaduras sobre metanol, puede ser debido a una menor producción de adenosin trifosfato (ATP) a partir de FAD reducido, que a partir de NAD reducido.

El calor liberado durante el crecimiento de microorganismos sobre metanol, es menor que el liberado cuando el crecimiento se realiza sobre n-alcenos, aunque es lo suficientemente elevado como para hacer necesaria la refrigeración de los fermentadores empleados en la producción de SCP a temperaturas de crecimiento comprendidas entre 30 y 32°C. Con el fin de evitar este inconveniente, se ha estudiado la posibilidad de aislar organismos termotolerantes, que sean capaces de crecer en metanol a una temperatura de 37°C a 42°C, encontrándose que, tanto bacterias tales como Pseudomonas bella TS 1008 (113) Pseudomonas methylotropa (Methylophilus methylotrophus) (35, 37) y Methylococcus NCIB 11083 (64) así como levaduras tales como Hansenula polymorpha (63) y Pichia methanotherma MO 104 (74) pueden crecer bien en metanol a dicha temperatura.

El proceso más avanzado para la producción de SCP a partir de metanol, ha sido desarrollado por la Imperial Chemical Industries Limited, siendo el microorganismo empleado el Methylophilus methylotrophus (3, 4) Un nuevo tipo de fermentador ha sido diseñado con el fin de utilizarle en este proceso. El sistema, que ha sido descrito por Gou y col. (37) ha sido diseñado para mantener una tasa de transferencia de oxígeno más elevada, sin limitación de oxígeno, eliminar el calor liberado durante el crecimiento a productividad alta, mantener homogénea la fase líquida, y evitar problemas

de esterilidad que se presentan en los fermentadores convencionales, debidos a las juntas y cierres mecánicos. ICI también ha desarrollado un proceso de aglomeración para la separación inicial de las células bacterianas del medio de cultivo, lo que permite que la centrifugación final se realice de un producto mucho más sólido que lo conseguido por otros métodos.

Durante tres años se ha trabajado a nivel de planta piloto, obteniendo 1.000 toneladas por año, y actualmente está en construcción una planta con capacidad para producir 50.000 a 75.000 toneladas al año, la cual entrará en funcionamiento a finales de 1.979 (3)

La Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. en Japon ha cultivado a nivel de planta piloto levaduras que toleran temperaturas de alrededor de 40°C cuando utilizan metanol como sustrato, y bacterias del género Pseudo-monas que crecen en metanol a 38°C, pero estos procesos no han alcanzado la magnitud de los llevados a cabo por ICI.

La Mitsubishi Petrochemical Co. Ltd. también ha estudiado la posibilidad de producir SCP a partir de bacterias y levaduras, utilizando metanol como sustrato, tanto en sistemas de cultivo discontinuo como continuo.

Debido a que en los trabajos realizados por diversos investigadores, sobre el valor nutritivo de las proteínas microbianas, (obtenidas a partir de hidrocarburos y metanol) se ha podido comprobar que no se producen cambios patológicos en los roedores y animales domésticos (pollos, gallinas, cerdos, terneras, etc...) a los que se les ha sustituido parte de las proteínas de su dieta por SCP (7, 37, 22, 70, 104, 105, 106, 120, 125, 127) y

teniendo en cuenta las ventajas mencionadas anteriormente, que presenta el metanol como sustrato, así como el enorme atractivo que presentan las proteínas bacterianas, se ha estudiado la posibilidad de encontrar bacterias, que utilizando metanol como única fuente de carbono y energía, sean capaces de producir un rendimiento tal, que haga rentable la obtención a nivel industrial de SCP a partir de dichas bacterias, siendo los primeros resultados de este trabajo recogidos en esta tesis.

Plan de trabajo

Nuestro plan de trabajo va orientado a la búsqueda y caracterización de bacterias capaces de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía, para posteriormente estudiar su desarrollo en fermentador a escala semi-piloto, con el fin de obtener biomasa, y lo podemos resumir en los siguientes puntos :

1º) Aislamiento de bacterias a partir de suelos de diferentes procedencia, con el fin de seleccionar, las que sean capaces de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía.

2º) Identificación de las bacterias seleccionadas, por sus características morfológicas, fisiológicas etc...

3º) Conservación de las bacterias seleccionadas, en un medio que nos permita la posterior utilización de dichas bacterias, durante un periodo de tiempo lo más largo posible.

4º) Elección de entre todas las bacterias seleccionadas anteriormente, de aquellas que en condiciones óptimas, produzcan un mejor rendimiento en cultivo discontinuo, utilizando un medio de cultivo a base de sales minerales y metanol.

PARTE EXPERIMENTAL

TOMA DE MUESTRAS

Las muestras fueron tomadas de suelos procedentes de diferentes regiones españolas, correspondiendo 26 muestras a la zona Centro, 7 a la zona Norte, 3 a la zona Sur y 3 a la zona de Levante.

La toma de muestras fué realizada, cogiendo el suelo de la zona comprendida entre los cinco y veinte centímetros de profundidad, y depositándolo en frascos estériles, en los que fué transportado al laboratorio, para su posterior utilización.

Las tomas de muestras fueron llevadas a cabo preferentemente en primavera y en otoño, pues en estas estaciones la población microbiana del suelo es más abundante, debido a :

1º) Que los deshielos y las lluvias favorecen el desarrollo de los microorganismos, mientras que el verano es seco por falta de precipitaciones, y el invierno es seco biológicamente, por estar el agua helada en la parte superior del suelo y no poder ser utilizada por los microorganismos para realizar sus funciones vitales.

2º) Que la primavera y el otoño son las épocas más propicias para la multiplicación de los microorganismos, pues las temperaturas son

suaves, presentando el otoño la ventaja de una gran aportación de materia orgánica, como consecuencia del periodo vegetativo de las plantas anuales y caducifolias.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROCEDENTES DEL SUELO CAPACES DE UTILIZAR METANOL COMO UNICA FUENTE DE CARBONO Y ENERGIA.

Con el fin de eliminar los microorganismos que no fueran capaces de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía, los aislamientos fueron realizados por cultivo de enriquecimiento en un medio a base de sales minerales y metanol.

Cultivo en agitador

Los aislamientos fueron llevados a cabo, suspendiendo 1 gramo de tierra, previamente tamizada para descomponer todos los agregados del suelo, y dejar las partículas sueltas, en 10 ml de suero fisiológico estéril, y sembrando 1 ml. de esta suspensión en una ampolla especial para cultivo sumergido con aireación, que contenía 100 ml. de medio de cultivo. Una vez sembradas las ampollas fueron incubadas en agitación, a una temperatura de 30 ° C durante seis días.

Las mencionadas ampollas son recipientes de vidrio Pyrex, en forma de T, cuya base interior es rugosa con el fin de que en el sistema de agitación se facilite la aireación del medio. Tienen una capacidad total de 300 ml. y fueron especialmente diseñadas para cultivo sumergido con aireación, en el Instituto de Fermentaciones Industriales (69).

El agitador que fué utilizado es eléctrico, de vaivén, modelo Belenguer, de accionamiento automático, con sistema transistorizado para

la regulación automática de su temperatura interior. Consta de cinco bandejas de 110 x 40 cm. perforadas para poder adaptarles bandas adhesivas que sujeten los recipientes que se van a agitar, El movimiento de vaivén de las bandejas lo imprime un motor de 1 HP con conexión trifásica a 220 V con potencia para 1.500 r.p.m. y con reductor de velocidad formado por diversos trenes de poleas que permiten obtener una velocidad de accionamiento de 80 - 90 r.p.m. El sistema de calefacción consiste en un juego de resistencias eléctricas de baja inercia térmica, con un consumo inicial de 2.000 vatios, conectadas al sistema termostático regulador de temperatura. En el cuadro de mandos hay un conmutador especialmente diseñado para realizar operaciones tales como la de parar automáticamente el aparato tan pronto como sean abiertas sus puertas frontales, poniéndose en marcha en cuanto sean cerradas las puertas. El conjunto va provisto de una envoltura metálica con aislante térmico.

Como medio de cultivo fué utilizado el descrito por C. Anthony y L.J. Zatman (5) para el crecimiento de Pseudomonas sp. M-27, con la modificación de que el sulfato amónico fué sustituido por urea por ser ésta más fácil de asimilar, y cuya composición es la siguiente :

| | |
|----------------------|----------|
| K_2HPO_4 | 2. g. |
| NaCl | 0.5 g. |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.001 g. |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.025 g. |
| Agua destilada | 1 litro. |

El pH se ajusta a 6.9 con Cl H N. en un pH-metro radiometer modelo PHM 22. Una vez repartido en ampollas se esteriliza a 121 °C

durante 15 minutos en un autoclave eléctrico marca IMAHO. Una vez esterilizado y enfriado se le añaden en condiciones estériles, por cada 100 ml. de medio 0.5 ml. de metanol y 1 ml. de solución acuosa de urea al 9 % previamente esterilizada por filtración amicrobica a través de un filtro Milipore de 100 ml. de capacidad al que se acopla una placa filtrante tipo H.A. de 0.45 u de diámetro capaz de retener todo tipo de microorganismos. El metanol y la urea se añaden al medio ya esterilizado, por no poder ser esterilizados por calor.

Las condiciones estériles se consiguen trabajando en una cámara estéril equipada con lámpara germicida de rayos ultravioleta,

Obtención de cultivos puros.

Cuando en las ampollas inoculadas con tierra hubo desarrollo abundante se hizo una observación microscópica, para conocer el aspecto de la población microbiana, realizándose seguidamente el aislamiento en placa para obtener los microorganismos en cultivo puro. El aislamiento se realizó tomando 1 ml. de cultivo (procurando que no lleve tierra) y suspendiéndolo en 10 ml. de suero fisiológico estéril 0.1 ml. de esta suspensión se sembró en placas que contenían un medio de cultivo agarizado a base de sales minerales y metanol. La siembra se realizó por extensión en superficie con espátula de Drigralsky.

Las placas así sembradas fueron incubadas durante siete días a 30° C. en estufa.

Las colonias que aparecieron en las placas, fueron observadas con lupa estereoscópica marca Wild M-3 con la que se pueden alcanzar hasta 40 aumentos, basándose el criterio de elección de las mismas en su aspecto y predominio.

Una vez examinadas las colonias y observados los microorganismos en el microscopio marca Wild M-20 de contraste de fase y campo oscuro, con el que se pueden alcanzar hasta 400 aumentos con objetivos secos y 1.000 con el de inmersión, se eligieron solo los bacilos móviles, debido a que en la bibliografía consultada, excepto algunas pertenecientes al género Methylococcus (cocos) (30.87) las bacterias citadas como productoras de biomasa a partir de metanol, son bacilos móviles, siendo los pertenecientes al género Pseudomonas los que han mostrado resultados más satisfactorios.

El medio de cultivo utilizado para realizar los aislamientos fué el descrito por C. Anthony y L.J. Zatman (5) para el aislamiento de Pseudomonas sp. M-27 cuya composición es la siguiente :

| | |
|----------------------|----------|
| K_2HPO_4 | 2 g. |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 2 g. |
| NaCl | 0.5 g. |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.001 g. |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.025 g. |
| Agar | 15 g. |
| Agua destilada | 1 litro |

Se esteriliza a 121° C durante 15 minutos cuando el medio fundido está a 45° C antes de repartirlo en las placas, se le añaden 5 ml/L

de metanol, pues como ya se ha indicado anteriormente, el metanol no se puede esterilizar por calor.

Resultados

Como puede observarse en la tabla 1 se examinaron 40 muestras numeradas por orden cronológico de llegada al laboratorio, numerándose también las cepas procedentes de cada muestra siguiendo un orden correlativo.

TABLA I

Procedencia de las muestras analizadas y cepas aisladas.

| Procedencia | Nº de muestra | Nº de cepa |
|-------------|---------------|------------|
| Zona Centro | 1 | 5.000 |
| | | 5.001 |
| | | 5.002 |
| Zona Centro | 2 | 5.003 |
| Zona Centro | 3 | 5.004 |
| | | 5.005 |
| | | 5.006 |
| Zona Centro | 4 | 5.007 |
| | | 5.008 |
| | | 5.009 |
| Zona Centro | 5 | 5.010 |
| | | 5.011 |
| Zona Centro | 6 | 5.012 |
| | | 5.013 |
| Zona Centro | 7 | 5.014 |

TABLA I (Continuación)

| Procedencia | Nº de muestra | Nº de cepa |
|-------------|---------------|------------|
| Zona Norte | 8 | 5.015 |
| | | 5.016 |
| | | 5.017 |
| | | 5.018 |
| | | 5.019 |
| | | 5.020 |
| | | 5.021 |
| Zona Norte | 9 | 5.022 |
| | | 5.023 |
| | | 5.024 |
| Zona Centro | 10 | 5.025 |
| | | 5.026 |
| Zona Centro | 11 | 5.027 |
| | | 5.028 |
| Zona Centro | 12 | 5.029 |
| | | 5.030 |
| | | 5.031 |
| | | 5.032 |

TABLA I (continuacion)

| Procedencia | Nº de muestra | Nº de cepa |
|-----------------|---------------|------------|
| Zona Centro | 13 | 5.036 |
| | | 5.037 |
| | | 5.038 |
| Zona Centro | 14 | 5.040 |
| | | 5.041 |
| | | 5.042 |
| | | 5.043 |
| | | 5.044 |
| | | 5.045 |
| Zona Norte | 15 | 5.047 |
| Zona de Levante | 16 | 5.048 |
| | | 5.049 |
| Zona Norte | 17 | 5.051 |
| | | 5.052 |
| | | 5.053 |
| | | 5.054 |
| | | 5.055 |
| Zona Centro | 18 | 5.058 |
| | | 5.059 |

TABLA I (continuacion)

| Procedencia | Nº de muestra | Nº de cepa |
|-------------|---------------|------------|
| Zona Norte | 19 | 5.060 |
| | | 5.061 |
| Zona Centro | 20 | 5.062 |
| | | 5.063 |
| | | 5.064 |
| Zona Centro | 21 | 5.065 |
| Zona Centro | 22 | 5.066 |
| Zona Centro | 23 | 5.067 |
| | | 5.068 |
| Zona Sur | 24 | 5.069 |
| Zona Centro | 25 | 5.070 |
| | | 5.071 |
| Zona Sur | 26 | 5.072 |
| | | 5.073 |
| Zona Centro | 27 | 5.074 |

TABLA I (continuacion)

| Procedencia | Nº de muestra | Nº de cepa |
|-----------------|---------------|------------|
| | | 5.075 |
| | | 5.076 |
| Zona Centro | 28 | 5.077 |
| | | 5.078 |
| | | 5.079 |
| | | 5.080 |
| Zona Centro | 29 | 5.081 |
| | | 5.082 |
| | | 5.083 |
| Zona Centro | 30 | 5.084 |
| | | 5.085 |
| | | 5.086 |
| | | 5.087 |
| Zona Sur | 31 | 5.088 |
| | | 5.089 |
| | | 5.090 |
| Zona de Levante | 32 | 5.091 |
| | | 5.092 |

TABLA I (continuación)

| Procedencia | Nº de muestra | Nº de cepa |
|-----------------|---------------|------------|
| Zona Norte | 33 | 5.093 |
| | | 5.094 |
| Zona de Levante | 34 | 5.095 |
| | | 5.096 |
| | | 5.097 |
| | | 5.098 |
| Zona Centro | 35 | 5.099 |
| | | 5.100 |
| Zona Norte | 36 | 5.101 |
| Zona Centro | 37 | 5.102. |
| | | 5.103 |
| | | 5.104 |
| Zona Centro | 38 | 5.105 |
| | | 5.106 |
| Zona Centro | 39 | 5.107 |
| Zona Centro | 40 | 5.108 |
| | | 5.109 |

Discusión de los resultados

Como puede apreciarse en la Tabla I , 103 cepas fueron aisladas por cultivo de enriquecimiento en un medio a base de sales minerales y metanol, a partir de 40 muestras de suelos.

Aunque las muestras proceden de regiones muy diferentes, la población microbiana encontrada es bastante uniforme, pues si bien es cierto que como ya se ha indicado, los cocos y hongos que se aislaron fueron desechados, estos aparecieron en escasas ocasiones, no habiéndose encontrado en ningún caso levaduras.

Esta uniformidad de los microorganismo aislados, lógicamente, es debida a que el medio en el que fueron realizados los aislamientos, por ser escaso en nutrientes, es selectivo para gran número de microorganismos

CONSERVACION DE CULTIVOS PUROS

Mientras se estaba trabajando con ellos, los cultivos puros fueron conservados en Micro Assay Culture Agar (Difco) dispuesto en tubos inclinados, que debidamente etiquetados fueron almacenados a 4º C.

Los microorganismos que no iban a ser utilizados durante un largo periodo de tiempo, fueron conservados en Tierra estéril, repartida en tubos de ensayo, que debidamente etiquetados, fueron almacenados a la temperatura ambiente.

La tierra estéril se preparó de la siguiente manera : la tierra fué tamizada con el fin de que quedara fina y homogénea. Se secó durante dos horas a 100º C y se repartió en tubos de ensayo, poniendo en cada tubo una cantidad tal, que alcanzara aproximadamente unos 2 cm. de altura. Con objeto de saber cuanto tiempo era necesario esterilizar la tierra así preparada, se hicieron 4 lotes de 20 tubos cada uno, esterilizandose:

El primer lote, media hora a 121º C. durante dos días consecutivos.

El segundo lote media hora a 121 ºC durante tres días consecutivos.

El tercer lote, tres cuartos de hora a 121 º C durante tres días consecutivos.

El cuarto lote, una hora a 121 ° C durante tres días consecutivos

10 tubos de cada lote fueron sembrados en agua de levadura y los otros 10 en Bacto Fluid Thioglycolate Medium (Difco). Todos los tubos fueron incubados a 30 ° C durante 8 días. Pasado este tiempo, los únicos tubos que no presentaban desarrollo bacteriano eran los pertenecientes al cuarto lote, de lo que se dedujo, que era necesario esterilizar la tierra una hora a 121° C durante tres días consecutivos.

El agua de levadura fué utilizada por ser un medio económico en el que se pueden desarrollar gran cantidad de microorganismos. Se prepara (50) desmenuzando y homogeneizando 100 g. de levadura prensada, del comercio en un litro de agua destilada, y llevandolo a ebullición durante 30 minutos. Una vez hervido y enrasado al volúmen inicial, se deja en reposo en nevera a 4° C, durante 24 horas, con el fin de que se separe la mayor parte del material no solubilizado. Transcurrido este tiempo se decanta y se filtra, utilizando un filtro Seitz con placa filtrante K7, sobre la que se forma una precapa, al filtrar 12 g. de Kisselgur disueltos en 200 ml. de agua destilada. Una vez filtrado se reparte y esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos.

El Bacto Fluid Thioglycolate Medium fué empleado para detectar la presencia de gérmenes anaerobios.

ESTUDIO COMPARATIVO DEL CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS Puros
EN UN MEDIO A BASE DE SALES MINERALES Y METANOL.

Este estudio fué llevado a cabo con los 103 cultivos puros de que disponíamos, con el objeto de agruparlos según su capacidad para desarrollarse en un medio a base de sales minerales y metanol.

Cultivo en ampolla

Fué realizado de la siguiente manera : de cada cultivo conservado en tierra estéril, aproximadamente 0.1 gramos de tierra, fueron sembrados en un matraz que contenía 25 ml. de agua de levadura. Las siembras fueron realizadas con la ayuda de varillas huecas de vidrio, de punta biselada que previamente habían sido esterilizadas, nos permitieron tomar cantidades de tierra aproximadamente iguales en condiciones estériles. Los matraces, una vez sembrados, fueron incubados en estufa a 30° C durante 48 horas. Pasado este tiempo, el contenido de cada matraz fué centrifugado a 9.000 r.p.m durante 15 minutos y el sedimento obtenido fué sembrado en una ampolla similar a las utilizadas en el aislamiento de las cepas, que contenía 100 ml. de medio, de composición idéntica a la del medio utilizado por C. Anthony y L.J. Zatman (5) para el cultivo de Pseudomonas sp. M-27. Estas ampollas fueron incubadas en agitación a una temperatura de 30 ° C. Cuando los cultivos de las citadas ampollas alcanzaron la fase de crecimiento exponencial, 50 ml. del contenido de cada ampolla fueron centrifugados a 9.000 r.p.m durante 15 minutos y los sedimentos obtenidos fueron sembrados en otras tantas ampollas que contenían 100 ml. de medio cada una.

