

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Comparación de la metabolización de la sacarosa y la susceptibilidad a desinfectantes entre cepas bacterianas predominantes en jugo de caña del Ingenio Pantaleón

Trabajo de investigación presentado por
Ana Carolina Monroy Humphrey
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

Guatemala
2012

Comparación de la metabolización de la sacarosa y la susceptibilidad a desinfectantes entre cepas bacterianas predominantes en jugo de caña del Ingenio Pantaleón


UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

Comparación de la metabolización de la sacarosa y la
susceptibilidad a desinfectantes entre cepas bacterianas
predominantes en jugo de caña del Ingenio Pantaleón

Trabajo de investigación presentado por
Ana Carolina Monroy Humphrey
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y
Microbiología

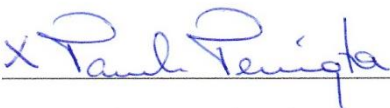
Guatemala
2012

Vo. Bo. :


(f) 

Lic. Osbel Núñez

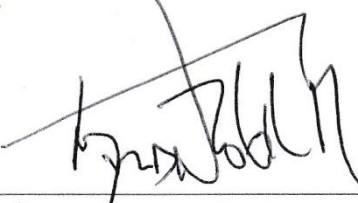
Tribunal Examinador:

(f) 

MSc Lucia Nitsch

(f) 

Lic. Ángel Ramírez

(f) 

Lic. Osbel Núñez

Fecha de aprobación: 4 de enero del 2013, Guatemala

PREFACIO

Esta investigación forma parte de una cadena de proyectos multidisciplinarios realizados desde el año 2007. Dichos proyectos surgen con el fin de tratar un problema en la industria azucarera, que involucra un adecuado control o monitoreo de la carga microbiana en los jugos de caña del proceso. Poco a poco, se ha logrado establecer un sistema de control microbiológico dentro del área de proceso, dejando aún un campo muy grande para investigar. Se han determinado los puntos críticos o de mayor carga microbiana, se aisló y trabajó con cepas del género reportado como más perjudicial para el proceso junto con una exploración en métodos para determinar la “severidad o agresividad” de dichas cepas. Esos primeros resultados son tomados como referencia en esta investigación, ampliando el perfil microbiano prevalente en el jugo de caña, en donde se intenta establecer con diversos indicadores la agresividad de la microbiota presente.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Contexto	3
IV. OBJETIVOS	19
A. Objetivo general	19
B. Objetivos específicos	19
V. JUSTIFICACIÓN	20
VI. VIABILIDAD	21
A. Recursos humanos	21
B. Recursos materiales y financieros	21
VII. MÉTODO	22
A. Diseño de investigación	22
B. Población	22
C. Muestra	23
D. Procedimiento	23
E. Análisis estadístico	26
VIII. RESULTADOS	28
A. Recuento de <i>Leuconostoc spp.</i> y microbiota total del jugo diluido y primario del jugo de caña, de marzo del 2012	28
B. Curva de crecimiento de <i>Klebsiella oxytoca</i> y <i>Klebsiella spp.</i>	29
C. Determinación de la producción de ácidos débiles de <i>Klebsiella oxytoca</i> , y <i>Klebsiella spp.</i> mediante caída de pH y capacidad buffer	30
D. Determinación de la actividad enzimática de <i>Klebsiella oxytoca</i> y <i>Klebsiella spp.</i>	33
E. Evaluación de seis desinfectantes utilizados en el Ingenio Pantaleón, ante <i>K. oxytoca</i> y <i>Klebsiella spp.</i>	33
IX. DISCUSIÓN	40
X. CONCLUSIONES	45
XI. RECOMENDACIONES	46
XII. LITERATURA CITADA	47
XIII. ANEXOS	50

LISTA DE CUADROS

Título	Página
Cuadro 1. Ácidos débiles como subproductos de la acción de microorganismos en el jugo de caña.	10
Cuadro 2. Compuestos activos de los desinfectantes utilizados.	14
Cuadro 3. Recuento de la microbiota total y de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> presente en muestras de jugo de caña primario y diluido	28
Cuadro 4. Clasificación de las colonias aisladas del jugo de caña primario y diluido según tinciones de Gram y morfología.	28
Cuadro 5. Clasificación de las colonias aisladas de la microbiota total del jugo de caña según tinciones de Gram y morfología, y el porcentaje de cada grupo.	29
Cuadro 6. Cambio de pH luego del tiempo y temperatura de incubación determinados como óptimos para cada caso, en medio de cultivo MP25	30
Cuadro 7. Análisis estadístico Shapiro-Wilk para la determinación de la normalidad de los datos, para la fase de determinación del cambio de pH por producción de ácidos débiles.	62
Cuadro 8. Test de homogeneidad de varianzas para la fase de determinación del cambio de pH por producción de ácidos débiles.	62
Cuadro 9. ANOVA con un nivel de confianza del 95% para comparar la diferencia entre los promedios de cambio de pH obtenidos para las dos cepas aisladas y el control positivo <i>L. mesenteroides</i> .	63

Cuadro 10. Prueba de rangos múltiples de Tukey para comparación y verificación de similitud entre los promedios de cambio de pH obtenidos.	63
Cuadro 11. Base de datos utilizada para los estadísticos realizados para la evaluación de los desinfectantes.	63
Cuadro 12. Análisis estadístico Shapiro-Wilk para la determinación de la normalidad de los datos, para la fase de evaluación de desinfectantes para <i>K. oxytoca</i> (bacteria 1) y <i>Klebsiellaspp.</i> (bacteria 2).	64
Cuadro 13. Análisis estadístico Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95%, para la evaluación del efecto de los desinfectantes según bacteria y dilución, tomando únicamente las muestras con valores no normales.	65
Cuadro 14. Test de homogeneidad de varianzas para la evaluación de desinfectantes evaluando únicamente los datos con un comportamiento normal.	66
Cuadro 15. ANOVA con un nivel de confianza del 95%, para la evaluación del efecto de los desinfectantes según bacteria y dilución.	66

LISTA DE FIGURAS

Título	Página
Figura 1. Proceso industrial de elaboración de azúcar	7
Figura 2. Síntesis general de dextranas a partir de sacarosa	9
Figura 3. Molécula de sacarosa	9
Figura 4. Reacción de oxidación de azúcares reductores del método DNS	12
Figura 5. Patrón que se debe seguir para colocar el inóculo de bacterias en el agar Mueller-Hinton, para la técnica de Kirby-bauer	16
Figura 6. Inserción de discos con antimicrobianos impregnados	16
Figura 7. Curva de crecimiento de <i>K. oxytoca</i> , realizada a una longitud de onda de 230nm en medio MP25	29
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>K. oxytoca</i> , realizada a una longitud de onda de 230nm en medio MP25	30
Figura 9. Cambios de pH dados por la producción de ácidos débiles luego de un tiempo de incubación, para <i>K. oxytoca</i> , <i>Klebsiella spp.</i> y <i>L.mesenteroides</i> como control positivo, en medio de cultivo MP25	31
Figura 10. Comparación de los valores del cambio de pH de las muestras analizadas, utilizando una prueba estadística de comparación Tukey con un nivel de confianza del 95%.	32
Figura 11. Capacidad buffer obtenida para <i>Klebsiella oxytoca</i> y <i>Klebsiella spp.</i>	32
Figura 12. Curvas de actividad enzimática de la dextranasa en <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella spp.</i> y <i>L. mesenteroides</i> mediante el método colorimétrico DNS	33

Figura 13. Evaluación de los seis desinfectantes con sus respectivos coeficientes de susceptibilidad según dilución, para <i>K. oxytoca</i>	34
Figura 14. Evaluación de los seis desinfectantes con sus respectivos coeficientes de susceptibilidad según dilución, para <i>K. oxytoca</i> . Mediante el análisis estadístico ANOVA y Kruskal Wallis con un nivel de confianza del 95% se determinó la significancia en las diferencias de datos	35
Figura 15. Evaluación de los seis desinfectantes con sus respectivos coeficientes de susceptibilidad según dilución, para <i>Klebsiella spp.</i>	35
Figura 16. Evaluación de los seis desinfectantes con sus respectivos coeficientes de susceptibilidad según dilución, para <i>Klebsiella spp.</i> Mediante el análisis estadístico ANOVA y Kruskal Wallis con un nivel de confianza del 95% se determinó la significancia en las diferencias de datos	36
Figura 17. Comparación de la evaluación del desinfectante SMB ante <i>K. oxytoca</i> y <i>Klebsiella spp.</i> según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones	37
Figura 18. Comparación de la evaluación del desinfectante QUAT 25 ante <i>K. oxytoca</i> y <i>Klebsiella spp.</i> según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones	37
Figura 19. Comparación de la evaluación del desinfectante Busan ante <i>K. oxytoca</i> y <i>Klebsiellaspp.</i> según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones	38
Figura 20. Comparación de la evaluación del desinfectante β -Stab ante <i>K. oxytoca</i> y <i>Klebsiellaspp.</i> según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones	38
Figura 21. Comparación de la evaluación del desinfectante Magnacide ante <i>K. oxytoca</i> y <i>Klebsiella spp.</i> según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones	39
Figura 22. Comparación de la evaluación del desinfectante SMB C ante <i>K. oxytoca</i> y <i>Klebsiella spp.</i> según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones	39

RESUMEN

La agroindustria azucarera no es solamente una fuerte contribución al desarrollo económico, social y ambiental para el país, sino también un amplio campo de investigación. Dado esto se ha realizado una serie de investigaciones desde el año 2007 relacionadas al área de proceso de elaboración de azúcar.

Para continuar esta serie de proyectos, en esta investigación se aisló e identificó dos de las cepas más abundantes en el jugo de caña primario y diluido, estableciendo con una serie de pruebas y ensayos la “severidad” de estas, comparándolas entre ellas y con *L. mesenteroides* (bacteria detectada como una de las más abundantes). Una de las bacterias aisladas resultó ser *Klebsiella oxytoca* y la otra identificada como *Klebsiella spp.* Para establecer las condiciones óptimas de crecimiento *in vitro* de las cepas aisladas se realizaron curvas de crecimiento, con las que se determinó que para ambas cepas la temperatura de incubación óptima es a 37°C, 3.5 horas de incubación para *K. oxytoca* y 3 horas para *Klebsiella spp.*, en el medio de cultivo líquido MP25. Uno de los aspectos evaluados para determinar la “severidad” de las cepas aisladas, fue la producción de ácidos débiles medida por disminución de pH e incremento de capacidad buffer de estas. En cuanto al cambio de pH, se encontró que en *K. oxytoca* es mayor que en *Klebsiella spp.* en general, incluso más que las cepas de *Leuconostoc* evaluadas en proyectos anteriores. Para la capacidad buffer, se encontró que *Klebsiella spp.* presenta una capacidad buffer mayor que *K. oxytoca*. Otro aspecto evaluado fue la actividad de la enzima dextranasa, para la cual no se encontró actividad en ninguna de las dos cepas trabajadas. Esto indica que las cepas aisladas del género *Klebsiella* no producen dicha enzima, o que lo hacen en menores cantidades que no son detectadas con el protocolo utilizado para este caso. Por último se evaluó la resistencia a seis de los desinfectantes más utilizados por los ingenios para control microbiano en el área de proceso: SMB, SMC, Magnacide, QUAT 25, Busan y β -Stab. De dichos desinfectantes evaluados el que mayor efecto tuvo fue el SMB C, mientras que con QUAT 25 y β -Stab no se obtuvo efecto sobre las cepas estudiadas.

Esta investigación es solo un aporte en la determinación del perfil microbiológico presente en el jugo de caña dejando aun mucho campo por trabajar. Se debe continuar el aislamiento e identificación de los géneros más abundantes en el jugo de caña para formar finalmente un perfil microbiano más completo que pueda proporcionar la información necesaria para llegar a tomar decisiones más puntuales en cuanto a su eliminación y control de ser así necesario.

I. INTRODUCCIÓN

La agroindustria azucarera en Guatemala es una de las principales fuentes de divisas en el país generando abundantes empleos. Los doce ingenios y las cinco organizaciones que los integran contribuyen enormemente al desarrollo del país siendo un factor importante para el progreso de Guatemala (Asazgua. 2012).

La agroindustria azucarera se encuentra formada por empresas que se dedican al cultivo, cosecha y procesamiento de la caña de azúcar y derivados realizando una contribución importante en el desarrollo económico, social y ambiental para el país (Vila A. 2003). Con este evidente aporte a la economía del país es considerada una industria de alta importancia y excelente campo para el desarrollo de investigación.

Este trabajo de investigación forma parte de una serie de proyectos que se han desarrollado desde el año 2007 en el Ingenio Santa Ana. En dicho proyecto se realizó la optimización y estandarización de técnicas analíticas para el recuento microbiológico presente en el jugo de caña. La implementación de estas técnicas incluyó un análisis sistemático de carga microbiana en caña, jugo primario y jugo diluido, presente en el área de proceso. Es una técnica colorimétrica (resazurina), con la que se estima la actividad de la mayoría de la microbiota presente en el jugo de caña (Lou, 2008). Con este estudio se estableció un método que provee resultados rápidos para las tomas de decisiones dentro del área de proceso, sin embargo no se había incluido un estudio cualitativo de la microbiota presente en el jugo.

En el proyecto siguiente se trasladó la investigación al Ingenio Pantaleón. En este proyecto realizado en el año 2009 se logró identificar la bacteria aeróbica más abundante en el jugo de caña, siendo esta identificada como *Leuconostoc mesenteroides*. Dado a que esta especie de bacteria utiliza medios comerciales de precio muy elevado para su crecimiento, en este proyecto se propuso crear un medio costo-efectivo que utilizara subproductos del proceso de producción de azúcar (Balsells, *et al.* 2009). Se realizó un medio sólido (MP200) y uno líquido (MP25) siendo efectivos para un crecimiento rápido de *L. mesenteroides*. En este mismo proyecto también se realizó la implementación de la técnica DNS (dinitrosalicílico), un método colorimétrico para determinar la actividad enzimática de la dextranasa en *L. mesenteroides*.

Utilizando las técnicas implementadas anteriormente y los medios diseñados para la especie más abundante presente en el jugo de caña, en el proyecto del 2011 se realizó un estudio en cinco cepas distintas de *L. mesenteroides*. Se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento de estas cinco cepas, mediante curvas de calibración. Se determinó la actividad de la dextranasa y producción de ácidos medidos por incremento de la capacidad buffer producido por las cepas, comparándolas entre sí. Finalmente se determinó la resistencia de las cinco cepas a los tres bactericidas utilizados para control y eliminación de microorganismos en el Ingenio Pantaleón.

Estos resultados constituyen una plataforma con información y técnicas para cepas del género *Leuconostoc*, pero al mismo tiempo revelaron la necesidad de estudiar en el mismo sentido otras especies presentes en abundancia en los jugos de caña.

En este trabajo se encontraron e identificaron dos de las cepas abundantes en el jugo de caña, sin incluir *L. mesenteroides*, y se determinó la actividad de la dextransacarasa y acidófila en ellas, al igual que su susceptibilidad a los desinfectantes utilizados en el ingenio. Con esto se obtuvo un perfil cada vez más amplio de las bacterias presentes en el jugo de caña y cómo la presencia de estas puede afectar la producción de azúcar según la agresividad que presentaron estas, mediante determinadas pruebas.

II. ANTECEDENTES

A. Contexto

El Ingenio Pantaleón es una agroindustria que se dedica a la producción de azúcar, mieles, alcoholes y energía eléctrica. Actualmente es el principal productor en Centroamérica encontrándose en uno de los diez productores más importantes de Latinoamérica. Es parte de la Fundación Pantaleón la cual también se dedica a realizar proyectos de educación, salud y medio ambiente contribuyendo al desarrollo de los países donde opera siendo estos: Guatemala, Honduras y Nicaragua. Pantaleón no solo es parte importante de la economía del país, sino también ofrece un enorme campo en el área de la investigación que debe ser aprovechado y explotado (Pantaleón, 2011).

Este proyecto forma parte de una serie de investigaciones realizadas a partir del año 2007 hasta el día de hoy. El proyecto global se originó en el Ingenio Santa Ana en Escuintla Guatemala, dado a que el Ingenio le abrió las puertas a la Universidad del Valle de Guatemala para que estudiantes pudieran realizar estudios o trabajos de investigación que enriquecieran los conocimientos del estudiante y fueran a su vez de beneficio para la industria azucarera.

El proyecto realizado del 2007-2008 cubrió estas primeras investigaciones en el ingenio. Entre estas la optimización y estandarización de técnicas analíticas para el recuento microbiológico presente en el jugo de caña. La implementación de estas técnicas incluyó el análisis sistemático de carga microbiana en caña, jugo primario y jugo diluido, a la vez que se evaluaron los puntos críticos en los tandems del proceso (Lou, 2008).

Se realizó la optimización del método de estimación de actividad microbiana utilizando resazurina, un método colorimétrico. En dicho método la resazurina se transforma en resorrufina la cual posee una coloración rosada y luego esta forma dehidrorresurrufina resultando una solución incolora. La formación de la resorrufina en aumento hace variar la coloración de la solución a tonos entre violeta y rosados. La formación de dehidrorresurrufina produce un cambio de coloración en la solución en tonos amarillentos y blancos. Con este método se logró encontrar una relación lineal entre el recuento de microorganismos y el tiempo total de decoloración de la resazurina. Con esto se logró establecer un sistema de colores para verificar la calidad de la caña que entra al proceso, asignando un color a dicha calidad y comprobando que los jugos más contaminados se decoloran en tiempos más breves. Con los colores y un tiempo establecido se logró establecer dicho sistema en el ingenio, utilizado para el monitoreo de la materia prima entrante y la carga microbiana presente en los jugos en varias etapas del proceso.

En el proyecto realizado en el 2009, se logró identificar la bacteria aeróbica más abundante en el jugo de caña, siendo esta identificada como *Leuconostoc mesenteroides*. Este proyecto le dio seguimiento a lo investigado en el proyecto del 2008 con la diferencia de que para este caso se trasladó la investigación hacia el Ingenio Pantaleón en Escuintla, Guatemala.

Adicionalmente a *Leuconostoc mesenteroides*, se identificaron otras dos bacterias, siendo estas *Lactobacillus casei* y *Bacillus stearothermophilus*, pero finalmente fue *L. mesenteroides* la que captó la atención del proyecto (Balsells, *et al.* 2009).

Para el caso de *L. mesenteroides*, se utiliza el medio Mayeux, Sandine y Elliker (MSE) para su aislamiento en donde se puede observar el crecimiento de la bacteria, en colonias con morfología de “gota”. Este efecto de gota se logra crear por la producción de dextranas en el medio (Avelar, 2011). A pesar de que este es un excelente medio para el crecimiento de *L. mesenteroides*, es vendido por las casas comerciales a un precio elevado, por lo que se propuso en el año 2009 crear un medio específico para dicha bacteria de menor costo. En el proyecto del 2009 Balsells, *et al.* se propusieron fórmulas para medios costo-efectivos utilizando para ellos subproductos del proceso de producción de azúcar (Balsells, *et al.* 2009)

Se llevaron a cabo distintos tipos de medios, tanto sólidos como líquidos evaluando la efectividad de crecimiento bacteriano. Luego del estudio estableció que el medio sólido MP200 fue el más efectivo al igual que el medio líquido MP25. El medio MP25 posee como componente principal la miel primaria (de donde provienen las siglas) y peptona, y el medio sólido MP200 difiere por el agregado de agar que posee. Finalmente lograron optimizar la realización de dichos medios logrando un mejor crecimiento bacteriano al igual que la reducción del tiempo de incubación (Balsells, *et al.* 2009).

Otro aporte importante del proyecto Balsells, *et al.*(2009) fue la optimización del método DNS (Dinitrosalicílico), un método colorimétrico utilizado para medir la actividad de la dextranasa y de las demás enzimas degradadoras de sacarosa. Con este método y los medios optimizados del proyecto, en el 2011 surge otro proyecto de investigación que se encargó de evaluar la capacidad de *L. mesenteroides* de metabolizar la sacarosa, y de presentar resistencia a determinados bactericidas.

En el proyecto, Avelar (2011) utilizó los avances y optimizaciones realizadas anteriormente, utilizándolos ya de forma aplicada. En este proyecto se utilizaron los medios de cultivo optimizados en el proyecto del 2009 para el crecimiento de *L. mesenteroides*.

La capacidad de metabolización del azúcar fue medida mediante el método colorimétrico DNS antes mencionado, realizando una comparación entre la actividad de la dextranasa de las diferentes cepas de *Leuconostoc* evaluadas. Para dicha evaluación no se encontró ninguna diferencia significativa. También se determinó la producción de ácidos o capacidad buffer de las cepas de *Leuconostoc* mediante una técnica sencilla de titulación (Avelar. 2011).

Mediante la elaboración de curvas de crecimiento estableció que las condiciones óptimas de crecimiento de *Leuconostoc spp.* fueron 3 horas de incubación a 28°C, y estas fueron las condiciones bajo las cuales se trabajaron las cepas utilizadas (Avelar. 2011)

Por último se realizó una evaluación de la susceptibilidad de las cepas de *Leuconostoc* hacia tres de los bactericidas utilizados en el Ingenio Pantaleón, para lo cual no se encontró diferencia significativa entre los coeficientes de susceptibilidad a antimicrobianos de las diferentes cepas de *Leuconostoc spp.* (Avelar. 2011).

