



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS *Weissella confusa* Y
Leuconostoc mesenteroides EN JUGOS DE CAÑA DE UN
INGENIO AZUCARERO ESTUDIANDO SU
SUSCEPTIBILIDAD A DOS BIOCIDAS COMERCIALES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

NORMA ANGÉLICA SAMPEDRO MÁRQUEZ



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Pedro Valle Vega
VOCAL: Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa
SECRETARIO: M. en Adm. Ind. Landy Irene Ramírez Burgos
1er. SUPLENTE: M. en C. Rolando Salvador García Gómez
2° SUPLENTE: Dra. Marisela Bernal González

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios 301, 302, 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Marisela Bernal González

SUSTENTANTE:

Sampedro Márquez Norma Angélica

Glosario

%	Porcentaje
°Bx	Grados Brix
°C	Grados centígrados
CB	Cloruro de benzalconio
CENICAÑA	Centro de Investigación de la Caña de Azúcar
CH ₂ O	Formaldehído
CONADESUCA	Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar
COOH	Grupo carboxilo
CO ₂	Dióxido de carbono
DOF	Diario Oficial de la Federación
Estructura anfipática	Se trata de una molécula que posee dos propiedades una hidrofílica y otra hidrofóbica
Fermentación	Según <i>Louis Pasteur</i> , quien creó este término, la fermentación es un fenómeno que ocurre cuando se ponen en contacto la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y la glucosa en condiciones anaerobias y se produce alcohol etílico y dióxido de carbono. Por ello, cualquier otra reacción bioquímica NO es una fermentación es una BIORREACCIÓN. En esta investigación se usará fermentación justamente para esta reacción bioquímica y a las demás se les denominará biorreacciones
g	Gramos
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
ha	Hectárea
INAZUCAR	Instituto Azucarero Dominicano
kg	Kilogramos
kPa	Kilopascales
L	Litros
lb	Libras
m ³	Metro cúbico
MAK	Sensibilización cutánea por sus siglas en inglés
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MRS	Man Rogosa Sharpie, siglas para este medio de cultivo
MS	Metam sodio o metam-sodio, siglas para este biocida
NH ₄	Amoniaco
O ₂	Oxígeno molecular
OMS	Organización Mundial de la Salud
PIB	Producto interno bruto

Glosario

ppm	Partes por millón, mg/kg
SAGARPA	Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación de los Estados Unidos Mexicanos
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca de los Estados Unidos Mexicanos
SSI	Solución salina isotónica
UFC	Unidades formadoras de colonias
v/v	Volumen a volumen
TLV	Concentración máxima permisible (valor techo) con respecto al aire, siglas en inglés para este término
Turbidez McFarland	Se trata de una escala de turbidez que indica el número de bacterias (UFC) por mililitro, la escala va de 0.5 (10^6 UFC/mL) a 10 (30×10^8 UFC/mL)

Símbolos griegos

μL	Microlitro
---------------	------------

Nota: Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

Índice

Índice		Pág.
Resumen		1
	Capítulo I	
1.	Problemática	3
1.1.	Introducción	3
1.2.	Justificación	4
1.3.	Objetivos	4
1.3.1.	Objetivo general	4
1.3.2.	Objetivo particular	4
1.4.	Hipótesis	5
	Capítulo II	
2.	Antecedentes	6
2.1.	Caña de azúcar	6
2.2.	Industria azucarera en México	6
2.3.	Proceso de obtención de azúcar	7
2.3.1.	Cultivo de la caña de azúcar	7
2.3.2.	Quema	8
2.3.3.	Corte de la caña	9
2.3.4.	Transporte a la fábrica	9
2.3.5.	Picado de la caña	9
2.3.6.	Molienda	9
2.3.7.	Clarificación	10
2.3.8.	Evaporación	10
2.3.9.	Cristalización y centrifugación	11
2.3.10.	Secado y enfriado	11
2.4.	Microorganismos en la industria azucarera	12
2.4.1.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	13
2.4.2.	<i>Weissella confusa</i>	14
2.5.	Pruebas bioquímicas	15
2.5.1.	Catalasa	15
2.5.2.	Descarboxilación de arginina	16
2.5.3.	Biodegradación de arabinosa	17
2.6.	Biocidas en la industria azucarera	18
2.6.1.	Cloruro de benzalconio (CB)	18
2.6.2.	Metam-sodio (MS)	19
2.6.3.	Formaldehído	20
	Capítulo III	
3.	Metodología	24
3.1.	Equipo y reactivos	24
3.2.	Diseño experimental	25
3.3.	Procedimiento	25
3.3.1.	Preparación del medio de cultivo agar MRS	25
3.3.2.	Preparación de agua peptonada	25
3.3.3.	Lavado y pelado de caña	25

Índice

	Pág.
3.3.4. Toma de la muestra	26
3.3.5. Inoculación y lectura	26
3.3.6. Pruebas primarias	26
3.3.6.1. Tinción de Gram (Ramírez <i>et al.</i> , 2008)	26
3.3.6.2. Tinción de cápsula (Ramírez <i>et al.</i> , 2008)	27
3.3.7. Pruebas bioquímicas	27
3.3.7.1. Catalasa	27
3.3.7.2. Descarboxilación de arginina	27
3.3.7.3. Biodegradación de arabinosa	28
3.3.8. Prueba automatizada en el equipo VITEK 2	29
3.3.9. Preparación de los biocidas de estudio	29
3.3.9.1. Cloruro de benzalconio (CB)	29
3.3.9.2. Metam-sodio (MS)	29
3.3.9.3. Formaldehído	30
3.3.10. Pruebas de resistencia a biocidas	30
3.4. Análisis estadístico	31
Capítulo IV	
4. Resultados y discusión	32
4.1. Inoculación y lectura	32
4.2. Pruebas primarias	33
4.3. Pruebas bioquímicas	35
4.3.1. Catalasa	35
4.3.2. Descarboxilación de arginina	35
4.3.3. Biodegradación de arabinosa	36
4.4. Prueba automatizada en el equipo VITEK 2	36
4.5. Pruebas de resistencia a biocidas	36
4.6. Cloruro de benzalconio (CB)	36
4.7. Metam-sodio (MS)	37
4.8. Formaldehído	38
4.9. Pruebas de antagonismo	39
4.10. Análisis estadístico	40
4.10.1. Tiempo de incubación	40
4.10.2. Prueba de resistencia a biocidas	41
4.10.2.1. Análisis estadístico para cloruro de benzalconio	41
4.10.2.2. Análisis estadístico para metam sodio	44
4.10.2.3. Análisis estadístico para formaldehído	46
4.11. Efecto inhibitorio del segundo experimento	48
Capítulo V	
5. Conclusiones y perspectivas	52
5.1. Conclusiones	52
5.2. Perspectivas	54
Bibliografía	
Anexo I. Aislamiento de bacterias	59
Anexo II. Prueba de VITEK	61
Anexo III. Análisis estadístico de los resultados	64
Anexo IV. Disposición controlada de los residuos producidos	72

Índice de tablas

Índice de Tablas

		Pág.
Tabla 1.	Biocidas utilizados en la industria azucarera y sus características	18
Tabla 2.	Ficha técnica de cloruro de benzalconio (MAPFRE, 2015, con algunas modificaciones)	21
Tabla 3.	Ficha técnica de metam-sodio (Arvizu-Ramos 2010, con modificaciones)	22
Tabla 4.	Ficha técnica de formaldehído (MAPFRE, 2015)	23
Tabla 5.	Reactivos y equipo con distribuidor y especificaciones	24
Tabla 6.	Diseño experimental para seleccionar de la dosis óptima	31
Tabla 7.	Unidades formadoras de colonias, UFC, a diferentes temperaturas para <i>Weissella confusa</i>	32
Tabla 8.	Unidades formadoras de colonias, UFC, a diferentes temperaturas para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	32
Tabla 9.	Halos de inhibición de <i>Weissella confusa</i> , utilizando CB	37
Tabla 10.	Halos de inhibición de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , utilizando CB	37
Tabla 11.	Halos de inhibición de <i>Weissella confusa</i> , utilizando MS	38
Tabla 12.	Halos de inhibición de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , utilizando MS	38
Tabla 13.	Halos de inhibición de <i>Weissella confusa</i> , utilizando formaldehído	39
Tabla 14.	Halos de inhibición de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , utilizando formaldehído	39
Tabla 15.	Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para <i>Weissella confusa</i>	40
Tabla 16.	Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	41
Tabla 17.	Efecto inhibitorio del cloruro de benzalconio (CB) y metam sodio (MS) en porcentaje para la bacteria <i>Weissella confusa</i>	49
Tabla 18.	Efecto inhibitorio del cloruro de benzalconio (CB) y metam sodio (MS) en porcentaje para la bacteria <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	50
Tabla 19.	Comparación del % de efecto inhibitorio para las bacterias de estudio ante los biocidas de estudio (cloruro de benzalconio y metam sodio)	51
Anexos		
Tabla A1.	Comparación de los resultados teóricos presentados por Serna <i>et al.</i> (2010) con los obtenidos en la prueba de VITEK	63
Tabla A2.	Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de <i>Weissella confusa</i> ante CB	64
Tabla A3.	Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de <i>Weissella confusa</i> ante las dosis de CB	64
Tabla A4.	Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de <i>Weissella confusa</i> ante MS	65
Tabla A5.	Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de <i>Weissella confusa</i> ante las dosis de MS	66
Tabla A6.	Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de <i>Weissella confusa</i> ante formaldehído	66

