

R. 6614

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 138 número 23 del libro
correspondiente.

Sevilla, **02 MAYO 1989**

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

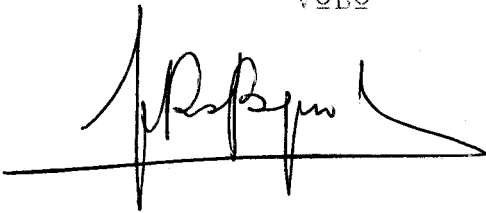
El Jefe del Negociado de Tesis,

Alicia Lafitte

"ESTUDIO DEL POLISACARIDO EXTRACELULAR DE RHIZOBIUM
LEGUMINOSARUM VAR. TRIFOLII RS1051 Y RHIZOBIUM
LEGUMINOSARUM VAR. PHASEOLI CFN42 Y CIAT899"

Memoria realizada en el Departamento de Microbiología
y Parasitología de la Universidad de Sevilla y que
presenta en la Facultad de Farmacia la Licenciada MARIA
DEL CARMEN MEJIAS RISOTO para optar al grado de Doctor.

VOBO



Prof. Dr. F. Ruíz-Berraquero

Director



Prof. Dr. M. Megías

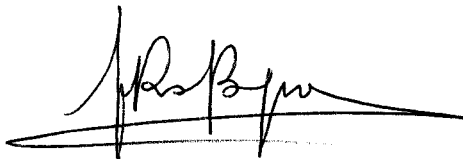


Sevilla, Abril de 1989

FRANCISCO RUIZ-BERRAQUERO, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

INFORMA: que de acuerdo con la normativa de Tesis Doctoral vigente (Real Decreto 185/1985, de 23 de Enero) da su conformidad para la presentación de la Tesis Doctoral Titulada "ESTUDIO DEL POLISACARIDO EXTRACELULAR DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM VAR. TRIFOLII RS1051 Y RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM VAR. PHASEOLI CFN42 Y CIAT899" realizada en este Departamento por la Licenciada MARIA DEL CARMEN MEJIAS RISOTO bajo la dirección del DR. MANUEL MEGIAS GUIJO.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla a veintiocho de Abril de mil novecientos ochenta y nueve.




Fdo. Francisco Ruíz-Berraquero
Director del Departamento

ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISION DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

MANUEL MEGIAS GUIJO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

INFORMA: que de acuerdo con la normativa de Tesis Doctoral vigente (Real Decreto 185/1985, de 23 de Enero), doy mi autorización para la presentación de la Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DEL POLISACARIDO EXTRACELULAR DE RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM VAR. TRIFOLII RS1051 Y RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM VAR. PHASEOLI CFN42 Y CIAT899" realizada en este Departamento por la Licenciada MARIA DEL CARMEN MEJIAS RISOTO bajo mi dirección.

Y para que así conste, expido y firmo la presente certificación en Sevilla a veintiocho de Abril de mil novecientos ochenta y nueve.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Megías Guijo', enclosed within a large, loopy circular scribble.

Fdo.: Manuel Megías Guijo.

ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISION DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

Mi agradecimiento a todos los que han colaborado conmigo en la realización de esta Tesis:

 Al Dr. D. Francisco Ruíz Berraquero por aceptarme en el Departamento y poner a mi alcance los medios necesarios para la realización del presente trabajo.

 Al Dr. D. Manuel Megías Guijo porque le debo la oportunidad que he tenido de colaborar en la labor investigadora del Departamento y mi formación científica. Le agradezco el haber asumido la dirección de esta Tesis, a veces en condiciones poco favorables.

 Al Dr. D. Miguel Angel Caviedes por instruirme en el trabajo con polisacáridos microbianos, por sus consejos y por su colaboración en el estudio de la composición de los polisacáridos.

 Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona por haberme permitido utilizar sus instalaciones para realizar gran parte de los experimentos que se presentan en este trabajo.

 Al Dr. D. Francisco Congregado por su gran ayuda y consejos.

 A Juan Miguel Alsina por su constante ayuda y porque gracias a su colaboración e interés se ha podido llevar a cabo el estudio reológico de los polisacáridos.

 Al DR. D. Agustín García por poner a mi alcance los reactivos analíticos necesarios.

Al Dr. D. Alfredo Maestre por su interés para iniciarme en los conocimientos de reología.

Al Dr. D. Antonio Gil por su ayuda en el estudio de la composición de los polisacáridos.

Al Departamento de Dinámica de Fluídos de la E.S.I.I. de la Universidad de Barcelona por poner a mi alcance el viscosímetro en el que se ha llevado a cabo el estudio reológico de los polisacáridos.

A María Josefa Antón por su ayuda en la realización de gran parte de los cálculos por ordenador.

A Manuel Mejías Risoto por su colaboración en la parte informática para la realización de esta Memoria.

A todos los miembros del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla y del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona por su ayuda y amistad en todo momento.

A Juan Carlos y a mis padres.

INDICE

	<u>Pag.</u>
INTRODUCCION.....	1
I. Polisacáridos.....	2
I.1. Generalidades.....	2
I.2. Composición.....	3
I.2.1. Polímeros del género <u>Rhizobium</u>	6
I.3. Biosíntesis.....	9
I.4. Producción.....	11
I.5. Aplicaciones.....	13
II. Taxonomía del género <u>Rhizobium</u>	22
II.1. Género <u>Rhizobium</u>	23
II.2. Interacción <u>Rhizobium</u> -planta. Papel del polisacárido en dicha interacción.....	24
OBJETO DEL TRABAJO.....	29
MATERIALES.....	32
I. Microorganismos.....	33
II. Metales pesados.....	33
III. Medios de cultivo.....	33
III.1. Medio TY.....	33
III.2. Medio LB.....	35
III.3. Medio 79 de Allen.....	36
IV. Tampones.....	36
IV.1. Tampón fosfato.....	36
IV.2. Solución tampón de hidrogenoftalato potá- sico.....	37
V. Fuentes de carbono y nitrógeno.....	37
V.1. Fuentes de carbono.....	37
V.2. Fuentes de nitrógeno.....	38
VI. Soluciones reactivas.....	38
VI.1. Reactivos para el reconocimiento de meta- les.....	38
VI.1.1. Reactivo del cincón.....	38
VI.1.2. Solución de difenil-carbazida.....	39
VI.1.3. Acido sulfúrico para reconocimiento	

	<u>Pag.</u>
de cromo.....	39
VI.1.4. Solución de ditizona.....	39
VI.1.5. Agua amoniaca.....	40
VI.1.6. Acido acético para reconocimiento de mercurio.....	40
VI.1.7. Solución de dietil-ditiocarbamato sódico.....	40
VI.1.8. Solución de citrato sódico para reconocimiento de plomo.....	40
VI.1.9. Solución de cianuro potásico para reconocimiento de plomo.....	40
VI.1.10. Solución de sulfato de cobre para reconocimiento de plomo.....	41
VI.1.11. Solución de tartrato sódico y po- tasico para reconocimiento de cad- mio.....	41
VI.1.12. Solución de hidróxido sódico para reconocimiento de cadmio.....	41
VI.1.13. Solución alcalina lavadora para reconocimiento de cadmio.....	41
VI.1.14. Solución de citrato amónico para reconocimiento de cobre.....	42
VI.2. Reactivo para reconocimiento de azúcares totales.....	42
VI.2.1. Reactivo de la antrona.....	42
METODOS.....	43
I. Cultivo bacteriano en medio líquido.....	44
II. Estudio del polisacárido extracelular.....	44
II.1. Producción.....	44
II.2. Extracción.....	45
II.3. Purificación.....	45
II.3.1. Purificación del gel.....	45
II.3.2. Montaje de la columna.....	46
II.3.3. Aplicación de la muestra.....	46

	<u>Pag.</u>
II.3.4. Reacción de la antrona.....	47
II.4. Análisis.....	48
II.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución.....	48
II.5. Medida del pH.....	48
II.6. Estudio reológico.....	49
II.6.1. Obtención de los reogramas.....	49
II.6.2. Cálculo de la viscosidad a partir de los reogramas.....	50
III. Estudio de la retención de iones metálicos por polisacáridos.....	51
III.1. Preparación del gel.....	51
III.2. Reacciones de identificación de iones metálicos.....	53
III.2.1. Cadmio. Reacción con ditizona....	53
III.2.2. Cinc. Reacción con cincón.....	54
III.2.3. Cobre. Reacción con sodio dietil ditiocarbamato.....	54
III.2.4. Cromo. Reacción con difenilcarba zida.....	54
III.2.5. Mercurio. Reacción con ditizona..	55
III.2.6. Plomo. Reacción con sodio dietil ditiocarbamato sódico.....	55
III.3. Cálculo de la concentración de metal.....	56
RESULTADOS.....	57
I. Producción de exopolisacárido por <u>Rhizobium legumi-</u> <u>nosarum</u> var. <u>trifoloi</u> RS1051 y var. <u>phaseoli</u> CFN42 y CIAT899 en diferentes condiciones de cultivo.....	58
I.1. Producción de exopolisacárido a diferentes temperaturas de incubación.....	58
I.2. Producción de exopolisacárido en diferentes condiciones de oxigenación.....	60
I.3. Producción de exopolisacárido a diferentes tiempos de incubación.....	65

	<u>Pag.</u>
I.4. Producción de exopolisacárido a partir de diferentes fuentes de carbono.....	68
I.5. Producción de exopolisacárido en presencia de distintas fuentes de nitrógeno.....	70
I.6. Producción de exopolisacárido en presencia de metales pesados.....	72
II. Estudio del pH de los polisacáridos.....	73
III. Estudio de la composición de los exopolisacáridos	73
IV. Estudio reológico de los exopolisacáridos.....	83
IV.1. Obtención de los reogramas.....	83
IV.2. Cálculo de la viscosidad de los exopolisacáridos.....	84
IV.2.1. Estudio de la influencia de la concentración sobre la viscosidad de las soluciones de los exopolisacáridos.....	88
IV.2.2. Estudio de la influencia de la temperatura sobre la viscosidad de las soluciones de los exopolisacáridos.....	93
IV.2.3. Estudio de la influencia del pH sobre la viscosidad de las soluciones de los exopolisacáridos...	95
IV.2.4. Estudio de la influencia del número de pases sobre la viscosidad de las soluciones de los polisacáridos extracelulares.....	97
IV.3. Estudio tixotrópico de las soluciones de los exopolisacáridos.....	97
IV.4. Medida del carácter pseudoplástico del exopolisacárido.....	101
IV.5. Cálculo de la tensión inicial.....	103
V. Estudio de la retención de metales pesados por el polisacárido extracelular de <u>Rhizobium</u>	103

	<u>Pag.</u>
DISCUSION.....	118
I. Producción de polisacárido extracelular.....	119
I.1. Influencia de la temperatura sobre la producción de exopolisacárido.....	121
I.2. Influencia de la oxigenación en la producción de exopolisacárido.....	123
I.3. Influencia del tiempo de incubación sobre la producción de exopolisacárido.....	125
I.4. Influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de exopolisacárido.....	126
I.5. Influencia de los metales sobre la producción de exopolisacárido.....	129
II. Composición de los exopolisacáridos.....	130
II.1. Influencia de las condiciones de cultivo de las cepas sobre la composición del exopolisacárido.....	133
III. Estudio reológico del exopolisacárido.....	136
III.1. Influencia de la concentración sobre la viscosidad de los exopolisacáridos.....	139
III.2. Influencia de la temperatura sobre la viscosidad de los exopolisacáridos.....	141
III.3. Influencia del pH sobre la viscosidad de los exopolisacáridos.....	142
III.4. Influencia de deformaciones sucesivas sobre la viscosidad de los exopolisacáridos.....	143
III.5. Estudio tixotrópico de los exopolisacáridos.....	144
IV. Estudio de la retención de metales por el exopolisacárido.....	145
CONCLUSIONES.....	148
BIBLIOGRAFIA.....	152

INTRODUCCION

I. POLISACARIDOS.

I. 1. Generalidades.

Los polisacáridos son moléculas constituidas por muchas unidades de monosacáridos enlazadas, formando cadenas lineales o ramificadas.

La mayor parte de los glúcidos encontrados en la naturaleza se presentan como polisacáridos de elevado peso molecular. Por hidrólisis completa con ácidos o con enzimas específicas, estos polisacáridos producen monosacáridos y/o derivados sencillos de monosacáridos.

Hasta hace poco tiempo el uso industrial de los polisacáridos ha estado relegado a materias primas extraídas de plantas y algas. Estos productos tradicionales como el almidón, los alginatos, el agar o la gomo arábica, entre otros, están sujetos a fluctuaciones tanto en cantidad como en calidad, ya que a veces las propiedades reológicas no son exactamente las requeridas. Incluso en determinadas ocasiones, la cantidad de polisacárido necesaria para un propósito específico puede resultar prohibitiva a causa de los costes.

Ante estos inconvenientes, la producción de polisacáridos bacterianos proporciona una alternativa válida, ya sea a través del desarrollo de productos con propiedades idénticas a los ya usados, o materiales con mejores propiedades reológicas que puedan ser utilizados para nuevas aplicaciones (Sutherland, 1986).

Se pueden diferenciar entre los polisacáridos bacterianos tres tipos según la función biológica que desempeñen:

A.- Polisacárido extracelular. Es aquel que es excretado al exterior celular. Puede quedar unido a la bacteria formando lo que se denomina cápsula, o bien puede dispersarse en el medio de cultivo líquido en forma de lodo suelto.

Su misión es proteger a la bacteria contra el medio ambiente extremo y defenderla del ataque por bacteriófagos (Maxted, 1952). No parece que el polisacárido sirva como fuente nutritiva para la bacteria, éstas no suelen usar su polisacárido, salvo Bacillus indica, que si es capaz de usarlo (Wilkinson, 1958). En cambio los hongos si degradan su propio exopolisacárido (Szauiszlo y col., 1968).

B.- Polisacárido intracelular. Es aquel que permanece en el interior bacteriano y que tiene una misión de reserva energética (ej. polihidroxi β -butirato, glucógeno).

C.- Polisacárido estructural. Es el que sirve como elemento estructural en las paredes y cubiertas de las células. Sirve como protección y soporte a los organismos unicelulares (Kang, 1979).

I. 2. Composición.

Por hidrólisis completa, con ácidos o con enzimas específicas, estos polisacáridos producen monosacáridos y o derivados sencillos de monosacáridos. La D-glucosa es la unidad monosacarídica predominante en los polisacáridos, pero son también corrientes la D-manosa, D-fructosa, D y L-galactosa, D-xilosa y D-arabinosa. También se encuentran normalmente, derivados de los monosacáridos como productos de hidrólisis de los polisacáridos naturales, entre ellos la D-glucosamina, D-galactosamina,

ácido D-glucurónico, ácido N-acetil-neuramínico y ácido N-acetil-murámico.

Los polisacáridos, también llamados glucanos, difieren en la naturaleza en sus unidades monosacáridas repetidas, en la longitud de sus cadenas y en el grado de ramificación.

Se dividen en homopolisacáridos, constituidos por un sólo tipo de unidad monomérica (ej. dextrano y levano), y heteropolisacáridos con dos o más unidades monómeras diferentes.

Los compuestos generales para los heteropolímeros suelen ser D-galactosa, D-glucosa, ácido D-glucurónico, ácido D-pirúvico y grupos acetilos, en una proporción aproximada a 1:5:2:2:3. Las unidades monosacáridas se unen mediante enlace 1-3 y 1-4, pudiendo presentar uniones laterales 1-4 y 1-6. Los residuos terminales de D-glucosa y D-galactosa pueden ir sustituidos en los carbonos 4 y 6 por piruvato (Kang y Col., 1979; Somme, 1975 y Sutherland, 1986).

Sutherland (1983) utiliza como criterio para diferenciar los polisacáridos el rango molar entre sus componentes carbohidratos y no carbohidratos. En algunas ocasiones también se proporciona información más detallada a cerca de la estructura (Williams y Lawson, 1979) junto con otras propiedades tales como rotación óptica y viscosidad.

Los polisacáridos más utilizados en la actualidad por las aplicaciones que tienen en la industria son: xantano, dextrano y escleroglucano. Todos tienen composición y estructura diferentes entre sí.

EL xantano es un polímero producido por varias especies del género Xanthomonas. Posee un elevado peso molecular, contiene D-glucosa, D-manosa, ácido glucurónico, ácido acético y ácido pirúvico (Sloneker y Jeanes, 1962).

Sloneker y col. (1962) propusieron la estructura de este polímero por primera vez, posteriormente otros investigadores siguieron estos estudios usando diferentes técnicas (Jansson y col., 1975; Lindberg y col., 1973; Bjorndal y col., 1970). Se concluyó la estructura del xantano como unidades repetitivas de pentasacáridos que contienen dos unidades de glucosa, dos unidades de manosa y una unidad de ácido glucurónico.

La cadena principal contiene unidades β -D-glucosa unidas a través de la posición 1 y 4. La cadena lateral contiene dos unidades de manosa y la unidad de ácido glucurónico. La β -D-manosa terminal se une a la posición 4 del ácido glucurónico, el cual, a su vez, está unido a la posición 2 de la α -D-manosa. Estos tres azúcares de la cadena lateral están unidos, por término medio, a la posición 3 de cada dos unidades de glucosa, en la cadena principal. La unidad D-manosa adyacente a la cadena principal contiene un grupo acetilo en posición 6 y cerca de la mitad de las unidades de D-manosa terminal están unidas por unión "ceto" a través de las posiciones 4 y 6 a un ácido pirúvico. El peso molecular oscila en un rango de $2,5 \cdot 10^6$ a $5 \cdot 10^7$ daltons (Dintzis y col., 1970). A continuación se representa la estructura propuesta para el xantano .

Se ha encontrado una relación interesante a nivel estructural entre los polisacáridos de todas las especies del género Rhizobium. En las cepas de crecimiento rápido hay dos grupos de exopolisacáridos basados en el tipo de esqueleto. Un grupo, principalmente de R. meliloti y algunas cepas de otras especies que tienen un esqueleto común, compuesto de glucosa y galactosa con diferentes uniones de cadenas laterales.

En el segundo grupo, todas las cepas de R. leguminosarum var. viciae, R. leguminosarum var. phaseoli y de R. leguminosarum var. trifolii, poseen un esqueleto idéntico que tiene la característica especial de poseer dos residuos de ácido glucurónico por unidad repetitiva.

Los exopolisacáridos de R. japonicum y los del grupo cowpea son claramente diferentes de los de crecimiento rápido. Sus unidades repetitivas son más pequeñas y las cadenas laterales consisten en residuos azucarados simples que están metilados. Se han descrito cepas de R. japonicum que producen glucanos como único componente de sus exopolisacáridos y que son efectivos en una amplia variedad de cultivares de soja.

Otras cepas de R. japonicum y del grupo cowpea se sabe que producen polisacáridos que contienen azúcares diferentes a los anteriormente descritos (Kennedy, 1980).

Se han encontrado oligosacáridos de igual tamaño y estructuras que las unidades repetitivas sencillas de los respectivos exopolisacáridos producidos por todas las cepas de R. meliloti y por algunas de R. leguminosarum var. trifolii y R. lupini (Amemura y col., 1983; Zevenhuizen y Van Neerven, 1983). Estos oligosacáridos ácidos se segregan al medio en cantidades apreciables

(0,3-1,6 g/l) y están presentes en los sobrenadantes de los cultivos.

Otro de los componentes que pueden ser producidos por todas las especies de crecimiento rápido del género Rhizobium y que han sido descubiertos en los sobrenadantes de los cultivos tras la precipitación de los exopolisacáridos, son los β -D-glucanos (Zevenhuizen, 1981; Amemura y col. 1983). Los cultivos contienen mezcla de estos glucanos compuestos por 17 a 23 residuos de glucosa (Dudman, 1984). La proporción de glucanos de diversos tamaños en los cultivos de diferentes cepas, depende de la cepa y parece estar correlacionado con la estructura del exopolisacárido correspondiente (Beyer y col., 1983; Hisamatsu y col., 1983).

I. 3. Biosíntesis.

En general la síntesis de la mayoría de polisacáridos implica la adición de una unidad monomérica simple al final no reductor de una molécula polisacarídica cebadora existente.

Para los levanos y dextranos (homopolisacáridos) el polímero se forma en el exterior de la membrana celular.

La síntesis de heteropolisacáridos implica los siguientes pasos:

a.- Captación del sustrato. El sustrato entra en el interior celular por alguno de los siguientes mecanismos: difusión facilitada, transporte activo o translocación.

b.- Metabolismo intermediario.

c.- Formación de exopolisacárido.

d.- Modificación y excreción.

La captación del sustrato es una de las primeras limitaciones en la producción de exopolisacárido. Una vez que el sustrato ha pasado al interior celular y tras un proceso de fosforilación, puede seguir las vías catabólicas para producción de energía (Entner-Doudoroff o ciclo de ácidos tricarboxílicos), o bien puede entrar en las vías anabólicas de formación de polímero. En este caso, el paso siguiente es la formación de un nucleótido del azúcar, que mediante su unión a un lípido isoprenoide, es transportado hasta la cadena de azúcares en formación. Cada azúcar tiene su precursor. Existe una regulación enzimática y genética de estos precursores.

Una vez en la superficie celular, esta cadena polisacarídica sufre modificaciones y su posterior excreción.

Parece que la acetilación del polisacárido ocurre mientras la cadena está unida al lípido isoprenoide. La acetilación y piruvilación son independientes de la síntesis del exopolisacárido.

La piruvilación enzimática ocurre desde el fosfoenol piruvato al azúcar-lípido (Gardiol, 1986).

Puede ocurrir que la cadena principal y las cadenas laterales necesiten distintos precursores y luego se unan.

La liberación de la cadena del lípido isoprenoide parece que ocurre a través de un enzima. En el caso de bacterias capsuladas a través de un enzima ligada que

uniría el polímero a la membrana celular (Sutherland, 1977).

La producción de polisacárido suele ser máxima en la última parte de la fase exponencial y al principio de la fase estacionaria.

Los mecanismos de síntesis del polímero en la mayoría de los casos, es común a los de formación de peptidoglicano y lipopolisacárido. Quizás por esto el exopolisacárido no se sintetiza hasta que no cesa el crecimiento bacteriano, porque primeramente el lípido isoprenoide ha de dedicarse a la síntesis de constituyentes de la pared celular. (Sutherland, 1977 y 1986; Allison, 1987).

I. 4. Producción.

La producción industrial de los polisacáridos no está sometida a cambios de las cosechas, condiciones climáticas o polución marina. El producto está menos sometido a variabilidad y la producción puede ser cuidadosamente controlada.

La mayoría de los medios de producción están basados en una alta relación carbono:nitrógeno y una incubación entre 20 y 30°C. La fuente de carbono normalmente utilizada para los propósitos de aislamiento suele ser glucosa, en su forma pura o como almíbar. También suele usarse sacarosa.

La cantidad de azúcar en el medio, determina en algunos casos la cantidad y calidad del exopolisacárido. En el caso del polímero producido por Bacillus polymyxa,

cuando el medio de producción lleva un disacárido como fuente carbonada, el polisacárido producido no contiene ácidos urónicos (Forsyth y Webley, 1949), aunque en la mayoría de los casos, la naturaleza de la fuente de carbono no influye en la composición del polímero.

Es también necesaria la presencia de nitrógeno en el medio de producción, por una parte, para el crecimiento celular, y por otra, para la formación de enzimas necesarias para el metabolismo de azúcares. Pero un exceso de sustrato nitrogenado puede inhibir la síntesis del polímero.

El proceso de síntesis de polisacárido es aeróbico. Es necesaria la presencia de una elevada tensión de oxígeno en el medio de producción.

Otro factor crítico para la producción de polisacárido es el pH del medio, el cual suele ser de 6,0-7,5 para cultivos bacterianos, y de 4,0-5,5 para cultivos fúngicos.

La temperatura óptima de incubación para la producción de polímero suele coincidir con la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo o ligeramente inferior.

También es necesaria la presencia en el medio de producción de pequeñas cantidades de elementos minerales (Kang, 1979; Sutherland, 1983).

La producción industrial de polisacárido se lleva a cabo mediante un proceso continuo, aunque para su investigación se utilizan procesos discontinuos.

Uno de los principales problemas planteados en la producción de polisacáridos bacterianos a nivel industrial, es la eliminación de las células bacterianas del medio de cultivo. Para ello se necesitan fuerzas centrífugas grandes, con el consecuente gasto energético. Para resolver este problema se podrían usar células mutantes de superficie rugosa o mediante el uso de enzimas inmovilizadas. Para conseguir un mayor rendimiento en la producción a nivel industrial se ha propuesto realizar este proceso en dos fases: en una primera fase se mantiene una baja concentración del sustrato carbonado en el medio de cultivo, con lo que se permite el crecimiento celular y no se favorece la formación de polímero. En una segunda fase se aumenta la concentración de sustrato carbonado con lo que se favorece una gran producción de polímero.

Conjuntamente a la producción del polímero se podrían formar productos indeseados, y cuyas rutas metabólicas coinciden en algunos pasos con las rutas metabólicas del polisacárido, como son polímeros de reserva, otros polisacáridos alternativos, o bien producción de enzimas degradativas del polímero. Para evitar este problema, se podrían utilizar células mutantes de ciertas enzimas que inhiban la producción de estos polímeros contaminantes. Para mejorar la producción, se buscan mutantes alterados en los mecanismos regulatorios de enzimas que intervienen en la síntesis del polímero (Sutherland, 1983).

I. 5. Aplicaciones.

Los polisacáridos son usados por su capacidad de modificar las características reológicas de sistemas acuosos, y se caracterizan por formar soluciones altamente

viscosas a baja concentración, o por la formación de un gel.

Los biopolímeros son normalmente usados como agentes viscosizantes o alternativamente como agentes gelificantes. Algunos polímeros son capaces de formar geles a través de interacciones inter o intramoleculares.

El polisacárido debe tener las características reológicas para su uso propuesto. Una de las ventajas del uso de polímeros microbianos es que se puede manipular su producción de manera que se dirija a obtener polímeros con las propiedades deseadas.

Evans y col (1979) notaron una variación en la viscosidad de los xantanos preparados bajo diferentes condiciones fisiológicas, lo cual puede originar cambios químicos tales como alteración en el contenido en piruvatos (Smith y col., 1981). También han apreciado diferencias en el peso molecular.

El polímero más ampliamente usado en la industria es la goma xantano, por su capacidad de controlar las propiedades reológicas de los fluídos, su alta viscosidad a baja concentración, su alta resistencia a los cambios de temperatura y pH y su compatibilidad con las sales (Sutherland, 1986).

En las Tablas 1 y 2 se resumen las diferentes aplicaciones del xantano. De todas ellas quizás la más importante sea la de extracción de crudo. Para ello la goma xantano es usada en bajas concentraciones para viscosizar y controlar las propiedades reológicas del líquido de perforación. Su uso tiene un doble propósito, por una parte aumenta la viscosidad del agua inyectada en

TABLA 1.- Usos no alimentarios de los polisacáridos extracelulares.

1. Agente suspensor.	Pinturas tixotrópicas. Ceras para cuero y metales. Pigmentos y tintes para papel y telas. Sprays agroquímicos.
2. Controlador de viscosidad.	Abrasivos y extracción de crudo. adhesivos.
3. Gelificante.	Explosivos
4. Floculante.	Extracción de oro.

TABLA 2.- Uso de los polisacáridos en alimentación.

1. Agentes espesantes. En salsas y almíbar.

 2. Agentes gelificantes. En postres con base de
leche, confitados y
gelatinas, pastel y pasta de
relleno.

 3. Coloides. Estabilizadores en helados, aderezos de
ensaladas y bebidas de
frutas.

 4. Formadores de geles sinérgicos. En geles de
carnes sintéticas etc.

 5. Retardadores de formación de cristal de hielo o
azúcar. Helados, pastillas
etc.

 6. Estables a bajo pH. Aderezos de ensaladas.
-

los reservorios de crudo para favorecer la presión ejercida sobre los restos de éste, y facilitar su extracción. Por otra parte actúa como lubricante para la barrena de perforación (Kang, 1979; Sutherland, 1983 y 1986). De esta manera se puede conseguir un aumento del rendimiento en la extracción del crudo de hasta un 20 % (Van Poolen, 1980).

En la industria textil se usa la goma xantano como espesante de los tintes, de manera que se facilita su aplicación, previene la migración de los colores y favorece el buen marcado de dibujos.

En la industria de cerámica y vidrio el xantano a baja concentración favorece la suspensión de los componentes insolubles por largos períodos de tiempo.

Cuando el xantano forma parte de la composición de sustancias limpiadoras se favorece la adhesión de éstas a la superficie a limpiar, con lo que el tiempo de contacto es mayor.

También se usa como espesante en formulaciones de explosivos que contienen 60-80 % de sodio, amonio y nitrato cálcico, por su excelente compatibilidad con altos niveles de sales.

La goma xantano ha encontrado un amplio uso en la industria alimentaria como resultado de sus propiedades exclusivas:

- a) Solubilidad en agua caliente y fría.
- b) Alta viscosidad a bajas concentraciones.

- c) Poca variación de la viscosidad con los cambios de temperatura.
- d) Excelente solubilidad y estabilidad en sistemas ácidos.
- e) Unica propiedad reológica que lo provee de alta viscosidad a bajo cizallamiento, y baja viscosidad cuando se somete a alto cizallamiento.
- f) Excelentes propiedades suspensoras.
- g) Excelente compatibilidad con un amplio rango de sales.
- h) Excelente estabilidad térmica.
- i) Buenas propiedades emulsionantes.
- j) Estabiliza el hielo previniendo la formación de cristales de hielo.

Las aplicaciones en este campo se pueden ver resumidas en la Tabla 2.

En agricultura tiene aplicación el xantano añadiéndolo a los piensos para impedir la separación de sus componentes durante su almacenamiento (Andrew, 1977 y Petrowski, 1978).

Formando parte de los productos químicos agrícolas como fungicidas favorece la estabilidad de la emulsión, provee dispersabilidad, reduce la velocidad de la corriente, y además incrementa la adherencia y

permanencia del pesticida (Schuppner, 1972; Gibsen y Saddington, 1973).

En aplicaciones farmacéuticas la goma xantano se usa para estabilizar emulsiones y facilitar su aplicación (Felty, 1975). También se usa como suspensor en formulación de antibióticos para proveer una dosificación uniforme. La sal alumínica del xantano se usa como suspensor del sulfato de bario en opacificación de radiografías.

También se usa en cosmética, en formulación de pastas de dientes, cremas y lociones.

El dextrano también tiene aplicaciones muy diversas aunque menos ampliamente difundidas que el xantano.

Un uso particular del dextrano es para aumentar el volumen del plasma sanguíneo (Grönwall, 1957). Para ello se usan soluciones estériles, libres de pirógenos (aprox. 6 %) con un peso molecular entre 50,000 y 100,000.

También puede ser usado como líquido de perforación (Owen, 1950 y 1959; Sparks, 1962; Cypert y Patton, 1963).

El complejo de hierro con dextrano fué usado como fuente de hierro nutricional. Se confirmó que el hierro en este complejo era capaz de formar el complejo hemoglobina. Esta fuente de hierro fué usada para combatir anemia (Martin y col., 1955; Cox y col. 1965).

El escleroglucano también es usado en muchas aplicaciones, en tintas, cerámica (Halleck, 1969), perforación de barros (Anonymus, 1969), en farmacia y en cosmética (Rodgers, 1973).

Otra aplicación de los polímeros bacterianos menos conocida, pero no por ello menos importante, es en la eliminación de iones metálicos de solución, y en concreto de aguas residuales.

La concentración de metales pesados es elevada en zonas de alta contaminación, llegando a concentraciones que pueden alterar el medio ambiente.

Aunque en zonas de baja contaminación las concentraciones de metales pesados son muy bajas, no se puede descartar la incorporación de metales pesados a las tierras de cultivo mediante el agua que se utiliza para el riego, que generalmente es agua residual depurada, pero que en la depuración no se retienen los metales pesados.

El proceso de depuración de aguas residuales sigue varios pasos:

a) Sedimentación. Se eliminan principalmente los residuos sólidos y hasta un 40 a 60 % de metales, salvo el níquel (15-35 %) y manganeso (30 %) (Lester, 1983).

b) Tratamiento biológico con lodo activo. En este caso la eliminación de níquel, manganeso y cobalto es baja y la de cobre, plomo, cromo y cinc se da en un 50 % aproximadamente (Sterritt y Lester, 1981; Kempton y col., 1983).

Los procesos fisicoquímicos para la eliminación de metales son adsorción y precipitación.