Con los resultados encontrados en los proyectos anteriores, se obtiene un panorama mucho más amplio en lo que respecta al contenido microbiano en el jugo de caña. Conociendo la bacteria más importante y su forma de metabolización de la sacarosa se puede optar por continuar caracterizando otras bacterias de importancia en la metabolización y contaminación del jugo de caña.

1. Proceso de la producción de azúcar.

a. Agrícola. Para dar inicio al proceso se preparan los suelos para lo cual se aplican conceptos de conservación del suelo. La siembra es realizada de forma manual y semi-mecánica. La renovación de las plantaciones es realizada cuando la productividad de la caña va disminuyendo su producción a niveles notables. El proceso de fertilización consiste en la aplicación de los nutrientes que la planta necesita para su crecimiento, y los principales son: nitrógeno, fósforo, potasio y azufre (Ingenio Pantaleón, 2011).

La época de zafra (cosecha) da inicio a mediados del mes de noviembre y termina a finales de abril. El cultivo se cosecha a los doce meses de edad cuando se logra alcanzar la mayor concentración de azúcar en la caña. En la caña que se cosecha de forma manual, es importante controlar el porcentaje de impurezas que luego pueden reducir la capacidad de recuperación del azúcar en el proceso industrial. Un 25% de la caña es cosechada de forma mecánica, lo cual permite tener una labor más fácil pero a la vez tiene el inconveniente de entregar un producto de inferior calidad al que se realiza de forma manual (Ingenio Pantaleón. 2011)

b. Proceso industrial. Para dar inicio al proceso industrial de producción de azúcar, se realiza un pesado y determinación de la calidad de la materia prima lo cual se realiza para medir la cantidad y calidad del jugo y de la sacarosa presente. Este proceso es seguido por la limpieza y preparación de la caña, el cual consiste en la remoción de partículas del suelo y piedras mediante el lavado con agua seguido del picado de la caña hasta reducirla en astillas muy pequeñas. Luego se procede a extraer el jugo de la caña lo cual se lleva a cabo en varios molinos colocados en serie. Al mismo tiempo que la caña pasa de un molino a otro, esta se va mojando con agua disminuyendo el contenido de azúcar presente hasta llegar a obtener lo que se conoce como bagazo. El bagazo es un

subproducto que se utiliza en la misma industria como combustible para la producción de vapor (Ingenio Pantaleón, 2011).

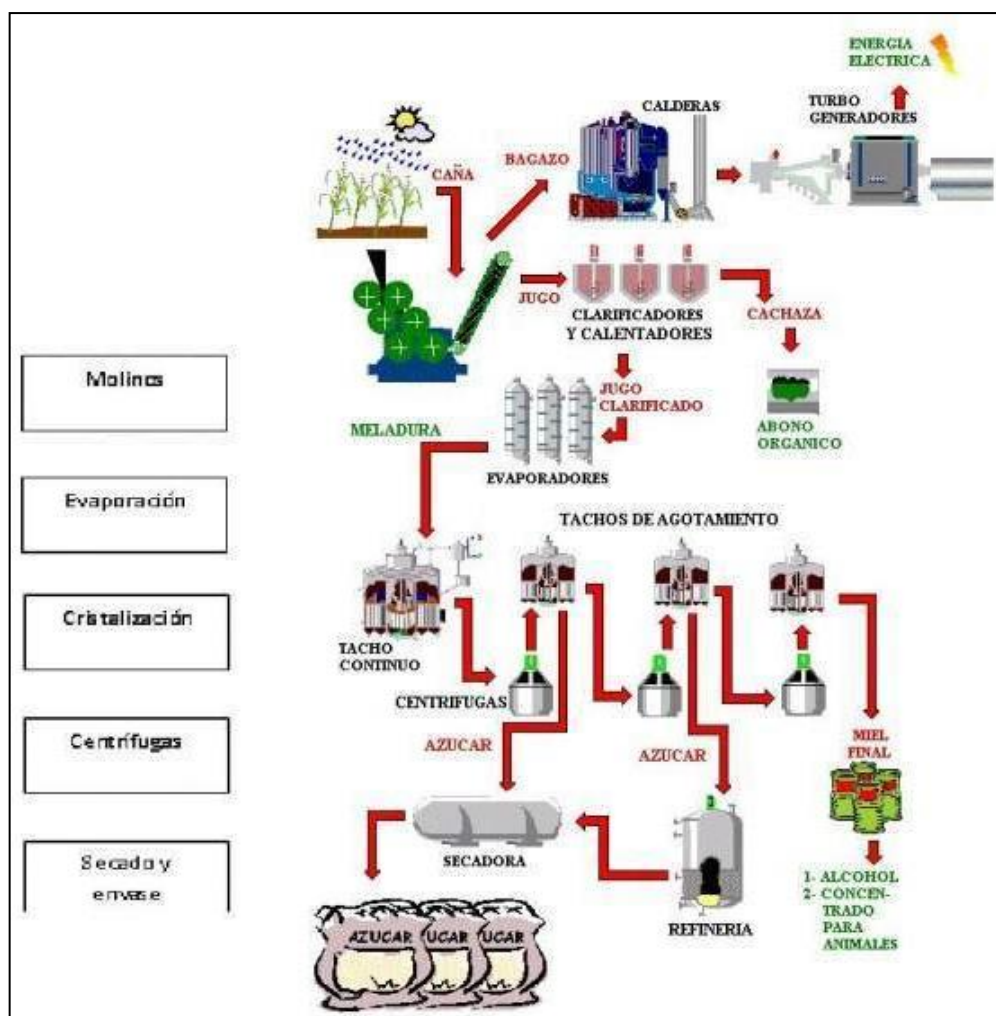
El jugo de caña extraído es luego purificado mediante un agregado de dióxido de azufre, cal hidratada y calor con el fin de remover las impurezas restantes y eliminar o evitar en lo posible la presencia de microorganismos. El resultado principal de este proceso es un jugo de tono claro que es luego trasladado a una fase de evaporación, obteniendo también cachaza como subproducto que es luego utilizado como abono en los campos de caña. Durante la evaporación se remueve toda el agua presente en el jugo mediante un sistema que aprovecha la energía resultante para producir meladura como producto principal y vapores de baja presión que suministra energía a todo el proceso (Ingenio Pantaleón, 2011).

La meladura resultante de la evaporación es luego llevada a un proceso de cristalización. Este proceso se lleva a cabo por la concentración de la meladura y mieles intermedias en tres etapas que llaman cocimientos. El producto de dicho proceso son las masas cocidas que pasan a un proceso de centrifugación para la obtención de los cristales (Ingenio Pantaleón, 2011).

Obtenidos los cristales, estos se someten a un proceso de refinación. En este proceso se disuelve el azúcar cristalizada con agua destilada hasta obtener un jarabe. A esto se le da un tratamiento de decoloración mediante una mezcla con carbón activado, procedido de una filtración que elimina dicho carbón en filtros de presión. Ya clarificado el jarabe se realiza un segundo proceso de cristalización obteniendo como producto, azúcar de pureza más alta y mejor color.

Para el manejo del azúcar se realiza una separación, mediante centrifugación, de la miel de los cristales que se encuentran en la masa cocida (que proviene de la cristalización) y pasando esta azúcar a las etapas posteriores de secado y envase siguiendo todas las normas de higiene establecidas para la elaboración de alimentos. La figura 1 muestra el proceso industrial de elaboración de azúcar (Ingenio Pantaleón, 2011).

Figura 1. Proceso industrial de elaboración de azúcar



(EcuRed, 2011)

2. Polisacáridos en la producción de azúcar. Se han realizado numerosas investigaciones relacionadas a los polisacáridos encontrados en la caña de azúcar y sus efectos durante el proceso de elaboración de esta. Los polisacáridos encontrados durante el proceso incluyen los propios de la planta, lo cual puede depender de factores como la variedad de la planta, período de madurez, el aspecto climático y los resultantes de los procesos de deterioro de la caña. A pesar de que son varios los polisacáridos presentes en el proceso, los esfuerzos para disminuir la presencia de estos se han enfocado en el almidón y en la dextrana. Para el caso del almidón, este es un polímero que proviene de las actividades metabólicas de la caña, no así la dextrana, la cual es formada por la actividad de microorganismos presentes en la misma planta o adquiridos durante el proceso. Todos los polisacáridos tienden a tener efectos adversos en el proceso de elaboración del azúcar dado a sus propiedades físicas. La presencia de estos provoca pérdidas en cuanto a la sacarosa procesable y en el peor de los casos se da un aumento de la viscosidad que vuelve el proceso más lento al igual que la modificación de los cristales provocando pérdidas en la sacarosa. Los polisacáridos solubles, además del almidón pueden ser agrupados en tres categorías principales. El primer grupo incluye los

polisacáridos estructurales, los cuales se originan en la misma planta y que incluyen hemicelulosas, las conocidas como pentanas y pectinas. El segundo grupo lo integran los polisacáridos formados por bacterias antes y durante el proceso de manufactura y refinamiento del azúcar (principal: dextrana). Existe evidencia de que polisacáridos parecidos a la dextrana pueden formarse durante las cosechas de caña dado por la acción de enzimas naturales propias del jugo que contiene en su interior, y son estos los polisacáridos que integran el tercer grupo (Cuddihy J. *et al.* 2001)

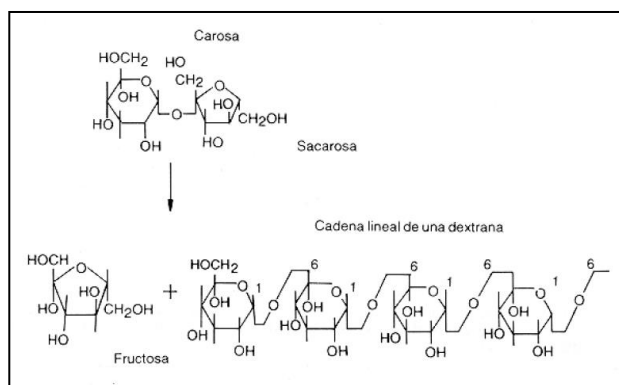
3. Presencia de microorganismos durante el proceso. Investigaciones realizadas en azucareras se han enfocado a determinar los componentes presentes en el jugo que se encuentran asociados a la disminución tanto del rendimiento del azúcar, como a la calidad de esta. Se han logrado vincular estos problemas a las impurezas presentes en el jugo que tienen origen en los propios procesos fisiológicos de la caña. Entre estos se encuentran azúcares que interfieren en el proceso de cristalización del azúcar, provocando un cambio en la morfología del cristal de la sacarosa. A estas sustancias se les suma la formación de dextranas formadas durante el deterioro de la caña y sus jugos, causadas por la acción de los microorganismos propios de la caña. Estas sustancias poliméricas provocan en las soluciones de sacarosa una elevación de la viscosidad que contribuye directamente en la disminución del tamaño del cristal de azúcar, y esto lleva a una pequeña pérdida de la capacidad industrial. Las sustancias mencionadas en conjunto van a provocar la aparición de cristales de sacarosa pequeños y alargados conocidos como “cristal de aguja” que pueden escapar a las mieles finales durante el proceso de centrifugación, incrementando aun más las pérdidas de sacarosa (Ramos, 2008).

Varias especies de bacterias, pero en especial *L. mesenteroides*, dan origen a las dextranas mencionadas. Las dextranas son polisacáridos que se componen por varias unidades de glucosa que se encuentran unidas en cadena recta mediante enlaces α -1,6. Para que el polímero sea definido o considerado dextrana al menos entre el 50 y 60% de las uniones presentes deben ser de tipo α -1,6 existiendo un amplio rango de pesos moleculares entre los mismos. Las diferentes ramificaciones que puedan presentarse en las dextranas en su cadena molecular van a depender de la clase de bacteria que las esté produciendo, provocando diferencias estructurales en el polímero (Larrahondo, 1995). La estructura y propiedades de la dextrana producida puede variar entre las distintas cepas, y están bajo la influencia de las condiciones de cultivo tal como la concentración de sacarosa, pH, temperatura y oxigenación. Otros polisacáridos similares a la dextrana son formados por organismos del suelo presentes en el jugo de caña dentro del parénquima, tales como escleroglucano, pululano y curdlano (Cuddihy J. *et al.* 2001).

En estudios se ha sugerido que en una concentración de dextrana de 1000 ppm en grados Brix o mayor, el polisacárido contiene predominantemente de uno a seis enlaces glicosídicos. Esto indica que el material con concentraciones elevadas de dextrana es casi exclusivo de bacterias. Una cantidad pequeña de dextrana, menos de 300 ppm, contiene una proporción de 1-4 y 1-3 enlaces y es formada de forma natural en la caña (Cuddihy J. *et al.* 2001).

Además de las pérdidas de sacarosa causadas por la formación de dextranas, también producen una elevación en los valores del “pol” (contenido de sacarosa que se expresa como un porcentaje en peso, que se determina mediante polarimetría), debido a su poder dextro-rotatorio elevado (Larrañondo, 1995).

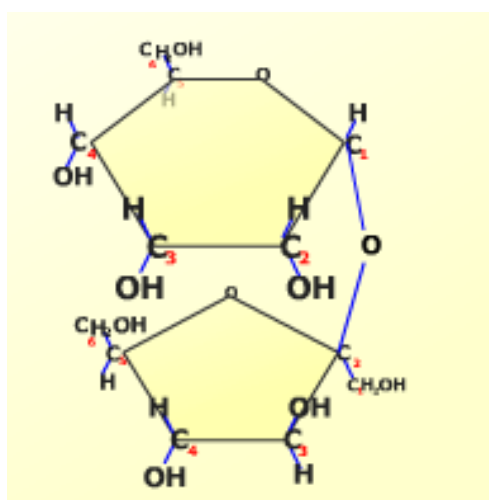
Figura 2. Síntesis general de dextranas a partir de sacarosa



(Larrañondo J. 1995)

La síntesis de dextranas a partir de la sacarosa se lleva a cabo mediante la acción enzimática de la dextransacarasa. La sacarosa es un disacárido no reductor formado por los monosacáridos fructosa y glucosa. La molécula se encuentra formada por una glucosa ciclada con el carbono anomérico en posición α , y una fructosa ciclada con el carbono anomérico en la posición β (INTEF, 2013).

Figura 3. Molécula de sacarosa.



(INTEF, 2013)

Durante la síntesis de dextrana se utiliza únicamente la fracción de glucosa de cada una de las moléculas de azúcar consumidas dejando como subproducto la fructosa, la cual es descompuesta en ácidos orgánicos y otros productos que inducen un descenso del pH (Larrañondo J. 1995). Junto con el jugo, las dextranas producidas se extraen en los molinos a la vez que pueden contaminar los flujos de

disminuyendo su valor de pH dado a la producción del ácido láctico. En general todas las bacterias que se encuentran en el jugo de caña son degradadoras de lactosa y producen como parte de su metabolismo, ácidos orgánicos (Balsells. *et. al.* 2009).

Otra de las formas en que se puede ver afectado el proceso por la producción de ácidos, es el aumento del consumo de cal, la cual es utilizada para elevar el pH del jugo durante el proceso de alcalinización (Balsells. *et. al.* 2009).

En el estudio Balsells D. *et. al.* 2009 se realizó un monitoreo de la carga de microorganismos, especialmente *L. mesenteroides*, a lo largo del paso del jugo de caña en los distintos molinos. Se encontró que existe una relación en el incremento de la temperatura con la disminución de la densidad microbiana en el jugo. A lo largo de los molinos, el jugo va siendo sometido a mayores temperaturas y luego del monitoreo realizado en dicho estudio se pudo establecer que la relación lineal entre densidad microbiana y temperatura de los molinos puede ser utilizada para predecir de cierta forma la densidad microbiana presente (Balsells.*et. al.* 2009).

4. **Actividad enzimática.** El daño causado por los microorganismos de la caña en la industria azucarera, se debe a que estos sintetizan ciertas enzimas para la metabolización de la sacarosa. (Avelar, 2011). Dado esto se han creado métodos para determinar la tasa de metabolización que posee el organismo hacia un determinado sustrato.

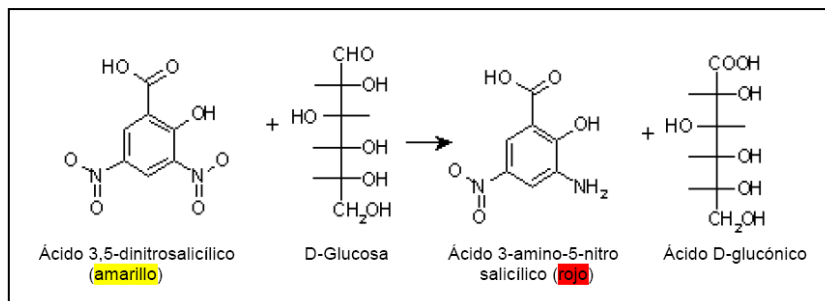
Existe una serie de métodos de uso en laboratorios para medir la actividad enzimática. Los métodos más comúnmente utilizados son la espectrofotometría que es un método cuantitativo y reacciones de colorimetría que son más cualitativas. Para el caso de un método espectrofotométrico es necesario que la enzima de interés actúe sobre un sustrato específico que absorba luz a una determinada longitud de onda, o que el producto de la reacción enzimática posea la misma absorbancia (Avelar, 2011).

Un método utilizado para la determinación de la actividad enzimática, el método DNS (Dinitrosalicílico) usado por Balsells D. *et. al.* 2009, es una de las alternativas a utilizar en el laboratorio, siendo este un método sencillo y relativamente rápido de realizar. En este estudio se logró determinar la actividad enzimática de la cepa aislada de *L. mesenteroides* estableciendo la efectividad del método DNS para medir la producción de azúcares reductores. En el estudio Avelar S. 2011, se aplicó dicha técnica ya estandarizada para evaluar la actividad enzimática de distintas cepas aisladas de *Leuconostoc*, en donde no se encontró diferencias significativas entre las actividades de cada una de ellas.

El método del ácido 3.5-dinitrosalicílico (DNS) se basa en la reducción del DNS, que posee inicialmente un color amarillo, por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico

que presenta un color rojo ladrillo. La presencia de este último compuesto puede ser detectado con lecturas de absorbancia en la zona de 540-570 nm (Tena M. y Jorriin J. 2011)

Figura 4. Reacción de reducción del DNS



(Tena M. y Jorriin J. 2011)

5. **Microorganismos presentes en suelos.** Bacterias promotoras del crecimiento en plantas se refieren a bacterias beneficiosas para estas, que pueden afectar el desarrollo de las plantas directa o indirectamente, por lo que la presencia de microorganismos en suelos es indispensable. Estas son capaces de asociarse con muchas plantas y generalmente existen en diversos ambientes. El efecto promotor de crecimiento más importante, es el de proveer los compuestos sintetizados por la bacteria a la planta, y hacer que las plantas absorban ciertos nutrientes más fácilmente promoviendo un crecimiento directo, tal como lo es la fijación de nitrógeno, secreción de algunos reguladores de crecimiento entre otros. Cuando estas bacterias promotoras de crecimiento inhiben o previenen el impacto de algún patógeno a través de uno o varios mecanismos, estas bacterias promueven un crecimiento indirecto en las plantas tales como generar antibióticos, inducción de resistencia sistémica y competir por sitios de colonización en plantas (Liu Y. *et al.* 2010).

Con esto se comprende la existencia de microorganismos en los suelos, y la presencia de ellos en la materia prima como lo es la caña para la industria azucarera. Existen diversos géneros bacterianos presentes en suelo, y ejemplo de esto son especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*, las cuales se encuentran dispersas en el medio ambiente al igual que presentes en los humanos. Ambos géneros son comúnmente reconocidos como patógenos comunitarios y nosocomiales y causantes de infecciones significativas (Bouza y Cercenado. 2002).

Existe el caso de *K. pneumoniae*, se ha determinado la incidencia de esta en fuentes ambientales comunes. En la literatura se menciona que se ha encontrado una asociación de *K. pneumoniae* con plantas de caña de azúcar, jugos y hasta insectos, por lo que en estudios realizados se ha aislado *K. pneumoniae* de verduras y semillas con el fin de comparar las propiedades bioquímicas de las cepas aisladas del medio ambiente y las cepas de *K. pneumoniae* encontradas en humanos (Brown y Seidler. 1973).

Especies de *Klebsiella* se han encontrado también en maíz, algodón y en tallos de papa. En dichos estudios se pudo sugerir que las especies de *Klebsiella* pueden poseer propiedades específicas para penetrar o habitar endofíticamente en varios cultivos (Katsuki A. *et al.* 2002).

Especies de *Klebsiella* son resistentes a penicilinas y pueden adquirir resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Muchas especies aisladas de *Klebsiella* son susceptibles a las fluoroquinolonas, trimetoprim sulgametoxazol, aminoglicocidos y carbapenems (Bouza y Cercenado. 2002).

Klebsiella oxytoca por ejemplo, es un patógeno asociado a problemas de salud adquirido por fuentes ambientales. También relacionada con infecciones adquiridas a nivel de hospitales, casi siempre involucrando pacientes inmunodeprimidos o aquellos que requieren cuidados intensivos (Lowe C. *et al.* 2012).

6. **Desinfectantes.** Tal como se mencionó en el proceso de elaboración industrial de la caña de azúcar, el jugo de caña es sometido a varios procesos que pueden garantizar una reducción en la carga de la microbiota, tal como calor y la dilución del jugo a lo largo de los molinos o tándems. Para el control de la actividad microbiológica en la agroindustria azucarera se puede ejecutar un riguroso ajuste entre la quema, corte tanto mecánico como manual, y la entrega de la caña fresca. Junto con eso se emplean las técnicas de saneamiento con vapor y el uso de biocidas sobre la caña en los tándems (Rodríguez, 2005).

