



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA**

**TESIS DE GRADO
PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE:
INGENIERO QUIMICO**

TEMA:

**“Aislamiento y Caracterización de la
Bacteria Zymomona Mobilis”**

AUTORES:

**Ricardo Javier Abarca Arauz
Verónica Andrea Navarrete Carpio**

DIRECTOR DE TESIS:

Ing. Qco. Carlos Muñoz Cajiao

2010

GUAYAQUIL

ECUADOR

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis no hubiera podido ser realizada sin la ayuda de muchas personas, a todas ellas queremos expresarles la fortuna que hemos tenido de trabajar y compartir con vosotros, estamos muy agradecidos por la ayuda, aprecio, amistad y solidaridad recibida.

En primer lugar queremos agradecer al Ing. Qco. Carlos Muñoz Cajiao, quien aceptó ser nuestro director de tesis y de quien hemos recibido amistad, confianza, conocimientos y toda su ayuda para llegar a feliz término de esta tesis, además por la paciencia y dedicación.

Agradecemos a nuestras familias por el apoyo brindado y por el sacrificio hecho para hacer de nosotros unos profesionales con buenos valores.

También queremos agradecer a todos nuestros queridos profesores de la Facultad de Ingeniería Química por los conocimientos brindados durante los años de permanencia en la facultad.

No podemos dejar de agradecer a nuestros amigos que estuvieron junto a nosotros en momentos difíciles y que fueron fundamentales durante los años de estudio.

Ing. Qco. Ricardo Abarca Arauz

Ing. Qca. Verónica Navarrete Carpio

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

- 1.1. Resumen
- 1.2. Introducción
- 1.3. Antecedentes
- 1.4. Importancia actual de la producción de bioetanol
- 1.5. Objetivo general
- 1.6. Objetivo específico

CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LA MATERIA PRIMA

- 2.1. Agave
- 2.2. Clasificación botánica
 - 2.2.1 Características generales (ver anexo B)
 - 2.2.2 Principales especies (ver anexo C)
 - 2.2.2.1. Agave Americana
 - 2.2.2.2. Agave Victoriae Reginae
 - 2.2.2.3. Agave Stricta
 - 2.2.3. Técnica de cultivo (ver anexo D)
 - 2.2.3.1. Riego
 - 2.2.3.2. Suelo – Trasplante
 - 2.2.3.3. Abono
 - 2.2.3.4. Floración
 - 2.2.3.5. Poda
 - 2.2.3.6. Multiplicación
 - 2.2.4 Plagas y enfermedades (ver anexo E)
 - 2.2.5 Cabuya en el Ecuador (ver anexo F)
 - 2.2.5.1. Características de la cabuya ecuatoriana
 - 2.2.5.2. Regionalización
- 2.3. Propiedades
- 2.4. Usos

CAPÍTULO 3: ZYMOMONAS MOBILIS

3.1. Taxonomía de *Zymomonas mobilis*

3.1.1. Hábitat

3.1.2. Metabolismo

3.1.3. Necesidades nutritivas

3.1.4. Catabolismo

3.1.4.1. Formación de 6-P-GLUCONATO a partir de sacarosa, glucosa o fructosa

3.1.5. Estructura y composición de la membrana celular

3.1.6. Bioquímica de la reacción

3.1.6.1. Cuantificación de azúcares reductores totales, proteínas y etanol

3.1.7. Balance energético

3.2. Limitaciones del proceso

3.3. Influencia del oxígeno e inhibición por el etanol

3.4. Efecto de ciertos parámetros fisicoquímicos sobre el crecimiento y la producción de etanol por *Zymomonas mobilis* en cultivos por lotes

3.4.1. Efecto del sustrato

3.4.2. Efecto de la temperatura

3.4.3. Efecto del Etanol

3.4.4. Efecto del pH

3.5. Aplicaciones industriales

CAPÍTULO 4: PRUEBAS EXPERIMENTALES

4.1. Cultivo de la bacteria *Zymomona mobilis*

4.1.1. Medio de cultivo # 1

4.1.2. Medio de cultivo # 2

4.1.3. Siembra # 1 del extracto N°1 en el medio de cultivo # 1

4.1.4. Siembra # 1 del extracto N°2 en los medios de cultivo 1 y 2

4.1.5. Siembra # 2 del extracto N°1 en los medios de cultivo 1 y 2

4.1.6 Siembra # 1 del extracto N°3 en los medios de cultivo 1 y 2

4.1.7. Morfología de las colonias

4.1.8. Resiembra # 1 del extracto N°1 en el medio de cultivo 1 y 2
disolución 10^{-1}

4.1.9. Resiembra # 2 del extracto N°1 en el medio de cultivo # 1 disolución
 10^{-1}

4.1.10. Resiembra # 3 del extracto N°1 en el medio de cultivo # 1 disolución
 10^{-1}

4.1.11. Discusión

4.2. Identificación de la bacteria *Zymomona mobilis*

4.2.1. Pruebas bioquímicas

4.2.1.1. Prueba del Indol

4.2.1.2. Prueba del Citrato

4.2.1.3. Prueba del TSI (triple sugar iron)

4.2.1.4. Prueba de Ureasa

4.2.1.5. Prueba de Gelatinaza

4.2.1.6. Prueba D-glucosa

4.2.1.7. Prueba de Sacarosa

4.2.1.8. Prueba de Lactosa

4.2.1.9. Prueba Standard media + 0.5% NaCl

4.2.1.10. Prueba de Catalasa

4.2.1.11. Prueba de Oxidasa

4.2.1.12. Prueba de Movilidad

4.2.1.13. Prueba de Detección de *Zymomonas mobilis*

4.2.3. Análisis de resultados

4.3. Aislamiento de la bacteria *Zymomonas mobilis*

4.4. Crecimiento cinético de la bacteria *Zymomonas mobilis*

4.5. Conclusiones

4.6. Recomendaciones

APÉNDICE

Bibliografía

Glosario de términos

ANEXOS

Anexo A

Anexo B

Anexo C

Anexo D

Anexo E

Anexo F

CAPÍTULO 1

DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

1.1. RESUMEN

El proceso de aislamiento y caracterización de las bacterias *Zymomonas mobilis* comienza con la solución de la muestra, que en nuestro caso fue el jugo de cabuya recogido de la sierra ecuatoriana en donde se encuentran la bacteria *Zymomona mobilis*, la cual fue sembrada en un medio de cultivo y en condiciones de incubación (atmósfera, temperatura, pH) considerando las características fisiológicas del microorganismo para su adecuado crecimiento y reproducción.

Para la identificación y caracterización de estas bacterias gramnegativas se realizaron pruebas bioquímicas dadas para el microorganismo en estudio, para realizar estas pruebas se dispuso de múltiples medios, los cuales se deben aplicar de acuerdo a las exigencias del microorganismo en estudio y se comparó los resultados con los dados en el Manual de Bacteriología de Bergey, lo cual confirmó la presencia de esta bacteria en el jugo de cabuya.

Se realizó el crecimiento cinético para conocer la velocidad de reproducción de esta bacteria.

Finalmente se aisló la bacteria *Zymomona mobilis* en una solución de glicerol al 20% con la finalidad de preservarla a una temperatura de -80°C , cumpliéndose así los objetivos propuestos en este proyecto.

1.2. INTRODUCCION

Los procesos de producción de alcohol pueden ser realizados por síntesis química o biológica. La producción por síntesis química se basa en la oxidación del etileno bajo condiciones drásticas de presión y temperatura. La producción de alcohol por vía biológica se utilizó desde hace mucho tiempo, entre los microorganismos productores de etanol más utilizados se encuentran las levaduras del género *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, ya sea para su utilización como materia de base para procesos de síntesis química, o para la producción de bebidas alcohólicas.

Múltiples aspectos sobre la producción de alcohol por levaduras relacionadas con la fisiología, las rutas metabólicas implicadas, así como el efecto de ciertos parámetros fisicoquímicos que influyen en la producción de alcohol ya han sido estudiados. De igual manera, diferentes tecnologías relacionadas con la producción de alcohol por levaduras han sido desarrolladas con el objetivo de incrementar la concentración de alcohol, así como su productividad.

Otro de los microorganismos que recientemente ha sido objeto de numerosos estudios sobre la producción de alcohol es la *Zymomonas mobilis*. Esta bacteria ha despertado gran interés en la comunidad biotecnológica del mundo por su alta velocidad de fermentación.

La síntesis de etanol vía microbiana convencionalmente es por levaduras, sin embargo el género bacteriano *Zymomonas* spp tiene una especial capacidad para producir etanol, que en la actualidad es una alternativa interesante, para la actual demanda mundial de combustibles derivados del petróleo.

Los resultados confirman su amplia distribución en fuentes naturales y su potencial para producir etanol. Se concluye que este género sujeto a un exhaustivo trabajo de selección por vía natural o ingeniería genética puede ser una alternativa para la solución de la crisis mundial de energéticos, puesto que el etanol sintetizado por vía biológica no causa contaminación ambiental.

1.3. ANTECEDENTES

Desde que fue aislada como gran contaminante durante la producción de sidra en 1912, *Zymomonas mobilis* ha sido objeto de numerosos estudios. Su eficiencia para la producción de alcohol es conocida desde 1931 gracias a los estudios de Kluyver y Hoppenbrouwers.

Tres años más tarde, en 1934, Screder y sus colaboradores demostraron que cuando *Zymomonas mobilis* era cultivada en presencia de glucosa, 98% del sustrato era transformado en etanol y CO₂. A principios de los años 50 Gibbs y DeMoss demostraron que la bacteria metabolizaba su sustrato por la vía de Entner-Doudoroff (E-D). Este descubrimiento contribuyó considerablemente al estudio de *Zymomonas mobilis*, pues hasta entonces se consideraba que la bacteria, al igual que las levaduras utilizadas para la producción de alcohol, metabolizaba su sustrato por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). No fue sino hasta los años 60 que la bacteria fue utilizada a nivel industrial para la producción de pulcre, bebida alcohólica de origen mexicano, obtenida por fermentación de cocultivo con *Lactobacillus* sp. Y *Leuconostoc mesenteroides*. Hasta ahora, éste constituye el único ejemplo de la utilización de *Zymomonas* a nivel industrial. Fue en esa misma época que los investigadores empezaron a interesarse por los aspectos cinéticos del crecimiento y de la producción de etanol por *Zymomonas mobilis*.

En 1965 se reportó por primera vez la velocidad de crecimiento de *Zymomonas mobilis* y se mostró el efecto de la composición del medio de cultivo sobre: la producción de biomasa, el tiempo de generación y la de etanol a partir de glucosa. Algunos trabajos fueron después realizados con el mismo objetivo: el estudio del crecimiento de *Zymomonas mobilis* en función de la fuente de carbono y de energía.

Durante más de cincuenta años numerosos trabajos se han realizados sobre diferentes aspectos (ecológicos, bioquímicos y tecnológicos) de *Zymomonas*

mobilis. Debido a la gran dispersión, y en algunos casos, a la ambigüedad de resultados presentados, Swings y deLey se dedicaron al estudio taxonómico y fenotípico de más de cuarenta cepas de *Zymomonas mobilis* aisladas en diferentes países. Aunque su estudio fue dedicado a los aspectos biológicos de la bacteria, ellos llegaron a la conclusión de que *Zymomonas* presentaban un gran potencial económico, lo cual fue confirmado dos años más tarde por el grupo australiano de Rogers, que demostraron que en comparación con las levaduras, tradicionalmente utilizadas para la producción de etanol, *Zymomonas mobilis* presenta rendimientos y velocidades de producción de etanol superiores. Debido a las características organolépticas de algunas bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación con levaduras, la sustitución de éstas por *Zymomonas* es difícil de suponer, sin embargo, la bacteria podría ser utilizada para la producción de alcohol para su uso como energético, o como materia de base en procesos de síntesis química.

1.4. IMPORTANCIA ACTUAL DE LA PRODUCCION DE BIOETANOL

El consumo mundial de energía esta aumentado debido al floreciente crecimiento de la población humana y al incremento en la prosperidad, especialmente en los países menos desarrollados. En el presente, el uso de fuentes renovables de energía, como la energía hidráulica, la geotérmica, la energía obtenida a partir de biomasa, la energía eólica y la solar, han ganado gran atención por las limitadas reservas de las fuentes de energía tradicionales y no renovables, como los combustibles fósiles. El énfasis sobre la conversión de biomasa en etanol se ha incrementado, dado que el etanol es considerado el combustible líquido alternativo más limpio.

El bioetanol es el producto de fermentación alcohólica de diversos materiales orgánicos a través de la acción de microorganismos. La producción de bioetanol perdió importancia a finales de la primera mitad del siglo XX, al ser sustituida por la producción de etanol por vía sintética, a partir de derivados del petróleo, que resulta más barata, pero no puede ser utilizado en la preparación de alimentos, bebidas alcohólicas, ni medicamentos.

La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y CO_2 como desechos consecuencia de la fermentación.

En la actualidad se empieza a sintetizar etanol mediante la fermentación a nivel industrial a gran escala para ser empleado como biocombustible.

La vía fermentativa de producción de etanol, es hoy competitiva porque es sostenible y se trabaja fundamentalmente en la búsqueda de materias primas baratas, que sustituyan a las tradicionales materias azucaradas, como melazas, productos intermedios de la producción de azúcar y jugos de frutas, a la vez que

se busca una mayor eficiencia en los procesos de fermentación, recuperación y purificación del alcohol producido.

El costo de producción del etanol está íntimamente relacionado y es dependiente del costo de la materia prima puesta en fábrica, del volumen y de la composición de la misma. El éxito de cualquier plan de desarrollo de cultivos para la producción de etanol es dependiente de la selección de los cultivos apropiados, los métodos de producción y su ubicación. Un sistema que sea establecido alrededor de los costos más bajos de la materia prima y esté completamente integrado, de forma tal que aproveche todas las posibilidades que le dan los derivados, presenta las mejores oportunidades para ser exitoso.

1.5. OBJETIVO GENERAL

Este proyecto tiene como finalidad aislar y caracterizar bacterias *Zymomonas mobilis*.

1.6. OBJETIVO ESPECÍFICO

Aplicar técnicas para la identificación bioquímica y aislamiento de la bacteria *Zymomonas mobilis*.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO DE LA MATERIA PRIMA

2.1. AGAVE

El género agave pertenece a la familia de las Agavaceae y comprende numerosas especies originarias de las zonas desérticas de América. La mayor parte de las plantas son monocárpicas, vale decir que florecen una sola vez en su vida y después de la floración y la maduración de los frutos muere.

2.2. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA

Phylum: Euphyta

División: Angiospermae

Clase: Monocotyledones

Orden: Amaryllidaceae

Familia: Agavaceae

Género: Agave

2.3. PROPIEDADES

Es diurético, depurativo, antiescorbútico. En medicina popular laxante, vulnerario. Las raíces son consideradas como antisifilíticas. La infusión de las hojas se usa como bebida refrescante, con efecto hepático y digestivo. Externamente se ha usado para lavar los ojos irritados. El jugo fresco de las hojas es resolutivo y se ha usado para tratar heridas e irritaciones de la piel.

2.4. USOS

El agave se cultiva aún por la fibra textil de sus hojas, llamada pita. El zumo azucarado extraído de la savia del tallo floral antes de la floración se fermenta

para producir una bebida alcohólica, llamada pulque, que a su vez se destila para obtener el mezcal.



Entre los usos curiosos de esta planta destaca el de una provincia española Almería, donde el espigón de las flores es utilizado para hacer escaleras.

Algunas variedades se utilizan en jardinería, especialmente la *marginata* (con el borde de las hojas de color blanco amarillento) y la *medio-picta* (con una banda en medio de la hoja en vez del extremo).

Muy utilizadas antiguamente para la fabricación de la cuerda de pita propiamente dicha. Su elaboración consiste en machacar las hojas de la planta hasta hacer que se desprenda su parte verde y húmeda. Así se logran las fibras que hay en su interior. Luego se encordan éstas hasta fabricarse cuerdas de textura áspera de varios grosores y de un color casi blanco. Actualmente se emplean medios mecánicos y su uso es más escaso.

CAPÍTULO 3

ZYMO MONAS MOBILIS

3.1. TAXONOMÍA DE LAS ZYMOMONAS MOBILIS

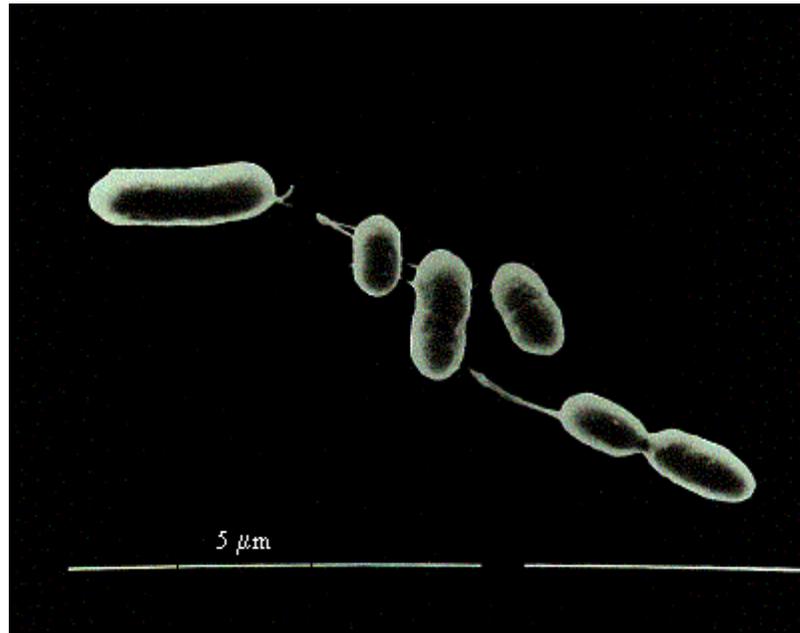
La existencia de *Zymomonas mobilis* fue publicada por vez primera en 1912 (bajo el nombre de Ceba ya citado por Swings y deLey 1977). Otra cepa de *Zymomonas mobilis* (llamada inicialmente *Thermobacterium mobile*) fue aislada por Lindner en 1928 a partir de jugo de agave fermentado. Durante más de 20 años numerosas cepas de *Zymomonas* han sido aisladas, y la clasificación de las bacterias ha cambiado en varias ocasiones. Debido a su morfología, y al hecho de metabolizar su sustrato por vía de Entner-Doudoroff, la bacteria ha sido clasificada dentro de la familia de las Pseudomonadaceae. Utilizando criterios taxonómicos relacionados con más de cuarenta cepas, Swings y deLey propusieron una nueva clasificación que reagrupa a todas las cepas de *Zymomonas* en una especie (*Zymomonas mobilis*) y dos subespecies: *Zymomonas mobilis mobilis* y *Zymomonas mobilis pomaceae*.