Esto se repitió cuatro veces, antes de usar los citados sedimentos, como inoculos de unas ampollas, que al igual que las anteriores contenían 100 ml. de medio cada una y fueron incubadas en agitación a una temperatura de 30^o C. En los cultivos desarrollados en estas últimas ampollas fué medido el crecimiento mediante medidas turbidimétricas, realizadas en un espectrocolorímetro Mod, Spectronic 72, a una longitud de onda de 660 nm., empleando como blanco agua destilada a la que le fué asignada una absorción igual a cero.

Todos esos pases fueron realizados con objeto de adaptar a los microorganismos a vivir en el medio y condiciones de cultivo en que estábamos trabajando.

Resultados

Los resultados pueden observarse en la Tabla II en la que el desarrollo celular está representado por una, dos, tres o cuatro cruces, según que éste sea escaso, regular, bueno o muy bueno.

TABLA II

Capacidad de desarrollo de los cultivos puros sobre metanol determinada por turbidimetría.

| Nº de cepa | Desarrollo celular | Horas de cultivo |
|------------|--------------------|------------------|
| 5.000 | +++ | 72 |
| 5.001 | ++ | 72 |
| 5.002 | + | 72 |
| 5.003 | +++ | 72 |
| 5.004 | ++ | 96 |
| 5.005 | ++ | 96 |
| 5.006 | ++ | 72 |
| 5.007 | + | 72 |
| 5.008 | ++ | 72 |
| 5.009 | +++ | 72 |
| 5.010 | + | 72 |
| 5.011 | ++ | 72 |
| 5.012 | + | 96 |
| 5.013 | + | 72 |
| 5.014 | ++ | 72 |
| 5.015 | +++ | 72 |
| 5.016 | ++ | 72 |
| 5.017 | ++ | 72 |
| 5.018 | ++ | 72 |

42

TABLA II (continuacion)

| Nº de cepa | Desarrollo celular | Horas de cultivo |
|------------|--------------------|------------------|
| 5.019 | ++ | 72 |
| 5.020 | + | 72 |
| 5.021 | ++ | 72 |
| 5.022 | ++ | 72 |
| 5.023 | ++ | 72 |
| 5.024 | + | 72 |
| 5.025 | + | 72 |
| 5.026 | +++ | 72 |
| 5.027 | +++ | 72 |
| 5.028 | ++ | 72 |
| 5.029 | ++ | 72 |
| 5.030 | + | 72 |
| 5.031 | + | 72 |
| 5.032 | + | 72 |
| 5.033 | + | 72 |
| 5.036 | + | 72 |
| 5.037 | + | 72 |
| 5.038 | + | 72 |
| 5.040 | + | 72 |
| 5.041 | + | 72 |
| 5.042 | + | 72 |
| 5.043 | ++ | 72 |
| 5.044 | + | 72 |

TABLA II (continuacion)

| Nº de cepa | Desarrollo celular | Horas de cultivo |
|------------|--------------------|------------------|
| 5.045 | + | 72 |
| 5.047 | ++ | 72 |
| 5.048 | + | 72 |
| 5.049 | + | 72 |
| 5.051 | + | 72 |
| 5.052 | + | 72 |
| 5.053 | + | 72 |
| 5.054 | + | 72 |
| 5.055 | + | 72 |
| 5.058 | + | 72 |
| 5.059 | + | 72 |
| 5.060 | + | 72 |
| 5.061 | + | 72 |
| 5.062 | + | 72 |
| 5.063 | + | 72 |
| 5.064 | + | 72 |
| 5.065 | + | 72 |
| 5.066 | ++++ | 72 |
| 5.067 | +++ | 72 |
| 5.068 | ++ | 72 |
| 5.069 | +++ | 72 |
| 5.070 | +++ | 72 |
| 5.071 | ++ | 72 |

TABLA II (continuación)

| Nº de cepa | Desarrollo celular | Horas de cultivo |
|------------|--------------------|------------------|
| 5.072 | +++ | 72 |
| 5.073 | ++++ | 72 |
| 5.074 | + | 72 |
| 5.075 | + | 72 |
| 5.076 | ++ | 84 |
| 5.077 | ++ | 84 |
| 5.078 | +++ | 72 |
| 5.079 | + | 72 |
| 5.080 | +++ | 72 |
| 5.081 | ++ | 72 |
| 5.082 | ++ | 72 |
| 5.083 | ++ | 72 |
| 5.084 | ++ | 72 |
| 5.085 | ++ | 72 |
| 5.086 | + | 72 |
| 5.087 | + | 72 |
| 5.088 | + | 72 |
| 5.089 | + | 72 |
| 5.090 | ++ | 72 |
| 5.091 | ++ | 72 |
| 5.092 | +++ | 72 |
| 5.093 | + | 72 |
| 5.094 | + | 72 |

TABLA II (continuación)

| Nº de cepas | Desarrollo celular | Horas de cultivo |
|-------------|--------------------|------------------|
| 5.095 | + | 72 |
| 5.096 | ++ | 72 |
| 5.097 | + | 72 |
| 5.098 | + | 72 |
| 5.099 | + | 96 |
| 5.100 | + | 72 |
| 5.101 | ++ | 72 |
| 5.102 | +++ | 72 |
| 5.103 | ++ | 72 |
| 5.104 | ++ | 72 |
| 5.105 | ++ | 72 |
| 5.106 | ++ | 72 |
| 5.107 | + | 72 |
| 5.108 | ++ | 72 |
| 5.109 | + | 72 |

Discusión de los resultados

Todas las cepas que poseemos son capaces de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía, lo cual es lógico, pues como ya se ha indicado anteriormente, todas ellas fueron aisladas en un medio a base de sales minerales y metanol.

Como puede apreciarse observando la Tabla II, las 103 cepas que tenemos, pueden dividirse en cuatro grupos según el desarrollo que hayan alcanzado en el medio a base de sales minerales y metanol ya citado.

Al 1º grupo pertenecen las cepas 5.066 y 5.073 con las que se consiguieron alcanzar densidades ópticas de 3.3 y 3.5 respectivamente, que aproximadamente corresponden a unos rendimientos de 1.1 y 1.2 g/L de materia seca. Estas cepas, por ser las que presentan mayor desarrollo celular, son las más interesantes para nosotros.

Al 2º grupo pertenecen 14 cepas con las que se consiguieron alcanzar densidades ópticas comprendidas entre 2 y 3 que aproximadamente corresponden a un rendimiento comprendido entre 0.7 y 0.9 g/L de materia seca.

Al tercer grupo pertenecen 36 cepas con las que se lograron alcanzar densidades ópticas comprendidas entre 1 y 2 que corresponden aproximadamente a un rendimiento de 0.4 y 0.7 g/L.

Al cuarto grupo pertenecen 51 cepas que aunque son capaces de

utilizar metanol como única fuente de carbono y energía, en el medio empleado en este ensayo, no produjeron un rendimiento superior a 0.4 g/L.

ESTUDIO TAXONOMICO DE LOS CULTIVOS PURCS

Estudio Morfológico

Fué llevado a cabo en cultivos jóvenes, obtenidos, sembrando un asa de cada cultivo conservado en tubos inclinados de Micro Assay Culture Agar, en un tubo que contenía 10 ml. de Agua de Levadura e incubando dichos tubos a 30 ° C durante 24 horas.

La forma y movilidad fueron observadas entre porta y cubre en un microscopio marca Reichert, en campo claro a 630 aumentos.

Tamaño Acoplado al microscopio marca Reichert un micrómetro objetivo y un micrómetro ocular, para la combinación óptica de 630 aumentos, cada división del micrómetro ocular equivale a 2.2 micras. Con esta combinación óptica fué medido el tamaño de los microorganismos.

Tinción de Gram fué realizada según la técnica descrita en el Handbuch der Mikrobiologischen Laboratoriums-technik (21)

Resultados Todas las cepas que poseemos son bacilos rectos móviles, de tamaño comprendido entre 0.5 - 1 u de ancho por 1.5- 4 u de largo, y Gram negativos.

Estudio Fisiológico

Fué realizado en cultivos jóvenes de las cepas en estudio, utili-

zando como testigos, cepas puras procedentes de diferentes colecciones. Estas cepas son las siguientes :

Pseudomonas solanacearum NCPPB 325

Pseudomonas aeruginosa ATCC 10,701

Pseudomonas insueta ATCC 21,276

Pseudomonas fluorescens CECT 378

Pseudomonas pisi CECT 94

Las pruebas fisiológicas que fueron realizadas son las siguientes :

Oxidasa .- Esta prueba fué realizada, siguiendo la técnica de K. Kovacs (59) que consiste en depositar sobre un papel de filtro 2 ó 3 gotas de solución acuosa al 1% de tetrametil p-fenilendiamina, y extender sobre este papel impregnado de reactivo, un poco de la colonia del germen a estudiar, procedente de un cultivo de 24 horas en Micro Assay Culture Agar (Difco). La aparición inmediata de una coloración púrpura indica la presencia de una oxidasa en el sistema enzimático del germen.

Catalasa.- La presencia de este enzima fué detectada por el método descrito en el Handbuch der Mikrobiologifchm Laboratoriumstechnik (21).

Tipo de respiración.- Fué determinado siguiendo la técnica descrita en el Manuel de Techniques Bacteriologiques (13)

Oxidación/Fermentación de la glucosa.- Esta prueba que nos permite diferenciar las bacterias que presentan metabolismo fermentativo, de aquellas que lo presentan oxidativo, fué llevada a cabo, siguiendo la técnica de R. Hugh y E. Leifson (49) quienes demostraron que cuando un microorganismo es inoculado en dos tubos que contienen un medio apropiado al que se ha añadido un determinado hidrato de carbono, y el medio de uno de los tubos se cubre con parafina, para eliminar el oxígeno, mientras que el medio del otro tubo se deja descubierto, se pueden observar las siguientes reacciones de valor diferencial :

Los organismos fermentativos producirán reacción ácida en los dos tubos.

Los organismos oxidativos producirán reacción ácida en el tubo descubierto, y ligera producción de ácido o ausencia de crecimiento sin cambio de color en el tubo tapado.

Los organismos que no están clasificados ni como fermentativos ni como oxidativos, no producirán cambio alguno en el tubo tapado, originando ligera reacción alcalina en el destapado.

Utilización de Citrato.- La capacidad de utilizar citrato como única fuente de carbono, fué puesta de manifiesto, cultivando los microorganismos en el medio de Kosser (109) cuya composición es la siguiente:

| | |
|--|--------|
| Citrato sódico | 2 g. |
| NaCl | 5 g. |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0.1 g. |
| NH ₄ H ₂ PO ₄ | 1 g. |

| | |
|---------------------------------|---------|
| K ₂ HPO ₄ | 1 g. |
| Agua destilada | 1 litro |

Las sales se disuelven en el agua y se ajusta el ph a 6.7 - 6.9.
Se reparte en tubos y se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos. Los tubos una vez sembrados fueron incubados a 30 ° C durante 48 horas.

Producción de Pigmentos Fluorescentes. - Fué determinada, sembrando cultivos jóvenes de las cepas a ensayar en Pseudomonas Agar F (Difco) al que se habían añadido 10 g. por litro de glicerina, e incubando los tubos sembrados a 30° C durante 48 horas.

Producción de Píocianina. - Fué determinada, sembrando cultivos jóvenes de los microorganismos a estudiar, en el medio King A (55) que favorece la formación de pigmentos píocianicos y cuya composición es la siguiente :

| | |
|--------------------------------|---------|
| Bacto peptona (Difco) | 20 g. |
| Agar | 15 g. |
| Glicerol | 10 g. |
| K ₂ SO ₄ | 10 g. |
| MgCl ₂ | 1.4 g. |
| Agua destilada | 1 litro |

Se reparte en tubos y se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos. Los tubos se dejan enfriar en posición inclinada y una vez sembrados se incuban a 30 °C.

Arginina Dihidrolasa. - La presencia de este enzima capaz de

en anaerobiosis, transformar la arginina en ornitina, amoniaco y anhídrido carbónico, fué detectada siguiendo la técnica de Thornley (115) se utilizó esta técnica, en lugar de la recomendada por Moller (79) para la determinación de descarboxilasas de aminoácidos en Enterobacteriaceas, porque si se sigue el método de Moller, debido a que la mayor parte de nuestras cepas no fermentan la glucosa, el tubo control, en vez de ponerse amarillo, aparecerá de un color gris ligeramente morado, que puede confundirse con la coloración violeta que presenta el medio cuando la prueba es positiva. Sin embargo siguiendo la técnica de Thornley los resultados son más fáciles de interpretar, ya que el medio tomará color púrpura o naranja según que la prueba sea positiva o negativa.

Hidrolisis de Gelatina.- Fué determinada, sembrando cultivos jóvenes de los microorganismos a estudiar en agua de levadura con 12 % de gelatina e incubando los tubos sembrados a 30 ° C durante 7 días.

Producción de Sulfhídrico.- Esta prueba fué llevada a cabo, sembrando cultivos jóvenes de las cepas a estudiar en un medio sólido cuya composición es la siguiente :

| | |
|--------------------|----------|
| Bacto Triptona | 20 g. |
| Acetato de plomo | 0.2 g. |
| Fosfato dipotasico | 2 g. |
| Tiosulfato sódico | 0.08 g. |
| Agar | 15 g. |
| Agua destilada | 1 litro. |

La siembra fué realizada en picadura y los tubos sembrados

fueron incubados a 30° C durante 10 días.

La formación de sulfhídrico fué puesta de manifiesto por ennegrecimiento del medio en la zona de la picadura, debido a la formación de sulfuro de plomo de color negro.

Hidrolisis de la Urea.- La capacidad de los microorganismos para hidrolizar la urea con liberación de amoníaco, fué puesta de manifiesto utilizando el medio recomendado por V.B.D Skerman (109) cuya composición es la siguiente :

| | | |
|---------------------------------|-------|-------|
| Bacto peptona | 1 | g. |
| NaCl | 5 | g. |
| KH ₂ PC ₄ | 2 | g. |
| Glucosa | 1 | g. |
| Rojo fenol | 0.012 | g. |
| Agar | 20 | g. |
| Agua destilada | 1 | litro |

Se esteriliza a 121° C durante 15 minutos. Se enfría a 55-60° C y se le añaden asepticamente, 100 ml. de una solución acuosa de urea al 20% previamente esterilizada por filtración a través de un filtro Millipore al que se había acoplado una placa filtrante tipo H.A de 0.45 u de diámetro, capaz de retener bacterias y levaduras, y se reparte en tubos. La elevación del ph originada por la liberación de amoníaco, se aprecia por un cambio de color del indicador, de amarillo a rosa.

Crecimiento a 41° C.- Fué determinado, cultivando los microorganismos en agua de levadura a 41° C durante 48 horas.

Reducción de Nitratos. - Fué determinada según la técnica descrita en el Manual of Microbiological Methods (110) que consiste en sembrar las cepas a ensayar en caldo nitrado cuya composición es la siguiente :

| | |
|--------------------|---------|
| Bacto Beef Extract | 3 g. |
| Bacto peptona | 5 g. |
| Nitrato potásico | 1 g. |
| Agua destilada | 1 litro |

Se reparte en tubos y se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos. Los tubos una vez sembrados se incuban a 30° C y una vez desarrollados los microorganismos en este medio, a cada tubo se le añaden unas gotas de solución al 8 por 1.000 de ácido sulfámico en acético 5 N. y unas gotas de solución al 5 por 1.000 α -naftilamina en acético 5N.

La aparición de color rojo o rosa indica la presencia de nitritos en el medio.

Resultados. - Pueden observarse en la Tabla III

TABLA III

Caracteres fisiológicos de los cultivos puros

| Nº de cepa | 5000 | 5001 | 5002 | 5003 | 5004 | 5005 | 5006 | 5007 | 5008 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Oxidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tipo de respiración | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| O/F de glucosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Utilización citrato | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Pigm. fluorescentes | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piocianina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Argn. dihidrolasa | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| Gelatinasa | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Producción de SH ₂ | - | + | - | - | - | + | + | + | + |
| Ureasa | - | + | - | - | + | + | - | - | + |
| Crecimiento 41°C | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Reducción nitratos | + | + | + | - | + | + | + | + | + |

TABLA III (continuación)

| Nº de cepa | 5009 | 5010 | 5011 | 5012 | 5013 | 5014 | 5015 | 5016 | 5017 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Oxidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tipo de respiración | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| O/F de glucosa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Utilización citrato | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Pigm. Fluorescentes | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piocianina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Argn. dihidrolasa | - | - | + | + | - | - | - | - | + |
| Gelatinasa | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| Producción de SH ₂ | + | - | - | - | + | + | + | + | - |
| Ureasa | - | - | + | + | + | - | - | - | - |
| Crecimiento 4º C | - | + | + | - | - | + | + | + | + |
| Reducción nitratos | + | + | + | + | - | - | + | - | - |

TABLA III (continuación)

| Nº de cepa | 5038 | 5040 | 5041 | 5042 | 5043 | 5044 | 5045 | 5047 | 5048 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Oxidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tipo respiración | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| O/F de glucosa | - | - | - | - | - | - | - | - | F |
| Utilización citrato | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| Pigm. fluorescentes | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piocianina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Argn. dihidrolasa | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Gelatinasa | + | + | + | + | - | + | + | | - |
| Producción de SH ₂ | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Ureasa | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Crecimiento 41º C | - | - | + | + | - | + | + | - | - |
| Reducción nitratos | - | - | + | + | + | + | - | + | + |

TABLA III (continuación)

| Nº de cepa | 5049 | 5051 | 5052 | 5053 | 5054 | 5055 | 5058 | 5059 | 5060 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Oxidasa | - | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tipo de respiración | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| O/F de glucosa | - | - | 0 | - | 0 | - | - | F | 0 |
| utilización citrato | + | - | + | + | + | + | + | - | + |
| Pigm. fluorescentes | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Piocianina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Argn. dihidrolasa | - | + | + | - | + | - | - | - | + |
| Gelatinasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Producción de SH ₂ | - | - | + | + | + | - | - | - | + |
| Ureasa | - | - | + | - | - | - | - | - | + |
| Crecimiento 41º C | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Reducción de nitratos | + | - | + | + | + | + | - | - | + |

TABLA III (continuación)

| Nº de cepa | 5061 | 5062 | 5063 | 5064 | 5065 | 5066 | 5067 | 5068 | 5069 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Oxidasa | - | + | - | - | + | + | + | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tipo de respiración | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| O/F de glucosa | - | 0 | F | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Utilización citrato | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| Pigm. fluorescentes | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| Piocianina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Argn. dihidrolasa | - | + | - | - | - | + | + | + | - |
| Gelatinasa | + | + | + | - | + | + | + | + | - |
| Producción de SH ₂ | - | - | - | + | + | + | - | - | - |
| Ureasa | - | - | - | - | - | + | - | + | - |
| Crecimiento 41º C | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Reducción nitratos | + | - | - | - | - | + | - | - | - |

TABLA III (continuación)

| Nº de cepa | 5070 | 5071 | 5072 | 5073 | 5074 | 5075 | 5076 | 5077 | 5078 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Oxidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tipo de respiración | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| O/F de glucosa | - | 0 | - | 0 | - | - | - | - | - |
| Utilización citrato | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Pigm. fluorescentes | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Piocianina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Argn. dihidrolasa | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Gelatinasa | - | + | + | - | + | - | - | - | + |
| Producción de SH ₂ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ureasa | - | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Crecimiento 41º C | - | - | + | + | - | - | - | - | + |
| Reducción nitratos | - | - | + | - | + | - | + | - | + |