Dado a que no se elimina por completo la microbiota del jugo de caña durante el paso de los molinos, el ingenio utiliza una serie de desinfectantes aplicados en los puntos críticos de contaminación, luego de un análisis rápido de carga microbiana.

Cuadro 2. Compuestos activos de los desinfectantes utilizados.

Desinfectante	Descripción	Características	Compuesto activo
SMB	Bactericida y fungicida	Elimina microorganismos tales como hongos, levaduras, bacterias etc., que causan la inversión de la sucrosa en glucosa, levulosa y otros. Controla el desarrollo de dichos microorganismos especialmente en <i>L. mesenteroides</i> evitando la producción de las llamadas “gomas fermentadoras” que producen jugos de baja calidad con viscosidades altas.	Carbamatos. Inhibición de la biosíntesis de la pared celular.
QUAT 25	Bactericida y fungicida	Posee poder bactericida y facultades tensoactivas, que permiten la eliminación de hongos, levaduras y bacterias que causan la inversión de la sacarosa en glucosa, levulosa y demás azúcares no cristalizables. Utilizado para el control de dichos microorganismos y en especial <i>L. mesenteroides</i> , evitando que se produzcan gomas y fermentaciones que resultan en un jugo de baja calidad y altas viscosidades.	Aminas Cuaternarias y Tensoactivos. El mecanismo de acción consiste en atacar la enzima invertasa.
Busan	Fungicida orgánico	Fungicida utilizado para la desinfección del suelo y semillas	TCMTB (tocianomethyltio benzotiazol) Inhibición de topoisomera “gyrasa B”, encargada de la hidrólisis de ATP como energía para el super enrollamiento del ADN circular.
B-Stab (Beta STAB)		Rompimiento de pared celular e inhibición del transporte de azúcares hacia la célula	Ácido beta de lúpulo
SMB C	No hay suficiente información		
Magnacide	Herbicida	La acroleína funciona como toxico para las células que reacciona con grupos sulfidriilo, incluyendo proteínas, interrumpiendo las rutas de señalización de las células.	Acroleína 95%

(2013, Labsca S.A.), (2008. PMEP), (Montagna C. et al. 2011)

Dado a la resistencia que las bacterias pueden adquirir a lo largo del tiempo, debe existir un proceso de monitoreo constante que permita evaluar la efectividad de los desinfectantes en los microorganismos presentes. Uno de los métodos comúnmente utilizados en un laboratorio de microbiología para determinar la resistencia o susceptibilidad de un microorganismo ante un antibiótico o biocida, es el método de Kirby-Bauer.

El propósito del análisis de Kirby-Bauer o de difusión por disco es determinar la susceptibilidad o resistencia de bacterias aeróbicas y anaerobias facultativas a diversos compuestos antimicrobianos con el fin de seleccionar el adecuado para el tratamiento de un paciente infectado, alguna superficie de trabajo o incluso algún proceso industrial entre otras aplicaciones (Hudzicki, 2010).

Para dicha técnica un disco de papel filtro estéril de aproximadamente 6mm es impregnado en agar Mueller-Hinton (MH), el cual es considerado el más apropiado para la técnica, con una concentración conocida del antimicrobiano. Antes de impregnar los discos en el agar, se debe colocar el inóculo de bacterias que se desea examinar. El antimicrobiano se inicia a difundir en el agar de su alrededor, y su concentración es mayor en las áreas más cercanas al disco y se va dando una reducción logarítmica conforme aumenta la distancia desde el disco. La tasa de difusión del antimicrobiano a través del agar depende de las propiedades de difusión, peso molecular y solubilidad de dicho compuesto en el agar MH. Las moléculas de mayor tamaño se difundirán a un ritmo más lento que las moléculas de menor tamaño. Todos estos factores en combinación le dan al antimicrobiano una zona de intervención de tamaño único, indicando la susceptibilidad al compuesto analizado (Hudzicki, 2010).

El crecimiento de la bacteria ocurre en presencia del compuesto antimicrobiano, cuando la bacteria alcanza una cantidad crítica que puede dominar o contrarrestar los efectos de inhibición. Este crecimiento crítico o excesivo se demuestra con un círculo pronunciado de bacterias alrededor del disco, y es esta concentración del antimicrobiano la que se conoce como concentración crítica (Hudzicki, 2010).

Al preparar el medio MH se debe tomar en cuenta la cantidad de medio vertido en cada caja petri, siendo de 25 ml aproximadamente para placas de 100 mm y 60 ml para cajas de 150 mm, pero en cualquiera de los casos con una profundidad de 4 mm. Las cajas con muy poco agar o poco profundas pueden producir resultados falsos de susceptibilidad, ya que el antimicrobiano se difundirá más de lo debido, aumentando las zonas de inhibición. De igual forma si el medio agregado en las cajas petri sobrepasa los 4 mm pueden obtenerse falsos resultados de resistencia al antimicrobiano. Otro factor a tomar en cuenta al preparar el medio es el pH, ya que este debe estar entre 7.2 y 7.4 para que los antimicrobianos analizados no pierdan o aumenten su actividad (Hudzicki, 2010).

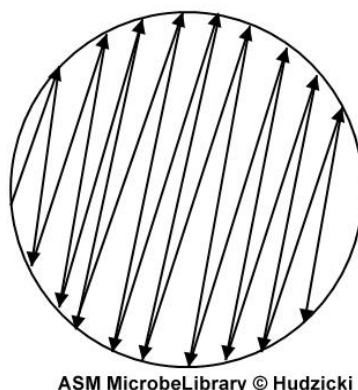
La concentración bacteriana ideal para el ensayo de Kirby-Bauer es utilizar un estándar de McFarland 0.5. Un estándar de McFarland permite realizar una comparación visual de la densidad bacteriana que se desea inocular, y para el caso de un estándar de 0.5 se obtiene el equivalente a una

suspensión bacteriana que contiene entre 1×10^8 y 2×10^8 UFC/ml de *E. coli*. Para preparar el inóculo que se esparcirá por la placa de medio MH se deben tomar entre cuatro y cinco colonias del cultivo de interés, suspenderlas en 2ml de solución salina estéril y agitar hasta homogenizar la suspensión. Una vez realizado se puede comparar con un estándar de McFarland 0.5 e ir ajustando la turbidez de la suspensión con más inóculo hasta obtener la deseada (Hudzicki, 2010).

Los discos impregnados con antimicrobianos no deben ser colocados más cerca de 24 mm, de centro a centro, en el agar. No deben colocarse más de 12 discos en una caja de 150 mm o más de 5 discos en una caja de 100 mm. Debe evitarse colocar los discos muy cerca del borde de la caja ya que puede dificultar la medición del halo (Hudzicki, J. 2010).

Una vez realizado todo el proceso las cajas deben ser incubadas por 18 horas aproximadamente a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Los resultados son analizados según el halo de inhibición que se presente en cada uno de los discos impregnados, tomando una regla para realizar dicha medición (Hudzicki, J. 2010).

Figura 5. Patrón que se debe seguir para colocar el inóculo de bacterias en el agar Mueller- Hinton, para la técnica de Kirby-bauer

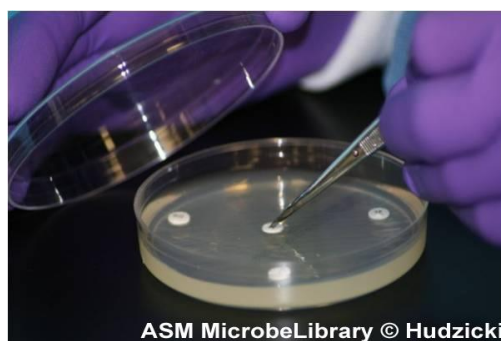


ASM MicrobeLibrary © Hudzicki

(Hudzicki, Jan. 2010)

La inoculación debe realizarse como se muestra, girando 60 grados cada vez que se finalice dicho diseño, de manera que se logre cubrir toda la placa (Hudzicki, 2010).

Figura 6. Inserción de discos con antimicrobianos impregnados



ASM MicrobeLibrary © Hudzicki

(Hudzicki, Jan. 2010)

III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En todo proceso industrial es indispensable detectar los puntos críticos que pueden afectar en algún sentido la productividad. Es necesario encontrar y minimizar los problemas que puedan causar pérdidas o bajos rendimientos en el producto terminado. Todo proceso debe garantizar un producto inocuo y de excelente calidad para el consumidor, y son los factores internos en el proceso de producción los que deben ser monitoreados.

Dado a que en el proceso de producción de azúcar se ha logrado vincular los problemas de disminución tanto del rendimiento del azúcar como de la calidad de esta a distintos factores, se han realizado diversas investigaciones con el fin de llegar a una solución concreta y aplicable. Muchos de los problemas se encuentran asociados a las impurezas presentes en el jugo de caña, las cuales tienen origen en los propios procesos fisiológicos de la caña. La caña consigo lleva microorganismos provenientes de los suelos, los cuales acompañan el proceso en varias de sus etapas. La presencia de microorganismos en el proceso ha sido asociada a diversos problemas, que al unirlos pueden causar pérdidas posiblemente significativas.

Existen sustancias como la dextrana, la cual es causada por la acción de los microorganismos propios de la caña, que provocan en las soluciones de sacarosa una elevación de la viscosidad que contribuye directamente en la disminución del tamaño del cristal de azúcar llevando así a una pequeña pérdida de la capacidad industrial. Diversas sustancias en conjunto van a provocar la aparición de cristales de sacarosa pequeños y alargados conocidos como “cristal de aguja” que pueden escapar a las mieles finales durante el proceso de centrifugación, incrementando aun más las pérdidas de sacarosa (Ramos, 2008)

Otro de los factores relacionados con la presencia de microorganismos incluye el descenso de pH, causado por la producción de diversos ácidos débiles que forman parte del metabolismo de los microorganismos presentes en el jugo. A mayor presencia de ácidos en el jugo se da un aumento en la capacidad buffer y son mayores las cantidades de cal necesarias para la obtención del pH deseado en una de las etapas del proceso.

Los principales subproductos producidos por la acción de microorganismos como *Leuconostoc* y demás microorganismos incluyendo las levaduras, son los ácidos acético, láctico y butírico, manitol y etanol, los cuales contribuyen aún más en el descenso del pH del jugo de caña (Larrahondo, 1995).

Dada la presencia inminente de microorganismos durante el proceso, se han tomado medidas correctivas en cuanto a la concentración de la microbiota presente. Entre las medidas que se han tomado en el proceso de producción de azúcar se incluye el agregado de ciertos antimicrobianos o desinfectantes que contribuyan a la disminución en la carga microbiana. Dado esto se ha tomado como un requisito el uso de estas sustancias por lo que es indispensable conocer un perfil de las bacterias más abundantes presentes en el jugo de caña.

Unidos estos diversos factores, hacen a un determinado género o especie bacteriana, más perjudicial para el proceso azucarero. Dado a las diversas investigaciones realizadas, se ha llegado a conocer a profundidad uno de los microorganismos más perjudiciales para dicho proceso siendo este el género *Leuconostoc*, siendo la protagonista *L. mesenteroides*.

Es el comportamiento de dicha bacteria el que puede ser tomado como referencia, determinando el grado de agresividad del resto del perfil bacteriano del jugo de caña.

Conociendo esto, se pudieron formular las siguientes preguntas de investigación:

¿Es posible aislar e identificar dos de las cepas abundantes en el jugo de caña diferentes de *L. mesenteroides*?

¿Cuáles son las condiciones óptimas de crecimiento de dichas cepas identificadas?

¿Es posible determinar si las cepas abundantes identificadas poseen actividad dextransacarasa?

¿Cuál es la efectividad de seis de los desinfectantes utilizados en los ingenios, ante las cepas identificadas?

¿Cuál es la capacidad buffer y producción de ácidos débiles de las cepas prevalentes aisladas?

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Comparar el grado de severidad de dos de las cepas abundantes en el jugo de caña con *L. mesenteroides*, mediante el uso de técnicas microbiológicas y bioquímicas.

B. Objetivos específicos

1. Comparar los recuentos totales de la microbiota presente en el jugo de caña de la zafra del presente trabajo, con lo encontrado años anteriores.
2. Aislar e identificar dos de las cepas más abundantes en el jugo de caña mediante técnicas microbiológicas y pruebas bioquímicas.
3. Determinar la actividad enzimática de la dextranasa de dos de las cepas abundantes en el jugo de caña, mediante ensayos enzimáticos.
4. Determinar el efecto inhibitorio de los desinfectantes utilizados por los ingenios en Guatemala sobre las cepas estudiadas, utilizando el método de difusión por disco.
5. Determinar la capacidad buffer y producción de ácidos débiles de las cepas aisladas del jugo de caña.

V. JUSTIFICACIÓN

Un estudio previo (Balsells D. y de la Peña B., 2009) se dedicó a encontrar el microorganismo de mayor importancia en la degradación de sacarosa (*Leuconostoc mesenteroides*), muestreando distintos puntos en el proceso de elaboración del azúcar. Una vez que establecieron que *L. mesenteroides* era el microorganismo más abundante se elaboró un medio hecho a base de miel primera, el cual es un intermediario del proceso, resultando ser el medio de cultivo óptimo y costo efectivo para el crecimiento de dicha bacteria. En el estudio anterior (Avelar, 2011) se realizaron las primeras pruebas para establecer la metodología de evaluación de cepas de *L. mesenteroides*, haciéndose necesario trabajar con otras especies presentes en los jugos y observar su comportamiento.

Durante los últimos años se ha desarrollado un sistema de monitoreo y control microbiológico basado en un test de resultados rápidos que estiman la actividad de toda o la mayoría de la microbiota presente en el jugo de caña, junto con pruebas de sensibilidad a diferentes concentraciones de los desinfectantes en uso. Sin embargo este sistema no ha incluido el estudio cualitativo de la microbiota ni el grado de severidad de cepas particulares presentes ya activas, por lo que es necesario diseñar metodologías para ello con el fin de optimizar y complementar el sistema ya implementado.

Por ello, en el presente trabajo se llegó a la identificación más cercana posible de dos cepas distintas de *L. mesenteroides* abundantes en el jugo de caña, determinando su actividad enzimática, capacidad buffer y la evaluación de la efectividad de los bactericidas utilizados para su eliminación y control. Al determinar la actividad enzimática de la dextransacarasa se pudo comparar dicha actividad con *L. mesenteroides* obteniendo una idea general del efecto que tienen estas cepas en la producción de azúcar. Con la determinación de la efectividad de los bactericidas se desea establecer la dosis óptima que debe utilizarse para la eliminación o control de estas cepas de bacterias consideradas como las más abundantes, pensando en un ahorro de los recursos utilizados para el control microbiano, y para un control que resulte efectivo. Con estos datos se pretende tener las bases necesarias para hacer cualquier toma de decisiones en cuanto al control de los microorganismos presentes en el jugo de caña.

Los resultados obtenidos de la investigación serán proporcionados al ingenio de forma que obtengan un perfil de las bacterias más abundantes presentes en el jugo, y principalmente para que con los datos de la resistencia a los bactericidas puedan hacer un uso más acertado de estos a la hora de aplicarlos en el proceso.

VI. VIABILIDAD

A. Recursos humanos

La recolección de las muestras se llevó a cabo por el Licenciado Osbel Núñez (Catedrático del curso de microbiología del departamento de Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala), quien es la principal fuente de apoyo y asesor del proyecto. El resto de la investigación se llevó a cabo por mi persona.

B. Recursos materiales y financieros

Los aspectos administrativos fueron llevados a cabo por estudiantes de Ingeniería Industrial que participaron en el proyecto global. Los fondos del proyecto los proporcionó el Ingenio Pantaleón en conjunto con la Universidad del Valle de Guatemala, obteniendo la colaboración de los departamentos de: Bioquímica y Microbiología, Ingeniería Química e Ingeniería Industrial. Los fondos fueron utilizados para la adquisición de materiales y reactivos, y con respecto a las visitas realizadas al ingenio estas fueron financiadas por cada estudiante y el mismo asesor. El resto de recursos utilizados como equipo e instalaciones, fueron provistos por La Universidad del Valle de Guatemala, en los laboratorios de Bioquímica y Microbiología.

VII. MÉTODO

A. Diseño de investigación

1. Aislamiento e identificación de al menos una cepa bacteriana prevalente en el jugo de caña. Esta parte del estudio es un tipo de trabajo de laboratorio, no experimental, con un enfoque cuantitativo. Se clasifica de esta forma debido a que no se utilizarán controles de ningún tipo y no se manipularán variables ya que se trabajará con lo encontrado en el jugo de caña, aislando las colonias presentes en distintos medios.

2. Ensayo enzimático para determinación de la actividad enzimática de la(s) cepa(s) bacterianas aisladas. Esta fase es un estudio descriptivo, con diseño experimental y enfoque cuantitativo. Es un experimento debido a que hay un alto control de variables, se cuenta con controles negativos y se puede realizar una comparación entre distintas cepas de bacterias.

3. Determinación de la capacidad buffer y producción de ácidos débiles. Esta fase es un estudio descriptivo, con diseño experimental y enfoque cuantitativo. Es un experimento dado a que hay un control de variables, se cuenta con controles negativos y se puede realizar una comparación entre distintas cepas de bacterias.

4. Estudio efectividad de los bactericidas utilizados en el ingenio para la o las cepas bacterianas aisladas. Esta fase es un estudio de tipo descriptivo, con un diseño experimental y enfoque cuantitativo. Es de tipo experimental verdadero ya que al igual que en la segunda fase, se tiene un alto grado de control de variables, y el uso de un control positivo como desinfectante de referencia. Es cuantitativo dado a que los resultados obtenidos estarán basados en las distintas concentraciones de cada uno de los bactericidas.

B. Población

La población de estudio incluye dos de las cepas bacterianas aisladas más abundantes en el jugo primario y diluido de caña obtenido de los tándems del Ingenio Pantaleón, Escuintla. Las muestras fueron recolectadas en los tándems dado a estudios previos que establecían mayor carga bacteriana en estos puntos que en el resto de puntos.

C. Muestra

La recolección de muestras se realizó en marzo del año 2012 de modo que se tomaron aun en período de zafra. Las muestras tomadas pertenecían al jugo primario y diluido que recorre los molinos o tándems del proceso. La muestra del jugo primario es el jugo obtenido al principio del proceso, es jugo que no ha sido mezclado en ningún punto en el proceso, no así el jugo diluido el cual es el resultante de la mezcla de los jugos provenientes de todos los molinos del proceso. Esto nos permite verificar la microbiota presente en estos dos puntos. La fecha y hora de la recolección se eligió por conveniencia dentro del período de tiempo disponible de parte del asesor del proyecto, para las visitas al ingenio. Por consiguiente fecha y hora no se tomaron como variables.

Para todas las fases del proyecto se utilizaron las cepas bacterianas prevalentes encontradas en el jugo de caña.

D. Procedimiento

1. Inoculación y traslado de muestras. Para el traslado de las muestras se prepararon cajas petri con el medio MP200 optimizado en proyecto Balsells *et. al* 2009, y PCA (Agar PlateCount) en las instalaciones de la Universidad del Valle. Para evitar la contaminación de los medios, estos fueron sellados con Parafilm® y trasladados en una hielera con “ice packs” al Ingenio Pantaleón. Las muestras recolectadas pertenecían al jugo de caña primario y diluido, depositado en botes de plástico estériles con tapadera, con su respectiva rotulación. Luego fueron trasladados al laboratorio de caña del Ingenio Pantaleón, donde se prepararon las respectivas diluciones (10^{-1} - 10^{-5}) en agua peptonada estéril y ahí mismo se realizaron las inoculaciones en los medios mencionados. La siembra de la microbiota total se realizó mediante la técnica de placa vertida en los dos medios. Se conservaron los medios inoculados, sellados con Parafilm® en una caja plástica para el posterior traslado al laboratorio de microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala. Ya en la Universidad se procedió a incubar las muestras a 37°C durante 24 horas.

2. Recuento de la microbiota total, aislamiento e identificación de las cepas prevalentes encontradas en el jugo de caña. Este proceso involucró un recuento de la microbiota total, mediante la observación de la morfología de las colonias y la abundancia de estas. Como primer paso se realizó un recuento de las colonias de *Leuconostoc* encontradas en el medio MP200 inoculado. Luego mediante observación se tomaron todas las colonias identificadas como distintas, enumerando cada una de estas (esto para el caso del agar plate count). Se aislaron en agar nutritivo y posteriormente se realizaron las tinciones de Gram para tener un amplio panorama de la microbiota total encontrada en el jugo. De igual forma se verificó el crecimiento de las muestras

aisladas en agar sangre de manera que se observó presencia/ ausencia y tipo de hemolisis, morfología y coloración de las colonias.

Una vez aisladas adecuadamente, se realizó un cepario de esta microbiota encontrada en el jugo de caña como referencia para futuros estudios.