Índice de tablas

		Pág.
Tabla A7.	Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de <i>Weissella confusa</i> ante las dosis de formaldehído	67
Tabla A8.	Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ante CB	68
Tabla A9.	Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ante las dosis de CB	68
Tabla A10.	Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ante MS	69
Tabla A11.	Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ante las dosis de MS	70
Tabla A12.	Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ante formaldehído	70
Tabla A13.	Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ante las dosis de CB	71

Índice de figuras

		Pág.
Figura 1.	Participación estatal de caña de azúcar molida 2012/2013 (CONADESUCA, 2015)	7
Figura 2.	Proceso de obtención de azúcar (CENICAÑA, 2010)	8
Figura 3.	Etapa de cristalización y centrifugación (CENICAÑA, 2010)	12
Figura 4.	Síntesis de dextrana a partir de Sacarosa (Larrahondo, 1995)	14
Figura 5.	Reacción del peróxido de hidrogeno y la enzima catalasa, (MacFaddin, 2003)	15
Figura 6.	Sistema de arginina dihidrolasa, (MacFaddin, 2003)	16
Figura 7.	Descarboxilación de la arginina, (MacFaddin, 2003)	17
Figura 8.	Estructura del cloruro de benzalconio (Shandong IRO, 2016)	19
Figura 9.	Estructura del metam-sodio (Bonilla-Vidal, 2013)	19
Figura 10.	Estructura del formaldehído (McMurry, 2008)	20
Figura 11.	Colonias en agar MRS de <i>Weissella confusa</i>	33
Figura 12.	Tinción de Gram y agrupación para <i>Weissella confusa</i>	33
Figura 13.	Tinción de cápsula para <i>Weissella confusa</i>	33
Figura 14.	Colonias en agar MRS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	34
Figura 15.	Tinción de Gram y agrupación para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	34
Figura 16.	Tinción de cápsula para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	34
Figura 17.	Prueba negativa de catalasa para <i>Weissella confusa</i>	35
Figura 18.	Prueba negativa de catalasa para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	35
Figura 19.	Tubo de referencia de la prueba descarboxilación de arginina	35
Figura 20.	Prueba (+) de descarboxilación de arginina para <i>Weissella confusa</i>	35
Figura 21.	Prueba (-) de descarboxilación de arginina para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	35
Figura 22.	Tubo de referencia de la prueba biodegradación de arabinosa	36
Figura 23.	Prueba (-) de biodegradación de arabinosa para <i>Weissella confusa</i>	36
Figura 24.	Prueba (+) de biodegradación de arabinosa para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	36
Figura 25.	Prueba de antagonismo para <i>Weissella confusa</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	40
Figura 26.	Prueba de antagonismo para <i>Weissella confusa</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	40
Figura 27.	Promedio de inhibición para <i>Weissella confusa</i> a diferentes dosis de CB	42
Figura 28.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Weissella confusa</i> a diferentes dosis de CB	42
Figura 29.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Weissella confusa</i> a diferentes tiempos	42
Figura 30.	Promedio de inhibición para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a diferentes dosis de CB	43

Índice de figuras

		Pág.
Figura 31.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a diferentes dosis de CB	43
Figura 32.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a diferentes tiempos	43
Figura 33.	Promedio de inhibición para <i>Weissella confusa</i> a diferentes dosis de MS	44
Figura 34.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Weissella confusa</i> a diferentes dosis de MS	44
Figura 35.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Weissella confusa</i> a diferentes tiempos	44
Figura 36.	Promedio de inhibición para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a diferentes dosis de MS	45
Figura 37.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a diferentes dosis de MS	45
Figura 38.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a diferentes tiempos	45
Figura 39.	Promedio de inhibición para <i>Weissella confusa</i> a diferentes dosis de formaldehído	46
Figura 40.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Weissella confusa</i> a diferentes dosis de formaldehído	47
Figura 41.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Weissella confusa</i> a diferentes tiempos	47
Figura 42.	Promedio de inhibición para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a diferentes dosis de formaldehído	47
Figura 43.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a diferentes dosis de formaldehído	48
Figura 44.	Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a diferentes tiempos	48
Figura 45.	Gráfico de cajas y bigotes para el % de efecto inhibitorio para <i>Weissella confusa</i> vs biocida (cloruro de benzalconio y metam sodio)	49
Figura 46.	Gráfico de cajas y bigotes para el % de efecto inhibitorio para <i>Leuconostoc mesenteroides</i> vs biocida (cloruro de benzalconio y metam sodio)	50
Figura 47.	Gráfico de la comparación del % de efecto inhibitorio de <i>Weissella confusa</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> vs biocida (cloruro de benzalconio y metam sodio)	51
Figura 48.	Gráfico de cajas y bigotes para el % de efecto inhibitorio vs bacteria de estudio (<i>Weissella confusa</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	51
ANEXOS		
Figura A1.	Aislamiento masivo de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a las 24 horas	59
Figura A2.	Aislamiento masivo de <i>Weissella confusa</i> a las 24 horas	59
Figura A3.	Aislamiento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> a las 72 horas	59
Figura A4.	Aislamiento de <i>Weissella confusa</i> a las 72 horas	59
Figura A5.	Aislamiento por agotamiento de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	59
Figura A6.	Aislamiento por agotamiento de <i>Weissella confusa</i>	59

Índice de figuras

		Pág.
Figura A7.	Cocos Gram negativos y cocobacilos Gram positivos obtenidos del aislamiento	59
Figura A8.	Cocos Gram negativos obtenidos del aislamiento	59
Figura A9.	Cocobacilos Gram positivos con ausencia de cápsula obtenidos del aislamiento	60
Figura A10.	Micrococos Gram positivos agrupados en cadenas cortas o pares	60
Figura A11.	Cocos Gram positivos agrupados en tétradas	60
Figura A12.	Cocobacilos Gram positivos agrupados en cadenas cortas	60
Figura A13.	Formato de Registro de la prueba de VITEK para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	61
Figura A14.	Formato de Registro de la prueba de VITEK para <i>Weissella confusa</i>	61