TABLA III (continuación)

| Nº de cepa | 5079 | 5080 | 5081 | 5082 | 5083 | 5084 | 5085 | 5086 | 5087 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Oxidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tipo de respiración | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| O/F de glucosa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - |
| Utilización citrato | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Pigm. fluorescentes | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Piocianina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Argn. dihidrolasa | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Gelatinasa | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| Producción de SH ₂ | - | - | - | + | - | + | + | - | - |
| Ureasa | - | + | - | - | - | + | - | + | - |
| Crecimiento 41º C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Reducción nitratos | - | - | - | + | - | + | + | + | + |

TABLA III (continuación)

| Nº de cepa | 5088 | 5089 | 5090 | 5091 | 5092 | 5093 | 5094 | 5095 | 5096 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Oxidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tipo de respiración | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| O/F de glucosa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | F | F | - | - |
| Utilización citrato | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Pigm. fluorescentes | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Piocianina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Argn. dihidrolasa | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Gelatinasa | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| Producción de SH ₂ | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| Ureasa | - | - | - | + | + | + | + | - | + |
| Crecimiento 41º C | - | - | - | - | - | + | + | - | + |
| Reducción nitratos | + | - | - | - | + | - | + | - | - |

TABLA III (continuación)

| Nº de cepa | 5097 | 5098 | 5099 | 5100 | 5101 | 5102 | 5103 | 5104 | 5105 |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Oxidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tipo de respiración | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| O/F de glucosa | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | F | 0 | - |
| Utilización citrato | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Pigm. fluorescentes | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| Piocianina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Argn. dihidrolasa | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| Gelatinasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Producción de SH ₂ | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Ureasa | + | + | + | - | + | + | - | + | + |
| Crecimiento 41º C | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Reducción nitratos | + | + | - | - | - | + | - | + | + |

TABLA III (continuación)

| Nº de cepa | 5106 | 5107 | 5108 | 5109 |
|-------------------------------|------|------|------|------|
| Oxidasa | + | + | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + |
| Tipo de respiración | A | A | A | A |
| O/F de glucosa | 0 | - | 0 | - |
| Utilización citrato | + | + | + | + |
| Pigm. fluorescentes | - | - | - | - |
| Piocianina | - | - | - | - |
| Argn. dihidrolasa | - | - | - | - |
| Gelatinasa | + | + | + | + |
| Producción de SH ₂ | - | - | + | - |
| Ureasa | - | - | - | - |
| Crecimiento 41º C | - | + | + | + |
| Reducción nitratos | + | + | + | + |

Discusión de los resultados

Todas las cepas aisladas son muy similares entre sí, pues todas son de forma bacilar, móviles, de tamaño comprendido entre 1.5 y 4 μ de largo por 0.5- 1 μ de ancho, Gram negativas, aerobios estrictos y catalasa positivos. Aunque, como ya se ha indicado anteriormente, los cocos y hongos encontrados fueron desechados estos aparecieron en muy escasas ocasiones y en una proporción tan pequeña, que la uniformidad de las cepas aisladas puede considerarse como una consecuencia de las técnicas de aislamiento empleadas, ya que si los aislamientos se hubieran llevado a cabo modificando parámetros tales como ph, temperatura, adición de nutrientes, etc... los microorganismos aislados serían totalmente diferentes.

Atendiendo a su comportamiento frente a la glucosa y según sean oxidasa positivas o negativas, las bacterias aisladas fueron divididas en cuatro grupos, perteneciendo al :

Grupo 1. - Las oxidasa positivas que no fermentan la glucosa

Grupo 2. - Las oxidasa negativas que no fermentan la glucosa.

Grupo 3. - Las oxidasa positivas que fermentan la glucosa

Grupo 4. - Las oxidasa negativas que fermentan la glucosa.

Al Grupo 1, pertenecen 46 cepas, cuyas características corresponden a las del género Pseudomonas, aunque su capacidad para desarrollarse en metanol, las aparta de un gran número de ellos, pues Stanier y col.(111)

después de llevar a cabo un estudio taxonómico detallado de 267 estirpes de Pseudomonas, llegaron a la conclusión de que ninguna de ellas era capaz de utilizar metanol como fuente de carbono. Aunque los Pseudomonas capaces de utilizar metanol constituyen un grupo muy restringido, no es extraño que gran parte de las bacterias aisladas pertenezcan a este grupo, si se tiene en cuenta que, como ya se ha indicado anteriormente, debido a las condiciones en que fueron realizados los aislamientos, los microorganismos que no eran capaces de utilizar metanol no pudieron desarrollarse.

De estas 46 cepas, 14 son capaces de producir pigmentos fluorescentes en Pseudomonas Agar F (Difco) poseen arginina dihidrolasa y son incapaces de crecer a 41º C. De estas cepas, 11 hidrolizan la gelatina, por lo que se asemejan bastante al Pseudomonas fluorescens, mientras que las tres restantes por no hidrolizarla, se parecen más al Pseudomonas putida.

De las 31 cepas de este grupo, que no producen pigmentos fluorescentes, 23 carecen de arginina dihidrolasa y son capaces de hidrolizar la gelatina, por lo que siguiendo la clave de clasificación de Pseudomonas de la octava edición del Bergey's manual of determinative bacteriology, (20) podrían estar encuadradas en el apartado 2 de la sección 11 o ser consideradas como estirpes de Pseudomonas facilis, que es la única especie perteneciente a la sección 111 capaz de hidrolizar la gelatina. 16 de estas cepas son incapaces de crecer a 41º C por lo que se asemejan bastante al Pseudomonas facilis, mientras que las otras 7 por crecer a 41º C podrían quedar encuadrados en el apartado 2 de la sección 11, pareciéndose bastante al Pseudomonas cepacia, sinónimo de Pseudomonas multivorans (Stanier) aunque se diferencian de él entre otras cosas, por no formar ningún tipo de pigmento en el medio de King (A y B)

Al grupo de bacterias que no producen pigmentos fluorescentes pertenecen también 6 cepas que por ser incapaces de hidrolizar la gelatina y no poseer arginina dihidrolasa pueden ser encuadradas en la sección 111 o bien ser consideradas como estirpes de Pseudomonas stutzeri 5 de estas cepas por ser incapaces de crecer a 41^o C pueden considerarse semejantes a las especies de Pseudomonas incluidas en la sección 111 de la clave de clasificación del Bergey's manual, mientras que la sexta por ser capaz de crecer a 41^o C se parece bastante al Pseudomonas stutzeri, del que se diferencia en que no forma nunca colonias rugosas. Debido a que esta cepa (5.073) es la más interesante para nosotros por ser la que alcanzó un mayor desarrollo celular en el estudio comparativo anteriormente realizado, fué estudiada con más detenimiento como se verá mas adelante.

Las cepas restantes de este grupo, por ser capaces de hidrolizar la gelatina, poseer arginina dihidrolasa y crecer a 41^o C se asemejan al Pseudomonas alcaligenes y a los capaces de hidrolizar la gelatina incluidos en el apartado 1 de la sección 11 de la clave de Bergey's manual (20)

Al Grupo 2, pertenecen 50 cepas que por ser oxidasa negativas no fermentar la glucosa y formar colonias de color rosa, incrementándose el color con la edad, parecen similares a las bacterias capaces de utilizar metanol, estudiadas por P.K. Stocks y C.S. McCleskey (112) quienes compararon las características de cepas aisladas por ellos con las de Pseudomonas methanica (26), Pseudomonas AM-1 (88), Pseudomonas PRL-W4 (52) Protaminobacter ruber, y Vibrio extorquens, llegando a la conclusión de que morfológica y fisiológicamente todas eran lo suficientemente similares entre sí, como para poder considerarlas estirpes de una misma especie. Como especie tipo propusieron Vibrio extorquens, mientras no se encuentre una afiliación

genérica más apropiada para estas especies.

Al Grupo 3, pertenecen 2 cepas que por ser oxidasa positivas, poseer arginina dihidrolasa, ser capaces de hidrolizar la gelatina, no crecer a 41º C y producir pigmentos fluorescentes en Pseudomonas Agar F (Difco) podrían considerarse semejantes al Pseudomonas fluorescens, pero debido a que fermentan la glucosa pensamos que quizá se asemejen más a las especies del género Aeromonas, y una que por no poseer arginina dihidrolasa, hidrolizar la gelatina y no crecer a 41º C se parece al Pseudomonas facilis, del que se diferencia en que fermenta la glucosa.

Al Grupo 4, pertenecen 5 cepas que comparten características en Enterobacteriaceas y de Pseudomonas, ya que si por ser oxidasa negativas y fermentar la glucosa parece que se aproximan a las Enterobacteriaceas, otras características tales como la de ser aerobios estrictos, las asemejan a los Pseudomonas. Debido a su pequeño número y a que para nosotros apenas tienen interés por presentar escaso desarrollo en metanol, no han sido estudiadas con más detenimiento.

Agrupando las cepas pertenecientes a cada uno de estos grupos según su mayor o menor capacidad para desarrollarse sobre metanol, encontramos que como puede verse en la Tabla IV de las 46 cepas del 1º grupo 2 presentan un crecimiento muy bueno en metanol, y 8 lo presentan bueno, por lo que son 10 las cepas de este grupo que presentan un desarrollo aceptable. Estas cepas representan el 22% de las bacterias de este grupo, mientras que las que presentan crecimiento regular constituyen el 37 % y las de crecimiento escaso el 41 %

De las 50 cepas pertenecientes al 2º grupo, ninguna presenta desarrollo muy bueno en metanol, mientras que 6 lo presentan bueno, por lo que en este grupo, las bacterias que son capaces de desarrollarse en metanol de una manera aceptable, se encuentran en la proporción del 12 %, siendo el porcentaje de las que presentan regular y escaso crecimiento 36 y 52 % respectivamente.

A los grupos 3º y 4º pertenecen 7 cepas ninguna de las cuales es capaz de desarrollarse sobre metanol de una manera aceptable, por lo que para nosotros carecen de interés.

A la vista de estos resultados, puede observarse que es en el 1º grupo en el que se encuentra la mayor proporción de bacterias, cuyo desarrollo sobre metanol es bueno, siendo la proporción de bacterias que presentan desarrollo escaso, mayor en los restantes grupos, Por esta razón las cepas pertenecientes a los grupos 2º, 3º y 4º, han sido consideradas de escaso interés en este trabajo, aunque posiblemente en otra ocasión serán estudiadas sus posibilidades de producción de biomasa, pues existe la posibilidad de mejorar su desarrollo sobre metanol, modificando el medio o las condiciones de cultivo.

Características fisiológicas de la cepa 5.073

De las bacterias pertenecientes al 1º grupo, la 5.073 ha sido la mas estudiada, por ser la que como puede verse en la Tabla II, la que presenta un mayor desarrollo celular sobre metanol habiéndose realizado con ella, para conseguir un mejor encuadramiento de la misma, una serie

de pruebas complementarias, tales como : hidrólisis de almidón, denitrificación, asimilación de compuestos carbonados, etc. las cuales fueron realizadas, siguiendo las técnicas recomendadas por Stanier y col. (111)

Las características fisiológicas de la cepa 5.073 aparecen resumidas en la Tabla V, en la que puede apreciarse que la cepa 5.073 por carecer de arginina dihidrolasa, no hidrolizar la gelatina, crecer a 41 ° C., producir fuerte denitrificación, no necesitar factores de crecimiento, poder utilizar amonio o nitrato como fuente de nitrógeno, y ser capaz de crecer en maltosa y almidón se parece bastante al Pseudomonas stutzeri, pero se diferencia de él además de por ser capaz de crecer en metanol, por no formar las colonias rugosas típicas del Pseudomonas stutzeri, y por ser capaz de utilizar arginina como única fuente de carbono y energía, característica que la asemeja al Pseudomonas multivorans, de el que se diferencia entre otras cosas, por no hidrolizar la gelatina, utilizar almidón como fuente de carbono, y no formar ningún tipo de pigmento en el medio de King (A y B). Para aclarar más la situación taxonómica de esta cepa, será necesario realizar otras pruebas como tinción de flagelos, determinación del tanto por ciento de guanina y citosina en el ADN, determinación de acumulación de ácido poli- β - hidroxibutírico, etc... lo cual será objeto de un trabajo posterior.

La cepa 5.073 se diferencia de otras Pseudomonas capaces de utilizar metanol, como las estudiadas por P.K. Stocks y C.S. McCleskey (112) por ser oxidasa positiva, no reducir los nitratos a nitritos y poseer ureasa. Mas se parece al Pseudomonas A, descrito por Y. Miura y col.(78) de el que se diferencia solamente por producir denitrificación vigorosa y ser capaz de crecer a ph 5 y 10.

TABLA IV

Capacidad de desarrollo sobre metanol de las cepas oxidasa +, que no fermentan la glucosa

| Desarrollo sobre metanol | Nº de cepas |
|--------------------------|-------------|
| ++++ | 2 |
| +++ | 8 |
| ++ | 17 |
| + | 19 |

Capacidad de desarrollo sobre metanol de las cepas oxidasa - que no fermentan la glucosa.

| Desarrollo sobre metanol | Nº de cepas |
|--------------------------|-------------|
| ++++ | 0 |
| +++ | 6 |
| ++ | 18 |
| + | 26 |

TABLA IV (continuacion)

Capacidad de desarrollo sobre metanol de las cepas oxidasa + que fermentan la glucosa.

| Desarrollo sobre metanol | Nº de cepas |
|--------------------------|-------------|
| ++++ | 0 |
| +++ | 0 |
| ++ | 1 |
| + | 2 |

Capacidad de desarrollo sobre metanol de las cepas oxidasa - que fermentan la glucosa.

| Desarrollo sobre metanol | Nº de cepas |
|--------------------------|-------------|
| ++++ | 0 |
| +++ | 0 |
| ++ | 0 |
| + | 4 |

TABLA V

Caracteres fisiológicos de la cepa 5.073

Tipo de respiración : aerobia

| | |
|-------------------------------|---|
| O/F de glucosa | 0 |
| Arginina dihidrolasa | - |
| Hidrolisis de gelatina | - |
| Producción de SH ₂ | - |
| Ureasa | + |
| Reducción de nitratos | - |
| Denitrificación | + |
| Hidrolisis de almidón | + |
| Utilización de citrato | + |
| Crecimiento a 41° C | + |
| Crecimiento a 49° C | - |
| Crecimiento a pH4 | - |
| Crecimiento a pH 10 | + |
| Crecimiento NaCl 6.5 % | + |
| Pigm. fluorescentes | - |
| Piocianina | - |
| Oxidasa | + |
| Catalasa | + |

TABLA V (continuación)

Asimilación de compuestos carbonados

| | |
|--------------|---|
| Glucosa | + |
| Maltosa | + |
| Manosa | + |
| Melibiosa | + |
| Lactosa | + |
| Levulosa | + |
| Xilosa | + |
| Galactosa | + |
| Esculina | + |
| Almidón | + |
| Arginina | + |
| Formaldehido | - |
| Etanol | + |
| Glicerol | + |
| Sorbitol | + |
| Acetato | + |
| Oxalato | - |
| Peptona | + |

CARACTERISTICAS DE DESARROLLO DE LA CEPA 5.073 COMO ESTUDIO PREVIO AL ENSAYO EN PLANTA SEMI-PILOTO

Con objeto de establecer unas condiciones standard que sean válidas para el desarrollo de la cepa 5.073 en un fermentador a escala semi-piloto, es necesario conocer la influencia que ciertos factores como ph, temperatura, adición de nutrientes, etc... ejercen sobre el desarrollo de la citada cepa.

Todos los ensayos fueron realizados en ampollas en agitación, utilizando, salvo en los casos en que se indique lo contrario, como medio base, el empleado por C. Anthony y L.J. Zatman para el cultivo de Pseudomonas sp M-27 (5) sustituyendo el sulfato amónico por fosfato triamónico.

Efecto del ph. Fué determinado, sembrando la cepa 5.073 en ampollas que contenían agua de levadura ajustada a diferentes ph con ClH N ó NaOH N, e incubando dichas ampollas en agitación a 30° C. El crecimiento fué medido turbidimetricamente a una longitud de onda de 660 nm. demostrándose que dicha cepa es incapaz de crecer a ph inferior a 5, desarrollándose bien a ph comprendido entre 5 y 10, siendo el óptimo 7.

Efecto de la temperatura. Fué determinado sembrando la cepa 5.073 en ampollas que contenían 100 ml. del medio a base de sales minerales y metanol, anteriormente citado e incubando dichas ampollas en agitador a diferentes temperaturas.

Esta cepa es incapaz de crecer a una temperatura inferior a 10° C

y superior a 42° C, correspondiendo como puede verse en la fig. 1 el máximo crecimiento a una temperatura de 30° C.

Efecto de la concentración de inóculo. Fué determinado sembrando diferentes cantidades de inóculo en ampollas que contenían el medio a base de sales minerales y metanol ya citado, e incubando dichas ampollas en agitación a 30° C.

Las cantidades de inóculo sembradas fueron las que aproximadamente correspondían a 0.4, 0.2, y 0.04 g/L de materia seca, que según una serie de determinaciones previamente realizadas corresponden respectivamente a $4.8 - 5.6 \times 10^6$; $2.4 - 2.8 \times 10^6$ y $4.8 - 5.6 \times 10^5$ células/c.c. y dieron lugar a unas densidades ópticas iniciales de 1, 0.5 y 0.1 respectivamente.

Como en los casos anteriores el desarrollo fué seguido mediante medidas turbidimétricas realizadas a una longitud de onda de 660 nm.

Observando los resultados representados gráficamente en la fig. 2 se puede apreciar que la cantidad de inóculo más adecuada es la que corresponde a una densidad óptica de 0.5 pues a menor proporción de inóculo el crecimiento es más lento, y con mayor cantidad, aunque el desarrollo es algo más rápido, la diferencia es escasa.

Efecto de la concentración de metanol.

Fué determinado, sembrando proporciones de inóculo equivalentes a 0.2 g/L de materia seca, en ampollas que contenían un medio a base de sales minerales y metanol, este en diferentes concentraciones, e incubando

dichas ampollas en un agitador de vaivén a 30º C.

El crecimiento fué observado, mediante medidas turbidimétricas, realizadas a una longitud de onda de 660 nm. utilizando como blanco agua -- destilada.

Los resultados aparecen representados gráficamente en la fig. 3 en la que puede apreciarse que el crecimiento aumenta al aumentar la concentración de metanol, pero a una concentración de metanol superior al 0.5 %, el crecimiento desciende, debido a la acción inhibitoria del metanol, siendo esta cepa incapaz de crecer en un medio de cultivo que contenga metanol en una proporción del 6 %.

Efecto del extracto de levadura. Fué estudiado sembrando la cepa 5.073 en una ampolla que contenía 100 ml. del medio de cultivo a base de sales minerales y metanol, ya citado (ver pag. 77) al que le fueron añadidos 0.5 g % de extracto de levadura (Difco) e incubando dicha ampolla a 30º C. en agitación

El desarrollo celular fué seguido como en los casos anteriores por turbidimetría.

El crecimiento obtenido fué comparado con el conseguido cultivando esta cepa en idénticas condiciones de agitación y temperatura, en el mismo medio de cultivo, pero sin extracto de levadura, comprobándose que como puede apreciarse en la fig. 4 el extracto de levadura estimula considerablemente el crecimiento de la cepa en estudio.

Efecto del Corn Steep Liquor. Por un procedimiento análogo al indicado en el ensayo anterior, se pudo comprobar que el Corn Steep Liquor en la proporción del 1 % apenas afectaba al crecimiento de la cepa 5.073.

Efecto de algunas vitaminas. Con objeto de conocer la influencia que las vitaminas podrían ejercer en el crecimiento de la cepa 5.073, fueron ensayadas una serie de vitaminas en la proporción de 25 mg/L.

Como en los casos anteriores, los ensayos fueron realizados en ampollas en agitación, a 30° C, utilizando como medio de cultivo, el compuesto a base de sales minerales y metanol ya citado, al que le fueron añadidos 25 mg/L de la vitamina a ensayar.