Con el fin de realizar un experimento válido se tomaron las distintas colonias bacterianas aisladas en agar nutritivo y se inocularon en agar MP200 (medio sólido optimizado para *L. mesenteroides*) de modo que ayudara a la selección de la cepa o cepas bacterianas a utilizar en el resto del experimento. Con esta verificación de crecimiento en el medio MP200 se logró separar del resto, las bacterias con capacidad de crecimiento a elevadas concentraciones de azúcar y por consiguiente comparables con *L. mesenteroides*. Una vez establecidas las colonias capaces de desarrollarse en dicho medio y eligiendo el grupo más abundante según las tinciones de Gram realizadas y morfología, se tomaron dos muestras aisladas y se procedió a identificarlas mediante secuenciación (este procedimiento fue realizado en el laboratorio externo Biolab S.A.).

Para las diversas fases de la investigación se utilizó siempre un cultivo puro previamente aislado en agar nutritivo. Se tomó una colonia aislada y se realizó un sembrado para aislar de forma que se lograra apreciar la morfología de las colonias individuales. Se dejaron incubando a 37°C durante 24 horas.

3. Optimización de tiempo y temperatura de cultivo. Para dicho procedimiento se preparó el medio de cultivo líquido optimizado MP25.

a. Determinación de la longitud de onda máxima. Como primer procedimiento se realizó un inóculo de las bacterias seleccionadas, utilizando un estándar de McFarland 0.5, en medio MP25. Se realizaron diluciones 1:100 (muestra: agua destilada) y se hicieron mediciones espectrofotométricas a una longitud de onda entre 190-230. Realizadas todas las corridas se eligió la longitud de onda donde los valores de absorbancia resultaron mayores, siendo esto a 230nm.

b. Curvas de crecimiento para determinar condiciones óptimas de crecimiento. De igual forma que para el procedimiento anterior, se preparó el medio de cultivo MP25, en el cual se realizó un inóculo de las bacterias con una concentración equivalente a un estándar de McFarland 0.5. Se realizaron lecturas de absorbancia a los distintos tiempos de incubación (1h, 2h, 3h, 4h y 5h) a tres distintas temperaturas (28°C, 32°C y 37°C). Esto se realizó hasta que el cambio entre las absorbancias fuera mínimo. Se utilizaron los resultados de las absorbancias, las temperaturas y tiempos de incubación para graficar el comportamiento resultante por las bacterias analizadas. Con dichas curvas de crecimiento se logró determinar en qué condiciones se obtuvieron los mejores comportamientos y fases logarítmicas, estableciendo las condiciones óptimas de crecimiento. Para el

caso de *K. oxytoca* se tomó como ideal la temperatura de 37°C y 3.5 horas de incubación. Para el caso de *Klebsiella spp.* se tomó como ideal la temperatura de 37°C y 3 horas de incubación.

4. Determinación de la actividad de dextransacarasa.

Para este ensayo se utilizó el método DNS (3,5- dinitrosalicílico) el cual es uno de los métodos colorimétricos utilizados para estimación de azúcares reductores. El método presenta un cambio de coloración al encontrar azúcares reductores, como lo es la fructosa, en la reacción. Dado a que la fructosa es producto de la reacción de producción de dextrana y del catabolismo de la sacarosa, resulta un método adecuado de medición de actividad enzimática. Utilizando un cultivo fresco se realizó un inóculo de las bacterias a un estándar de McFarland 0.5 en medio MP25. Se incubó a la temperatura y tiempo establecido como óptimo en el procedimiento anterior. Se tomó 1 mL del cultivo y se añadió a una solución de sacarosa 1%. Se tomó 1mL de dicha mezcla y se transfirió a un tubo eppendorf de 2.5mL. Se centrifugó a 6,000 g a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se transfirieron 0.8mL de la fase acuosa a un tubo de ensayo junto con 0.8mL del reactivo DNS. Se calentó entre 5 y 15 minutos a 90°C hasta obtener un cambio de coloración de amarillo a café ladrillo. Se añadieron 266µL de la solución de tartrato de sodio y potasio (40%) para estabilizar la coloración obtenida, y se procedió a realizar las lecturas espectrofotométricas a 575nm.

Este mismo procedimiento se realizó cada dos horas de incubación durante 6 horas. Este procedimiento se trabajó en triplicado.

5. Determinación de la producción de ácidos débiles.

Para dicho procedimiento se utilizó un cultivo fresco de las bacterias, realizando una suspensión a un McFarland 0.5 en medio MP25. Este procedimiento se realizó mediante la medición del pH inicial y final, luego del tiempo y temperatura establecidos como óptimos para cada bacteria aislada. Se trabajó en triplicado.

6. Determinación de la capacidad buffer.

De igual forma que para el procedimiento anterior, para este caso también se utilizó una suspensión bacteriana equivalente a un estándar de McFarland 0.5. Se incubaron las muestras a su temperatura y tiempo de incubación óptimos y se midió el pH en ese momento. Utilizando NaOH 0.139N (previamente valorado), se llevó el pH de la muestra una unidad mayor al tomado anteriormente. Se anotaron los mL de NaOH utilizados para llegar a dicho pH y mediante estequiometria, se determinaron los moles necesarios para cambiar el pH en una unidad (Avelar, 2011), dato que se tomó como capacidad buffer. Se trabajó en triplicado.

7. Evaluación de efectividad de bactericidas.

Esta fase se realizó mediante el método de difusión por disco o Kirby Bauer, comparando con un control (formaldehído 1:10) positivo para susceptibilidad. Se analizaron los seis distintos bactericidas, a cinco diferentes concentraciones en triplicado cada una de ellas: puro (100%), y las diluciones de 10^{-1} - 10^{-4} .

El ensayo se realizó utilizando un cultivo fresco de las bacterias, en medio MP200. Se sembró la muestra de manera que se formara una capa uniforme en toda la placa, utilizando un esparcidor de vidrio. Se esperó a que las placas se secaran completamente antes de colocar los discos. Se dividieron las cajas petri en seis segmentos de igual tamaño y con pinzas estériles se procedió a colocar los discos impregnados previamente con las distintas diluciones de los desinfectantes. Se dejó incubando a 37°C durante 24 horas. Este procedimiento al igual que los anteriores, fue realizado en triplicado.

E. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó Microsoft Excel 2007 para la realización de diversas gráficas, el programa estadístico “R” para Windows versión 2.15.2 en el que se realizaron las gráficas correspondientes a las bacterias con respecto a cada desinfectante y finalmente el programa SPSS versión 17.0 para los análisis estadísticos Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis, ANOVA, y el análisis de comparación de Tukey.

Para la fase de recuento de microbiota total del jugo de caña no se realizó estadística alguna dado a que no se contó con las réplicas necesarias.

Tanto para la fase de determinación de cambio o caída de pH por producción de ácidos como para la evaluación de los desinfectantes, se realizó la prueba estadística de normalidad ShapiroWilk tomando los datos como un conjunto para cada una de las fases. Se observó que el comportamiento de los datos al ser tomados en conjunto daba resultados no normales, por lo que se prefirió tomar los datos por separado. Para el caso de la caída de pH, se tomaron por separado los cambios de pH según bacteria analizada, de igual forma para la evaluación de los desinfectantes se tomaron los datos de cada bacteria con cada desinfectante. De esta forma se encontraron comportamientos normales para algunas de las muestras y no normales para otras tal como se puede observar en los anexos.

La fase de determinación de producción de ácidos débiles, dio un resultado normal para cada muestra analizada, el cual fue seguido por un análisis de homogeneidad de varianzas que definió el análisis ANOVA en un nivel de confianza al 95% que se realizó para establecer las diferencias significativas entre muestras.

Para la evaluación de los desinfectantes se obtuvieron resultados tanto normales como no normales. Con los datos normales se utilizó de igual forma un análisis de homogeneidad de varianzas, seguido por una prueba de ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Para el caso de los datos no normales se utilizó la prueba estadística no paramétrica, Kruskal-Wallis con la que se definió las diferencias significativas entre muestras. Dado a que dos de los desinfectantes utilizados no mostraron efecto alguno, se decidió trabajar únicamente con los cuatro restantes SMB, Busan, Magnacide y SMB C. La misma decisión se tomó, al no incluir la dilución de los desinfectantes de 10^{-4} ya que no hubo efecto alguno, de modo que los resultados obtenidos nos brindaran información de las diferencias significativas de utilizar las diluciones restantes.

VIII. RESULTADOS

A. Recuento de *Leuconostoc spp.* y microbiota total del jugo diluido y primario del jugo de caña, de marzo del 2012

Cuadro 3. Recuento de la microbiota total y de *Leuconostoc* presente en muestras de jugo de caña primario y diluido

Muestra	Microbiota total (UFC/mL)	<i>Leuconostoc spp.</i> (UFC/mL)
Jugo diluido	4.3×10^6	3.5×10^5
Jugo primario	6.7×10^6	8.3×10^5

Tal como se observa en el cuadro, la microbiota total fue más abundante que el recuento de *Leuconostoc spp.* tanto para el jugo diluido como para el jugo primario. En el estudio Avelar, 2009 se observó el mismo comportamiento en cuanto a la concentración de microbiota total y *Leuconostoc spp.* encontrado, tanto para jugo diluido como jugo primario. No fue ese el caso de los resultados obtenidos en el proyecto Balsells *et al.* 2009, en el que ambos recuentos, microbiota total y *Leuconostoc spp.* resultaron relativamente iguales.

Cuadro 4. Clasificación de las colonias aisladas del jugo de caña primario y diluido según tinciones de Gram y morfología.

Tinción de Gram	Jugo primario (% presente)	Jugo diluido (% presente)
Bacilos gram +	37.5%	--
Bacilos gram -	25%	44.4%
Cocos gram -	--	22.2%
Cocobacilos gram -	--	11.1%
Cocos gram+	--	11.1%
Cocobacilos gram +	25%	11.1%
Estafilococos gram +	12.5%	--

En el cuadro se pueden observar los porcentajes obtenidos de cada tinción realizada y el resultado de esta según el tipo de jugo.

Cuadro 5. Clasificación de las colonias aisladas de la microbiota total del jugo de caña según tinciones de Gram y morfología, y el porcentaje de cada grupo.

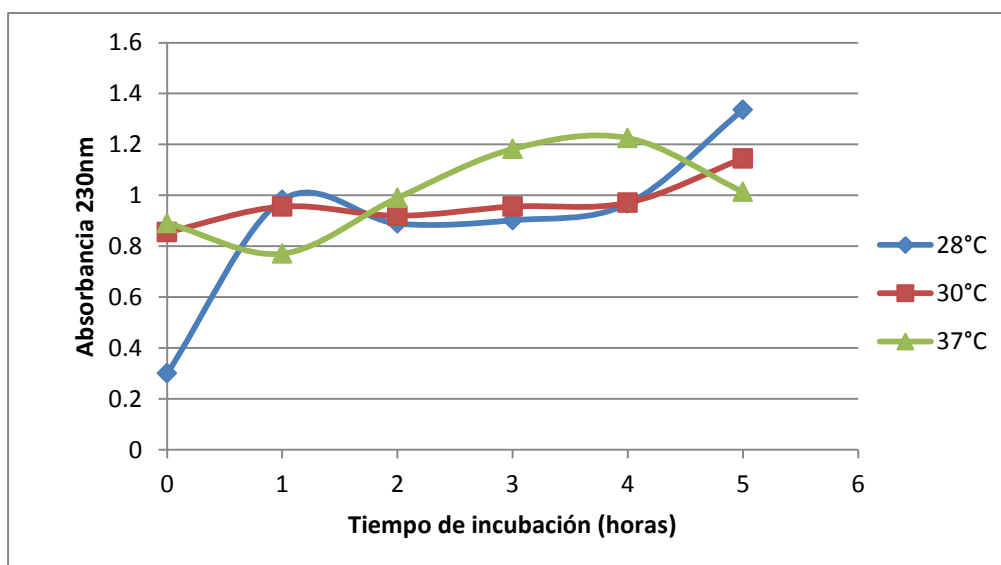
Tinción de Gram	Microbiota total (% presente en el jugo de caña)
Bacilos gram +	17.64%
Bacilos gram -	35.29%
Cocos gram -	11.76%
Cocobacilos gram -	5.88%
Cocos gram+	5.88%
Cocobacilos gram +	17.64%
Estafilococos gram +	5.88%

En el cuadro anterior se muestran los porcentajes de la clasificación realizada según morfología y tinción de Gram de la microbiota total del jugo de caña. Tal como se puede observar el grupo más abundante resulto ser el de bacilos gram negativo.

B. Curva de crecimiento de *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella spp.*

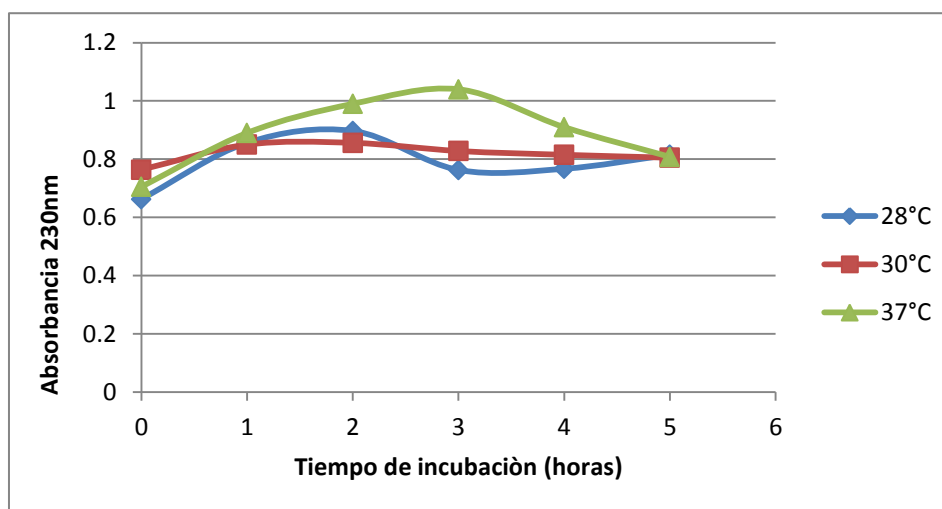
En la siguiente figura se muestra la curva de crecimiento de *K. oxytoca*, realizada con el fin de determinar la temperatura y tiempo de incubación óptimos para su crecimiento. Se tomó la temperatura de 37°C y 3.5 horas de incubación como condiciones óptimas, ya que tal como se observa en la gráfica fue la curva que presentó el mejor comportamiento y una clara fase logarítmica.

Figura 7. Curva de crecimiento de *K. oxytoca*, realizada a una longitud de onda de 230nm en medio MP25



A continuación se muestra la curva de crecimiento de *Klebsiella spp.* realizada, en la cual se tomó la temperatura de 37°C y 3 horas de incubación como condiciones óptimas. Tal como se observa en la gráfica, ninguna de las curvas muestra una fase logarítmica clara y en la curva tomada como ideal, la fase logarítmica se encuentra un poco antes de cumplir las tres horas de incubación. Para dar un resultado más conciso o exacto se tomará como ideal 3 horas de incubación. Dichas condiciones fueron elegidas como óptimas ya que al igual que para el caso anterior, fue la curva que presentó el mejor comportamiento.

Figura 8. Curva de crecimiento de *Klebsiella spp.*, realizada a una longitud de onda de 230nm en medio MP25



C. Determinación de la producción de ácidos débiles de *Klebsiella oxytoca*, y *Klebsiella spp.* mediante caída de pH y capacidad buffer.

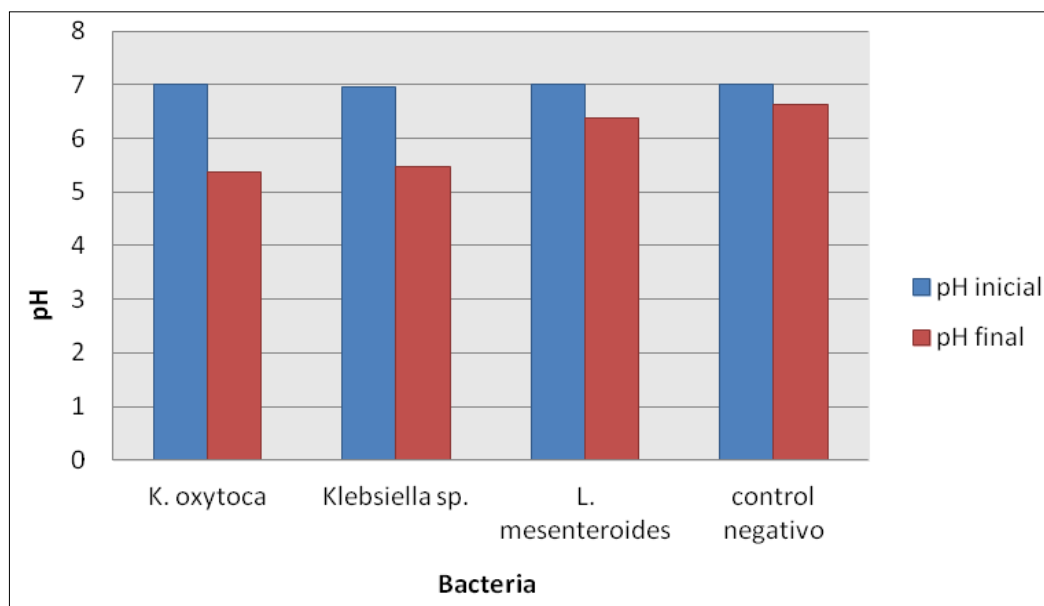
En el siguiente cuadro se muestra el promedio del pH inicial y final de *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.*, utilizando como referencia y control positivo a *L. mesenteroides* y como control negativo el medio sin inóculo. Estos datos fueron tomados antes y después del tiempo de incubación óptimo para cada caso, utilizando el medio de cultivo MP25. Para el caso de *L. mesenteroides* se utilizó el dato establecido en Avelar, 2011 (3 horas a 28°C).

Cuadro 6. Cambio de pH luego del tiempo y temperatura de incubación determinados como óptimos para cada caso, en medio de cultivo MP25

Muestra	pH inicial	pH final
<i>K. oxytoca</i>	7	5.36
<i>Klebsiella spp.</i>	6.97	5.48
<i>L. mesenteroides</i>	7	6.37
Control negativo	7	6.64

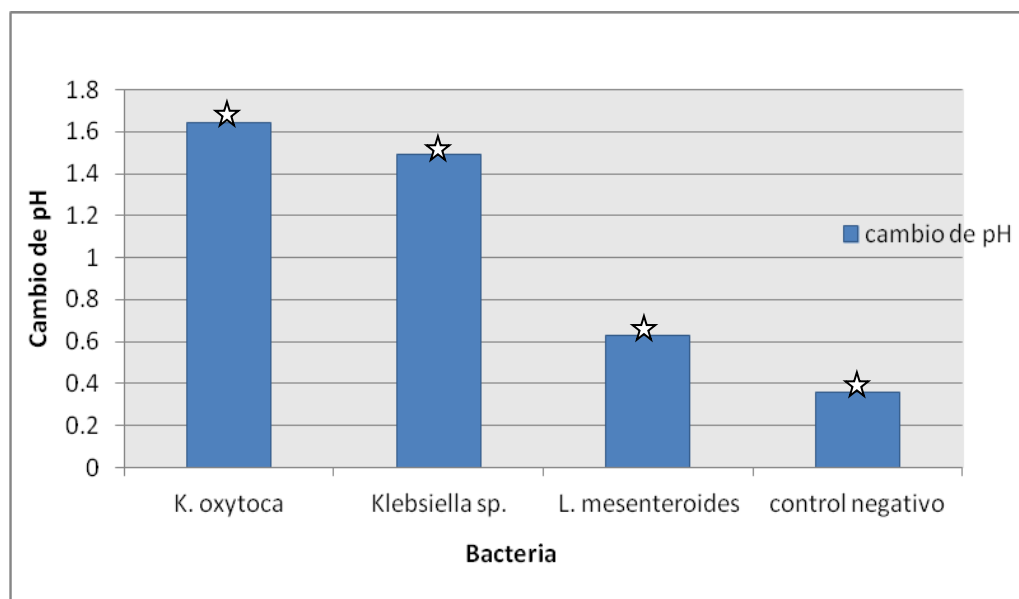
En la siguiente figura se muestra la diferencia entre los datos obtenidos de pH inicial y pH final (luego de un proceso de incubación, según tiempo y temperatura óptimos). Tal como se puede observar si hubo una disminución evidente en el pH luego de incubadas las muestras. Debe tomarse en cuenta que el control negativo dio un leve cambio en el pH final, lo cual puede alterar el resultado real de producción de ácidos para las otras muestras.

Figura 9. Cambios de pH dados por la producción de ácidos débiles luego de un tiempo de incubación, para *K. oxytoca*, *Klebsiella spp.* y *L. mesenteroides* como control positivo, en medio de cultivo MP25.



Para determinar o comparar los cambios de pH obtenidos para cada uno de los casos, se utilizó como análisis estadístico un ANOVA a un nivel de confianza del 95%. Dicho análisis mostró que existe diferencia significativa entre los promedios de los cambios de pH de cada una de las muestras analizadas. Se realizó una prueba de comparaciones utilizando una prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%, comparando de igual forma los promedios de cambios de pH. Tal como se puede observar en el cuadro 6 de anexos, se determinó que los cambios de pH de *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* fueron los más parecidos produciendo cambios más grandes de pH, difiriendo de *L. mesenteroides* quien presento cambios más pequeños.