Resumen

La industria azucarera es de gran relevancia económica y social en México. Sin embargo, uno de los mayores problemas durante su procesamiento está representado por la obtención del jugo. En este punto del proceso existen pérdidas de sacarosa del 3-5% debido a la presencia de *Leuconostoc mesenteroides*, una bacteria ácido láctica que, a partir de sacarosa, produce dextranas, por lo que se utilizan productos para la desinfección y/o sanitización de la caña de azúcar, tales como ditiocarbamatos, cloruro de benzalconio y otras sales cuaternarias de amonio como bicloruro de amonio y formaldehído. El uso de reactivos químicos para el control de microorganismos en la industria alimentaria se ve confrontado con el hecho de que pueden ser tóxicos al humano o dañar al ambiente. Por ello, una alternativa sería la de utilizar la especie *Weissella confusa*, la cual es una bacteria ácido láctica heterofermentativa, utilizada por su actividad bactericida que podría reducir la cantidad de biocida sintético utilizado actualmente en la industria de extracción del jugo de caña. Es esta última una de las razones por las que se realizó dicha investigación. El objetivo es aislar e identificar otra de las bacterias predominantes en el jugo de caña, justamente *Weissella confusa*, comprobar su susceptibilidad a dos biocidas, cloruro de benzalconio y metam-sodio, comparando las dosis empleadas para inhibir a *Leuconostoc mesenteroides* y determinar si *Weissella confusa* puede actuar de forma antagónica o como bacteriocida ante *Leuconostoc mesenteroides*. Para ello se realizó una toma de muestra, inoculación y lectura para determinar a las bacterias presentes en el jugo de caña. Las colonias características fueron seleccionadas y aisladas para su posterior identificación. Una vez identificadas las bacterias de estudio fueron sometidas a una prueba de difusión en disco para evaluar su susceptibilidad. En esta etapa se usó un tercer biocida como control, el formaldehído. Esta prueba fue realizada para ambas bacterias utilizando las mismas concentraciones de los biocidas de prueba e incubando las placas a 35°C por 24, 48 y 72 horas. Se midió el diámetro del halo de inhibición y, por último, se realizó un análisis estadístico para conocer si existía diferencia significativa entre el efecto inhibitor de cada biocida para las bacterias de estudio. Los resultados obtenidos muestran que se aisló del jugo de caña a *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*. El halo de inhibición promedio para el formaldehído es de 11.78 mm

para *Weissella confusa* mientras que para *Leuconostoc mesenteroides* es de 10.3 mm, los cuales fueron tomados como referencia debido a que se conoce su poder biocida. Los porcentajes de efecto inhibitorio tomando como referencia al formaldehído fueron, para el cloruro de benzalconio una inhibición de 93.80, 102.21 y 117.15% con *Weissella confusa*, mientras que para *Leuconostoc mesenteroides* fueron de 103.88, 113.59 y 122.33% utilizando concentraciones de 10, 15 y 20 mg L⁻¹, respectivamente, el metan sodio presentó para *Weissella confusa* 0, 67.32 y 87.69% y *Leuconostoc mesenteroides* 0, 74.76 y 80.58% utilizando concentraciones de 30, 40 y 45 mg L⁻¹, por lo que el porcentaje de eficiencia de cada uno de los biocidas es mayor para inhibir el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* que para *Weissella confusa*. Finalmente, esta última no presentó un efecto antagónico al *Leuconostoc mesenteroides* por lo que no puede actuar como un biocida natural.

Palabras clave: *Weissella confusa*, *Leuconostoc mesenteroides*, biocidas, cloruro de benzalconio, metan sodio, formaldehído

1. Problemática

1.1. Introducción

En México la industria azucarera es una de las actividades con mayor tradición y trascendencia en el desarrollo histórico (Crespo, 1988), teniendo también una gran relevancia económica y social en el campo; genera más de dos millones de empleos, tanto en forma directa como indirecta y generando un valor de producción primaria alrededor de 30 mil millones de pesos (SAGARPA, 2012). Durante la producción de azúcar uno de los compuestos indeseables son las dextranas, las cuales son sintetizadas a partir de sacarosa por microorganismos contaminantes, que provocan pérdidas significativamente al incrementar la viscosidad en los fluidos y reducir el recobrado industrial (Jiménez, 2005). Uno de los principales microorganismos contaminantes y productora de dextrana¹ es la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, la cual puede causar pérdidas del 3-5 % en masa debido a su multiplicación continua.

Uno de los puntos críticos del proceso de la caña es la extracción del jugo, pues representa pérdidas de azúcar de un 13% por inversión química; un 25% por efecto enzimático y un 62% por inversión microbiológica, debido a que se presentan condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos, como es el caso de *Leuconostoc mesenteroides*, que a partir de la sacarosa produce cantidades apreciables de dextrana (Arvizu-Bernal y Ramos-Medina, 2010). Es esta la razón por la que se lleva un control de dichos microorganismos contaminantes mediante el uso de biocidas tales como: ditiocarbamatos, cloruro de benzalconio, y otras sales cuaternarias de amonio como bifluoruro de amonio y formaldehído (Kochergin, 2002). Sin embargo, de acuerdo con Cuervo-Mulet *et al.* (2010), el uso de reactivos químicos para el control de microorganismos en la industria alimentaria pueden ser tóxicos al humano o dañar al ambiente. Existen reportes científicos de la producción de bacteriocidas por el género *Weissella*.

¹ Las gomas tienen la terminación -ana después del nombre abreviado del glúcido de origen. Por tanto, debe decirse dextrana (proveniente de la dextrosa o glucosa) (Nota de la asesora)

1.2. Justificación

Los productos que se han utilizado para la desinfección y/o sanitización de la caña de azúcar son: ditiocarbamatos, cloruro de benzalconio y otras sales cuaternarias de amonio como bifluoruro de amonio y formaldehído (Kochergin, 2002). Sin embargo, el uso de reactivos químicos para el control de microorganismos en la industria alimentaria se ve confrontado con el hecho de que pueden ser tóxicos al humano o dañar al ambiente (Cuervo-Mulet *et al.*, 2010). Por ello, una alternativa es utilizar la especie *Weissella confusa*, la cual es una bacteria ácido láctica heterofermentativa, utilizada por su actividad bactericida que puede reducir la cantidad de biocida sintético utilizado actualmente en la industria de extracción del jugo de caña, ya que se ha estudiado el efecto antagónico de *Weissella confusa* contra *Streptococcus dysgalactiae* ATCC27957 y *Escherichia coli* (Espeche *et al.*, 2009) y contra especies de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, principales patógenos causales de mastitis bovina (Serna-Cock *et al.*, 2010).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Identificar dos bacterias predominantes en jugo de caña de azúcar, (*Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*) evaluando la susceptibilidad a dos biocidas comerciales (cloruro de benzalconio y metam de sodio) y comparando las dosis empleadas para cada una de ellas.

1.3.2. Objetivo particular

- Revisar las características que presenta la bacteria *Weissella confusa*, así como las aplicaciones que éstas tienen en los diferentes campos de la ciencia
- Aislar a *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella confusa* en el jugo de caña de un ingenio azucarero

- Identificar a *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella confusa* en el jugo de caña de un ingenio azucarero
- Evaluar la susceptibilidad de *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* en presencia de dos biocidas comercial y comparar la dosis empleada
- Usar al formaldehído como biocida de referencia en la comparación de los dos biocidas en esta investigación
- Determinar si *Weissella confusa* puede actuar de forma antagónica o como bacteriocida ante *Leuconostoc mesenteroides*

1.4. Hipótesis

Nula H_0 = La dosis aplicada de biocidas no produce efectos inhibitorios a las bacterias del género *Weissella*

Alternativa H_a = La aplicación de los biocidas produce efectos inhibitorios a las bacterias del género *Weissella*

2. Antecedentes

2.1. Caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es originaria de Nueva Guinea, se trata de una gramínea tropical. Es un pasto gigantesco que posee un tallo macizo que puede tener de dos a cinco metros de altura. Su diámetro puede ser de cinco a seis centímetros. En su tallo se forma y acumula jugo, el cual es rico en sacarosa, compuesto que al ser extraído y cristalizado industrialmente forma el azúcar. Su cultivo se desarrolla en zonas tropicales, durante la siembra se requiere una gran cantidad de agua para permitir la absorción, transporte y asimilación de nutrientes. Su periodo de crecimiento varía entre 11 y 17 meses dependiendo de la zona donde es cultivada (SIAP, 2015). En el mundo existen alrededor de 25 especies reconocidas como caña de azúcar (Zarco-Mercado, 2014).

Su composición depende de la variedad, edad, madurez, clima, suelo y forma de ser cultivada, el tronco de la caña se encuentra compuesto por fibra en un 11 a 16%, de agua en un 73 a 76%, y de sacarosa de un 8 a 15%, siendo esta última la más importante ya que al ser cristalizada se forma azúcar el cual es uno de los productos básicos (Zarco-Mercado, 2014).

2.2. Industria azucarera en México

En México el cultivo de caña de azúcar dio origen a un sistema agroindustrial después de ser introducida por Cortés a Veracruz durante la conquista española. Por ello, esta actividad económica tuvo sus orígenes desde la conquista y hoy en día es una de las actividades con mayor tradición y trascendencia en el desarrollo histórico (Crespo, 1988). En México es considerada una de las actividades más importantes teniendo un área cultivada de 708.3 mil hectáreas (ha), generando más de 440 mil empleos directos y beneficios indirectos a más de 2.2 millones de personas (DOF, 2015), se cuenta con 62 ingenios, pero solamente 58 de ellos se encuentran activos. Esta actividad ha representado el 4.7% del Producto Interno Bruto (PIB) del sector primario y el 2.3% del PIB manufacturero.