La mayor parte de las cepas pertenece a la subespecie *mobilis*. Algunas características fenotípicas del género *Zymomonas* son:

1. Bastón gramnegativo de 1 a 5 μm de ancho y de 2 a 6 μm de largo.
2. Inmóvil o móvil debido a la presencia de 1 a 4 flagelos lofótricos.
3. Arreglo celularpleomórfico (cadenas, rosetas, filamentos).
4. Ausencia de esporas, de cápsulas y de constituyentes de almacenamiento celular.
5. Catalasa positiva y oxidasa negativa.
6. Anaeróbico y microaerófilico.
7. La utilización de sacarosa es inducible y puede ir acompañada de información de levanas.
8. Las únicas fuentes de carbono que metaboliza son: glucosa, fructosa y sacarosa.

9. Contenido de G+C de 47,5 a 49,5%.

10. Talla del genoma $1,5 \cdot 10^9$ kdaltones, aproximadamente 1500 cistrones.



3.1.1. HÁBITAT

Zymomonas forma parte de la microflora presente en el material de reserva de algunos vegetales tropicales. Algunas bacterias de este género se han aislado como contaminantes durante la producción de sidra y de cerveza.

3.1.2. METABOLISMO

Zymomonas sólo fermenta la glucosa, la fructosa y la sacarosa, por tanto presenta la particularidad de no asimilar prácticamente ninguna otra fuente de carbono, aunque se ha reportado que pueden metabolizar la rafinosa.

Para la fermentación de la glucosa utilizan la vía de Entner – Doudoroff.

La fermentación de estas dos hexosas se acompaña de una producción de gas importante y de una acidificación del medio.

La mayoría de las cepas produce entre 1 y 1,6 moles de etanol por mol de glucosa o de fructosa metabolizado.

Por cada mol de sustrato consumido, se producen dos moles de NADH, éstas se producen a nivel del etanol y una parte menor a nivel del lactato.

El rendimiento de ATP es de uno por un mol de hexosa degradada.

Zymomonas no posee sistema de transporte como la fosfoenol piruvato glucosa fosfotransferasa, ni sistema de permeasa, sino más bien un sistema por difusión facilitada.

Presentan un sistema de transporte para la glucosa y fructosa que se asocia a una velocidad de difusión elevada y una afinidad baja, esto la limita a vivir en un hábitat limitado a entornos con altas concentraciones de azúcar.

3.1.3. NECESIDADES NUTRITIVAS

Zymomona mobilis es una bacteria quimiorganótrofa que presenta auxotrofia por el pantotenato de calcio, y en algunos casos por la biotina. El nitrógeno necesario para el crecimiento puede proporcionársele por medio de sales minerales, aminoácidos o péptidos.

Los nitratos y nitritos no son asimilados por la bacteria. El azufre, magnesio y potasio son proporcionados en forma de sales. Los oligoelementos (Mo, Fe, Zn, Mn, etc.) necesarios al metabolismo de la bacteria se encuentra en estado de trazas en sales utilizadas para la preparación del medio de cultivo.

3.1.4. CATABOLISMO

Como se mencionó anteriormente, *Zymomonas mobilis* metaboliza su sustrato por la vía de Entner-Doudoroff (Fig. 1), vía generalmente utilizada por los organismos aerobios estrictos. Desde el punto de vista energético *Zymomonas mobilis* ha sido considerada ineficiente para producir biomasa, ya que una sola molécula de ATP es producida por cada molécula de monosacárido metabolizada. Sin embargo, si uno considera la producción de etanol, es claro que la bacteria representa un sistema biológico muy eficaz.

Debido a las características de producción de etanol por *Zymomonas mobilis* (tasas catabólicas elevadas, utilización simultánea de glucosa y de fructosa, tolerancia a altas concentraciones de etanol y de azúcares, formación de diferentes subproductos en función del tipo de sustrato carbonado utilizado, conversión elevada de sustrato en etanol y en CO₂), son enzimas implicadas en la utilización directa de los azúcares y las enzimas responsables de la formación del etanol a partir del piruvato, las que han sido más estudiadas.

El estudio de las enzimas que intervienen en la vía catabólica (Entner-Doudoroff) se dividirá en tres partes:

1. Formación de 6-P-gluconato a partir de sacarosa, glucosa o fructosa.
2. Formación de piruvato a partir de 6-P-gluconato.
3. Formación de etanol y de CO₂ a partir de piruvato.

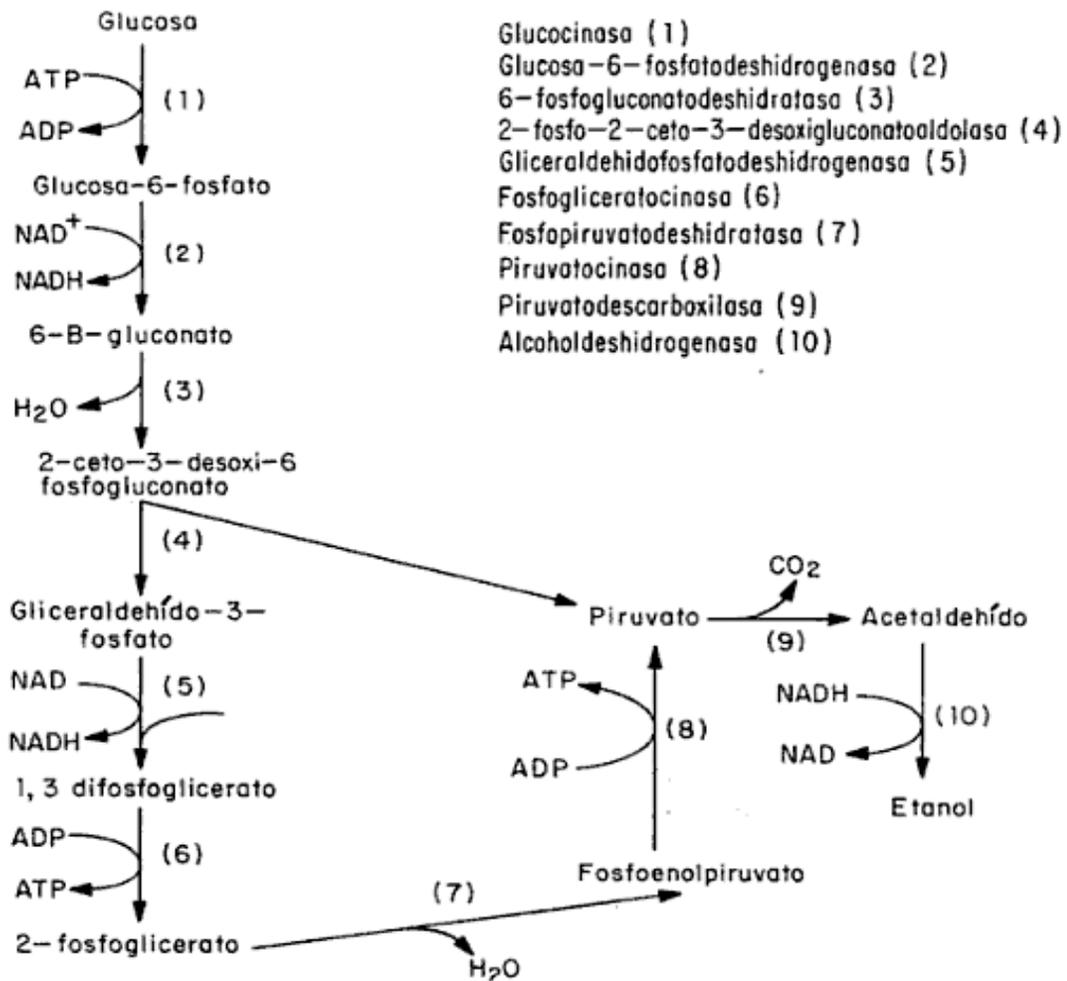


Figura 1. Vía metabólica de degradación de sustrato de Entner-Doudoroff

3.1.4.1. FORMACIÓN DE 6-P-GLUCONATO A PARTIR DE SACAROSA, GLUCOSA O FRUCTOSA

La serie de reacciones que intervienen en la formación de 6-P-gluconato a partir de cada uno de los azúcares arriba mencionados tiene un papel importante en la formación de productos de la fermentación. De una manera general, dependiendo del sustrato carbonado utilizado existen dos vías de oxidación del sustrato:

1. Cuando el sustrato es glucosa o fructosa, el etanol y el CO₂ son los productos mayoritarios de la fermentación (Fig. 2A).
2. Cuando el sustrato es la sacarosa, levanas y sorbitol son también producidos. Este último puede producirse cuando la fuente de carbono está constituida por una mezcla de glucosa y de fructosa (Fig. 2B).

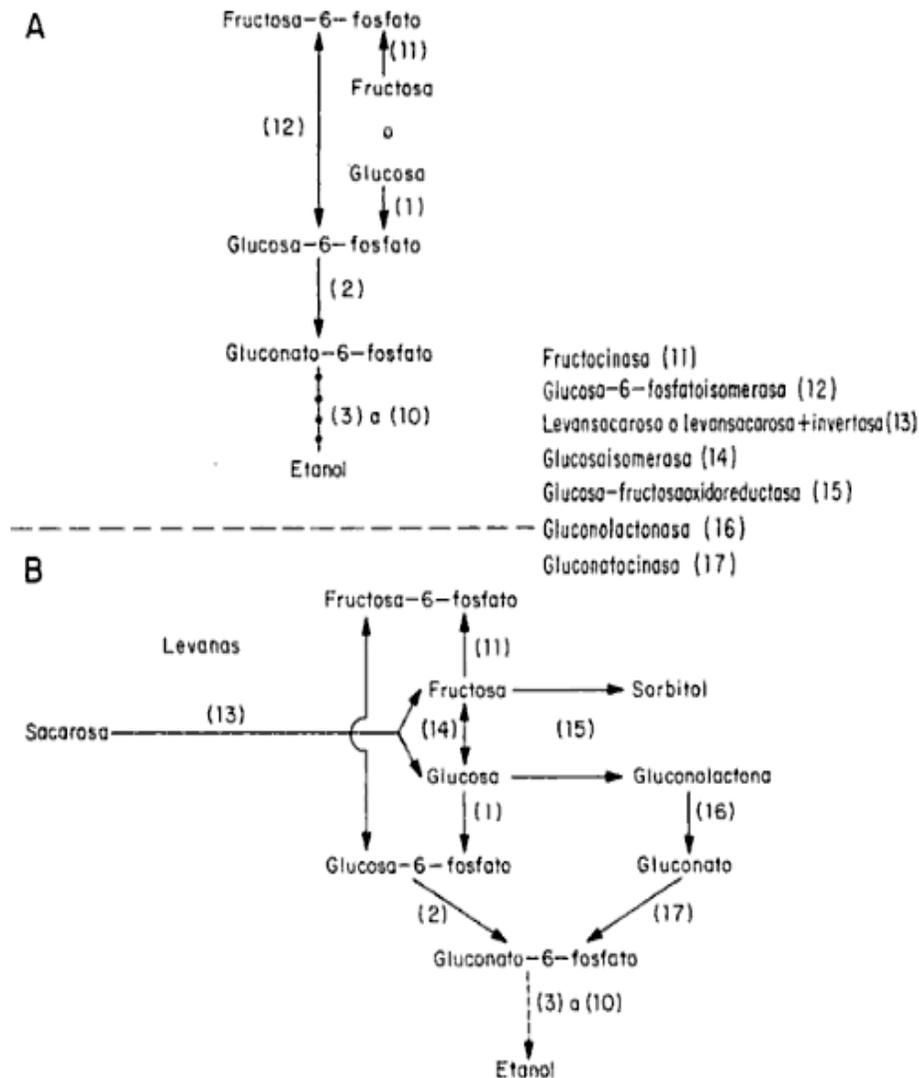


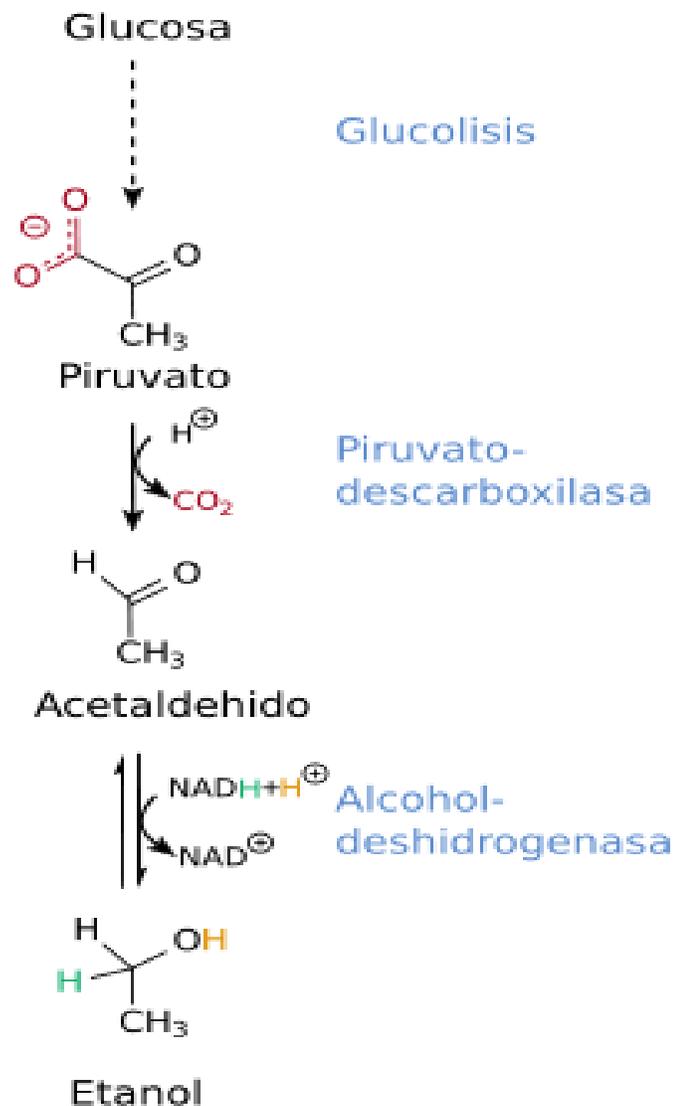
Figura 2. Vía metabólica de producción de etanol a partir de: A. Glucosa o Fructosa B. Sacarosa o mezcla de Glucosa y Fructosa

3.1.5. ESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LA MEMBRANA CELULAR

La membrana celular de *Zymomonas mobilis* es característica de las bacterias gramnegativas, ésta comprende una membrana externa, una membrana interna y la mureína. Los fosfolípidos principales de *Zymomonas mobilis* están representados por la fosfatidiletanolamina (fe), el fosfatidilglicerol (fg), y el difosfatidilglicerol (dfg). En las *Zymomonas* también están presentes la fosfatidilcolina (fc) y el fosfatidildimetiletanol-amina (fdme), ambos fosfolípidos están raramente presentes en las bacterias gramnegativas.

La proporción de ácidos grasos insaturados y principalmente del ácido cisvaccénico es elevada (70-80% de los ácidos grasos totales). También se ha demostrado la presencia de hopanoides, cuya estructura es muy similar a la de los esteroides y que juegan un papel muy importante para la estabilidad de las membranas en las levaduras. Después de extraer y analizar los lipopolisacáridos (lps) de *Zymomonas mobilis*, se reportó la presencia de glucosa, galactosa, manosa y ácido mirístico, al igual que pequeñas cantidades de hexosaminas, pentosas, ácido urónico y fosfato. Sin embargo, el ácido β -hidroximirístico (componente del lípido a), el ácido cetodesoxioctulonóico (cdo) y heptosa compuesto característico de los lps de bacterias gramnegativas no fueron detectados. Más recientemente se demostró la presencia de un polisacárido particular, constituido de unidades alfafructofuranosil-2 \rightarrow 6, y que está asociado a la membrana celular.