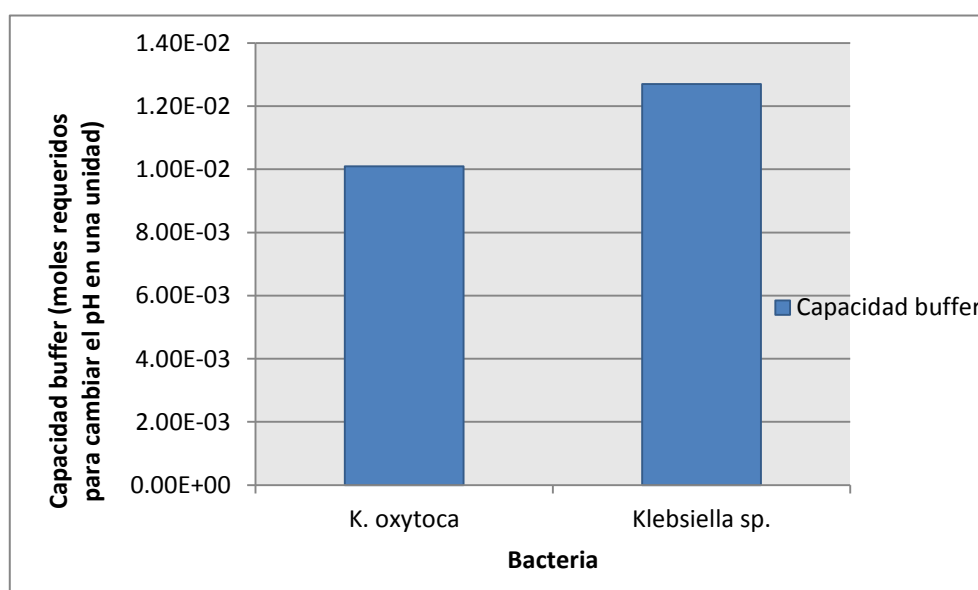
Figura 10. Comparación de los valores del cambio de pH de las muestras analizadas, utilizando un análisis estadístico ANOVA a un nivel de confianza del 95%..



☆ Diferencia significativa entre el promedio de diferencias de pH. Valor p de 3.92×10^{-7} obtenido en análisis ANOVA.

En la siguiente figura se muestra la diferencia entre la capacidad buffer encontrada para las dos cepas trabajadas. Tal como se puede observar, es mayor la capacidad buffer de *Klebsiella spp.* que *K. oxytoca*. Dado que se toma la capacidad buffer como el número de moles necesarios para cambiar el pH en una unidad, se tiene que *Klebsiella spp.* requiere más adición de base para llegar a un pH deseado. En el estudio realizado en el 2009 se determinó la capacidad buffer para 5 cepas de *Leuconostoc spp.*, dando valores en el orden de 10^{-3} , siendo valores menores a los obtenidos para *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella spp.*

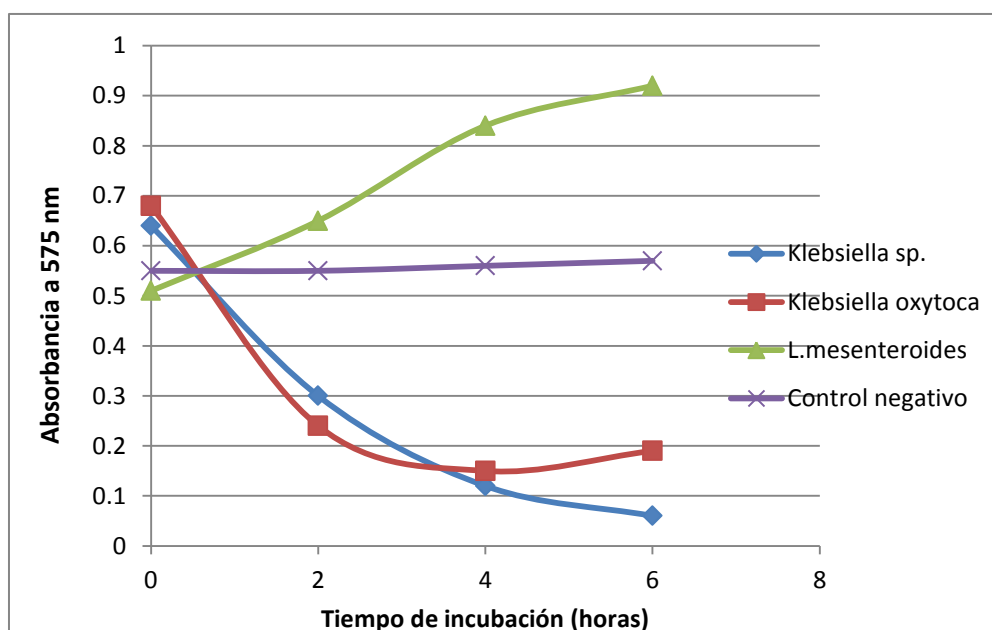
Figura 11. Capacidad buffer obtenida para *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella spp.*



D. Determinación de la actividad enzimática de *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella spp.*

A continuación se muestra la gráfica de las curvas de actividad enzimática de *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella spp.* determinadas mediante el método colorimétrico DNS (dinitrosalicílico). Se puede observar una tendencia descendente por parte de *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella spp.*, no así el comportamiento de *L. mesenteroides* la cual presento una tendencia ascendente. Dado a que para este caso se quería encontrar la actividad enzimática de la enzima dextranasa en las cepas aisladas, se puede observar que *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* no poseen tal actividad, o lo hace en valores muy pequeños para ser detectados con el método utilizado. En el estudio Avelar, 2011 se estableció que la actividad enzimática puede expresarse en términos del cambio de absorbancia por minuto (tiempo de incubación) y volumen del cultivo de la muestra analizada (mL). Para este caso no fue posible obtener dichos datos.

Figura 12. Curvas de actividad enzimática de la dextranasa en *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella spp.* y *L. mesenteroides* mediante el método colorimétrico DNS

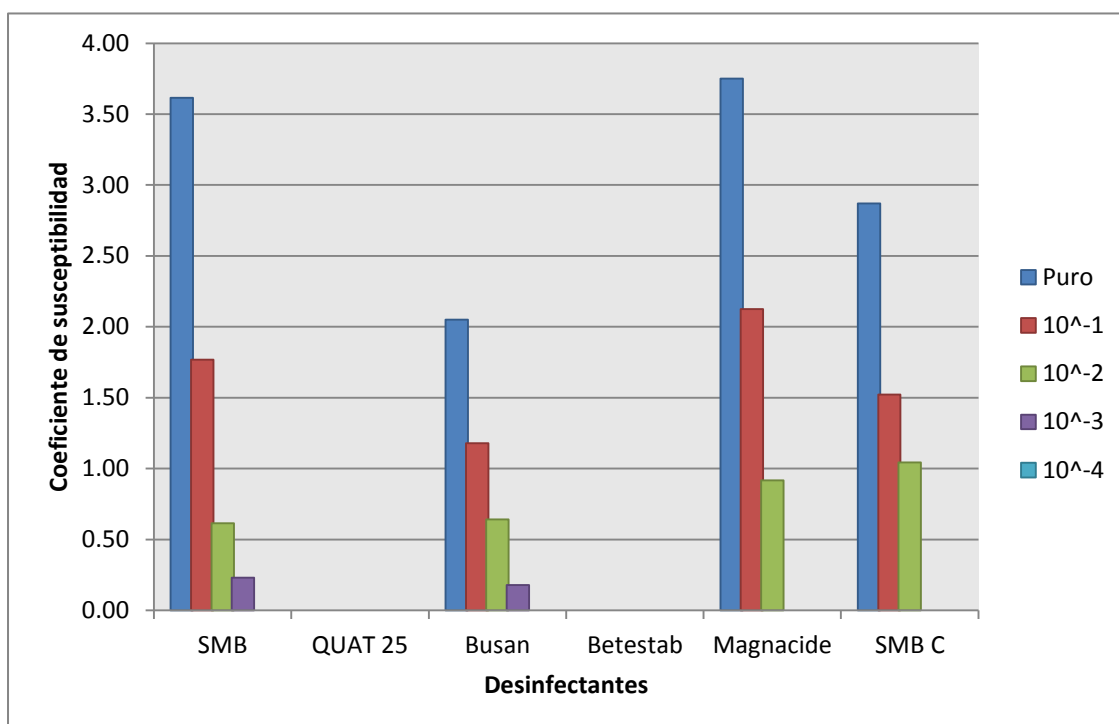


E. Evaluación de seis desinfectantes utilizados en el Ingenio Pantaleón, ante *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.*

En la siguiente figura se muestran los 6 desinfectantes evaluados, dando su coeficiente de susceptibilidad según dilución. Tal como se puede observar en la figura 12 y 14, dos de los

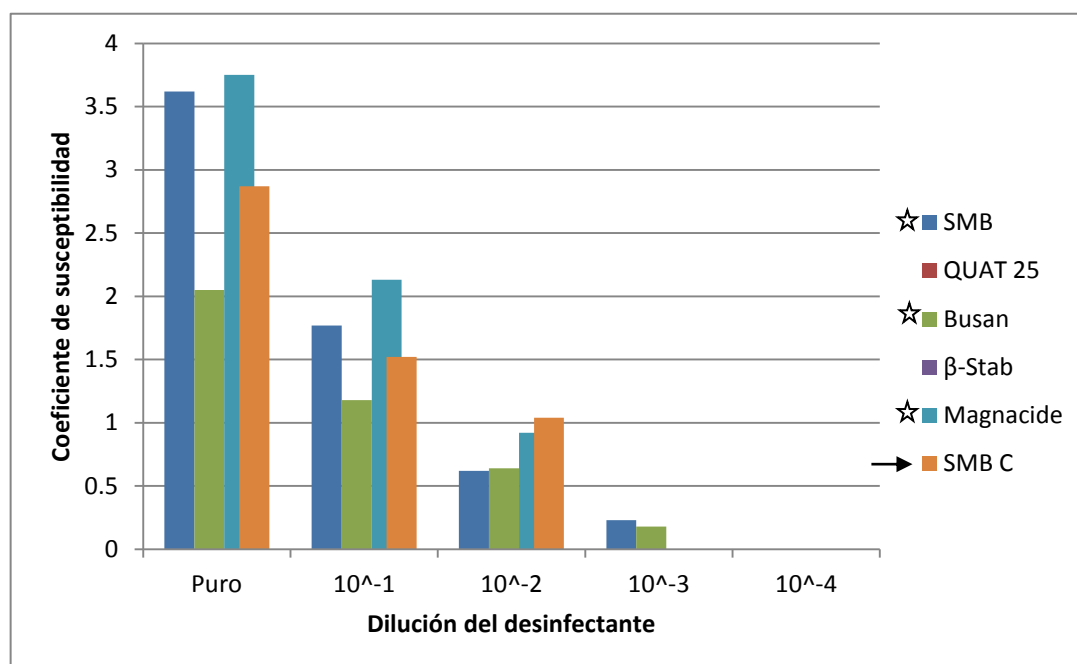
desinfectantes, QUAT25 y β -Stab, no tuvieron efecto alguno en las muestras analizadas. Con fines prácticos de análisis fueron eliminados dichos desinfectantes al realizar las pruebas estadísticas posteriores, al igual que la dilución de los desinfectantes 10^{-4} . Dado a que las pruebas de normalidad realizadas, mediante la prueba estadística de Shapiro-Wilk, dieron resultados no normales se tomó la decisión de evaluar los datos por separado, cada una de las bacterias con cada desinfectante resultando tanto pruebas paramétricas como no paramétricas para los distintos casos.

Figura 13. Evaluación de los seis desinfectantes con sus respectivos coeficientes de susceptibilidad según dilución, para *K. oxytoca*



Para el caso de la evaluación de los desinfectantes ante *K. oxytoca* (ver figura 13), se obtuvo datos normales para el desinfectante Busan y SMB C, estableciendo las diferencias significativas mediante el estadístico ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Dicho análisis mostró que existen diferencias significativas entre las tres diluciones evaluadas (10^{-1} a 10^{-3}) para el desinfectante Busan. Para el caso del SMB C, se demostró que no existen diferencias significativas entre las diluciones realizadas. Mediante la prueba de Kruskal Wallis en un nivel de confianza del 95%, se estableció que para los desinfectantes SMB y Magnacide si existe diferencia significativa entre los efectos obtenidos con las diluciones evaluadas.

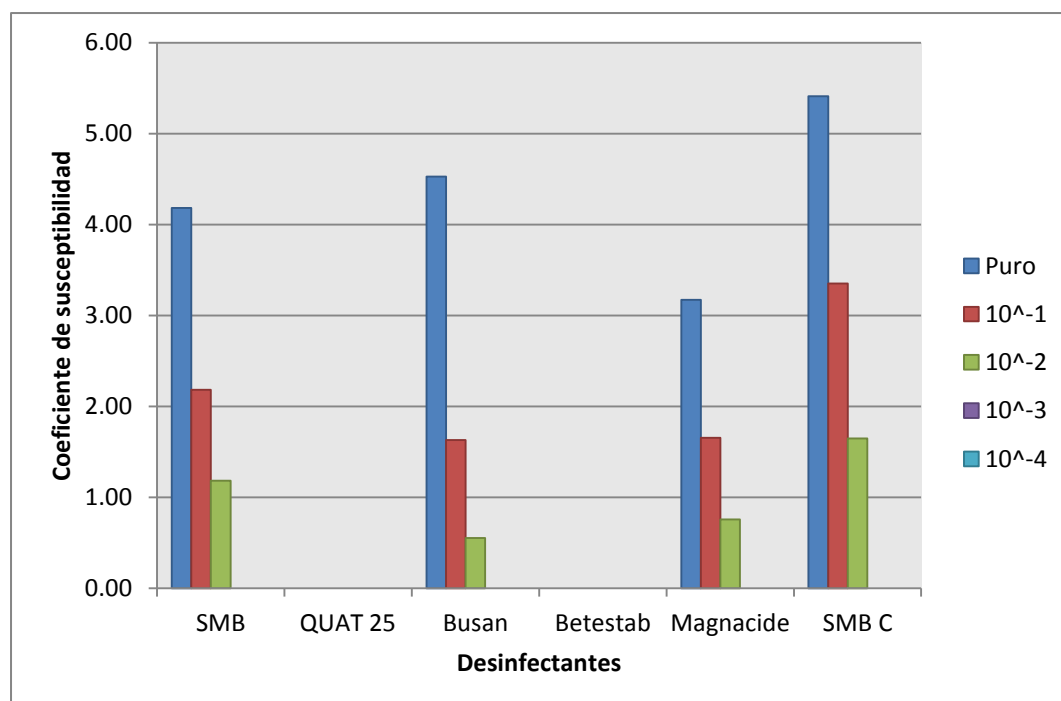
Figura 14. Evaluación de los seis desinfectantes con sus respectivos coeficientes de susceptibilidad según dilución, para *K. oxytoca*. Mediante el análisis estadístico ANOVA y Kruskal Wallis con un nivel de confianza del 95% se determinó la significancia en las diferencias de datos.



- ☆ Existe diferencia significativa entre diluciones para cada desinfectante en particular
- No existe diferencia significativa entre las diluciones

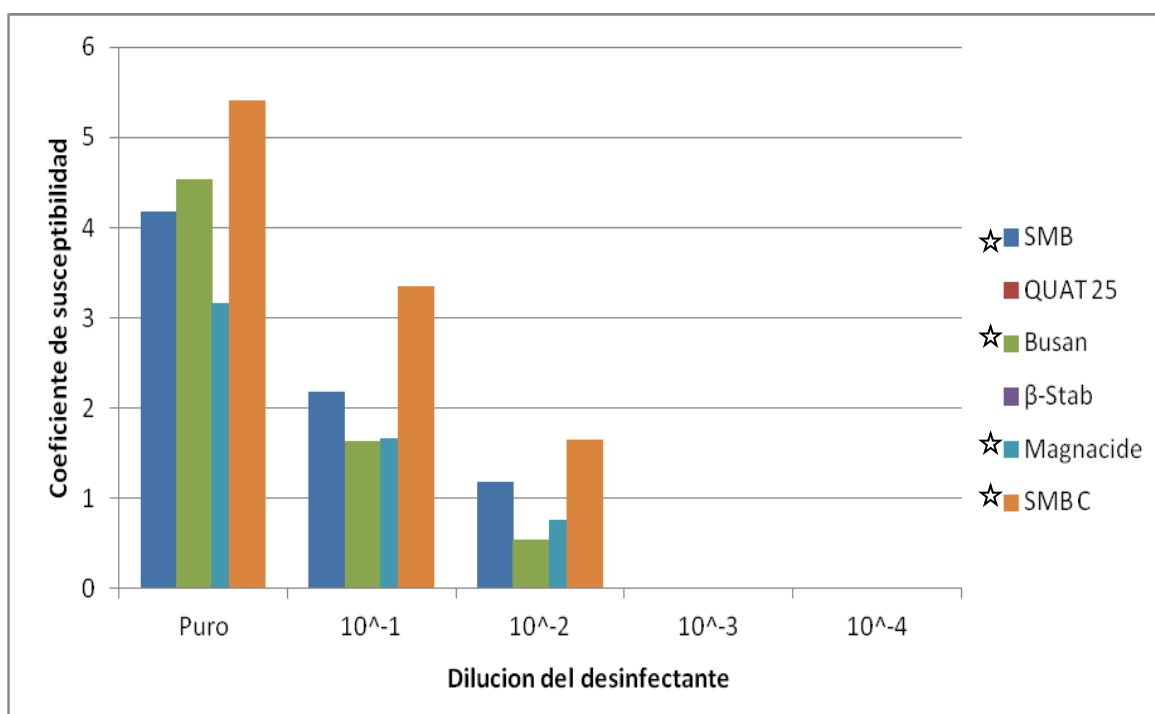
En la siguiente figura se muestran los 6 desinfectantes evaluados, dando su coeficiente de susceptibilidad según dilución. Tal como se mencionó anteriormente, para el caso de *Klebsiella spp.* tampoco se obtuvo efecto alguno para los desinfectantes QUAT25 y β-Stab, incluyendo la dilución 10⁻⁴.

Figura 15. Evaluación de los seis desinfectantes con sus respectivos coeficientes de susceptibilidad según dilución, para *Klebsiella spp.*



Para el caso de la evaluación de los desinfectantes ante *Klebsiella spp.*, se obtuvo datos normales para el desinfectante SMB C, estableciendo las diferencias significativas mediante el estadístico ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Dicho análisis mostró que existe diferencia significativa entre las tres diluciones evaluadas (10^{-1} a 10^{-3}) para dicho desinfectante. Mediante la prueba de Kruskal Wallis en un nivel de confianza del 95%, se estableció que de igual forma para los desinfectantes SMB, Busan y Magnacide existe diferencia significativa entre las diluciones realizadas.

Figura 16. Evaluación de los seis desinfectantes con sus respectivos coeficientes de susceptibilidad según dilución, para *Klebsiella spp.* Mediante el análisis estadístico ANOVA y Kruskal Wallis con un nivel de confianza del 95% se determinó la significancia en las diferencias de datos.



★Existe diferencia significativa entre diluciones para cada desinfectante en particular

A continuación se muestra de manera gráfica las interacciones entre *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* ante cada desinfectante de forma individual con sus respectivas diluciones. Dichas gráficas muestran la media de los datos y el intervalo de confianza. Para casi todos los casos se puede observar una tendencia similar, en una disminución del coeficiente de susceptibilidad conforme se diluye el desinfectante. Puede observarse una separación evidente entre los datos, demostrando de forma gráfica que si existe diferencia significativa entre los coeficientes resultantes según dilución como se comprobó estadísticamente. Las gráficas mostradas a continuación muestran los seis desinfectantes y todas las diluciones de manera que también pueda observarse que no hubo efecto alguno en determinados desinfectantes y diluciones.