En México los mayores estados con números de hectáreas cultivadas es Veracruz que representa un 36.7% del total nacional, Jalisco un 11.4%, San Luis Potosí un 10.3% y el resto lo representan doce estados más.



Fig. 1. Participación estatal de caña de azúcar molida 2012/2013 (CONADESUCA, 2015)

2.3. Proceso de obtención de azúcar

El azúcar es un producto básico para la sociedad ya que es esencial y necesario para la dieta alimenticia. Esta característica no es la única que le da la importancia que representa, puesto que también es de una materia prima esencial para diversas industrias, confitería, panificación, bebidas, productos químicos de sus subproductos como la celulosa, el etanol, etc., etc. Son estas algunas de las razones por las que el cultivo y proceso de obtención de la azúcar se ha vuelto un tema de estudio para muchos investigadores (Fig. 2).

2.3.1. Cultivo de la caña de azúcar

Se prepara el terreno para su cultivo, posteriormente se selecciona una buena semilla, la cual debe de estar libre de plagas y enfermedades, para ser sembrada, se trata de un cultivo poco exigente pues no suele soportar temperaturas inferiores a los 0°C y su

temperatura optima de crecimiento suele ser de 30°C, requiere de abundante agua (Zepeda-Guardado, 2012).

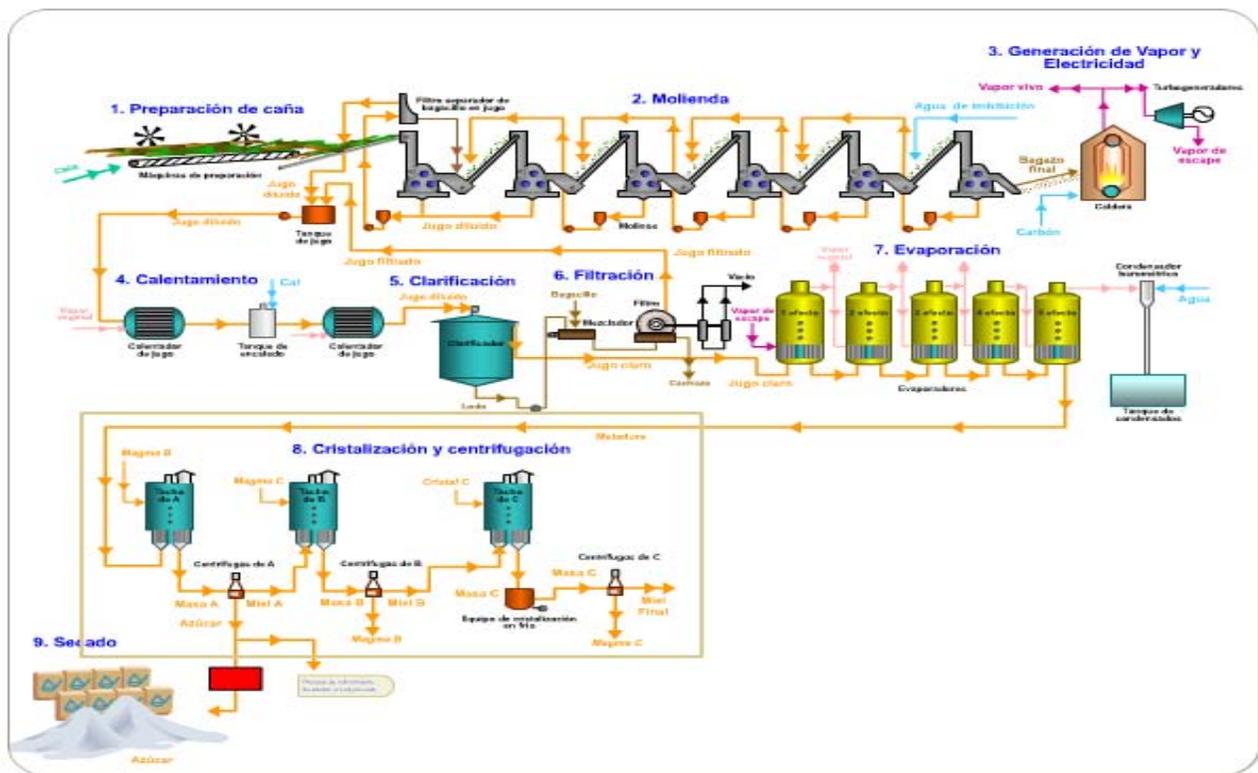


Fig. 2. Proceso de obtención de azúcar (CENICAÑA, 2010)

2.3.2. Quema

Esta operación en campo, que actualmente se considera muy contaminante por la producción de hollín, se debe hacer cuando no es posible técnicamente la cosecha con las plantas verdes. En la quema se eliminan las hojas y se logra la pérdida de turgencia de las hojas que son muy filosas y dañan la piel de los cortadores de caña, ayudando además a ahuyentar a los animales dañinos como las víboras de cascabel. Desafortunadamente, la quema aumenta la temperatura del tallo de 55°C hasta 85°C y no destruye a microorganismos termófilos, ya que se han encontrado posteriormente a esta operación. Además, se ha observado el incremento de dextranas a casi diez veces desde las 12 a las 48 horas (h) de la quema (Bonilla-Vidal, 2013).

2.3.3. Corte de la caña

El corte de la caña puede ser manual o mecánico: para el corte manual se utilizan machetes y los cortadores se agrupan en parejas, cada pareja corta seis surcos que forman una manga. Ésta es ubicada en el centro de los surcos para después ser levantada por las llenadoras y colocada en los camiones.

Por otro lado, el corte mecánico se realiza con máquinas (cosechadoras), las cuales cortan, pican y limpian y envían la caña directamente en el camión. Durante esta operación *Leuconostoc mesenteroides* puede agredir a la caña debido a que hay una exposición del tejido interno de la caña (Zepeda-Guardado, 2012).

2.3.4. Transporte a la fábrica

Una vez cortada la caña, es transportada hacia los ingenios, esperando que el tiempo de traslado no sea mayor a 36 h. Ahí es llevada a las básculas para pesarla. Posteriormente se distribuye en los tándem de molinos. Cada tándem de molido, posee dos vibradoras de caña, una vez que son viradas las cargas de caña, se lavan para quitar la tierra y suciedad que traen del campo (ZAFRANET, 2015).

2.3.5. Picado de la caña

Las picadoras son unos ejes colocados sobre conductores, provistas de dos cuchillas giratorias las cuales cortan los tallos para darles un tamaño uniforme y desmenuzar la caña (CENICAÑA, 2010).

2.3.6. Molienda

La caña preparada por las picadoras es llevada hasta los molinos, los cuales por medio de una compresión extrae el jugo, durante esta etapa se agrega un poco de agua caliente con la finalidad de extraer la mayor cantidad de sacarosa. Esta agua es conocida como de imbibición. El jugo que se extrae en esta etapa se conoce como jugo mixto, el cual tiene un pH de 5.0 a 5.6. Es abundante en sales orgánicas e inorgánicas, y tiene una cantidad de sólidos totales de 10 a 18°Bx. Se considera un medio ideal para la proliferación de microorganismos. La cantidad de microorganismos presentes en jugos obtenidos puede variar dependiendo de la caña, pues para cañas normales el

recuento es de 10^5 a 10^7 UFC/mL, mientras que para cañas ácidas es de 10^8 UFC/mL (Bonilla-Vidal, 2013).

Esta operación es un punto crítico en la obtención de azúcar puesto que las condiciones de operación de los molinos y la calidad de la caña, contribuyen a la pérdida de sacarosa de un 13% por inversión química; un 25% por efecto enzimático y un 62% por inversión microbiológica, debido a que se presentan condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos, como es el caso de *Leuconostoc mesenteroides*, que a partir de la sacarosa produce cantidades apreciables de dextranas (Arvizu-Bernal y Ramos-Medina, 2010).