Varios investigadores (Steiner y col., 1976; Nelson y col. 1981 y Forster, 1983) han usado el término general de adsorción, para describir la transición entre la forma

soluble del metal y la formación de partículas por mediación de un proceso de lodo activo.

Algunas bacterias usan la formación de sales insolubles como mecanismo de detoxificación. Aiking y col. (1982) encontraron una cepa de Klebsiella aerógenes que precipita el cadmio como sulfuro en la periferia de la célula.

Algunos metales precipitan pobremente (Stephenson y Lester, 1984), y ésto podría ocurrir en el estado biológico del tratamiento de aguas residuales.

La presencia de biomasa parece ser importante en la promoción de los precipitados (Lester, 1985). La biomasa del lodo activo es la que contribuye a la eliminación del metal tóxico (Oliver y Cosgrove, 1974). El polímero extracelular está implicado en la biomasa del lodo activo en la eliminación de iones solubles de metales (Dugan y Pickrum, 1972; Brown y Lester, 1979). Algunos géneros de Zoogloea ramígera han demostrado tener una alta afinidad por iones solubles de metales (Friedman y Dugan, 1968), y materiales poliméricos extraídos del lodo activo han sido capaces de unirse con los iones metálicos (Steiner y col., 1976).

Dugan y Pickrum (1972) sugirieron que es posible desarrollar un proceso microbiológico implicando polímeros extracelulares en la eliminación de iones metálicos, en procesos de tratamiento de aguas residuales, y en otros procesos para el control de polución de metales (Lester, 1984).

En el presente trabajo se han estudiado varios aspectos de los citados anteriormente, para el

polisacárido de varias cepas de Rhizobium que es una bacteria propia del suelo.

II. TAXONOMIA DEL GENERO RHIZOBIUM

En el manual de Bergey 1ª edición (Bergey's, 1984), el género Rhizobium forma parte de la familia Rhizobiaceae que presenta cuatro géneros que se distinguen por las siguientes características:

I) Producen nódulos en raíces de plantas leguminosas, fijan el nitrógeno atmosférico cuando están en simbiosis, aunque algunos nódulos son inefectivos. No producen 3-ceto lactosa.

A) Producen nódulos en raíces de plantas leguminosas predominantemente de zonas templadas. Son de crecimiento rápido en medio de agar con extracto de levadura y manitol. Generalmente producen ácidos en medios de sales minerales y manitol. Tanto por ciento de |C| + |G| = 59-64.

GENERO I RHIZOBIUM

B) Producen nódulos en raíces de plantas tropicales y algunas de zonas templadas. Son de crecimiento lento en medio de extracto de levadura-manitol. Generalmente producen reacciones alcalinas en medios de sales minerales y manitol. Tanto por ciento de |C| + |G| = 61-65.

GENERO II BRADYRHIZOBIUM

II) No producen nódulos en plantas leguminosas, pero la mayoría de las especies producen otro tipo de

hipertrofia en muchas plantas. No fijan el nitrógeno. Tanto por ciento de |C| + |G| = 57-63.

GENERO III AGROBACTERIUM

III) Producen nódulos en ciertas especies de plantas pertenecientes a la familia Myrsinaceae y la familia Rubiaceae. La capacidad de fijar nitrógeno es discutida. Tanto por ciento de |C| + |G| = 60-61.

GENERO IV PHYLOBACTERIUM

Recientemente se ha incluido un nuevo género en la familia Rhizobiaceae, capaz de fijar nitrógeno atmosférico tanto en vida libre como en simbiosis con la leguminosa Sesbania rostrata. Se trata del género Azorhizobium.

II. 1. Género Rhizobium.

Incluye bacilos, pleomórficos en condiciones adversas de cultivo, gram negativos, móviles, aerobios donde el oxígeno actúa como aceptor final de electrones. Las colonias tienen de dos a cuatro mm de diámetro tras tres o cuatro días de crecimiento. Producen reacciones ácidas en medio mineral con manitol y otras fuentes de carbono y su crecimiento en medios con hidratos de carbono va acompañado por producción de grandes cantidades de polisacárido extracelular.

Se describen tres especies dentro del género Rhizobium:

R. leguminosarum con tres biovariedades (trifolii, phaseoli, y viceae), que tienen de dos a seis flagelos

peritricos. Produce nódulos en raíces de algunas, aunque no necesariamente en todas, las especies de Pisum (guisante de campo), Lathyrus (guisante), Vicia (guisante), Lens (lenteja), especies templadas de Phaseolus y Trifolium (trébol).

R. meliloti que tiene de dos a seis flagelos peritricos, forma ácidos a partir de leche tornasolada y forma nódulos en raíces de algunas, aunque no todas, especies de Melilotus (meliloto), Medicago (alfalfa) y Trigonella (alholva).

R. Loti tiene un flagelo polar o subpolar y normalmente produce nódulos en algunos, aunque no en todos, los siguientes hospedadores: Lotus, Lupinus, Anthyllis, Ornithopus, Cicer, Caragana, Leucaena y Mimosa.

Scholla y Elkan (1984) apoyándose en los datos fisiológicos y genéticos de que se disponen de las bacterias de crecimiento rápido que forman nódulos efectivos en la soja, han propuesto agrupar a estas cepas en la nueva especie R. fredii, para diferenciarlas de las cepas de crecimiento lento (Bradyrhizobium japonicum) que nodulan en la misma planta.

II. 2. Interacción Rhizobium-planta. Papel del polisacárido extracelular en dicha interacción.

Las especies del género Rhizobium, como hemos indicado anteriormente, establecen simbiosis con su leguminosa específica. Esta simbiosis aporta beneficios mutuos que se traducen en la fijación simbiótica del nitrógeno por la planta y la persistencia de Rhizobium en la naturaleza. Tanto la planta como la bacteria son

incapaces de fijar nitrógeno como organismos independientes.

El establecimiento de la simbiosis Rhizobium-leguminosa, está perfectamente regulado por ambos simbiosiontes. El proceso comienza con la colonización del pelo radical por bacterias del género Rhizobium, que se ven atraídas hacia la rizosfera por sustancias que son segregadas por la planta y que la bacteria es capaz de transformar (Bauer, 1981; Dart, 1977; Vincent, 1980 entre otros).

El proceso de reconocimiento celular entre microorganismos y plantas superiores se cree que proviene de una unión específica, reversible o irreversible, entre receptores químicos en la superficie de las células implicadas. Esta teoría condujo a elaborar la hipótesis de la lectina (Bauer, 1981; Graham, 1981; Dazzo y Hubell, 1982 y Vance, 1983). De acuerdo con esta teoría, las lectinas de la planta (proteínas específicas unidas a carbohidratos) reconocen y se unen a componentes (carbohidratos) de la superficie celular bacteriana. Esta unión iniciaría entonces el proceso de infección.

Para investigar el papel que pudieran tener en las primeras etapas del proceso de infección, se han estudiado una amplia variedad de productos sintetizados por Rhizobium, fundamentalmente exopolisacárido (EPS), polisacárido capsular (CPS), lipopolisacárido (LPS) y glucanos neutros de pequeño peso molecular (SmPS) (Sahlman y Fahreus, 1963; Fahreus y Ljunggren, 1967; Ljunggren, 1969; Higashi y Abe, 1980; Bauer, 1981; Carlson, 1984; Huber y col., 1984; Hollingsworth y col., 1985; Rusa y col. 1985).

Existen varias teorías a cerca del papel del polisacárido en la adhesión de la bacteria a la planta. Hay pocas evidencias que sugieran que los exopolisacáridos participan en los estados iniciales de la adhesión. El exopolisacárido no participa en los procesos de unión "per se" sino en la formación de microcolonias, y así, en la síntesis de una película superficial microbiana.

Allison y col. (1987), sugirieron que un exceso de producción de polímero puede prevenir la adhesión, pero inicialmente, pueden ser requeridas pequeñas cantidades de polisacáridos.

La adhesión de bacterias a través de la producción de polímeros no específicos, ha sido descrita por Marshal y col. (1971) como un proceso en tres estados:

1º) Reversible. Atracción de células a la superficie. En este punto están implicadas fuerzas electrostáticas.

2º) Unión.

3º) Crecimiento.

En el 2º y 3º puntos, el exopolisacárido actúa permitiendo la adhesión.

El exopolisacárido no está directamente relacionado con el proceso inicial de ataque, pero sí con la formación de una película microbiana. Parece que Ca^{2+} y Mg^{2+} , sobre todo Mg^{2+} , juegan un papel importante en la regulación de la síntesis de EPS y, por tanto, en la unión celular.

Allison y col. (1987) concluyeron que la síntesis de EPS no es un prerrequisito para la adhesión bacteriana.

Tully (1988) pensó que el EPS puede ser importante en el proceso de infección y nodulación, posiblemente debido a su reconocimiento por la lectina del pelo radical.

Sanders y col. (1978) aislaron mutantes de R. leguminosarum que son incapaces de nodular y producen polisacáridos normales. Por otra parte Napoli y Albersheim (1980) han demostrado relación entre la carencia de polisacárido extracelular y la pérdida de la capacidad para nodular.

La disminución de la capacidad de las células de R. japonicum para unirse a las lectinas de soja cuando los cultivos son viejos, se ha relacionado con el incremento de la metilación de las cadenas laterales de galactosa de sus EPSs (Mort y Bauer, 1980).

Según Cadmus y col. (1982) y Sherwood y col (1984) los cambios en las propiedades de unión a las lectinas del polisacárido de R. trifolii en las diferentes etapas del cultivo están relacionadas con cambios en la sustitución de radicales piruvil y acetil.

El inusitado aumento de la capacidad de nodulación de dos mutantes de R. japonicum con producción de EPS disminuida, se relacionó con la presencia de un carbohidrato adicional que contenía mayoritariamente o exclusivamente glucosa (Law y col. 1982).

Se ha propuesto la hipótesis que la unión específica de Rhizobium a los pelos radicales en los primeros estadios del proceso de infección resulta de la

interacción entre el CPS y la lectina de la raíz hospedadora (Stacey y col., 1980; Kato y col., 1981; Paau y col. 1981).

Mutantes de Rhizobium con una gran reducción en los niveles de producción de EPS, son aún capaces de nodular en su planta hospedadora, pero los nódulos se desarrollan pobremente (Chakravorty y col., 1982).

Una vez producida la adhesión, la presencia de ácido indolacético, producido por la bacteria al transformar el triptófano segregado por la planta, induce la curvatura del pelo radical, produciéndose una zona de tensión, en la cual se produce un debilitamiento de la pared de la célula vegetal, y comienza la penetración de Rhizobium al interior del pelo radical (Abe y col., 1980; Bauer, 1981). A continuación tienen lugar una serie de interacciones complejas altamente específicas entre un procariota y un eucariota.

OBJETO

El uso industrial de los polisacáridos bacterianos es cada vez más amplio debido a que su producción no está supeditada a cambios climáticos ni corrientes marinas. Sus propiedades se pueden regular mediante la manipulación tanto genética como fisiológica de los microorganismos productores. En la actualidad las investigaciones se dirigen a conseguir un mayor rendimiento en la producción, y a la obtención de un producto más estable y de mayor viscosidad.

Para conocer si los polímeros producidos por el género Rhizobium pueden ser utilizados en la industria, nos marcamos como objetivos del presente trabajo los siguientes:

- 1) Estudio de la producción de polisacárido extracelular de las cepas de R. leguminosarum var. trifolii RS1051 y de R. leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 variando las condiciones fisiológicas de cultivo para encontrar las condiciones óptimas de producción.
- 2) Estudio de la composición de los exopolisacáridos de las cepas utilizadas.
- 3) Estudio de las características reológicas de los exopolisacáridos.

Como es sabido, en los procesos de depuración de aguas residuales y aguas de ríos, tiene un papel importante la biomasa bacteriana que favorece la eliminación de ciertos componentes tóxicos, bien sea mediante transformación de los mismos en compuestos menos tóxicos o por un simple proceso de adsorción. En este

segundo apartado juegan un papel muy importante los polímeros extracelulares sintetizados por las bacterias.

En la Bibliografía se citan diversos estudios sobre la capacidad de distintos polímeros bacterianos para retirar iones metálicos de soluciones.

En el presente trabajo, se ha establecido la capacidad de estos polímeros para retener metales pesados, planteando como objetivo inicial en este campo de investigación, el uso de los polímeros una vez producidos y extraídos para establecer las bases de estudios posteriores.

MATERIALES

I. MICROORGANISMOS

Rhizobium leguminosarum var. trifolii cepa RS1051, aislada en nuestro laboratorio de raíces de trébol. Presenta tres plásmidos. Es resistente a la rifampicina y espectinomomicina. Forma simbiosis con Trifolium repens (trébol blanco) y Trifolium pratense (trébol violeta), dando lugar a nódulos efectivos (Nod⁺, Fix⁺).

Rhizobium leguminosarum var. phaseoli cepa CIAT899. Presenta dos plásmidos. Es resistente a la rifampicina. Forma simbiosis con Phaseolus vulgaris (frijol). De esta simbiosis resultan nódulos fijadores (Nod⁺, Fix⁺).

Rhizobium leguminosarum var. phaseoli cepa CFN42. Presenta seis plásmidos. Es resistente a la rifampicina. Hace simbiosis con Phaseolus vulgaris dando lugar a la formación de nódulos efectivos (Nod⁺, Fix⁺).

II. METALES PESADOS.

En la Tabla 3 se muestran los metales pesados utilizados. Fueron esterilizados por filtración en membrana Millipore de 0,45 μ de diámetro de poro. Para medio sólido, los metales fueron añadidos sobre el agar a temperatura de sobrefusión.

III. MEDIOS DE CULTIVO

III. 1. Medio TY.

Medio utilizado para el crecimiento de Rhizobium

TABLA 3. Sales de los metales pesados utilizados en el presente trabajo.

SAL DEL METAL	FORMULA EMPIRICA
ACETATO DE PLOMO	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
CLORURO DE CADMIO	$\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
CLORURO DE CINC	ZnCl_2
CLORURO DE MERCURIO	HgCl_2
CROMATO POTASICO	K_2CrO_4
SULFATO DE COBRE	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

tanto en medio líquido como sólido. Fué descrito por Beringer (1974) cuya composición es la siguiente:

Triptona.....	5,00 g
Extracto de levadura.....	3,00 g
Cloruro cálcico.6 H ₂ O.....	0,84 g
Agua c.s.p.	1000,00 ml

El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Para medio sólido se añadió agar Oxoid a una concentración del 1,2 %.

III. 2. Medio LB.

Medio utilizado para diferenciar el crecimiento de la cepa de R. leguminosarum var. phaseoli CIAT899 de las otras cepas utilizadas, ya que permite el crecimiento de la cepa CIAT899 inhibiendo el de las otras dos.

Este medio fué descrito po Luria-Bertani (Maniatis, 1982), cuya composición es la siguiente:

Peptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
Cloruro sódico.....	10 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 ml

El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Para medio sólido se añadió agar Oxoid a una concentración del 1,2 %.

III. 3. Medio 79 de Allen.

Para la producción de polisacárido se usó el medio 79 de Allen (Allen, 1951), cuya composición se describe a continuación.

K ₂ HPO ₄	0,6 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2 g
CaCO ₃	3,0 g
NaCl	0,2 g
Manitol	7,6 g
Glucosa	2,4 g
Extracto de levadura	1,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000,0 ml

El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

IV. TAMPONES.

IV. 1. Tampón fosfato.

Se preparó según (Gomori, 1955).

Solución A: Solución 0,2 M de fosfato sódico monobásico (27,8 g por l de agua destilada).

Solución B: Solución 0,2 M de fosfato sódico dibásico (71,7 g por l de agua destilada).

Se mezclan 33 ml de solución A y 67 ml de la solución B y se diluye hasta 200 ml con agua destilada, para conseguir un pH de 7,1, ajustándose si fuera preciso. Se

esterilizó por filtración en membrana Millipore de 0,45 μ de diámetro de poro.

IV. 2. Solución tampón de hidrogenoftalato potásico.

Se disolvieron 5 g de hidrogenoftalato potásico para análisis en 50 ml de agua. La solución se fijó a pH 9,0 mediante solución de hidróxido sódico por lo menos 27 % para análisis y se completó el volumen con agua hasta 100 ml.

V. FUENTES DE CARBONO Y DE NITROGENO.

Para ensayar la influencia de las distintas fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de polímero, se utilizó el medio base que se describe a continuación:

K ₂ HPO ₄	0,6 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
CaCO ₃	3,0 g
NaCl	0,2 g
Agua destilada c.s.p.	1000,0 ml

El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Posteriormente se añadieron las fuentes de carbono y nitrógeno correspondientes, una vez disueltas y esterilizadas.

V. 1. Fuentes de carbono.

Se utilizaron como fuentes carbonadas los siguientes compuestos: arabinosa, citrato sódico, glicerol, glucosa,

glutamato sódico, manitol, sacarosa y succinato sódico a la concentración final de 5 g/l. Las soluciones previamente esterilizadas fueron añadidas al medio base anteriormente descrito, y suplementado con extracto de levadura como fuente de nitrógeno a una concentración de 1 g/l.

V. II. Fuentes de nitrógeno.

Se utilizaron como fuentes nitrogenadas los compuestos que se citan a continuación: cloruro amónico, extracto de levadura, glutamato sódico y nitrato potásico, a la concentración final de 1 g/l. Las soluciones en agua destilada, esterilizadas, fueron añadidas al medio base ya descrito y suplementado con sacarosa a la concentración de 5 g/l como fuente de carbono.

El glutamato sódico debe ir suplementado con biotina y tiamina a la concentración de 20 µg/l. El nitrato potásico se debe suplementar con biotina a la misma concentración anterior.

VI. SOLUCIONES REACTIVAS.

VI. 1. Reactivos para el reconocimiento de metales

VI. 1. 1. Reactivo del cincón.

Se disolvieron 100 mg de cincón en una mezcla de 2 ml de solución de hidróxido sódico 1 N y 98 ml de agua.

VI. 1. 2. Solución de difenil-carbazida.

Se disolvieron 0,25 g de difenil-carbazida para análisis en 100 ml de acetona para análisis.

VI. 1. 3. Acido sulfúrico para reconocimiento de cromo.

Se añadieron 57 ml de ácido sulfúrico al 96 % a 375 ml de agua. La solución caliente se enfrió a temperatura ambiente después de haber añadido una gota de permanganato potásico 0,1 N.

VI. 1. 4. Solución de ditizona

Por agitación prolongada se disolvieron 0,02 g de ditizona para análisis en 100 ml de tetracloruro de carbono, agitando después cuatro veces con 50 ml de una solución acuosa amoniacal (1 ml de amoníaco al 10 % en 200 ml de agua). Los extractos acuosos reunidos se filtraron y se trataron con 100 ml de tetracloruro de carbono y 1 ml de ácido clorhídrico del 25 % para análisis y agitando inmediatamente. La fase orgánica de color verde, se lavó tres veces con 50 ml de agua y se filtró de nuevo. Esta solución tiene una estabilidad aproximada de unas cuatro semanas. Se aplicó una solución al 0,001 %, que se ha de preparar siempre inmediatamente antes de su empleo. Se diluyeron 10 ml de la solución preparada, como se ha descrito anteriormente, con tetracloruro de carbono, hasta un volumen de 200 ml.

VI. 1. 5. Agua amoniacal.

A 1 l de agua se añadió 1 ml de solución de amoníaco al 25 % para análisis.

VI. 1. 6. Acido acético para reconocimiento de mercurio.

Se diluyeron 15 ml de ácido acético por lo menos 96 % para análisis en agua hasta completar 100 ml.

VI. 1. 7. Solución de dietil-ditiocarbamato sódico.

Se disolvieron 100 mg de dietil-ditiocarbamato sódico para análisis en 100 ml de agua.

VI. 1. 8. Solución de citrato sódico para reconocimiento de plomo.

Se disolvieron 10 g de citrato trisódico dihidratado para análisis en agua hasta 100 ml.

VI. 1. 9. Solución de cianuro potásico para reconocimiento de plomo.

Se disolvieron 10 g de cianuro potásico para análisis en agua hasta 100 ml.

VI. 1. 10. Solución de sulfato de cobre para reconocimiento de plomo.

Se disolvió 1 g de sulfato de cobre para análisis en 200 ml de agua, añadió amoníaco por lo menos 25 % Suprapur hasta disolución total del precipitado formado. Después se diluyó con agua hasta 250 ml. La solución ha de tener un pH aproximado de 10,5.

VI. 1. 11. Solución de tartrato sódico y potásico para reconocimiento de cadmio.

Se disolvieron 10 g de tartrato sódico y potásico para análisis en agua hasta 100 ml.

VI. 1. 12. Solución de hidróxido sódico para reconocimiento de cadmio.

Se disolvieron 10 g de hidróxido sódico para análisis en agua hasta 100 ml.

VI. 1. 13. Solución alcalina lavadora para reconocimiento de cadmio.

Se disolvieron 2 g de hidróxido sódico para análisis en agua hasta 100 ml.

VI. 1. 14. Solución de citrato amónico para reconocimiento de cobre.

Se disolvieron 20 g de hidrogenocitrato-diamónico para análisis en agua hasta 100 ml.

VI. 2. Reactivo para reconocimiento de azúcares totales

VI.2. 1. Reactivo de la antrona.

A 100 ml de agua destilada, se les añadieron, poco a poco, 500 ml de ácido sulfúrico concentrado. En 100 ml de esta mezcla se disolvieron por agitación, en el momento de usarse, 0,2 g de antrona.

METODOS

I. CULTIVO BACTERIANO EN MEDIO LIQUIDO.

Los cultivos bacterianos se inocularon a partir de una colonia bacteriana y se incubaron a 28°C con agitación durante 48 horas. A continuación se diluyeron en medio fresco y se dejaron crecer hasta una concentración aproximada de 2×10^8 células por ml, tomando medida de la densidad óptica a 450 nm con un espectrofotómetro Bausch and Lomb "Spectronic 20".

II. ESTUDIO DEL POLISACARIDO EXTRACELULAR.

II. 1. Producción.

La producción de polisacárido extracelular por Rhizobium se realizó mediante la técnica descrita por Caviedes y col. (1982).

Las bacterias fueron cultivadas en matraces de 250 ml añadidos de 125 ml de medio líquido 79 de Allen.

Los matraces se inocularon con 5 ml de una suspensión bacteriana con una concentración aproximada de 2×10^8 células por ml, y se incubaron a 28°C en agitación durante 5 días.

La producción en anaerobiósis se llevó a cabo introduciendo el matraz de cultivo en una campana Gaspak de anaerobiósis y el medio líquido se mantuvo en movimiento mediante agitación magnética.

Para la producción de polisacárido con aireación forzada, se utilizó una bomba de burbujeo mediante la cual

se mandaba aire al interior del medio de cultivo, haciendolo pasar por un filtro estéril.

II. 2. Extracción.

Los cultivos obtenidos según el método anterior se centrifugaron a 40.000 g durante 20 minutos en una Sorvall RC5B refrigerada. Para extraer los polisacáridos se siguió la técnica descrita por Amarger y col. (1967).

Al líquido sobrenadante, resultante de la centrifugación del medio de cultivo, se le adicionaron dos volúmenes de acetona y el precipitado recogido se secó con aire caliente. Se dializó frente a agua destilada a 4°C durante 24 horas. Se volvió a precipitar con acetona.

II. 3. Purificación.

Se realizó por filtración en gel utilizando Sephadex G-25 como se describe a continuación.

II. 3. 1. Preparación del gel.

El Sephadex comercial se presenta como polvo seco, el cual se debe hinchar antes de empaquetarlo en la columna sumergiéndolo en la solución usada como eluyente (tampón fosfato pH 7,1).

Para ello, se depositó la cantidad adecuada de Sephadex en un matraz Kitasato con exceso de eluyente, se dejó reposar el tiempo necesario para conseguir una buena

hidratación del mismo. Para acelerar el proceso se puede calentar el matraz en baño maría durante 60 minutos.

Para evitar el problema que podría surgir si quedaran algunas burbujas de aire atrapadas en la matriz del gel, durante la hidratación, se desgasificó mediante bomba de vacío conectada al Kitasato que alberga el gel.

II. 3. 2. Montaje de la columna.

Se empleó una columna Pharmacia Fine Chemical K 16/70 equipada en sus terminales con sendos émbolos provistos de placas porosas de teflón que canalizan la entrada y salida del eluyente. Dicha salida se conecta a una bomba peristáltica. Por el extremo superior de la columna se añadió lentamente la suspensión de Sephadex con la ayuda de una varilla de vidrio, hasta conseguir la altura deseada (aproximadamente 50 cm), procurando que no quedase atrapada ninguna burbuja de aire. Se dejó una pequeña capa de eluyente sobre la parte superior del gel, se cerró la salida y se conectó al conducto de entrada del eluyente. Para conseguir un equilibrado y empaquetado perfectos, se hicieron pasar unos 500 ml de eluyente a un flujo de 0,5 ml/min.

II. 3. 3. Aplicación de la muestra.

Una vez eliminado el exceso de eluyente, se depositó la muestra en la parte superior del gel. Se partió de una solución del precipitado seco, obtenido con acetona, a la concentración de 2 mg/ml. Se utilizó un volumen de 5 ml de dicha solución, y una vez embebido, se añadió un

determinado volumen de eluyente y se conectó al reservorio.

El desarrollo se llevó a cabo utilizando un flujo de 0,5 ml/min y recogiendo fracciones de 7 ml, para lo que se empleó un colector automático.

Los polisacáridos pudieron ser determinados en cada una de las fracciones por la reacción de la antrona (Mokkrasch, 1954).

II. 3. 4. Reacción de la antrona.

En tubos de ensayo perfectamente limpios (tantos como fracciones fueron recogidas más un par de ellos que se utilizaron como testigos) se colocaron 5 ml del reactivo de la antrona recién preparado. Se llevaron a un baño de hielo y allí se les fué añadiendo a cada uno 1 ml de cada fracción, de tal modo que formaron una segunda capa sobre el reactivo. En los tubos testigos se utilizó 1 ml del tampón fosfato pH 7,1.

Cuando todos los tubos habian sido preparados se agitaron mecánicamente llevándolos de nuevo al baño de hielo. Luego se pasaron a un baño de agua hirviendo donde se mantuvieron 10 minutos, enfriándolos después rápidamente en agua de grifo hasta temperatura ambiente. A partir de este momento se pudo realizar la lectura de la densidad óptica, del color verde desarrollado, a una longitud de ondas de 620 nm, usándose como blanco los testigos preparados.

II. 4. Análisis.

Las concentraciones de polisacáridos deseadas se disolvieron en agua destilada, y se añadió ácido sulfúrico concentrado en la cantidad necesaria para que quedase a 1 N. A continuación se hidrolizaron por calentamiento a reflujo durante 11 horas. Pasado este tiempo se eliminó el ácido sulfúrico por adición de carbonato de bario (hasta que no se observó desprendimiento de burbujas). El precipitado formado se separó por filtración en Millipore. La solución recogida se concentró a vacío hasta sequedad, y el residuo seco se disolvió en agua destilada para su análisis por cromatografía.

II. 4. 1. Cromatografía líquida de alta resolución.

Para la realización de este estudio se ha utilizado un cromatógrafo Sugar Analyzes I Waters Associated Inc, provisto de un inyector de volumen fijo de 20 μ l, una bomba de alta presión modelo M 510 y un detector de índice de refracción R401. Se utilizó la columna Aminex ion exclusión HPX-87 H (Biorad).

Se trabajó a 65°C. El eluyente utilizado fué ácido sulfúrico 0,015 N. La velocidad de flujo fué de 0,3 ml/min.

II. 5. Medida del pH.

Soluciones 0,1% de los polisacáridos fueron descationizadas utilizando resina de intercambio iónico Amberlite IR-120 (H), en cantidad suficiente para que toda la solución estuviera en contacto con dicha resina. Tras

agitación se dejó reposar la mezcla durante 15 minutos y a continuación se separó por filtración la solución de polisacárido de la resina y se procedió a la medida del pH de la misma.

II. 6. Estudio reológico.

II. 6. 1. Obtención de los reogramas.

Se utilizó un viscosímetro de cono placa tipo Ferranti-Shirley, provisto de una unidad de control y variación de la velocidad, sistema de termostatación y equipo de registro. Se utilizó el cono particular grande.

La muestra fué sometida a una tensión de deformación creciente desde 0 hasta 500 rpm y viceversa en un tiempo de 60 minutos.

Las constantes del aparato para transformar las velocidades y tensiones de deformación reducidas (τ , D) en las correspondientes a din/cm^2 y s^{-1} respectivamente fueron.

Para tensiones de deformación: $K_{\tau} = 24,80$

Para velocidades de deformación: $K_D = 17,45$

De este modo:

$$\tau (\text{din/cm}^2) = \hat{\tau} (\text{cm}) \frac{100 \text{ unid.}}{19,4/5 \text{ cm.}} \times 1 \times K_{\tau}$$

$$D (\text{s}^{-1}) = \hat{D} (\text{cm}) \frac{500 \text{ rpm}}{21 \text{ cm}} \times K_D$$

Se prepararon soluciones de los polisacáridos a diferentes concentraciones: 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; y 3 %. Sobre la placa del viscosímetro se aplicaron de 2 a 3 ml de muestra y se dejaron reposar durante dos minutos con el fin de evitar la aparición de tensión inicial debido a la manipulación.

Primeramente se realizaron pruebas a temperatura ambiente (22°C). Posteriormente se estudió la influencia de algunos cambios en la temperatura sobre la reología de las soluciones 1 % de los polímeros, ajustando la temperatura de la placa del viscosímetro a valores de 20, 40, 60 y 80°C.

Las soluciones al 1% de los polisacáridos se ajustaron a distintos valores de pH (1,5; 3; 5; 7; 9; 11 y 13) para estudiar la influencia del pH de las soluciones sobre la reología de las mismas.

Para el estudio tixotrópico de las soluciones de los polímeros, éstas se sometieron a una velocidad de deformación constante, que fué fijada en el aparato a 500 rpm, durante unos minutos.

II. 6. 2. Cálculo de la viscosidad a partir de los reogramas.

Los reogramas obtenidos son las representaciones gráficas de las tensiones de deformación frente a las velocidades de deformación. Se realizó un ajuste matemático por polinomios ortogonales de cada reograma para conocer las constantes de los polinomios que los definan (Mothes, 1961). Este polinomio es una ecuación de segundo grado de la cual se calculó la tensión de

deformación reducida (τ cm) que sirvió para el cálculo posterior de la tensión de deformación (τ din/cm²).

La viscosidad para una velocidad de deformación dada D (s⁻¹) se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\mu \text{ (poises)} = \frac{\tau}{D}$$

III. ESTUDIO DE LA RETENCION DE IONES METALICOS POR POLISACARIDOS.

Para este estudio se siguió el método descrito por Lester y col. (1984).

La complejación de iones metálicos por polímeros extracelulares pudo ser determinada por adición del polímero en concentración 0,01 % a una solución de una sal soluble del metal seguido de agitación durante tres horas hasta alcanzar el equilibrio. Posteriormente, el complejo polímero-metal, pudo ser separado del ión metálico libre usando cromatografía por filtración en gel.

Las concentraciones de los metales utilizados se indican en la Tabla 4.

III. 1. Preparación del gel.

Se utilizó el gel comercial Sephadex G-10 y se procedió a su hinchamiento en cloruro sódico 0,02 M según la técnica anteriormente descrita en métodos (Apartado II. 3. I.), y se procedió al montaje de la columna según se describe en métodos (Apartado II. 3. 2).

TABLA 4.- Concentraciones a las que se han usado los metales pesados para el estudio de retención.

Metal pesado	Concentración (mg/l)
CADMIO	0,40
CINC	4,80
COBRE	2,50
CROMO	0,15
MERCURIO	0,60
PLOMO	5,50

Las dimensiones del lecho del gel empleado fueron 54 cm de altura y 1,5 cm de diámetro.

Sobre la base superior del gel se aplicaron 1,5 ml de muestra, y se eluyó con cloruro sódico 0,02 N a una velocidad de 0,3 ml/min. Se recogieron fracciones de 3,5 ml.

III. 2. Reacciones de identificación de iones metálicos.

En las fracciones de eluyente recogidas a la salida de la columna se analizó el posible complejo polímero-metal formado, utilizando para ello reacciones colorimétricas de reconocimiento del metal. Se utilizó la reacción de la antrona para el reconocimiento del polímero.