Figura 17. Comparación de la evaluación del desinfectante SMB ante *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones

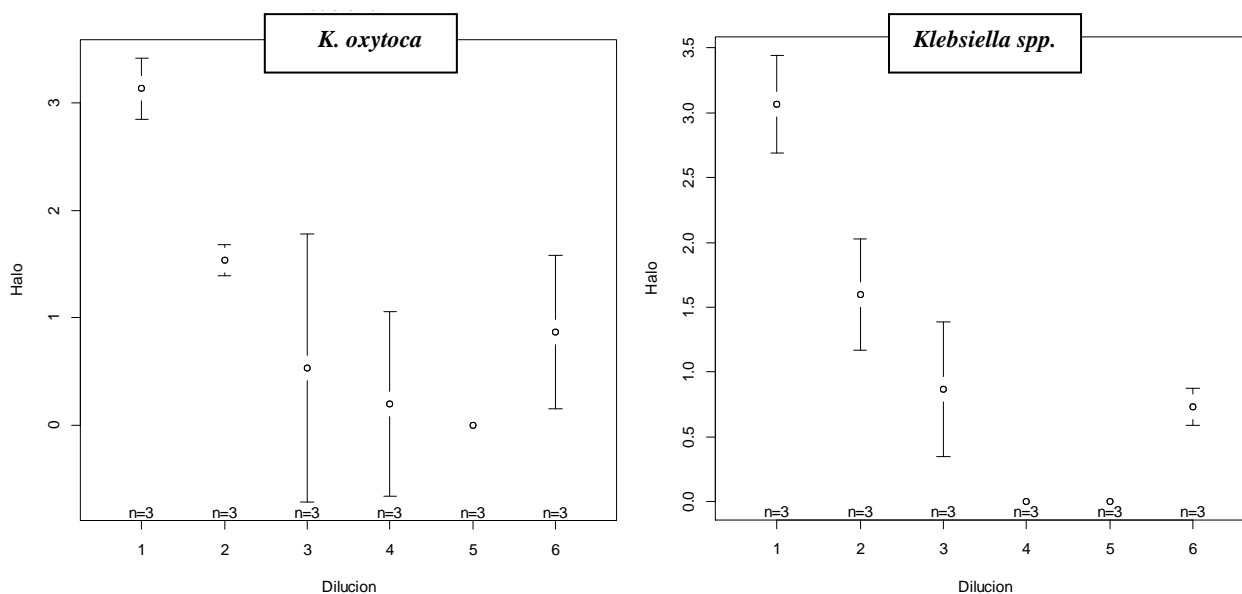


Figura 18. Comparación de la evaluación del desinfectante QUAT 25 ante *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones

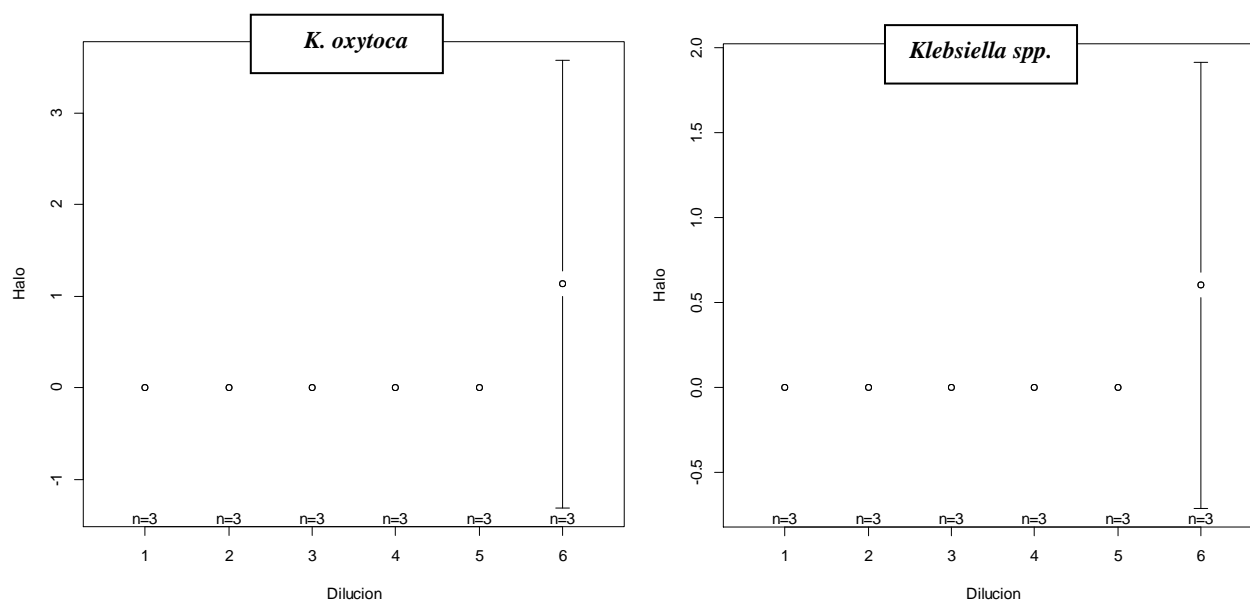


Figura 19. Comparación de la evaluación del desinfectante Busan *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones

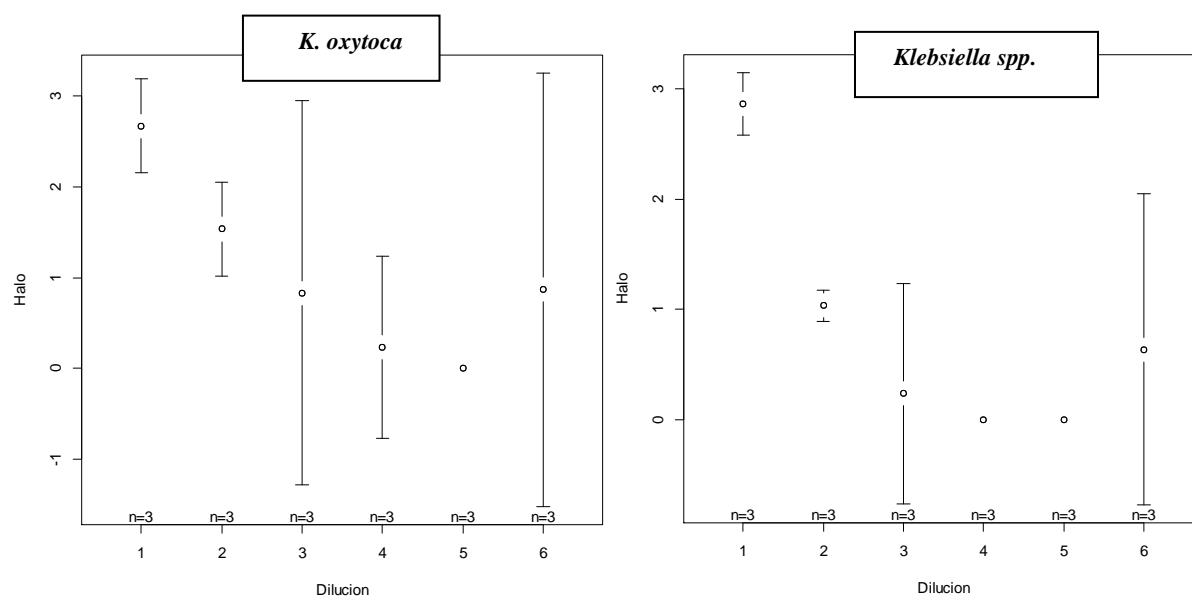


Figura 20. Comparación de la evaluación del desinfectante β -Stab *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones

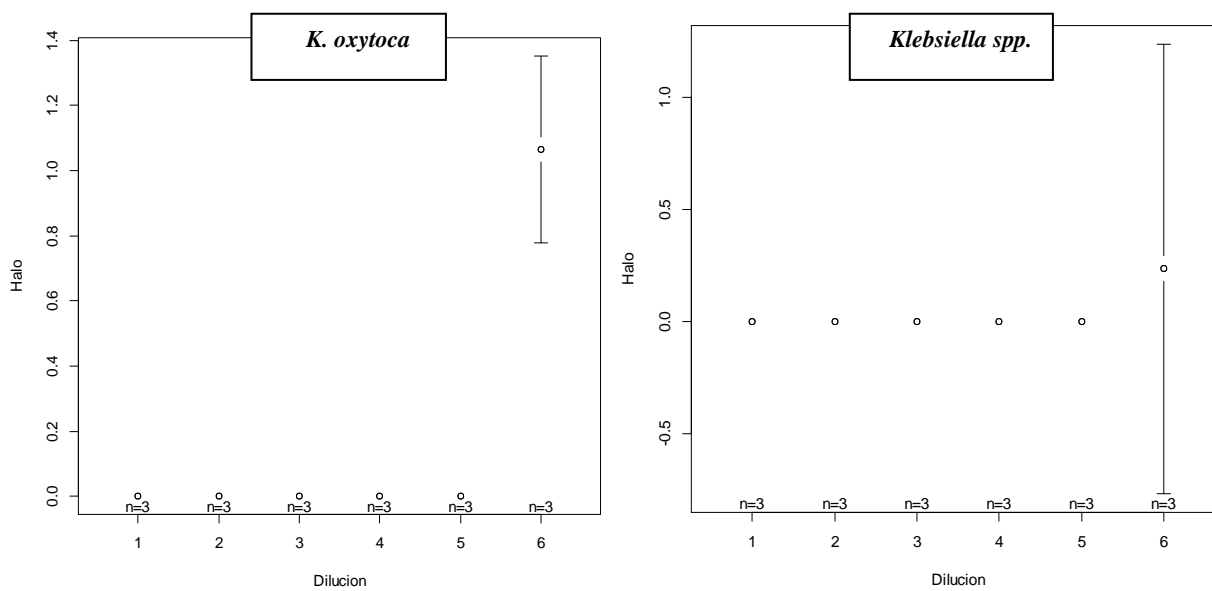


Figura 21. Comparación de la evaluación del desinfectante Magnacide *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones

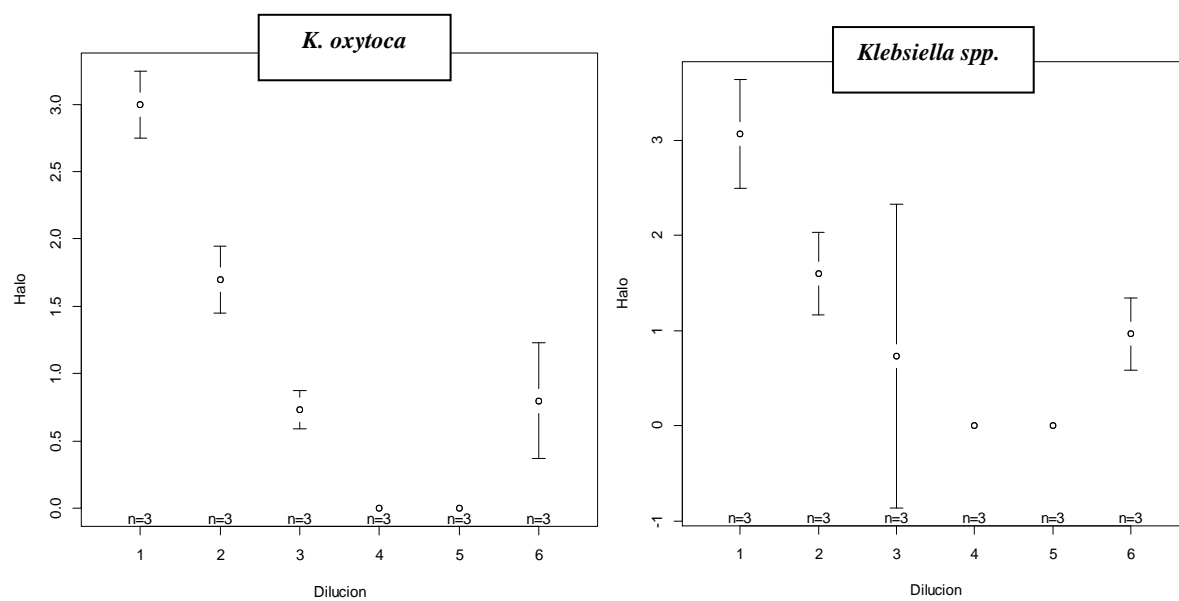
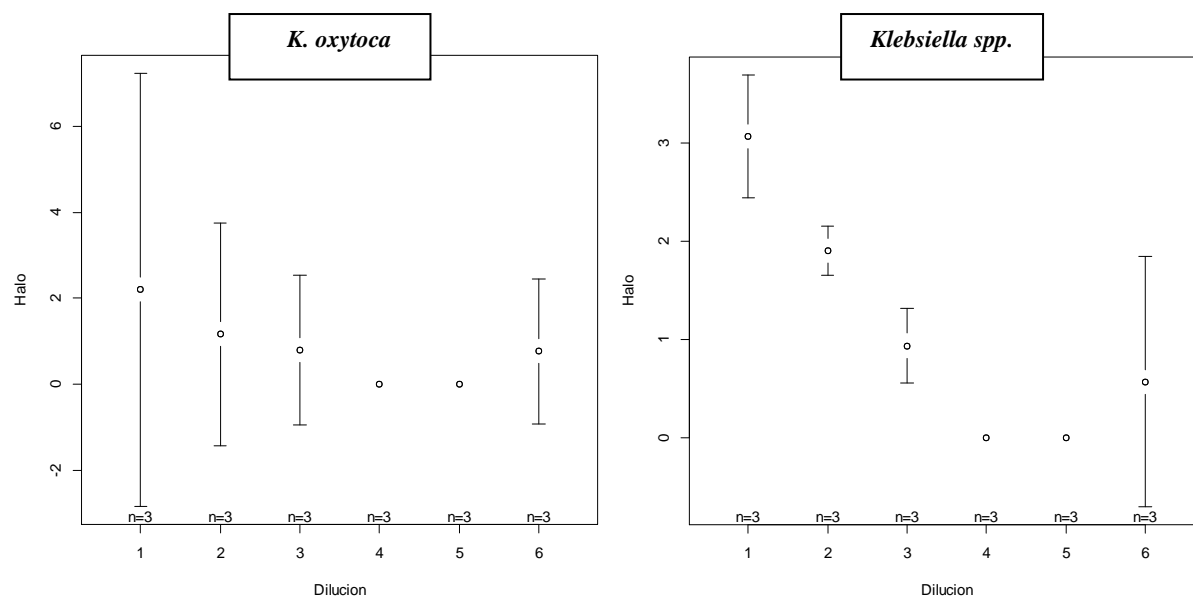


Figura 22. Comparación de la evaluación del desinfectante SMB C ante *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* según el coeficiente de susceptibilidad a distintas diluciones



IX. DISCUSIÓN

Para el recuento de la microbiota total y *Leuconostoc* presente en las muestras de jugo de caña diluido y primario, se obtuvieron conteos en el orden de 10^6 para la microbiota total y un recuento en el orden de 10^3 para el caso de *Leuconostoc*. En el proyecto Avelar, 2011 se encontró un comportamiento similar en cuanto a un recuento mayor de la microbiota total que la de *Leuconostoc*, lo cual es un dato muy probable de obtener. Con los recuentos de microbiota total encontrados para esta investigación, se puede observar que son los mismos o muy similares a los recuentos obtenidos el año pasado en dicho proyecto, estando estos últimos en el orden de 10^6 y 10^7 . En el proyecto Balsells *et al.* realizado en el 2009, se obtuvieron recuentos de 10^5 tanto para la microbiota total como para *Leuconostoc*, mostrando que aumentó la carga microbiana encontrada del 2009 al 2011, pero se mantuvo el recuento parecido entre 2011 y 2012. Para el caso de *Leuconostoc* se obtuvo un recuento en el orden de 10^5 en el año 2009 siendo similar al encontrado en esta investigación. No así para el año 2011, se obtuvieron recuentos en el orden entre 10^2 y 10^4 , mostrando un aumento de *Leuconostoc* en los jugos analizados para esta ocasión.

Las dos cepas seleccionadas, y con las cuales se trabajó esta investigación resultaron ser *Klebsiella spp.* y una en específico resultó ser *K. oxytoca*. El proceso de identificación se hizo en un laboratorio externo mediante secuenciación (Biolab S.A.). Al observar que ambas muestras pertenecían al género *Klebsiella*, valdría la pena pensar que puede ser uno de los grupos de bacterias más abundantes en el jugo de caña. Para ello debe seguirse trabajando en la identificación de los perfiles microbianos presentes en el jugo de caña.

En estudios realizados en distintas regiones se ha analizado la microbiota presente en la caña de azúcar y el jugo de caña, definiendo los distintos géneros o especies presentes. Como en un estudio realizado (Subbannayya, *et al.* 2006) el jugo de caña analizado contenía bacterias como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter spp.*, y *Bacillus subtilis*. Este solamente es un ejemplo de la microbiota que puede estar presente en jugo de caña sin previo tratamiento, aunque dado a que no proviene de la misma región que el jugo de caña analizado para esta ocasión puede ser tomado para comparar con los géneros encontrados en las distintas regiones, y tal como en esta ocasión se encontró una especie de *Klebsiella*.

Una vez identificadas las bacterias, se procedió a realizar una curva de crecimiento a 230nm (longitud de onda determinada como máxima) para cada una que lograra definir cuáles eran las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación. Para el caso de *K. oxytoca* se tomó como ideal la temperatura 37°C y 3.5 horas de incubación, ya que tal como se observó en la Figura 6 fue la curva que presentó el mejor comportamiento y una clara fase logarítmica.

Para el caso de la muestra de *Klebsiella spp.*, se tomó la temperatura de 37°C y 3 horas de incubación como condiciones óptimas e ideales. Estas condiciones se eligieron dado a que como se observó en la Figura 7, ninguna de las curvas muestra una fase logarítmica clara y un comportamiento ideal, por lo que se tomó la curva con la mejor apariencia.

Para la determinación de la producción de ácidos débiles, se logró observar que el pH inicial difirió del pH final luego de la incubación a temperatura y tiempo óptimos para cada caso. Con la prueba estadística realizada se determinó que la diferencia entre el promedio de diferencias de pH de las muestras analizadas es significativa. Con esto se puede establecer que los cambios de pH producidos luego de la incubación sí difieren entre muestras, pero a pesar de esto se encontró que hay similitud entre los cambios de pH de *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* siendo mayores al cambio de pH promedio de *L. mesenteroides*. El mayor cambio de pH fue producido por *K. oxytoca*, con lo que se puede afirmar que produce mayor cantidad de ácidos débiles que las otras dos muestras. Para este caso o esta prueba de producción de ácidos débiles, se puede decir que *K. oxytoca* resulta más perjudicial que las otras dos, siendo esto un dato interesante ya que se logra comprobar que en cuanto a producción de ácidos débiles pueden haber otros grupos bacterianos más perjudiciales que *Leuconostoc*.

Para encontrar un dato más concreto de la producción de ácidos débiles, se determinó la capacidad buffer para ambas muestras trabajadas. La capacidad buffer se estableció como el número de moles necesarios, de NaOH en este caso, para cambiar el pH en una unidad (Avelar, 2011). Para *K. oxytoca* se encontró una capacidad buffer de 1.01×10^{-2} y para *Klebsiella spp.* un valor de 1.27×10^{-02} ambas en el mismo orden. Comparando ambas muestras se encontró que *Klebsiella spp.* presenta una capacidad buffer mayor que *K. oxytoca*, siendo más difícil llevar a un pH deseado los ácidos producidos por *Klebsiella spp.* En el proyecto realizado en el 2011 se obtuvieron valores de capacidad buffer entre 6.0×10^{-3} a 7.0×10^{-3} para las distintas cepas de *Leuconostoc*. Dado a que los valores de capacidad buffer de *Leuconostoc* resultaron ser menor al de las dos cepas evaluadas para este caso, al establecer el grado de agresividad de las cepas para producción de ácidos y valor de capacidad buffer se puede decir que el género *Klebsiella* es más agresivo que *Leuconostoc*. Tomando este dato a gran escala, la producción de ácidos del género *Klebsiella* representa mayor problema para el proceso, ya que sería más complicado llevar el jugo de caña al pH deseado aumentando la cantidad de cal que se utiliza para dicho propósito. Al igual que para la producción de ácidos débiles, el haber encontrado mayor capacidad buffer en el género *Klebsiella* puede establecernos que para estos aspectos evaluados *Leuconostoc* no resulta tan perjudicial.

Otro factor evaluado en esta investigación, fue la actividad enzimática de la enzima dextranasa. Como ya se conoce por la teoría, varias especies de bacterias pero en especial *Leuconostoc mesenteroides* dan origen a las llamadas dextranas. La presencia de estas sustancias junto con otros polisacáridos provenientes de la misma caña provoca una serie de inconvenientes durante el proceso, por lo que la determinación de los microorganismos presentes en el jugo de caña que posean esta actividad enzimática es de gran interés. Dado a que durante la formación de dextrana se utiliza

únicamente la fracción de glucosa de las moléculas de sacarosa, queda como subproducto la fructosa. Es esta fructosa libre la que se midió utilizando el método colorimétrico DNS. Para el caso de *L. mesenteroides*, el ensayo de la actividad enzimática resulta en una curva ascendente, en la que al transcurrir el tiempo detecta mayores cantidades del azúcar libre, fructosa. Para el caso de las bacterias trabajadas, *Klebsiella spp.* y *K. oxytoca* se observó un comportamiento contrario resultando en una curva descendente. Este ensayo enzimático nos permitió establecer que dichas bacterias no poseen la enzima dextransacarasa, o la poseen en cantidades menores, lo suficientemente bajas para ser detectadas por el protocolo utilizado para esta investigación. Con el resultado obtenido se puede pensar en que las bacterias trabajadas en lugar de dejar libre la fructosa, la utilizan para su metabolismo posiblemente entrando directamente en el proceso de glucólisis. En la Figura 11 se observa claramente como la cantidad de azúcares libres que detecta el ensayo disminuye conforme pasa el tiempo, no así para el caso de *L. mesenteroides*. Para este caso no se logró establecer de forma numérica la actividad enzimática, ya que las bacterias trabajadas simplemente no poseen dicha actividad, por lo que solamente puede observarse gráficamente.

Tomando en cuenta que este es uno de los factores que tomamos para establecer la agresividad de los microorganismos evaluados, se puede decir que las muestras de *Klebsiella* evaluadas no presentan una amenaza en cuanto a producción de dextrana durante el proceso. Vale la pena mencionar que puede realizarse un ensayo *in vitro* con una mezcla de las bacterias, tanto de *L. mesenteroides* como de *Klebsiella spp.* evaluando de una forma muy general la ecología microbiana que se da en el jugo de caña. Verificar si la fructosa libre que deja *L. mesenteroides* es utilizada por *Klebsiella spp.*

Finalmente y uno de los ensayos más importantes, fue la determinación de la resistencia de *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* a seis de los desinfectantes utilizados para el control microbiológico en el Ingenio Pantaleón. Tal como se observó en la Figura 12, dos de los desinfectantes no tuvieron efecto alguno sobre las dos muestras evaluadas, QUAT 25 y β -Stab. Esto crea cierta duda acerca del funcionamiento de dichos desinfectantes y su uso en el ingenio. Para este estudio se evaluaron únicamente para las cepas aisladas, por lo que sería recomendable realizar pruebas en otras cepas extraídas del jugo de caña al igual que en la microbiota total, estableciendo si su uso es efectivo en el ingenio o están siendo utilizados sin función alguna.