3.1.6. BIOQUÍMICA DE LA REACCIÓN



Bioquímica de la reacción de fermentación

La glucólisis es la primera etapa de la fermentación, lo mismo que en la respiración celular, y al igual que ésta necesita de enzimas para su completo funcionamiento. A pesar de la complejidad de los procesos bioquímicos una forma esquemática de la reacción química de la fermentación alcohólica puede

describirse como una glicólisis (en la denominada *vía Embden-Meyerhof-Parnas*) de tal forma que puede verse como participa inicialmente una molécula de hexosa:



Se puede ver que la fermentación alcohólica es desde el punto de vista energético una reacción exotérmica, se libera una cierta cantidad de energía. La fermentación alcohólica produce gran cantidad de CO₂, que es la que provoca que el cava (al igual que el Champagne y algunos vinos) tengan burbujas. Este CO₂ (denominado en la edad media como *gas vinorum*) pesa más que el aire, y puede llegar a crear bolsas que desplazan el oxígeno de los recipientes donde se produce la fermentación. Por ello es necesario ventilar bien los espacios dedicados a tal fin. En las bodegas de vino, por ejemplo, se suele ir con una vela encendida y colocada a la altura de la cintura, para que en el caso de que la vela se apague, se pueda salir inmediatamente de la bodega. La liberación del dióxido de carbono es a veces "tumultuosa" y da la sensación de hervir, de ahí proviene el nombre de fermentación, palabra que en castellano tiene por etimología del latín *fervere*.

Un cálculo realizado sobre la reacción química muestra que el etanol resultante es casi un 51% del peso. Se puede ver igualmente que la presencia de fósforo (en forma de fosfatos), es importante para la evolución del proceso de fermentación. La fermentación alcohólica se produce por regla general antes que la fermentación maloláctica, aunque existen procesos de fermentación específicos en los que ambas fermentaciones tienen lugar al mismo tiempo. La presencia de azúcares asimilables superiores a una concentración sobre los 0,16 g/L produce invariablemente la formación de alcohol etílico en proceso de crecimiento de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) incluso en presencia de exceso de oxígeno (aeróbico), este es el denominado efecto Crabtree, este efecto es tenido en cuenta a la hora de estudiar y tratar de modificar la producción de etanol durante la fermentación.

Si bien el proceso completo (*vía Embden-Meyerhof-Parnas*) descrito simplificado anteriormente explica los productos resultantes de la fermentación etílica de un hexano, cabe destacar que el proceso se puede detallar en una glicólisis previa gobernada por un conjunto de enzimas en la que se obtiene un piruvato tal y como se describe a continuación:



La reacción química se describe como la reducción de dos moléculas de Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) de NADH (forma reducida del NAD^+) con un balance final de dos moléculas de ADP que finalmente por la reacción general mostrada anteriormente se convierten en ATP (adenosín trifosfato). Otros compuestos trazados en menores proporciones que se encuentran presentes tras la fermentación son: el ácido succínico, el glicerol, el ácido fumárico.

En más detalle durante la fermentación etílica en el interior de las levaduras, la vía de la glucólisis es idéntica a la producida en el eritrocito (con la excepción del piruvato que se convierte finalmente en etanol). En primer lugar el piruvato se descarboxila mediante la acción de la piruvato descarboxilasa para dar como producto final acetaldehído liberando por ello dióxido de carbono (CO_2) a partir de iones del hidrógeno (H^+) y electrones del NADH. Tras esta operación el NADH sintetizado en la reacción bioquímica catalizada por el GADHP se vuelve a oxidar por el alcohol deshidrogenasa, regenerando NAD^+ para la continuación de la glucólisis y sintetizando al mismo tiempo etanol. Se debe considerar que el etanol va aumentando de concentración durante el proceso de fermentación y debido a que es un compuesto tóxico, cuando su concentración alcanza aproximadamente un 12% de volumen las levaduras tienden a morir. Esta es una de las razones fundamentales por las que las bebidas alcohólicas (no destiladas) no alcanzan valores superiores a los 20% de concentración de etanol.

3.1.6.1. CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES TOTALES, PROTEÍNAS Y ETANOL

Las etapas del proceso de fermentación del jugo del agave identificadas como: Aguamiel, semilla, contrapunta y corrida. El aguamiel corresponde al líquido extraído de la cepa del agave, la semilla es un jugo con fermentación de alrededor de 60 días, la contrapunta es un jugo de 24 horas de fermentación obtenido por una mezcla 1:1 de aguamiel y semilla. La corrida corresponde a un jugo de 48 horas de fermentación, esta es la etapa final y el producto se comercializa. Las muestras se transportan refrigeradas y se procesan durante las 24 horas siguientes.

Empleando las técnicas colorimétricas de Miller y Bradford se cuantifica la concentración en g/L de azúcares reductores totales y proteínas. Encontrando que al inicio del proceso (aguamiel) se presentó la mayor cantidad de azúcares y proteínas a razón de 25 g/L y 3.7 g/L lo que demuestra que el aguamiel es un sustrato nutricionalmente enriquecido que favorece el crecimiento de poblaciones microbianas; las cuales utilizan los compuestos del aguamiel como fuente de carbono y energía para producción de nuevas células, acompañado de la formación de productos de la fermentación.

Como se observa en la Figura A, el contenido de azúcar y proteína va disminuyendo en función del tiempo de fermentación, sin embargo no llega a ser consumido en su totalidad es por esto que el pulque al final del proceso ó etapa denominada como corrida tiene un ligero sabor dulce, contenido de proteína y etanol. En un jugo de 48 horas de fermentación el contenido de etanol fue de 10.35 % (v/v), 4.76 g/L de azúcares reductores y 1 g/L de proteína. Los porcentajes de etanol obtenidos mediante cromatografía de gases se muestran en la Tabla 1.

Tabla #1. Concentraciones de etanol para las cuatro diferentes etapas de fermentación, obtenidas mediante espectroscopia de gases

MUESTRA	CONTENIDO DE ETANOL % (V/V)
Agua miel	0,26
Semilla	7,01
Contrapunta	6,34
Corrida	10,35

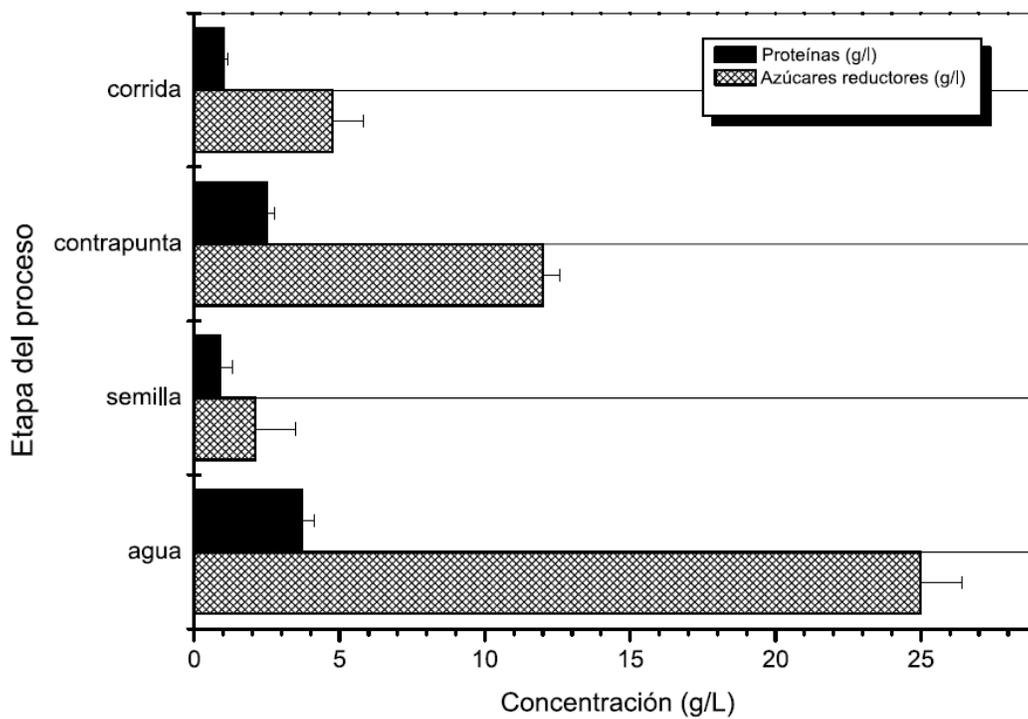


Figura A. Concentración de proteínas y azúcares reductores durante cada etapa del proceso de fermentación artesanal de jugo de agave

3.1.7. BALANCE ENERGÉTICO

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico exotérmico (libera energía) y moléculas de ATP necesarias para el funcionamiento metabólico de las levaduras (seres unicelulares). Debido a las condiciones de ausencia de oxígeno durante el bioproceso, la respiración celular de la cadena del ADP en ATP queda completamente bloqueada, siendo la única fuente de energía para las levaduras la glicólisis de la glucosa con la formación de moléculas de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. El balance a nivel molecular del proceso se puede decir que genera 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Si se compara este balance con el de la respiración celular se verá que se generan 38 moléculas de ATP. A pesar de ello parece ser suficiente energía para los organismos anaeróbicos. La energía libre de Gibbs (entalpía libre) de la reacción de fermentación etílica muestra un valor de ΔG de $-234.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ (en un entorno de acidez neutra pH igual a 7) este valor negativo de la energía libre de Gibbs indica que: desde el punto de vista termodinámico **la fermentación etílica es un proceso químico espontáneo.**

3.2. LIMITACIONES DEL PROCESO

La determinación de los factores que limitan la glicólisis fermentativa del etanol son complejos debido a la interrelación existente y a la naturaleza de los parámetros intervinientes durante el proceso de fermentación. Algunos de ellos se deben tener en cuenta en la fermentación alcohólica industrial. En las limitaciones que surgen durante el proceso se pueden enumerar algunos de los más importantes como son:

- **Concentración de etanol resultante.-** Una de las principales limitaciones del proceso, es la resistencia de las levaduras a las concentraciones de etanol (alcohol) que se llegan a producir durante la fermentación, algunos

microorganismos como el *Saccharomyces cerevisiae* pueden llegar a soportar hasta el 12% de concentración en volumen. En ingeniería bioquímica estos crecimientos se definen y se modelizan con las ecuaciones de crecimiento celular dadas por las ecuaciones de Tessier, Moser y de la ecuación de Monod.

- **Acidez del sustrato.**- El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación ya que las levaduras se encuentran afectadas claramente por el ambiente, bien sea alcalino o ácido. Por regla general el funcionamiento de las levaduras está en un rango que va aproximadamente desde 3.5 a 5.5 pH. Los procesos industriales procuran mantener los niveles óptimos de acidez durante la fermentación usualmente mediante el empleo de disoluciones tampón. Los ácidos de algunas frutas (ácido tartárico, málico) limitan a veces este proceso.
- **Concentración de azúcares.**- La concentración excesiva de hidratos de carbono en forma de monosacáridos y disacáridos puede frenar la actividad bacteriana. De la misma forma la baja concentración puede frenar el proceso. Las concentraciones límite dependen del tipo de azúcar así como de la levadura responsable de la fermentación. Las concentraciones de azúcares afectan a los procesos de osmosis dentro de la membrana celular.
- **Contacto con el aire.**- Una intervención de oxígeno (por mínima que sea) en el proceso lo detiene por completo (es el denominado **Efecto Pasteur**). Esta es la razón por la que los recipientes fermentadores se cierran herméticamente.
- **La temperatura.**- El proceso de fermentación es exotérmico, y las levaduras tienen un régimen de funcionamiento en unos rangos de temperatura óptimos, se debe entender además que las levaduras son seres mesófilos. Si se expone cualquier levadura a una temperatura cercana o superior a 55 °C por un tiempo de 5 minutos se produce su muerte. La mayoría cumple su misión a temperaturas de 30°C.

- **Ritmo de crecimiento de las cepas.**- Durante la fermentación las cepas crecen en número debido a las condiciones favorables que se presentan en el medio, esto hace que se incremente la concentración de levaduras.

3.3. INFLUENCIA DEL OXÍGENO E INHIBICIÓN POR EL ETANOL

Con respecto a la inhibición por oxígeno, se ha demostrado que *Zymomonas mobilis* no es una bacteria estrictamente aerobia. La aireación disminuye el rendimiento en etanol y la concentración en ácido láctico, aumenta la velocidad de consumo específico de glucosa y la producción de ácido acético. La inhibición es más importante sobre la productividad de etanol que sobre el crecimiento celular. El efecto Pasteur está ausente y el rendimiento no aumenta en condiciones de aerobiosis.

Con respecto a la inhibición por etanol, *Zymomonas mobilis* presenta probablemente la tolerancia más elevada al etanol. Es capaz de producir etanol con concentraciones superiores a 13% (p/v). Esto en parte es debido a que sus enzimas glucocinasa y fructocinasa no están sometidas a una inhibición por etanol, además presenta modificaciones a nivel de su membrana celular y presenta una adaptación a altas concentraciones de etanol. Esto se traduce en una disminución de la relación lípido/proteína y en una modificación de la composición en fosfolípidos, o sea, la excepcional resistencia al etanol de esta bacteria sería debido a que practica un cierto re arreglo a nivel de membrana, del contenido de fosfolípidos hopanoides y proteínas.

3.4. EFECTO DE CIERTOS PARAMETROS FISICOQUÍMICOS SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE ETANOL POR ZYMOMONAS MOBILIS EN CULTIVOS POR LOTES

Los estudios de Rogers y Cols mostraron el interés de la utilización de *Zymomonas mobilis* para la producción de etanol. La Tabla 2 resume los datos obtenidos durante un estudio comparativo de la producción de etanol por *Zymomonas mobilis* y por la levadura *Saccharomyces carlsbergensis* (actualmente *S. pastorianus*) a partir de un medio con concentraciones elevadas de glucosa. Estos resultados muestran algunas propiedades interesantes que deben ser tomadas en consideración para la elección del microorganismo utilizado para la producción de alcohol.

Algunas de las ventajas de *Zymomonas mobilis* sobre la levadura son:

- Velocidades específicas de consumo de sustrato y de producción de etanol elevadas.
- Mayor productividad volumétrica de etanol.
- Rendimiento de etanol superior y rendimiento de biomasa inferior.
- No necesita aporte de oxígeno.
- Mayores posibilidades de manipulación genética.

Estas características condujeron a más estudios sobre los parámetros cinéticos sobre el crecimiento y de la producción de alcohol por la bacteria.

Tabla #2
Parámetros cinéticos de *Z. mobilis* y *S. carlsbergensis* a partir de 250 g/l de glucosa

<i>Glucosa (g/l)</i>	<i>Z. mobilis</i>	<i>S. carlsbergensis</i>
μ (1/h)	0.13	0.055
q_s (g/g h)	5.5	2.1
q_p (g/g h)	2.5	0.87
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.029	0.033
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.47	0.44
Etanol máx (g/l)	102	108

3.4.1. EFECTO DEL SUSTRATO

Algunas cepas de *Zymomonas mobilis* pueden crecer en medios con concentraciones muy elevadas de azúcares. De las cepas estudiadas por Swings y deLey 22 crecieron en medios con 400 g/l de glucosa. Todas las cepas crecieron en presencia de 200 g/l de glucosa.

Recientemente la producción de 85 g/l de etanol a partir de 460 g/l de sacarosa fue reportada. El aumento de la concentración inicial de azúcares (Tabla 3) tiene un efecto más importante sobre los parámetros relacionados con el crecimiento (μ y $Y_{x/s}$) que sobre aquellos relacionados con la producción de alcohol (q_p y $Y_{p/s}$). A partir de resultados obtenidos con diferentes cepas de *Zymomonas mobilis* se pudo estimar que el carbono incorporado a la biomasa varía entre 0,5 y 4,5% de la fuente inicial de carbono, el resto siendo utilizado para la formación de los productos de la fermentación.

Tabla #3
Efecto de la concentración de glucosa sobre los parámetros cinéticos de
Zymomonas mobilis en cultivo por lotes

<i>Glucosa (g/l)</i>	<i>100</i>	<i>150</i>	<i>200</i>	<i>250</i>
μ (1/h)	0.212	0.165	0.146	0.133
q_p (g/g h)	2.50	2.52	2.49	2.53
q_s (g/g h)	5.47	5.22	5.15	5.45
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.038	0.036	0.028	0.019
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.491	0.490	0.496	0.472

Aunque la mayor parte de la fuente carbonada es utilizada para la producción de etanol y de CO₂, cantidades no despreciables de subproductos son formadas en presencia de sacarosa o de mezcla de glucosa y fructosa. A partir de sacarosa la formación de levanas y de sorbitol, provoca una disminución de hasta el 20% en el rendimiento de producción de etanol en comparación con el obtenido con glucosa.

Cuando la glucosa es utilizada como fuente de carbono, los subproductos pueden representar hasta un 9% de la fuente de carbono inicial, mientras que a partir de glucosa estos representan un máximo del 4%. Por lo tanto, la glucosa podría ser el sustrato ideal para la producción de alcohol por *Zymomonas mobilis*, sin embargo, es necesario recordar que la formación de subproductos también dependen de factores tales como temperatura, pH, aireación, método de cultivo, etc.

3.4.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA

Aunque *Zymomonas mobilis* es capaz de crecer en una gama de temperaturas de 25 a 40°C su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 35°C. A temperaturas superiores a 30°C, son los rendimientos en etanol y en biomasa, más que los parámetros específicos quienes se ven más afectados. El mismo fenómeno es observado a temperaturas superiores a 37°C. La temperatura tiene un efecto muy importante sobre la composición y la fluidez de la membrana celular. A altas temperaturas la concentración de fosfolípidos disminuye. Al hacer crecer a *Zymomonas mobilis* a temperaturas superiores a 40°C, la pérdida de integridad de la membrana se debe a la baja concentración de fosfolípidos.

Contrariamente a *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* es incapaz de mantener constante la fluidez de la membrana al ser cultivada a diferentes temperaturas. A altas temperaturas la fluidez disminuye proporcionalmente a la concentración de ácidos grasos insaturados. El aumento de la temperatura induce la acumulación de etanol en el interior de las células, lo que amplifica su efecto inhibitorio. Durante el cultivo de *Zymomonas mobilis* a 40°C, la adición de Mg^{2+} al medio de cultivo mejora en un 100% el rendimiento de producción de etanol (76% de rendimiento en lugar de 38%).