2.3.7. Clarificación

En esta operación el jugo que es obtenido de la molienda, que es ácido ya que posee un pH aproximado de 5.0 a 5.6, es opaco y turbio, por lo que es tratado con una lechada de cal mediante un tratamiento térmico a 105°C aproximadamente. Este procedimiento se realiza con la finalidad de elevar el pH para disminuir las pérdidas de sacarosa. También se logra la precipitación de las impurezas orgánicas e inorgánicas formándose un lodo llamado cachaza los cuales son sólidos que no son considerados glúcidos. Por el fondo del clarificador sale la cachaza y por la parte superior el jugo clarificado. La cachaza es filtrada y lavada para recuperar la mayor cantidad posible de jugo y de sacarosa. Posteriormente, es enviada al campo donde se usa como mejorador de los suelos. De esta manera el jugo clarificado se manda a los tanques evaporadores (Bonilla-Vidal, 2013).

2.3.8. Evaporación

Este proceso es llevado a cabo en evaporadores al vacío de efecto múltiple, conocidos coloquialmente como “tachos” en la industria azucarera. En esta operación unitaria se elimina la mayor cantidad de agua posible en el jugo, con la finalidad de obtener la meladura (jarabe). En esta etapa es importante la ausencia de dextranas, ya que estas pueden provocar un mayor gasto energético por el aumento de la viscosidad, además de aumentar el tiempo de cocción de las masas, provocando el agotamiento de las mismas (INAZUCAR, 2015).

2.3.9. Cristalización y centrifugación

Una vez concentradas las meladuras se lleva a cabo la cristalización del azúcar en “tachos” al vacío de simple efecto, donde el jarabe se sigue evaporando para formar soluciones saturadas de sacarosa denominadas templeas. Por lo general, en la industria se utilizan tres tachos (Fig. 3), de los cuales se obtienen tres tipos de “masas cocidas”. La masa A obtenida del tacho A es una mezcla de cristales de sacarosa y miel, la cual al pasar por una de las centrifugas da como resultado el azúcar que se comercializa.

La miel A, la cual alimenta al segundo tacho, da la masa B de cristales, que al ser centrifugados producen el magma B, utilizado como semilla en la cristalización del tacho A. La miel B que se obtiene de esta segunda separación se alimenta al “tacho” C, en el cual se pasa por un equipo de cristalización en frío llevando a cabo un agotamiento de la masa C por disminución de la solubilidad ante una caída de la temperatura. Estos pequeños cristales también son usados como semilla de cristalización.

Las llamadas mieles finales o melazas de la salida del “tacho” C ya tienen muy poca sacarosa por lo que son enviadas a tanques de almacenamiento para su uso, sobre todo, como fuente de carbono para la industria biotecnológica (producción de antibióticos, vacunas, aminoácidos esenciales, etanol, etc.) (CENICAÑA, 2010).

2.3.10. Secado y enfriado

El azúcar húmeda es transportada por elevadores y bandas para alimentar las secadoras que son elevadores rotatorios en los cuales el azúcar se coloca en contacto con el aire caliente que circula en contracorriente, se debe de tener una humedad aproximada de 0.05% con la finalidad de evitar la formación de terrones. El proceso de enfriado se lleva a cabo a 60°C empleando enfriadores rotatorios inclinados en los que fluye aire frío en contracorriente que disminuye su temperatura hasta un 40-45°C, el azúcar enfriado se empaca en sacos de diferente peso (INAZUCAR, 2015).

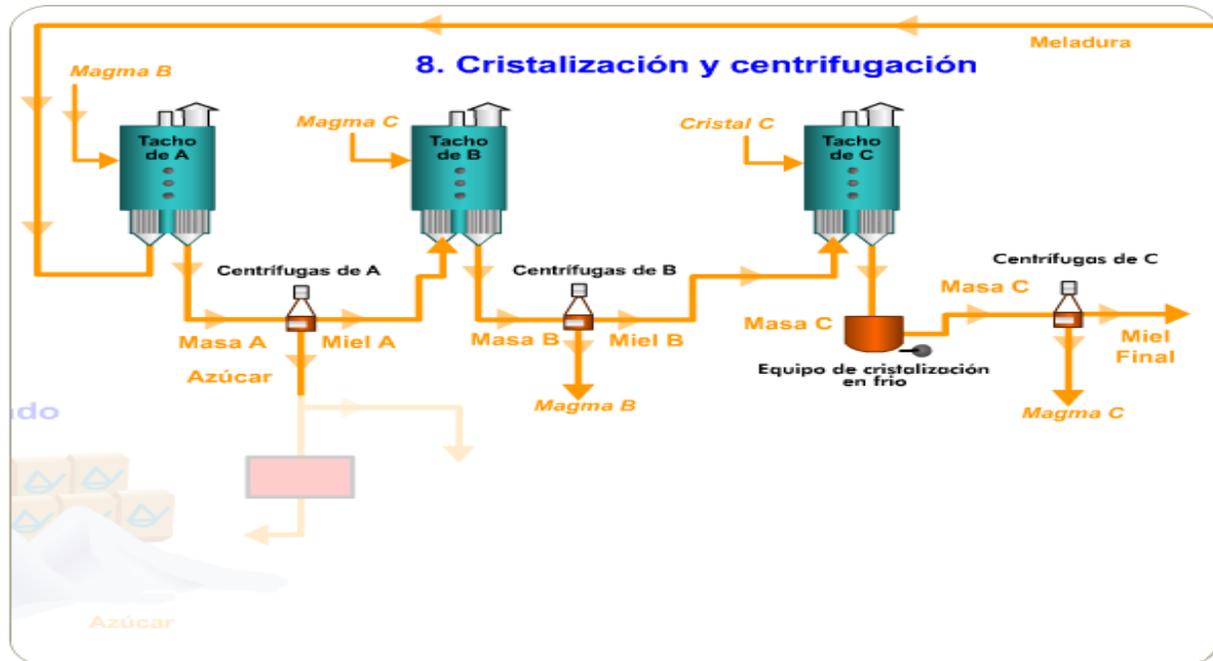


Fig. 3. Etapa de cristalización y centrifugación (CENICAÑA, 2010)

2.4. Microorganismos en la industria azucarera

La presencia de microorganismos en la industria azucarera comienza desde el campo, ya que estos pueden provenir del suelo o de estructuras vegetales en putrefacción, los tres principales grupos de microorganismos que causan deterioro son: mohos, levaduras y bacterias, los cuales en la etapa de extracción del jugo (molienda), representan pérdidas de azúcar en un 62%, debido a la inversión del azúcar por los microorganismos que proliferan en condiciones favorables (Arvizu-Bernal y Ramos-Medina, 2010).

Los principales géneros de mohos que se pueden encontrar presentes son, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Asoperguillus*, *Trichoderma*, *Monilia*, de levaduras *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Kluyvoromyces*, *Hansenula* y de bacterias *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Cytobacterium*, *Micrococcus*, *Staphilicoccus* y *Clostridium*. Algunos estudios recientes muestran que *Leuconostoc mesenteroides*, en las primeras 6 horas de su crecimiento a 30°C, puede consumir hasta 8.6 g L⁻¹/h (Bonilla-Vidal, 2013), provocando la producción

de dextranas y causando grandes pérdidas en los rendimientos de obtención de azúcar.

2.4.1. *Leuconostoc mesenteroides*

El género *Leuconostoc* pertenece a la familia *Leuconostocaceae*, se trata de una bacteria ácido láctica heterofermentativas, con morfología de cocoide ovoide Gram positivo, agrupados en pares o cadenas cortas, son anaerobias facultativas, con ausencia de esporas pero presencia de cápsula, son catalasa negativa, productores de ácido láctico y CO₂, además de ser resistentes a la vancomicina, en agar MRS presenta colonias de forma circular con superficie lisa, translucidas, color crema, con consistencia viscosa, elevación convexa y borde entero, son responsables de la biosíntesis de dextranas y levano extracelular en presencia de sacarosa (Mendoza-Hernández, 2010).

La bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, tiene diversas subespecies tales como: *Leuconostoc mesenteroides* subespecies *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subespecies *dextranicum*, y *Leuconostoc mesenteroides* subespecies *cremoris*. El género *Leuconostoc* no crece a 45°C, son arginina descarboxilasa negativa y algunas de las subespecies no biodegradan la arabinosa.