Las vitaminas ensayadas fueron : Tiamina, Riboflavina, biotina, inositol, pantotenato cálcico y una mezcla de clorhidrato de tiamina, clorhidrato de piridoxina e hidroxicoalamina.

Debido a que las vitaminas no se pueden esterilizar por calor, estas fueron añadidas al medio de cultivo en forma de solución acuosa previamente esterilizada por filtración amicrobica, a través de un filtro Milipore de 100 ml. de capacidad, al que le fué acoplado una placa filtrante tipo H. A. de 0.45 u de diámetro, capaz de retener todo tipo de microorganismos.

De los resultados obtenidos, representados en la fig. 5 puede deducirse que ninguna de las vitaminas ensayadas afecta al crecimiento de la cepa 5.073.

Efecto de algunos aminoácidos. Por un procedimiento similar al

de los ensayos anteriores, fué estudiada la influencia que sobre el desarrollo de la cepa 5.073 ejercían aminoácidos tales como : glicocola, fenilalanina, triptofano y metionina, pudiendose comprobar, como puede apreciarse en la fig. 6 que la metionina inhibe el crecimiento de la citada cepa, mientras que glicocola fenilalanina y triptofano no afectan al crecimiento. Estos aminoácidos fueron utilizados en la proporción de 0.2 g/L.

Crecimiento en diferentes medios. Teniendo en cuenta que, como ya se ha indicado anteriormente, la cepa 5.073 pertenece al género Pseudomonas, y con objeto de encontrar un medio en el que pudiera ser rentable cultivar la mencionada cepa con el fin de obtener proteínas, fueron ensayados diversos medios, utilizados por distintos investigadores en la producción de biomasa a partir de diferentes especies del género Pseudomonas.

Los medios que fueron ensayados son los siguientes :

Medio 1. Utilizado por S. Yamada y col. (132) para el cultivo de Pseudomonas putida 981 y cuya composición es la siguiente :

| | |
|---|---------|
| Extracto de levadura | 5 g. |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 3 g. |
| KH_2PO_4 | 4 g. |
| K_2HPO_4 | 3 g. |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 g. |
| $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ | 0.5 mg. |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.5 mg. |

| | |
|-------------------------------------|----------|
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 0.5 mg. |
| Agua destilada | 1 litro. |

El ph se ajusta a 7 con ph-metro radiometer modelo PHM 22 y se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos. Antes de inocularle se le añade el metanol en una proporción de 0.5 %

Medio 2. Utilizado por P. Praeve y D. Sukatsch (90) para el cultivo de Pseudomonas ATCC 31.061 y cuya composición es la siguiente :

| | |
|---|---------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 g. |
| KH ₂ PO ₄ | 0.4 g. |
| Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O | 0.2 g. |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0.02 g. |
| KCl | 0.02 g. |
| Agua destilada | 1 litro |

El ph se ajusta a 7. Se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos y una vez frio se le añaden 0.5 ml. de metanol por cada 100 ml. de medio.

Medio 3. Utilizado por la Phillips Petroleum Company (89) para el cultivo de bacterias y levaduras, cuya composición es la siguiente :

| | |
|--------------------------------------|--------|
| H ₃ PO ₄ (85%) | 2. ml. |
| KCl | 1 g. |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 1.5 g. |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 0.2 g. |
| Na Cl | 0.1 g. |

| | |
|-----------------------|---------|
| Solución de elementos | |
| traza | 5 ml. |
| Agua destilada | 1 litro |

La solución de elementos traza tiene la siguiente composición:

| | |
|--|---------|
| CuSO ₄ 5 H ₂ O | 0.06 g. |
| KI | 0.08 g. |
| FeCl ₃ 6H ₂ O | 4.8 g. |
| MnSO ₄ H ₂ O | 0.3 g. |
| Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O | 0.2 g. |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 2 g. |
| H ₃ BO ₃ | 0.02 g. |
| Agua destilada | 1 litro |

Como fuente de N se emplea NH₄OH en una cantidad que depende del ph deseado.

Al ajustar el ph a 7 (ph óptimo para el crecimiento de la cepa 5.073) se produce una lenta precipitación, posiblemente de ortofosfato amonico magnesico, que puede dificultar la asimilación de los diferentes nutrientes por el microorganismo, por lo que es necesario ajustar el ph a 6

Se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos y antes de inocular se le añade el metanol en la proporción del 0.5 %:

Medio 4. de composición similar al anterior del que se diferencia en que el NH₄ OH ha sido sustituido por (NH₄)₃ PO₄, ya que de este

modo el medio es más cómodo de preparar.

Medio 5. Utilizado por K. Yamanouchi (134) para el cultivo de Pseudomonas methylophilus y cuya composición es la siguiente :

| | |
|---|---------|
| KH_2PO_4 | 10 g. |
| K_2HPO_4 | 70 g. |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 5 g. |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 30 g. |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 g. |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 g. |
| Agua destilada | 1 litro |

Por la misma razón que en el caso anterior, el ph se ajusta a 6, se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos y se le añaden 0.5 ml. de me tanol por cada 100 ml. de medio.

Medio 6. Utilizado por G. Terui y col. (114) para el cultivo de Pseudomonas methanolica y cuya composición en la siguiente :

| | |
|---|---------|
| KH_2PO_4 | 0.5 g. |
| $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ | 2 g. |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.2 g. |
| KCl | 0.1 g. |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.01 g. |
| Agua destilada | 1 litro |

Se ajusta el ph a 7 y se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos. El metanol se añade en la proporción del 0.5 %

Medio 7 Utilizado por A. Yoshikawa (136) para el cultivo de Pseudomonas methanoqluconica. Su composición es la siguiente :

| | |
|--|---------|
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 3 g. |
| KH ₂ PO ₄ | 4 g. |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0.4 g. |
| NaCl | 5 g. |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 5 mg. |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | 20 mg. |
| ZnSO ₄ 7H ₂ O | 5 mg. |
| MnCl ₂ 4H ₂ O | 2 mg. |
| CuSO ₄ 5H ₂ O | 0.2 mg. |
| Agua destilada | 1 litro |

El ph se ajusta a 7. Se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos. Como en los medios anteriormente descritos el metanol se añade, en la proporción de 0.5 %

Los ensayos fueron llevados a cabo, sembrando la cepa 5.073 en ampollas que contenían los diferentes medios e incubando dichas ampollas en agitación a 30° C durante 96 horas.

El desarrollo celular fué seguido, lo mismo que en los ensayos anteriores, midiendo la densidad optica a una longitud de onda de 660 nm

Los resultados obtenidos aparecen representados en la fig. 7 en la que puede apreciarse que el máximo desarrollo se consiguió en los medios 3 y 4, mientras que en el medio 2 el crecimiento es mínimo.

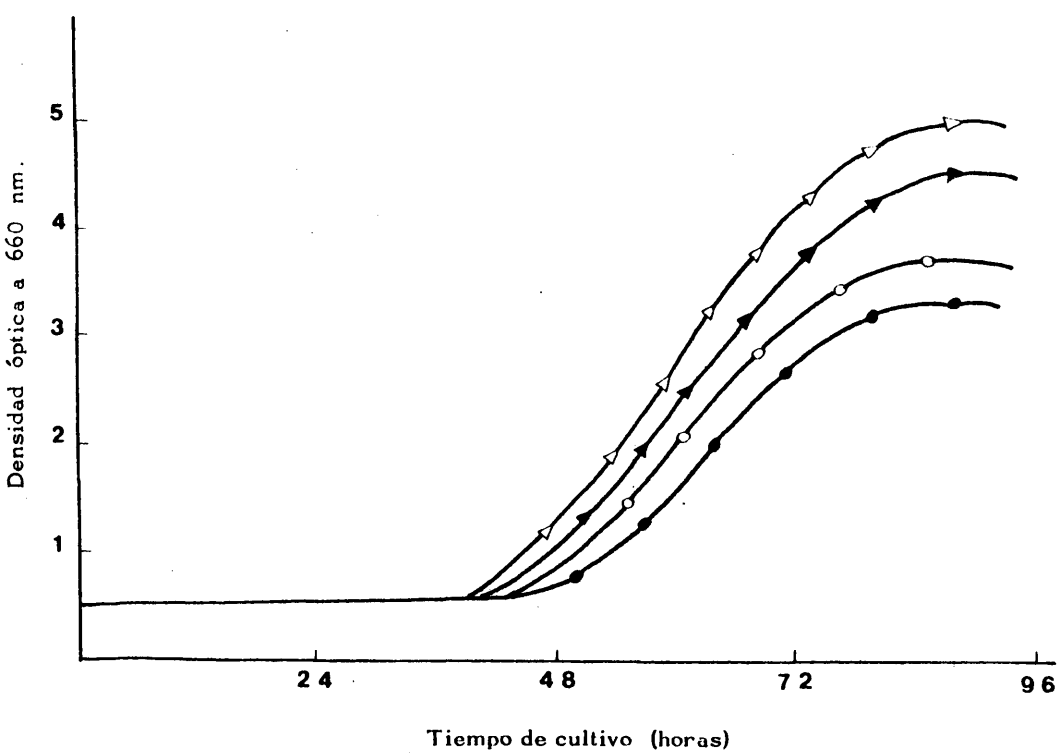


Fig. 1 Efecto de la temperatura en el desarrollo de la cepa 5.073

Desarrollo a 28 ° C —▲—▲
 " 30 ° C —△—△
 " 32 ° C —○—○
 " 35 ° C —●—●

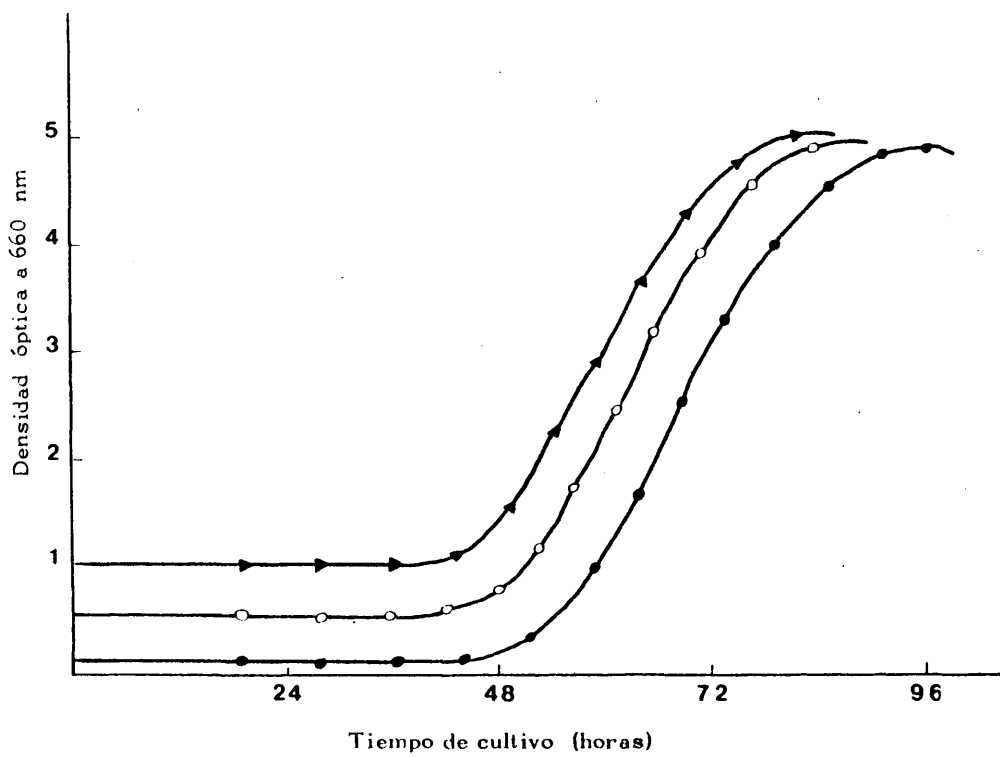


Fig. 2 Efecto de la cantidad de inóculo en el desarrollo de la cepa 5073

0.04 g/L —●—●

0.2 g/L —○—○

0.4 g/L —▲—▲

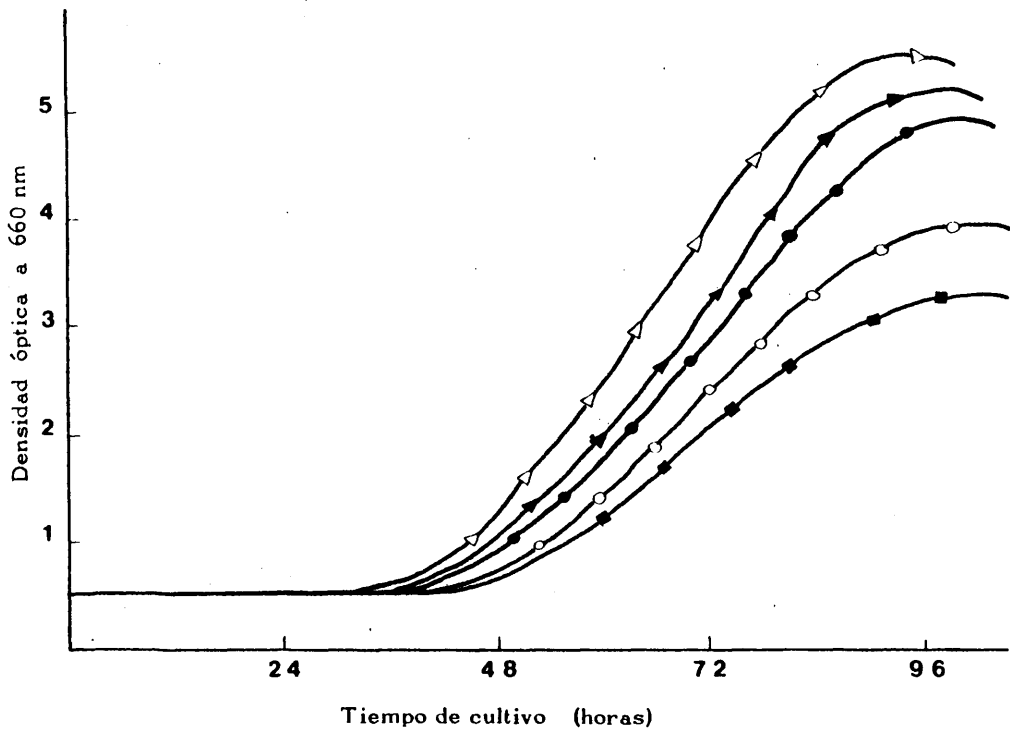


Fig. 3 Efecto de la concentración de metanol en el desarrollo de la cepa 5.073

Concentración de 0.2 % —●—●
 " 0.5 % —△—△
 " 1 % —▲—▲
 " 2 % —○—○
 " 4 % —■—■

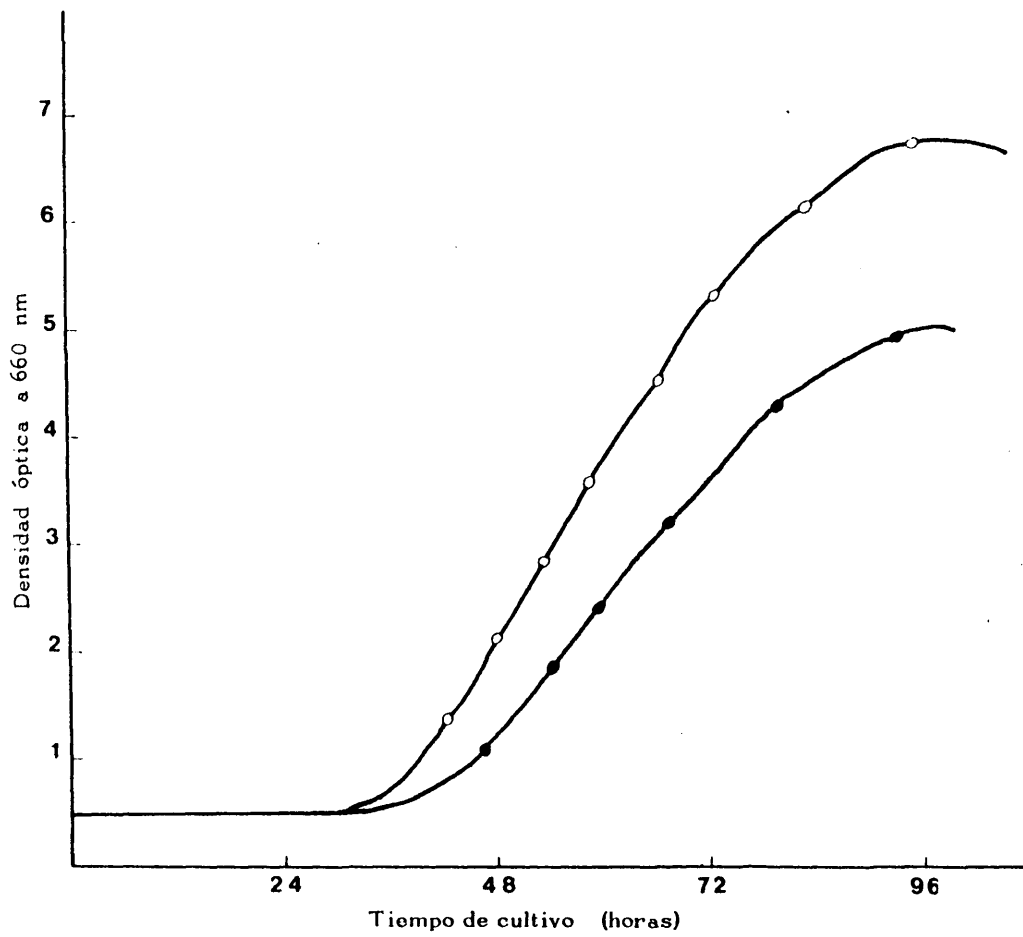


Fig. 4 Efecto del extracto de levadura en el desarrollo de la cepa 5.073

Con extracto de levadura — o — o
 Sin extracto de levadura — • — •

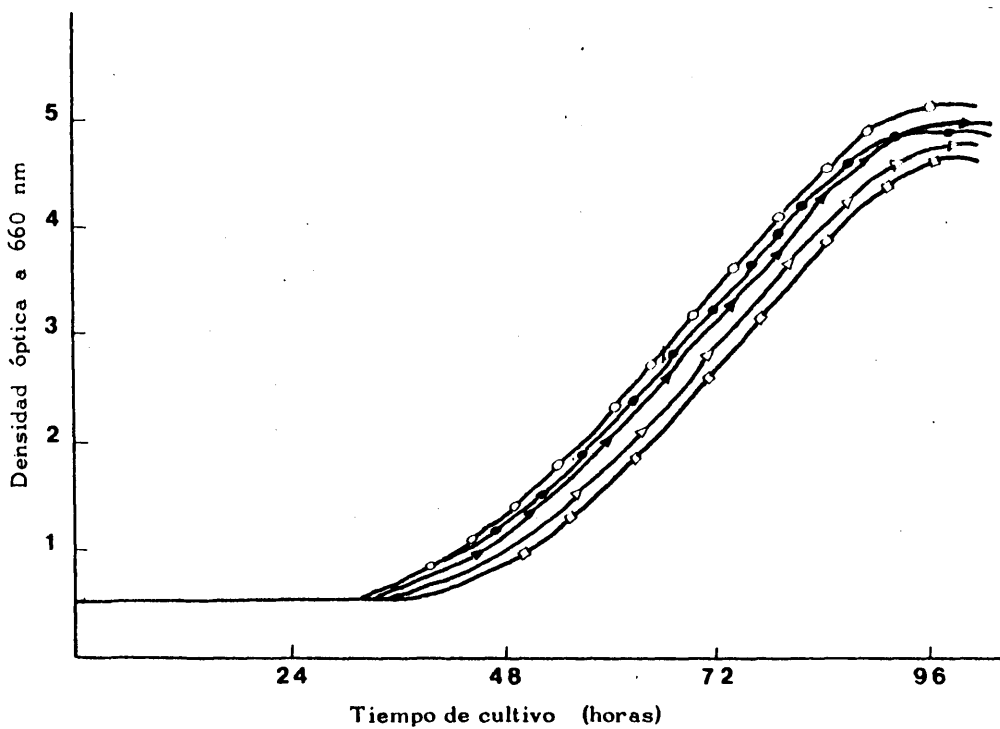


Fig. 5 Efecto de algunas vitaminas en el desarrollo de la cepa 5.073

- Inositol — o — o
- Riboflavina — ● — ●
- Tiamina — ▲ — ▲
- Pantotenato cálcico — △ — △
- Mezcla de vitaminas — □ — □