3.4.3. EFECTO DEL ETANOL

El interés de producir el etanol a concentraciones elevadas ha provocado muchos estudios sobre el efecto inhibitorio de éste sobre los microorganismos que lo producen. De las cepas estudiadas por Swings y deLey, todas crecieron en presencia de 55 g/l de etanol adicionado al medio de cultivo, mientras que sólo 12 cepas pudieron desarrollarse en presencia de 100 g/l de alcohol adicionado. De igual manera que la temperatura, el etanol tiene un efecto muy importante sobre la composición de la membrana celular. Un aumento de la permeabilidad de la membrana en presencia de altas concentraciones de etanol provoca la fuga de

cofactores necesarios a ciertas actividades enzimáticas, los hopanoides tiene una gran influencia en las propiedades de las membranas. Durante el crecimiento de *Zymomonas mobilis* en presencia de concentraciones elevadas de etanol, el 1, 2, 3,4 tetrahidroxi-pentano-29-hopano (thbh) es el hopanoide mayoritario, éste representa una fracción elevada de los lípidos totales. Un aumento importante del ácido cisvaccénico fue observado en presencia de concentraciones elevadas de glucosa en el medio de cultivo. Por otro lado la adición de altas concentraciones de etanol a cultivos de *Zymomonas mobilis* provoca un aumento de fe y fg y una disminución de fosfatidilcolina (fc) y difosfatidilglicerol (dfg). Estudios realizados sobre el efecto del etanol adicionado al medio de cultivo y del producido por *Zymomonas mobilis* mostraron que en ambos casos, su efecto inhibitor es más importante sobre el crecimiento que sobre su producción. En general los resultados obtenidos sobre el efecto inhibitor del etanol adicionado al medio de cultivo no deben tomarse en cuenta de una manera cuantitativa, pues no se considera ni la adaptación progresiva de las células al etanol producido ni al choque al que son sometidas las células al adicionar el etanol.

3.4.4. EFECTO DEL PH

Dependiendo de las cepas, *Zymomonas mobilis* puede crecer en una amplia gama de valores de pH (de 3 a 7). De las cepas estudiadas por Swings y deLey alrededor de 20 pudieron crecer a valores de pH de 3.5. Tradicionalmente, valores de pH de 5.0 a 6.5 se han usado para estudiar metabolismos de *Zymomonas mobilis*.

3.5. APLICACIONES INDUSTRIALES

Zymomonas mobilis interviene en la fermentación del vino de palma, de la cerveza chica, así como en la fabricación del vino. Se asegura, además, que participaba en la fabricación de las cervezas auténticas de la antigüedad.

También se ha utilizado para la conservación de jugos extraídos de remolacha y en el tratamiento de desechos de la industria cervecera para uso como alimento en animales de granja (un uso parecido se ha producido con la papa).

Otro uso dado ha sido para la elaboración de cervezas con bajo contenido de alcohol (0,7%), a esta se la llama “cerveza dietética”. También ha sido empleada para desarrollar una nueva tecnología en la producción del “pulque”.

Otra posibilidad de utilización de *Zymomonas mobilis* es la producción a gran escala de etanol. Esto debido a que su rendimiento de conversión es mayor que el de la levadura y a que puede producirlo a una velocidad significativamente más elevada, además, esta bacteria no necesita oxígeno y presenta en general una mejor tolerancia al etanol que la levadura.

CAPÍTULO 4

PRUEBAS EXPERIMENTALES

4.1. CULTIVO DE LA BACTERIA ZYMOMONA MOBILIS

4.1.1. MEDIO DE CULTIVO # 1

1. Se pesa en una balanza analítica todos los reactivos:
 - Glucosa (6 gramos)
 - Agar (7,5 gramos)
 - Peptona (3 gramos)
 - Extracto de levadura (3 gramos)
 - Agua destilada (300 ml)
2. Se pone la glucosa, la peptona, el extracto de levadura y el agar en un vaso de precipitación con 300 ml de agua destilada, se mide el pH que de este medio es 6,5.
3. Se lleva el vaso de precipitación con los reactivos a una hornilla y se los calienta a fuego lento agitando hasta que disuelvan.
4. Se pone esta disolución en una fiola y se la tapa con papel aluminio.
5. Se lleva la fiola al autoclave y se esteriliza a 121°C y 1 atmosfera de presión por 20 minutos.
6. Se coloca este medio en las cajas petri que deben estar en un flujo de aire y se deja enfriar unos minutos antes de cerrar las cajas para que el vapor de la disolución no se condense en la tapa y no se contamine el medio.
7. Se cierra las cajas petri hasta colocar la muestra.

4.1.2. MEDIO DE CULTIVO # 2

1. Se pesa en una balanza analítica todos los reactivos:
 - Glucosa (6 gramos)
 - Agar (7,5 gramos)
 - Extracto de levadura (3 gramos)
 - Agua destilada (300 ml)
2. Se pone la glucosa, el extracto de levadura y el agar en vaso de precipitación con 300 ml de agua destilada, se mide el pH que de este medio es 6,5.
3. Se lleva el vaso de precipitación con los reactivos a una hornilla y se los calienta a fuego lento agitando hasta que disuelvan.
4. Se pone esta disolución en una fiola y se la tapa con papel aluminio.
5. Se lleva la fiola al autoclave y se esteriliza a 121°C y 1 atmosfera de presión por 20 minutos.
6. Se coloca este medio en las cajas petri que se encuentran en un flujo de aire y se deja enfriar unos minutos antes de cerrar las cajas para que el vapor de la disolución no se condense en la tapa y no se contamine el medio.
7. Se cierra las cajas petri hasta colocar la muestra.

4.1.3. SIEMBRA A DEL EXTRACTO N°1 EN EL MEDIO DE CULTIVO # 1

1. Se coloca 10 tubos de ensayo etiquetados en un portatubos.
2. Con una pipeta se coloca 4,5 ml de agua destilada esterilizada en cada tubo.
3. Con la micropipeta en el primer tubo se pone 0,5 ml del extracto N°1.
4. En los siguientes tubos se hacen diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} .
5. En un flujo de aire se coloca 10 cajas petri con el medio #1 y con el asa de inoculación se pone cada dilución en cada caja petri (FIG 1), se las sella con papel parafilm y se las etiqueta.
6. Se las lleva a la incubadora a 35°C por 48 horas.

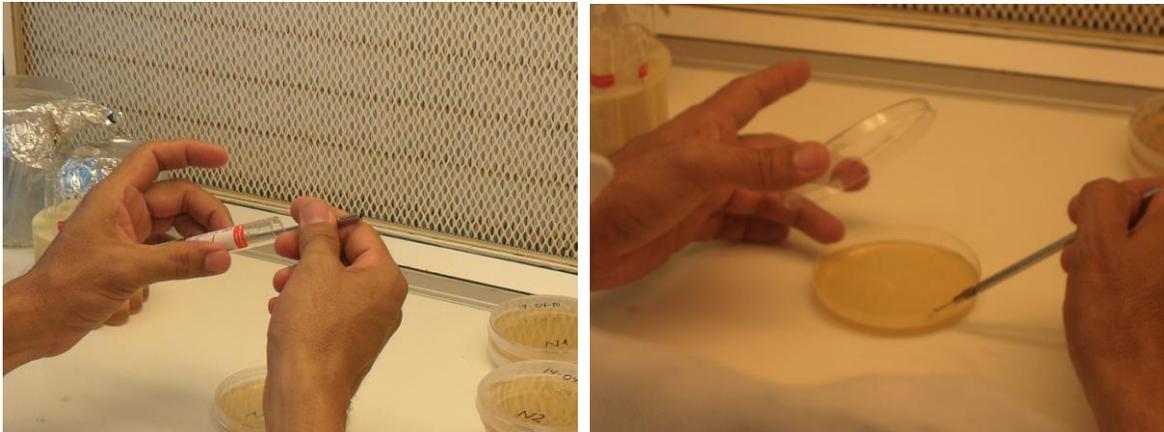


FIG 1. INOCULACIÓN DEL MEDIO

4.1.4. SIEMBRA B DEL EXTRACTO N°2 EN LOS MEDIOS DE CULTIVO 1 Y 2

1. Se coloca 5 tubos de ensayo etiquetados en un portatubos.
2. Con una pipeta se coloca 4,5 ml de agua destilada esterilizada en cada tubo.
3. Con la micropipeta en el primer tubo se pone 0,5 ml del extracto N°2.
4. En los siguientes tubos se hacen disoluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .
5. En un flujo de aire se coloca 5 cajas petri intercalando con el medio 1 y 2 y con el asa de inoculación se pone cada disolución en cada caja petri (FIG 2), se las sella con papel parafilm y se las etiqueta.
6. Se las lleva a la incubadora a 35°C por 48 horas.

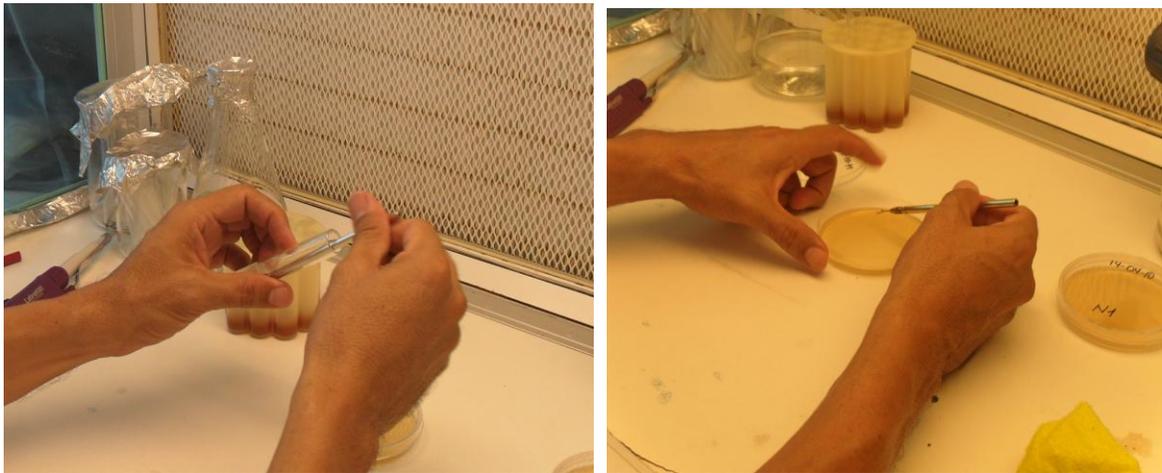


FIG 2. INOCULACIÓN DEL MEDIO

4.1.5. SIEMBRA C DEL EXTRACTO N°1 EN LOS MEDIOS DE CULTIVO 1 Y 2

1. Se coloca 1 tubo de ensayo etiquetados en un portatubos.
2. Con una pipeta se coloca 4,5 ml de agua destilada esterilizada en el tubo.
3. Con la micropipeta en el primer tubo se pone 0,5 ml del extracto N°1.
4. Se coloca dos cajas petri con los diferentes medios en el flujo de aire y con el asa de inoculación se pone la disolución en cada caja petri (FIG 3), se las sella con papel parafilm y se las etiqueta.
5. Se las lleva a la incubadora a 35°C por 48 horas.

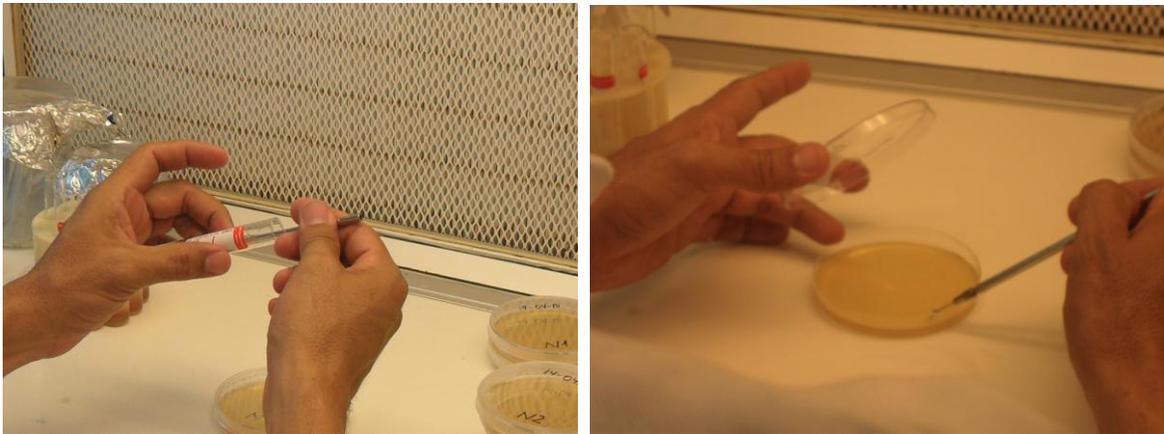


FIG 3. INOCULACIÓN DEL MEDIO

4.1.6 SIEMBRA D DEL EXTRACTO N°3 EN LOS MEDIOS DE CULTIVO 1 Y 2

1. Se coloca 4 tubos de ensayo etiquetados en un portatubos.
2. Con una pipeta se coloca 4,5 ml de agua destilada esterilizada en cada tubo.
3. Con una micropipeta en el primer tubo se pone 0,5 ml del extracto N°3.
4. En los siguientes tubos se hacen disoluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .
5. En un flujo de aire se coloca 4 cajas petri intercalando con el medio 1 y 2 y con el asa de inoculación se pone cada disolución en cada caja petri (FIG A-4), se las sella con papel parafilm y se las etiqueta.
6. Se las lleva a la incubadora a 35°C por 48 horas.

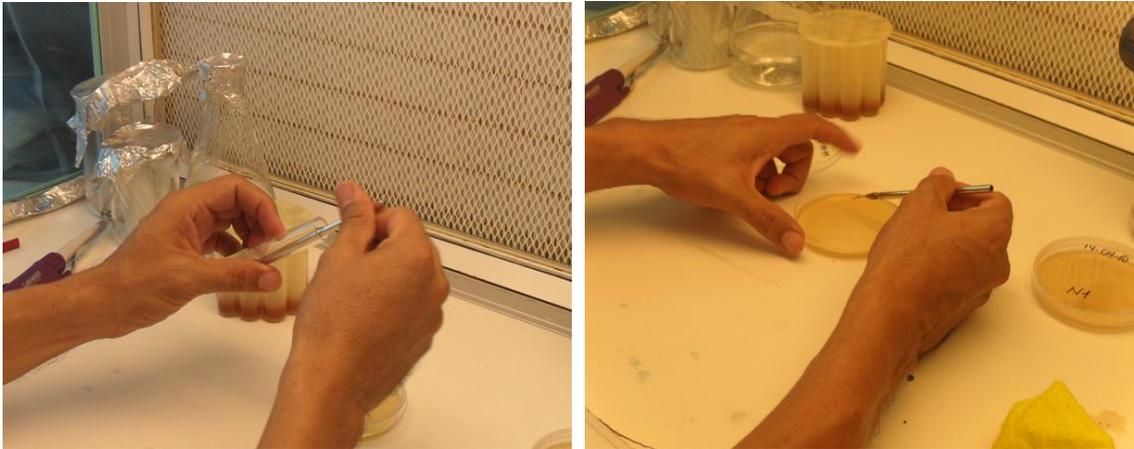


FIG 4. INOCULACIÓN DEL MEDIO

4.1.7. MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS

MORFOLOGÍA	COLONIA A	COLONIA B
Forma	Circular	Irregular
Elevación	Elevada	Elevada
Superficie	Liza	Rugosa
Bordes	Rectos	Irregular
Color	Crema	Amarillo pálido

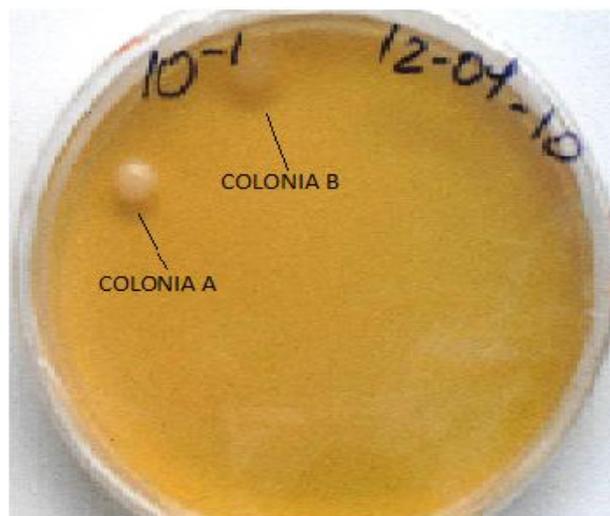


FIG 5. COLONIAS QUE CRECIERON EN LA SIEMBRA A

4.1.8. RESIEMBRA # 1 DEL EXTRACTO N°1 EN EL MEDIO DE CULTIVO 1 Y 2 DISOLUCIÓN 10^{-1}

1. Se coloca dos cajas petri con los diferentes medios en el flujo de aire y con el asa se va inoculando una pequeña cantidad de muestra de las colonia A que han crecido en el medio de cultivo # 1 de la siembra A en cada caja petri, se las sella con papel parafilm y se las rotula.
2. Se las lleva a la incubadora a 35°C de 24 horas.



FIG 6. COLONIAS PURAS DE ZYMOMONAS MOBILIS EN LA RESIEMBRA #1

**4.1.9. RESIEMBRA # 2 DEL EXTRACTO N°1 EN EL MEDIO DE CULTIVO # 1
DISOLUCIÓN 10^{-1}**

1. Se coloca tres cajas petri con el medio # 1 en el flujo de aire y con el asa se va inoculando con muestra de colonia de la resiembra #1 en cada caja petri, se las sella con papel parafilm y se las rotula.
2. Se las lleva a la incubadora a 35°C por 24 horas.