Durante la obtención de azúcar una de las operaciones críticas del proceso es la extracción del jugo (molienda), ya que el jugo extraído posee una cantidad de sólidos totales de 10 a 18°Bx, un pH de 5.0 a 5.6, abundantes sales orgánicas e inorgánicas y una temperatura de 25 a 30°C (Bonilla-Vidal, 2013), lo que lo hace un medio ideal para la proliferación de ciertos microorganismos. El género *Leuconostoc* juega un importante papel en la producción de azúcar, ya que su presencia durante el proceso puede ocasionar grandes pérdidas, cercanas al 20% del total, debido a que utiliza a la sacarosa para la producción de dextranas (Fig. 4). Estas dextranas no solamente reducen el contenido de azúcar en los jugos sino que aumentan su viscosidad haciendo su manejo mucho más difícil desde el punto de vista tecnológico.

Las dextranas son polisacáridos constituidos por unidades de glucosa en forma de cadena recta mediante enlaces α 1-6. Pueden presentar diferentes ramificaciones en su estructura molecular, dependiendo de la clase de bacteria que las produzca, lo cual

causa diferencia estructural en el polímero (Flores-Santillán y Pérez-Cordero, 2013), para que se considere una dextrana por lo menos entre en 50-60% de la uniones deben ser α 1-6. En la industria azucarera estos compuestos son indeseables debido a que aumentan la viscosidad de los jugos extraídos, obstruye tuberías, y bombas, crean problemas en los elevadores y tachos, además de que prolongan la formación de cristales debido a que se forman cristales en forma de aguja. El agotamiento de las masas es menor y dificulta la eliminación de las mieles en las centrifugas por lo que requiere de un mayor lavado y una mayor circulación de las mieles

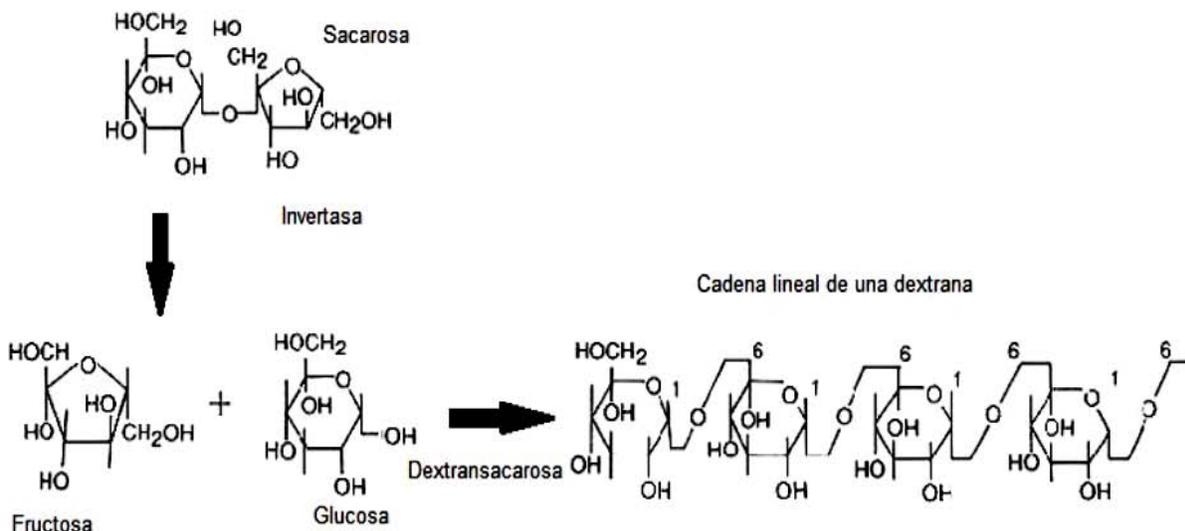


Fig. 4. Síntesis de dextrana a partir de sacarosa (Larrahondo, 1995)

2.4.2. *Weissella confusa*

El género *Weissella* incluye a las especies previamente asignadas a *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Collins *et al.*, 1993). Es una bacteria ácido láctica heterofermentativa, aerobia facultativa, cuya morfología pueden ser cocobacilos cortos, Gram positivos, agrupados en pares o cadenas cortas. Forman colonias pequeñas con elevación convexa, con borde entero, viscosas suaves y, en ocasiones, pueden ser translúcidas u opacas, color crema y, en algunos casos, amarillas muy parecidas a *Leuconostoc mesenteroides* e incluso pueden llegar a confundirse, ya que también son catalasa negativa. Algunas especies del género *Weissella* pueden descarboxilar la arginina y biodegradar la arabinosa.

Hoy en día es una bacteria muy estudiada y esto se debe a su actividad bacteriocida. Existen diversos estudios científicos que muestran la producción de bacteriocinas del género *Weissella*. Espeche *et al.* (2009) aislaron de muestras de leche de bovinos sanos especies de *Weissella paramesenteroides* con efecto antagónico contra *Streptococcus dysgalactiae* ATCC27957 y *Escherichia coli*, Serna-Cock *et al.* (2010) reportaron la actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* aislada de líquido rumial bovino contra especies de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* principales patógenos causales de mastitis bovina, Cock *et al.* (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* los cuales son patógenos causales de enfermedades producidas por alimentos. Por otro lado, Nam *et al.* (2002) encontraron que *Weissella confusa* puede actuar como probiótico que puede reducir la capacidad de infección por *Helicobacter pylori*.

2.5. Pruebas bioquímicas (MacFaddin, 2003)

Las pruebas bioquímicas permiten determinar características metabólicas. Algunas de estas pruebas son rápidas y su lectura puede ser en cuestión de segundos hasta pocas horas, debido a que se evalúa una enzima preformada. Sin embargo, la mayoría de las pruebas detectan componentes metabólicos o la sensibilidad de los microorganismos ante algunas sustancias, por lo que en este caso se requiere el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48 h.

2.5.1. Catalasa

Es una prueba para determinar la presencia de la enzima catalasa. Dicha enzima descompone el peróxido de hidrógeno, el cual es el producto final oxidativo de la degradación aerobia de los glúcidos. La catalasa elimina en forma catalítica los intermediarios de la reducción del oxígeno (Fig. 5).

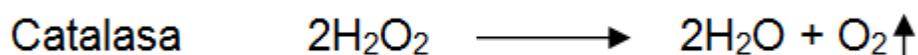


Fig. 5. Reacción del peróxido de hidrógeno y la enzima catalasa (MacFaddin, 2003)

Dicha prueba es llevada a cabo utilizando como reactivo peróxido de hidrógeno al 30% y un cultivo puro de 24 h. El burbujeo inmediato indica la liberación de O₂, por lo que la prueba se considera positiva; es decir, que existiendo la presencia de la enzima catalasa, la prueba se considera negativa al no existir burbujeo.

2.5.2. Descarboxilación de arginina

La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas atacan los aminoácidos en su carboxilo terminal (-COOH) para formar una amina o una diamina y dióxido de carbono. La descarboxilación está restringida a aminoácidos que poseen por lo menos un grupo químicamente activo distinto de una amina (-NH₂) o un grupo -COOH y la degradación de los aminoácidos ocurre en anaerobiosis.

La L-arginina es catabolizado por medio de dos sistemas que pueden ocurrir de manera simultánea o separada. Estas dos vías metabólicas son el sistema de la arginina hidrolasa y arginina descarboxilasa. La primera se realiza en dos pasos, la degradación de L-arginina a L-citrulina, seguida por un sistema que fracciona la citrulina en L-ornitina hasta llegar a putrescina (Fig. 6).