III. 2. 1. Cadmio. Reacción con ditizona.

20 ml de la solución problema se regularon a pH 7,8 con solución de amoníaco o bien ácido nítrico. Tras adición de 20 ml de solución de hidróxido de sodio y 5 ml de solución de tartrato sódico y potásico, se agitaron vigorosamente durante medio minuto con 20 ml de una solución de ditizona. La fase orgánica separada se lavó con 20 ml de solución alcalina y se efectuó la medición a 520 nm en cubetas de 2 cm, tomando como referencia tetracloruro de carbono.

III. 2. 2. Cinc. Reacción con cincón.

En un matraz aforado de 50 ml de capacidad, se trataron 20 ml de la solución problema, previamente neutralizada, con 10 ml de solución tampón y 3 ml de solución de reactivo, enrasando con agua hasta completar el volumen de 50 ml. A continuación se efectuó la medición a 625 nm en cubetas de 5 cm tomando agua como referencia.

III. 2. 3. Cobre. Reacción con sodio dietil ditiocarbamato.

Se trataron 20 ml de la solución problema, previamente neutralizada, con 5 ml de solución de dietil-ditiocarbamato sódico. A continuación se agitó durante un minuto fuertemente con 5 ml de cloroformo. El extracto orgánico fué medido a 436 nm en cubetas de 1 cm tomando cloroformo como referencia.

III. 2. 4. Cromo. Reacción con difenilcarbazida.

En un matraz aforado de 50 ml se trataron 30 ml de la solución problema neutralizada previamente, y en la que el cromo había de estar presente en forma de cromato (Cr VI) con 2 ml de ácido sulfúrico y 1 ml de solución de reactivo. Se enrasó con agua hasta los 50 ml y la solución (con una normalidad sulfúrica aproximada de 0,2 N) se midió a 540 nm en cubetas de 5 cm tomando agua como referencia.

III. 2. 5. Mercurio. Reacción con ditizona.

En un embudo de agitación se introdujeron 20 ml de la solución problema, que había de ser 0,5 N en ácido sulfúrico y se procedió a una extracción con dos veces 10 ml de solución de reactivo. El último extracto había de ser de color verde permanente. Los extractos orgánicos reunidos se agitaron por tres veces, con cada vez 10 ml de agua amoniacal y luego otras tres veces con cada vez 10 ml de ácido acético. La medición se realizó a 485 nm en cubetas de 2 cm tomando tetracloruro de carbono como referencia.

III. 2. 6. Plomo. Reacción con dietilditiocarbamato sódico.

Se trataron 20 ml de la solución problema prácticamente neutralizada con 2 ml de solución de citrato sódico, 1 ml de amoníaco, 5 ml de solución de cianuro potásico y con la solución reactivo. Esta mezcla se agitó cada vez un minuto con 10 ml y luego con otros 5 ml de cloroformo. Los dos extractos de cloroformo fueron agitados durante medio minuto con 5 ml de solución de sulfato de cobre y a continuación se filtró por un filtro seco a un matraz aforado de 20 ml. La solución de sulfato de cobre se agitó una vez más con otros 3 ml de cloroformo. Los extractos orgánicos reunidos se enrasaron con cloroformo hasta 20 ml y se efectuó la medición a 436 nm en una cubeta de 5 cm, tomando como referencia cloroformo.

III. 3. Cálculo de la concentración de metal pesado.

Se prepararon varias soluciones patrones, de concentración conocida, de cada uno de los metales y se les realizó la reacción de reconocimiento del metal correspondiente, midiendo posteriormente la densidad óptica de la reacción resultante. Se trazó así la recta de calibrado para cada metal, a partir de la cual se calcularon las concentraciones de metal presentes en cada fracción analizada.

RESULTADOS

I. PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDO POR RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM VAR. TRIFOLII RS1051 Y VAR. PHASEOLI CFN42 Y CIAT899 EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.

Cultivando la cepa bacteriana en batch-culture, en un medio adecuado, se puede obtener cantidad suficiente de polímero para el posterior estudio de sus propiedades físicas y químicas.

Tanto la producción como las propiedades indicadas experimentan variaciones dependiendo de las condiciones a las que sean sometidas las bacterias durante su cultivo.

Los factores críticos para la producción de polisacáridos bacterianos son aquellos que influyen directamente en el crecimiento de los microorganismos (temperatura, pH, y oxigenación), y los relacionados con las fuentes energéticas carbonadas y nitrogenadas.

Por ello en el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la influencia que pueden ejercer algunos factores en la producción de polímero.

I. 1. Producción de exopolisacárido a diferentes temperaturas de incubación.

Primeramente se estudió el crecimiento de las cepas (RS1051, CFN42 y CIAT899) a las siguientes temperaturas: 25, 28, 33 y 37°C. Los resultados obtenidos se expresan en la Figura 1. Se observa que las tres cepas tienen su óptimo de crecimiento a 28°C, dando un mayor rendimiento R. leguminosarum var. trifolii RS1051.

La cepa de R. leguminosarum var. phaseoli CIAT899

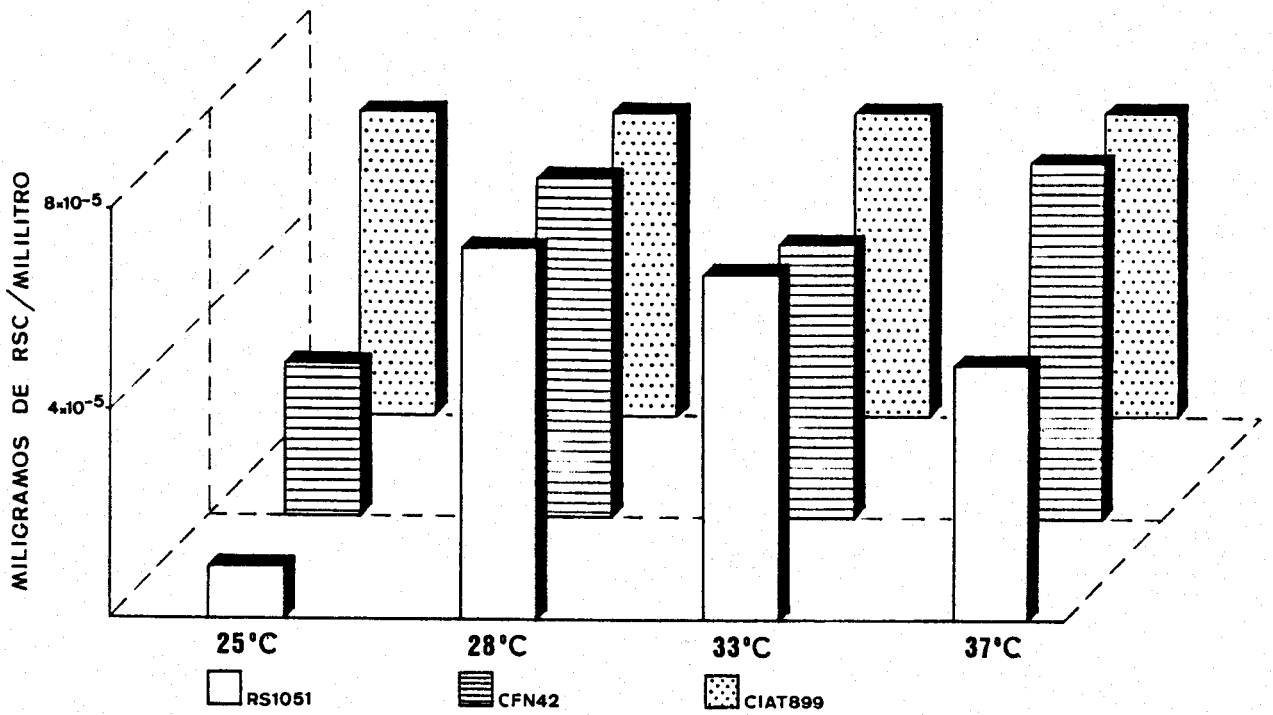


FIGURA 1 .- Estudio del crecimiento de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051 en medio TY, tras incubación a 28°C durante 48 horas.

crece bien a las 4 temperaturas probadas (25, 28, 33 y 37°C).

La cepa de R. leguminosarum var. phaseoli CFN42 presentó un crecimiento ligeramente superior a 37°C aunque también fué alto su crecimiento a 28°C.

A 25°C sólo se desarrolló con normalidad la cepa de R. leguminosarum var. phaseoli CIAT899.

Para un estudio posterior de producción de polímero se utilizaron las temperaturas a las que las cepas presentaban un máximo crecimiento (28 y 37°C).

En la Figura 2 se indica la producción de polímero por las cepas bacterianas a las temperaturas citadas anteriormente. Se observa que tanto a 28 como a 37°C la cepa que presentó mayor producción de polímero fué la de R. leguminosarum var. phaseoli CIAT899. La cepa de R. leguminosarum var. trifolii RS1051 superó en producción y rendimiento a la de la var. phaseoli CFN42 cuando se cultivó a 28°C, pero a 37°C no presentó prácticamente producción de polímero.

I. 2. Producción de exopolisacárido en distintas condiciones de oxigenación.

Rhizobium es un microorganismo aerobio, capaz de utilizar diferentes compuestos carbonados como fuente de energía.

Se han realizado diferentes estudios sobre la proporción adecuada de oxígeno para conseguir un máximo rendimiento en los niveles de producción de polisacárido.

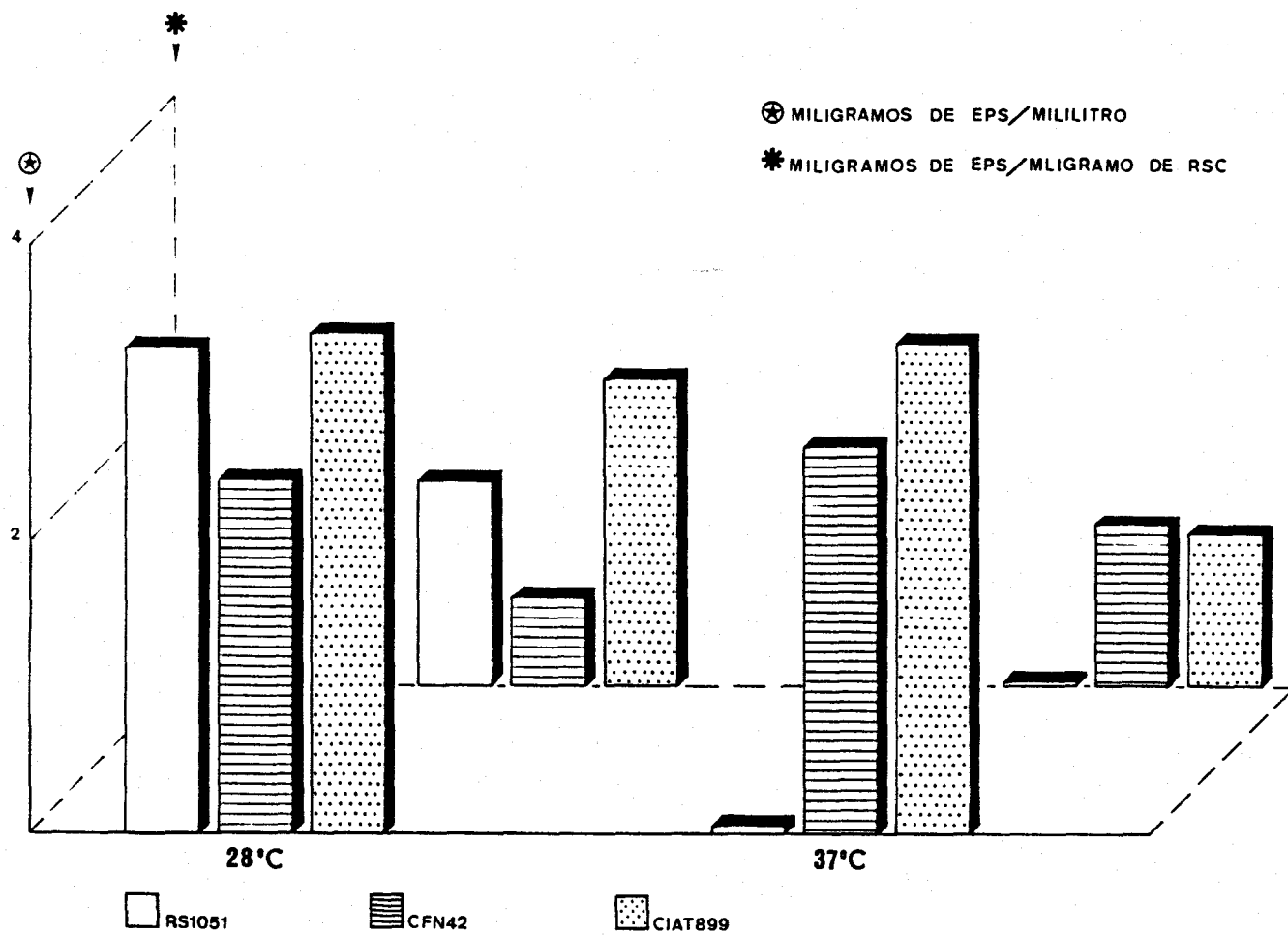


FIGURA 2 .- Estudio de la producción de polisacárido extracelular por las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051, incubadas a 28°C y 37°C.

Todos ellos coinciden en que la producción de polisacárido por bacterias aerobias necesita la presencia de oxígeno disuelto en el medio, pero esta proporción de oxígeno puede ser un factor limitante.

En la Figura 3 se representa gráficamente la producción de polisacárido por las tres cepas en estudio, variando las condiciones de oxigenación del medio (cultivo estático, con aireación forzada, en anaerobiosis).

Se aprecia de forma significativa que el proceso de producción de polímero por nuestras cepas de Rhizobium es claramente aeróbico.

En condiciones de aireación forzada la producción de polisacárido fué alta para las tres cepas. La cepa de R. leguminosarum var. phaseoli CIAT899 fué la de mayor rendimiento en la producción aunque fué la que produjo menos exopolisacárido por unidad de volumen.

En la Figura 4 se estudia la producción de polisacárido extracelular a distintas velocidades de agitación (50, 100, 200 y 300 rpm).

Las tres cepas presentaron mayor producción y rendimiento a 200 rpm.

Se observa que las cepas RS1051 y CIAT899 presentan una producción de exopolisacárido similar, siendo la de mayor rendimiento la CIAT899. CFN42 presenta menor producción y rendimiento.

A la vista de estos resultados, establecimos como velocidad óptima de agitación para estudios posteriores 200 rpm.

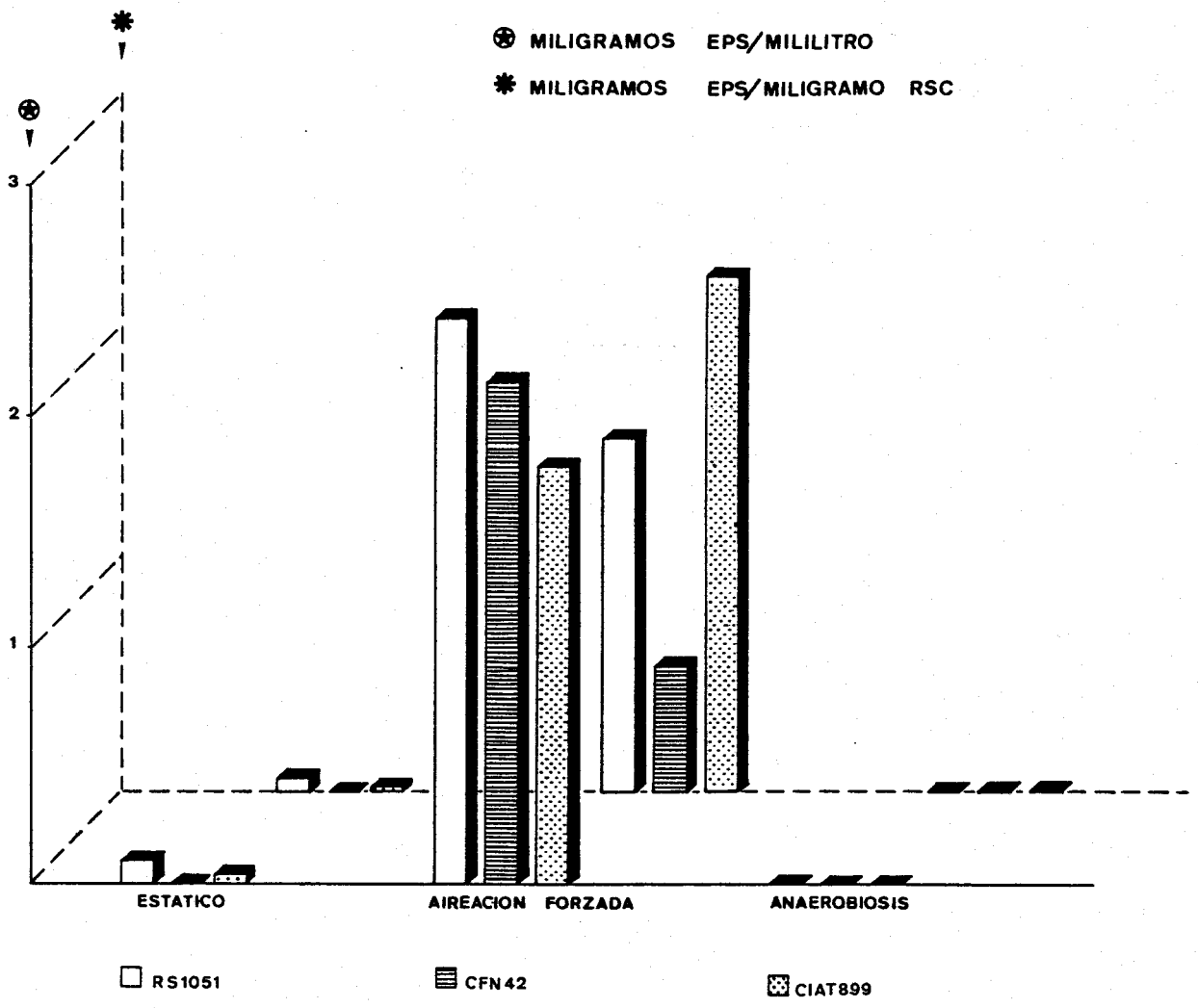


FIGURA 3.- Estudio de la producción de polisacárido extracelular por las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051, con diferentes grados de oxigenación del medio.

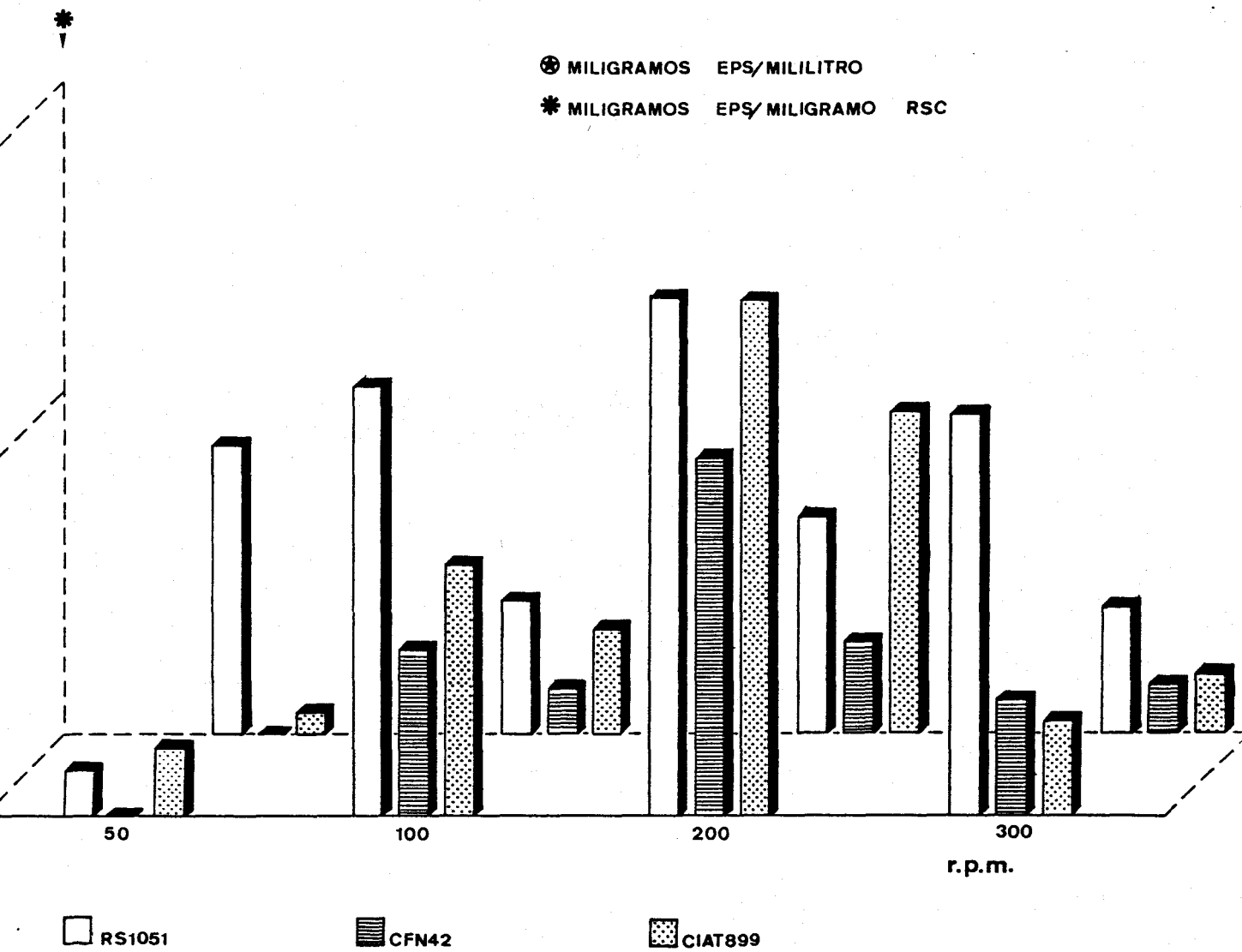


FIGURA 4 .- Estudio de la producción de polisacárido extracelular por las cepas de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 y var. trifolii RS1051, a diferentes velocidades de agitación del medio.

I. 3. Producción de exopolisacárido a diferentes tiempos de incubación.

La producción de polisacárido por las bacterias es un resultado de su proceso metabólico y por tanto de su desarrollo celular. Por ello cabe pensar que dependiendo del tiempo de generación del microorganismo, variará el tiempo de incubación necesario para que la bacteria llegue a un máximo rendimiento en el proceso de elaboración de polisacárido.

En primer lugar se realizó el estudio de crecimiento de las tres cepas en el medio que usamos para la producción de polisacárido (79 de Allen), expresándolo como mg de residuo seco celular (RSC) por ml de medio a las 72, 120 y 168 horas de incubación a 28°C.

En la Figura 5 se presentan estos resultados. El mayor crecimiento celular se produjo en el cultivo de 72 horas y decreció progresivamente hasta las 168 horas de cultivo.

No ocurrió lo mismo con la producción como se puede ver en la Figura 6. El máximo de producción tuvo lugar a las 120 horas por las cepas RS1051 y CIAT899, siendo ligeramente superior a las 168 horas para la CFN42.

El rendimiento de producción máximo se produjo a las 120 horas para la CIAT899 y a las 168 horas para las otras dos cepas.

Para estudios posteriores se utilizó un tiempo de incubación de 120 horas dado que el rendimiento de producción se ve influido por el número de bacterias existentes en el cultivo.

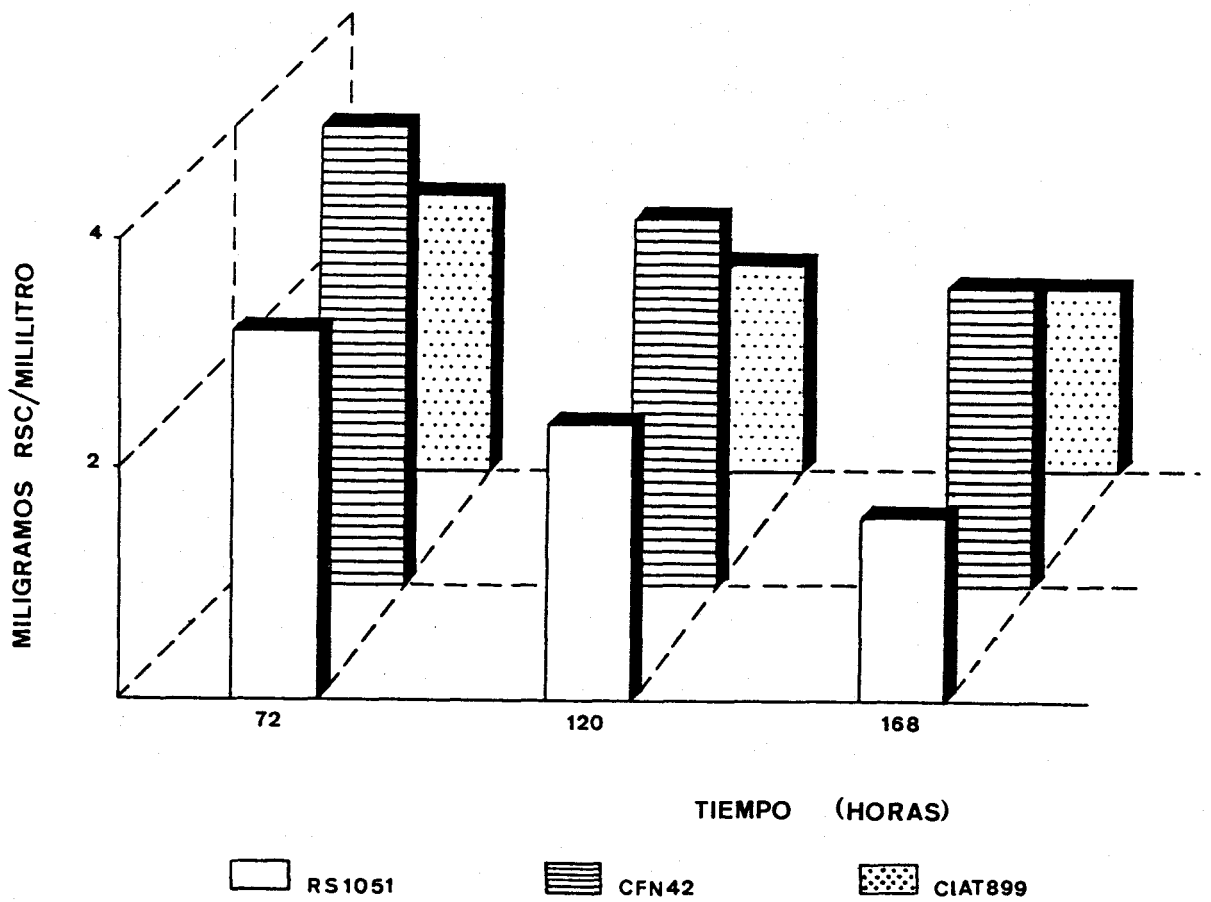


FIGURA 5.- Estudio del crecimiento de las cepas de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 y var. trifolii RS1051 a diferentes tiempos de incubación a 28°C.

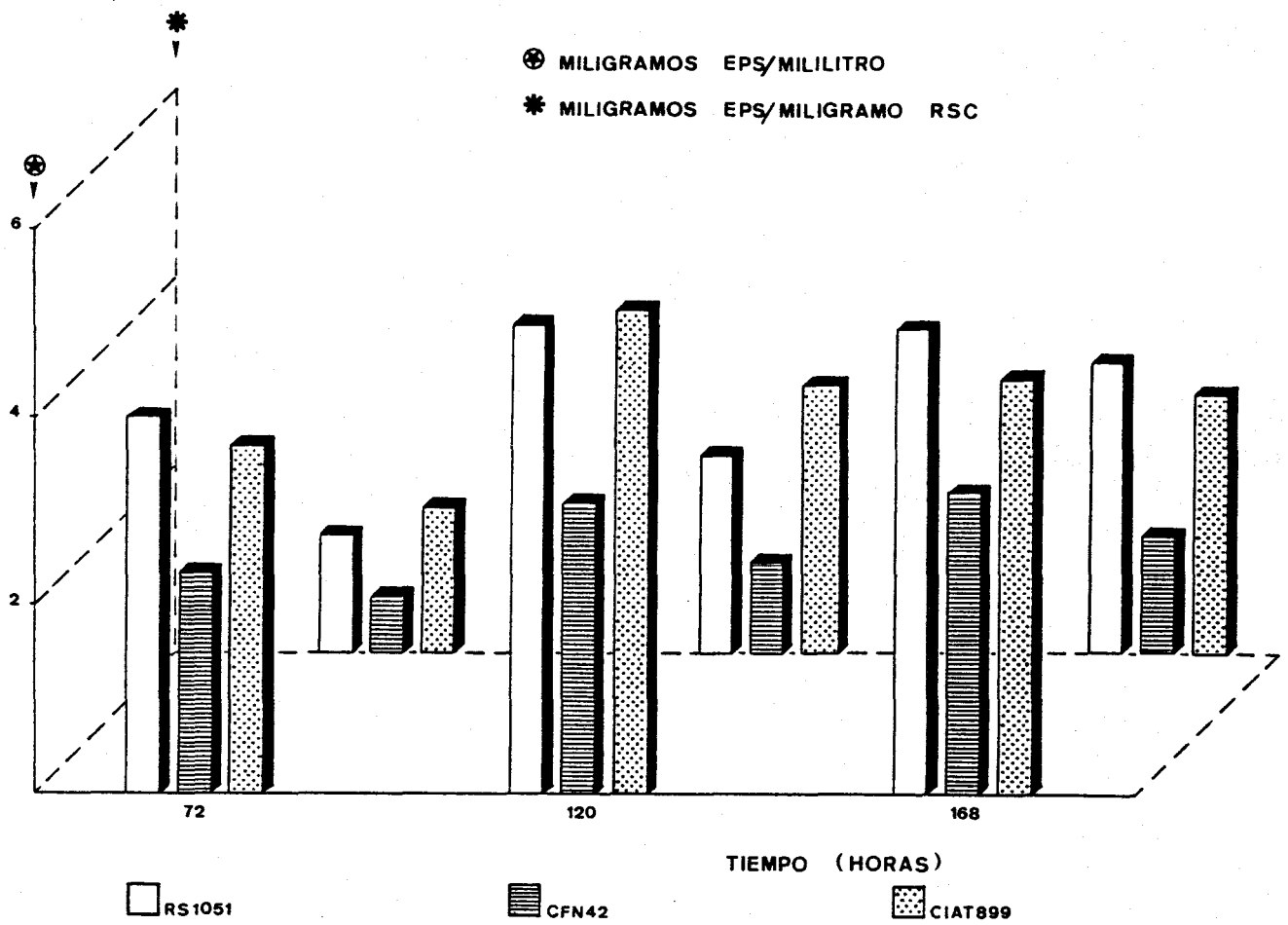


FIGURA 6.- Estudio de la producción de polisacárido extracelular por las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051, en diferentes tiempos de incubación, a 28°C.

I. 4. Producción de exopolisacárido a partir de diferentes fuentes de carbono.

Como se ha indicado en la Introducción, una de las condiciones indispensables para la producción de polímero bacteriano, es la presencia en el medio de cultivo de una fuente de carbono adecuada. En este apartado expresamos los resultados obtenidos al estudiar la producción de polímero por las tres cepas de Rhizobium, usando 8 fuentes de carbono diferentes (arabinosa, citrato sódico, glicerol, glucosa, glutamato sódico, manitol, sacarosa y succinato sódico).

La concentración de los compuestos es un factor influyente para la transformación óptima de la fuente carbonada en polímero por parte de la cepa implicada. Las concentraciones usadas en el presente trabajo (5g/l) fueron descritas por Rodríguez Navarro (1987).

En la Figura 7 se representan los resultados obtenidos para las cepas en estudio para los 8 compuestos diferentes. En ella se observa que la sacarosa fué la mejor fuente de carbono. Para las cepas CFN42 y CIAT899, la más elevada producción de polisacárido se consiguió con sacarosa y manitol, sin embargo, la cepa RS1051 presentó máxima producción cuando se usó glucosa como fuente de carbono, y seguida de la sacarosa.

En cuanto al rendimiento de las células en la producción de polímero, se aprecia un aumento notable, para las tres cepas, cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono.