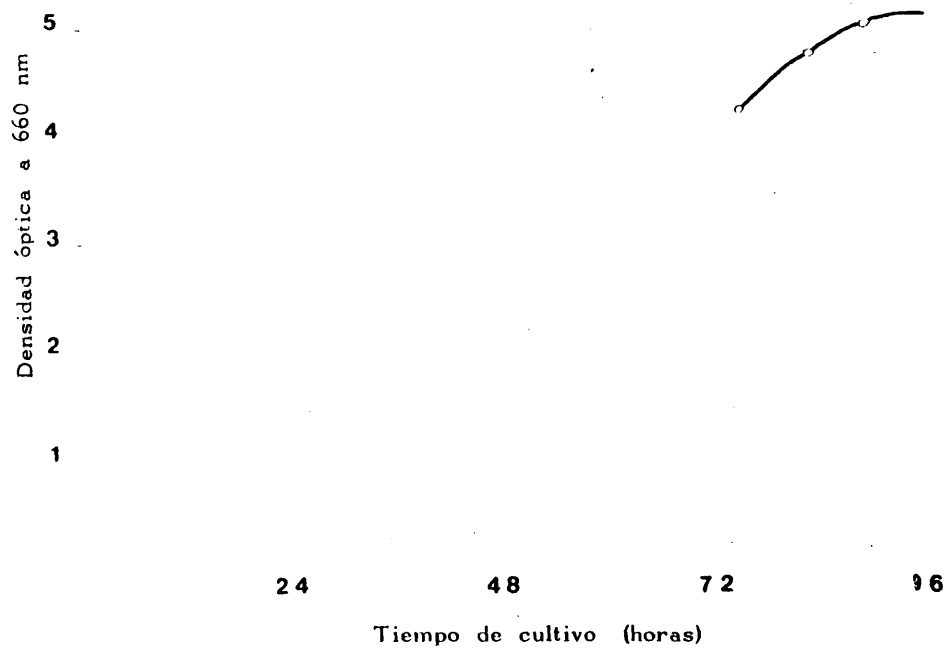


Fig. 6 Efecto de algunos aminoácidos en el desarrollo de la cepa 5.073

Fenilalanina — o — o
 Glicocola — ● — ●
 Triptofano — Δ — Δ
 Metionina — ▲ — ▲

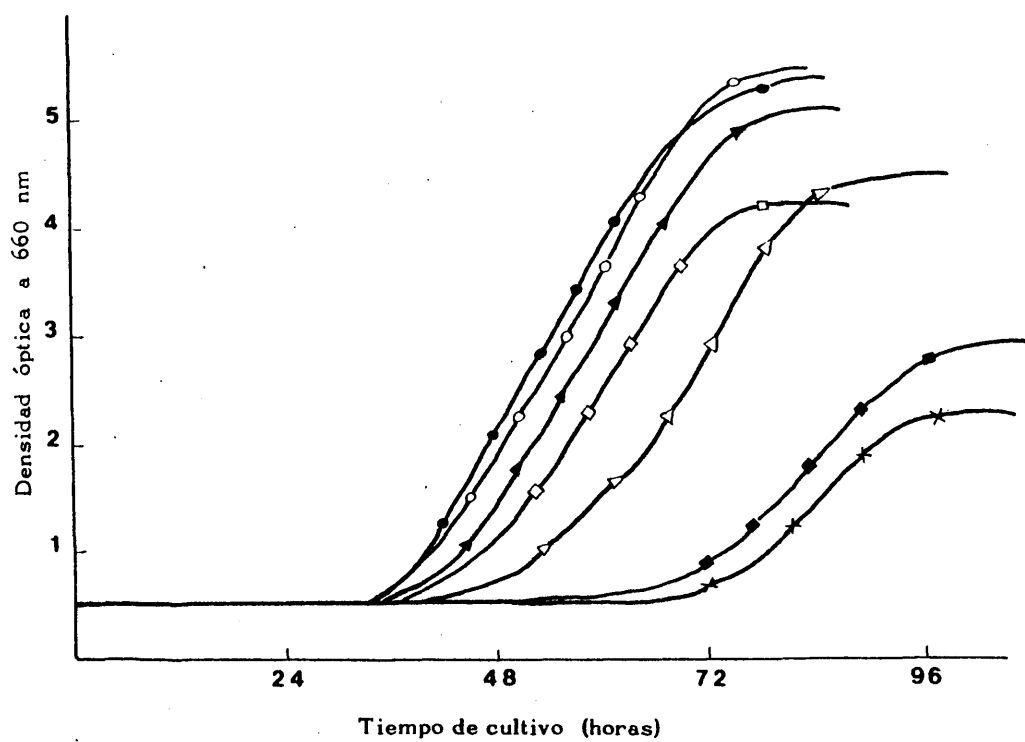


Fig. 7 Desarrollo de la cepa 5.073 en diferentes medios

- Medio 1 —▲—▲
 Medio 2 —x—x
 Medio 3 —o—o
 Medio 4 —●—●
 Medio 5 —■—■
 Medio 6 —□—□
 Medio 7 —△—△

Discusión de los resultados

Estudiando el efecto que parámetros tales como ph, temperatura, adición de nutrientes, etc... ejercen en el desarrollo de la cepa 5.073 podemos observar que esta cepa es incapaz de crecer a ph inferior a 5, lográndose el máximo crecimiento a ph 7. Debido a que algunas sales de los medios 3 y 4 (medios en los que se consiguió un mayor desarrollo de la cepa 5.073) precipitan al ajustar el ph a 7, cuando se utilicen dichos medios el ph se ajustará a 6, ya que a este ph las sales no precipitan y el crecimiento solo es ligeramente inferior al conseguido a ph 7.

La cepa 5.073 es incapaz de crecer a una temperatura inferior a 10° C y superior a 42° C, siendo 30° C la temperatura óptima de crecimiento. Como puede observarse en la fig. 1, el desarrollo de esta cepa a 28° C es mayor que a 32° y 35° C.

Como puede verse en la fig. 2 la cantidad de inóculo más adecuada es la correspondiente a 0.2 g/L de materia seca, que aproximadamente equivale a $2.4 - 2.8 \times 10^6$ células/c.é. pues cuando la cantidad de inóculo es menor, el desarrollo alcanzado es mas lento y cuando es mayor, aunque el crecimiento es algo más rápido, apenas hay diferencia.

El máximo desarrollo celular se consigue cuando la concentración de metanol en el medio es 0.5 %, pues como puede observarse en la fig. 3 a medida que se aumenta la concentración de metanol, aumenta el desarrollo, pero por encima del 0.5 % a medida que aumenta la cantidad de metanol disminuye el crecimiento, siendo éste nulo cuando el metanol se encuentra en la proporción del 6 %.

En cuanto a nutrientes puede apreciarse que así como el extracto de levadura favorece ostensiblemente el crecimiento de la cepa 5.073, ni el Corn Steep Liquor, ni ninguna de las vitaminas ensayadas parecen afectar al desarrollo de dicha cepa. De los aminoácidos estudiados ninguno parece afectar al crecimiento de esta cepa, excepto la metionina que como puede verse en la fig. 6 ejerce una acción inhibidora.

Como puede apreciarse en la fig. 7 de entre todos los medios ensayados el máximo crecimiento se consigue con los medios 3 y 4, los cuales se diferencian entre sí únicamente en la fuente de nitrógeno, que en el medio 3 es NH_4OH y en el 4 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$. El hecho de que no haya apenas diferencias entre los rendimientos conseguidos con ambos medios, indica que el empleo de NH_4OH ó $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ como fuente de nitrógeno no afecta al crecimiento de la cepa 5.073, por lo que es preferible utilizar el medio 4 ya que éste es más cómodo de preparar. También puede observarse que el menor crecimiento corresponde a los medios 2 y 5 en los que lo mismo que en el medio 1, la fuente de nitrógeno es sulfato amónico, mientras que en los demás, excepto en el 3 es fosfato amónico. Esto indica que aunque esta cepa es capaz de utilizar ambas fuentes de nitrógeno, el fosfato amónico favorece su desarrollo, pues aunque el desarrollo alcanzado en el medio 1 es casi similar al conseguido en los medios 3 y 4, probablemente es debido al extracto de levadura, que como ya se ha indicado anteriormente, favorece el desarrollo de la cepa 5.073 de una manera considerable, y no a la fuente de nitrógeno. Observando la composición de los diferentes medios, puede comprobarse que el medio 2 es el único que no tiene sulfato de hierro, lo que nos indica que el hierro es un elemento indispensable para el buen desarrollo de esta cepa. El mejor crecimiento logrado en los medios 3 y 4, posiblemente es debido a que el molibdeno y el boro, aún en pequeñas canti-

dades, son capaces de estimular el desarrollo celular, ya que los demás medios carecen de estos elementos.

DESARROLLO EN PLANTA SEMI-PILOTO DE LA CEPA 5.073

Los ensayos realizados a escala semi-piloto con la cepa 5.073 se iniciaron a partir de las condiciones de cultivo previamente establecidas, y fueron llevados a cabo en un fermentador Chepmap modelo G.F. 0007, de 7 litros de capacidad, con un volumen útil de 4 - 5 litros, cuyo esquema puede observarse en la fig. 9.

El desarrollo celular fué seguido a lo largo del proceso, como en los ensayos anteriores, midiendo la densidad óptica del medio de cultivo a una longitud de onda de 660 nm. En los casos en que fué necesario, se determinó el peso seco, torando 10 ml. del cultivo y centrifugándolos en tubos previamente tarados, durante 15 minutos a 9.000 r.p.m. en una centrífuga Sorvall RC 2-B provista de programador automático de aceleración y frenado. Los sedimentos obtenidos se lavaron dos veces con agua destilada repitiéndose la centrifugación en las mismas condiciones. Los tubos con los sedimentos así obtenidos, se secaron en una estufa modelo Normatest a 100 ° C hasta peso constante (12 horas).

Con el fin de poder establecer fácilmente una relación entre densidades óptica y gramos/Litro de materia seca, de tal modo que cono-

ciendo la densidad óptica tuviéramos una idea aproximada de los gramos/litro a que corresponde, sin necesidad de determinar el peso seco, se tomaron una serie de muestras, de cada una de las cuales, se midió la densidad óptica y determinó el peso seco. Los datos obtenidos fueron ajustados por mínimos cuadrados a una recta de tipo $Y = AX + B$ obteniéndose que A es igual a 0.3226 y B a -0.3024, siendo el coeficiente de correlación 0.9970. La representación gráfica puede verse en la fig. 8. Esta recta aunque no es demasiado exacta nos ha sido de gran utilidad para seguir el desarrollo de los cultivos de una manera bastante aproximada.

Descripción del fermentador : El fermentador utilizado consta de las siguientes partes :

Un cilindro de vidrio C acoplado a presión mediante juntas tóricas a la base B y tapa T del fermentador, que lo mismo que el cuerpo interior del fermentador y los accesorios que están en contacto con el medio de cultivo, son de acero inoxidable.

Un sistema de agitación formado por un eje central E, con paletas inclinadas P, que producen un reciclado alrededor del cuerpo central de termostatación Z, que está movido por un motor M, de corriente continua, con regulación electrónica de 0 a 3.000 r.p.m

Un refrigerante de acero inoxidable R (en el esquema aparece a escala reducida) y un filtro de acero sinterizado a través del cual se verifica la salida de gases.

Un cuerpo central hueco Z a través del cual pasa un flujo constante de agua, que puede ser calentada mediante resistencias eléctricas, cuya conexión está regulada y controlada electricamente por un termómetro de contacto, con lo que se consigue la regulación de temperatura entre la del ambiente y 50° C con un error inferior a 0.5° C.

Un electrodo combinado de ph, dotado de cámara de presurización, consiguiéndose el ajuste de ph con una precisión de ± 0.1 mediante un controlador proporcional y la adición de reactivos correctores por medio de bombas peristálticas reguladas.

Un sistema de control de espuma que es doble, pues consta de discos rompedores de espuma D y de sonda que acciona la adición de antiespumante mediante una bomba peristáltica regulada.

La aireación se consigue mediante una línea de aire comprimido filtrado a través de un filtro de acero sinterizado. La regulación de aire se verifica mediante un rotámetro graduado en $\%$ entre 0 y 17 L/m.

La tapa T del fermentador cuyo esquema puede verse en la fig. 10, tiene 9 orificios que permiten la introducción de los instrumentos de medida de temperatura, ph, etc... de una manera estéril. Numerados del 1 al 9 estos orificios corresponden :

El 1 a la entrada del electrodo de oxígeno.

El 2 a la entrada de medio, reactivos, etc...

El 3 a la entrada del termómetro de contacto

El 4 a la entrada de la sonda de ph

El 5 a la entrada del sensor de temperatura y los reactivos correctores de ph

El 6 a la entrada de aire

El 7 a la entrada de sonda antiespumante

El 8 al orificio de toma de muestras

El 9 a la entrada del refrigerante.

Este fermentador está provisto de un medidor y registrador multicanal para los parámetros temperatura, ph y oxígeno disuelto.

La esterilización del fermentador es simple y se puede realizar de dos maneras : introduciendo vapor en el interior del fermentador, a la vez que se coloca la cubierta metálica protectora que le aísla de la temperatura ambiente, o desmontándolo y esterilizándolo en autoclave.

Para la realización de este trabajo hemos dispuesto de dos fermentadores exactamente iguales, que nos han permitido, en los casos en que fué necesario, hacer ensayos paralelos, modificando alguno de los parámetros según convenga.

El medio de cultivo utilizado en estos ensayos fué el 4, cuya composición a base de sales minerales y metanol, fué descrita anteriormente. Este medio fué elegido por las razones siguientes :

19) Como puede apreciarse observando los resultados obteni-

dos en los ensayos anteriormente realizados, es de entre todos los medios ensayados, en el que la cepa 5.073 presentó un mayor desarrollo celular.

2º) Es un medio sintético y por tanto fácilmente reproducible

3º) No presenta problemas de formación de espuma, lo que hace innecesaria la adición de antiespumantes.

Preparación del inóculo . El inóculo fué preparado, sembrando aproximadamente 0.1 gramos de la tierra en que se hallaba conservada la cepa 5.073, en una ampolla que contenía 100 ml. de medio e incubando dicha ampolla en agitación a 30º C. Cuando este cultivo alcanzó la fase logarítmica de crecimiento fué utilizado como inóculo de una ampolla de 2 litros de capacidad que contenía 1 litro de medio y que fué incubada lo mismo que la anterior a 30º C en agitación. El cultivo así obtenido fué utilizado como inóculo. La cantidad de inóculo sembrado fué la que aproximadamente equivalía a $2.4 - 2.8 \times 10^6$ células/c.c. que según una serie de determinaciones anteriormente realizadas correspondía a 0.2 g/L de materia seca y dió una densidad óptica inicial de 0.5 medida a una longitud de onda de -- 660 nm.

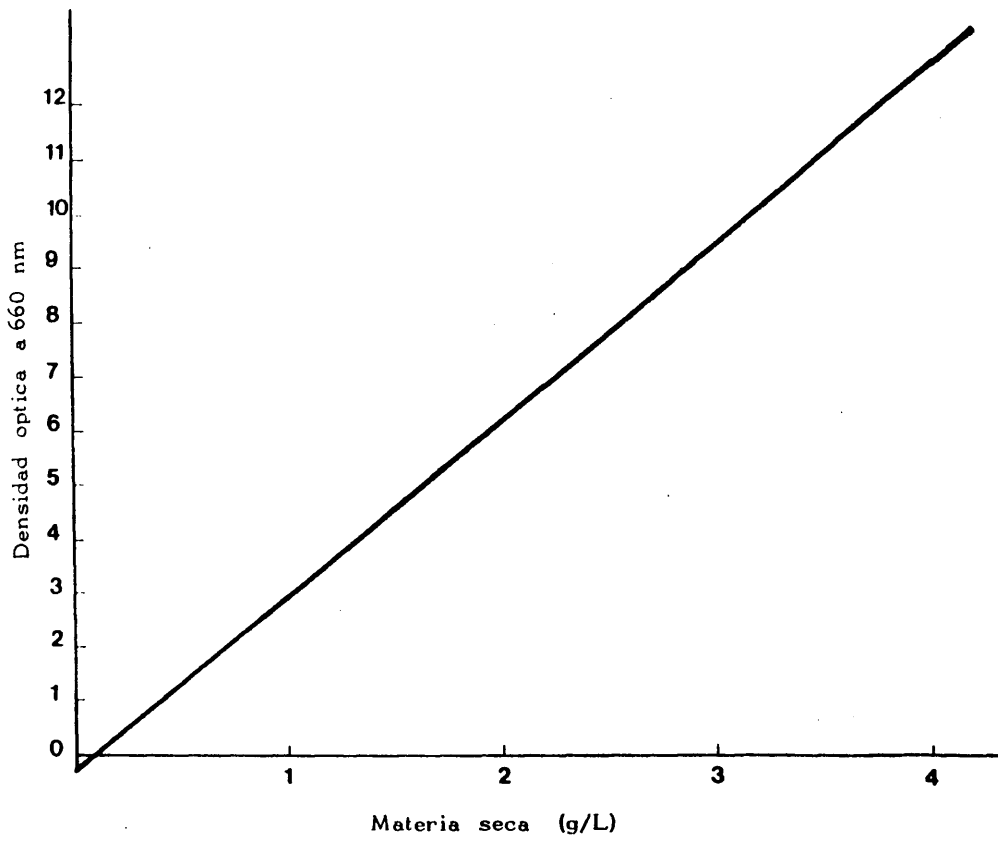


Fig. 8 Recta que permite relacionar materia seca con densidad óptica

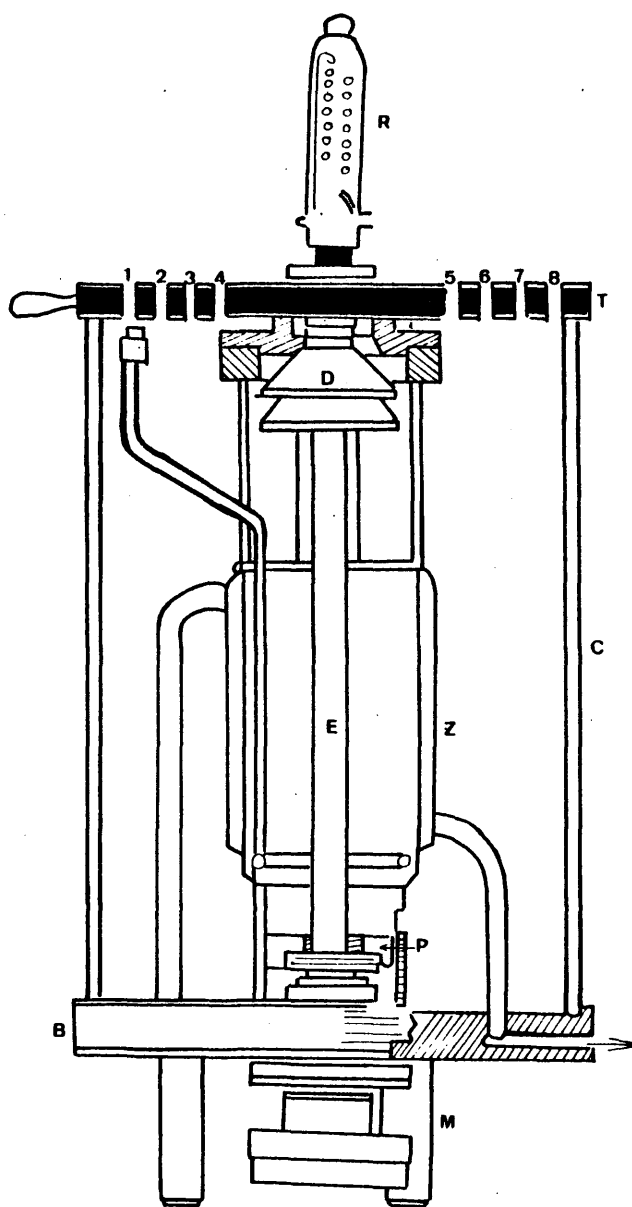


Fig. 9 Esquema del Fermentador Chepmap

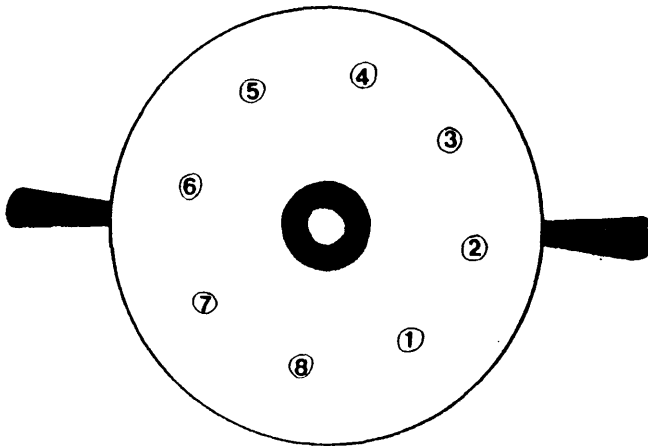


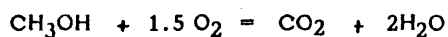
Fig. 10 Esquema de la tapa del Fermentador

- nº 1 Electrodo de oxígeno
- nº 2 Entrada de medio, reactivos, etc...
- nº 3 Termómetro de contacto
- nº 4 Sonda de ph
- nº 5 Sensor de temperatura y entrada de reactivos correctores de ph
- nº 6 Entrada de aire
- nº 7 Sonda antiespumante
- nº 8 Toma de muestras

Rendimiento Teorico

Aunque el rendimiento teórico (g de biomasa/g de sustrato) puede ser determinado en función del número de moles de ATP producidos durante el metabolismo del sustrato, de la cantidad de oxígeno consumida, del cambio de entalpía en el medio, debido al crecimiento, del contenido de electrones utilizables del sustrato y del contenido en carbono del sustrato, B.J. Abbot (1) recomienda la utilización de los dos últimos métodos, ya que estos por basarse solamente en la composición molecular del sustrato y en una constante empírica, no requieren medidas experimentales, ni ningún tipo de suposiciones, a la vez que pueden ser aplicados a un gran número de sustratos y microorganismos.