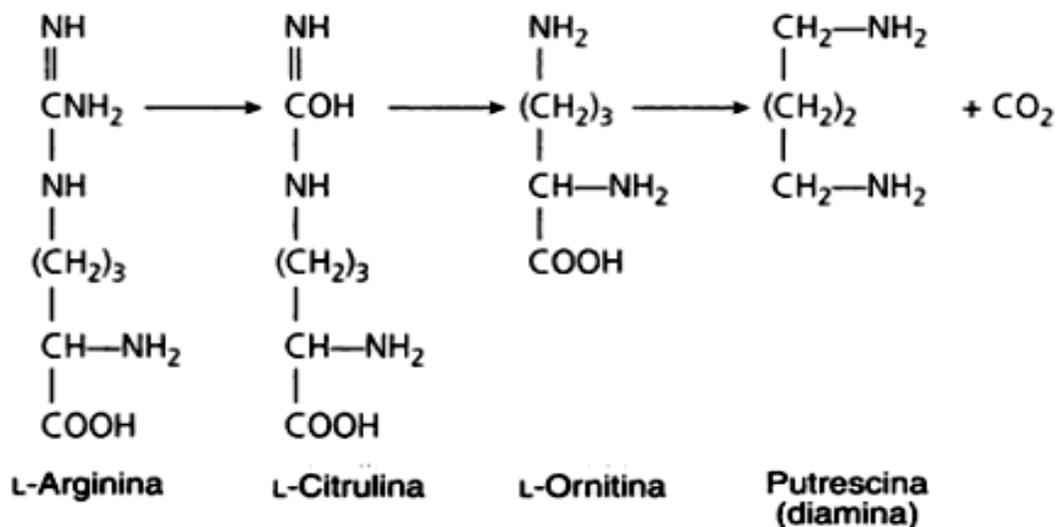


Fig. 6. Sistema de arginina dihidrolasa (MacFaddin, 2003)

En la descarboxilación, antes de llegar al producto final, se produce agmatina la cual es una molécula más grande que la putrescina. Esta última no es considerada como

producto final en el catabolismo, por lo que es degradada mediante dos vías, por la acción de las enzimas agmatinasa y agmatina dihidrolasa, hasta llegar a su producto final (Fig. 7).

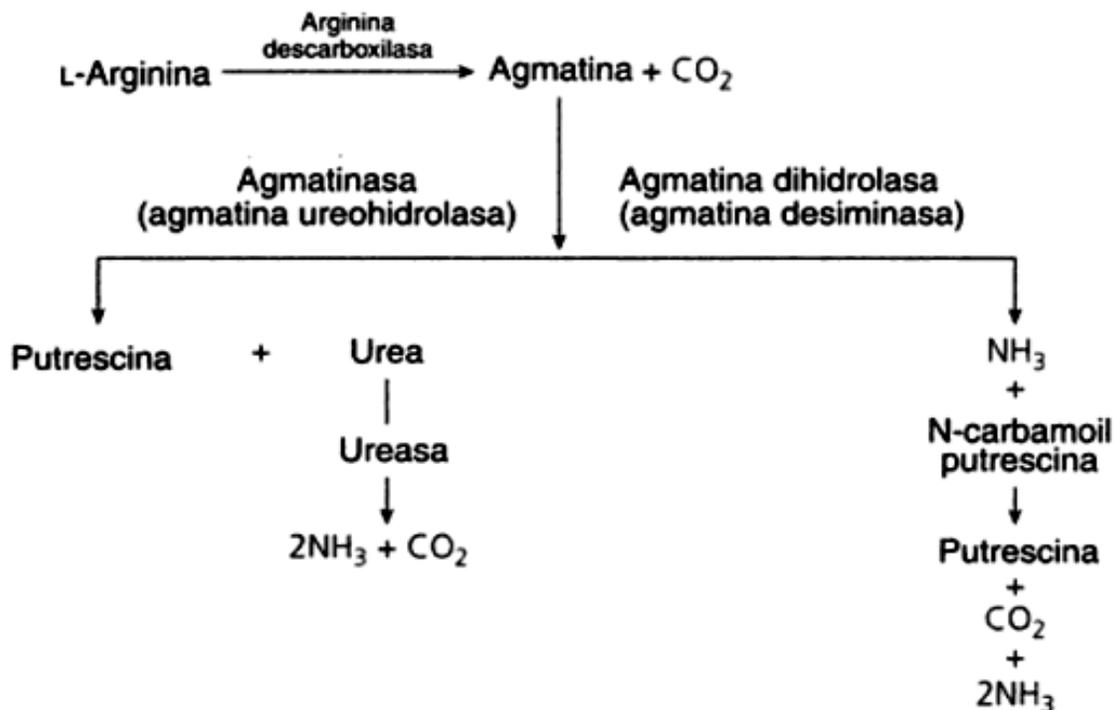


Fig. 7. Descarboxilación de la arginina (MacFaddin, 2003)

2.5.3. Biodegradación de arabinosa

Esta biorreacción (mal llamada “fermentación”²) es una prueba en donde se observa la capacidad de un microorganismo para fermentar un hidrato de carbono específico. Las bacterias que biodegradan un hidrato de carbono por lo común son aerobios facultativos. Un hidrato de carbono se degrada y fracciona en dos triosas que posteriormente se degradan a una cantidad de compuestos de 1, 2, 3 y 4 carbonos.

² El término fermentación fue acuñado por Louis Pasteur para nombrar la reacción anaerobia realizada por *Saccharomyces cerevisiae* sobre la glucosa para producir alcohol etílico y bióxido de carbono. Por tanto, cualquier otra biorreacción NO es una fermentación. En este libro se les denomina biorreacciones (Nota de la asesora)

2.6. Biocidas en la industria azucarera

En la industria azucarera se usan los biocidas habitualmente para el control de microorganismos tales como *Leuconostoc spp.* Estos métodos químicos generan ciertas dificultades, especialmente para la industria alimentaria, puesto que pueden ser tóxicos al humano o acarrear graves consecuencias al ambiente. Es por esta razón que la industria ha buscado el uso de microorganismos antagonistas, inocuos y que no tengan repercusión en el proceso. Los biocidas más utilizados para la desinfección y/o sanitización de la caña de azúcar son: ditiocarbamatos y otros carbamatos, cloruro de benzalconio y otras sales cuaternarias de amonio como bifluoruro de amonio y formaldehído (Tabla 1).

Tabla 1. Biocidas utilizados en la industria azucarera y sus características

Nombre del biocida	Dosis empleada	DL ₅₀	Referencias
Dimetil ditiocarbamato de sodio	15-20 mg kg ⁻¹	1000 mg kg ⁻¹ oral en ratas	Bonilla-Vidal (2013)
Cloruro de benzalconio	50-100 mg kg ⁻¹	400 mg kg ⁻¹ oral en ratas	Villa (2008)
Formaldehído	0.2-0.5mg kg ⁻¹	100 mg kg ⁻¹ , oral en ratas	OMS (1982)

2.6.1. Cloruro de benzalconio (CB)

Es una sal de amonio (Fig. 8), ya que es una mezcla sinérgica de constituyentes cuaternarios de tetra-alquil y tri-alquil amonio. En la industria azucarera es utilizado en los molinos debido a sus propiedades bactericidas, bacteriostáticas y fungicidas derivadas de su superficie catiónica activa. Su aplicación asegura una rápida eliminación de todo tipo de microorganismos, cubriendo un amplio espectro de las bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras (Villa, 2008). También es empleado como antiséptico y desinfectante de la piel, de materiales de industrias alimentarias y en algunos compuestos cosméticos.

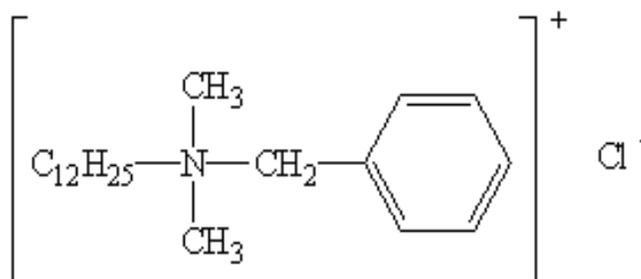


Fig. 8. Estructura del cloruro de benzalconio (Shandong IRO, 2016)

Su mecanismo de acción bactericida es a través de tres niveles, alteración de la membrana celular, desnaturalización de proteínas e inactivación enzimática. Estos mecanismos se deben a su estructura anfipática, debido a las cadenas carbonatadas (hidrófobas) las cuales penetra en las membranas, mientras que el nitrógeno catiónico (hidrófilo) interacciona con los fosfatos de los fosfolípidos, lo que provoca que haya una salida del material citoplasmático hacia el exterior y la alteración celular. Esta familia de biocidas son considerados desinfectantes de bajo nivel. La ficha técnica que describe al compuesto se muestra en la Tabla 2.