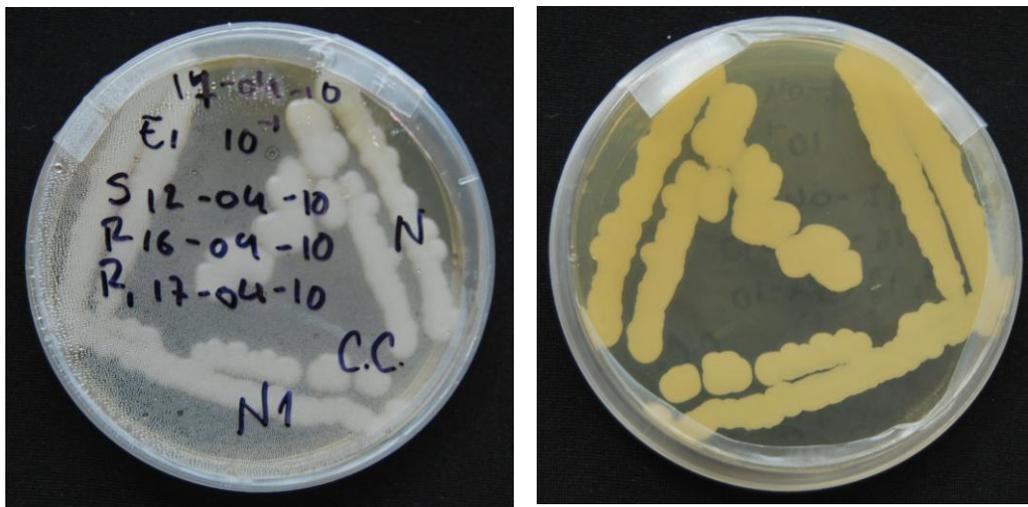


FIG 7. COLONIAS DE ZYMOMONAS MOBILIS EN LA RESIEMBRA #2

4.1.10. RESIEMBRA # 3 DEL EXTRACTO N°1 EN EL MEDIO DE CULTIVO # 1 DISOLUCIÓN 10^{-1}

1. Se coloca tres cajas petri con el medio # 1 en el flujo de aire y con el asa se va inoculando con muestra de colonia de la resiembra #2 en cada caja petri, se las sella con papel parafilm y se las rotula.
2. Se las lleva a la incubadora a 35°C por 24 horas.



FIG 8. COLONIAS PURAS DE ZYMOMONAS MOBILIS EN LA RESIEMBRA #3

Para confirmar la presencia de *Zymomonas mobilis* en los medios de cultivo se realizo la técnica de la Tinción de Gram a muestras de colonias, la cual al llevar al microscopio se pudo observar la presencia de bacilos Gramnegativos característico de la bacteria *Zymomona mobilis*.

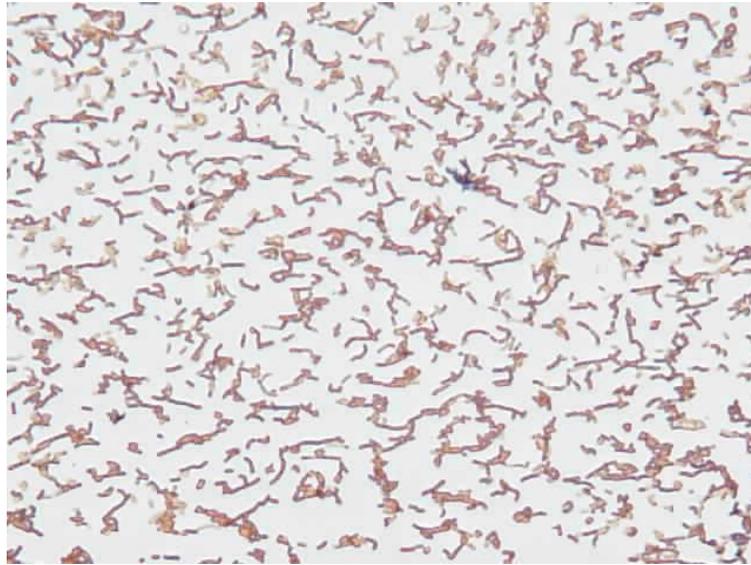


FIG 9. ZYMOMONAS MOBILIS (40X)

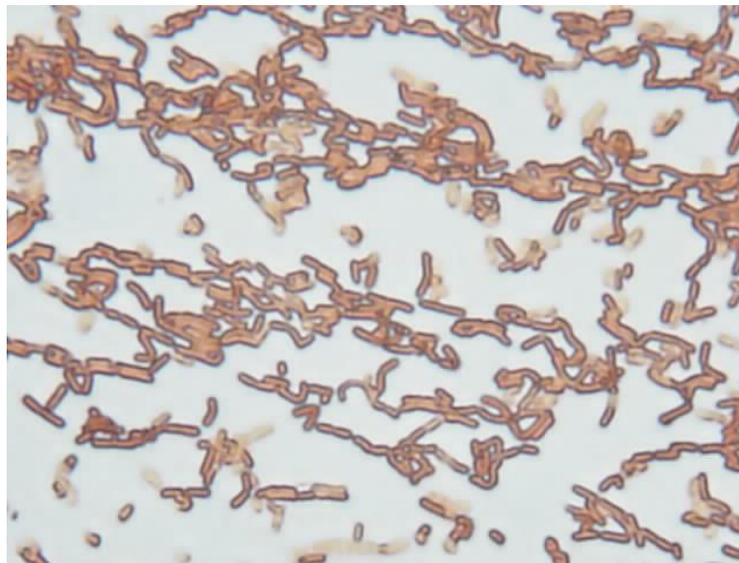


FIG 10. ZYMOMONAS MOBILIS (100X)

4.1.11. DISCUSIÓN

Mediante la siembra de los extractos 1, 2, 3 en los medio 1 y 2 se pudo observar el crecimiento de dos tipos de colonias A y B como es en el caso de la siembra A del extracto N°1 y la disolución 10^{-1} . De los dos medios de cultivo que utilizamos la diferencia es el reactivo peptona; el medio de cultivo # 1 fue donde mejor crecieron las *Zymomonas mobilis* por tanto en las resiembras trabajamos solo con el medio # 1.

Para su confirmación se realizó la técnica de la Tinción de Gram a los dos tipos de colonias donde se pudo observar por medio del microscopio que en la colonia A hay presencia de bacilos y diplobacilos Gram negativos que por sus características dan a conocer la presencia de colonias de *Zymomonas mobilis*.

Pero además al analizar con el microscopio la colonia B se observó bacilos Gram positivos por lo que la descartamos ya que no cumplen con las características de *Zymomonas mobilis*.

Con la colonia A ya analizada se realizaron las resiembras 1 y 2 con la finalidad de multiplicar las colonias y tener colonias puras. A estas también se les realizó la técnica de la Tinción de Gram dando bacilos Gramnegativos y confirmando la presencia de *Zymomonas mobilis*.

Se realizó una tercera resiembra con la finalidad de tener colonias frescas para las pruebas bioquímicas.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA ZYMOMONA MOBILIS

4.2.1. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes.

Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no.

Para realizar las pruebas bioquímicas se dispone de múltiples medios, los cuales se deben aplicar de acuerdo a las exigencias del microorganismo en estudio.

4.2.1.1. PRUEBA DE INDOL

REACTIVOS

- *Caldo de Triptófano* medio: 30 ml pH: 7,0
 - Peptona: 0,3 g
 - NaCl: 7,5 ml
 - H₂O destilada: 22,5 ml
- *Reactivo de Kovacs*

MEDIO

Para la preparación del caldo se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una vaso de precipitación se agita bien y se mide el

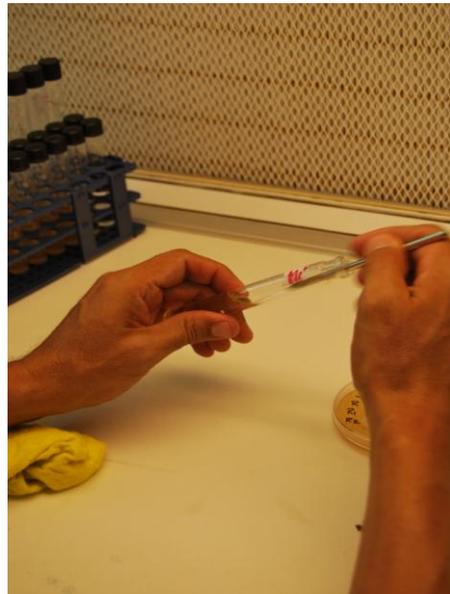
pH. Luego se pone la disolución en cantidades iguales en tres tubos de ensayo rotulados y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

PROCEDIMIENTO

Inocular el caldo triptófano con el microorganismo en estudio (FIG 13) e incubar a 35°C durante 18 a 24 horas. Al finalizar este período, añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs por la pared interior del tubo.



(a)



(b)

FIG 11 (a,b). INOCULACIÓN DEL CALDO TRIPTÓFANO

INTERPRETACIÓN

El desarrollo de un color rojo intenso en la interfase del reactivo y el caldo, segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de indol y un resultado de la prueba positiva.

RESULTADO

No se observó el desarrollo del color rojo en la interfase del reactivo por lo tanto la prueba fue negativa.



FIG 11-c. RESULTADO DE LA PRUEBA DE INDOL

4.2.1.2. PRUEBA DE CITRATO

REACTIVOS

- *Medio de Simmons* medio: 30 ml pH: 7,0
 - Fosfato diácido de amonio: 3 ml
 - Fosfato dipotásico: 3 ml
 - NaCl: 15 ml
 - Citrato de sodio: 6 ml
 - Sulfato de magnesio: 0,6 ml
 - Agar: 0,45 g
 - Azul de bromotimol: 2,4 ml

MEDIO

Para la preparación del medio se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una vaso de precipitación se agita y se mide el pH, se lleva a calentamiento a fuego lento y con agitación constante hasta disolver el agar. Luego se pone la disolución en cantidades iguales en tres tubos de ensayo rotulados y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

PROCEDIMIENTO

Se inocula la superficie del agar inclinado con una sola estría en el pico (FIG 14). Utilizar un cultivo de 24 horas en un medio sólido y cuidando no arrastrar medio de cultivo, ya que se pueden producir falsos positivos por crecimiento a partir del medio de cultivo del inóculo. Incubar a 35°C durante 4 días.



(a)

(b)

FIG 12 (a,b). INOCULACIÓN DEL MEDIO

INTERPRETACIÓN

El ensayo es positivo cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador al azul. Y cuando el ensayo es negativo hay un viraje a verde.

RESULTADO

Se pudo observar el viraje a verde, lo cual nos dice que el ensayo es negativo.



(c)



(d)

FIG 12 (c,d). RESULTADO DE LA PRUEBA DE CITRATO

4.2.1.3. PRUEBA DE TSI (TRIPLE SUGAR IRON)

REACTIVOS medio: 30 ml pH: 7,4

- Agar TSI: 1,95 g
- H₂O destilada: 30 ml

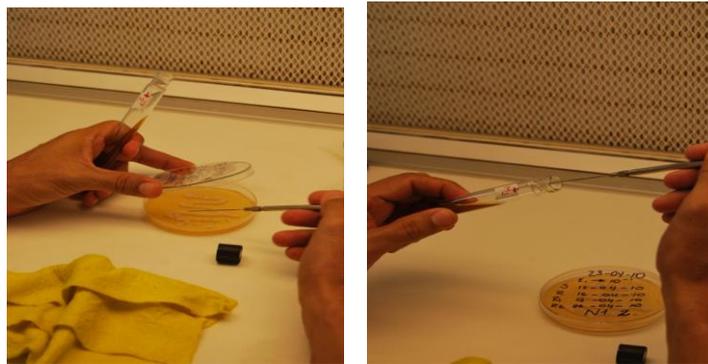
MEDIO

Para la preparación del medio se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una vaso de precipitación se agita y se mide el pH, se lleva a calentamiento a fuego lento y con agitación constante hasta disolver el agar.

Luego se coloca la disolución en cantidades iguales en tres tubos de ensayo rotulados y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

PROCEDIMIENTO

Inocular los tubos de TSI con una punta (alambre recto) (FIG 15). Para eso introducir la punta hasta 3 a 5 mm del fondo del tubo. Tras retirar la punta del fondo, estriar el pico con un movimiento en zig zag. Incubar a 35 °C durante 18-24 hs, pero no más de 24 horas.



(a)

(b)

FIG 13 (a,b). INOCULACIÓN DEL MEDIO

INTERPRETACIÓN

Pico ácido/fondo ácido (A/A)

Glucosa y lactosa y/o sacarosa fermentadas. Puede producirse H₂S o no.

RESULTADO

Al medir el pH en el pico y el fondo del tubo nos dio un pH ácido (A/A).

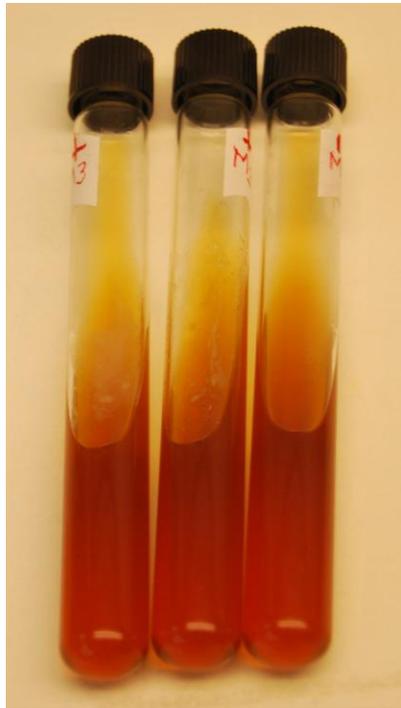


FIG 13-c. RESULTADO DE LA PRUEBA DE TSI

4.2.1.4. PRUEBA DE UREASA

REACTIVOS

- *Caldo de Stuart* medio: 30 ml pH: 7,0
 - Extracto de levadura: 0,30 ml
 - Fosfato disódico: 0,285 g
 - Fosfato monopotásico: 0,273 g
 - Urea: 0,6 g
 - Rojo fenol: 0,10 ml
 - H₂O destilada: 29,6 ml

- *Agar Urea de Christensen* medio: 30 ml pH: 7,0
 - Peptona: 3 ml
 - Glucosa: 3 ml
 - NaCl: 15 ml
 - Fosfato monopotásico: 6 ml
 - Urea: 0,6 g
 - Rojo fenol: 0,10 ml
 - Agar: 0,45 g
 - H₂O destilada: 2,9 ml

MEDIO

Para la preparación del caldo se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una vaso de precipitación se agita bien y se mide el pH. Luego se pone la disolución en cantidades iguales en tres tubos de ensayo rotulados y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

Para la preparación del medio se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una vaso de precipitación se agita y se mide el pH, se lleva a calentamiento a fuego lento y con agitación constante hasta disolver el agar.

Luego se coloca la disolución en cantidades iguales en tres tubos de ensayo rotulados y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

PROCEDIMIENTO

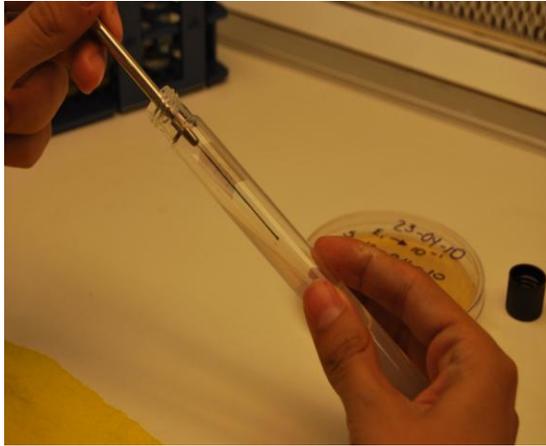
Inocular el caldo con una ansada cargada con el cultivo puro del microorganismo y estriar la superficie del agar (FIG 16). Incubar a 35°C de 24 a 72 horas.



(a)



(b)



(c)

FIG 14 (a,b,c). INOCULACIÓN DEL CALDO Y EL AGAR

INTERPRETACIÓN

Caldo: una coloración rojiza indica alcalinización e hidrólisis de urea

Agar: una coloración rojiza en el medio indica hidrólisis de urea positiva. Los degradadores lentos producen coloración parcial (generalmente el pico), los rápidos producen coloración en todo el tubo. Si no hay hidrólisis el medio permanece con el color original (amarillo) y se observa crecimiento.

RESULTADO

A pesar de que no hubo cambio de coloración ni en caldo ni en el agar luego de la incubación se midió el pH al caldo y al agar los cuales se habían alcalinizado ya que el pH de 7,0 aumento a 8,5 lo cual nos da a conocer que la prueba es positiva.

4.2.1.5. PRUEBA DE LA GELATINAZA

REACTIVOS medio: 30 ml pH: 7,2

- Gelatina: 0,9 g
- Agar: 0,45 g
- NaCl: 0,3 g
- H₂O destilada: 30 ml

MEDIO

Para la preparación del medio se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una vaso de precipitación se agita y se mide el pH, se lleva a calentamiento a fuego lento y con agitación constante hasta disolver el agar.

Luego se coloca la disolución en cantidades iguales en tres tubos de ensayo rotulados y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

PROCEDIMIENTO

Tomar con el asa en punta una muestra del microorganismo en estudio y realizar una punción hasta el fondo del tuco con medio (FIG 17), llevar a incubar a 37°C durante 24-48 horas. Colocar en la nevera por 30 minutos.