Otro aspecto interesante fue observar el resultado obtenido en la dilución 10^{-4} realizada para todos los desinfectantes, dilución que no hizo efecto para ninguna de las bacterias trabajadas. Dado esto, los dos desinfectantes y la dilución que no produjeron efecto sobre las muestras, fueron eliminados del análisis estadístico. Esto se realizó por fines prácticos de manera que se evaluaron las diferencias existentes entre los datos importantes y significativos.

Para el caso de los desinfectantes evaluados para *K. oxytoca*, se observó comportamientos similares en cuanto a la inhibición causada por cada dilución. Se observó un comportamiento descendente en los datos, conforme mas diluido se encontraba el desinfectante. Mediante los análisis estadísticos ANOVA

y Kruskal-Wallis realizados, se determinó que si existen diferencias significativas entre el efecto resultante para cada una de las diluciones, en los desinfectantes SMB, Busan y Magnacide. Esto indica que para obtener los mejores resultados en cuanto a inhibición del crecimiento de dicha bacteria, es necesario utilizar el desinfectante lo menos diluido posible, por consiguiente representa más gasto. Cabe mencionar que a pesar de esto los desinfectantes Busan y SMB son los únicos que presentaron resultados de inhibición para la dilución 10^{-3} .

Este no fue el caso del desinfectante SMB C, para el cual se obtuvo un valor p de 0.479 demostrando que no existe diferencia significativa entre las diluciones realizadas. Esto indica que para la eliminación de *K. oxytoca*, no importa si se utiliza puro el desinfectante o en una dilución de 10^{-2} , el efecto va ser el mismo. Esta información nos permite establecer que este puede ser el mejor desinfectante para el control y eliminación de *K. oxytoca* ya que no solo presentó efectividad sino además resulta el más económico de utilizar ya que al aplicarlo diluido (10^{-2}) funciona de igual forma.

Los resultados obtenidos para *Klebsiella spp.* fueron un poco distintos. Para este caso ninguno de los desinfectantes mostró efecto en la dilución de 10^{-3} , con lo que se puede decir que para la eliminación de *Klebsiella spp.* deben usarse los desinfectantes más concentrados o que posiblemente la cepa que se está analizando es más resistente a dichos desinfectantes. Los análisis estadísticos realizados demostraron que existe diferencia significativa entre las diluciones de cada desinfectante, con lo que podemos establecer que para obtener mejores resultados los desinfectantes deben estar a mayores concentraciones. Para este caso el desinfectante que mejores resultados mostró fue el SMB C, ya que como se observa en la Figura 15 es el que posee mayores coeficientes de susceptibilidad.

Al comparar los resultados obtenidos para las muestras analizadas del género *Klebsiella*, y los resultados obtenidos en el estudio del 2011, se puede establecer que las cepas de *Leuconostoc* evaluadas son un poco más resistentes a las evaluadas para este caso. Las cepas de *Leuconostoc* no presentaron susceptibilidad para las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} , *K. oxytoca* sí por lo que se puede decir que *L. mesenteroides* es un poco más agresiva o resistente para este caso. Para las cepas de *Leuconostoc* evaluadas se determinó que el desinfectante más efectivo para su eliminación y control es el Magnacide, pero para el caso de las muestras de *Klebsiella* el desinfectante con mejor efecto resultó ser SMB, Busan y SMB C para *K. oxytoca* y SMB C para *Klebsiella spp.* Otro aspecto que debe ser tomado en cuenta es, que para el estudio del 2011 el desinfectante β -Stab dio buenos resultados de inhibición hasta una dilución del 10^{-2} para las cepas de *Leuconostoc*, mientras que para las bacterias pertenecientes al género *Klebsiella* no se obtuvo resultado alguno, aun utilizándolo al 100%. Con esto se puede establecer que cada bacteria posee distintas respuestas a los diferentes desinfectantes, por lo que al ir determinando el perfil microbiológico del jugo de caña se podrán ir estableciendo los efectos de los desinfectantes para cada caso. Conociendo los géneros o especies más resistentes a dichos desinfectantes se podría aplicar el mejor desinfectante y a la concentración ideal.

Para futuras investigaciones debe tomarse en cuenta que las evaluaciones se realicen con más repeticiones y que se incluyan los mismos desinfectantes ya evaluados de modo que se logre armar una adecuada base de datos. Valdría la pena repetir la evaluación del QUAT25 y el β -Stab utilizando otras cepas presentes en el jugo de caña al igual que en la microbiota total, de modo que se pueda tomar la decisión de dejar de utilizarlo o seguir aplicándolo para control microbiológico.

Para esta investigación se evaluaron cuatro distintos aspectos que son identificados como perjudiciales para la industria azucarera, la producción de ácidos débiles, capacidad buffer, actividad de la enzima dextranasa y resistencia a determinados desinfectantes utilizados para el control microbiológico. Tomando *L. mesenteroides* como la más perjudicial encontrada hasta ahora, se tomó como referencia y se comparó con las cepas encontradas del género *Klebsiella*. Tal como se reportó en los resultados, las cepas trabajadas en esta investigación resultaron más perjudiciales que las cepas de *Leuconostoc* evaluadas en el 2011 en cuanto a producción de ácidos y capacidad buffer. No fue el mismo caso para la actividad enzimática de la dextranasa, ya que se determinó que *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* no poseen dicha enzima. Y con respecto a los desinfectantes, se pudo establecer que las cepas de *Leuconostoc* no presentaron susceptibilidad para diluciones mayores a 10^{-2} , en cambio *K. oxytoca* sí para dos de los desinfectantes llegando a pensar que esta última es más susceptible a los desinfectantes utilizados que *Leuconostoc*.

Queda aún mucho campo por descubrir, llegar a formar un perfil microbiológico lo más completo posible incluyendo pruebas que determinen la agresividad para cada caso. Conociendo los grupos prevalentes y más perjudiciales presentes en el jugo de caña se pueden llegar a tomar decisiones más puntuales en cuanto a su eliminación y control de ser así necesario.

X. CONCLUSIONES

- Los recuentos de microbiota total del jugo de caña primario y diluido, a partir del año 2011 al presente año se mantuvieron muy similares, no así los recuentos de *Leuconostoc* los cuales aumentaron en un orden.
- Una de las dos cepas abundantes aisladas del jugo de caña resulto ser *Klebsiella spp.*
- La segunda cepa identificada fue *K. oxytoca*.
- Se determinó que las condiciones óptimas de crecimiento de *K. oxytoca* y *Klebsiella spp.* se dan a 37°C, 3.5 horas de incubación para *K. oxytoca* y 3 horas para *Klebsiella. spp.*, en el medio de cultivo liquido MP25.
- En cuanto al cambio de pH por producción de ácidos débiles, se encontró que *K. oxytoca* produce más ácidos que *Klebsiella spp.* en general, incluso más que las cepas de *Leuconostoc* evaluadas en el estudio del 2011.
- Se encontró que *Klebsiella spp.* presenta una capacidad buffer mayor que *K. oxytoca*, siendo más difícil llevar a un pH deseado los ácidos producidos por *Klebsiella spp.*
- La capacidad buffer encontrada para el género *Klebsiella* que se evaluó para este estudio, resultó ser mayor que para las cepas de *Leuconostoc* evaluadas en el 2011.
- No se encontró actividad dextransacarasa en ninguna de las dos cepas trabajadas. Esto no indica que *Klebsiella* no produce dicha enzima, sino que posiblemente lo hace en menores cantidades siendo tan bajas que no son detectadas con el protocolo utilizado para este caso.
- De los desinfectantes evaluados el que mayor efecto tuvo fue el SMB C, mientras que con QUAT 25 y β -Stab no se obtuvo efecto sobre las cepas estudiadas.
- La dilución 10^{-4} evaluada para todos los desinfectantes no produjo efecto de inhibición, siendo 10^{-2} la dosis mínima efectiva a utilizar para las cepas estudiadas.

XI. RECOMENDACIONES

- Continuar trabajando en el aislamiento e identificación de los géneros más abundantes en el jugo de caña para formar finalmente un perfil microbiano más completo y que de esta forma se puedan llegar a tomar decisiones más puntuales en cuanto a su eliminación y control de ser así necesario.
- Realizar un ensayo *in vitro* que permita obtener un panorama superficial de la ecología microbiana presente en el jugo de caña durante el proceso de elaboración de azúcar. Esto podría realizarse determinando la actividad enzimática resultante de una mezcla de *L. mesenteroides* y las cepas a aisladas.
- Dado a que dos de los desinfectantes evaluados no tuvieron efecto alguno sobre las muestras evaluadas, QUAT 25 y β -Stab, sería recomendable realizar pruebas en otras cepas extraídas del jugo de caña al igual que en la microbiota total, estableciendo si su uso es efectivo en el ingenio o están siendo utilizados sin función alguna.
- Desarrollar una forma de evaluación numérica que permita que mediante los indicadores evaluados (capacidad buffer, actividad dextransacarasa y resistencia a desinfectantes), se puede establecer que tan severa es una cepa bacteriana con respecto a otra.

XII. LITERATURA CITADA

- Adachi, Katsuki; M. Nakatani y H. Mochida. 2002. "Isolation of an endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan". *Soil science and plant nutrition*. 48 (6): 889 – 895.
- Avelar, Sofia. 2011. *Evaluación de cepas de Leuconostoc spp. por su capacidad de Metabolizar sacarosa y su resistencia a antimicrobianos*. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. 99 págs.
- Asazgua (Asociación de Azucareros de Guatemala). Actualizado 2012. *Nuestra historia*. <http://www.azucar.com.gt/>.
- Balsells, Diana; B. de la Peña y F. Rodríguez. 2009. *Optimización de procedimientos de Laboratorio y económicos en control microbiológico en la industria azucarera*. Tesis Universidad del Valle de Guatemala. 201 págs.
- Bouza, E. y Cercenado E. 2002. *Klebsiella and enterobacter: antibiotic resistance and treatment implications*. *Seminars in respiratory infections*. 17(3):215-30.
- Brown C. y Seidler R. 1973. *Applied and environmental microbiology*. "Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma". 25 (6): 900-904.
- Cuddihy, James; Porro M. y Raiih J. 2001. *The presence of total polysaccharides in sugar Production and methods for reducing their negative effects*. *Journal American Society of Sugarcane Technologists*. Vol.21. 73-91.
- E. Ramos y S. Ravelo. 2008. *Control de la calidad real de la caña y sus jugos; métodos para la Determinación de polisacáridos y AIS*. <http://www.oocities.org/ramguira/CANE/metodos.pdf>. Fecha de acceso: Octubre 2011.

- Hudzicki, Jan. 2010. "Kirby- Bauer disk diffusion susceptibility test protocol". *American Society for Microbiology*.
- K. Subbannayya, *et al.* 2006. How safe is sugarcane juice. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 25(1): 73-74.
- Larrahondo Jesús. 1995. *Calidad de la caña de azúcar*. Centro de investigación de la caña de azúcar de Colombia; CENICAÑA. Cali, Colombia. págs. 337-354. http://www.cenicana.org/pdf/documentos_no_seridados/libro_el_cultivo_cana/libro_p337-354.pdf
- Lou, María José. 2008. *Desarrollo de un medio de cultivo costo-efectivo para el recuento y la propagación de Leuconostoc mesenteroides en distintos jugos de caña*. Universidad del Valle de Guatemala, Tesis no publicada.
- Labsca S.A. Productos Labs. Guatemala. Fecha de acceso: marzo 2013. <http://labsca.com/formulas.html>
- Montagna Cristina, Pechen de D'Angelo A. y Venturino A. 2011. *Toxicology of the Herbicide Acrolein: Risk Assessment in Aquatic Environments*. *Herbicides and Environment*. pp. 405-417. http://cdn.intechopen.com/pdfs/12595/InTech-toxicology_of_the_herbicide_acrolein_risk_assessment_in_aquatic_environments.pdf
- Pantaleón. <http://www.pantaleon.com/fundacion-pantaleon> Fecha de acceso: Septiembre 2011.
- Pérez José Manuely Pratt Lawrence. 1997. *Industria Azucarera en Guatemala: Análisis de Sostenibilidad*. INCAE Business School.
- Problemas de Energía, Enzimas y Catálisis*. 1996. Universidad de Alcalá de Henares. España. http://www.biologia.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/energy_enzymes_catalysis/06t.html
- Proceso industrial*. Ingenio Pantaleón. Guatemala. http://www.pantaleon.com/sites/default/files/popup/pop_up.htm. Fecha de acceso: Abril 2011
- Proceso de fabricación del azúcar de caña*. EcuRed; Enciclopedia Cubana. http://www.ecured.cu/index.php/Archivo:Proceso_del_azucar.jpg Fecha de acceso: Noviembre 2011.

- Rodríguez, Efraín. 2005. *La dextranasa lo largo de la industria azucarera*. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Habana, Cuba. 22:11-19
- R Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Sacarosa*. Instituto Nacional de Tecnologías Educativas y de Formación del Profesorado (INTEF). Gobierno de España. Fecha de acceso: enero 2013. <http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/alumno/2bachillerato/biomol/explicasac.htm>
- Tablas de constantes*. México. Universidad Iberoamericana (UIA). 72-26. Fecha de acceso: marzo 2013. <http://www.uia.mx/campus/publicaciones/quimanal/pdf/tablasconstantes.pdf>
- TCMTB (Busan) Chemical Profile 2/85*. 2008. Pesticide Management Education Program (PMEP). <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/fung-nemat/tcmtb-ziram/tcmtb/fung-prof-tcmtb.html>
- Tena M. y Jorrián J. *Extracción y ensayo de la actividad invertasada levadura de panadería*. Universidad de Rabanales; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba España. <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/31%20INVERTASA%20ENSAYO.pdf> Fecha de acceso: Noviembre 2011.
- Vila, Andrea. 2003. *Impacto social de la Agroindustria azucarera en Guatemala*. Tesis Universidad Francisco Marroquín de Guatemala. 46págs.
- Yang, Liu. *et al.* 2010. Study on mechanisms of colonization of nitrogen-fixing PGPB, *Klebsiella pneumoniae* NG14 on the root surface of rice and the formation of biofilm. *Current Microbiology*. Vol62:1113-1122

XIII. ANEXOS

A. Obtención y recuento de la microbiota total del jugo de caña primario y diluido

1. Material, equipo y reactivos

- 1) Cajas petri
- 2) Probeta
- 3) Tubos de ensayo de 20 ml
- 4) Pipetas de vidrio de 1mL y 10mL
- 5) Bulbo
- 6) Esparcidor de vidrio
- 7) Parafilm
- 8) Botes plásticos estériles para transporte de muestras
- 9) Erlenmeyers de 250mL y 500mL
- 10) Agitador magnético
- 11) Miel primaria (obtenida en el Ingenio Pantaleón)
- 12) Peptona de carne
- 13) Agar agar
- 14) APC (Agar plate count)
- 15) Agua peptonada
- 16) Etanol 70% para desinfección
- 17) Jugo de caña primario y diluido obtenido del área de proceso del Ingenio Pantaleón
- 18) Balanza
- 19) Espátula
- 20) Mechero
- 21) Chispero
- 22) Asas
- 23) Campana de flujo laminar
- 24) Incubadora
- 25) Estufa
- 26) Autoclave

2. Procedimiento

- 1) Preparación de APC para el crecimiento de las muestras de jugo de caña.
 - a. Ver indicaciones del fabricante en cuanto a cantidad utilizada y tiempo de esterilización.
 - b. Sacar el medio de la autoclave y dejar enfriar a temperatura ambiente lo suficiente para verter el medio sin que solidifique este.
 - c. Limpiar la campana de flujo laminar con etanol al 70%.
 - d. Encender el UV de la campana durante 15 minutos.
 - e. Verter aproximadamente 20 mL del medio en cajas petri estériles.
 - f. Refrigerar las cajas en un ambiente libre de contaminación hasta su uso.

- 2) Preparación de agua peptonada para realizar las diluciones de las muestras.
 - a. Esterilizar tubos de ensayo y pipetas de vidrio (10mL y 1mL) durante 15 minutos en autoclave.
 - b. Dejar secar los tubos en horno hasta eliminar los residuos de agua.
 - c. Ver indicaciones del fabricante en cuanto a cantidad utilizada del medio de cultivo y tiempo de esterilización.
 - d. Limpiar la campana de flujo laminar con etanol al 70%.
 - e. Encender el UV de la campana durante 15 minutos.
 - f. Verter 9 mL del medio en los tubos de ensayo con ayuda de una pipeta de vidrio estéril.
 - g. Refrigerar el medio hasta su uso.

- 3) Preparación del medio MP200 optimizado para *L. mesenteroides* (Balsells *et al.* 2009)
 - a. En un erlenmeyer agregar 200mL de miel primaria, 10g de peptona de carne y 15g de agar agar (para un litro de medio).
 - b. Disolver el medio utilizando una estufa y agitación.
 - c. Esterilizar en la autoclave durante 15 minutos.
 - d. Sacar el medio de la autoclave y dejar enfriar a temperatura ambiente lo suficiente para verter el medio sin que solidifique este.
 - e. Limpiar la campana de flujo laminar con etanol al 70%.
 - f. Encender el UV de la campana durante 15 minutos.
 - g. Verter aproximadamente 20 mL del medio en cajas petri estériles.
 - h. Refrigerar las cajas en un ambiente libre de contaminación hasta su uso.

- 4) Recolección y preparación de las diluciones de las muestras de jugo de caña.
 - a. Utilizando botes plásticos estériles, se toma la muestra directamente en el área de proceso, tanto el jugo diluido como el primario.
 - b. Se debe trasladar rápidamente al laboratorio del ingenio.

- c. Tomar 1mL de las muestras y añadir a los tubos que contienen 9mL de agua de peptona (dilución 1:10 o 10^{-1}).
- d. Proceder con las diluciones seriadas hasta llegar a una dilución de 10^{-5} .
- e. Tomar 0.1mL de cada dilución y agregarlo tanto al medio de cultivo MP200 como al medio APC.
- f. Utilizar esparcidores estériles para dispersar las muestras de manera uniforme.
- g. Sellar las cajas con parafilm para transportarlas a la Universidad del Valle de Guatemala.
- h. Incubar durante 24 horas a 37°C .

B. Aislamiento de la microbiota total del jugo de caña

1. Material, equipo y reactivos

- a. Cajas petri
- b. Probeta de 25mL
- c. Esparcidor de vidrio
- d. Agar nutritivo
- e. Agar sangre de carnero
- f. Miel primaria
- g. Peptona de carne
- h. Agar agar
- i. Etanol 70%
- j. Lugol
- k. Safranina
- l. Cristal violeta
- m. Alcohol-acetona
- n. Balanza
- o. Espátula
- p. Mechero
- q. Chispero
- r. Asas
- s. Campaña de flujo laminar
- t. Incubadora
- u. Estufa
- v. Autoclave

2. Procedimiento

- a. Preparación de agar nutritivo
 - 1) Ver indicaciones del fabricante en cuanto a cantidad utilizada y tiempo de esterilización.

- 2) Sacar el medio de la autoclave y dejar enfriar a temperatura ambiente lo suficiente para verter el medio sin que solidifique este.
 - 3) Limpiar la campana de flujo laminar con etanol al 70%.
 - 4) Encender el UV de la campana durante 15 minutos.
 - 5) Verter aproximadamente 20 mL del medio en cajas petri estériles.
 - 6) Refrigerar las cajas en un ambiente libre de contaminación hasta su uso.
- b. Preparación de agar sangre
- 1) Preparar el agar base (agar nutritivo) según las indicaciones del fabricante.
 - 2) Añadir un 5% de sangre de ovino, a la cantidad a realizar.
 - 3) Repetir el procedimiento del inciso “a” del paso 2 al 6.
- c. Selección y aislamiento de las colonias
- 1) Luego de la incubación de las diluciones del jugo de caña debe realizarse un conteo de la microbiota total.
 - 2) Se debe elegir la dilución con la densidad bacteriana más adecuada para distinguir la cantidad de colonias y realizar un conteo.
 - 3) Enumerar cada una de las colonias, tanto del jugo diluido como del primario distinguiéndolas adecuadamente.
 - 4) Aislar cada una de ellas en agar nutritivo e incubar durante 24 horas a 37°C.
 - 5) Una vez aisladas se procede a crecer las colonias enumeradas en agar sangre con el fin de determinar presencia y tipo de hemólisis.
 - 6) Para crear una selección válida de las cepas a utilizar, se debe verificar el crecimiento de las colonias en el medio MP200.
 - 7) En todos los medios utilizados debe verificarse la morfología y color de las colonias.
 - 8) Para determinar el grupo más abundante de bacterias, se deben realizar las respectivas tinciones de gram y realizar una clasificación según esto.
- d. Aislamiento de *Leuconostoc mesenteroides*
- 1) Para el caso de cepas de *Leuconostoc*, es necesario aislarlas a partir del medio de cultivo MP200. Las colonias de *Leuconostoc* poseen apariencia de “gotas de agua” en dicho medio de cultivo.
 - 2) Para tomar una muestra adecuada del microorganismo debe introducirse el asa en el centro de la colonia, ya que los bordes pueden ser únicamente la dextranasa formada.
 - 3) Aislar en agar nutritivo.
- e. Tinciones de gram
- 1) Tomar una de las colonias aisladas y colocarla sobre una gota de agua destilada sobre un portaobjetos.
 - 2) Esparcirla de modo que quede una capa delgada del inóculo.