El contenido de electrones utilizables es una medida del grado de reducción (u oxidación) del sustrato y representa el número de electrones del sustrato que pueden ser transferidos al oxígeno en la combustión. Se determina multiplicando por 4 el número de moles de oxígeno necesarios para la completa combustión del sustrato. En el caso del metanol la reacción sería :



luego el número de electrones utilizables sería $1.5 \times 4 = 6$, pero debido a que según B.J. Abbot, 2 de estos electrones no son utilizados en la producción de biomasa, el número de electrones utilizables queda reducido a 4. Teniendo en cuenta que varios investigadores después de realizar una serie de medidas de producción de biomasa a partir de gran variedad de sustratos llegaron a la conclusión de que 3.14g. de biomasa se producían por cada electrón utilizable de un mol de sustrato, podemos calcular que por cada mol de

metanol (32 g.) se producirán $3.14 \times 4 = 12.56$ g. de biomasa o sea por cada gramo de metanol 0.39 g. de biomasa.

Para la determinación del rendimiento teórico según el contenido en carbono del sustrato hay que tener en cuenta que existe un factor constante de producción común a azúcares polihidricos, alcoholes y parafinas, cuyo valor es 1.1 g. de biomasa por gramo de carbono. Teniendo este en cuenta, si 1 g. de carbono produce 1.1 g. de biomasa, 12 g. de carbono, producirán 13.2 g. de biomasa, lo que equivale a 0.41 g. de biomasa por gramo de metanol.

En el caso del metanol el rendimiento teórico, calculado por cualquiera de los dos procedimientos indicados, se encuentra próximo a los 0.4 g. de biomasa/ g. de metanol.

Curva de crecimiento de la cepa 5.073 en fermentador

Fué realizada, cultivando la cepa 5.073 en el fermentador anteriormente descrito, utilizando como medio de cultivo el 4.

El fermentador de 7 litros de capacidad, previamente esterilizado y enfriado, se llenó con 6 litros de medio, con el fin de reducir lo más posible las superficies internas del fermentador que no estuvieran cubiertas por el medio de cultivo, pues debido a su carácter altamente aerobio, la cepa 5.073 tiene gran tendencia a formar velo sobre dichas superficies, y por tanto si se quiere mantener un cultivo homogéneo, cuyo desarrollo a lo largo del proceso pueda ser seguido con cierta garantía, midiendo la densidad óptica, será necesario que las citadas superficies sean mínimas. No se puede poner más medio porque la sobrepresión podría originar algunos -- trastornos en la parte superior del fermentador.

Una vez llenado e inoculado el fermentador, se inició el proceso, a lo largo del cual y gracias a los dispositivos de regulación automática del fermentador, se mantuvo la temperatura a 30° C ; el ph a 6, la entrada de aire a 1.8 litros por minuto (0.3 v/v/m) y la agitación a 1.500 r.p.m.

El desarrollo fué seguido turbidimetricamente. Observando los resultados obtenidos, representados en la fig. 11 puede apreciarse que la máxima densidad optica alcanzada es 6.6 que corresponde aproximadamente a un rendimiento de 2.3 g/L de materia seca, cifra superior a los 1.7 g/L conseguidos cultivando la cepa 5.073 en ampolla en agitación, utilizando el mismo medio y condiciones de cultivo. De esto se deduce que

con la utilización del fermentador se consigue mejorar ostensiblemente el rendimiento alcanzado, lo cual era de esperar, ya que la mayor transferencia de oxígeno, así como el control de ph y un sistema de regulación de temperatura más perfecto, son factores que contribuyen a aumentar el desarrollo celular. También puede observarse que la tasa de crecimiento en la fase logarítmica es 0.27, siendo el tiempo de generación $2 \frac{1}{2}$ horas.

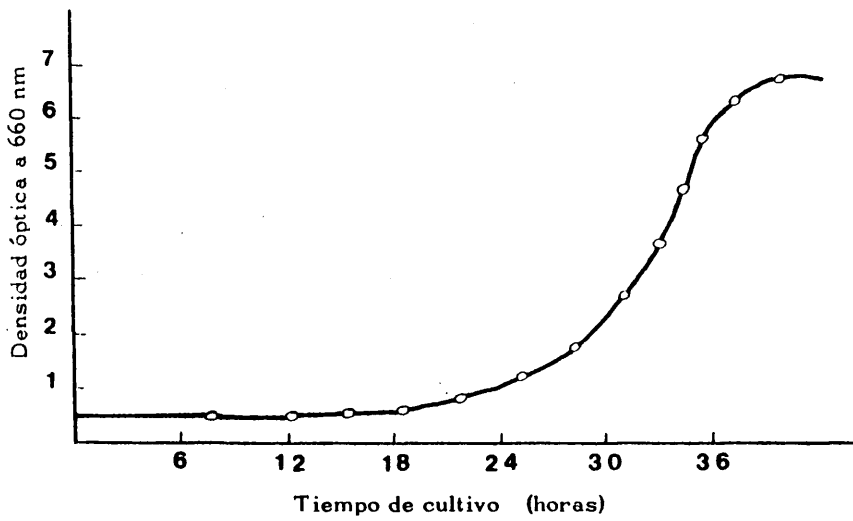
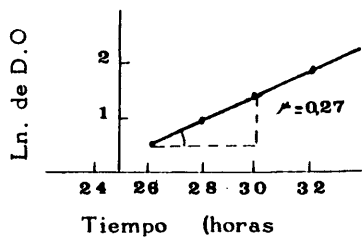
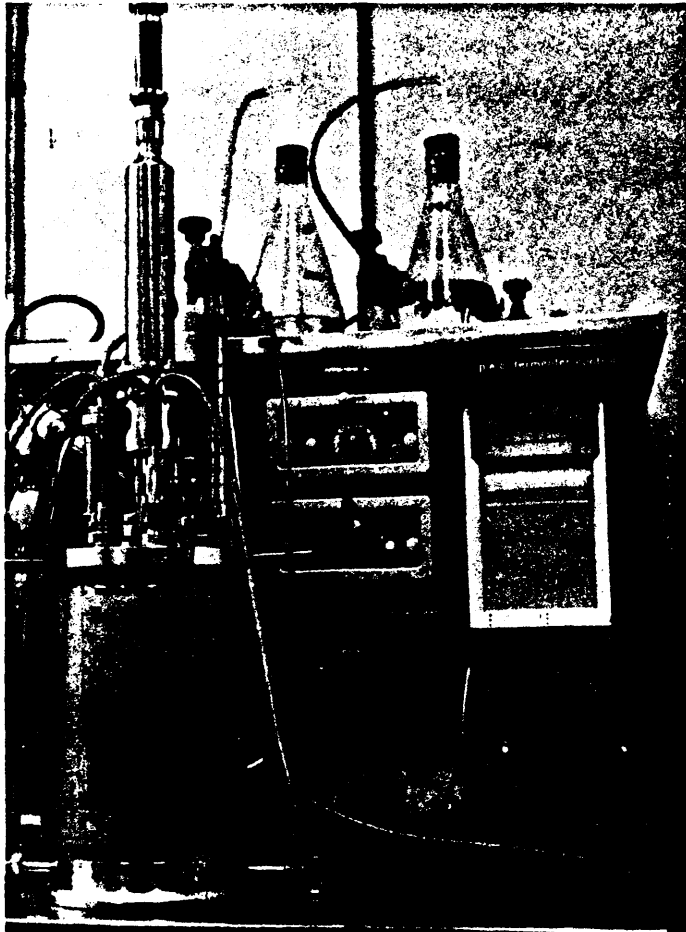


Fig. 11 Desarrollo en fermentador de la cepa 5.073



Fotografía 1.- Cultivo de la cepa 5.073 en fermentador Chemap

Curva de crecimiento con inóculo procedente de un cultivo en fase logarítmica

Este ensayo fué realizado con el fin de intentar reducir la fase de latencia, periodo que en los procesos industriales interesa que sea lo -- más corto posible, ya que en él no hay multiplicación, pués representa el tiempo de adaptación que necesitan las células del inóculo para poder desarrollarse en un determinado medio de cultivo.

Fuó llevado a cabo en las mismas condiciones que el anterior, diferenciándose de éste únicamente en que como inóculo se utilizaron células bacterianas procedentes de la fase logarítmica de un cultivo de la cepa 5.073 en fermentador y en las condiciones de cultivo indicadas en el ensayo precedente.

Observando los resultados representados gráficamente en la fig. 12 puede apreciarse que en este ensayo la fase de latencia tuvo una duración de 6 horas, lo que supone una considerable reducción de la misma respecto al ensayo anterior, en el que como puede verse en el fig. 11, la fase de latencia tuvo una duración de 18 horas. Esto es debido a que las células utilizadas como inóculo, estaban ya adaptadas a vivir en las condiciones de cultivo en que fué realizado el ensayo.

La máxima densidad óptica alcanzada en este ensayo es, como puede verse en la fig. 12, 6.8 que aproximadamente corresponde a 2.5 g/L de materia seca, cifra ligeramente superior a los 2.3 g/L conseguidos



en el ensayo anterior. Esta mejora en la producción de biomasa quizá sea debida a que al ser menor el tiempo de multiplicación, será menor la pérdida de metanol por evaporación. Sin embargo no se ha conseguido mejorar la tasa de crecimiento, que como en el ensayo anterior es 0.27.

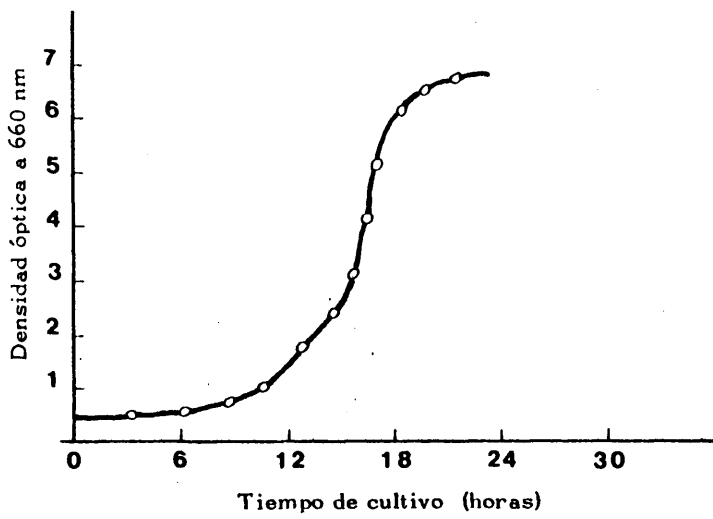
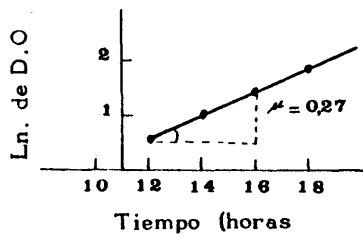


Fig. 12 Desarrollo de la cepa 5.073 utilizando un inóculo procedente de un cultivo en fase logarítmica

Curva de crecimiento sin esterilización previa

Debido a que mediante rigurosos controles microbiológicos realizados en los ensayos anteriores, se pudo comprobar que aparentemente la uniformidad del cultivo se mantenía a lo largo de todo el proceso, aunque se hubieran realizado manipulaciones que pudieran comprometer la pureza del mismo, se pensó en la posibilidad de trabajar en condiciones no estériles, por lo que este ensayo fué realizado en condiciones de estricta limpieza, pero no de esterilidad.

Este ensayo fué llevado a cabo en las mismas condiciones de cultivo que el ensayo anterior, del que se diferencia en que el medio de cultivo no fué esterilizado y el fermentador en vez de ser esterilizado fué simplemente lavado con una solución jabonosa de una sal de amonio cuaternario, y aclarado con abundante agua.

Los resultados obtenidos como puede verse en la fig. 13, son muy similares a los conseguidos en el ensayo anterior, en cuanto a rendimiento y velocidad de desarrollo se refiere, lo que parece indicar que ya no es posible reducir más la fase de latencia. Así mismo mediante un riguroso exámen microscópico a lo largo de todo el proceso y haciendo aislamientos en placa en los casos en que se consideró necesario, se pudo comprobar que aunque se estaba trabajando en condiciones no estériles, el cultivo permanecía libre de gérmenes extraños durante todo el proceso. Aunque a nivel de laboratorio, esto apenas tiene interés por no presentar

la esterilización ningún problema, a escala industrial el poder trabajar en condiciones no estériles, supone un gran ahorro de energía, así como de tiempo y mano de obra, y por consiguiente una reducción del coste del proceso, factor muy importante a tener en cuenta en los procesos industriales.

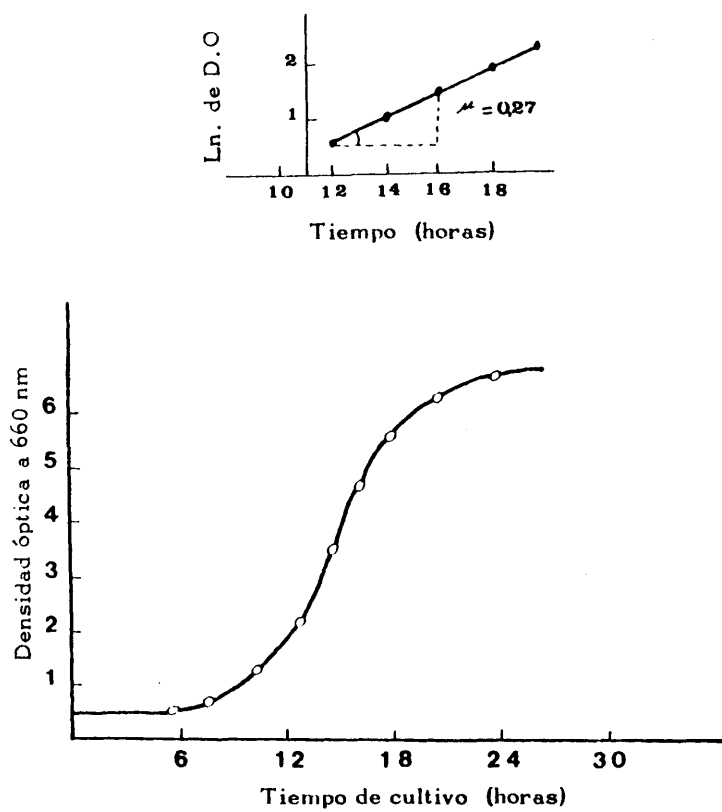


Fig. 13 Desarrollo en fermentador de la cepa 5.073 en condiciones no estériles.

Curva de crecimiento con sucesivas adiciones de metanol.

Debido a que las pérdidas de metanol por evaporación eran bastante considerables en las condiciones de temperatura y agitación en que estábamos trabajando, (30 ° C y 1.500 r.p.m.) y teniendo en cuenta que según Monod (80) el crecimiento de un cultivo es proporcional a la concentración de sustrato, se pensó en la posibilidad de mejorar los rendimientos alcanzados en los ensayos anteriormente realizados, manteniendo la concentración de metanol en el medio de cultivo por encima de un cierto límite mediante sucesivas adiciones de metanol a lo largo del proceso, procediéndose a la realización de este ensayo.

Este ensayo fué llevado a cabo en las mismas condiciones que el ensayo anterior, es decir sin esterilizar el fermentador ni el medio de cultivo, a una temperatura de 30 ° C, ph 6, con una agitación de 1.500 r.p.m y un flujo de aire de 1.8 litros/minuto (0.3 v/v/m). A partir de las 10 horas de cultivo y hasta el final del proceso, cada hora y media fueron adicionados al medio de cultivo 5 ml de metanol, lo que diferencia a este del ensayo anterior.

Los resultados obtenidos están representados en la fig. 14 en donde las flechas indican las adiciones de metanol. Como puede observarse la máxima densidad óptica alcanzada en este ensayo es 10.5 que corresponde a un peso seco de 3.35 g/L cifra muy superior a los 2.5 g/L conseguidos en los ensayos anteriores, lo que demuestra que efectivamente, manteniendo la concentración de metanol por encima de un cierto límite, la

producción de biomasa aumenta considerablemente. Respecto a la cantidad de metanol utilizada el rendimiento conseguido es de 0.36 g. de biomasa por gramo de metanol.

Con el fin de reducir aún más la pérdida de metanol por evaporación y conseguir así un mayor aprovechamiento del mismo, se repitió este ensayo, adicionando el metanol de 2 en 2 ml cada media hora en vez de cada hora y media 5 ml.

Los resultados obtenidos están representados en la fig. 15 en la que las flechas señalan las sucesivas adiciones de metanol. Como puede apreciarse observando los resultados, la máxima densidad óptica alcanzada es 12, que corresponde a 3.7 g/L de materia seca. El rendimiento alcanzado es de 0.39 g. de biomasa por gramo de metanol suministrado, valor muy próximo al del rendimiento teórico anteriormente calculado.

Observando comparativamente los resultados representados en la Tabla VI, puede verse que en el primer caso en el que no ha habido adiciones complementarias de metanol la tasa de crecimiento es 0.27, mientras que cuando se efectúan adiciones complementarias de metanol la tasa de crecimiento es 0.4. Según varios investigadores la tasa máxima de crecimiento de las bacterias que asimilan el metanol por la vía de la ribulosa es más alta (0.4 - 0.6) que la de las que utilizan la vía de la serina (0.2), lo que nos hace pensar que quizá la cepa 5.073 asimile el metanol utilizando la vía de la ribulosa.