Como cabía esperar, la producción con citrato sódico fué nula ya que Rhizobium se describe en el manual de

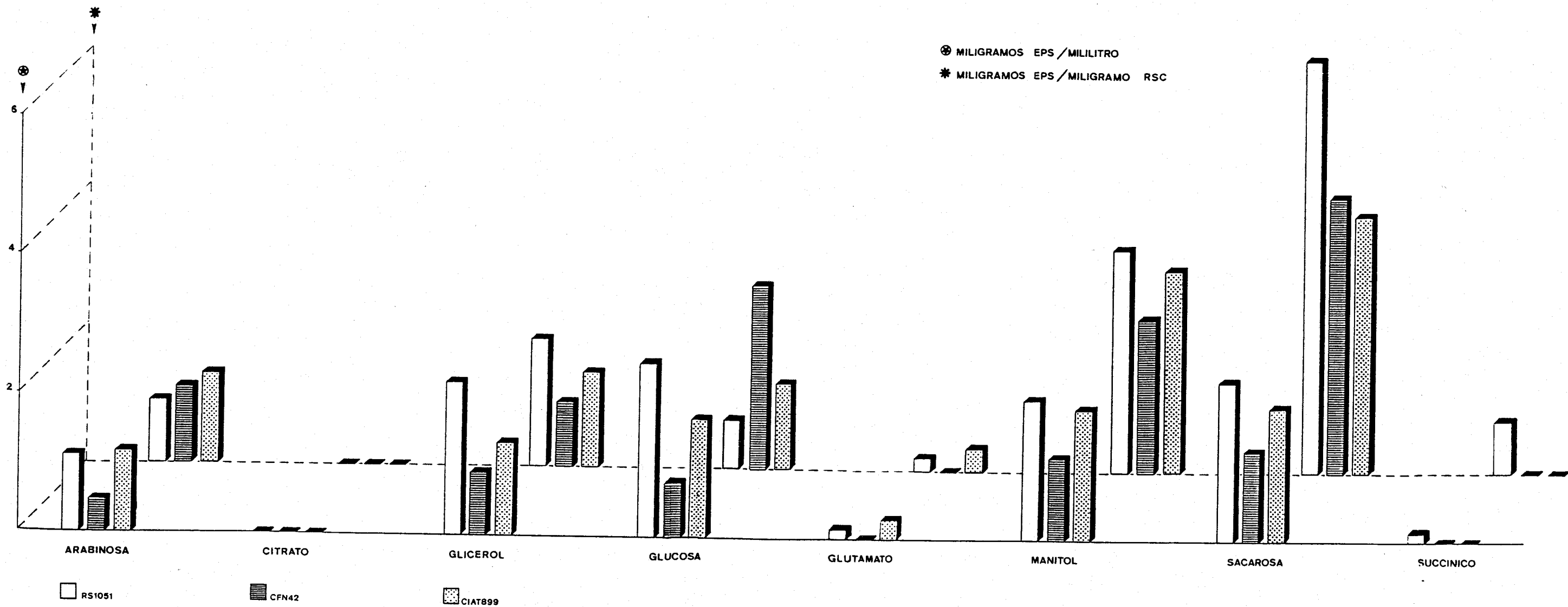


FIGURA 7.- Estudio de la producción de polisacárido extracelular por las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051, en presencia de diferentes fuentes de carbono.

Bergey (Bergey's, 1984) como microorganismo no capaz de usar citrato como fuente de carbono. También fué nula la producción en presencia de succínico por las cepas de R. leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899, y prácticamente inapreciable para la cepa de R. leguminosarum var. trifolii RS1051, aunque con un rendimiento superior al que se esperaba.

A la vista de estos resultados se decidió usar la sacarosa como fuente carbonada para el estudio de la influencia de la fuente de nitrógeno, presente en el medio, en la producción de polisacárido.

I. 5. Producción de exopolisacárido en presencia de distintas fuentes de nitrógeno.

Otro factor limitante para la producción de polisacárido por las bacterias es la presencia en el medio de una fuente de nitrógeno que los organismos utilizan para formar las enzimas necesarias para los procesos metabólicos y de desarrollo celular. Este factor llega a ser limitante siempre que se use en cantidad inadecuada.

Para el presente estudio se han tomado como referencia las condiciones indicadas por Rodríguez Navarro (1987) en la que la concentración óptima de la fuente nitrogenada en el medio de cultivo, para la producción de polímero por Rhizobium es de 1g/l.

Se han ensayado cuatro compuestos diferentes (extracto de levadura, cloruro amónico, glutamato sódico y nitrato potásico) y los resultados se representan en la Figura 8.

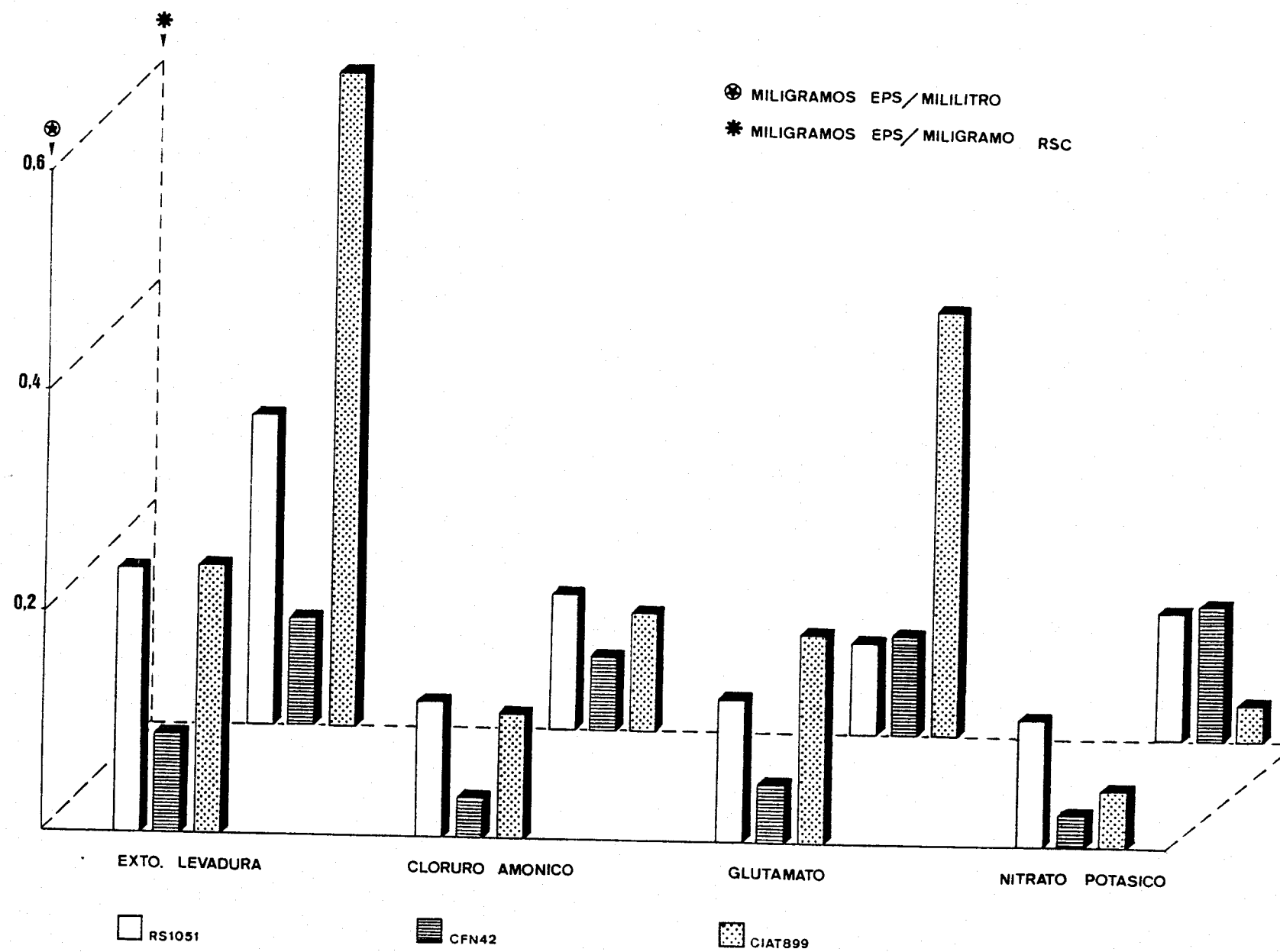


FIGURA 8.- Estudio de la producción de polisacárido extracelular por las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051, en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno.

Podemos ver que para las tres cepas la mayor producción de polímero, con una diferencia significativa, la presentaron cuando se cultivaron en extracto de levadura, siendo el glutamato sódico la siguiente mejor fuente de nitrógeno, pero siempre que se combine con una fuente de carbono adecuada.

El rendimiento en la producción para las cepas RS1051 y CIAT899 fué bastante superior en presencia de extracto de levadura, sobre todo por la cepa CIAT899. Sin embargo, La cepa CFN42 presentó mayor rendimiento cuando el compuesto utilizado como fuente de nitrógeno fué nitrato potásico, aunque con diferencia poco notable respecto al extracto de levadura.

También parece interesante destacar el alto rendimiento que presenta la cepa de R. leguminosarum var. phaseoli CIAT899 cuando se utilizó glutamato sódico como fuente de nitrógeno.

I. 6. Producción de exopolisacárido en presencia de metales pesados.

Para este estudio se cultivaron las cepas en medio 79 de Allen al cual se añadió en cada caso la solución de la sal del metal en la proporción adecuada para que quedasen en el medio de producción a las concentraciones mM que se indican a continuación: cadmio, 0,1; cinc, 1,5; cobre, 1,5; cromo, 0,5; plomo, 5.

Las soluciones de metales fueron añadidas al medio de Allen esterilizándolas previamente por filtración en membrana Millipore de 0,45 μ de diámetro de poro.

En la Figura 9 se observa que el cadmio y el mercurio son los metales que más afectaron el crecimiento de la cepa de R. leguminosarum var. trifolii RS1051. El metal que menos afectó el desarrollo de dicha cepa es el cinc. En cambio, se observa una disminución en la producción de polímero por la citada cepa cuando se cultivó en presencia de todos los metales salvo cuando se cultivó en presencia de cromo y plomo.

II. ESTUDIO DEL pH DE LOS EXOPOLISACARIDOS.

Los polisacáridos producidos por las cepas pertenecientes al género Rhizobium son normalmente polisacáridos ácidos. En este apartado hemos estudiado el pH de los polisacáridos de las cepas de R. leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 y var. trifolii RS1051. En la Tabla 5 se recogen los valores obtenidos. Para los tres polímeros se obtuvo prácticamente el mismo valor de pH ácido.

III. ESTUDIO DE LA COMPOSICION DE LOS EXOPOLISACARIDOS.

Zevenhuizen (1973) publicó que los exopolisacáridos de Rhizobium están compuestos principalmente por D-glucosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico, ácido pirúvico y grupos O-acetilos en las proporciones 5:1:2:2:3. Las uniones entre ellos fueron determinadas por análisis por metilación junto con reducción de carboxilos. Además demostró que la estructura de los polisacáridos

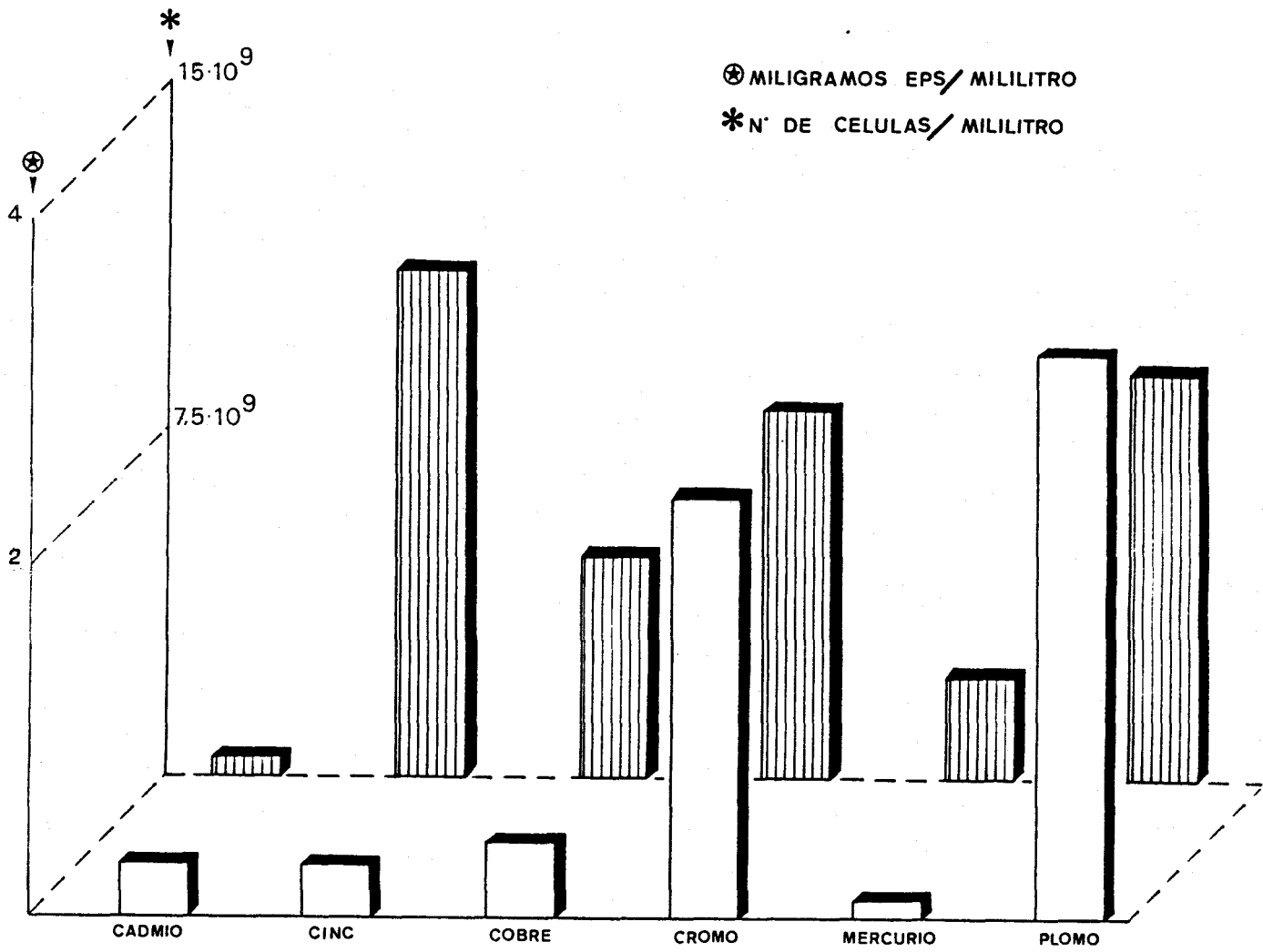


FIGURA 9.- Estudio del crecimiento y producción de polisacárido extracelular por las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *trifolii* RS1051 y var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 cuando se cultivan en presencia de metales.

TABLA 5.- Valores del pH de las soluciones de los polisacáridos de las cepas de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN 42 y CIAT899 y var. trifolii RS1051 en solución.

EPS	pH
RS1051	2,90
CFN42	2,90
CIAT899	3,00

extracelulares de R. leguminosarum var. viciae y var. phaseoli son muy similares, o posiblemente idénticas.

Chaudari y col. (1973) encontraron D-glucosa, D-galactosa, ácido D-glucurónico, ácido pirúvico y grupos O-acetilos en la proporción 6:1:1,4:2:2.

En el presente trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la composición de los polisacáridos extracelulares de R. leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 y var. trifolii RS1051, mediante cromatografía de alta resolución líquido-líquido. Los cromatogramas obtenidos nos sirven de screening general para buscar diferencias significativas entre los polímeros producidos por las cepas ya mencionadas, en diferentes condiciones de cultivo.

En la Figura 10 se observa en primer lugar (a) el cromatograma correspondiente a la mezcla patrón (sus componentes se encuentran en una concentración de 1 mg/ml.). Los otros tres cromatogramas corresponden a las hidrólisis de los polisacáridos extracelulares de las cepas RS1051, CFN42 y CIAT899 (b, c y d respectivamente) en las condiciones normales de cultivo en medio 79 de Allen (28°C y 200 rpm de agitación).

Tomando como referencia el cromatograma correspondiente a la mezcla patrón sabemos que los tiempos de retención, con las condiciones empleadas, para los ácidos glucurónico y galacturónico, glucosa, galactosa, pirúvico, succínico y acético son respectivamente: 15,21; 16,67; 17,00; 18,01; 18,77; 21,43 y 28,45 minutos.

En las muestras que se analizan se pueden presentar ligeras diferencias de estos valores debido a que no se

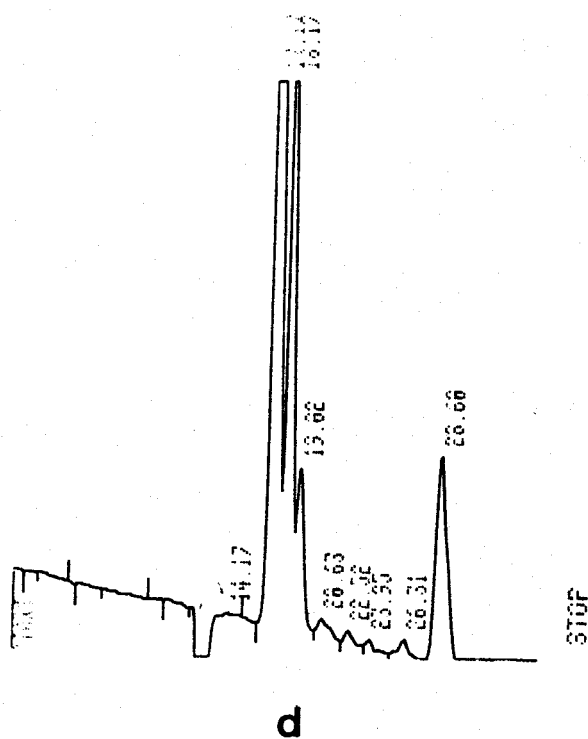
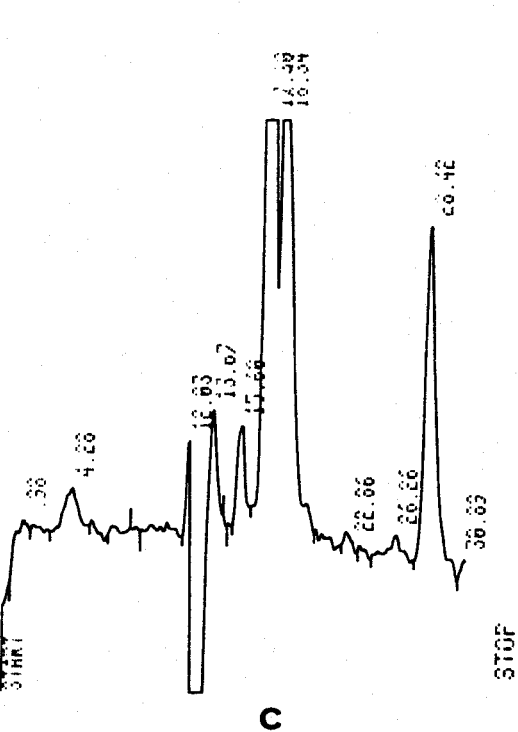
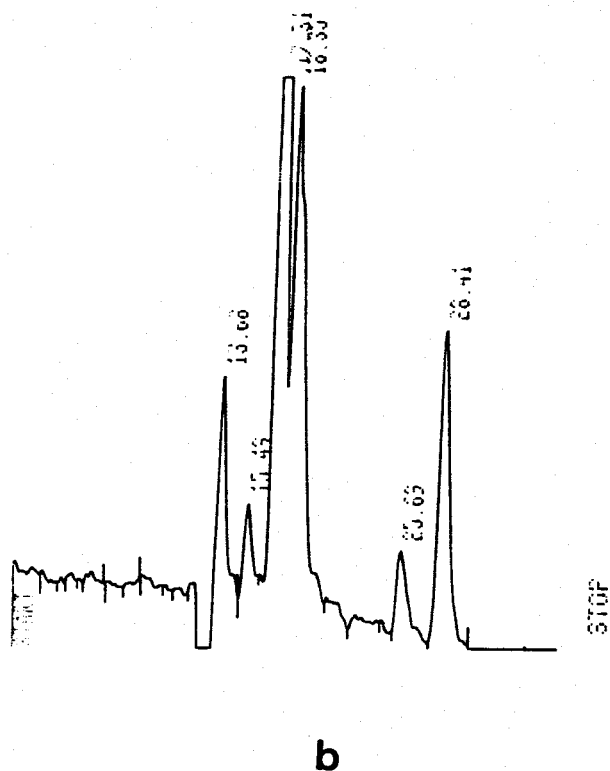
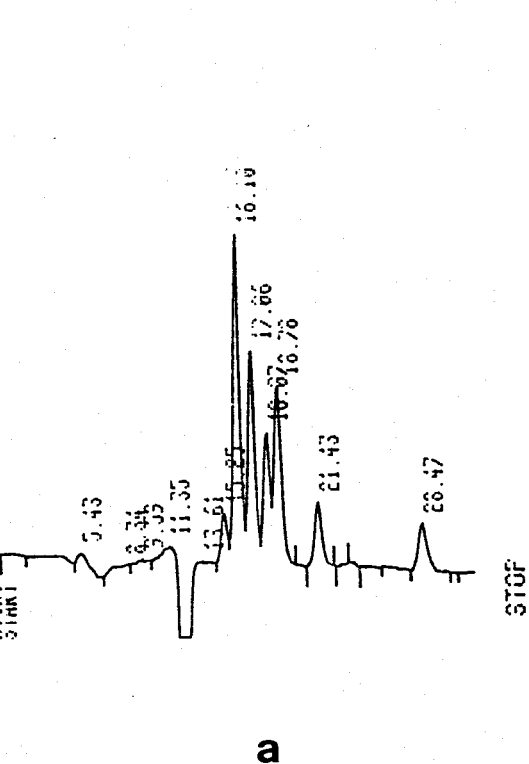


FIGURA 10.- Cromatogramas de los hidrolizados de los polisacáridos extracelulares de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *trifolii* RS1051 y var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 (b, c, y d) y de una mezcla calibrada (a).

puede conseguir una total reproducibilidad de los resultados de una muestra a otra.

Se observa que los exopolisacáridos de las tres cepas presentan como compuestos comunes: glucosa, galactosa y ácido acético. Los polisacáridos extracelulares de las cepas CFN42 y RS1051 contienen ácidos urónicos en su molécula, los cuales están ausentes en la molécula del polisacárido extracelular de la cepa CIAT899.

Por estudios paralelos que se llevan a cabo en el Departamento de Química Orgánica en la Facultad de Ciencias Químicas de nuestra Universidad, dirigidos por el Dr. Gil, se conoce que los tres polisacáridos que estamos estudiando presentan en su molécula ácido pirúvico como componente habitual. En los cromatogramas que se presentan sólo se separó el pico de pirúvico en el exopolisacárido de la cepa CIAT899 (con un tiempo de retención de 19,02 min.). En los otros dos polisacáridos este pico queda enmascarado por el de galactosa.

El polisacárido extracelular de la cepa RS1051 presentó un componente propio de este polímero que es el ácido 3-hidroxi-butírico y cuyo pico sale a un tiempo de retención de 25,69 min.

En las Tablas 6, 7 y 8 se pueden ver las relaciones molares entre los componentes de estos tres polímeros cuando varían las condiciones de cultivo de las cepas, y en la Tabla 9 las correspondientes al exopolisacárido de RS1051 producido en presencia de metales.

TABLA 6.- Estudio de la composición del polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051. Relación molar entre sus componentes.

	GLC	GAL	AA	AU	AP	3HB
<u>TIEMPO INCUBACION</u> ^(1,2,4)						
72 h	1,30	1,00	0,60	0,04	ND	0,30
120 h	2,00	1,00	0,90	0,10	ND	0,40
168 h	2,20	1,00	0,50	0,10	ND	0,50
<u>VELOCIDAD AGITACION</u> ^(1,3,4)						
50 rpm	2,00	1,00	0,60	0,10	0,25	0,60
100 rpm	2,00	1,00	0,40	0,20	ND	0,14
200 rpm	2,10	1,00	0,50	0,10	ND	0,10
<u>AIREACION FORZADA</u> ^(1,3,4)						
	2,20	1,00	0,60	0,08	ND	0,20
<u>FUENTE CARBONADA</u> ^(2,3,4)						
ARABINOSA	2,00	1,00	0,60	0,10	ND	0,06
GLICEROL	0,60	1,00	0,03	0,50	ND	0,20
GLUCOSA	1,00	1,00	0,60	0,20	ND	0,20
GLUTAMATO SODICO	0,60	1,00	0,60	0,00	ND	0,08
MANITOL	0,60	1,00	0,20	0,40	ND	0,30
SACAROSA	2,20	1,00	0,60	0,30	ND	0,20
SUCCINATO SODICO	1,40	1,00	0,20	0,00	ND	0,02
<u>FUENTE NITROGENADA</u> ^(2,3,5)						
CLORURO AMONICO	0,80	1,00	0,60	0,06	ND	0,06
EXTRACTO DE LEVADURA	2,20	1,00	0,60	0,09	ND	0,09
GLUTAMATO	2,40	1,00	0,60	0,10	ND	0,00
NITRATO POTASICO	1,60	1,00	0,10	1,00	ND	0,02

GLC. glucosa; GAL. galactosa; AA. ácido acético; AU. ácidos urónicos; AP. ácido pirúvico; 3HB. 3-hidroxibutírico; ND. no detectado.

- (1) Se utilizó como fuente de carbono glucosa (2,4 g/l) y manitol (7,6 g/l).
- (2) Los cultivos se incubaron a 28°C con una agitación de 200 rpm.
- (3) El polímero se extrajo a los 5 días de incubación del cultivo.
- (4) Se utilizó como fuente de nitrógeno extracto de levadura (1 g/l).
- (5) Se utilizó como fuente de carbono sacarosa (5 g/l).

TABLA 7.- Estudio de la composición del polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42. Relación molar entre sus componentes.

	GLC	GAL	AA	AU	AP	3HB
<u>TIEMPO INCUBACION</u> ^(1,2,4)						
72 h	1,80	1,00	0,40	0,10	ND	NP
120 h	2,00	1,00	0,50	0,20	ND	NP
168 h	2,30	1,00	0,40	0,20	ND	NP
<u>VELOCIDAD AGITACION</u> ^(1,3,4)						
50 rpm	—	—	—	—	—	—
100 rpm	2,50	1,00	0,60	0,20	ND	NP
200 rpm	2,20	1,00	0,50	0,12	ND	NP
<u>AIREACION FORZADA</u> ^(1,3,4)						
	2,00	1,00	0,40	0,10	ND	NP
<u>FUENTE CARBONADA</u> ^(2,3,4)						
ARABINOSA	1,90	1,00	0,09	ND	ND	NP
GLICEROL	2,80	1,00	0,50	0,20	ND	NP
GLUCOSA	2,70	1,00	0,60	0,08	ND	NP
GLUTAMATO SODICO	—	—	—	—	—	—
MANITOL	2,50	1,00	0,60	0,10	ND	NP
SACAROSA	2,00	1,00	0,09	ND	ND	NP
SUCCINATO SODICO	—	—	—	—	—	—
<u>FUENTE NITROGENADA</u> ^(2,3,5)						
CLORURO AMONICO	1,00	1,00	0,70	ND	ND	NP
EXTRACTO DE LEVADURA	1,70	1,00	0,02	ND	ND	NP
GLUTAMATO	3,00	1,00	0,60	0,10	ND	NP
NITRATO POTASICO	0,60	1,00	0,01	ND	ND	NP

GLC. glucosa; GAL. galactosa; AA. ácido acético; AU. ácidos urónicos; AP. ácido pirúvico; 3HB. 3-hidroxibutírico; ND. no detectado; NP. no presenta; — no hubo producción.

- (1) Se utilizó como fuente de carbono glucosa (2,4 g/l) y manitol (7,6 g/l).
- (2) Los cultivos se incubaron a 28°C con una agitación de 200 rpm.
- (3) El polímero se extrajo a los 5 días de incubación del cultivo.
- (4) Se utilizó como fuente de nitrógeno extracto de levadura (1 g/l).
- (5) Se utilizó como fuente de carbono sacarosa (5 g/l).

TABLA 8.- Estudio de la composición del polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CIAT899. Relación molar entre sus componentes.

	GLC	GAL	AA	AU	AP	3HB
<u>TIEMPO INCUBACION</u> (1,2,4)						
72 h	1,40	1,00	0,05	NP	ND	NP
120 h	3,00	1,00	0,10	NP	ND	NP
168 h	3,10	1,00	0,10	NP	ND	NP
<u>VELOCIDAD AGITACION</u> (1,3,4)						
50 rpm	2,30	1,00	0,40	NP	0,90	NP
100 rpm	3,70	1,00	0,10	NP	ND	NP
200 rpm	3,00	1,00	0,50	NP	0,30	NP
<u>AIREACION FORZADA</u> (1,3,4)						
	2,80	1,00	0,20	NP	0,40	NP
<u>FUENTE CARBONADA</u> (2,3,4)						
ARABINOSA	2,00	1,00	0,60	NP	ND	NP
GLICEROL	2,00	1,00	0,10	NP	ND	NP
GLUCOSA	2,20	1,00	0,10	NP	ND	NP
GLUTAMATO SODICO	1,00	1,00	0,50	NP	ND	NP
MANITOL	2,00	1,00	0,30	NP	ND	NP
SACAROSA	2,40	1,00	0,30	NP	ND	NP
SUCCINATO SODICO	—	—	—	—	—	—
<u>FUENTE NITROGENADA</u> (2,3,5)						
CLORURO AMONICO	1,50	1,00	0,10	NP	ND	NP
EXTRACTO DE LEVADURA	2,30	1,00	0,40	NP	ND	NP
GLUTAMATO	2,30	1,00	0,50	NP	ND	NP
NITRATO POTASICO	1,50	1,00	0,10	NP	ND	NP

GLC. glucosa; GAL. galactosa; AA. ácido acético; AU. ácidos urónicos; AP. ácido pirúvico; 3HB. 3-hidroxibutírico; ND. no detectado; NP. no presenta; — no hubo producción.

- (1) Se utilizó como fuente de carbono glucosa (2,4 g/l) y manitol (7,6 g/l).
- (2) Los cultivos se incubaron a 28°C con una agitación de 200 rpm.
- (3) El polímero se extrajo a los 5 días de incubación del cultivo.
- (4) Se utilizó como fuente de nitrógeno extracto de levadura (1 g/l).
- (5) Se utilizó como fuente de carbono sacarosa (5 g/l).

TABLA 9.- Estudio de la composición del polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051 cuando se cultiva en presencia de metales. Relación molar entre sus componentes.

METAL	GLC	GAL	AA	AU	AP	3HB
CINC	2,20	1,00	0,70	0,20	0,40	0,20
COBALTO	2,20	1,00	1,40	0,20	0,80	0,80
COBRE	2,20	1,00	0,07	2,20	1,50	ND
CROMO	4,20	1,00	0,20	5,20	4,40	0,10
MERCURIO	NT	NT	NT	NT	NT	NT
PLOMO	3,00	1,00	0,08	2,50	0,60	0,10
CONTROL	2,10	1,00	0,50	0,10	ND	0,10

GLC. glucosa; GAL. galactosa; AA. ácido acético; AU. ácidos urónicos; AP. ácido pirúvico; 3HB. 3-hidroxibutírico; ND. no detectado; NT. no ensayado.

En todos los ensayos se utilizó glucosa (2,4 g/l) y manitol (7,6 g/l) como fuente de carbono. El polímero se extrajo a los 5 días de cultivo a 28°C con una agitación de 200 rpm.

IV. ESTUDIO REOLOGICO DE LOS EXOPOLISACARIDOS.

La reología es la ciencia que estudia las deformaciones de la materia bajo la influencia de tensiones deformantes.

Las aplicaciones de la reología en el campo industrial son diversas: pinturas, alimentación, lubricantes, cosmética, farmacia galénica, etc.

La reometría pone a punto los métodos experimentales para la determinación de las características reológicas. La reología aplicada estudia las características reológicas que ha de tener un producto para que su comportamiento sea óptimo desde el punto de vista de su aplicación.

IV. 1. Obtencion de los reogramas.

Los reogramas son la representación gráfica de la relación entre la tensión de cizallamiento (τ) y la velocidad de deformación (D) que se le aplica a la muestra en estudio.

La tensión de cizallamiento se define como la relación entre la fuerza de desplazamiento y la superficie de la placa del viscosímetro utilizado.

Se ha realizado en primer lugar el estudio de la variación de la tensión de deformación, para nuestros polisacáridos, a concentraciones crecientes de 0,25 a 3 %, sometiéndolos a una velocidad de deformación creciente desde 0 a 500 rpm, descendiendo a continuación otra vez hasta cero, todo ello en un tiempo de 60 segundos.