(a)



(b)

FIG 15 (a,b). INOCULACIÓN DEL MEDIO

INTERPRETACIÓN

El ensayo es positivo si hay licuefacción de la gelatina y negativo si hay solidificación.

RESULTADO

Luego de incubar y permanecer durante media hora en la nevera el medio con muestra, se pudo observar que este seguía solido lo cual da a con conocer que la prueba es negativa.



(c)

FIG 15-c. RESULTADO DE LA PRUEBA DE GELATINAZA

4.2.1.6. PRUEBA D-GLUCOSA

REACTIVOS medio: 20 ml pH: 6,0

- Glucosa: 1 g
- Nitrato de potasio: 4 ml
- Fosfato monopotásico: 2 ml
- Sulfato de magnesio: 1 ml
- H₂O destilada: 13 ml

MEDIO

Para la preparación del caldo se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una vaso de precipitación se agita bien y se mide el pH.

Se coloca la disolución en cantidades iguales en dos tubos de ensayo rotulados, se introduce el tubo de Durham invertido en cada tubo y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

PROCEDIMIENTO

Inocular el caldo con el microorganismo en estudio (FIG 18) e incubar a 35°C durante 24 horas.



(a)

(b)

FIG 16 (a,b). INOCULACIÓN DEL MEDIO

RESULTADO

Luego de la incubación por 24 horas se observó la presencia de burbujas en el tubo de Durham además al destapar el tubo se pudo percibir un olor dulce intenso característico de la fermentación.



(c)

FIG 16-c. RESULTADO DE LA PRUEBA D-GLUCOSA

4.2.1.7. PRUEBA DE SACAROSA

REACTIVOS medio: 20 ml pH: 7,2

- Sacarosa: 0,4 g
- Peptona: 10 ml
- Fosfato dipotásico: 1 ml
- Sulfato de magnesio: 0,5 ml
- H₂O destilada: 8,5 ml

MEDIO

Para la preparación del caldo se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una vaso de precipitación se agita bien y se mide el pH.

Se coloca la disolución en cantidades iguales en dos tubos de ensayo rotulados, se introduce el tubo de Durham invertido en cada tubo y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

PROCEDIMIENTO

Inocular el caldo con el microorganismo en estudio (FIG 19) e incubar a 35°C durante 24 horas.



(a)

(b)

FIG 17 (a,b). INOCULACIÓN DEL MEDIO

RESULTADO

Luego de incubar por 24 horas se observó la presencia de burbujas en el tubo de Durham además al destapar el tubo se pudo percibir un olor dulce intenso característico de la fermentación.



(c)

FIG 17-c. RESULTADO DE LA PRUEBA DE SACAROSA

4.2.1.8. PRUEBA DE LACTOSA

REACTIVOS medio: 100 ml pH: 6,9

- Lactosa: 0,5 g
- Gelatina: 0,5 g
- Extracto de carne: 0,5 ml
- H₂O destilada: 99,5 ml

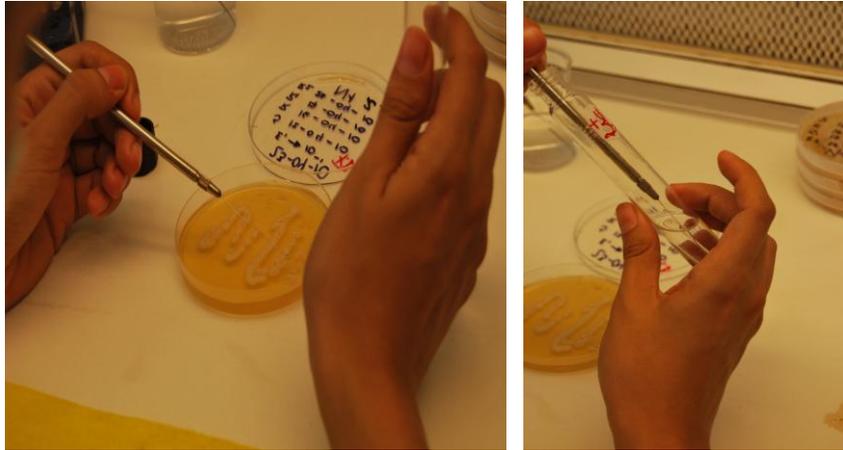
MEDIO

Para la preparación del caldo se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una vaso de precipitación se agita bien y se mide el pH.

Luego se coloca la disolución en cantidades iguales en tubos de ensayo y se introduce el tubo Durham invertido, se los rotula y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

PROCEDIMIENTO

Inocular el caldo con el microorganismo en estudio (FIG 20) e incubar a 35°C durante 24 horas.



(a)

(b)

FIG 18 (a,b). INOCULACIÓN DEL MEDIO

RESULTADO

Luego de la incubación por 24 horas se pudo observar la presencia de burbujas en el tubo de Durham acompañado de un olor dulce intenso característico de la fermentación.

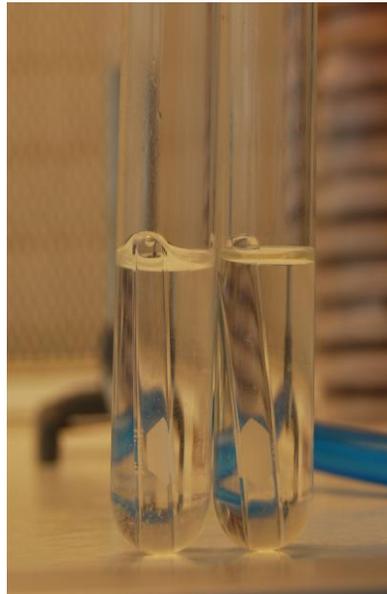


FIG 18-c. RESULTADO DE LA PRUEBA DE LACTOSA

4.2.1.9. PRUEBA STANDARD MEDIA + 0.5% NaCl

REACTIVOS medio: 30 ml pH: 7,0

- Agar Standard media: 0,66 g
- NaCl 0,5%: 15 ml
- H₂O destilada: 15 ml

MEDIO

Para la preparación del medio se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una vaso de precipitación se agita y se mide el pH, se lleva a calentamiento a fuego lento y con agitación constante hasta disolver el agar.

Luego se coloca la disolución en cantidades iguales en tres tubos de ensayo rotulados y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión.

PROCEDIMIENTO

Inocular los tubos haciendo estriar el pico con un movimiento en zigzag (FIG 21). Incubar a 35 °C durante 24 horas.



(a)

(b)

FIG 19 (a,b). INOCULACIÓN DEL MEDIO

INTERPRETACIÓN

El ensayo es positivo si hay crecimiento de colonias. Por lo contrario es negativo.

RESULTADO

La prueba dio positiva ya que se pudo observar luego de incubar por 24 horas el crecimiento de colonias en el medio.



(C)

FIG 19-c. RESULTADO DE LA PRUEBA STANDARD MEDIA

4.2.1.10. PRUEBA DE CATALASA

REACTIVOS

- Peróxido de hidrogeno al 30%

PROCEDIMIENTO

Con el asa de inoculación recoger del centro de una colonia de 18 – 24 horas y colocar sobre un portaobjetos. Agregar una gota de peróxido de hidrogeno al 30% sobre el microorganismo (FIG 22).



(a)



(b)



(c)



(d)

FIG 20 (a,b,c,d). PASOS PARA PRUEBA DE CATALASA

INTERPRETACIÓN

El ensayo es positivo si se observa formación de burbujas. Por lo contrario es negativa.

RESULTADO

Inmediatamente al poner las gotas de peróxido de hidrogeno en la muestra de colonias se pudo observar la formación de burbujas por lo tanto la prueba es positiva.



(e)

FIG 20-e. RESULTADO DE LA PRUEBA DE CATALASA

4.2.1.11. PRUEBA DE OXIDASA

REACTIVOS

- Reactivo de Kovacs

PROCEDIMIENTO

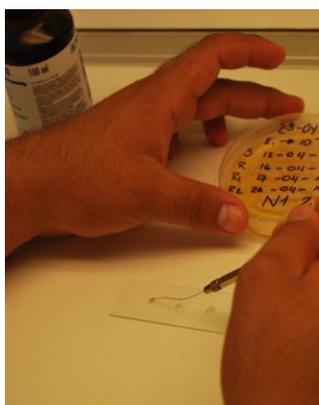
Con el asa se recoge algunas colonias y colocarlas en un portaobjetos separado una de otra. Agregar 1-2 gotas del reactivo de Kovacs (FIG 23), la reacción se produce en unos 10-15 segundos.



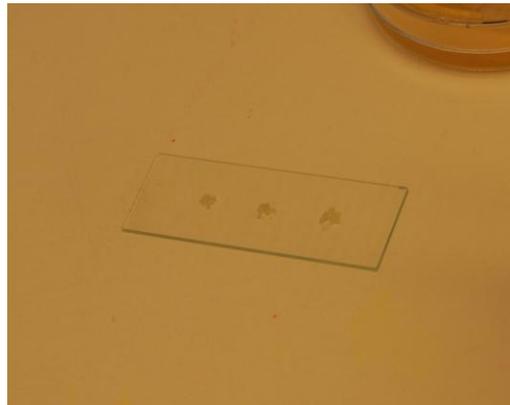
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

FIG 21 (a,b,c,d,e). PASOS PARA PRUEBA DE OXIDASA

INTERPRETACIÓN

Este reactivo tiñe las colonias oxidasas positivas de color lavanda que vira gradualmente a purpura negrozco intenso.

RESULTADO

La prueba dio negativa ya que no hubo ningún cambio de coloración en la muestras de las colonias.



FIG 21-f. RESULTADO DE LA PRUEBA DE OXIDASA

4.2.1.12. PRUEBA DE MOVILIDAD

REACTIVOS medio: 100 ml pH: 5,0

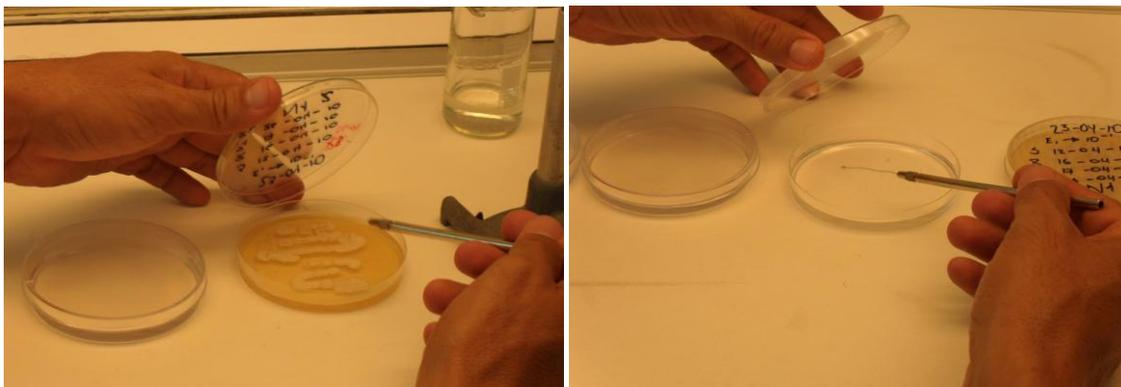
- Agar: 0,35 g
- Glucosa: 5 g
- H₂O destilada: 100 ml

MEDIO

Para la preparación del medio se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en una fiola se agita y se mide el pH, se lleva a calentamiento a fuego lento y con agitación constante hasta disolver el agar. Se lo autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión. Luego se pone la disolución en cajas petri rotuladas.

PROCEDIMIENTO

Con el asa se recoge muestra colonias y se colocarla en la caja petri (FIG 24). Se la sella con papel parafilm y se lleva a incubar por 24 horas a 35°C.



(a)

(b)

FIG 22 (a,b). INOCULACIÓN DEL MEDIO

INTERPRETACIÓN

El ensayo es positivo si se hace turbio el medio y hay crecimiento alargado de la colonia. Por lo contrario si es negativo yo hay ningún cambio.

RESULTADO

La prueba dio negativa ya no se observo ningún cambio en la muestra.



(C)

FIG 22-c. RESULTADO DE LA PRUEBA DE MOVILIDAD

4.2.1.13. PRUEBA DE DETECCIÓN DE ZYMOMONAS MOBILIS

La presencia de *Zymomonas* se detecta por producción de gas.

REACTIVOS medio: 200 ml pH: 4,0

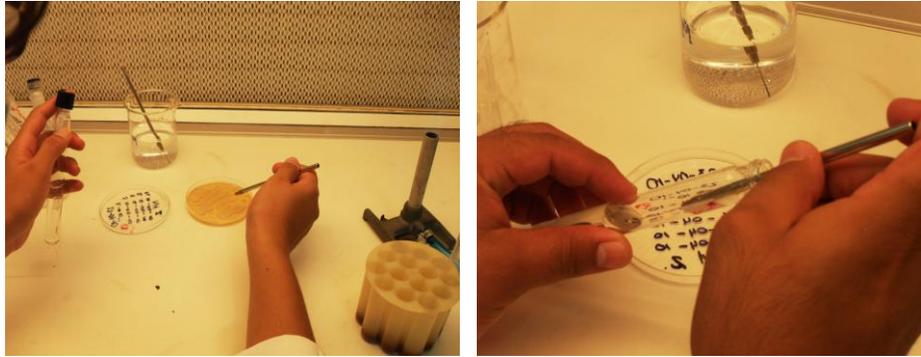
- Extracto de malta: 0,6 g
- Extracto de levadura: 0,6 g
- Glucosa: 4 g
- Peptona: 1 g
- Etanol: 6 ml
- H₂O destilada: 94 ml

MEDIO

Para la preparación del caldo se pesa las cantidades de los reactivos antes descritos y se los coloca en un vaso de precipitación se agita bien y se mide el pH. Se coloca la disolución en cantidades iguales en dos tubos de ensayo rotulados, se introduce el tubo de Durham invertido en cada tubo y se los autoclava por 20 minutos a 121°C y 1 atm de presión. Finalmente se coloca el etanol en cantidades iguales en los tubos.

PROCEDIMIENTO

Inocular el caldo con el microorganismo en estudio (FIG 25) e incubar a 30°C durante 6 días.



(a)

(b)

FIG 23 (a,b). INOCULACIÓN DEL MEDIO

RESULTADO

Se pudo observar la aparición de burbujas en el interior del tubo de Durham lo cual nos dice que hay producción de gas además al destapar los tubos se percibió un fuerte olor a etanol acompañado de gas que se había producido también en el tubo de ensayo.

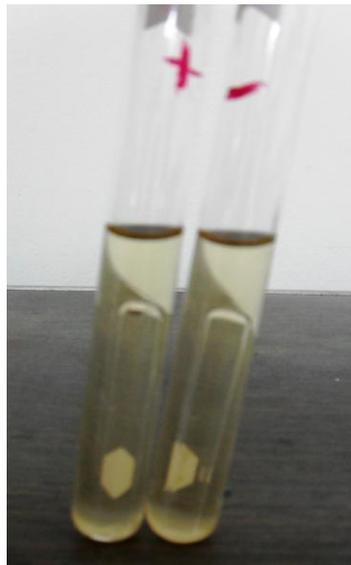


FIG 23-c. RESULTADO DE LA PRUEBA DE DETECCIÓN

4.2.3. ANALISIS DE RESULTADOS

La identificación bioquímica de cocobacilos Gramnegativos aislados se realizaron siguiendo pruebas tradicionales según lo reportado por el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey 1984, Tabla 1. De la amplia variedad de pruebas bioquímicas, se utilizó en el laboratorio las 11 más importantes, aplicados a la especie del microorganismo en estudio. Con los resultados obtenidos mediante los ensayos realizados se ha podido confirmar mediante la identificación bioquímica que la bacteria que se extrajo del jugo de la Cabuya ecuatoriana (Agave) es la *Zymomona mobilis* a continuación se detalla los resultados obtenidos (Tabla 4).

TABLA # 4 IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA	
Prueba Bioquímica	Resultado
Indol	-
Citrato	-
TSI	A/A
Ureasa	+
Gelatinaza	-
D-glucosa	+
Sacarosa	-
Lactosa	+
Catalasa	+
Oxidasa	-
Standard media + 0,5% NaCl	+
Movilidad	-

También se realizó una prueba de detección para *Zymomonas* sp la cual fue positiva porque se obtuvo una excesiva producción de CO₂ y un olor a etanol garantizándonos que la bacteria en estudio es la *Zymomona mobilis*.

4.3. AISLAMIENTO DE LA BACTERIA ZYMOMONA MOBILIS

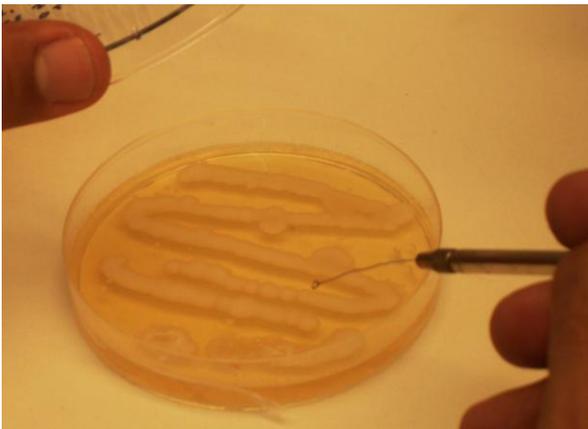
1. Para el aislamiento de la bacteria se toma con una micropipeta 750 μL de una solución al 20% de glicerol previamente esterilizada (121°C - 1 atm - 20 min), y se coloca en tubos Eppendorf (FIG 26 (a,b)).
2. Se toma con un asa muestra de colonia fresca y se inocula en el tubo. Se sella y se rotula los tubos (FIG 26 (c,d,e,f)).
3. Se coloca los tubos Eppendorf en un portatubos de espumafon y se los lleva a un Freezer a -80°C (FIG 26 (g)).