También puede apreciarse observando la Tabla VI, que en el

primer caso el rendimiento es mayor, pero sin embargo la producción de masa celular es mucho menor.

Como complemento de todos los ensayos realizados, se efectuaron una serie de determinaciones del contenido en nitrógeno total de la biomasa obtenida, por el método de Kjeldahl, después de haber lavado las células con solución de ClK al 9 por mil, para eliminar los posibles restos de nitrógeno procedentes del medio. Como valor medio de estas determinaciones se encontró que la biomasa obtenida contenía 71.8 % de proteína cruda

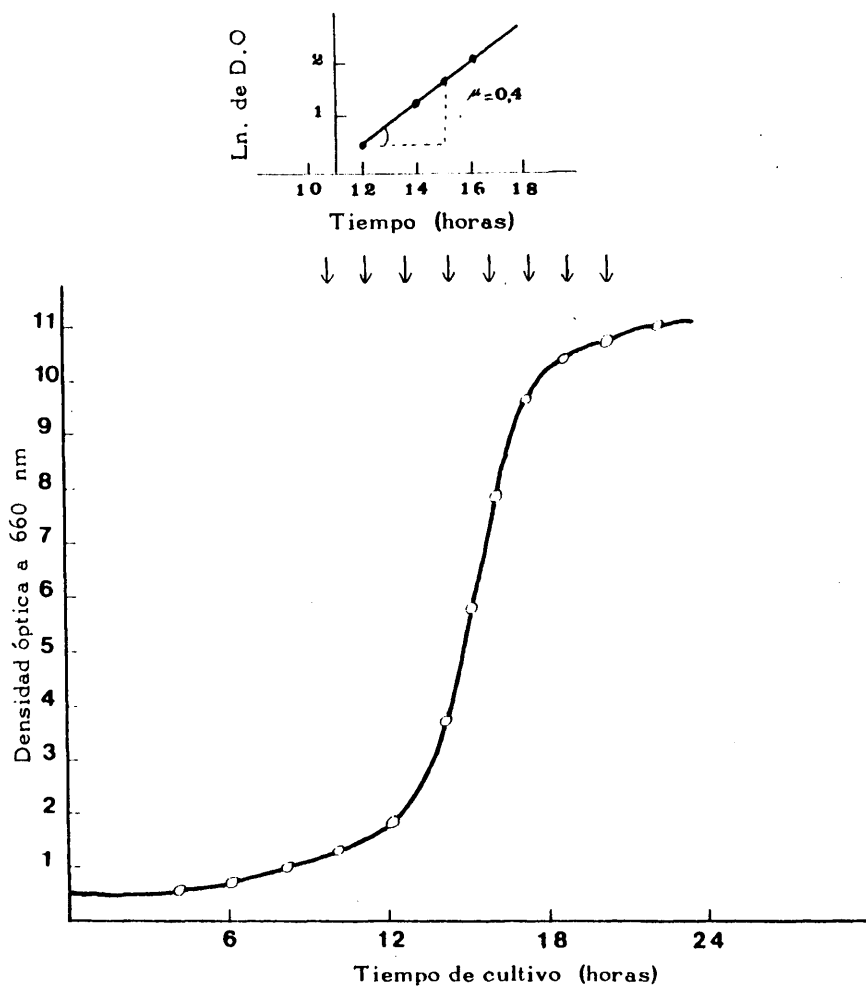


Fig. 14 Desarrollo de la cepa 5.073 adicionando 5 ml. de metanol cada hora y media

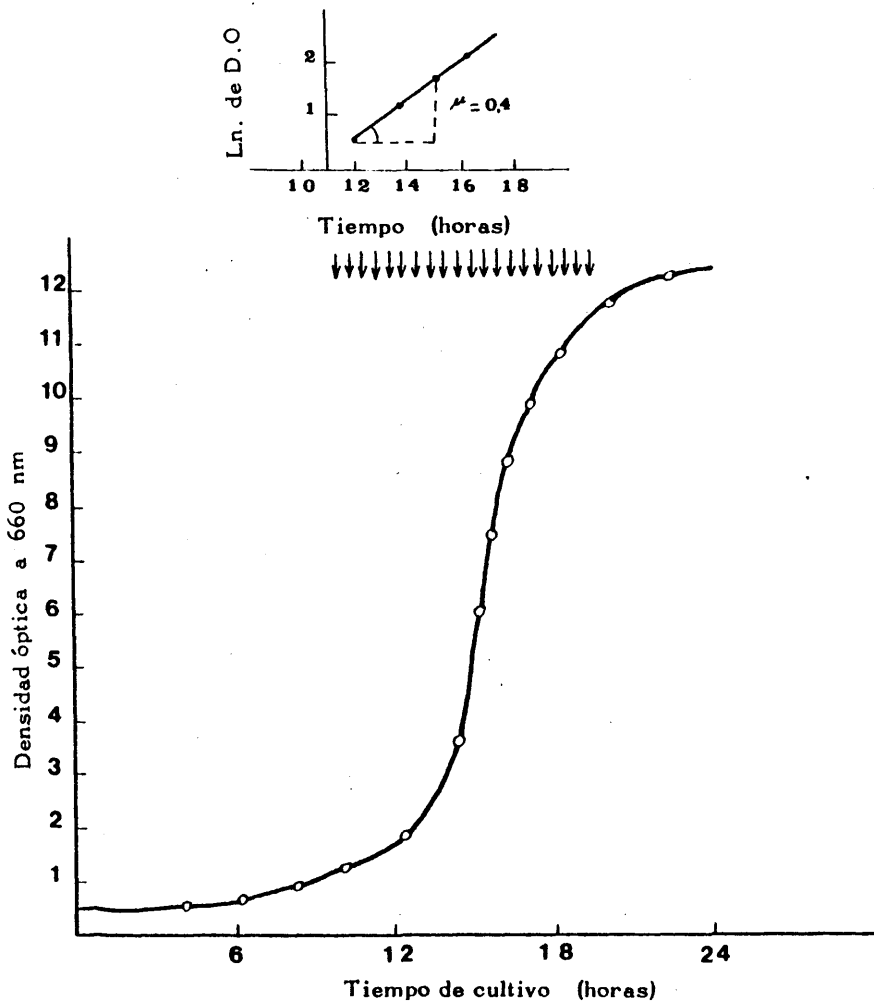


Fig. 15 Desarrollo de la cepa 5.073 adicionando 2 ml. de metanol cada media hora

TABLA VI

Tasas de crecimiento y rendimientos de la cepa 5.073 en medio sintético de sales minerales con diferente concentración de metanol:

| | | | |
|--|------|------|------|
| Concentración inicial de metanol en % | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Total de ml. de metanol adicionados | 0 | 40 | 40 |
| Nº de adiciones | 0 | 8 | 20 |
| Tasa de crecimiento | 0.27 | 0.4 | 0.4 |
| Tiempo de generación en horas | 2.5 | 1.7 | 1.7 |
| Biomasa obtenida g/L | 2.5 | 3.35 | 3.7 |
| g de biomasa / g de metanol suministrado | 0.6 | 0.36 | 0.39 |

CONCLUSIONES

1º) De 40 muestras de suelos de diversa procedencia, se han aislado 103 cepas bacterianas por cultivo de enriquecimiento en el medio a base de sales minerales y metanol utilizado por C. Anthony y L. J. Zatman (5) para el desarrollo de Pseudomonas M-27. Todas las cepas aisladas son de forma bacilar, móviles, Gram negativas, aerobias estrictas y catalasa positivas. Se conservaron en tierra esteril.

2º) De las 103 cepas aisladas : 46 son oxidasa positivas y no fermentan la glucosa, 50 son oxidasa negativas y no fermentan la glucosa, 3 son oxidasa positivas y fermentan la glucosa y 5 son oxidasa negativas y fermentan la glucosa.

De las 46 oxidasa positivas que no fermentan la glucosa, 14, son capaces de producir pigmentos fluorescentes, poseen arginina dihidrolasa y son incapaces de crecer a 41º C, 11 de ellas hidrolizan la gelatina por lo que se asemejan bastante al Pseudomona fluorescens, mientras que las tres restantes por no hidrolizarlas se parecen a Pseudomonas putida. De las 32 restantes, 7 carecen de arginina dihidrolasa, hidrolizan la gelatina y crecen a 41º C por lo que pueden quedar encuadradas en el apartado 2 de la Sección II de la clave de clasificación de Pseudomonas del Bergey's Manual, pareciéndose bastante al Pseudomonas cepacia aunque se diferencian de él entre otras cosas por no formar ningún tipo de pigmento en el medio de King (A y B). 5 son incapaces de crecer a 41º C, no hidrolizan la gelatina y carecen de arginina dihidrolasa por lo que se asemejan a

las especies del género Pseudomonas incluidas en la Sección III de la clave de clasificación del Bergey's manual. 1, es incapaz de hidrolizar la gelatina, no posee arginina dihidrolasa y crece a 41º C por lo que se parece al Pseudomonas stutzeri del que se diferencia en que no forma nunca colonias rugosas. 3, hidrolizan la gelatina, poseen arginina dihidrolasa y crecen a 41º C por lo que se asemejan al Pseudomonas alcaligenes y a los Pseudomonas capaces de hidrolizar la gelatina incluidos en el apartado 1 de la Sección II de la clave del Bergey's manual, y 16 carecen de arginina dihidrolasa, son capaces de hidrolizar la gelatina y crecen a 41º C por lo que se asemejan al Pseudomonas facilis.

Las 50 cepas oxidasa negativas que no fermentan la glucosa, - forman colonias de color rosa, y parecen similares a las bacterias que P. K. Stocks y C.S. Mc Cleskey (112) identificaron como especies del Vibrio extorquens mientras no se encuentre una afilización genérica más adecuada para ellas.

De las 3 cepas oxidasa positivas que fermentan la glucosa, 2 poseen arginina dihidrolasa, hidrolizan la gelatina crecen a 41ºC y producen pigmentos fluorescentes por lo que podrían considerarse semejantes al Pseudomonas fluorescens pero por fermentar la glucosa quizá se asemejen más a las especies del género Aeromonas y la otra por poseer arginina dihidrolasa, hidrolizar la gelatina y no crecer a 41ºC se parece al Pseudomonas facilis del que se diferencia en que fermenta la glucosa.

Las 5 restantes oxidasa negativas que fermentan la glucosa comparten características de Enterobacteriaceas y de Pseudomonas

3º) La cepa 5.073 que es la que presentaba un desarrollo celular más aceptable fué identificada por sus caracteres morfológicos y fisiológicos como perteneciente al género Pseudomonas. Esta cepa posee caracteres tales como carecer de arginina dihidrolasa, no hidrolizar la gelatina, producir denitrificación, crecer a 41º C, ser capaz de crecer en maltosa y almidón, etc... que la asemejan al Pseudomonas stutzeri, pero se diferencia de él por ser capaz de utilizar metanol como fuente de carbono, por no formar las colonias típicas rugosas del Pseudomonas stutzeri y por ser capaz de utilizar arginina como fuente de carbono, característica que la asemeja al Pseudomonas multivorans. De todos los Pseudomonas capaces de crecer en metanol, descritos en la bibliografía al que más se parece es al Pseudomonas A citado por Y. Miura (38) del que se diferencia por producir denitrificación y ser capaz de crecer a pH 5 y 10.

4º) Ninguna de las vitaminas del grupo B parece afectar al desarrollo de esta cepa. De los aminoácidos estudiados ninguno estimula el crecimiento, ejerciendo la metionina una acción inhibidora.

5º) Cultivando esta cepa en fermentador con un medio a base de sales minerales y metanol y adicionando metanol a pequeños intervalos, se consiguió en un periodo de 22 horas un rendimiento de 0.39 g. de biomasa por gramo de metanol suministrado, valor muy próximo a los 0.4 g. de biomasa por gramo de metanol, calculados teóricamente según B.J. Abbot. (1)

6º) Para obtener una tasa de crecimiento de 0.4 ha sido necesario realizar adiciones complementarias de metanol al medio de cultivo.

Las 8 adiciones de 5. ml de metanol ó 20 de 2 ml. en igual -- tiempo, no influyen en la tasa de crecimiento, aunque en este último caso se mejora ligeramente el rendimiento.

7º) Mediante un riguroso exámen microscópico se pudo comprobar que aunque no se esterilicen ni el fermentador ni el medio de cultivo si se trabaja en condiciones de extremada limpieza, el medio de cultivo per manece libre de gérmenes extraños a lo largo de todo el proceso.

8º) La biomasa obtenida contiene 71.8 % de proteína cruda, valor lo suficientemente elevado como para poder considerar a esta cepa co mo potencial productora de proteínas a partir de metanol, ya que antes de cultivar este microorganismo a gran escala con el fin de obtener proteínas será necesario determinar su toxicidad y su valor nutritivo, así como realizar estudios más profundos sobre los requerimientos nutritivos de esta cepa y la ingeniería del proceso, lo que será objeto de trabajos posteriores.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABBOT B.J. The prediction of substrate yield coefficients. *Proces. Biochem.* abril 13 - 15 (1973)
- 2.- AMANO Y. H SAWADA, N. TAKADA y G. TERUI Isolation and characterization of *Methylomonas methanolica* nov. sp. *J. Ferment Technol.* 53 315 - 326 (1975)
- 3.- ANONIMO ICI sanctions microbial protein feedstuffs plant *Chem. Ind. (London)* 20 859-860 (1976)
- 4.- ANONIMO Full scale single cell protein. *Process Biochem.* 12 (I) 30 (1977)
- 5.- ANTHONY C. y L.J. ZATMAN The microbial oxidation of methanol I Isolation and properties of *Pseudomonas* sp. M-27 *Biochem. J.* 92 609 - 614 (1964)
- 6.- ASTHANA H. A.E. HUMPREY y V. MORITZ Growth of yeast on methanol as the sole carbon substrate. *Biotechnol. Bioeng.* 13 (6) 923 - 929 (1971)
- 7.- BARBER R.S., R. BRANDE, K.G. MITCHELL y A.W. MYRES, The value of hydrocarbon grown yeast as a source of protein for growing pigs. *Brit. J. Nutr.* 25 285 - 294 (1971)

- 8.- BARON C.C.A. y G. CLEMENT Nutritional and biochemical quality of Spirulina alga for human consumption IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos sept. (1974)
- 9.- BEWERSDORFF M. y M. DOSTALEK The use of methane for production of bacterial protein. Biotechnol. Bioeng. 13 49 - 62 (1971)
- 10.- BROWN L.R., R.J. STRAWINSKI y C.S. MC-CLESKEY The isolation and characterization of Methanomonas methanoxidans. Can. J. Microbiol. 10 791 - 799 (1964)
- 11.- BUENDIA M., V. ARROYO, B. IÑIGO y J. GARRIDO Producción de alcohol y levadura alimento a partir de extracto de garrofa Rev. C. Aplic. 82 385 - 391 (1961)
- 12.- BURLEW J.S. Algae culture. Publ. nº 600 Carnegie Inst. Washington. Washington D.C. (1953)
- 13.- BUTTIAUX R., H. BEERENS y A. TACQUET Manual de techniques bacteriologiques. Flammarion Medecine Sciences (1974)
- 14.- CASAS-CAMPILLO C., J.L. MORALES, S. LARREA y H. RODRIGUEZ Monilia as a source of single cell protein. X Congreso Internacional de Microbiología. Méjico (1970)
- 15.- CASTRO A., J. SINNICCOY y S.R. TANNENBAUM Reduction of

nucleic acid content in *Candida* yeast cells by bovine pancreatic ribonuclease A treatment J. Appl. Microbiol. 22 422 - 427 (1971)

- 16.- CHAMPAGNAT A. y J. FILOSA Production of yeast U S Patent 3.193390 (1965)
- 17.- CLEMENT G., C. CIDDEY y A. MEUZI Aminoacid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima* J. Sci. Food Agr. 18 497 - 501 (1967)
- 18.- COONEY Y. y R.I. LEVINE Microbial utilization of methanol Advan. Appl. Microbiol. 15 337 - 365 (1972)
- 19.- COOPER P.G., R.S. SILVER y J.P. BAYLE Semi-comercial studies of a petroprotein process based on n-paraffins. In single-cell protein II (S.R. Tannenbaum and D.I.C Wang eds) pag. 454 - 466 M.I.T Press Cambridge Massachusetts (1975)
- 20.- COWAN S.T., J.G. HOLT, J.LISTON, R.G.E. MURRAY, C.F. NIVEN, A.W. RAVIN y R.Y. STANIER. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8ª edición. The Williams and Wilking Co. Baltimore
- 21.- DICKSCHEIT R. y A. JANKE Handbuch der Mikrobiologischen Laboratoriumstechnik. Verlag Theodor Steinkopff Dresden (1967)

- 22.- D'AMELLO J.P.F. The use of methane-utilizing bacteria as a source of protein in young chicks. *Brit. Poultry Sci.* 14 291-301 (1973)
- 23.- DOSTALEK M., L. HAGGSTROM y N. MOLIN Optimization of biomass production from methanol. *Ferment Technol. Today Proc. Int. Ferment. Symp.* 4th 497-501 (1972)
- 24.- DOSTALEK M. y N. MOLIN Studies of biomass production of methanol-oxidizing bacteria. In *Single-cell protein II* (S.R. Tannenbaum and Wang eds) 385-401 M.I.T. Press Cambridge Massachusetts (1975)
- 25.- DOWNS J. y D.E.F. HARRISON Production of pink pigment in *Pseudomonas extorquens* NCIB 9399 growing in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.* 37 65 - 74 (1974)
- 26.- DWORKIN M. y J.W. FOSTER Studies on *Pseudomonas methanica* *J. Bacteriol.* 72 646 - 659 (1956)
- 27.- EROSHIN V.K., J.H. HARWOOD y S.J. PIRT Influence of amino acids, carboxylic acids and sugars on the growth of *Methylococcus capsulatus* on methane *J. Appl. Bacteriol.* 31 560 - 567 (1968)
- 28.- ERTOLA R.J., M.D. LILLY y F.C. WEBB Production of cell tissue from hydrocarbons by a microbiological process, *Biotechnol. Bioeng.* 7 309 - 319 (1965)

- 29.- FERNANDEZ M^aJ., C. LLAGUNO y B. IÑIGO Aprovechamiento de residuos de la destilación vínica y de whisky. Agricultura 393 312 - 316 (1965)
- 30.- FOSTER J.W y R.H. DAVIS A methane-dependent coccus with notes on clasification and nomenclature of obligate methane-utilizing bacteria. J. Bacteriol. 91 1924- 1931 (1966)
- 31.- GARRIDO J., H. BLASCO, M. BUENDIA e I. SAAVEDRA. El alpechin como sustrato en procesos de fermentación. XXVIII Congreso Internacional de Química Industrial 1408 (1955)
- 32.- GARRIDO J., M. BUENDIA y B. IÑIGO Producción de levadura alimentaria a partir de la cáscara de almendra (endocarpio) y concentrado de lejía bisulfítica Ann. Real Sociedad Española de Física y Química 55 B 749- 752 (1959)
- 33.- GARRIDO J., M^aJ. FERNANDEZ, C.VELA, P. GONZALEZ y J.FOUL Protein obtained from syntetic ethanol. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos sept. (1974)
- 34.- GARRIDO J., L.HIDALGO y A. REUS Utilización de prehidrolizados de esparto en la fabricación de levaduras alimenticias. Rev. C. Apl. 21 312 (1951)
- 35.- GARRIDO J.,A. REUS y L. HIDALGO Posibilidad de la utilización de los prehidrolizados de bagazo de caña de azucar en la fabricación de levaduras alimenticias. Rev. C.Apl.22 403-407 (1951)