Como se disenterá posteriormente, las soluciones diluidas de polímeros se suelen comportar como fluidos newtonianos, pero las soluciones concentradas poseen unas características reológicas diferentes. Por tal motivo reciben el nombre de fluidos no newtonianos. Este tipo de fluidos se caracteriza por los parámetros reológicos que son las constantes de las ecuaciones que definen su comportamiento reológico, o bien por los reogramas.

En las Figuras 11, 12 y 13 se representan los reogramas correspondientes a las soluciones de los polisacáridos extracelulares de las cepas de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 y var. trifolii RS1051, a diferentes concentraciones (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3 %). En abcisas se representa la tensión de deformación en cm y en ordenadas la velocidad de deformación en cm.

IV. 2. Calculo de la viscosidad de los exopolisacáridos.

Por tratamiento matemático de los reogramas obtenidos (Métodos II. 6. 2.) se obtuvo la viscosidad de las soluciones de los polímeros.

La tensión de cizallamiento aumentó proporcionalmente a la velocidad de cizallamiento y a la viscosidad.

En los fluidos newtonianos la relación entre la tensión de cizallamiento y la velocidad de deformación es constante:

$$\frac{\tau}{D} = \text{viscosidad } (\mu) = \text{constante}$$

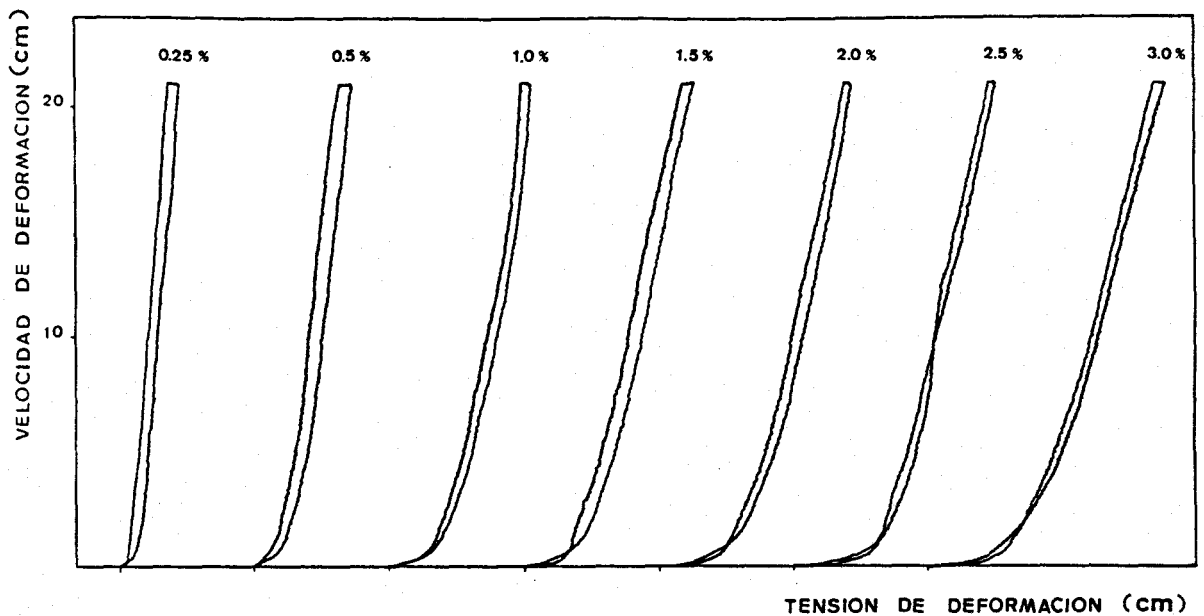


FIGURA 11 .- Reogramas obtenidos de las soluciones del polisacárido extracelular de la cepa de Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051, a distintas concentraciones, sometidas a una velocidad de deformación creciente desde 0 a 500 rpm, decreciendo a continuación hasta cero.

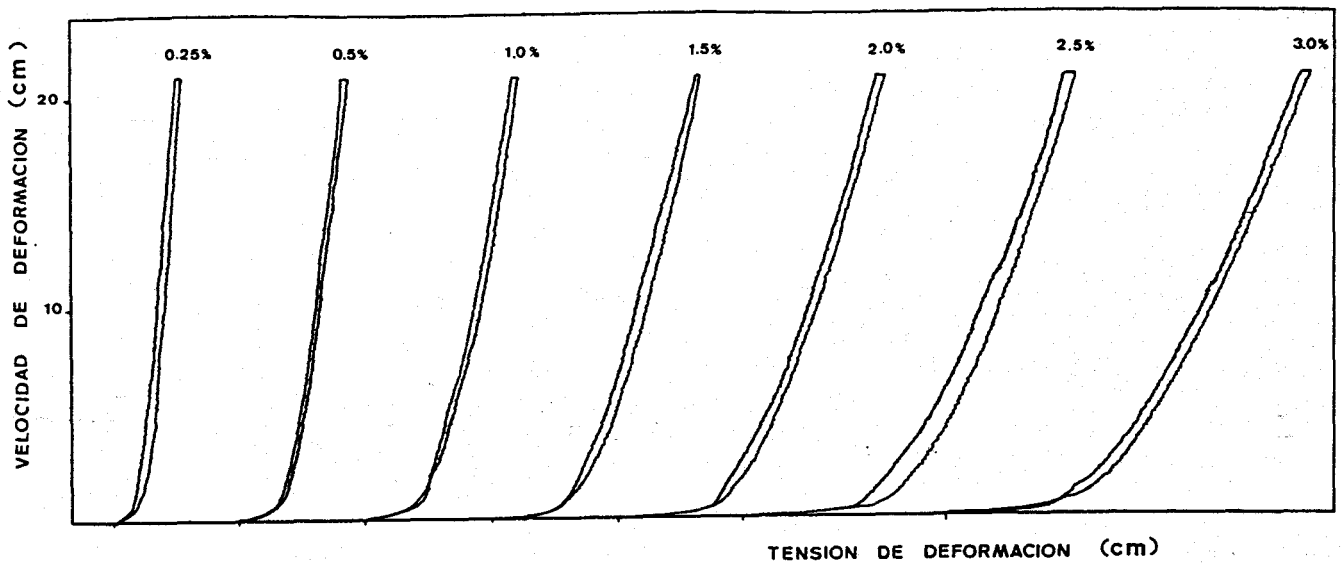


FIGURA 12.- Reogramas obtenidos de las soluciones del polisacárido extracelular de la cepa de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42, a distintas concentraciones, sometidas a una velocidad de deformación creciente desde 0 a 500 rpm, decreciendo a continuación hasta cero.

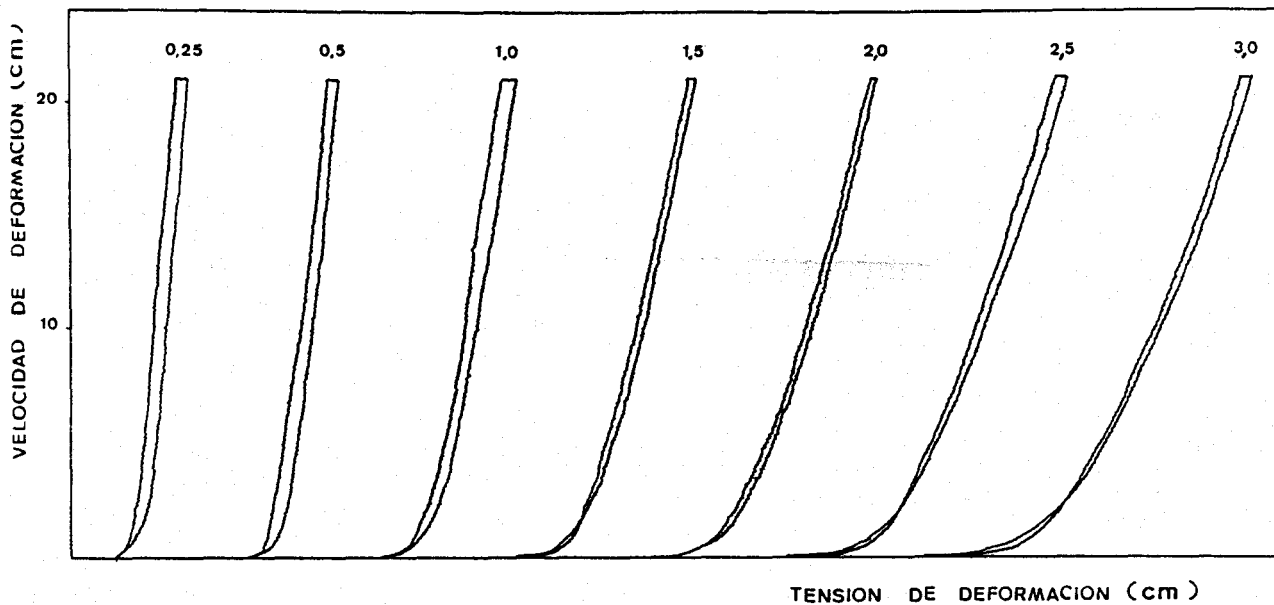


FIGURA 13.- Reogramas obtenidos de las soluciones del polisacárido extracelular de la cepa de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CIAT899, a distintas concentraciones, sometidas a una velocidad de deformación creciente desde 0 a 500 rpm, decreciendo a continuación hasta cero.

El diagrama reológico para estos fluidos es una recta que pasa por el origen. La viscosidad es constante y sólo depende de la temperatura.

En los fluidos no newtonianos no puede usarse el concepto viscosidad por dos causas:

- La consistencia depende de la tensión tangencial, y por tanto, no es constante y puede variar entre amplios límites. En cambio, la viscosidad es siempre constante.

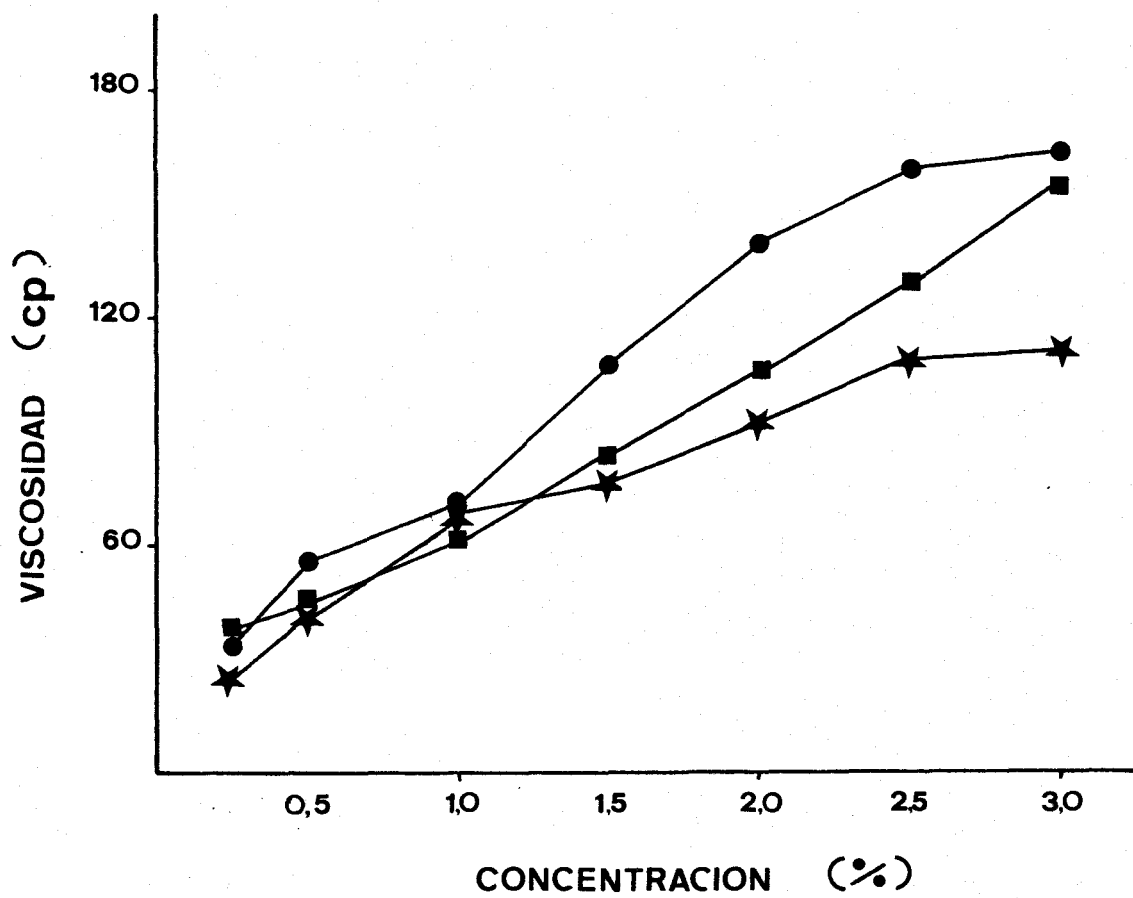
- La consistencia tiene unas unidades diferentes a la viscosidad.

En los fluidos no newtonianos se ha utilizado con frecuencia el concepto de viscosidad aparente, que es la que tendría un fluido newtoniano cuya recta pasara por el mismo punto del reograma.

IV. 2. 1. Estudio de la influencia de la concentración sobre la viscosidad de las soluciones de los exopolisacáridos.

En la Figura 14 se representa la variación de la viscosidad de las soluciones de los tres exopolisacáridos sometidos a estudio con la concentración, cuando se someten a un gradiente de deformación de $4570,238 \text{ s}^{-1}$ (250 rpm) a 28°C . En abcisas se representan las concentraciones de las soluciones de los polímeros expresadas en tanto por ciento, y en ordenadas se representa la viscosidad expresada en centipoises (cp).

En las Tablas 10, 11 y 12 se resumen los valores de tensión de deformación y viscosidad para los tres



★ RS1051 ■ CIAT899 ● CFN42

FIGURA 14 .- Estudio de la viscosidad de las soluciones de los polisacáridos extracelulares de las cepas de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 y var. trifolii RS1051, a diferentes concentraciones, correspondientes a una velocidad de deformación de $4570,238 \text{ s}^{-1}$ (250 rpm).

TABLA 10.- Valores de viscosidad aparente de las soluciones del polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051 a diferentes concentraciones.

CONCENTRACION (%)	\hat{r} (cm)	τ (din/cm ²)	μ (cp)
0,25	1,79	1147,13	25,10
0,50	3,11	1984,13	43,40
1,00	4,86	3104,73	67,90
1,50	5,44	3476,28	76,10
2,00	6,58	4204,30	91,90
2,50	7,79	4978,92	108,94
3,00	7,94	5074,41	111,00

- Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (22°C).
- Los valores que se indican corresponden a una velocidad de deformación de 4570,238 S⁻¹ (250 rpm).

TABLA 11.- Valores de viscosidad aparente de las soluciones del polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42 a diferentes concentraciones.

CONCENTRACION (%)	$\hat{\tau}$ (cm)	τ (din/cm ²)	μ (cp)
0,25	2,54	1622,48	35,50
0,50	4,00	2557,59	55,96
1,00	6,26	4001,30	68,80
1,50	7,68	4912,38	107,50
2,00	10,00	6392,07	139,90
2,50	11,35	7254,64	158,70
3,00	14,92	9534,00	163,90

- Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (22°C).
- Los valores que se indican corresponden a una velocidad de deformación de 4570,238 S⁻¹ (250 rpm).

TABLA 12.- Valores de viscosidad aparente de las soluciones del polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CIAT899 a diferentes concentraciones.

CONCENTRACION (%)	\hat{t} (cm)	τ (din/cm ²)	μ (cp)
0,25	2,51	1605,61	35,10
0,50	3,03	1935,10	42,30
1,00	4,50	2873,99	62,90
1,50	5,98	3823,74	83,70
2,00	7,58	4845,52	106,00
2,50	9,24	5906,24	129,20
3,00	11,06	7071,77	154,70

- Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (22°C).
- Los valores que se indican corresponden a una velocidad de deformación de 4570,238 S⁻¹ (250 rpm).

polímeros, correspondientes a una velocidad de deformación de $4570,238 \text{ s}^{-1}$.

Se observa como la viscosidad para una velocidad de deformación constante aumentó con la concentración del polímero.

Las viscosidades de las soluciones de los polisacáridos producidos por las cepas de R. leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 fueron similares entre sí, siendo algo superior la de CFN42. Ambas fueron superiores a la de la solución del polisacárido extracelular de R. leguminosarum var. trifolii RS1051.

IV. 2. 2. Estudio de la influencia de la temperatura sobre la viscosidad de las soluciones de los exopolisacáridos.

En los fluidos no newtonianos la viscosidad se ve influida por los cambios de temperatura, debido, a que éstos pueden ocasionar modificaciones estructurales en la molécula del polímero, adaptándose ésta a la estructura más estable.

En la Figura 15 representamos el estudio de la influencia de los cambios de temperatura sobre las soluciones de nuestros polímeros, a la concentración del 1 %.

En abcisas se representan las temperaturas a las que se sometieron las soluciones de los polímeros (22, 40, 60 y 80°C) y en ordenadas los valores de viscosidad (cp).

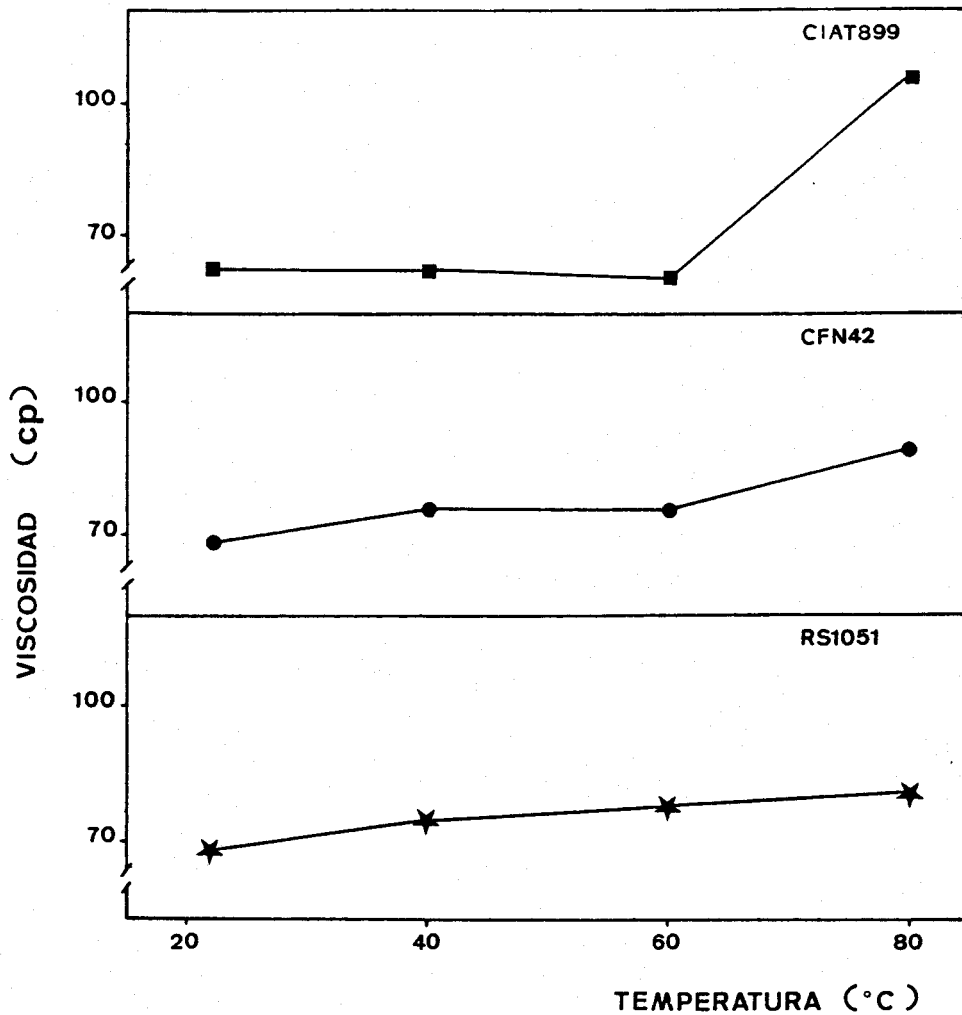


FIGURA 15.- Estudio de la viscosidad de las soluciones, al 1%, de los polisacáridos extracelulares de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051, a diferentes temperaturas, correspondientes a una velocidad de deformación de $4570,238 \text{ s}^{-1}$ (250 rpm).

Se observó en todos los casos un aumento de la viscosidad con la temperatura, el cual se hace muy marcado para el exopolisacárido de la cepa de R. leguminosarum var. phaseoli CIAT899 cuando la temperatura asciende hasta 80°C.

IV. 2. 3. Estudio de la influencia de los cambios de pH sobre la viscosidad de las soluciones de los exopolisacáridos.

De la misma manera que la temperatura, los cambios de pH de las soluciones pueden afectar la estructura final del polímero ocasionando cambios en la conformación final de la molécula que puedan influir en la viscosidad del polímero.

En la Figura 16 se representa el estudio de la viscosidad de las soluciones de nuestros polímeros, sometidas a cambios de pH comprendidos entre 1,5 y 13 unidades y a temperatura ambiente (22°C).

Las cepas de R. leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 mostraron poca variación de su viscosidad con los cambios de pH, aunque entre sí parecen tener un comportamiento contrario.

La cepa de R. leguminosarum var. trifolii RS1051, mostró una influencia algo mayor del pH sobre la viscosidad de su polisacárido en solución y su comportamiento fué similar al que presentó el polisacárido de la cepa de R. leguminosarum var. phaseoli CFN42, ya que ambos presentaron un máximo de viscosidad a pH 9 disminuyendo ligeramente cuando el pH se hizo superior a este valor.

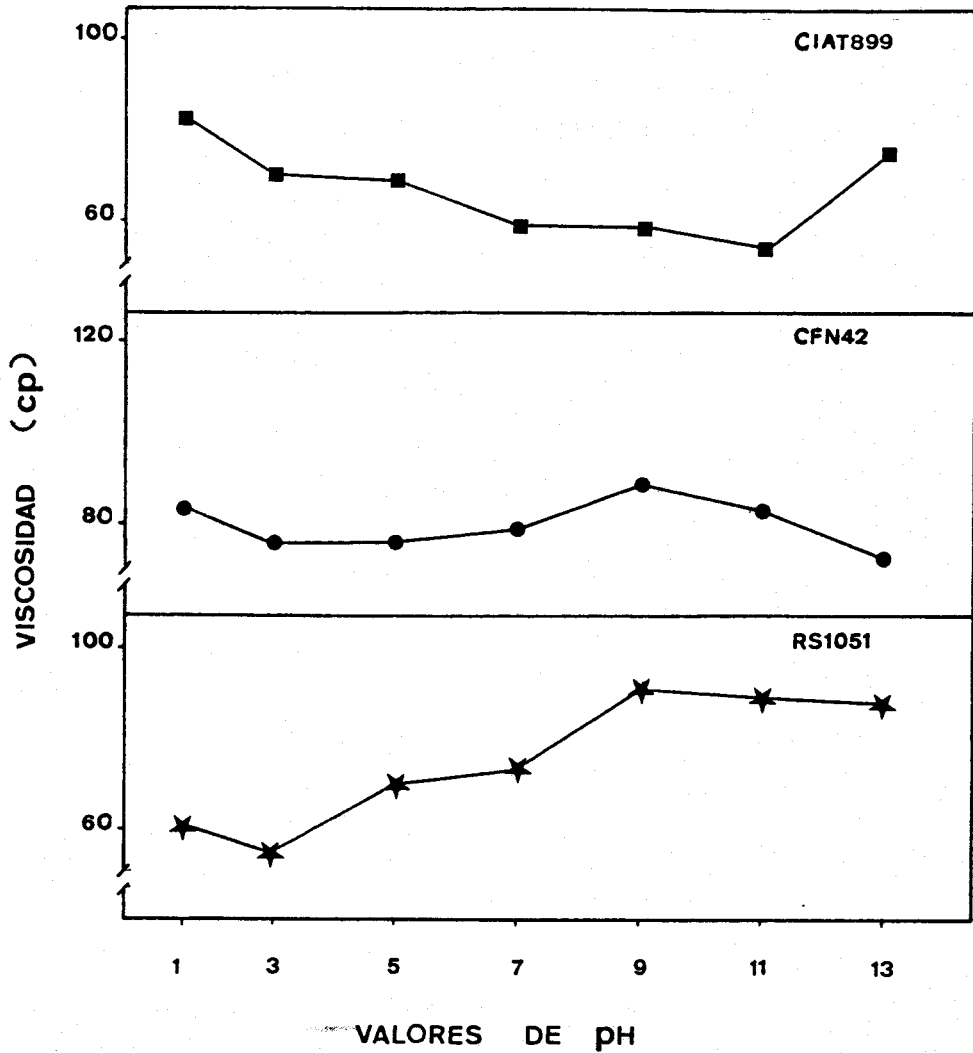


FIGURA 16.- Estudio de la viscosidad de las soluciones, al 1%, de los polisacáridos extracelulares de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051, a diferentes valores de pH, correspondientes a una velocidad de deformación de $4570,238 \text{ s}^{-1}$ (250 rpm).

La solución del exopolisacárido de la var. phaseoli CIAT899 disminuyó su viscosidad al aumentar el pH desde 1,5 hasta 11, y a partir de este valor aumentó la viscosidad con el pH.

IV. 2. 4. Estudio de la influencia del número de pases sobre la viscosidad de las soluciones de los polisacáridos extracelulares.

En la Figura 17 se representa el estudio de la viscosidad de las soluciones de los exopolisacáridos de las cepas en estudio, cuando éstas se someten a una velocidad de deformación creciente de 0 a 500 rpm y a continuación decreciente hasta 0 rpm durante 60 s, realizando esta operación hasta 5 veces sucesivas, a 22°C de temperatura.

Se observa que estas velocidades de deformación sucesivas a las que se someten los polímeros influyen de manera poco notable sobre la viscosidad de los mismos. Las variaciones que se produjeron en su viscosidad se encuentran comprendidas como máximo en un rango de 40 cp.

IV. 3. Estudio tixotrópico de las soluciones de los exopolisacáridos.

Varios términos son usados para caracterizar el comportamiento de sistemas no newtonianos. Puesto que la viscosidad en estos casos no es constante, se usa en lugar de viscosidad el término "viscosidad aparente o consistencia". Los cambios reversibles de consistencia son conocidos y denotados por el término tixotropía. Este fenómeno se aprecia en muchas soluciones diluídas de los

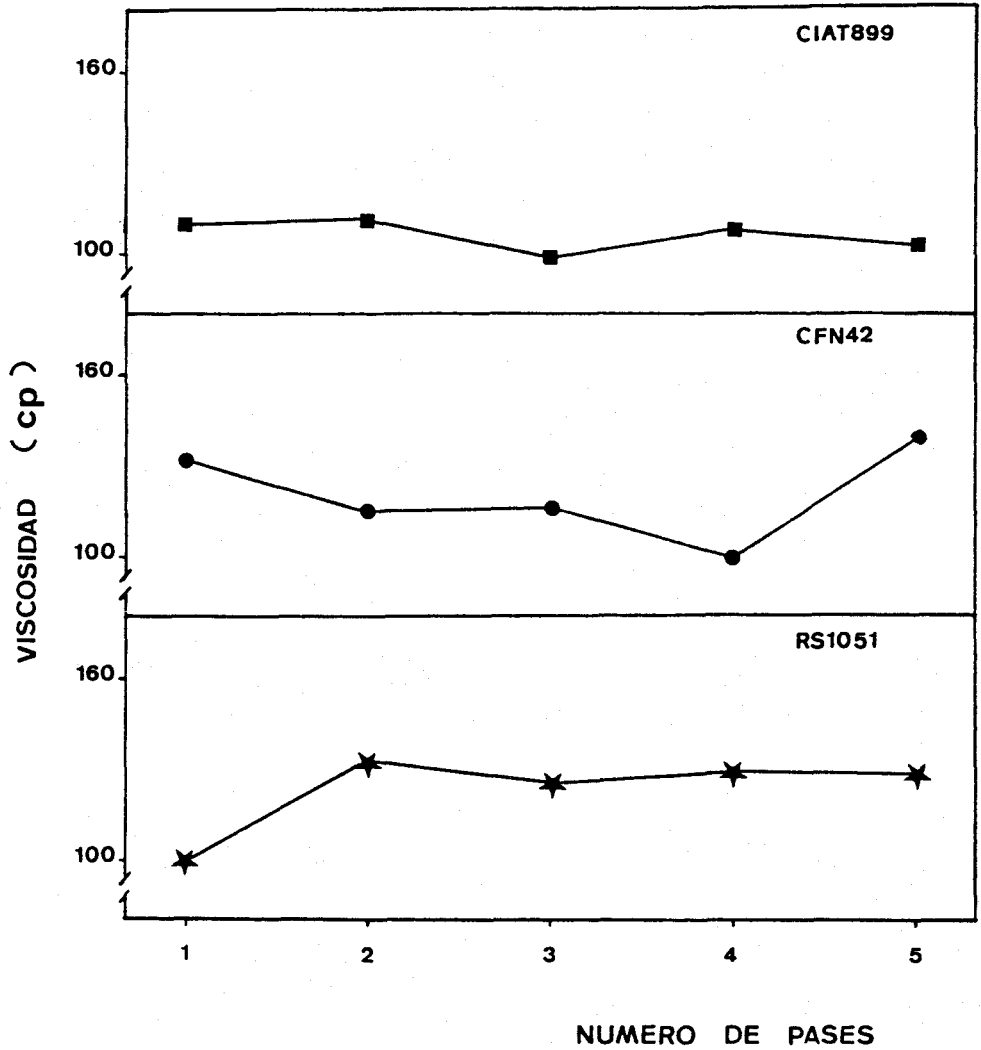


FIGURA 17.- Estudio de la viscosidad de las soluciones, al 2%, de los polisacáridos extracelulares de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051, cuando la solución fué sometida a una velocidad de deformación de $4570,238 \text{ s}^{-1}$ (250 rpm) en varios pases sucesivos.

polímeros superiores.

Se llama reopexia a la propiedad, de algunos sistemas tixotrópicos, de aumentar su consistencia más rápidamente con la agitación muy lenta que con completo reposo.

Dilatancia es el reverso de la tixotropía, es decir, un aumento en la consistencia al aumentar fuertemente los esfuerzos de deformación.

Hemos realizado el estudio de la posible existencia de esta propiedad en nuestros polisacáridos, sometiendo sus soluciones al 1% a una velocidad de deformación constante (500 rpm) durante 100 s, obteniéndose los correspondientes diagramas reológicos (tixogramas) los cuales se presentan en la Figura 18.

Para cuantificar los resultados obtenidos a partir del tixograma, se calculó el Índice de Aceleración Tixotrópica (I.A.T.), que se define como la diferencia entre las tensiones de deformación encontradas en un intervalo de tiempo determinado.

$$\text{I.A.T.} = K \frac{\tau_2 - \tau_1}{t}$$

K se hace igual a 1000 para poder introducir el valor obtenido dentro de escalas representables.

Si el I.A.T. tiene un valor mayor que 0, el fluido se comporta como reopéctico.

Si el I.A.T. tiene un valor menor que 0 el fluido tiene un comportamiento tixotrópico.