- 3) Para fijar la muestra esta debe ser secada sobre el portaobjeto con ayuda de un mechero.
- 4) Añadir cristal violeta de manera que cubra toda la muestra fijada, y dejar que permanezca durante 1 minuto.
- 5) Lavar con agua destilada.
- 6) Añadir lugol y esperar 1 minuto.
- 7) Lavar con agua destilada.
- 8) Añadir unas cuantas gotas de alcohol-acetona (paso crítico de la tinción). Debe ser una cantidad moderada de modo que resulte de manera adecuada la decoloración de la muestra.
- 9) Lavar con agua destilada.
- 10) Añadir safranina y esperar 1 minuto.
- 11) Lavar con agua destilada.

C. Determinación de las condiciones óptimas de tiempo y temperatura de incubación de las cepas a trabajar, mediante curvas de crecimiento.

1. Material, equipo y reactivos

- a. Cajas petri
- b. Tubos de vidrio de 20 mL
- c. Pipetas de 10mL
- d. Celdas para espectrofotómetro (para este caso se utilizaron celdas de plástico)
- e. Micropipetas p100 y p1000 con sus respectivas puntas
- f. Agar nutritivo
- g. Miel primaria
- h. Peptona de carne
- i. Etanol 70%
- j. Cultivo aislado de la bacteria(s) a analizar
- k. Estándar de McFarland 0.5
- l. Balanza
- m. Espátula
- n. Mechero
- o. Chispero
- p. Asas
- q. Campaña de flujo laminar
- r. Incubadora
- s. Estufa
- t. Autoclave
- u. Baño de agua

- v. Espectrofotómetro UV (Thermo Scientific, Genesys 10)

2. Procedimiento

- a. Preparación del medio de cultivo líquido MP25
- 1) En un erlenmeyer agregar 25mL de miel primaria, y 10g de peptona de carne (para un litro de medio)
 - 2) Disolver el medio utilizando una estufa y agitación.
 - 3) Esterilizar en la autoclave durante 15 minutos.
 - 4) Sacar el medio de la autoclave y dejar enfriar a temperatura ambiente.
 - 5) Limpiar la campana de flujo laminar con etanol al 70%.
 - 6) Encender el UV de la campana durante 15 minutos.
 - 7) Verter aproximadamente 15 mL del medio en tubos de ensayo estériles.
 - 8) Refrigerar los tubos en un ambiente libre de contaminación hasta su uso.
- b. Determinación de la longitud de onda máxima
- 1) Preparar tubos con medio MP25
 - 2) Tomar una colonia previamente aislada de las cepas a utilizar y aislarla nuevamente en agar nutritivo de modo que se obtengan cultivos frescos para el procedimiento.
 - 3) Incubar durante 24 horas a 37°C.
 - 4) En condiciones estériles, tomar una muestra del inóculo y suspender en el medio de cultivo MP25 hasta llegar a una concentración equivalente a un McFarland 0.5.
 - a. Debe realizarse un control de calidad del estándar de McFarland a utilizar, y esto se logra realizando una lectura espectrofotométrica a 625nm. La absorbancia debe estar entre 0.08 y 0.1.
 - b. Dado a que el medio de cultivo MP25 posee una coloración oscura, es muy difícil determinar a simple vista si la suspensión de la muestra posee la turbidez equivalente a un McFarland 0.5, por lo que este análisis de control de calidad es recomendable. Para ello puede utilizarse como blanco el mismo medio sin el inóculo.
 - 5) Realizar diluciones de la muestra 1:100 (muestra: agua destilada)
 - 6) Utilizando un espectrofotómetro UV, realizar las correspondientes lecturas entre 190-320 nm
 - 7) Utilizar como blanco el medio de cultivo sin inóculo.
 - 8) Determinar la absorbancia máxima obtenida para posteriores procedimientos.
- c. Curvas de crecimiento
- 1) Preparar tubos con medio MP25
 - 2) Tomar colonias de un cultivo fresco, previamente aisladas en agar nutritivo, y hacer una suspensión en el medio con una concentración equivalente a un McFarland 0.5. Verificar la concentración tal como se mencionó anteriormente.

- 3) Realizar lecturas espectrofotométricas en el tiempo cero de incubación, a 28°C, 30°C y 37°C a la longitud de onda máxima encontrada en el procedimiento anterior.
- 4) Repetir las lecturas durante el tiempo de incubación necesario para obtener diferencias mínimas entre las absorbancias.
- 5) Realizar triplicados de las muestras en las tres temperaturas de incubación.
- 6) Graficar las curvas de crecimiento utilizando las absorbancias obtenidas, y localizar la fase estacionaria que determine la temperatura y tiempo de incubación óptimos.

D. Determinación de la actividad enzimática de la dextransacarasa utilizando el método colorimétrico DNS

1) Material, equipo y reactivos

- a. Cajas petri
- b. Tubos de ensayo
- c. Tubos de vidrio con tapadera
- d. Micropipetas p100 y p1000 con sus respectivas puntas
- e. Celdas para espectrofotómetro (para este caso se utilizaron celdas de plástico)
- f. Agar nutritivo
- g. Miel primaria
- h. Peptona de carne
- i. Etanol 70%
- a. Cultivo aislado de la bacteria(s) a analizar
- j. Estándar de McFarland 0.5
- k. Solución de sacarosa 1%
- l. Solución de ácido dinitrosalicílico 1%
- m. Solución de tartrato de sodio y potasio (40%)
- n. Tubos eppendorf 0.5
- o. Balanza
- p. Espátula
- q. Mechero
- r. Chispero
- s. Asas
- t. Campaña de flujo laminar
- u. Incubadora
- v. Estufa
- w. Autoclave
- x. Centrifuga (Fisher Cientific, Accu Spin Micro 17R)
- y. Espectrofotómetro UV (Thermo Scientific, Genesys 10)
- z. Baño de agua a 90°C

2. Procedimiento

- a. Preparación de la solución de sacarosa 1%
 - 1) Para un litro: agregar 10g de sacarosa en 1000 de agua destilada.
 - 2) Autoclavear la solución durante 15 minutos.
 - 3) Limpiar la campana de flujo laminar con etanol al 70%.
 - 4) Encender el UV de la campana durante 15 minutos.
 - 5) Verter 15 mL de la solución a tubos estériles.

- b. Ensayo enzimático
 - 1) Utilizando un cultivo fresco, realizar una suspensión de la bacteria en medio MP25, a una concentración equivalente a un estándar de McFarland 0.5.
 - 2) Utilizar como control positivo una cepa de *Leuconostoc*.
 - 3) Incubar a temperatura y tiempo óptimo.
 - 4) Trabajar en triplicado.
 - 5) Luego de la incubación, transferir 1mL de la suspensión a los tubos con la solución de sacarosa. Este momento es tomado como el tiempo cero.
 - 6) Tomar 1mL de esta mezcla y transferirlo a un tubo eppendorf de 2.5mL.
 - 7) Centrifugar a 6,000 g a temperatura ambiente durante 15 minutos.
 - 8) Transferir 0.8mL de la fase acuosa a un tubo de ensayo y añadir 0.8mL de la solución de DNS.
 - a. Para preparar 1L de solución de DNS: agregar 10g de ácido dinitrosalicílico, 2g de fenol, 0.5g de sulfito de sodio, 10g de hidróxido de sodio y aforar utilizando agua destilada.
 - 9) Introducir los tubos en un baño de agua a 90°C de 5-15 minutos hasta obtener un cambio de coloración de amarillo a café o rojo/ladrillo.
 - 10) Agregar 266µL de la solución de tartrato de sodio y potasio (40%) para estabilizar la coloración obtenida.
 - 11) Enfriar utilizando un baño de agua fría.
 - 12) Medir la absorbancia a 575nm.
 - 13) Repetir el mismo procedimiento para los otros tiempos de incubación (2, 4 y 6 horas).

E. Prueba de resistencia a desinfectantes

- 1) Material, equipo y reactivos
 - b. Cajas petri
 - c. Tubos de vidrio con tapadera
 - d. Micropipetas p10 y p100 con sus respectivas puntas
 - e. Miel primaria
 - f. Peptona de carne
 - g. Agar agar

- h. Etanol 70%
- i. Formaldehído
- j. Desinfectantes a analizar
- k. Cultivo aislado de la bacteria(s) a analizar
- l. Esparcidor de vidrio
- m. Tubos eppendorf 0.5
- n. Discos estériles de papel filtro
- o. Balanza
- p. Espátula
- q. Mechero
- r. Chispero
- s. Asas
- t. Pinzas
- u. Campaña de flujo laminar
- v. Incubadora
- w. Estufa
- x. Horno
- y. Autoclave

2. Procedimiento

- a. Preparación de la muestra
 - 1) Preparar tubos con medio MP25.
 - 2) Hacer una suspensión de bacterias en dicho medio, utilizando un cultivo fresco de la bacteria a analizar.
 - 3) Incubar durante 24 horas a 37°C de manera que se obtenga una carga bacteriana adecuada de la muestra.

- b. Preparación de los discos con desinfectantes
 - 1) Realizar discos utilizando papel filtro y un sacabocados.
 - 2) Introducirlos en una caja adecuada y autoclavar durante 15 minutos.
 - 3) Realizar diluciones de cada uno de los desinfectantes (10^{-1} a 10^{-4}) utilizando tubos eppendorf de 2.5mL.
 - 4) Utilizar formaldehído como control positivo en una dilución 1:10.
 - 5) Añadir 10µL de cada una de las diluciones a los discos estériles y dejar secar en horno el tiempo que sea necesario para que se absorban y sequen adecuadamente.

- c. Método de difusión por disco
 - 1) Preparar cajas petri con el medio MP200.
 - 2) Tomar 80µL de la muestra preparada y añadirla en cada una de las cajas petri.

- 3) Extender la muestra utilizando un esparcidor de vidrio estéril, hasta que se forme una capa uniforme del inóculo.
- 4) Dejar secar la muestra para una adecuada absorción.
- 5) Dividir las cajas en seis segmentos de igual tamaño, y rotularlos según las diluciones realizadas (desinfectante puro, diluciones 10^{-1} a 10^{-4} y formaldehído como control positivo).
- 6) Utilizando una pinza estéril, tomar los discos y colocarlos en los distintos segmentos de la caja de modo que queden lo suficientemente separados para distinguir los halos de inhibición formados.
- 7) Incubar a 37°C durante 24 horas.
- 8) Medir los diámetros de los halos de inhibición resultantes.
- 9) Establecer el dato de inhibición tal como se menciona en Lou 2008, dividiendo el halo de la muestra dentro del halo del formaldehído.
- 10) Trabajar en triplicado.

F. Determinación del cambio de pH

1. Material, equipo y reactivos

- a. Cajas petri
- b. Tubos de vidrio con tapadera
- c. Beakers de 25mL
- d. Miel primaria
- e. Peptona de carne
- f. Etanol 70%
- g. Soluciones buffer para calibración, pH 4, pH7 y pH10
- h. Cultivo aislado de la bacteria(s) a analizar
- i. Balanza
- j. Espátula
- k. Mechero
- l. Chispero
- m. Asas
- n. Incubadora
- o. Estufa
- p. Potenciómetro

2. Procedimiento

- a. Calibración del potenciómetro
 - 1) Localizar la opción de calibración del equipo.
 - 2) Colocar el potenciómetro dentro de la solución de pH conocido que el equipo solicite (pH 4, pH7 o pH 10), verificando que el electrodo este adecuadamente sumergido.

- 3) Realizar el mismo procedimiento con las soluciones estándar en el orden requerido.
 - 4) De no obtenerse en la pantalla los datos propios de las soluciones estándar, realizar un ajuste manual para llegar al valor de la solución.
- b. Cambio de pH
- 1) Realizar tubos con medio MP25.
 - 2) Utilizando un cultivo fresco previamente aislado, realizar una suspensión de la bacteria equivalente a una concentración de un estándar de McFarland 0.5.
 - 3) Utilizar como control positivo una cepa de *Leuconostoc* a la misma concentración y como control negativo el medio de cultivo sin inóculo.
 - 4) Tomar 10mL de la muestra y transferir a un beaker de 25mL.
 - 5) Introducir el potenciómetro dentro de la muestra, de manera que el electrodo este completamente sumergido.
 - 6) Esperar que la lectura del pH sea estable y anotar el resultado. Este dato será tomado como pH inicial (lavar con agua destilada entre cada lectura realizada).
 - 7) Incubar las muestras a temperatura y tiempo óptimo.
 - 8) Tomar nuevamente el pH de la muestra. Este dato será tomado como pH final.
 - 9) Realizar en triplicado.

G. Determinación de la capacidad buffer

1. Materiales, equipos y reactivos

- a. Cajas petri
- b. Pipeta de vidrio de 10mL
- c. Bulbo
- d. Bureta
- e. Tubos de vidrio con tapadera
- f. Erlemeyers de 25mL
- g. Miel primaria
- h. Peptona de carne
- i. Etanol 70%
- j. HCl 0.139N
- k. NaOH
- l. Fenolftaleína como indicador
- m. Soluciones buffer para calibración, pH 4, pH7 y pH10
- n. Cultivo aislado de la bacteria(s) a analizar
- o. Balanza
- p. Espátula
- q. Mechero
- r. Chispero

- s. Asas
- t. Incubadora
- u. Estufa con agitación
- v. Agitadores magnéticos
- w. Potenciómetro

2. Procedimiento

- a. Preparación de una solución de NaOH 0.1N
 - 1) Para 1L de solución: pesar 4g de NaOH y en un balón aforar con agua destilada a 1000mL.

- b. Valoración de la solución de NaOH
 - 1) Utilizando una pipeta volumétrica, tomar 10mL de la solución de NaOH y añadirla a un erlenmeyer de 25mL.
 - 2) Armar el sistema correspondiente para realizar la valoración, utilizando una base, una pinza y una probeta con la solución de HCl.
 - 3) Agregar 3 gotas de fenolftaleína a la solución de NaOH coloreando la solución con un tono rosado/violeta.
 - 4) Añadir gota a gota la solución de HCl, manteniendo una constante agitación, hasta que se dé un cambio en la coloración de violeta a incoloro.
 - 5) Registrar los mililitros de HCl utilizados.

- c. Determinación de la capacidad buffer
 - 1) Calibrar el potenciómetro con el mismo procedimiento mencionado anteriormente.
 - 2) Realizar tubos con medio MP25.
 - 3) Utilizando un cultivo fresco previamente aislado, realizar una suspensión de la bacteria equivalente a una concentración de un estándar de McFarland 0.5.
 - 4) Utilizar como control negativo el medio de cultivo sin inóculo.
 - 5) Incubar la muestra a temperatura y tiempo óptimo.
 - 6) Tomar 10mL de la muestra y transferir a un beaker de 25mL.
 - 7) Introducir el potenciómetro dentro de la muestra, de manera que el electrodo este completamente sumergido.
 - 8) Esperar que la lectura del pH sea estable y anotar el resultado (lavar con agua destilada entre cada lectura realizada).
 - 9) Añadir poco a poco la solución de NaOH hasta obtener un cambio de una unidad de pH del inicial.
 - 10) Registrar los mililitros de NaOH agregados y mediante cálculos estequiométricos obtener la capacidad buffer de la muestra analizada.

H. Datos estadísticos obtenidos para las distintas fases del proceso.

A continuación se muestran las tablas resultantes de las pruebas estadísticas para cada fase de la investigación, en las que se encuentran marcados los datos de significancia de cada prueba (valor p).

1. Cuadro 7. Análisis estadístico Shapiro-Wilk para la determinación de la normalidad de los datos, para la fase de determinación del cambio de pH por producción de ácidos débiles. *K. oxytoca* (bacteria 1), *Klebsiella spp.* (bacteria 2), *L. mesenteroides* (bacteria 3) y control negativo (bacteria 4).

Tests of Normality				
		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Diferencia	1	.987	3	.780
	2	.871	3	.298
	3	.987	3	.780
	4	.987	3	.780

a. Lilliefors Significance Correction

(R Core Team. 2012)

2. Cuadro 8. Test de homogeneidad de varianzas para la fase de determinación del cambio de pH por producción de ácidos débiles.

Test of Homogeneity of Variances			
Diferencia			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.506	3	8	.069

(R Core Team. 2012)

3. Cuadro 9. ANOVA con un nivel de confianza del 95% para comparar la diferencia entre los promedios de cambio de pH obtenidos para las dos cepas aisladas y el control positivo *L. mesenteroides*.

ANOVA

Diferencia

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.566	3	1.189	130.519	3.92E-7
Within Groups	.073	8	.009		
Total	3.639	11			

(R Core Team. 2012)

4. Cuadro 10. Prueba de rangos multiples de Tukey para comparación y verificación de similitud entre los promedios de cambio de pH obtenidos.

En la tabla se encuentra marcado el grupo de datos que poseen los valores de cambio de pH más similares, siendo estos los más altos (*K. oxytoca* y *Klebsiella spp.*).

Homogeneous Subsets

Diferencia

Tukey HSD^a

Bacteria	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
4	3	.3633		
3	3		.6267	
2	3			1.4833
1	3			1.6433
Sig.		1.000	1.000	.246

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

(R Core Team. 2012)

5. Cuadro 11. Base de datos utilizada para los estadísticos realizados para la evaluación de los desinfectantes.

Código	Bacteria	Desinfectante	Dilución
1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	SMB	Puro
2	<i>Klebsiella sp.</i>	QUAT 25	10 ⁻¹
3	<i>L. mesenteroides</i>	Busan	10 ⁻²
4	Control negativo	β-Stab	10 ⁻³
5		Magnacide	10 ⁻⁴
6		SMB C	Control

6. Cuadro 12. Análisis estadístico Shapiro-Wilk para la determinación de la normalidad de los datos, para la fase de evaluación de desinfectantes para *K. oxytoca* (bacteria 1) y *Klebsiella spp.* (bacteria 2). Los datos mostrados no incluyen la dilución 10^{-4} ni los desinfectantes β -Stab y QUAT 25. Los valores marcados presentan los datos normales.

Tests of Normality^{b,c,d}

Bacteria	Desinfectante	Dilucion	Shapiro-Wilk			
			Statistic	df	Sig.	
1	1	Halo	1	.750	3	.000
		Halo	2	.750	3	.000
		Halo	3	.987	3	.780
	3	Halo	1	.923	3	.463
			2	.923	3	.463
			3	.999	3	.935
	5	Halo	1	1.000	3	1.000
			2	1.000	3	1.000
			3	.750	3	.000
	6	Halo	1	.971	3	.672
			2	.923	3	.463
			3	.862	3	.274
2	1	Halo	1	.964	3	.637
		Halo	2	.750	3	.000
		Halo	3	.923	3	.463
	3	Halo	1	.750	3	.000
			2	.750	3	.000
			3	.750	3	.000
	5	Halo	1	.750	3	.000
			2	.750	3	.000
			3	.871	3	.298
	6	Halo	1	.987	3	.780
			2	1.000	3	1.000
			3	.964	3	.637

(R Core Team. 2012)

7. Cuadro 13. Análisis estadístico Kruskal-Wallis con un nivel de confianza del 95%, para la evaluación del efecto de los desinfectantes según bacteria y dilución, tomando únicamente las muestras con valores no normales. Se encuentran marcados los valores que muestran datos con diferencia significativa, que para este caso fueron todos. Esto muestra diferencia significativa entre las tres diluciones para cada uno de los desinfectantes.

Kruskal-Wallis Test

Ranks

Test Statistics^{a,b}

Bacteria	Desinfectante		Halo
1	1	Chi-Square	7.322
		Df	2
		Asymp. Sig.	.026
	5	Chi-Square	7.261
		Df	2
		Asymp. Sig.	.027
2	1	Chi-Square	7.261
		Df	2
		Asymp. Sig.	.027
	3	Chi-Square	7.385
		Df	2
		Asymp. Sig.	.025
5	Chi-Square	7.322	
	Df	2	
	Asymp. Sig.	.026	

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Dilución

(R Core Team. 2012)

8. Cuadro 14. Test de homogeneidad de varianzas para la evaluación de desinfectantes evaluando únicamente los datos con un comportamiento normal.

Test of Homogeneity of Variances

Halo

Bacteria	Desinfectante	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1	3	2.260	2	6	.186
	6	1.861	2	6	.235
2	6	1.169	2	6	.373

(R Core Team. 2012)

9. Cuadro 15. ANOVA con un nivel de confianza del 95%, para la evaluación del efecto de los desinfectantes según bacteria y dilución. Dicho análisis tomó en cuenta únicamente los datos con valores normales. Se encuentran marcados los valores que muestran datos con diferencia significativa. El dato marcado con color verde muestra el único desinfectante para el cual no existe diferencia significativa entre el efecto obtenido para las tres diluciones evaluadas.

ANOVA

Halo

Bacteria	Desinfectante		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	3	Between Groups	5.136	2	2.568	9.510	.014
		Within Groups	1.620	6	.270		
		Total	6.756	8			
	6	Between Groups	3.162	2	1.581	.833	.479
		Within Groups	11.387	6	1.898		
		Total	14.549	8			
2	6	Between Groups	6.847	2	3.423	106.241	.000
		Within Groups	.193	6	.032		
		Total	7.040	8			

(R Core Team. 2012)