- 36.- GIACOBBI F., P. PUGLISI y G. LONGBARDI Single cell protein from n-paraffins 169 th Natl. Am. Chem. Soc. Philadelphia nº 74 (1975)
- 37.- GOW J.S., J.D LITTLEHAILES, S.R.L. SMITH y R.B.WALKER SCP production from methanol bacteria. In Single cell protein II (S.R. Tannenbaum and D.I.C. Wang eds) 379-384 M.I.T. Press Cambridge Massachusetts (1975)
- 38.- HAMER G. Volatil organic liquids as carbon substrates for aerobic fermentation. J. Ferment Technol. 46 177 - 187 (1968)
- 39.- HAMER G., D.E.F HARRISON, J.H. HARWOOD y H.H. TOPIWALA SCP production from methane. In Single cell protein II (S.R. Tannenbaum and D.I.C. Wang eds) 357-369 M.I.T. Press Cambridge Massachusetts (1975)
- 40.- HAMER G., C.G. HEDEN y C.D. CAREMBERG Methane as a carbon substrate for the production of microbial cells. Biotechnol. Bioeng. 2 495 - 514 (1967)
- 41.- HARDER W., M. MATTWOOD y J.R. QUAYLE Methanol assimilation by Hyphomicrobium species. J. Gen Microbiol. 78 (Pt I) 155 - 163 (1973)
- 42.- HARRISON D.E. F. Studies on the affinity of methanol and methane utilizing bacteria for carbon substrate. J. Appl. Bact. 36 301-313 (1973)

- 43.- HARRISON D.E.F. Making protein from methane. Chem. Tech. 6
570 - 574 (1976)
- 44.- HARRISON D.E.F. y R.B. FOLTZ Affinity of methanol and methane-utilizing bacteria for their carbon substrates J. Appl. Bacteriol. 36 (2) 301 - 308 (1973)
- 45.- HARRISON D.E.F., H.H. TOPIWALA y G. HAMER Yield and productivity in single cell-protein production from methane and methanol Ferment Technol. Today Proc. Int. Ferment Symp. 4th
491 - 495 (1972)
- 46.- HARWOOD J.H. y S.J. PIRT Quantitative aspects of growth of the methane-oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* on methane in shake flask and continuous chemostat culture. J. Appl. Bacteriol. 35 597 - 607 (1972)
- 47.- HEDENSKOG G. y H. MGRÉN Some methods for processing of single cell protein biotechnol. Bioeng. 15 129 - 142 (1973)
- 48.- HITZMAN D.O. y E.H. WAGNER Protein preparation by microbial fermentation Ger. Offen 2.554.118 (Cl. C12D13/06) 10 jun. (1976)
- 49.- HUGH R. y E. LEIFSON The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bact. 66 24 - 26 (1953)

50. JORGENSEN A. y A. HANSEN Microbiología de las fermentaciones. Acribia Zaragoza (1959)
51. KAMAZAWA M. The production of yeast from n-paraffins. In Single cell protein II (S.R. Tannenbaum and D.I.C. Wang eds) 438 - 453 M.I.T. Press Cambridge Massachusetts (1975)
52. KANEDA T. y J.M. ROXBURGH A methanol utilizing bacterium I Description and nutritional requirements. Can. J. Microbiol. 8 87 - 98 (1959)
53. KATO N. K. TSUJI, Y. TANI y K. OGATA A methanol-utilizing actinomycete J. Ferment Technol. 52 (12) 917 - 920 (1974)
54. KIHLEBERG R. The microbe as a source of food Ann. Rev. Microbiol. 26 427 - 466 (1972)
55. KING E. O., W.K. WARD y D. E. RANEY Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein J. Lab. Clin. Med. 44 301 0 307 (1954)
56. KO P.C., y Y. YU Production of SCP from hydrocarbons. In Single cell protein (R. I. Mateles and S. R. Tannenbaum eds) 1st ed. 255-262 M.I.T. Press Cambridge Massachusetts (1968)
57. KOMO K., M. YAMAMOTO, T. KOBAYASHI, R. OKAMOTO y A. TAKAMATSU Yeast cells, Japan Kokai 76 128482 (Cl C12 C11/08) 9 nov. (1976)

- 58.-KOSARIC N. y J.E. ZAJIC Microbial oxidation of methane and methanol
Adv. Biochem. Eng. 3 89 - 125 (1974)
- 59.-KOVACS,N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction
Nature (London) 178 703 (1956)
- 60.-LAINE B.M. y J. du CHAFFAUT Gas-oil as a substrate for single cell
protein production In Single cell protein II (R.S. Tannenbaum
and D.I.C Wangs eds) 424 - 437 M.I.T. Press Cambridge
Massachusetts (1975)
- 61.-LASKIN A. I. Ethanol as a substrate for SCP Chem. Congr. North. Am.
Continent México City Ist. Paper BMPC 39 (1975)
- 62.-LEADBETTER E. y J.W. FOSTER Studies on some methane-utilizing bac-
teria Arch. Mikrobiol. 30 91 - 118 (1958)
- 63.-LEVINE D. W. y C.L. COONEY Isolation and characterization of a ther-
motolerant methanol utilizing yeast Appl. Microbiol. 26 (6)
982 - 990 (1973)
- 64.-LINTON J.D. y J. VOKES Growth of the methane utilizing bacterium
Methylococcus NCIB 11083 in mineral salts medium with metha-
nol as the sole source of carbon. FEMS Microbiol. Lett 4 (3)
125 - 128 (1978)
- 65.-LIPINSKI E.S., J.H. LITCHFIELD Algae bacteria and yeast as food or
feed C.R.C. Crit. Rev. Food Technol. 1 581 (1970)

- 66.- LIMPINSKI E. S. y J.H. LITCHFIELD Single cell protein in perspective. Food Technol. 28 (5) 16 - 22 (1974)
- 67.- LITCHFIELD J. H. Single cell proteins. Food Technol. 31 (5) 175-179 (1977)
- 68.- LITCHFIELD J. H. Facts about food from unconventional sources. Chem. Process (London) 20 (9) 11 - 18 (1974)
- 69.- LLAGUNO C. Aspectos bioquímicos de la producción de ac, fumárico por fermentación. Rev. C. Aplic. 76 385 (1960)
- 70.- MAC-LENNAN D.G., J. S. GOW y D. A. STRINGER Methanol-bacterium process for SCP (Single cell protein). Process Biochem. 8 (6) 22 - 24 (1973)
- 71.- MARCILLA J., E. FEDUCHY, L. HIDALGO y J. GARRIDO Condiciones optimas de proliferación de la *Torulopsis utilis* var. magna de Thaysen sobre prehidrolizados de carozos de maiz (mazorcas desgranadas) Microbiología española 3 181 - 186 (1950)
- 72.- MC-KENNA y R. E. KALLIO The biology of hydrocarbon Ann. Rev. Microbiol. 19 183 - 208 (1965)
- 73.- MILLER T. L. y M.J. JOHNSON Utilization of gas oil by a yeast culture. Biotechnol. Bioeng. 8 567 - 580 (1966)
- 74.- MINAMI K., M. YAMAMURA, S. SHIMIZU, K. OGAWA y N. SEKINE

A new methanol-assimilating high-productive thermophilic yeast
J. Ferment. Technol. 56 (1) 1 - 7 (1978)

- 75.- MISHRA S.K y K.A. PRABIN. Oxidation of methanol by methyloco--
ccus M2 Isolation and properties of the organism. J. Ferment.
Technol. 57 (1) 1 - 7 (1979)
- 76.- MITSUDA H., B. TONOMURA y K. YAMAMOTO Symposium on new
sources of proteins. 3rd Int. Congress of Food Science and
Technology Washington D. C (1970)
- 77.- MIURA Y., M. OKAZAKI, S. KOMENUSHI, N. SAKATA, S. JOZA y
S. OBANA Microbial cells, Jpn Kokai Tokkyo Koho 79.20190 (C1
C12k3/00) 15 Feb. (1979)
- 78.- MIURA Y., M. OKAZAKI, S. KOMENUSHI, T. SAKATA, S. SHIROZA
y S. OBANA Production of single cell protein from methanol by a bac-
terium. J. Ferment. Technol. 57 (2) 124- 129 (1979)
- 79.- MOLLER V. Simplified tests for some amino acid. decarboxylases and
for the arginine dihydrolase system Acta Path. Microbiol. Scand.
36 158 - 172 (1955)
- 80.- MONOD J. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes.
Hernan et Cie. Paris (1942)
- 81.- MOYSE A. Les cultures d'algues. La Nature 3228 41 (1955)

- 82.- NEWELL J. A., E.A. ROBBINS, y R. D. SEELEY Manufacture of yeast protein isolate having a reduced nucleic acid content by an alkali U.S. Patent 3.867.555 (1975)
- 83.- OGATA, H., K. NISHIKAWA, M. OHSUGI y T. TOCHIKARA Production of yeast II Cultural conditions methanol assimilating yeast *Kloeckera* species nº 2201 *Hakko Kogaku Zasshi* 48 (8) 470 - 477 (1970)
- 84.- OHTA S., S. MAUL, A.J. SINSKEY y S.R. TANNENBAUM Characterization of a heat shock process for reduction of the nucleic acid content of *Candida utilis* *Appl. Microbiol.* 22 415 - 421 (1971)
- 85.- OSER B.L. The safety and acceptability of microbially produced food. Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Sept. (1974)
- 86.- OSWALD W.J y C.G. GOLUEKE Large-scale production of algae In Single cell protein (R. I Mateles and S. R. Tannenbaum eds) 271- 305 M.I.T. Press Cambridge Massachusetts (1968)
- 87.- PATEL R.N. y D.S. HOARE Physiological studies of methane and methanol oxidizing bacteria. Oxidation of C-1 compounds by *Methylococcus capsulatus*. *J. Bact.* 107 (1) 187 - 192 (1971)
- 88.- PEEL D. y J. R. QUAYLE Microbial growth on C₁ compounds I *Isq*

lation and characterization of *Pseudomonas* AM1 Biochemical
J. 81 465 - 469 (1961)

- 89.- PHILIPS PETROLEUM COMPANY Procedimiento de obtención de pro-
teína unicelular mediante fermentación microbiana de un alcohol
U.S.A. patente C12D 530.422 (1974)
- 90.- PRAEVE P. y D. SUKATSCH Fermentative production of protein Ger
Offen 2.440.948 (Cl C12D) II Mar (1976)
- 91.- QUAYLE J. R. The Metabolism of one-carbon compounds by microor-
ganisms *Advanc. Microbiol. Physiol.* 7 119 - 203 (1972)
- 92.- REUSS M., J. SNIESER, H.G. RENG, F. WAGNER Extended cul-
ture of *Candida boidinii* on methanol *Europ. J. Appl. Microbiol.*
1 (4) 295 (1975)
- 93.- RIBBONS D.W, J.E. HARRISON y A.M. WADZINSKI Metabolism of
single carbon compounds. *Annu Rev. Microbiol.* 24 135 -158
(1970)
- 94.- ROBINSON R.K. The potential value of algae as a food suplement IV
Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos,
Sept. (1974)
- 95.- SAHM H. y F. WAGNER Mikrobielle Verwestung von Methanol Isolie-
rung und Charakterisierung der Hefe *Candida boidinii* *Arch. Mi-
krobiol.* 84 29 - 42 (1972)

- 96.- SAHM H. y F. WAGNER Isolation and characterization of an obligate methanol-utilizing bacterium *Methylomonas* M-15 *Europ. J. Appl. Microbiol.* 2 147 - 158 (1975)
- 97.- SCHNABEL I. y J. GARRIDO Producción de levaduras sobre lejías bisulfíticas de *Eucalyptus globulus* y prehidrolizados de cáscara de almendra I Consideraciones generales. *Rev. Cien. Appl.* 96 11 - 12 (1964)
- 98.- SCHNABEL I. y J. GARRIDO Producción de levadura sobre lejías bisulfíticas de *Eucalyptus globulus* y prehidrolizados de cáscara de almendras VI multiplicación de *Candida utilis* 1255 y de *Hansenula anomala* 925 sobre prehidrolizados de cáscara de almendra *Rev. Cien. Appl.* 101 498 - 513 (1964)
- 99.- SCHNABEL I. y J. GARRIDO Producción de levadura sobre lejías bisulfíticas de *Eucalyptus globulus* y prehidrolizados de cáscara de almendra V variaciones de las condiciones de multiplicación de *Hansenula anomala* 925 sobre lejías. *Rev. Cien. Appl.* 100 430 - 439 (1964)
- 100.- SCHNABEL I. y J. GARRIDO Multiplicación de levaduras sobre prehidrolizados de madera de olivo I Multiplicación de *Hansenula anomala* *Rev. Cien. Appl.* 103 97 - 104 (1965)
- 101.- SCHNABEL I. y J. GARRIDO Multiplicación de levaduras sobre prehidrolizados de madera de olivo III Secuencia de la utilización

de glucosa y xilosa de sustrato en la multiplicación continua de *Hansenula anomala* 925 Rev. Cien. Appl. 105 316 - 323 (1965)

- 102.- SCHNABEL I. y J. GARRIDO Multiplicación de levaduras sobre prehidrolizados de madera de olivo IV Influencia del pH del medio sobre la acción inhibitoria del metanol, formaldehído, ácido fórmico, butírico y furfural. Rev. Cien. Appl. 113 522 - 533 (1966)
- 103.- SCHNABEL I. y J. GARRIDO Multiplicación de levaduras sobre prehidrolizados de madera de olivo V Fermentación continua en dos fases con flujo único Rev. Cien. Appl. 114 24 - 28 (1967)
- 104.- SCHULZ E. y H.J. OALAGE Composition and nutritive value of single cell protein (SCP) Anim. Feed Sci. Technol. 1 (1) 9 - 24 (1976)
- 105.- SHACKLADY C.A. y E. GATUMEL Single cell proteins from hydrocarbons In Proteins from Hydrocarbons (H. Gonuelle de Pontanel ed.) 27 - 52 Academic Press New York (1973)
- 106.- SHANNON D.W.F y J.M. MC-NAB The effect of different dietary levels of an n-paraffin grown yeast on the growth and feed intake of broiler chicks, Brit. Poultry Sci 13 267 - 272 (1972)
- 107.- SINSKEY A.J. y S.R. TANNENBAUM Removal of nucleic acids in SCP In Single cell protein II (S.R. Tannenbaum and D.I.C. Wang eds) 158 -178 M.I.T. Press Cambridge Massachusetts (1975)

- 108.- SHEERAN B.T. y M.J. JOHNSON Production of bacterial cells --
from methane: *Appl. Microbiol.* 21 511 - 515 (1971)
- 109.- SKERMAN V.B.D. A guide to the identification of the genera of bac-
teria. The Williams & Wilkins Company Baltimore 2ª edi-
ción (1967)
- 110.- SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS Manual of microbio-
logical methods Mc Graw Hill Book Co. Inc. New York (1957)
- 111.- STANIER R.Y., N.J. PALLERONI y M. DOUDOROFF The aerobic
Pseudomonads, a taxonomic study *J. Gen. Microbiol.* 43 (2)
159- 271 (1966)
- 112.- STOCKS P.K. y C.S. MC-CLESKEY Identity of the pink pigmen-
ted methanol-oxidizing bacteria as *Vibrio extorquens* *J. Bact.*
88 1065 - 1070 (1964)
- 113.- TAKEMOTO H., y T. IGARACHI Cultivation of microbial cells Japan
Kokai Tokyo Koho 79 32689 (CI C12K3/00) 10 Mar (1979)
- 114.- TERUI G., N.TAKEDA y H. SAWADA Methanol-assimilating pro-
pagation of microbial cells U.S. 3.755.082 (CI 195/49 C12b)
28 Aug. (1973)
- 115.- THORNLEY M.J. The differentiation of *Pseudomonas* from other
Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism *J.*
Appl. Bact. 23 37 - 52 (1960)

- 116.- THORSTENDOTTER L.K. Proteins from methanol Ger Offen 2.331.006 (Cl C12d) 13 sept. (1973)
- 117.- URENO K., Y. ASAI, M. SHINNADA y S. GOTO n-Paraffin assimilating yeasts grown at 37° C. J. Ferment Technol. 52 861-866 (1974)
- 118.- URENO K., Y ASAI, M.SHINNADA y T. KANNETANI Cell production from n-paraffin by Candida kofuensis MT-Y-8 at 37° and ph 3.5 J. Ferment Technol. 52 867 - 872 (1974)
- 119.- URENO K., Y. ASAI, H. YONEMARA, y T. KANNETANI, Relation between kinds of n-paraffins and assimilation by yeasts J. Ferment Technol. 52 873 - 877 (1974)
- 120.- VAN WERDEN E.J., C.A. SHACKLADY y P. VAN DER VAL Hydrocarbon grown yeast in rations for chicks Brit. Poultry Sci. 11 189 - 195 (1970)
- 121.- VARY P.S y M.J. JOHNSON Cell Yields of bacteria grown on methane Appl. Microbiol. 15 1473 - 1478 (1967)
- 122.- VELA C. Multiplicación de levaduras sobre etanol de síntesis para la obtención de proteínas. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Universidad Complutense de Madrid (1976)
- 123.- VINCENT W.A. Algae for food and feed Process Biochem. 4 (6) 45 - 47 (1969)

- 124.- VOLESKY B y J.E. ZAJIC Batch production of protein from ethane and methane mixtures Appl. Microbiol. 21 614 - 622 (1971)
- 125.- WALDROUP P.W., C.M. HILLARD y R. J. MITCHELL The nutritive value of yeast grown on hydrocarbon fractions for broiler chicks Poultry Sci. 50 1022 - 1029 (1971)
- 126.- WAGNER E., T. KLEEMAN y W. ZAHN Microbial transformations of Hydrocarbons II Growth constants and cell composition of microbial cells derived from n-alkanes Biotechnol. Bioeng, 11 393 - 408 (1969)
- 127.- WALDROUP P.W. y J. R. PAYNE Feeding value of methanol-derived single-cell protein for broiler chicks Poult. Sci. 53 (3) 1039 - 1042 (1974)
- 128.- WHITTEMBURY R., K.C. PHILLIPS y J.F. WILKINSON Enrichment isolation and some properties of methane utilizing bacteria J. Gen. Microbiol. 61 205 - 218 (1970)
- 129.- WILKINSON T.G. y C. HAMER Some growth characteristics of a *Hyphomicrobium* sp. in batch culture J. Appl. Bact. 35 577 - 588 (1972)
- 130.- WILKINSON T. G., D.E.F. HARRISON y R.B. FOLTZ Affinity for methane and methanol of mixed cultures grown on methane in continous culture J. Appl. Bact. 36 (2) 309 - 313 (1973)

- 131.- WILKINSON T.G., H.H. TOPIWALA y G. HAMER Interactions in a mixed bacterial population growing on methane in continous culture *Biotechnol. Bioeng.* 16 41 - 59 (1974)
- 132.- YAMADA S., K. NABE, M. WADA e I. CHIBATA Isolation and characterization of a methanol-utilizing bacterium *Pseudomonas putida* Strain 981 *J. Ferment. Technol.* 55 (5) 436 - 443 (1977)
- 133.- YAMADA K., J. TAKAHASHI, O.T.KAWABATA y T. ONTHASA. SCP from yeast and bacteria grown on hydrocarbons. In *Single cell protein* (R. I Mateles y S.R. Tannenbaum eds.) 192-207 M.I.T. Press Cambridge Mass. (1968)
- 134.- YAMANOUCHI K. L-Valine, Japan Kokai 74 12.719 (Cl C12 b) 26 Mar. (1974)
- 135.- YOKOTE Y., M. SUGIMOTO y S. ABES Yeasts utilizing methanol as a sole carbon source *J. Ferment. Technol.* 52 201 - 209 (1974)
- 136.- YOSHIKAWA A. Microbial cells Japan Kokai 75 71.888 (Cl C12 b) 14. Jun. (1975)
- 137.- YOSHIKAWA J. T. KATSURA, Y. FUKITA, H. WADA y Y.TAMIGAWA Proteins by methanol fermentation. Ger offen 2.402.217 (Cl C12 d) 25 Jul. (1974)

- 138.- ZAJIC J. E. y B. VOLESKY Continuous production of fungal protein from gaseous hydrocarbons X Congreso Internacional de Microbiología, Méjico (1970)