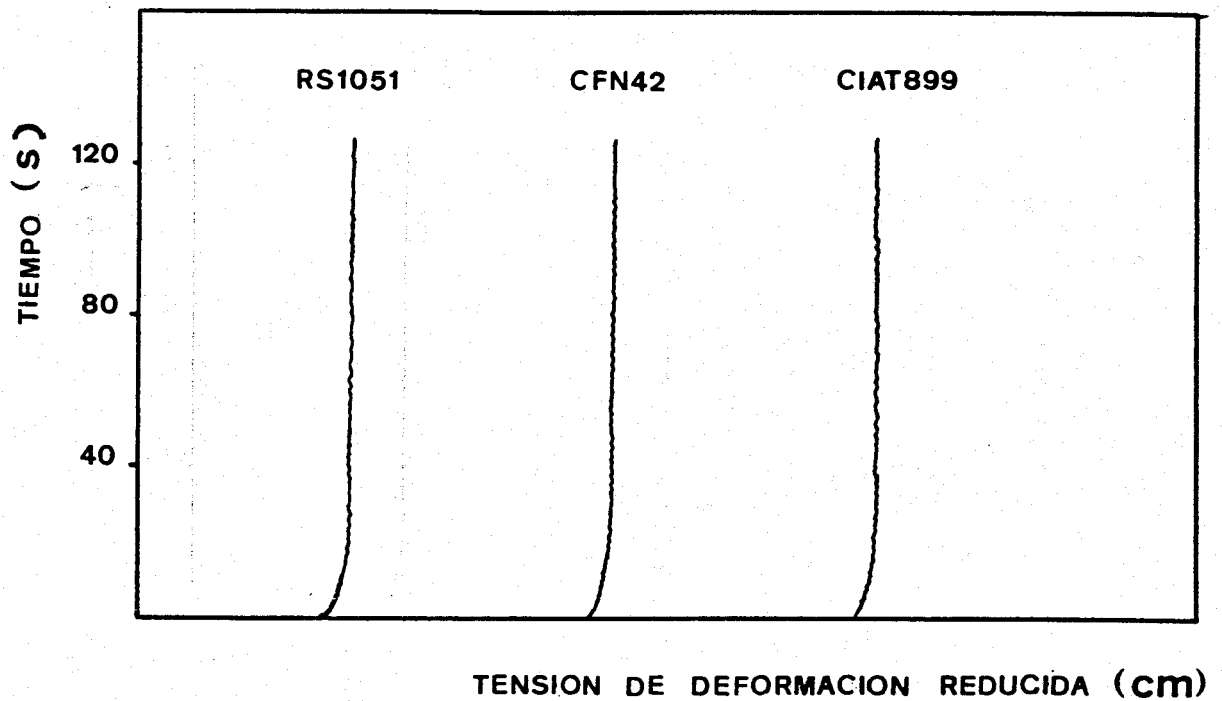


FIGURA 18.- Tixogramas obtenidos de las soluciones, al 1%, de los polisacáridos extracelulares de las cepas de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 y var. trifolii RS1051, cuando se sometieron a una velocidad de deformación constante de 500 rpm, durante 130 segundos.

A partir de los tixogramas que hemos obtenido para los polímeros de las cepas con las que trabajamos (Figura 18) hemos calculado el I.A.T. para un intervalo de tiempo de 90 s. Se desprecia el tramo inicial del tixograma debido a los efectos de la aceleración o inercia ya que el carácter tixotrópico o reopéctico del producto estudiado queda reflejado por el resto del diagrama.

Los valores obtenidos para el I.A.T. de las soluciones de los tres exopolisacáridos en estudio se indican en la Tabla 13.

IV. 4. Medida del carácter pseudoplástico del exopolisacárido.

En los fluidos no newtonianos, independientes del tiempo, la relación entre la velocidad de deformación y la tensión de deformación viene representada por una línea curva que pasa por el origen de coordenadas, que es el reograma de un fluido pseudoplástico.

Para comprobar si las soluciones de nuestros polímeros presentan o no un comportamiento pseudoplástico se ha utilizado la ecuación de Scott-Blair, basada en una derivación teórica de la ecuación reológica:

$$\frac{d^2 D}{d\tau^2}$$

Cuando el resultado de esta derivación da valores:

TABLA 13.- Valores de los Indices de Aceleración Tixotrópica correspondientes a los polisacáridos extracelulares de las cepas de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 y var. trifolii RS1051, y para un intervalo de tiempo de 90 S.

EPS	I.A.T.
RS1051	2,20
CFN42	1,60
CIAT899	0,55

- > 0: Fluido pseudoplástico
- = 0: Fluido newtoniano
- < 0: Fluido dilatante

Se han realizado los cálculos para soluciones a distintas concentraciones de los tres polímeros en estudio y los resultados obtenidos se indican en las Tablas 14, 15 y 16.

IV. 5. Calculo de la tensión inicial.

Al observar los reogramas obtenidos para las soluciones de los polisacáridos (Figuras 11, 12 y 13) se puede observar que existe una resistencia inicial a fluir a gradientes de velocidad bajos (Bingham 1922). El cálculo de esta tensión inicial da idea de la estabilidad a largo plazo de las soluciones de polímeros.

En las Tablas 17, 18 y 19 se indican los valores obtenidos para la tensión inicial de las soluciones de los polisacáridos estudiados, a diferentes concentraciones y a temperatura ambiente (22°C).

V. ESTUDIO DE LA RETENCION DE METALES PESADOS POR EL POLISACARIDO EXTRACELULAR DE RHIZOBIUM.

Entre las muchas aplicaciones que tienen los polisacáridos bacterianos conviene recordar la capacidad para retener algunos iones metálicos, disminuyendo la concentración de éste en el medio donde se encuentran.

Como se indica en la Introducción, en los procesos de depuración de aguas de ríos y aguas residuales intervienen

TABLA 14.- Estudio de la pseudoplasticidad del polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051 en solución a diferentes concentraciones.

CONCENTRACION (%)	$\frac{d^2 D}{d\tau^2}$
0,25	-0,04
0,50	1,74
1,00	1,62
1,50	0,74
2,00	0,71
2,50	0,65
3,00	0,46

- Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (22°C).

TABLA 15.- Estudio de la pseudoplasticidad del polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42 en solución a diferentes concentraciones.

CONCENTRACION (%)	$\frac{d^2 D}{d\tau^2}$
0,25	5,77
0,50	1,59
1,00	1,04
1,50	0,52
2,00	0,37
2,50	0,36
3,00	0,20

- Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (22°C).

TABLA 16.- Estudio de la pseudoplasticidad del polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CIAT899 en solución a diferentes concentraciones.

CONCENTRACION (%)	$\frac{d^2 D}{d\tau^2}$
0,25	4,33
0,50	2,30
1,00	1,10
1,50	0,64
2,00	0,48
2,50	0,28
3,00	0,17

- Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente (22°C).

TABLA 17.- Valores de Tensión inicial para el polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051.

CONCENTRACION (%)	τ_0	
	(cm)	(din/cm ²)
0,25	0,90	575,26
0,50	1,35	862,89
1,00	2,00	1278,35
1,50	2,40	1534,02
2,00	3,15	2013,40
2,50	3,35	2141,24
3,00	3,55	2269,07

- Los valores que se indican corresponden a una velocidad de deformación de $415,48 \text{ S}^{-1}$ (250 rpm).

TABLA 18.- Valores de Tensión inicial para el polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42 en solución a diferentes concentraciones.

CONCENTRACION (%)	τ_0	
	(cm)	(din/cm ²)
0,25	1,30	830,93
0,50	1,90	1214,43
1,00	2,75	1757,73
1,50	3,85	2460,82
2,00	5,30	3387,63
2,50	7,10	4538,14
3,00	8,20	5241,24

- Los valores que se indican corresponden a una velocidad de deformación de $415,48 \text{ S}^{-1}$ (250 rpm).

TABLA 19.- Valores de Tensión inicial para el polisacárido extracelular de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CIAT899 en solución a diferentes concentraciones.

CONCENTRACION (%)	τ_0	
	(cm)	(din/cm ²)
0,25	1,00	639,18
0,50	1,35	862,89
1,00	1,80	1150,52
1,50	2,40	1534,02
2,00	3,25	2077,32
2,50	4,20	2684,54
3,00	4,65	2972,16

- Los valores que se indican corresponden a una velocidad de deformación de $415,48 \text{ S}^{-1}$ (250 rpm).

las bacterias en uno de los pasos del proceso. Parece que la eliminación de metales que tiene lugar durante el tratamiento biológico de un agua se debe en parte al complejo formado entre dicho metal y los componentes polisacarídicos externos de los microorganismos.

En este apartado, se estudió la capacidad de los polisacáridos extracelulares de las cepas de R. leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899 y de la var. trifolii RS1051, para captar los metales en solución acuosa que citamos a continuación: cadmio, cinc, cobre, cromo, mercurio y plomo. Se han elegido estos metales para el presente estudio por ser los que se describen como más frecuentes contaminantes de las aguas residuales y por consiguiente de los ríos.

En las Figuras 19 a 24 se representan gráficamente los resultados obtenidos en este estudio. En abcisas se representa el volumen eluido de la columna cromatográfica expresado en ml, y en ordenadas se representa la concentración de metal pesado en la fracción eluida expresada en μM , y la concentración de polisacárido extracelular eluido en cada fracción y expresada en $\mu\text{g/ml}$. Sólo se representa la fracción de volumen eluido en la cual se eluye el polisacárido y el complejo EPS-metal si existe. El metal pesado no unido al polisacárido sale de la columna cromatográfica en un volumen de elución mayor.

Las líneas unidas mediante triángulos representan la elución del polisacárido extracelular para cada ensayo. Las líneas unidas mediante círculos representan la elución de los distintos metales pesados utilizados. En cada Figura se representa el estudio de la retención del metal por los polisacáridos de las tres cepas utilizadas.

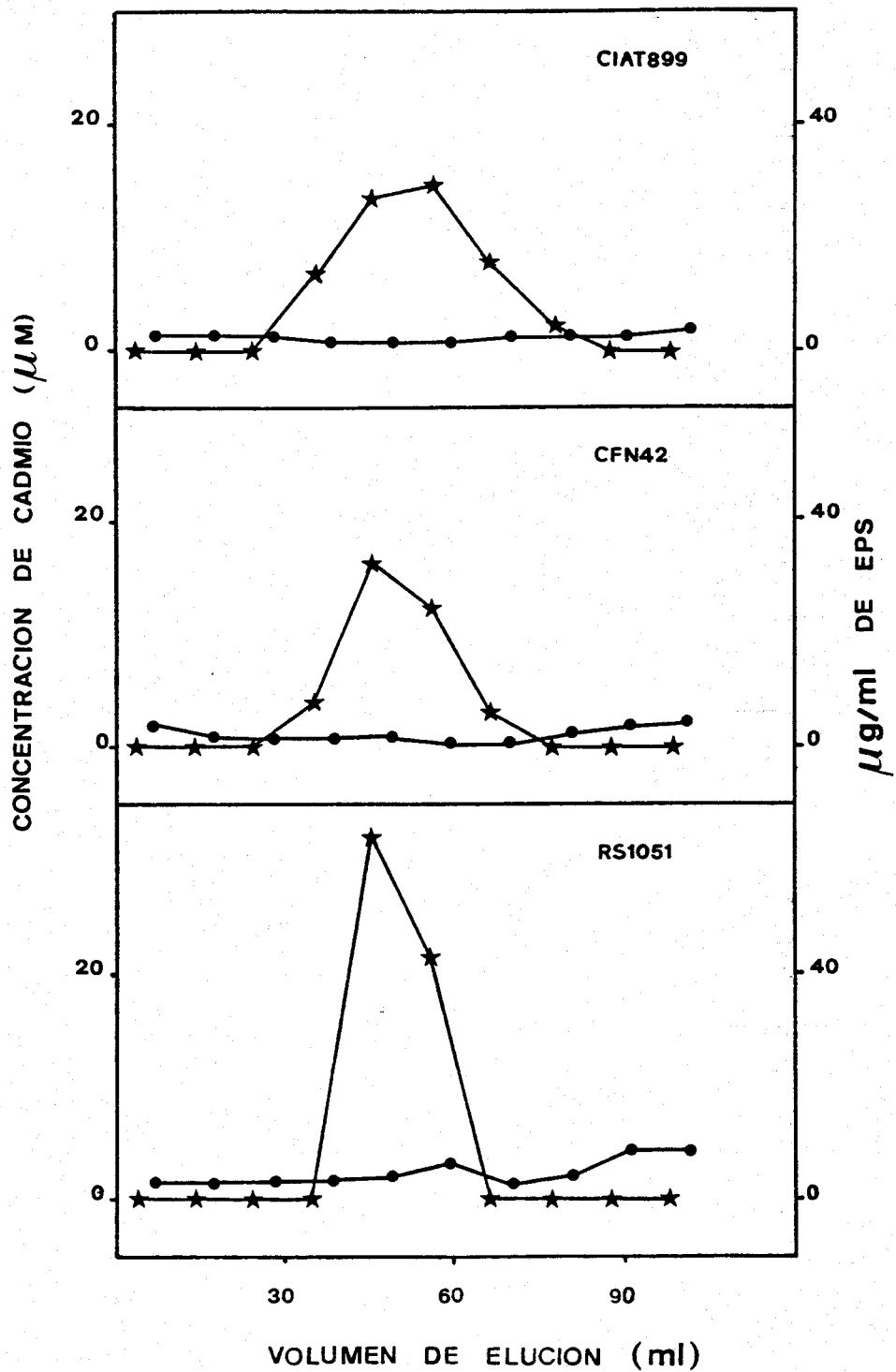


FIGURA 19.- Estudio de la capacidad de los polisacáridos extracelulares de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051 para retener iones cadmio en solución. ● Perfil de elución del metal. ★ Perfil de elución del polisacárido extracelular.

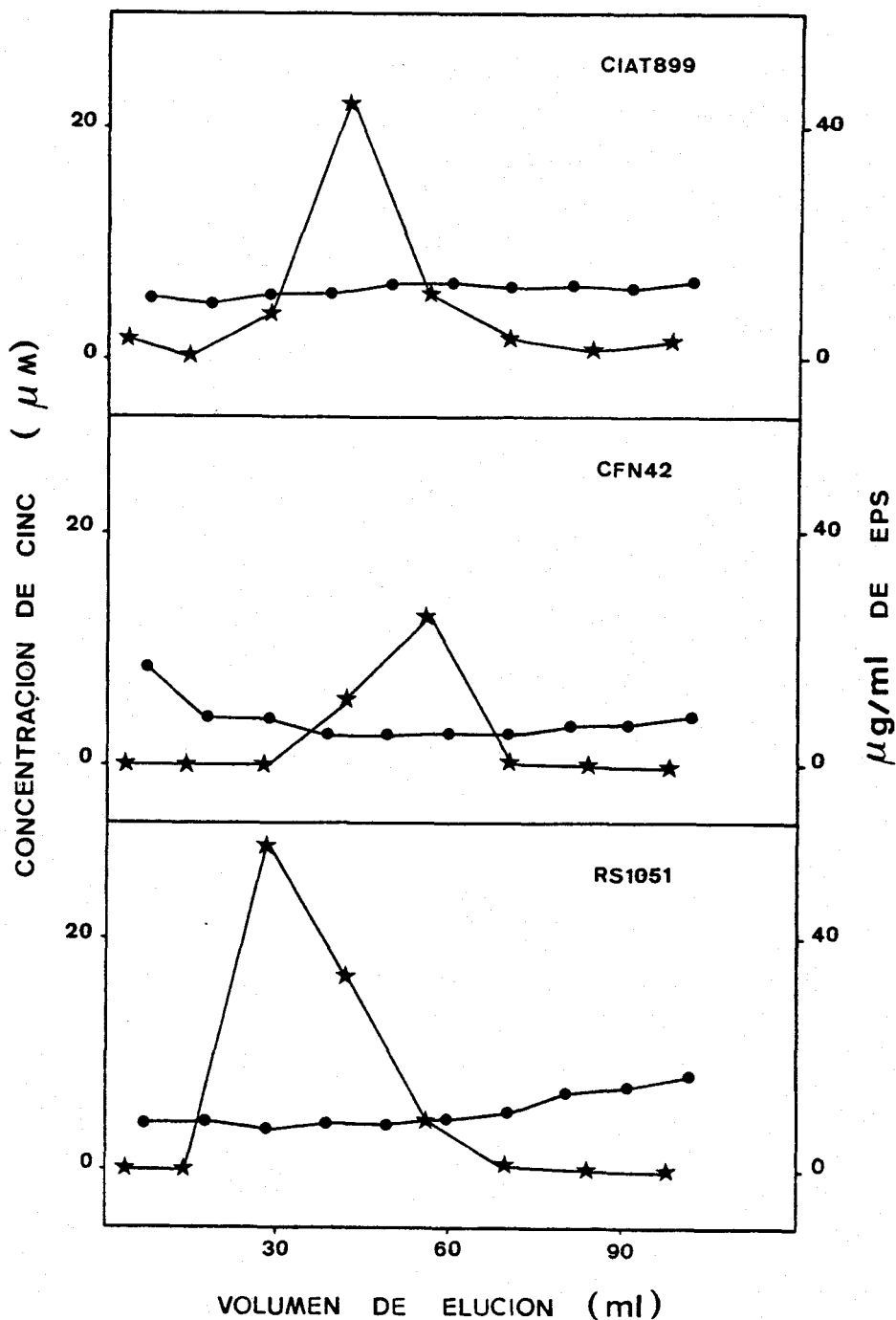


FIGURA 20.- Estudio de la capacidad de los polisacáridos extracelulares de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051 para retener iones cinc en solución. ● Perfil de elución del metal. ★ Perfil de elución del polisacárido extracelular.

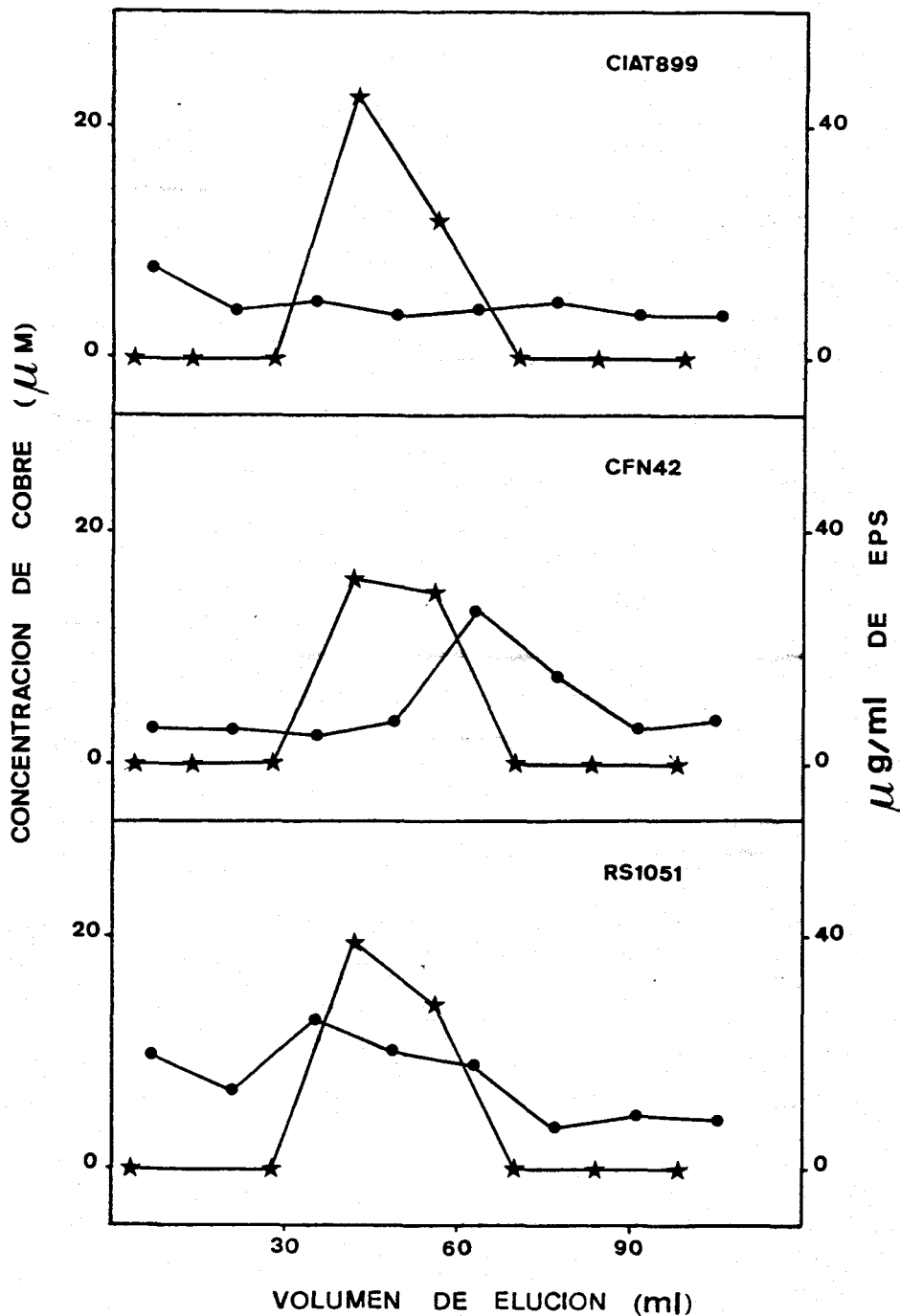


FIGURA 21.- Estudio de la capacidad de los polisacáridos extracelulares de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051 para retener iones cobre en solución. ● Perfil de elución del metal. ★ Perfil de elución del polisacárido extracelular

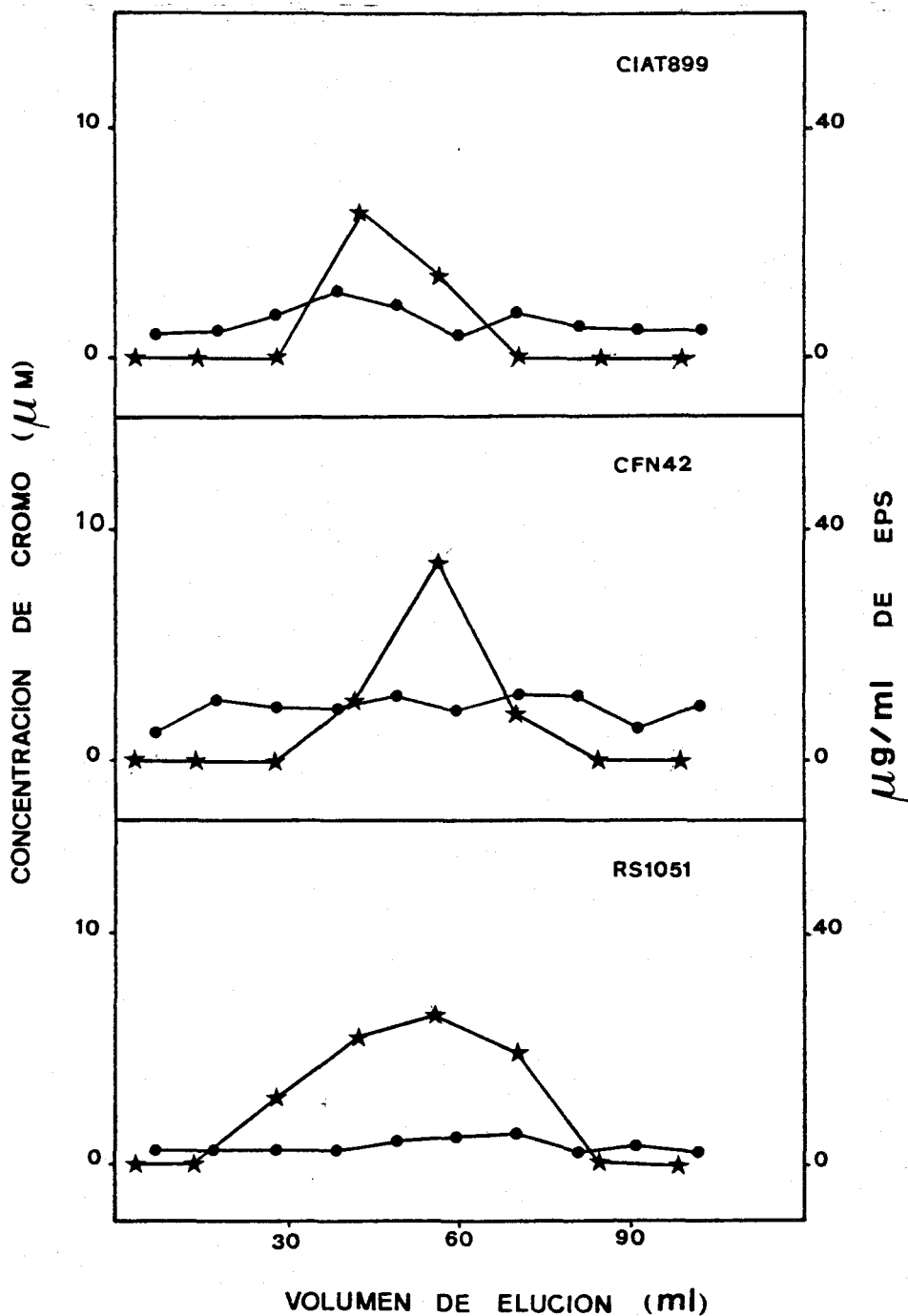


FIGURA 22.- Estudio de la capacidad de los polisacáridos extracelulares de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051 para retener iones cromo en solución. ● Perfil de elución del metal. ★ Perfil de elución del polisacárido extracelular.

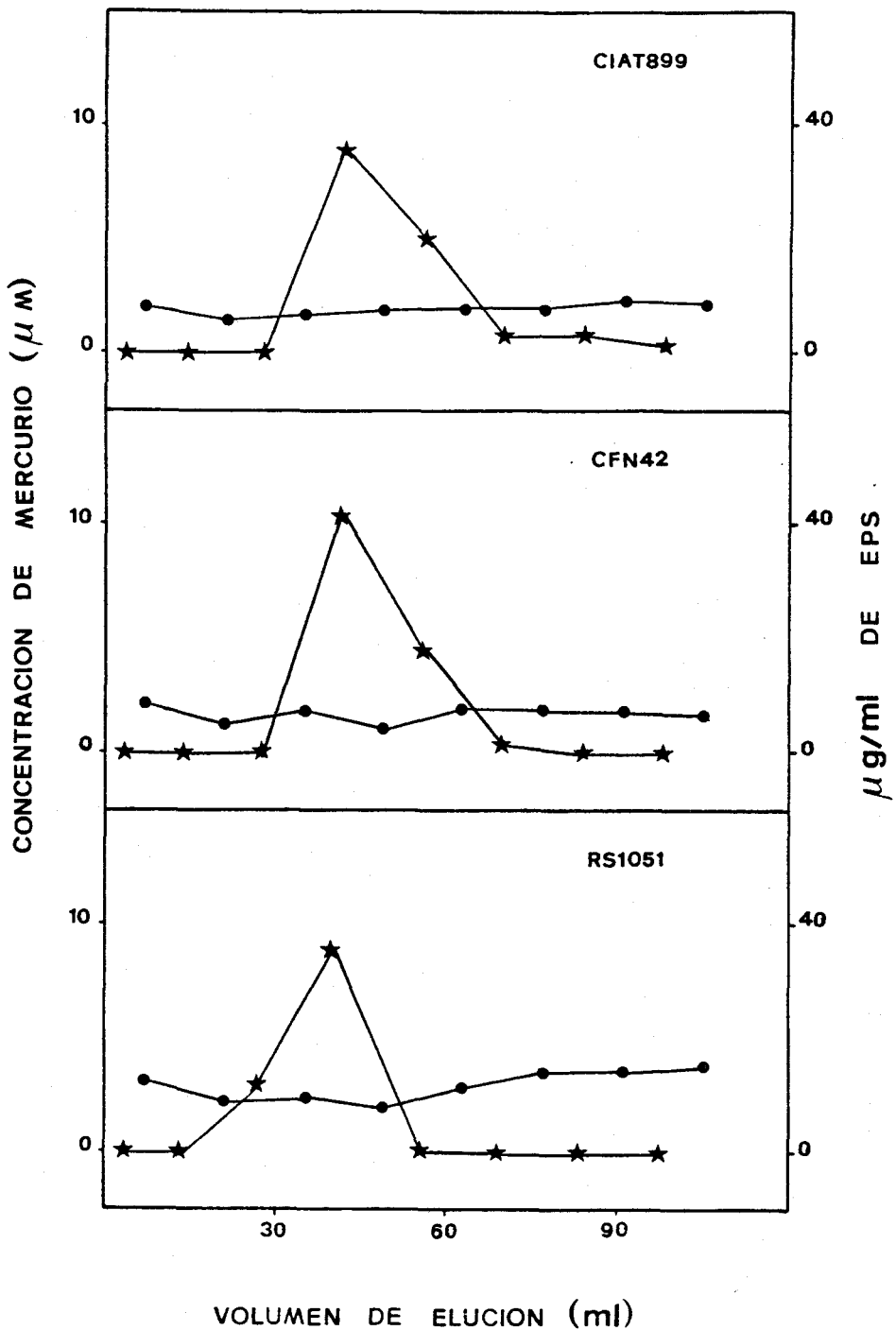


FIGURA 23.- Estudio de la capacidad de los polisacáridos extracelulares de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051 para retener iones mercurio en solución. ● Perfil de elución del metal. ★ Perfil de elución del polisacárido extracelular.

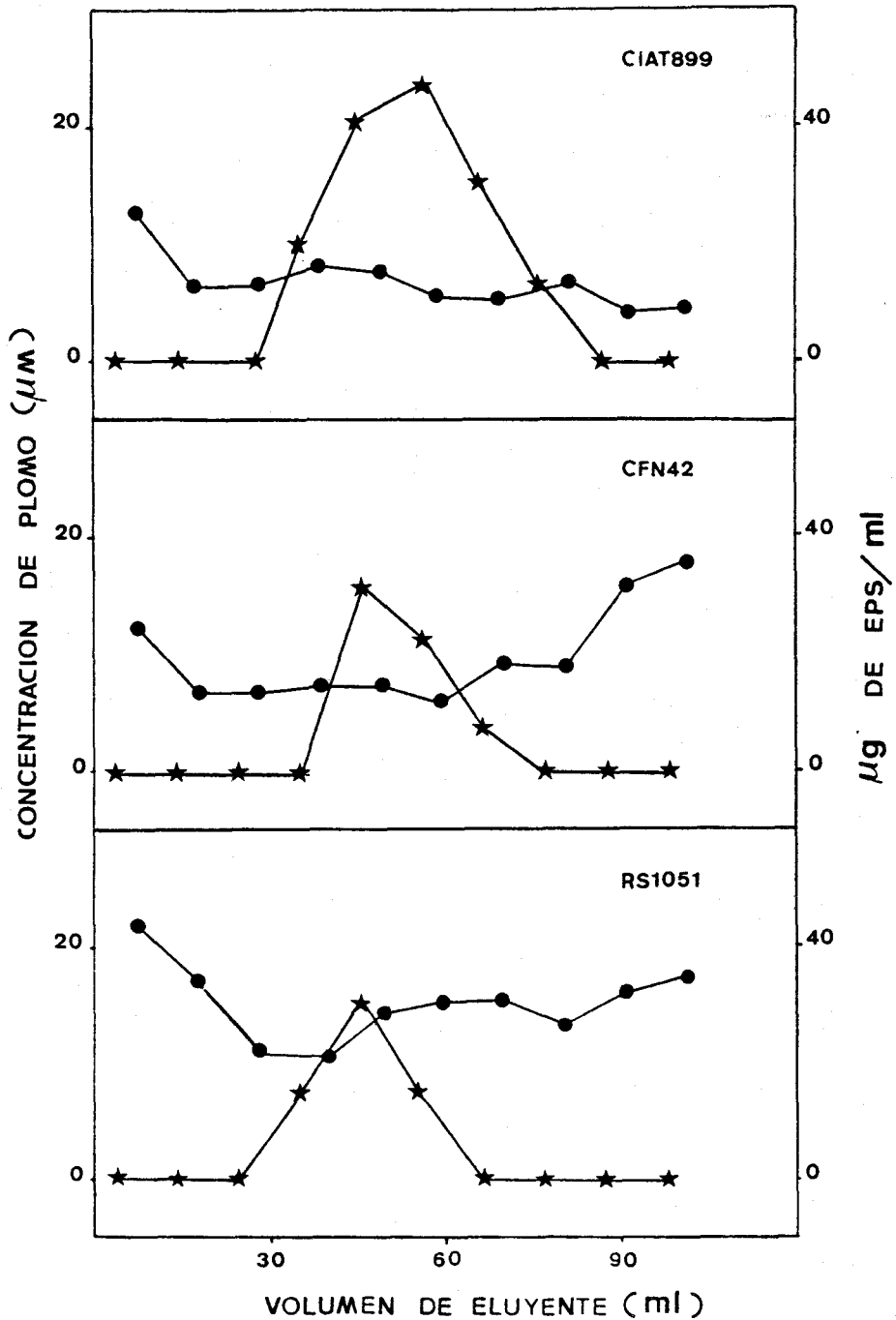


FIGURA 24.- Estudio de la capacidad de los polisacáridos extracelulares de *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* CFN42 y CIAT899 y var. *trifolii* RS1051 para retener iones plomo en solución. ● Perfil de elución del metal. ★ Perfil de elución del polisacárido extracelular.