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)



(g)

FIG 24 (a,b,c,d,e,f,g). PASOS PARA AISLAR ZYMOMONAS MOBILIS

4.4. CRECIMIENTO CINÉTICO DE LA BACTERIA ZYMOMONA MOBILIS

MEDIO

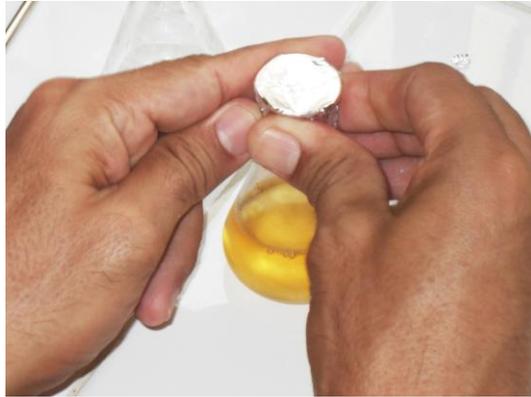
1. Se pesa en una balanza analítica todos los reactivos:
 - Glucosa (6 gramos)
 - Peptona (3 gramos)
 - Extracto de levadura (3 gramos)
 - Agua destilada (300 ml)
2. Se coloca glucosa, peptona y extracto de levadura en un vaso de precipitación con 300 ml de agua destilada, se agita bien. Se mide el pH del medio que es 6,5.
3. Se coloca 30 ml esta disolución en fiolas de 50 ml y se las tapa con papel aluminio (FIG 27 (a,b)).
4. Se lleva las fiolas al autoclave y se esteriliza a 121°C y 1 atmosfera de presión por 20 minutos (FIG 27 (c,d)).



(a)



(b)



(c)



(d)

FIG 25 (a,b,c,d). PREPARACIÓN DEL MEDIO

PROCEDIMIENTO

1. Se coloca 30 ml de agua destilada en una fiola de 50 ml, se sella con papel aluminio y se autoclava a 121°C por 20 minutos y 1 atm de presión.
2. Con el asa se toma muestra de colonias frescas y se coloca en la fiola. Se agita bien como diluyendo la muestra en el agua destilada (FIG 28 (a,b)).
3. Se toma con una micropipeta 1 ml de disolución y coloca en una Cámara de Neubauer de contado de células y se lleva a observar al microscopio realizando el conteo de las bacterias (FIG 28 (c,d,e,f)).



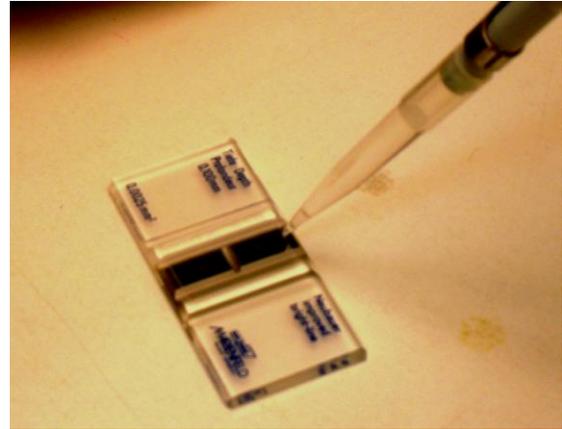
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

FIG 26 (a,b,c,d,e). DISOLUCIÓN DE MUESTRA DE ZYMOMONA MOBILIS Y CONTAJE DE CÉLULAS POR EL MÉTODO DE NEUBAUER

4. Luego se inoculan los medios líquidos colocando 1 ml de la disolución anterior, se sellan las fiolas con papel aluminio y papel parafilm (FIG 29 (a,b)).
5. Se llevan las fiolas a la zaranda rotativa a 120 RPM (FIG 29 (c)).



(a)



(b)



(c)

FIG 27 (a,b,c). INOCULACIÓN EN EL MEDIO LÍQUIDO Y COLOCACIÓN DE LOS MEDIOS EN LA ZARANDA ROTATORIA



(a)

(b)



(c)

FIG 28 (a,b,c). RESULTADO DE CRECIMIENTO CINÉTICO DE ZYMOMONAS MOBILIS

CONTAJE DE CÉLULAS

Aplicando la siguiente fórmula se pudo determinar cuántas bacterias hay en un mililitro de disolución

$$\rho \left(\frac{\text{celulas}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Contaje Total}}{\text{Numero de bloques externos}} * 10000$$

Se realizó un primer conteo de la disolución de la muestra en agua destilada para conocer la densidad de células que teníamos dándonos el siguiente resultado:

$$\rho = \frac{103}{16} * 10000$$

$$\rho = 64375 \frac{\text{Células}}{\text{ml}}$$

Antes de colocar en la zaranda los medios inoculados se realizó un primer conteo:

$$\rho = 2076 \frac{\text{Células}}{\text{ml}}$$

A las 12 horas:

$$\rho = 1825000 \frac{\text{Células}}{\text{ml}}$$

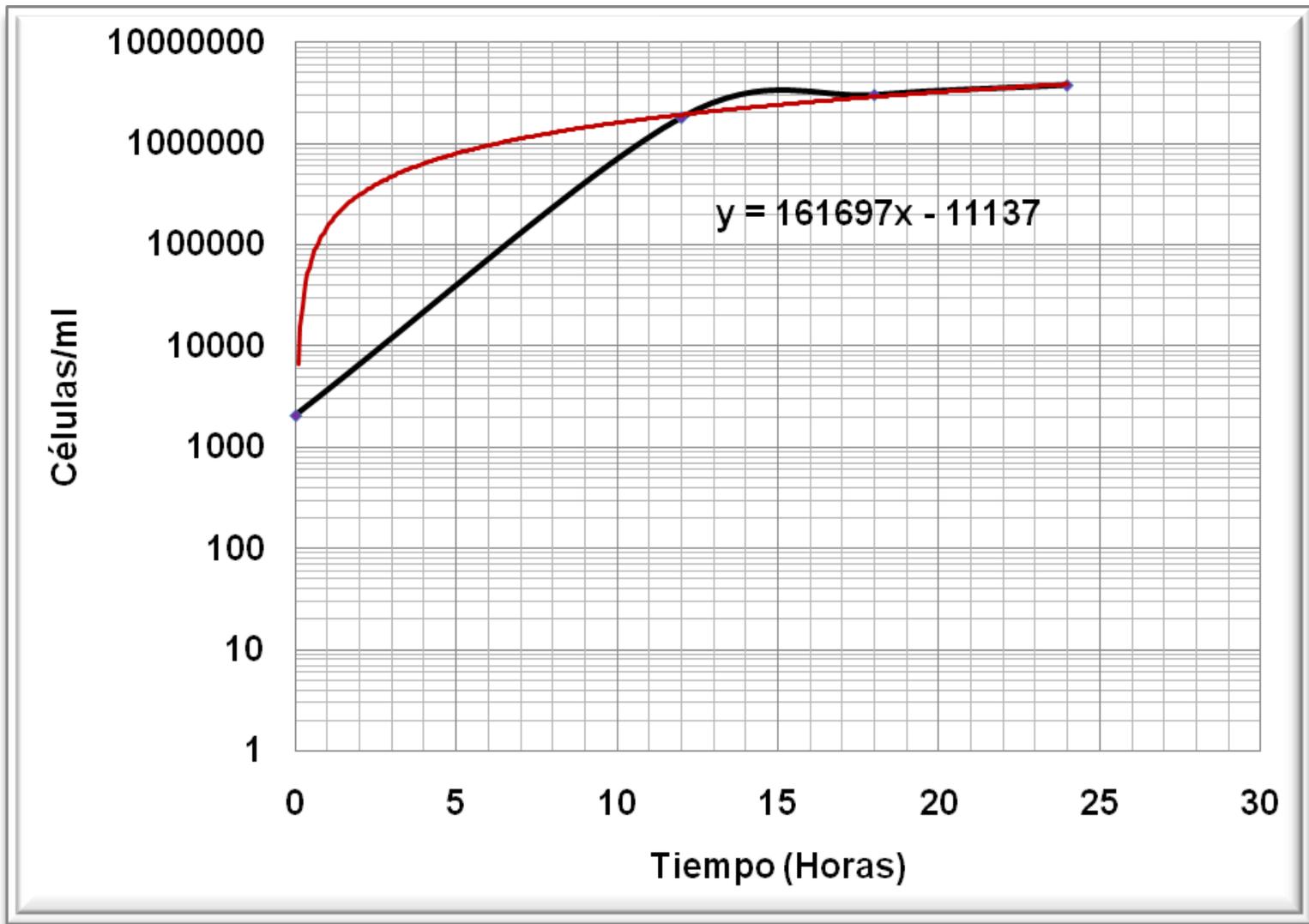
A las 18 horas:

$$\rho = 3055000 \frac{\text{Células}}{\text{ml}}$$

Finalmente a las 24 horas:

$$\rho = 3805000 \frac{\text{Células}}{\text{ml}}$$

Con los datos tomados se realizó la siguiente curva:



4.5. CONCLUSIONES

- Con la ayuda de la ingeniería genética se podría lograr que de esta bacteria se extraiga el gen responsable de la producción del etanol y colocarlo en otra bacteria diferente a la *Zymomona* para causar el mismo efecto ósea producción de etanol.
- Con temperaturas elevadas en la fermentación de la *Zymomona mobilis* se obtiene menos riesgo de contaminación del medio y una eficiencia y rendimiento elevado en cuanto a la producción de etanol.
- La temperatura óptima de crecimiento y reproducción de la bacteria *Zymomona mobilis* es 35°C.
- El rendimiento de la reproducción cinética de la *Zymomona mobilis* a una temperatura de 30°C y luego de 24 horas de constante agitación hubo un crecimiento de 3805000 células/ml.
- Una forma de comprobación de que la *Zymomona mobilis* estaban presentes en las cajas petri con sustrato fue realizando las pruebas bioquímicas donde se tomo muestra de colonias y se inocularon en diferentes medios.
- Se pudo obtener el aislamiento de la bacteria *Zymomona mobilis* en un medio de solución de glicerol al 20% y se lo llevo a una temperatura de -80°C.
- La producción excesiva de CO₂, como desecho y consecuencia de la fermentación, se podría utilizar en otras aplicaciones industriales como para la elaboración de hielo seco o gas para industrias de bebidas gaseosas.

4.6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda trabajar a una temperatura de 35°C que es la más adecuada para la reproducción correcta de la bacteria *Zymomonas mobilis*.
- Controlar que el pH en los medios de cultivo sea 6,5 para el crecimiento adecuado de las colonias de *Zymomonas mobilis*.
- En las pruebas bioquímicas, mantener las temperaturas dadas para el medio en la incubación del microorganismo para obtener los resultados deseados.
- Para obtener resultados efectivos el lugar donde se realizan las pruebas microbiológicas deberá estar completamente aséptico para que no haya contaminación de los medios con otros microorganismos no deseados.
- Se recomienda una vez aislada la bacteria *Zymomonas mobilis* se procederá inmediatamente a su preservación en un Freezer a una temperatura de – 80°C.
- Incentivar el desarrollo investigativo referente al mejoramiento genético de los microorganismos fermentadores utilizados actualmente, para lograr la optimización de los procesos fermentativos.

APÉNDICE

BIBLIOGRAFÍA

- BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

Coordinadores: García Garibay, Quintero Ramírez y López Munguía

Editorial Limusa – Noriega Editores

- THE ALCOHOL TEXTBOOK – THIRD EDITION

Edited by KA Jacques, TP Lyons and DR Kelsall

- HANDBOOK OF MICROBIOLOGICAL MEDIA – THIRD EDITION

Edited by Ronald M. Atlas – Editorial CRC PRESS

- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY – NINTH EDITION

Escrito por David Hendricks Bergey, John G. Holt

- PRODUCCIÓN DE ETANOL POR ZYMOMONAS SPP

www.Monografías.com

- PRODUCCION DE BIOETANOL

www.scribd.com/doc/.../Producción-de-Bioetanol

- PRODUCCIÓN DE ETANOL CON CÉLULAS INMOVILIZADAS DE ZYMOMONAS MOBILIS

www.imbiomed.com.mx/.../articulos.php

- CARACTERISTICAS DEL AGAVE

www.wikipedia.com

- CABUYA EN EL ECUADOR

www.sica.gov.ec/agronegocios/.../fibras/cabuya/cabuya_mag.pdf

- MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS

www.scribd.com/.../Medios-de-Cultivo-y-Pruebas-Bioquímicas

- PRUEBAS BIOQUÍMICAS

www.joseacortes.com/microbiologia/pruebasbioq/index.htm

- ETHANOL FERMENTATION TECHNOLOGY – *ZYMOMONAS MOBILIS*

www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles14.htm

- EL PULQUE: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y CONTENIDO ALCOHÓLICO MEDIANTE ESPECTROSCOPIA RAMAN.

www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/.../nova8_artorig3.pdf

GLOSARIO DE TERMINOS

AEROBIOSIS

A la descomposición de la materia orgánica en presencia de oxígeno se le llama aerobiosis y es el proceso más eficiente para liberar la energía de la materia orgánica.

AGAVE

Planta natural de zonas semidesérticas. Existen diferentes variedades; sus hojas son largas, carnosas y con espinas. La mayoría sirve para producir bebidas alcohólicas (pulque, tequila, mezcal, sotol y bacanora), dependiendo de la especie. Sin embargo, de otras se pueden extraer fibras textiles, como la lechuguilla o el henequén.

ASA DE INOCULACIÓN

Las asas para inocular, son de diferentes tipos, puede haber de mango plástico o de metal, como un pincel, de ahí parte una punta más delgada de metal y al final tiene una especie de aro, muy pequeñito.

Son aparatos de laboratorio que se utilizan para hacer Cepas, ósea se toma, x muestra de un cultivo o de algún otro lado, y en una caja petri (ya debes de tener preparado el cultivo) se siembra, lo que tomas con el asa de inoculación o bien asa de siembra, la caja se tapa, y se pone en congelación o a ambiente.

BACTERIA GRAMNEGATIVA

En microbiología, se denominan bacterias Gram negativas a aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram: de ahí el nombre

de "Gram-negativas" o también "gramnegativas". Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son uno de los principales grupos de bacterias y cuando se tratan como taxón se utiliza también el nombre de Negibacteria. Las restantes son las bacterias Gram positivas.

Las bacterias Gram-negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram-positivas presentan sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa. Al ser la pared fina, no retiene el colorante durante la tinción de Gram.

BACTERIA GRAMPOSITIVA

En microbiología, se denominan bacterias Gram positivas a aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram: de aquí el nombre de "Gram-positivas" o también "grampositivas". Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son uno de los principales grupos de bacterias, y cuando se tratan como taxón se utiliza también el nombre de Posibacteria.

BIOMASA

Cantidad de materia orgánica producida o existente en un ser vivo y que se encuentra en forma de proteínas, carbohidratos, lípidos, y otros compuestos orgánicos. Se mide en peso fresco, peso seco (una vez que se ha sometido a desecación a temperaturas moderadas), en términos energéticos (Kcal), etc.
MATERIA VIVA.

CATABOLISMO

El catabolismo (gr. *kata*, "hacia abajo") es la parte del metabolismo que consiste en la transformación de biomoléculas complejas en moléculas sencillas y en el almacenamiento de la energía química desprendida en forma de enlaces de fosfato y de moléculas de ATP, mediante la destrucción de las moléculas que contienen gran cantidad de energía en los enlaces covalentes que la forman, en reacciones químicas exotérmicas.

CEPA

En microbiología y genética, una cepa es una variante genotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

EFECTO PASTEUR

El efecto Pasteur es un efecto de inhibición de la fermentación alcohólica debido a la participación de oxígeno (O₂). La fermentación es un proceso completamente anaeróbico (sin la participación del aire) y la inclusión del oxígeno detiene o minimiza los procesos biológicos de las levaduras. El efecto fue descubierto en el año 1857 por el biólogo francés Louis Pasteur, que observó por primera vez que las levaduras dejaban de crecer al ser aireadas.

ENZIMA

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, que siempre que sea termodinámicamente posible. En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos. Casi todos los

procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran a unas tasas significativas. A las reacciones mediadas por enzimas se denominan reacciones enzimáticas.

ESPORA

Nombre genérico de una estructura reproductora, generalmente unicelular, pero pluricelular en algunos eumicetos, y, raramente, en los briofitos. Puede tener un origen asexual ó sexual.

FLAGELO

Estructura filamentosa y delgada, que en procariontas está constituida de una proteína llamada flagelina. Su función es la motilidad.

FERMENTACIÓN

En biotecnología se denomina fermentación a la producción industrial de toledosbiomasa, enzimas o metabolitos en general mediante el crecimiento controlado de células, especialmente las bacterianas, en biorreactores. Si bien se emplea el término «fermentación», cabe destacar que, metabólicamente, las condiciones de cultivo son en la mayoría de los casos aeróbicas a fin de obtener un máximo rendimiento en la producción.

GENOMA

El genoma es la totalidad de la información genética que posee un organismo en particular. Por lo general, al hablar de genoma en los seres eucarióticos nos referimos sólo al ADN contenido en el núcleo, organizado en cromosomas.

GLUCÓLISIS

La glucólisis o glicolisis (del griego glycos: azúcar y lysis: ruptura), es la vía metabólica encargada de oxidar o fermentar la glucosa y así obtener energía para la célula. Consiste esta ruta en 10 reacciones enzimáticas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, el cual es capaz de seguir otras vías metabólicas y así continuar entregando energía al organismo.