En la Figura 19, se estudia la capacidad de retención de cadmio por los tres polisacáridos extracelulares, no se observó formación de complejo polímero-metal para ninguno de los tres polisacáridos. Tampoco se observó retención del cinc ni del mercurio (Figuras 20 y 23 respectivamente) por ninguno de los tres polímeros.

En la Figura 21 se representa el estudio con cobre y se observa retención del metal por el polisacárido extracelular de las cepas de R. leguminosarum var. phaseoli CFN42 y de la var. trifolii RS1051.

En la Figura 22 observamos que el polisacárido de la cepa de R. leguminosarum var. phaseoli CIAT899 presentó capacidad para retener el cromo en solución, mientras que los otros dos polímeros en estudio no la presentaron.

En la Figura 24 se representa el estudio de retención con plomo. No se apreció capacidad de formación de complejo de los polímeros con el metal.

DISCUSSION

I. PRODUCCION DE POLISACARIDO EXTRACELULAR.

Para estudiar la producción de exopolisacárido en el laboratorio existen tres métodos posibles: crecimiento en medio sólido, batch-culture en medio líquido y cultivo continuo. La primera de estas técnicas es normalmente de gran valor en screening y no puede ser usada para propósitos industriales.

Para un rápido establecimiento de los parámetros de producción de los polisacáridos tales como: óptima composición del medio, pH, temperatura y oxigenación, el método batch-culture es el más utilizado. Sin embargo, existen algunos inconvenientes tales como: los cultivos muy viscosos pueden tener limitación de oxígeno, puede ocurrir un rápido cambio de pH en el medio de cultivo si éste no está altamente tamponado, y el crecimiento bacteriano ocasiona un cambio en los niveles de sustrato, concentraciones de iones y factores de crecimiento.

Después de estudios iniciales a pequeña escala en batch-culture, es conveniente hacer una evaluación útil de la producción de polímeros en batch-culture en grandes fermentadores, junto con cultivos continuos. El uso de grandes fermentadores evita el problema de la falta de reproducibilidad que ocurre en el estudio de un gran número de recipientes de pequeño volumen.

El método de batch-culture proporciona una rápida producción de polímero en cantidad suficiente para el examen de las características físicas, químicas, composición y estructura.

El uso de cultivo continuo para estudiar la producción de exopolisacáridos microbianos ofrece

considerables ventajas. El crecimiento es controlado por una simple limitación de nutriente. Se lleva a cabo en fermentadores con instrumentación adecuada para realizar medidas constantes de pH y oxígeno disuelto en el medio. Se puede regular la viscosidad del medio mediante diluciones (Silman, 1979). Pero un inconveniente para el uso de cultivo continuo puede ser la poca estabilidad de la cepa usada (Silman y Rogovin, 1972; Evans y col., 1979; Mian y col., 1978).

La mayoría de la información acerca de la producción industrial de exopolisacáridos no está libremente disponible. La producción del xantano se lleva a cabo mediante batch-culture de Xanthomonas campestris (Pettit, 1979). Se ha estudiado la aplicación de cultivo continuo a la producción de xantano (Evans y col., 1979) y han sido construidas algunas plantas de producción con este propósito. También se usa el cultivo continuo en algunas especies de Pseudomonas (Williams y Wimpenny, 1978) y para la producción de xantano por X. juglandis (Ellwood y col., 1979).

Está demostrado que los cambios en las condiciones de cultivo y en la composición del medio de cultivo influyen en la producción de polisacárido (Cadmus, 1962; Catley, 1971; Knettig y Zajic, 1972; Silman y Rogovin, 1972; Tanaka y col., 1974; Herbert y Kornberg, 1976; Neijssell y Tempest, 1976; Harada, 1977; Davidson, 1978; Catley, 1979; Jarman, 1979; Slodki, 1979).

I.1. Influencia de la temperatura sobre la producción de exopolisacárido.

La temperatura es un factor crítico en la síntesis de polisacárido. En general, la temperatura óptima para el crecimiento celular es además óptima para la formación del producto. Todos los productores de polisacáridos de cierta importancia comercial, tales como X. campestris, son organismos mesófilos (Kang, 1979).

Las cepas de R. leguminosarum que se han empleado para el presente trabajo, se desarrollaron bien a una temperatura entre 25 y 37°C. La cepa RS1051 fué más exigente para la temperatura de crecimiento que las otras dos, encontrando su valor óptimo a 28°C. Por el contrario, la cepa menos exigente para este factor fué la CIAT899 cuyo desarrollo no se afectó por los cambios de temperatura comprendidos en el intervalo estudiado.

La cepa CFN42 presentó un desarrollo algo menor a 25 °C, pero su crecimiento a 28, 33 y 37°C fué prácticamente igual. Las pequeñas diferencias que se observan pueden ser debidas a errores propios de la técnica utilizada.

Por tanto, la cepa de R. leguminosarum var. trifolii RS1051, es la que presenta un valor de temperatura crítico para su desarrollo, mientras que las otras dos cepas permiten un mayor margen de temperatura para desarrollarse con normalidad.

En cualquiera de los tres casos, las cepas que se han utilizado entran en la norma general de ser microorganismos mesófilos productores de polisacáridos.

Como se esperaba, la cepa RS1051 produjo una mayor cantidad de polímero a 28°C, siendo prácticamente nula a 37°C ya que a esta temperatura el desarrollo se vió inhibido. Esto hace pensar que la mayoría de las funciones metabólicas de estas células a 37°C están reprimidas y van dirigidas principalmente a mantener las constantes mínimas para la supervivencia celular.

La cepa CIAT899 presentó alta producción de polímero tanto a 28 como a 37°C y la CFN42 presentó producciones similares a ambas temperaturas.

Si se estudia el rendimiento celular en la producción de polímero, se observa que éste fué mayor a 28 que a 37°C para la cepa CIAT899 y para la cepa CFN42 fué ligeramente superior a 37°C.

Los cambios de temperatura comprendidos en el intervalo estudiado (25-37°C) pueden no afectar directamente al proceso de multiplicación celular en un medio deficiente en fuente de carbono (TY), pero cuando las bacterias son cultivadas en un medio adecuado para la producción de polímero, se puede alterar su metabolismo de manera que se vean estimuladas o inhibidas las rutas correspondientes a la síntesis de polisacárido.

Los datos obtenidos en estos estudios coinciden con los que se muestran en la bibliografía donde se citan diferentes temperaturas para producción de exopolisacárido por distintos microorganismos.

Harada y col. (1967) estudiaron la producción de curdlan por Alcaligenes faecalis a 32°C. El polisacárido B-1973 de Arthrobacter se produce a 25°C (Anonymous,

1962; Cadmus y col., 1963; Jeanes y col., 1965; Sloneker y col., 1968).

Nagahama y col. (1977) aislaron especies de Corynebacterium que son capaces de producir polisacárido cuando se cultivan a 34°C. El género Hansenula produce un polisacárido extracelular denominado fosfomanano, cuando se cultiva en condiciones adecuadas a 28 °C (Anderson y col., 1960).

El polisacárido Y-1401 es producido por Cryptococcus laurentii var. flavescens a 25°C (Cadmus y col., 1962). En condiciones aeróbicas se consigue una máxima producción de xantano a 28°C (Lilly y col., 1958).

Para la producción de dextrano por Leuconostoc dextranicum se utiliza una temperatura de incubación de 25°C en fermentador (Jeanes, 1968; Murphy y Whistler, 1973).

I.2. Influencia de la oxigenación en la producción de exopolisacárido.

La producción de exopolisacárido es un proceso aerobio. La cantidad de oxígeno disuelto en el medio influye sobre la producción de polímero tanto en cantidad como en calidad.

En el estudio que se ha llevado a cabo con las cepas RS1051, CFN42 y CIAT899 en condiciones de cultivo que les permiten diferentes grados de oxigenación, y cuyos resultados se expresan en las Figuras 3 y 4, se confirmó lo indicado.

Cuando el cultivo se sometió a diferentes velocidades de agitación, desde 0 (estático) hasta 300 rpm, se facilitó una mayor difusión de oxígeno hacia el interior del medio líquido, la cual es máxima a 300 rpm. Se observa como la producción de polímero fué aumentando a medida que aumentó la proporción de oxígeno disuelto, hasta alcanzar un máximo a 200 rpm. En estas condiciones la cantidad de polímero producido por las cepas RS1051, CFN42 y CIAT899 fué respectivamente 3,35; 2,34 y 3,34 mg/ml. Cuando la agitación fué de 300 rpm disminuyó en gran proporción la producción de polímero descendiendo hasta valores de 2,6; 0,75 y 0,61 mg/ml. Esta disminución al aumentar la velocidad de agitación podría ser debida a un exceso de oxígeno disuelto en el medio de cultivo.

Cuando la cepa RS1051 se cultivó a 28°C con una agitación de 50 rpm, se obtuvo una producción escasa de polímero, sin embargo fué bastante elevado el rendimiento celular en la producción. Podría ser una respuesta celular frente a un medio ambiente adverso.

Estos resultados coinciden con los trabajos citados en la bibliografía que indican que una limitación de oxígeno afecta la síntesis de polisacárido (Catley, 1979), mientras que la aireación favorece la producción (Sutherland, 1983).

Zevenhuizen (1986) obtuvo para la cepa de R. trifolii TA-1, bajo condiciones de aireación forzada y tras cinco días de incubación, en un medio con manitol:glutámico (relación C:N, 10:1), una producción de exopolisacárido de 3 mg/ml. En las mismas condiciones de cultivo citadas, pero con manitol:glucosa (7,4:2,6) como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (relación C:N, 10:1), las cepas RS1051, CFN42 y

CIAT899 presentaron una producción de 2,44; 2,17 y 1,8 mg/ml respectivamente. Estos valores son algo menores que los obtenidos para R. trifolii TA-1.

Las cepas en estudio dieron una mayor producción de exopolisacárido cuando se cultivaron en agitación a 200 rpm que cuando se utilizó aireación forzada. Esto podría deberse a que en aireación el oxígeno no se diluye por igual en todo el medio y la tensión de oxígeno no es constante.

I.3. Influencia del tiempo de incubación sobre la producción de exopolisacárido.

Cuando se estudió el crecimiento celular de las cepas CFN42, CIAT899 y RS1051 en el medio de producción de polímero a lo largo del tiempo, se observó que el máximo desarrollo se consigue a las 72 horas de incubación, a 28°C y con una agitación rotatoria de 200 rpm. A partir de este momento el desarrollo celular se hace negativo.

Si se estudia la producción de exopolisacárido en estas condiciones, con manitol:glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (relación C:N, 10:1), se observa el máximo de producción a los cinco días, es decir, con un retraso de dos días respecto al desarrollo celular.

Este retraso también fué observado por Ueda y col. (1981) estudiando la producción de polímero por la cepa N^o 626 de Aeromonas hydrophila. En este caso, utilizando un medio de cultivo con sacarosa como fuente de carbono, se obtuvo un máximo crecimiento celular a los 5 días de cultivo y la máxima producción se detectó a los 7 días.

El tiempo de incubación necesario para cada microorganismo es diferente. Así se ha propuesto la producción óptima de exopolisacárido para Arthrobacter en un período de 4 días (Sloneker y col., 1968).

El desfase de tiempo existente entre la obtención del máximo desarrollo celular y la máxima producción de polímero, es debido a la necesidad de la bacteria de usar su actividad metabólica para la síntesis de componentes celulares. Posteriormente derivará esta actividad a la síntesis de polímero.

I.4. Influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de exopolisacárido.

Para conseguir una alta producción de polisacárido es necesario que en el medio de cultivo exista una alta relación C:N (Duguid, 1953; Cadmus, 1962; Corpe, 1964; Booth, 1971; Catley, 1971; Williams y Wimpenny, 1977; Kang, 1979; Scheepe, 1986).

En los estudios de producción con distintas fuentes de carbono, se ha utilizado como concentración fija de la misma (5 g/l). En anteriores trabajos llevados a cabo por Rodríguez Navarro (1986), se puso de manifiesto que 5 g/l es la concentración óptima de fuente de carbono para la producción de polímero por especies de Rhizobium.

Otros autores sugieren para la óptima producción de exopolisacárido concentraciones de hidratos de carbono similares. Ueda y col. (1981), trabajando con una cepa de Aeromonas hydrophila, consideraron como concentración adecuada de sacarosa para la formación de polímero el 5 %.

Sow (1979) indicó el 4 % la concentración más apropiada. Kang y col. (1977) y Cottrell (1980) utilizan una concentración del 3% de glucosa en el medio de producción.

En el trabajo para el estudio de las fuentes de carbono se utilizó como fuente de nitrógeno extracto de levadura a la concentración de 1 g/l, siendo por tanto la relación C:N de 5:1.

Los mejores resultados de producción con la cepa RS1051 se obtuvieron con glucosa, sacarosa y glicerol. Para la cepa CFN42 y CIAT899 las mejores fuentes de carbono fueron sacarosa y manitol.

En los tres casos la sacarosa resultó ser una buena fuente de carbono, y el rendimiento en la producción conseguido con ella fué superior al conseguido con el resto de los compuestos carbonados.

Los valores de producción obtenidos con sacarosa para las cepas RS1051, CFN42 y CIAT899 fueron respectivamente 2,3; 1,3 y 1,9 mg/ml, siendo superiores a los obtenidos por Ueda y col. (1981). Estos autores cuando cultivaron Aeromonas hydrophila en presencia de sacarosa, obtuvieron una producción de polímero de 7 mg/ml. Con galactosa la producción fué de 1,3 mg/ml y con glucosa fué de 0,2 mg/ml, siendo esta última la que dió menos producción de todas las fuentes probadas.

Sow (1979), trabajando con Xantomonas campestris, indicó que la mejor fuente de carbono fué la sacarosa.

Kang (1979) consideró mejor fuente de carbono lactosa y almidón y la peor la glucosa. Estos resultados son

contrarios a los obtenidos con la cepa RS1051 ya que con glucosa se consiguió la máxima producción de polímero (2,5 mg/ml), seguido de glicerol (2,2 mg/ml).

Scheepe (1986) trabajando con Enterobacter sakazakii obtuvo máxima producción de polímero cuando utilizó glicerol como fuente de carbono (0,61 g/g glicerol sustrato). El rendimiento de nuestras cepas respecto al glicerol usado como fuente de carbono fué de 0,4; 0,2 y 0,3 g/g glicerol sustrato para las cepas RS1051, CFN42 y CIAT899 respectivamente, ligeramente inferior a los obtenidos por este autor.

Para las cepas estudiadas fueron pésimas fuentes de carbono los compuestos usados en forma de sales como citrato sódico, glutamato sódico y succinato sódico. Aunque Souw (1979) considera buenas fuentes de carbono al succinato y piruvato cuando van suplementados con sacarosa.

Rodríguez Navarro (1986) considera que la concentración óptima de la fuente de nitrógeno para la producción de exopolisacárido por cepas de Rhizobium es de 1 mg/ml. Teniendo en cuenta la referencia anterior, se ha llevado a cabo el estudio de la producción de polímero por nuestras cepas variando la fuente de nitrógeno. En todos los casos, la fuente de carbono utilizada fué sacarosa (5 g/l).

En la Figura 8 se observa que la producción más alta tuvo lugar cuando se cultivaron las cepas en presencia de extracto de levadura, en cuyo caso la producción fué de 2,4; 0,9 y 2,4 mg/ml para RS1051, CFN42 y CIAT899 respectivamente.

La producción con glutamato sódico fué menor. Sin embargo, conviene destacar el alto rendimiento que presentó la cepa CIAT899.

Scheepe (1986) trabajando con Enterobacter sakazakii, obtuvo mayor rendimiento en la producción de polímero cuando las células fueron cultivadas en presencia de glicerol como fuente de carbono y L-glutamina como fuente de nitrógeno. El rendimiento conseguido con nitrato fué menor que con glutamato, lo que también ocurrió en nuestro caso.

Ueda (1981) obtuvo mejor producción por A. hydrophila cuando usó glutamato 0,3 % como fuente de nitrógeno.

Es interesante destacar el alto rendimiento en la producción obtenido por la cepa CIAT899 cuando se cultivó en presencia de extracto de levadura. Tanto este caso como el alto rendimiento obtenido en presencia de glutamato, puede ser debido a una actividad metabólica que le permita a esta cepa realizar una mejor conversión del sustrato en polímero. También puede ocurrir que la bacteria en presencia de una fuente de nitrógeno deficiente, entre antes en fase estacionaria de crecimiento donde la síntesis de componentes celulares sea mínima y por tanto la actividad metabólica se desvía hacia la formación de metabolitos secundarios.

I.5. Influencia de los metales sobre la producción de exopolisacárido.

En la Figura 9 se expresan los resultados obtenidos

del estudio de producción de exopolisacárido en presencia de metales con la cepa RS1051.

Metales como el cadmio, mercurio, incluso el cobre, afectaron en gran medida el desarrollo celular inhibiéndolo, pero fué aún mayor el efecto de los metales sobre la producción de polímero.

El cinc no afectó el crecimiento bacteriano pero disminuyó drásticamente la producción de polímero. Esta inhibición también ocurrió con el resto de metales salvo con cromo y plomo. En el caso del cadmio y mercurio la falta de producción de polímero responde a una inhibición del desarrollo celular, pero no ocurre así en el caso del cobre y sobre todo del cinc. Estos metales pueden actuar inhibiendo alguna ruta metabólica en la síntesis de polímero.

II. COMPOSICION DE LOS EXOPOLISACARIDOS.

Los polisacáridos son polímeros formados por unidades repetitivas de azúcares. Por hidrólisis se obtienen los monosacáridos que los constituyen o bien derivados de estos monosacáridos.

La composición de los polisacáridos bacterianos es muy diversa. Todos presentan en su composición azúcares mono o disacáridos y radicales ácidos, pero la composición y estructura varía de unas especies a otras, incluso es variable entre cepas de una misma especie.

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio por HPLC de la composición de los exopolisacáridos de las cepas de R.leguminosarum var. trifolii RS1051 y

var. phaseoli CFN42 y CIAT899, obtenidos por incubación de las cepas durante 5 días a 28°C, en un medio con glucosa-manitol como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (relación C:N, 10:1), en matraces con agitación a 200 rpm. Las soluciones de los polímeros se sometieron a hidrólisis sulfúrica.

El exopolisacárido de la cepa RS1051 contiene en su molécula glucosa: galactosa: urónicos: pirúvico: acético y 3-hidroxi-butírico en la relación molar 2,0:1,0:0,1:ND:0,5:0,1.

La composición obtenida para el EPS de la cepa CFN42 es glucosa: galactosa: urónicos:pirúvico y acético en la proporción 2,20:1,0:0,12:ND:0,5.

Por último, la composición obtenida para el exopolisacárido de la cepa CIAT899 es glucosa: galactosa: pirúvico y acético en la proporción 3,0:1,0:0,3:0,5.

Los tres polímeros presentan glucosa, galactosa y pirúvico en su molécula. Ácidos urónicos no existen en el polímero de la cepa CIAT899 y sólo en el exopolisacárido de R. leguminosarum var. trifolii RS1051 existe el sustituyente 3-hidroxi-butírico. Hollingsworth y col. (1987) describen la presencia del radical 3-hidroxi-butírico en el polisacárido capsular de R. trifolii 0403.

El pico correspondiente al pirúvico sólo se consiguió resolver para el exopolisacárido de la cepa CIAT899, aunque se sabe que este componente está presente en los otros dos polímeros. Al observar el cromatograma se aprecia un ensanchamiento en el pico correspondiente a la galactosa debido a la presencia de pirúvico, el cual se ve enmascarado por una mayor concentración de este azúcar. La

existencia de pirúvico también está confirmada por trabajos paralelos que se están llevando a cabo en la actualidad en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Químicas, dirigidos por el Dr. Gil.

Se observa la variabilidad de composición que existe incluso entre cepas de una misma especie, y si se consulta la bibliografía se puede observar esta variabilidad.

Bhagwat y Thomas (1984) propusieron la siguiente composición para el polisacárido de R. cowpea: Manosa: galactosa: glucosa: acetato y urónicos en la proporción 6:1:5,4:0,5:1,4.

Zevenhuizen(1986) dió a conocer la composición del polímero de una cepa (TA-1) de R. trifolii; glucosa: galactosa: glucurónico y pirúvico en la proporción 5:1:2:2.

Apanna (1968) propuso para el exopolisacárido de R. meliloti la siguiente composición en azúcares; glucosa: manosa y galactosa.

La mayoría de los polímeros del género Rhizobium contienen glucosa y galactosa como componentes carbohidratos. También es frecuente encontrar en estos polímeros manosa. Otros componentes normales son ácidos urónicos y acético.

Si observamos los polímeros de otros géneros vemos que entran a formar parte de sus estructuras otros compuestos.

Linton (1988) propuso la siguiente composición para el exopolisacárido de Erwinia herbicida; galactosa:

glucosa: acetato: succinato: piruvato y urónicos (4,26:3:0,5:1,43:1,55:1,5). El succinato es un componente frecuente de los polímeros que por ello reciben el nombre de succinoglucanos. El curdlan es un polisacárido usado industrialmente, producido por Alcalígenes faecalis. La var. myxógenes de esta especie produce un succinoglucano que contiene glucosa, galactosa y succínico.

El exopolisacárido de Acetobacter xilinum incluye en su composición otro hidrato de carbono; glucosa: manosa: glucurónico y ramnosa (4:1:1:1) y 1 ó 2 acetilos en su molécula (Couso, 1978). El exopolisacárido de Beijerinckia también lleva ramnosa en su composición (Cottrell, 1980). Algunas cepas de Pseudomonas elodes llevan ramnosa en su polisacárido, además de glucosa (Cottrell, 1980; Moorhouse, 1981).

Erwinia tahitica sintetiza un exopolisacárido que contiene como componente carbohidrato, además de glucosa y galactosa, fucosa (Kang, 1979).

El polímero más extendido en la industria es el xantano cuya composición es; manosa: glucosa: glucurónico: acetato y piruvato (2:2:1:1:0,3-0,7).

II.1. Influencia de las condiciones de cultivo de las cepas sobre la composición del exopolisacárido.

Como se ha dicho anteriormante, las condiciones de cultivo de la cepa productora y los nutrientes utilizados, juegan un papel decisivo en la cantidad y calidad del polímero sintetizado. Por ello se ha llevado a cabo el estudio de la composición de los polisacáridos obtenidos

en diferentes condiciones de incubación y con distintas fuentes de carbono y nitrógeno.

Si se observan las Tablas 6, 7 y 8 se comprueba que existen diferencias entre las relaciones molares de los componentes del polímero para una misma cepa.

Estas diferencias se hacen más notables cuando los polímeros fueron sintetizados variando la fuente de carbono y nitrógeno.

Para el polímero de la cepa RS1051 los casos más representativos son los bajos niveles de glucosa que aparecen cuando se utilizó glicerol, glutamato o manitol como fuentes de carbono, y cuando se usó cloruro amónico como fuente de nitrógeno. En presencia de glutamato y succinato sódicos, no apareció en el cromatograma el pico correspondiente a los ácidos urónicos.

El polímero de la cepa CFN42 mostró una diferencia de composición respecto al polímero sintetizado en condiciones normales de cultivo, cuando se sintetizó en presencia de nitrato potásico como fuente de nitrógeno, en cuyo caso se vió disminuida la proporción de glucosa en la molécula. En los casos en que no se detectaron los ácidos urónicos, apareció en el cromatograma un pico con un tiempo de retención ligeramente inferior al correspondiente a los urónicos. Posiblemente esto se deba a una hidrólisis no completa de los ácidos urónicos y por tanto son eluidos antes de la columna.

El exopolisacárido de CIAT899 también presentó ligeras diferencias en la proporción de sus componentes al variar las condiciones de cultivo y los nutrientes.

En los casos en que hubo producción de polisacárido cuando se incubaron las cepas con una agitación rotatoria de 50 rpm, se observó que el pico correspondiente al pirúvico fué capaz de resolverse. Esto puede deberse a un aumento significativo de la proporción de pirúvico en la molécula, ocasionado por la escasez de oxígeno en el medio líquido. Este aumento se puede confirmar para el polímero de CIAT899 pero no así para el de RS1051 pues el pico correspondiente al pirúvico no se resolvió cuando se analizó la muestra control (a 200 rpm).

Se analizaron los polisacáridos producidos por la cepa de R. leguminosarum var. trifolii RS1051 cuando en el medio de cultivo estuvieron presentes iones metálicos.

De los resultados obtenidos (Tabla 9) cabe destacar un aumento de la proporción de glucosa cuando el metal presente en el medio fué cromo. También se produjo con este metal un aumento significativo de los ácidos urónicos y pirúvico.

En presencia de plomo la proporción de ácidos urónicos se elevó, al igual que en presencia de cobre. En este último caso también se produjo un aumento de pirúvico.

En presencia de cobalto, el polisacárido sintetizado presentó un aumento en la proporción de acético y 3-hidroxi-butírico.

Los metales pueden actuar como catalizadores de algunas reacciones metabólicas que favorezcan estas diferencias.

En la bibliografía se cita un caso de diferente composición del polímero de R. meliloti cuando se cultivó en presencia de manganeso. La presencia de manganeso hizo que se produjera un polímero carente de manosa, la cual forma parte de este polímero normalmente (Appanna, 1988).

III. ESTUDIO REOLOGICO DEL EXOPOLISACARIDO.

La aplicación industrial de los polisacáridos bacterianos se debe a las propiedades, que éstos polímeros presentan, de aumentar la viscosidad de las soluciones en las que entran a formar parte.

El polisacárido que en la actualidad tiene un mayor margen de aplicación en la industria es el xantano, debido a sus óptimas cualidades como gelificante y viscosizante, gracias a su buena estabilidad térmica y compatibilidad con ácidos, bases y soluciones de sales. Son pues éstas las cualidades que se buscan en un polisacárido bacteriano para uso industrial.

En el presente trabajo se ha realizado en primer lugar el estudio de la viscosidad que presentan los polisacáridos extracelulares de las cepas RS1051, CFN42 y CIAT899 cuando están en solución acuosa a diferentes concentraciones. Dichas soluciones fueron sometidas a una velocidad de deformación desde 0 hasta 500 rpm y viceversa, durante 60 s, a temperatura ambiente (22°C). Así se obtuvieron los reogramas que aparecen en las Figuras 11, 12 y 13.

La mayoría de las soluciones diluidas son fluidos newtonianos. las soluciones concentradas de polímeros

poseen características reológicas diferentes (fluidos no newtonianos) (García, S., 1987).

Las soluciones se vuelven newtonianas cuando la concentración desciende por debajo de un valor que depende del peso molecular del polímero y de la temperatura (Jirgensons, 1965).

Para fluidos newtonianos el diagrama reológico es una recta que pasa por el origen, es decir, la viscosidad es constante y depende sólo de la temperatura.

En los fluidos no newtonianos, independientes del tiempo, la relación entre D y τ viene representada por una línea curva que pasa por el origen de coordenadas, que corresponde al reograma de un fluido pseudoplástico, como es nuestro caso. En estos fluidos la resistencia a fluir no es constante, sino que depende de los valores de D y τ en cada punto de la curva. En este tipo de fluidos se utiliza el concepto de viscosidad aparente.

Si observamos los reogramas correspondientes a nuestros polímeros se aprecia una resistencia inicial a fluir a bajos valores de D . Esta tensión inicial nos da idea de la estabilidad a largo plazo de las soluciones (Bingham, 1922).

Las soluciones de los polímeros de las cepas RS1051, CFN42 y CIAT899 al 1 % presentaron una resistencia inicial a fluir de 1278,35; 1757,73 y 1150,52 din/cm^2 respectivamente, correspondientes a una velocidad de deformación de $415,48 \text{ s}^{-1}$.

El biopolímero 5028 de Pseudomonas presentó una tensión inicial de 108,66 din/cm^2 a una velocidad de

deformación de $105,758 \text{ s}^{-1}$ (Alsina, J.M., 1985).

Para la goma xantano se ha establecido una tensión inicial al 1 % de 13 din/cm^2 (Whitcomb y col., 1977).

A muy bajos rangos de agitación la viscosidad es newtoniana. En este punto la viscosidad es función del peso molecular y de la concentración del polímero. Cuando se incrementa el rango de agitación se observa un decrecimiento en la viscosidad.

Cuando se aumenta la concentración del polímero también se aumenta la viscosidad de la solución, pero esto ocurre así hasta el punto donde se produce un desorden molecular, el cual no prevalece mucho tiempo, y entonces la viscosidad se vuelve una función del rango de agitación. Este fenómeno es llamado pseudoplasticidad.

De acuerdo con la ecuación propuesta por el modelo de Scott-Blair, nuestro polímero, al igual que la goma xantano (Scott-Blair 1974) y el biopolímero EPS 5028 de Pseudomonas (Alsina, J.M., 1985), presenta un comportamiento pseudoplástico a todas las concentraciones, salvo el polímero de RS1051 al 0,25 % que muestra un ligero carácter de fluido dilatante.

Todavía no es posible hacer una correlación exacta entre la estructura química y las propiedades físicas. El uso de difracción por rayos X y otras técnicas han revelado que los biopolímeros adoptan estructuras ordenadas las cuales contribuyen a las propiedades en solución acuosa.

Las moléculas de gelano parecen adoptar una estructura helicoidal, al quitar los grupos acetilos de

este polisacárido aumenta la cristalinidad de la estructura. La presencia o ausencia de grupos acetilos tiene que ver con las propiedades gelificantes (Sutherland, 1986).

Los grupos piruvatos afectan la viscosidad. La eliminación de grupos acilos de Pseudomonas PS-60 produjo formación de geles (Cadmus y col., 1976).

Las propiedades físicas de los xantanos pueden estar afectadas por los grupos acilos presentes y esto varía dependiendo de la cepa bacteriana y de las condiciones fisiológicas usadas para el crecimiento. (Sutherland, 1986).

El xantano forma una estructura helicoidal en solución (Sutherland, 1986). Los grupos acetilos tienen un efecto estabilizante en la forma ordenada del xantano, los grupos piruvatos tienen un efecto opuesto. El contenido en acetilo y piruvato no tiene influencia en la viscosidad de soluciones diluidas del xantano o en su viscosidad intrínseca (Callet, 1987).

Sandford y col. (1977) coinciden con lo anteriormente expuesto, concluyendo que los xantanos con alto contenido en piruvato son más viscosos que los xantanos con bajo contenido en este radical.

III.1. Influencia de la concentración sobre la viscosidad de los exopolisacáridos.

Al aumentar las concentraciones de los polímeros de las cepas en estudio también aumenta la viscosidad de las mismas. Para una concentración del 2 % la viscosidad de

los polímeros correspondiente a una velocidad de agitación de $4570,238 \text{ s}^{-1}$ (250 rpm) fué de 91,9; 139,9 y 106 cp para los exopolisacáridos de RS1051, CFN42 y CIAT899 respectivamente. Por tanto, el exopolisacárido de CFN42 es el que dió una mayor viscosidad en solución acuosa.

La viscosidad de los citados polímeros a una concentración de 2% correspondiente a una velocidad de deformación de 9140 s^{-1} (500 rpm) fué de 72; 91 y 72 cp.

El exopolisacárido 5028 de Pseudomonas en estas mismas condiciones presenta una viscosidad de 13,92 cp (Alsina, J.M., 1985).

El xantano presenta una viscosidad de 7.000 cp a una concentración del 2 % y a 60 rpm de agitación. A estas mismas condiciones el exopolisacárido 5028 de Pseudomonas presenta una viscosidad de 2.940 cp (Alsina, J.M., 1985).

En la bibliografía los polisacáridos estudiados con fines industriales, tales como el succinoglucano de Arthrobacter (Sutherland, 1983), el exopolisacárido de Beijerinckia indica (Cottrell, 1980), el exopolisacárido de Erwinia tahitica y el escleroglucano (Kang y col., 1979), presentan una alta viscosidad. Estos datos no son comparables con los obtenidos en nuestros estudios porque se han utilizado diferentes técnicas de medida de viscosidad.

Cabe indicar, que no todos los exopolisacáridos que se utilizan industrialmente presentan una alta viscosidad. Un ejemplo es el dextrano cuyas soluciones al 6 % presentan unos valores de viscosidad similares al plasma sanguíneo.

III.2. Influencia de la temperatura sobre la viscosidad de los exopolisacáridos.

En los fluidos no newtonianos la temperatura tiene una gran importancia pues pequeñas variaciones en la misma, pueden modificar el comportamiento reológico de estos fluidos.

La viscosidad de las soluciones de la mayoría de los exopolisacáridos generalmente decrece cuando son calentadas.

Las soluciones al 1% de los polímeros que se están estudiando, mantuvieron su viscosidad cuando fueron calentadas hasta un valor de 60°C, pero cuando la temperatura alcanzó los 80°C, la viscosidad aumentó marcadamente para el polímero de CIAT899 y de forma menos notable para los otros dos. Este mismo fenómeno se observa en soluciones de xantano en sistemas libres de sales, cuya viscosidad incrementa después de un decrecimiento inicial al ser calentadas (Jeanes y col., 1961). Esto puede deberse a un desorden de la conformación ordenada tal como una doble hélice, cambiando a una espiral sin orden, resultando un incremento en el volumen hidrodinámico de la molécula y por tanto aumenta la viscosidad.

Las soluciones de xantano son bastante resistentes a cambios de temperatura (Jansson y col., 1975, Melton y col., 1976).

El polisacárido de Erwinia tahitica presenta alta viscosidad a 60°C, pero a temperatura superior disminuye (Kang, 1979).

Para el exopolisacárido de Pseudomonas 11264, la viscosidad depende de la temperatura (Williams y Lawson, 1979). El exopolisacárido de Arthrobacter es bastante estable a cambios de temperaturas (Sutherland, 1983).

El exopolisacárido 5028 de Pseudomonas es afectado por el calor, produciéndose una marcada disminución de la viscosidad en el intervalo de 10 a 35°C y entonces se estabiliza hasta 70°C a cuyo valor la viscosidad se reduce a un 73 % (Alsina, J.M., 1985).

El escleroglucano, otro polisacárido de uso industrial, tiene una viscosidad bastante estable entre 10 y 90°C.

Si se compara el comportamiento de nuestros polímeros con el de otros de uso industrial, se puede observar que son bastante resistentes a la temperatura en un margen de 0 a 80°C. Así el zanflo tiene un descenso en la viscosidad de 25 cp/°C de incremento de temperatura.

III.3. Influencia del pH sobre la viscosidad de los exopolisacáridos.

Frente a los cambios de pH comprendidos entre 1 y 13, el polímero de CFN42 mantuvo estable su viscosidad. El polímero de RS1051, presentó primeramente un ligero aumento de la viscosidad para estabilizarse de nuevo a pH 9. Y por último, el polímero de CIAT899 sufrió un efecto contrario al anterior, ya que primeramente disminuyó su viscosidad, aunque no de forma muy marcada, hasta pH 11 para aumentar a pH 13.

Si se compara este comportamiento con el de la goma xantano en solución, vemos que nuestros polímeros son algo menos estables a los cambios de pH puesto que la viscosidad del xantano es totalmente independiente a los cambios de pH en un rango de 1 a 13 (Jeanes, 1961; Janson, 1975; Melton, 1976; Sutherland, 1986).

En cambio, el escleroglucano sólo se mantiene estable hasta pH 10 (Kang, 1979) y el zanflo sólo es estable hasta este mismo valor de pH (Kang, 1977).

La viscosidad del exopolisacárido de Pseudomonas 5028 es independiente de los valores de pH en un rango de 1,5 a 13.

III.4. Influencia de deformaciones sucesivas sobre la viscosidad de los exopolisacáridos.

Cuando sometimos las soluciones (2%) de los polímeros a deformaciones sucesivas, se observó un comportamiento diferente para los tres polisacáridos. El polímero de la cepa CIAT899 mantuvo su viscosidad después de ser sometido cinco veces consecutivas a un proceso de deformación con una velocidad desde 0 a 500 rpm y viceversa, durante 60 s. El polímero de CFN42 fué perdiendo viscosidad a lo largo de los 4 primeros procesos de deformación a que se sometió, hasta perder un 24 % de la misma, volviendo a recuperar su valor inicial tras ser sometido a un proceso de deformación por quinta vez.

El polímero de RS1051 mostró un aumento de viscosidad en un 25 % tras haber sido sometido al proceso de deformación por dos veces sucesivas. Después mantuvo

constante su viscosidad a lo largo de tres procesos más de deformación.

Estos fenómenos pueden explicarse por rotura de algunos enlaces en la estructura final del polisacárido y formación de otros nuevos hasta adaptarse a la estructura más estable. Esta nueva estructura proporciona una mayor viscosidad al polisacárido en el caso de RS1051, y hace perder viscosidad al polímero de CFN42 hasta que se recupera volviendo a la viscosidad inicial.

Los polímeros que se estudian son bastante resistentes a las deformaciones sucesivas, ya que si comparamos con otros polímeros de uso industrial, observamos que los cambios sufridos en su viscosidad son mínimos.

El xantano pierde hasta un 50 % de su viscosidad tras ser sometido a un proceso de deformación semejante (Kang, 1983). El polímero de Pseudomonas 5028 pierde un 30 % de su viscosidad cuando se ha sometido a dos pases sucesivos de deformación hasta 1000 rpm durante 60 s (Alsina, J.M., 1985).

III.5. Estudio tixotrópico de los exopolisacáridos.

La estructura supermolecular que a menudo está presente en soluciones de polímeros, da lugar a una variedad de fenómenos reológicos dependientes del tiempo.

La más común es la tixotropía, la cual ha sido definida como una transición reversible gel-sol. Es observada experimentalmente como un decrecimiento en la

viscosidad con el tiempo en un rango de agitación constante.

Algunos sistemas tixotrópicos tienen la propiedad de aumentar su consistencia más rápidamente con la agitación muy lenta que con completo reposo.

Estos fenómenos son debidos a roturas de enlaces débiles dentro de la estructura molecular del polímero, que por un proceso de deformación continuado, sufren reordenación estructural.

Para poner de manifiesto la existencia de estos fenómenos en nuestros polímeros y tras someterlos a una agitación constante a de 500 rpm durante 100 s, a temperatura ambiente (22°C), se obtuvieron los tixogramas correspondientes, y se calcularon los índices de aceleración tixotrópica para cada polímero.

Así se han obtenido valores de estos índices superiores a 0, lo cual indica que estos polímeros tienen un carácter reopéctico.

Este comportamiento coincide con el mostrado por el polímero de la cepa 5028 de Pseudomonas (Alsina, J.M., 1985).

IV. ESTUDIO DE LA RETENCION DE METALES POR EL EXOPOLISACARIDO.

Dugan y Pickrum (1972) sugirieron que es posible desarrollar un proceso microbiológico, implicando polímeros extracelulares, para eliminar iones metálicos de solución. De esta forma es posible entender el papel de

los polisacáridos extracelulares en la eliminación de iones metálicos en procesos de tratamiento de aguas residuales. Su potencial aplicación en otros procesos para el control de polución de metales puede ser de valor en la estrategia de control de polución en general.

La biomasa del lodo activo es la que contribuye a la eliminación del metal tóxico (Oliver y Cosgrove, 1974). El polímero extracelular está implicado en la biomasa del lodo activo, y por tanto en la eliminación de iones solubles de metales (Dugan y Pickrum, 1972; Brown y Lester, 1979). Algunas cepas de Zoogloea ramígera han demostrado tener una alta afinidad por iones solubles de metales (Friedman y Dugan, 1968), y material polimérico extraído del lodo activo del que forman parte estas cepas, ha sido capaz de unir iones metálicos (Steiner y col., 1976).

Steiner y col (1976), Nelson y col. (1981) y Forster (1983) han usado el término adsorción para describir la transición entre la forma soluble del metal, y la formación de partículas a través de un proceso con lodo activo.

Con este fin se ha llevado a cabo el estudio de la capacidad de los polímeros de RS1051, CFN42 y CIAT899 para retener iones metálicos.

Los polímeros en estudio, al igual que el exopolisacárido disuelto de Chlorella stigmatophora (Kaplan 1987), no fué capaz de unir iones Pb^{2+} . Tampoco hubo retención de cadmio, cinc ni mercurio.

El exopolisacárido de CFN42 y RS1051 si presentaron capacidad de retener cobre, coincidiendo en esto con el

polímero de C. stigmatophora, aunque con un comportamiento contrario respecto a la retención de cinc y cadmio (Kaplan, 1987).

El polímero de CIAT899 presentó capacidad de retención de iones cromo.

En la fase de tratamiento con lodo activo, en el proceso de depuración de aguas residuales, la eliminación de níquel, manganeso y cobalto es baja pero la de cobre, plomo, cromo y cinc está en un promedio del 50 % (Sterritt y Lester 1981, Kempton y col. 1983).

Estos estudios preliminares abren un camino de investigación muy interesante, pues no sólo el género Rhizobium es capaz de competir con las cepas productoras de EPS para uso industrial, sino que el polímero que sintetiza tiene una composición muy sencilla, fácilmente modificable y con unas características reológicas apropiadas para su uso industrial, incluso con buenas perspectivas para su utilización en depuración de aguas residuales.

CONCLUSIONES

1a.- La producción de polisacáridos extracelulares por Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051 y Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42 y CIAT899, se afecta tanto por las condiciones de cultivo como por las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas, consiguiéndose la mejor producción cultivando:

a) R. leguminosarum var. trifolii RS1051 a 28°C durante 5 días, conteniendo glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (relación C:N, 5:1), sometido a una agitación rotatoria de 200 rpm.

b) R. leguminosarum var. phaseoli CFN42 a 37°C durante 5 días, en un medio conteniendo sacarosa como fuente de carbono, y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (relación C:N, 5:1), sometido a una agitación rotatoria de 200 rpm.

c) R. leguminosarum var. phaseoli CIAT899 a 28°C durante 5 días en un medio conteniendo sacarosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno (relación C:N, 5:1), sometido a una agitación rotatoria de 200 rpm. *se omite cultivo*

2a.- Del estudio de los polisacáridos por HPLC se deduce la siguiente composición:

a) Para el exopolisacárido de Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051: glucosa, galactosa, acético, urónicos y 3-hidroxi-butírico en la proporción molar 2:1:0,5:0,1:0,1. También

contiene pirúvico aunque su presencia no fué detectada.

b) Para el exopolisacárido de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CFN42: glucosa, galactosa, acético y urónicos, en la proporción molar 2:1:0,5:0,12. También contiene pirúvico aunque su presencia no fué detectada.

c) Para el exopolisacárido de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CIAT899: glucosa, galactosa, acético y pirúvico, en la proporción molar 3:1:0,5:0,3.

3a.- Las modificaciones de las condiciones fisiológicas de cultivo y de las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas, generalmente sólo afectan la composición cuantitativa del exopolisacárido.

4a.- La presencia de metales pesados en el medio de producción de exopolisacárido para la cepa de Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051 afecta tanto a la cantidad como a la composición cuantitativa del polímero.

5a.- Los exopolisacáridos de las cepas de Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051 y Rhizobium leguminosarum var. phaseoli (CFN42 y CIAT899) tienen alta viscosidad en solución acuosa, presentan carácter pseudoplástico y comportamiento reopéctico. Son bastante estables a los cambios de temperatura en un intervalo de 20 a 80°C, a los cambios de pH en un

intervalo de 1 a 13 unidades, y a deformaciones sucesivas.

6a.- Los polisacáridos extracelulares de las cepas de Rhizobium leguminosarum var. trifolii RS1051 y var. phaseoli CFN42 son capaces de formar complejos con iones cobre en solución. El polisacárido extracelular de la cepa de Rhizobium leguminosarum var. phaseoli CIAT899 es capaz de formar complejo con iones cromo en solución. Ninguno de los tres polímeros tiene capacidad para retener iones plomo, cadmio, cinc ni mercurio.

BIBLIOGRAFIA

- ABE, M., SHERWOOD, J.E., HOLLINGSWORTH, R.I. and DAZZO, F.B. 1980. J. Bacteriol. 160: 517-520.
- AIKING, H., KOK, K., VAN HEERIKHUIZEN, H. and VAN'TRIEJ, J. 1982. Appl. Environ. Microbiol. 44: 938-944.
- ALLEN, O.N. 1951. Experiments in soil bacteriology. Burgess Publish Minneapolis.
- ALLISON, D.G. and SUTHERLAND, I. W. 1978. J.Gen. Microbiol. 133: 1319-1327.
- ALSINA, J.M. 1985. Búsqueda y selección de microorganismos productores de exopolisacáridos. Características del exopolisacárido de la cepa EPS-5028. Tesis de Licenciatura.
- AMARGER, N., OBATON, N. and BLANCHERE, M. 1967. Can. J. Microbiol. 13: 99-105.
- AMEMURA, A. and HARADA, T. 1983. Carbohydr. Res. 115: 165-174.
- ANDERSON, R.F., BENEDICT, R.V., CADMUS, M.C. and SLODKI, M.E. 1960. Arch. Biochem. Biophys. 89: 289.

- ANDREW, T.R. 1977. Extracellular microbiol polysaccharides. ACS Symp. Ser. 45: 231-241. Sandford, P.A. and Laskin, A., (eds.). Am. Chem. Soc. Washington. D. C.
- ANONIMOUS. 1962. Microbial polysaccharide B-1973, CA-N-21. USDA Agric. Res. Serv. Peoria, Illinois.
- ANONYMOUS, 1969. 21 CFR 172.695.
- APPANNA, V.D. 1988. FEMS Microbiol. Lett. 50: 141-144.
- BAUER, W.D. 1981. Ann. Rev. Plant. Physiol. 32: 407-449.
- BERGEY'S. 1984. Manual of systematic bacteriology. 1. Krieg, N.R. y Holt, J. G. (Eds). Williams y Wilkins. Co. Baltimore.
- BERINGER, J.E. 1974. J. Gen. Microbiol. 84: 188-198.
- BEYER, R. and MELTON, L.D. 1983. Carbohydr. Res. 122: 155-163.
- BHAGWAT, A.A., and THOMAS, J. 1984. Arch. Microbiol. 140: 260-264.

- BINGHAM, E.C. 1922. Fluidity and plasticity. p. 217. Mc Graw-Hill, New York.
- BJORNDAL, H., HELLERQUIST, C.G., LINDBERG, B. and SVENSSON, S. 1970. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 9: 610-619.
- BOOTH, C. 1971. Methods in Microbiology. Vol. 4. Academic Press, London, New York.
- BROWN, M.J. and LESTER, J.N. 1979. Water Res. 13: 817-837.
- CADMUS, M.C., LAGODA, A.A. and ANDERSON, R.F. 1962. Appl. Microbiol. 10: 153.
- CADMUS, M.C., GASDORF, H., LAGODA, A.A., ANDERSON, R.F. and JACKSON, R.W. 1963. Appl. Microbiol. 11: 488-492.
- CADMUS, M.C., ROGOVIN, S.P., BURTON, K.A., PITTSLEY, J.E., KNUTSON, C.A. and JEANES, A. 1976. Can. J. Microbiol. 22: 942.
- CADMUS, N.C., BURTON, K.A. and SLODKI, M.E. 1982. App. Environ. Microbiol. 44: 242-245.
- CALLET, F., MILAS, M. 1987. J. Biol. Macromol. 9: 291-293.

- CARLSON, R.W. and TURNBULL, J.D. 1984. Advance in nitrogen fixation research. p. 412. Veeger, C. and Newton, W.E. (eds.). Wageningen, The Netherlands.
- CATLEY, B.J. 1971. Appl. Microbiol. 22: 641.
- CATLEY, B.J. 1979. Microbial polysaccharides and polysaccharases. pp: 69-84. Gooday, G.W. and Ellwood, D.C. (eds.). Academic Press, London, New York. San Francisco.
- CAVIEDES, M.A., MEGIAS, M., GIL, A.M., PALOMARES, A.J. and RUIZ-BERRAQUERO, F. 1982. Arch. Microbiol. 133: 20-22.
- CHAKRAVORTY, A.K., ZURKOWSKI, W., SHINE, J. and ROLFE, B.G. 1982. J. Mol. Appl. Genet. 1: 585-596.
- CHAUDHARI, A.S., BISHOP, C.T. and DUDMAN, W.F. 1973. Carbohydr. Res. 28: 221-231.
- CORPE, W.A. 1964. J. Bacteriol. 88: 1433.
- COTTRELL, I.W., KANG, K.S. and KOVACS, P. 1980. Handbook of water-soluble gums and resins. pp: 24.1-24.31. Davidson, R.L. (ed.). Mc. Graw Hill, New York.

- COUSO, R.O., IELPI, L. and DANKERT, M.A. 1987. J. Gen. Microbiol. 133: 2123-2135.
- COX, J.S., KING, R.E. and REYNOLDS, G.F. 1965. Nature (London). 207: 1202-1203.
- CYPERT, J.D. and PATTON, J.T. 1963. V.S. Patent. 3,084,122; Chem. Abstr. 59: 1422.
- DART, P.J. 1977. Infection and development of leguminous nodules. A treatise on dinitrogen fixation. pp. 367-372. Hardy, R.W. and Silver, W.S. (eds.). Newyork.
- DAVIDSON, I.W. 1978. FEBS Lett. 3: 347.
- DAZZO, F.B., TRUCHET, J.L., SHERWOOD, J.E., HRABAK, E.N. and GARDIOL, A.E. 1982. App. Env. Microbiol. 44: 478-490.
- DINTZIS, F.R., BABCOCK, G.E. and TOBIN, R. 1970. Carbohydr. Res. 13: 257-267.
- DUDMAN, W.F. 1984. Advances in nitrogen fixation research. pp. 397-404. Veeger. C. and Newton. W.E. (eds.). Wageninge. The Netherlans.

- DUGAN, P.R. and PICKRUM, H.M. 1972. Removal of mineral ions from water by microbially produced polymers. Proceedings of the 27th Industrial Conference. Purdue University, Engineering Extension. 141: 1019-1038.
- DUGUID, J.P. and WILKINSON, J.F. 1953. J. Gen. Microbiol. 9: 174.
- ELLWOOD, D.C., YEO, R.G. and EVANS, G.T. 1979. E.E.C. Patent.
- EVANS, C.G.T., YEO, R.G., and ELLWOOD, D.C. 1979. Microbial polysaccharides and polysaccharases. pp. 51-68. Berkeley, R.C.W., Gooday, G.W. and Ellwood, D.C. (eds.). Academic Press, London, New York, San Francisco.
- FAHRAEUS, G. and LJUNGGREN, H. 1967. The ecology of soil bacteria. pp: 396-421. Grayand, T.R.G., Parkinson, D. (eds.). Liverpool University Press.
- FELTY, L.G. 1975. U.S. Patent 3,906,108.
- FORSTER, C.F. 1983. Environ. Technol. Letters. 4: 417-424.
- FORSYTH, W.G.C. and WEBLEY, D.M. 1949. Biochemistry. 44: 455.

- FRIEDMAN, B.A., and DUGAN, P.R. 1968. Industrial Microbiology. 9: 381-388.
- GARCIA, S., BARRACO, M., ADRIA, M.A., LOPEZ, J.M., GINER, P. Y GARCIA-SOTO, L. 1987. Concepto de reología. Aplicaciones a la industria. Definición de fluidos newtonianos y no newtonianos. CIF. 6. pp: 264-268.
- GARDIOL, A.E. and DAZZO, F.B. 1986. J. Bacteriol. 168: 1459-1462.
- GIBSEN, K.F. and SADDINGTON, A.W. 1973. U.S. PATENT. 3,717,452.
- GOMORI, G. 1955. Methods in Enzymology. 1: 138-146.
- GRAHAM, T.L. 1981. Biology of the Rhizobiaceae. pp. 127-148. Giles, K.L. and Arthely, A.G. (eds.). Academic Press. London.
- GRÖNWALL, A. 1957. Dextran and its use in colloidal infusion solutions. Academic Press, New York.
- HALLECK, F.E. 1969. U.S. Patent 3,447,940.

- HARADA, T., MAEDA, I., HIROSHI, S., MASADA, M. and MISAKI, A. 1967. Agric. Biol. 31: 1184-1188.
- HARADA, T. 1977. Microbial extracellular polysaccharides. pp: 265-283. Sandford, P.A. and Laskin, A. (eds.). American chemical society, Washington.
- HERBERT, D. and KORNBERG, H.L. 1976. Biochem. J. 156: 477.
- HIGASHI, S. and ABE, M. 1980. App. Environ. Microbiol. 40: 1094-1099.
- HISAMATSU, M., AMEMURA, A., KOIZUMI, K., UTAMARA, T. and OKADA, Y. 1983. Carbohydr. Res. 121: 31-40.
- HOLLINGSWORTH, R., SMITH, E., and AHMAD, M.H. 1985. Arch. Microbiol. 142: 18-20.
- HOLLINGSWORTH, R., DAZZO, F. and MORT, A.J. 1987. J. Bacteriol. 169: 3369-3371.
- HUBER, T.A., AGARWAL, A.K. and KEISTER, D.L. 1984. J. Bacteriol. pp. 1168-1171.
- JANSSON, P.E., KENNE, L. and LINDBER, B. 1975. Carbohidr. Res. 45: 275-282.

JARMAN, T.R. 1979. Microbial polysaccharides and polysaccharases. pp: 35-50. Berkeley, R.C.W., Gooday, G.W. and Ellwood, D.C. (eds.). Academic Press, London, New York, San Francisco.

JEANES, A. and SLONEKER, J.H. 1961. U.S. Patent. 3,000,790.

JEANES, A. 1965. Carbohydr. Chem. 5: 118-127.

JEANES, A. 1968. Encyl. Poly. Sci. Techno. 4: 693-711. Bicales, N.M. (ed.).

JIRGENSONS, B., STRAUMANIS, M.E. 1965. Compendio de química coloidal. Comp. Ed. Continental. México.

KANG, K.S., VEEDER, G.T. and RICHEY, D.D. 1977. Extracellular microbial polysaccharides. pp: 211-219. Sandford, P.A. and Laskin, A. (eds.). American Chemical Society, Washington.

KANG, K.S. and COTTRELL, I.W. 1979. Thecnol. 2: 417-481.

KANG, K.S., VEEDER, G.T. and COTTRELL, I.W. 1983. Progress in industrial Microbiology. 18. Elsevier. Amsterdam.

KAPLAN, D., CHRISTIAEN, D. and ARAD, S. 1987. Appl. Environ. Microbiol. pp: 2953-2956.

KATO, G., MARUYAMA, Y. and NAKAMURA, N. 1981. Plant. Cell. Physiol. 66: 609-614.

KEMPTON, S., STERRITT, R.M. and LESTER, J.N. 1983. Environ. Pollution (Series A) 32: 51-78.

KENNEDY, L.D. 1980. Carbohidr. Res. 87: 156-160.

KNETTIG, E. and ZAJIC, J.E. 1972. Biotechnol. Bioeng. 14: 379.

LAW, I.J., YAMAMOTO, Y., MORT, A.J. and BAUER, W.D. 1982. Planta. 154: 100-109.

LESTER, J.N. 1983. Science of the total environment. 30: 1-44.

LESTER, J.N., STERRITT, R.M., RUDD, T. and BROWN, M.J. 1984. Microbiol. Meth. Environ. Biotechnol. pp. 197-217.

LESTER, J.N. and STERRIT, R.M. 1985. J. Appl. Bacteriol. Symposium supplement. pp. 141-153.

- LILLY, V.G., LEACH, J.G. and WILSON, H.A. 1958. Appl. Microbiol. 6: 105-108.
- LINDBERG, B., LÖRNGREN, J. and THOMPSON, J.L. 1973. Carbohydr. Res. 28: 351-357.
- LINTON, J.D., GOULDNEY, D. and WOODARD, S. 1988. J. Gen. Microbiol. 134: 1913-1921.
- LJUNGGREN, H. 1969. Physiol. Plant. Suppl. 5: 84.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. and SAMBROOK, J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- MARSHALL, K.C., STOUT, R. and MITCHELL, R. 1971. J. Gen. Microbiol. 68: 337-348.
- MARTIN, L.E., BATES, C.M., BERESFORD, C.R., DONALDSON, J.D., Mc DONALD, F.F., DUNLOP, D., SHEARD, P., LONDON, E. and TWIGG, G. D. 1955. Br. J. Pharmacol. Chomoter. 10: 375.
- MAXTED, W.R. 1952. Nature (London). 170: 1020-1021.
- MELTON, L.D., MINDT, L., REES, D.A. and SANDERSON, G.R. 1976. Carbohydr. Res. 46: 245.

MIAN, F.A., JARMAN, T.R. and RIGHELATO, R.C. 1978. J. Bacteriol. 134: 418.

MOKRASCH, L.C. 1954. J. Biol. Chem. 208:55-59.

MOORHOUSE, R., COLEGROVE, G.T. SANDFORD, P.A., BAIRD, J.S. and KANG, K.S. 1981. Solution properties of polysaccharides. pp: 111-124. Brant, D. (ed.). American Chemical Society, Washington.

MORT, A.J. and BAUER, W.D. 1980. Plant. Physiol. 66: 158-163.

MOTHES, J. 1961. Estadística aplicada a la Ingeniería. Ariel. Madrid.

MURPHY, P.T. and WHISTLER, R.L. 1973. Industrial gums. 2nd. ed. pp: 513-542. Whistler, R.L. and Bemiller, J.N. (eds.). Academic Press, New York.

NAGAHAMA, T., FUJIMOTO, J. and KANIE, M. 1977. Agric. Biol. Chem. 41: 9-16.

NAPOLI, C. and ALBERSHEIM, P. 1980. J. Bacteriol. 141: 1454-1456.

NEIJSSELL, O.M. and TEMPEST, D.W. 1976. Arch. Mikrobiol.
107: 215.

NELSON, P.O., CHUNG, A.K. and HUDSON, M.C. 1981. J. of the
Water Polution Control Federation. 53: 1323-1333.

OLIVER, B.G. and COSGROVE, E.G. 1974. Water Res. 8: 869-
874.

OWEN, W.E. 1950. Sugar. 45: 42.

OWEN, W.I. 1959. U.S. PATENT. 2,868,725.

PAAU, A.S., LEPS, W.T. and BRILL, W.B. 1981. Science. 213:
1513-1515.

PETROWSKI, G.E. 1978. Proc. AFMA Symp. pp. 57-59.

PETTIT, D.J. 1979. Polysaccharides in food. pp: 263-282.
Blanshard, J.M.V. and Mitchell, J.R. (eds.).
Butter Worthes, London and Boston.

RODGERS, N.E. 1973. Industrial gums. 2nd ed. pp. 499-511.
Wistler, R.L. and Be Miller, J.N. (eds.).
Academic Press, New York.

- RODRIGUEZ, D.N. 1986. Estudios fisiológicos y genéticos de estirpes de Rhizobium meliloti con vistas a la producción de inoculantes. Tesis Doctoral.
- RUSSA, R. LÜDERITZ, O., and RIETSCHER, E.T. 1985. Arch. Microbiol. 141: 284-289.
- SAHLMAN, K. and FAHREUS, G. 1963. J. Gen. Microbiol. 33: 425-431.
- SANDERS, R.E., CARLSON, R.W. and ALBERSHEIM, C. 1978. Nature. 271: 240-242.
- SANDFORD, P.A., PITTSLEY, J.E., KNUTSON, C.A., WATSON, P.R., CADMUS, M.C. and JEANES, A. 1977. Microbiol extracellular polysaccharides. ACS Symposium. pp: 45-81.
- SCHEEPE-LEBERKÜHNE, M. and WAGNER, F. 1986. Biotechnol. Lett. 3: 695-700.
- SCHOLLA, M.H. and ELKAN, G.H. 1984. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 484-486.
- SCHUPPNER, H.R. 1972. U.S. Patent 3,659,026.

- SCOTT-BLAIR, G.M. 1969. Elementary Rheology. Academic Press. London. 1969.
- SCOTT-BLAIR, G.M. 1974. An introduction to biorheology. Elsevier Press. Amsterdam.
- SHERWOOD, D.J.E., VASSE, J.M. DAZZO, F.B. and TRUCHET, G.L. 1984. J. Bacteriol. 159: 145-152.
- SILMAN, R.W. and ROGOVIN, P. 1972. Biotechnol. Bioeng. 14: 23.
- SILMAN, R.W. and BAGLEY, E.B. 1979. Biotechnol. Bioeng. 21: 173.
- SLODKI, M.E. and CADMUS, M.C. 1979. Appl. Microbiol. 26: 19.
- SLONEKER, J.H. and JEANES, A. (1962). Can. J. Chem. 40: 2066-2071.
- SLONEKER, J.M., ORENTAS, D.G. and JEANES, A. 1964. Can. J. Chem. 42: 1261-1269.
- SLONEKER, J.H., ORENTAS, D.G., KNUTSON, C.A., WARSON, P.R. and JEANES, A. 1968. Can. J. Chem. 46: 3353-3361.

SMITH, I.H., SYMES, K.C. LAWSON, C.J. and MORRIS, E.R.
1981. Int. J. Biol. Macromol. 3: 129.

SOMME, R. 1975. Carbohydrate research. 43: 145-149.

SOUW, P. and DEMAIN, A.L. 1979. Appl. Environ. Microbiol.
37: 1186.

SPARKS, W.J. 1962. U.S. Patent 3,053, 765. Chem. Abstr.
58: 8838. (1963).

STACEY, G. PAAU, A.S. and BRILL, W.G. 1980. Plant
Physiol. 66: 609-614.

STEPHENSON, T. and LESTER, J.N. 1984. Removal of metals
during activated sludge treatment by the
entrapment of precipitated metals. Proceedings of
the International Conference on Environmental
Contamination, London, Edinburg: CEP consultants
pp. 800-805.

STEINER, A.E., Mc LAREN, D.A. and FORSTER, C.F. 1976.
Water Res. 10: 25-30.

STERRIT, R.M. and LESTER, J.N. 1981. Water. Res. 15: 59-
65.

- SUTHERLAND, I.W. 1977. Microbial exopolysaccharide synthesis. ACS Symposium serie 42. Sandford, P.A. and Laskin, A. (eds.).
- SUTHERLAND, I.W. 1983. Biotechnol. 3: 533-574.
- SUTHERLAND, I.W. 1986. Microbiol. Sciences. 3: 5-8.
- SZAUISZLO, P.J., WIRSEN, C.Jr. and MITCHELL, R. 1968. J. Bacteriol. 96: 1474-1483.
- TANAKA, A., CHO, Y., TERANISHI, Y., NABESHIMA, S. and FUKUI, S. 1974. J. Ferment. Technol. 52: 739.
- TULLY, R.E. 1988. Appl. Environ. Microbiol. pp. 1624-1626.
- VEDA, S., MOMII, F., OSAJIMA, K. and ITO, K. 1981. Agric. Biol. Chem. 45: 1977-1981.
- VANCE, C.P. 1983. Ann. Rev. Microbiol. 37: 399-424.
- VAN POOLLEN, H. 1980. Fundamentals of enhanced oil recovery. Penn Well Books, Tulsa.
- VINCENT, J.M. 1980. Factors controlling the legume-Rhizobium symbiosis. pp. 103-129. Newton, W.E.

and Orme-Johnson, W.H. (eds.) Nitrogen fixation
II. University Park Press, Baltimore.

WHITCOMB, P.J. EK, B.J. and MOCOSKO, C.W. 1977. Rheology
of Xanthan Gum solutions. Extracellular Microbial
Polysaccharides, pp: 160-173. ASCM. 45.

WILKINSON, J.F. 1958. Bacteriol. Rev. 22: 46.

WILLIAMS, A.G., and WIMPENNY, J.W.T. 1977. J. Gen.
Microbiol. 102: 13.

WILLIAMS, A.G. and WIMPENNY, J.W.T. 1978. J. Gen.
Microbiol. 104: 47.

WILLIAMS, A.G. and LAWSON, C.J. 1979. Brit. Patent
1,539,064 A.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. 1973. Carbohydr. Res. 26: 409-419.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. 1981. Antonie van Leeuwenhoek. 47:
481-497.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.H. and NEERVEN, A.R.W. 1983.
Carbohydr. Res. 118: 127-134.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. 1986. FEMS Microbiol. Lett. 35: 43-47.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Ms. del Carmen Cuevas Rivato

titulada Estudio del polipéptido extracelular de *Xanthomonas*

vesicatorum var. *trifolii* RS 1057 y *Xanthomonas leucometastri*

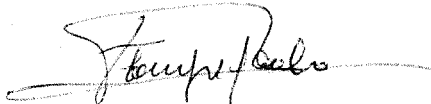
var. *maritima* CFN 42 y CIAT 899

acordó otorgarle la calificación de APTO CON LAUDE

Sevilla, 12 de Junio

1965

El Vocal,



El Presidente

El Vocal,



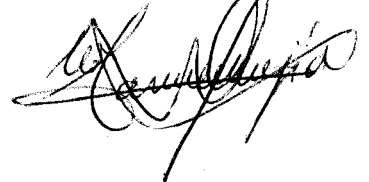
El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,



DPTO. DE MICROBIOLOGIA
Y
PARASITOLOGIA