HOPANOIDE

Los hopanoides son compuestos pentacíclicos similares a los esteroides, cuya función principal es mejorar la fluidez de la membrana plasmática en los procariontes.

En muchas bacterias, los hopanoides pueden desempeñar un importante papel en el ajuste de la permeabilidad de la membrana celular y en la adaptación a condiciones ambientales extremas.

En la bacteria de fermentación del etanol *Zymomonas Mobilis* los hopanoides puede tener un papel en la adaptación de las membranas celulares a la acumulación de etanol y a los cambios de temperatura que influyen en las funciones de la membrana.

INHIBICIÓN

Efecto de frenado o parada de una reacción o proceso, ya sea química o bioquímica, por la acción de algún agente externo.

INOCULAR

Inocular es la acción de introducir un organismo vivo menor a uno mayor con el fin de producir mayor cantidad de colonias que es capaz de generar. En este caso se refiere como inocular, la ingestión de una muestra de colonia para producir colonias de *Zymomonas* sp.

La inoculación es voluntaria por parte de quien lo realiza. Estrictamente hablando, este término se aplica más bien en bacteriología, donde se inocular invadiendo tejido.

LEVADURA

Se denomina levadura a cualquiera de los diversos hongos microscópicos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la descomposición mediante fermentación de diversos cuerpos orgánicos, principalmente los azúcares o hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias.

MICROAEROFILIA

La microaerofilia hace referencia a las condiciones de baja y estricta concentración de oxígeno que requieren determinados organismos para su desarrollo, conocidos como microaerófilos. Entre ellos cabe destacar la importancia de *Campylobacter*.

MICROORGANISMO

Un microorganismo, también llamado microbio u organismo microscópico, es un ser vivo que sólo puede visualizarse con el microscopio. La ciencia que estudia a

los microorganismos es la microbiología. «Micro» del griego μικρο (diminuto, pequeño) y «bio» del griego βιος (vida) seres vivos diminutos.

MOLÉCULA ATP

La adenosina trifostato (ATP) es una molécula que consta de una purina (adenina), un azúcar (ribosa), y tres grupos fosfato. Gran cantidad de energía para las funciones biológicas se almacena en los enlaces de alta energía que unen los grupos fosfato y se liberan cuando uno o dos de los fosfatos se separan de las moléculas de ATP.

PROCESO ANAERÓBICO

El proceso anaeróbico es un resultado de la falta de oxígeno en el medio de vivencia de algún tipo de bacteria o microorganismo viviente.

PULCRE

El pulque es una bebida tradicional Mexicana que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel obtenida a partir de diferentes especies de maguey (Agave americana, A. atrovirens, A. feroz, A. mapisaga, A. salmiana). Esta bebida es consumida por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país, particularmente en las áreas de la meseta central. Se caracteriza por ser una bebida alcohólica, blanca, con olor fuerte y viscosa.

RAFINOSA

La rafinosa es un hidrato de carbono α - galactosacárido. Se encuentra principalmente en las leguminosas, tales como soya, frijoles, garbanzos, cacahuates, chícharos, alubias, etc. También se ha identificado en algunos

cereales, pero en éstos, el contenido de rafinosa siempre está en segundo término, después de la sacarosa.

SIEMBRA POR AGOTAMIENTO O AISLAMIENTO EN ESTRÍA

Se tomará con el asa de siembra una cantidad adecuada depositando el inoculo en uno de los extremos superiores de la placa, se realizarán movimientos en zig-zag sin levantar el asa hasta concluir la siembra en toda la placa.

SUSTRATO

En bioquímica, un sustrato es una molécula sobre la que actúa una enzima.

Las enzimas catalizan reacciones químicas que involucran al sustrato o los sustratos. El sustrato se une al sitio activo de la enzima, y se forma un complejo enzima-sustrato. El sustrato por acción de la enzima es transformado en producto y es liberado del sitio activo, quedando libre para recibir otro sustrato.

ZYMO MONA MOBILIS

Zymomonas mobilis es una bacteria perteneciente a la Zymomonas género. Es notable por su capacidad de producir bioetanol, que superan la levadura en algunos aspectos. Originalmente fue aislado de las bebidas alcohólicas como el vino de palma africana, el pulque mexicano, y también como un contaminante de la sidra y la cerveza en los países europeos.

ANEXOS

ANEXO A

Tabla 1 Identificación bioquímica.

Prueba bioquímica	<i>Saccharomyces sp</i>	<i>Zymomonas sp</i>	<i>Lactobacillus sp</i>	Prueba bioquímica	<i>Saccharomyces sp</i>	<i>Zymomonas sp</i>	<i>Lactobacillus sp</i>
Catalasa	NR	+	-	L-sorbosa	-	NR	NR
Oxidasa	NR	-	-	D-Ribosa	-	NR	+
Citrato	NR	-	NR	Ramnosa	-	NR	-
D- Glucosa	+	+	+	Trealosa	+	NR	+
Fructuosa	+	-	+	Celobiosa	-	NR	+
Galactosa	+	+	+	Melotiosa	+	NR	+
D-Xilosa	-	+	d	Melositoza	-	NR	D
Manosa	NR	+	+	Glucosamina	-	NR	NR
Lactosa	-	+	+	Glicerol	-	NR	NR
Sacarosa	+	-	+	Eritrol	-	NR	NR
Manitol	-	-	+	Glucitol	-	NR	NR
Maltosa	+	-	+	Inositol	-	NR	NR
Arabinosa	-	-	d	D-lactato	-	NR	-
Rafinosa	-	-	+	D-gluconato	-	NR	NR
Sorbitol	NR	-	+	Ciclohexamida	NR	-	-
Indol	NR	-	-	Nitratos	NR	-	NR
Movilidad	-	-	-	Sulfuros	NR	-	NR
TSI	NR	A/A	NR	Crecimiento a 10° C	+	NR	+
RM/VP	NR	-/-	NR	Crecimiento a 45° C	NR	NR	NR

ANEXO B

CARACTERÍSTICAS GENERALES

El **agave** también es conocida con los nombres pita, maguey, cabuya, mezcal y fique son plantas a postura matosa y de forma globosa.

Son abastecidas de hojas sésiles dispuestos a rosetas, lanceoladas, más o menos carnosas, de color blanco-azulado o blanco-grisáceo que acaban con una aguja fina y casi siempre espinosa sobre los márgenes.

Las flores son dispuestas en inflorescencias paniculadas o espigadas según la especie que se forman al centro de la roseta de hojas.



El fruto es una cápsula leñosa con muy diversas formas, dehiscente con tres alas.

Se afirma que florezca después de 100 años. En realidad este no es verdadero en cuanto hacen falta de los 10 a los 30 años y más para ponerse adulta y por lo tanto para florecer. Durante este tiempo la planta demasiado adulto se vuelve para poder ser criada en maceta.

ANEXO C

PRINCIPALES ESPECIES

El género tiene numerosas especies entre las que recordamos:

AGAVE AMERICANA



El Agave americana tiene espléndidas hojas verde-grises, espinosas a lo largo de los márgenes y terminantes con un gran aguijón. Es una planta que crece bastante rápidamente alcanzando la madurez en pocos años. Es el agave más difuso y conocido en todo el mundo de las zonas caliente-templadas en cuanto el más tolerante, entre las muchas especies, en hecho de temperatura y por la capacidad de también crecer en maceta.

Existen numerosas variedades entre las que recordamos: **Agave americana stricta** con las hojas verdes estriadas de amarillo y blanco en la parte central de la hoja; **Agave americana marginata**, con hojas de un verde intenso estriado de amarillo sobre los márgenes de las hojas; **Agave americana medio-picta** con hojas gris-verde con una estriación central blanco-argentada.



Agave americana marginata



Agave americana medio picta

AGAVE VICTORIAE REGINAE

El Agave Victoriae reginae tiene las hojas largas y sutiles, estriadas de manera irregular de blanco.

Es una planta de pequeñas dimensiones que queda muy compacta. Produce una llamativa inflorescencia llevada por un largo tallo alto de los 2 a los 4 metros.

Es originaria de las zonas desérticas de México y crece en terrenos predominantemente calcáreos.



AGAVE STRICTA

El Agave stricta presenta las hojas verdes, rígidas, sutiles, largas hasta 40 cm y terminantes con una larga espina. La inflorescencia es llevada por un largo tallo flórale alto hasta dos metros.



ANEXO D

TÉCNICA DE CULTIVO

Los Agaves son plantas que crecen muy bien en pleno sol sea de verano que de invierno.

Las temperaturas ideales están entre los 20 y los 30°C. De la primavera y por todo el verano es desplazar bien a lo abierto, si criara en maceta.

RIEGO

Debe ser regado con parquedad y regularmente. Durante los meses invernales deberá ser regada suficiente para mantener el suelo húmedo. A la reanudación vegetativa, en primavera, se restablecen los riego de manera gradual pero regando no excesivamente, lo mucho de mantener la tierra húmeda, no mojada. Hacia el fin del verano recomenzado a reducir gradualmente los riegos.

Atención a no dejar nunca agua en el posamaceta en cuánto no tolera en ningún modo los estancamientos hídricos en particular tenéis cuidado a no mojar o dejar agua en las hojas.

SUELO – TRASPLANTE

El agave de grandes dimensiones se trasplanta cada año al principio de la primavera mientras las de pequeñas dimensiones cada dos-tres años.

Se utiliza un suelo para cactus que ya se encuentran listos de un buen viverista al que se suma un poco de arena fin.

Por todas las plantas, se entrega de usar macetas de terracota qué favorecen la respiración de la tierra. La maceta no tiene que ser demasiado adulto pero de dimensiones ligeramente superiores al precedente en efecto si hay

excesiva tierra no la utilizará y por lo tanto podría quedar empapada de agua con graves consecuencias por la planta.

ABONO

De la primavera y hasta a todo el otoño hace falta abonar el agave cada tres semanas con un abono líquido suministrado junto al agua de riego utilizando un producto específico formulado para la nutrición de las cactáceas. Durante el otoño y el invierno suspender los abonos.

FLORACIÓN



El agave florece una sola vez en su vida y luego muere y éste ocurre cuando la planta ha alcanzado la madurez, más o menos cuando ha alcanzado los 10-30 años y más de edad.

PODA

Generalmente no se poda. Se cortan las hojas basales que poco a poco desecan para evitar que se conviertan en vehículo de enfermedades parasitarias.

Tenga cuidado que el utensilio que usas para el corte sea limpiado y desinfectado (preferiblemente a la llama), para evitar infectar los tejidos.

MULTIPLICACIÓN

El **agave** se puede propagar a partir de los retoños que crecen alrededor de la planta madre y cuando han alcanzado un largo de unos 10 cm.

Deben ser cercenados con un cuchillo afilado, limpio y desinfectado (preferiblemente a la llama), y dejados secar al aire por dos-tres días. Después de que son puestos en una compota por cactáceas y arena y obligados a temperatura de 15°C.

La mezcla se tiene constantemente húmeda y al amparo del sol directo hasta cuando las jóvenes plantas no arraigan. A aquel punto pueden ser trasplantar y tratar como las plantas adultas.

ANEXO E

PLAGAS Y ENFERMEDADES

La planta aparece doliente

Un estado de malestar general de la planta normalmente es debido a excesivos riegos especialmente a estancamientos de agua en las hojas. Remedios: secar la planta y dejar secar la tierra eventualmente sacando la planta de la maceta si la tierra es demasiado estofado y dejando secarla por el tiempo necesario por lo tanto reponer la planta en la maceta. Por el futuro, disminuir los riegos.

Puntos rojizos en la página inferior de las hojas

Los puntos rojizos en la página inferior de las hojas podrían significar que usted está en presencia de Cochinillas. Para ser seguro, sugerimos a utilizar una lupa y observar. Se caracterizan por tener una especie de escudo protector, de color oscuro y consistente. Además si pruebas sacando con una uña, salen afuera fácilmente.

Remedios: saca con un copo de algodón mojado de alcohol o si la planta es grande y en maceta, puedes lavarla con un agua y jabón neutral frotando muy delicadamente con una esponja para remover los parásitos. Después de que debe ser limpiada muy bien para eliminar todo el jabón. Por las plantas más grandes y plantadas a lo abierto, puedes usar productos químicos específicos. Los tratamientos con insecticidas anticochinillas, para que sean mucho más eficaces, deben ir dirigidos contra las larvas, que son más sensibles que el adulto.



Presencia de pequeños animales blanquecinos sobre la planta

Si notas estos pequeños animales estás en presencia de afidios o como comúnmente son llamados “Pulgones”.

Remedios: usar productos químicos específicos localizable de un buen viverista.



Hojas que inician a amarillear, aparecen salpicadas de manchas de amarillo y castaña

Sucesivamente a estas manifestaciones las hojas se abarquillan asumen un aspecto casi polvoriento y caen. Observando cuidadosamente se notan también sutiles telarañas sobre todo en la página inferior de las hojas. Con estos síntomas

muy probablemente estamos en presencia de un ataque de ácaros o “araña roja” o “arañuela” un ácaro muy molesto y dañino.

Remedios: aumentar la frecuencia de las nebulizaciones (la falta de humedad favorece su desarrollo) y eventualmente, sólo en el caso de infestaciones particularmente graves, usar productos químicos específicos. Si el agave no es particularmente grande, se puede probar también a limpiar y hojas para eliminar mecánicamente el parásito usando un copo de algodón mojado y enjabonado. Después de qué la planta debe ser aclarada muy bien para eliminar todo el jabón.

ANEXO F

CABUYA EN EL ECUADOR



Cabuya Negra



Cabuya Blanca

El cultivo de la cabuya negra o penco (*Agave americana*) y de la cabuya blanca (*Furcraea andina*) se localiza en las provincias del Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Azuay, Cañar, Loja, Guayas y Manabí. Por lo general se utiliza como cerco vivo para establecer linderos entre propiedades rurales, y como planta ornamental, no obstante es una especie que puede ser incorporada en sistemas agroforestales.

Crece en terrenos pedregosos, arenosos y de baja productividad agrícola, existiendo zonas donde la explotación es intensiva.

La superficie destinada a la producción de fibra de cabuya en 1980 fue estimada en 3244 ha con una producción de 6081 t, y con una productividad media por ha de 1975 kg. Para 1989 la superficie fue de 3207 ha con una producción de 3571 t y con un rendimiento promedio de 1114 kg/ha.

La disminución de los rendimientos por ha y del volumen de producción, se debe a la falta de asistencia técnica en el manejo del cultivo, inexistencia de programas de mejoramiento genético, y bajos precios del producto en el mercado nacional e internacional, como consecuencia de los productos sustitutivos como los sintéticos.

La cabuya es utilizada en el país para la fabricación de: envases (sacos), hilos, cordeles, alfombras, shigras, hamacas, rodapiés, tapices, tapetes, para terminación de viviendas y edificios, adornos de calzado, sogas, soguillas, etc. La línea productiva más importante es la elaboración de sacos para embalaje de productos agrícolas destinados al consumo interno y a la exportación de productos como cacao (*Teobroma sp*) e higuierilla (*Ricinus comunis*).

CARACTERÍSTICAS DE LA CABUYA ECUATORIANA

NOMBRE CIENTIFICO

Agave spp.

SINONIMIA Y NOMBRES VULGARES

Fique, cabuya, agave, estopillo, yaxci, ceniza, tuxtleco, mezcal, sisal agave.

VARIETADES

Tunosa común: verde brillante, espinas cafés.

Uña de águila: espinas encorvadas, hojas verde claro por encima y ceniza por debajo.

Ceniza: no tiene espinas, de color verde por encima y gris por debajo.

Castilla: hojas verde brillante, con franjas de color café, espinas rudimentarias.

EXIGENCIAS DEL CULTIVO

Agroecológicas

Clima: Temperados, secos.

Temperatura: 19° – 32° C

Humedad: 70 – 90%

Pluviosidad: 300 – 1600 mm anuales

Altitud: 1300 – 2820 msnm

Formación ecológica: Estepa espinosa

Requerimientos edáficos

Textura: Arenosa, Franco arenosa, permeables, profundos, fértiles

Acidez: pH 5.0 – 6.5

Tipo de suelo: Suelos de cordillera, rojos, sueltos, permeables.

SISTEMAS DE PROPAGACIÓN

Semilla: Se la emplea ocasionalmente para multiplicación masiva.

Hijuelos: Que nacen del tronco de las plantas, son plantas de larga duración, fuertes, largas.

Bulbillos: Nacen en el maguey y caen por sí solos al suelo.

Meristemáticos: Se usan las yemas de plantas jóvenes.

SIEMBRA

Material de siembra: Hijuelos o bulbillos, que se localizarán cuidadosamente.

Existe la posibilidad de producirlos en pilón, con envases muchos más grandes que los tradicionales.

Distancia de siembra: 1.5 y 1.5 m entre plantas y de 3 a 4 m para las calles.

Densidad de plantas: 2000 – 3000 plantas por hectárea.

Época de plantación: Al inicio del período de lluvias o con riego.

ETAPAS DEL CULTIVO

Desarrollo de la plantación: 36 meses.

Inicio de la cosecha: 36 meses.

Vida económica: Perenne.

REGIONALIZACIÓN

Las zonas aptas para este cultivo se localizan en los valles secos interandinos y en las estribaciones de la Cordillera en donde los remanentes boscosos han desaparecido, provocando cambios climáticos: estribaciones de la Cordillera Occidental (Lita, Imbabura); partes interandinas de las provincias de Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Loja y en las zonas áridas de la Costa (Manabí y Guayas, península de Santa Elena). Ver mapa en la hoja siguiente.