2.6.2. Metam-sodio (MS)

Es un derivado del ácido carbámico (Fig. 9), el cual se ha empleado como desinfectante de suelo, reduciendo sustancialmente las poblaciones de nemátodos y hongos. La mayoría de los ditiocarbamatos son usados como herbicidas y su clasificación depende de la característica de la sustitución de uno o ambos hidrógenos en cada nitrógeno. Es conocido también como metilditiocarbamato de sodio, ditiocarbamato (Flores-Santillán y Pérez-Cordero, 2013).

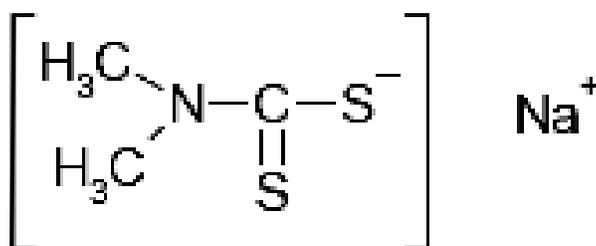


Fig. 9. Estructura del metam-sodio (Bonilla-Vidal, 2013)

Permite controlar las malezas y sus semillas en proceso de germinación. Es ampliamente utilizado en la industria de alimentos pero, principalmente, en la extracción de jugo de caña de azúcar. Su acción radica en la inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* ya que posee una ligera actividad anticolinesterásica y presenta una gran capacidad para la captación de metales en su interacción con radicales sulfhidrilo. La ficha técnica que describe al compuesto se muestra en la Tabla 3.

2.6.3. Formaldehído

El formaldehído, también conocido como metanal, es un compuesto de carbono, hidrógeno y oxígeno (Fig. 10). Es un gas incoloro y de olor sofocante, considerado como un eficaz biocida y utilizado también como conservador en la fabricación de ropa, plásticos, papel y tableros. En la industria azucarera se le utiliza para el control de microorganismos contaminantes debido a que su capacidad bactericida radica en su efecto alquilante de los grupos sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo o amina. Produce hidroximetilaciones o condensaciones (entrecruzamientos) en las proteínas y en los nitrógenos de los anillos de las bases púricas, por lo que su espectro es muy amplio (OMS, 1982).

Se comercializa principalmente en forma de solución acuosa del 37-50% v/v y son conocidas como formol, formalina, aldehído fórmico o metanal. Por lo general estas soluciones son utilizadas como conservadores. Es soluble en agua y en disolventes orgánicos; pero insoluble en éter de petróleo. La ficha técnica que describe al compuesto se muestra en la Tabla 4.

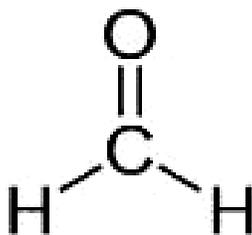


Fig. 10. Estructura del formaldehído (McMurry, 2008)

Tabla 2. Ficha técnica de cloruro de benzalconio
(MAPFRE, 2015, con algunas modificaciones)

Cloruro de benzalconio CAS: 63449-41-2		ICSC: 1584	
Propiedades físicas			
Punto de sublimación: 350°C Punto de fusión: 29-34°C Densidad relativa(agua=1): 1.5		Solubilidad en agua, g/100mL a 25°C: 28 Presión de vapor, kPa a 160°C: 0.13	
Datos importantes			
Estado físico; aspecto: Polvo higroscópico blanco a amarillo, de olor característico. Peligros químicos: La sustancia se descompone al calentarla intensamente, produciendo humos tóxicos y corrosivos incluyendo vapores amoniacales, vapores de cloro y óxidos de nitrógeno. Límites de exposición: TLV (valor techo) no establecido. MAK (sensibilización cutánea) no establecido.		Vías de exposición: La sustancia se puede absorber por inhalación. Riesgos de inhalación: Al producirse una pérdida de gas, se alcanza muy rápidamente una concentración nociva de éste en el aire. Efectos de exposición de corta duración: La sustancia irrita gravemente los ojos e irrita el tracto respiratorio. La inhalación puede originar edema pulmonar Efectos de exposición prolongada o repetida: Esta sustancia es carcinógena para los seres humanos.	
Datos ambientales			
Sustancia muy tóxica para los organismos acuáticos. Evítese de forma efectiva que el producto químico se incorpore al ambiente.			
Toxicidad			
	Animal	Dosis	
En especies acuáticas	Carpa y pez zebra	500 mg/L	
Oral exposición aguda	Ratas	7 mL (al 0.1%) /kg	
Oral exposición aguda	Ratas	5mL (al 0.13%) kg	
DL50 oral en ratas	Ratas	400 mg/kg	
Toxicidad ocular exposición aguda	Conejos albinos	0.1 mL (al 0.65% c/ojo)	

Tabla 3. Ficha técnica de metam-sodio (Arvizu-Bernal y Ramos-Medina (2010), con modificaciones)

Metam-sodio		
CAS: 137-42-8	Peso molecular: 129.17	
Propiedades físicas		
Punto de ebullición: 97 a 102 °C	pH solución al 42 % (a 20 °C): 7.5-10.5	
Punto de fusión: -5 a 0 °C	Presión de vapor, kPa a 160 °C: 0.13	
Densidad relativa(agua=1): 1.250	Temperatura de autoignición: No determinada	
Presión de vapor: 0.0575 Pa a 20 °C	Punto de inflamación: 66 °C	
Solubilidad en agua: 722 g/L aproximadamente		
Datos importantes		
Estado físico; aspecto: A 20 °C es líquido, de color amarillo-verde de olor azufrado.	Degradabilidad: Se degrada rápidamente en el ambiente por contacto con la humedad del suelo. Medio ambiente acuático. De acuerdo con los resultados de los ensayos de biodegradabilidad biodegradable.	
Peligros químicos: Se descompone cuando se diluye con agua en metil-isotiocianato (gas lacrimógeno y moderadamente venenoso) y en sulfuro de hidrógeno (gas altamente venenoso). En contacto con ácidos fuertes y se descompone en sulfuro de carbono y monometilamina (gases altamente inflamables).	Estabilidad: El producto es estable si es almacenado y manipulado según las recomendaciones dadas.	
Toxicidad		
	Animal	Dosis
Toxicidad aguda oral	Ratas	820 mg /kg
Toxicidad aguda oral	Conejos	825 mg/kg
Toxicidad aguda cutánea	Ratas	800 mg/kg
Toxicidad aguda cutánea	Conejos	2020 mg/kg
Dosis letal hombre	Hombre	600 mg/L 30 min; 800 mg/L inmediatamente/ letalmente

Tabla 4. Ficha técnica de formaldehído (MAPFRE, 2015, con modificaciones)

Formaldehído		ICSC: 0275	
CAS: 50-00-0		Masa molecular: 30.0	
Propiedades físicas			
Punto de ebullición: -20 °C		Punto de inflamación: gas inflamable	
Punto de fusión: -92 °C		Temperatura de autoignición: 430 °C	
Densidad relativa(agua=1):1.08		Limites de explosividad, % en volumen en el aire: 7-73	
Datos importantes			
Estado físico; aspecto: Gas, de olor característico.		Vías de exposición: La sustancia se puede absorber por inhalación.	
Peligros físicos: Se puede mezclar con el aire, formándose fácilmente mezclas explosivas.		Riesgo de inhalación : Al producirse una pérdida de gas, se alcanza muy rápidamente una concentración nociva de éste en el aire.	
Peligros químicos: La sustancia polimeriza debido al calentamiento suave. Reacción con oxidantes.		Efectos de exposición de corta duración: La sustancia irrita gravemente los ojos e irrita el tracto respiratorio. La inhalación puede originar edema pulmonar	
Límites de exposición: TLV: 0,3 ppm (valor techo), A2 (sospechoso de ser cancerígeno humano); SEN (ACGIH 2004). MAK: 0,3 ppm; 0,37 mg/m ³ ; Sh (sensibilización cutánea);		Efectos de exposición prolongada o repetida: Esta sustancia es carcinógena para los seres humanos.	
Categoría de limitación de pico: I(2); Cancerígeno categoría: 4; Mutágeno categoría: 5; Riesgo para el embarazo: Grupo C ; (DFG 2004).			
Toxicidad			
	Animal	Dosis	
Exposición aguda	Ratas wistar macho	30 ppm/6h	
Exposición subcrónica	Ratones	40 ppm/5h	
Carcinogenicidad o exposición crónica	Ratones	Sol. 10 % en agua	
Carcinogenicidad o exposición crónica	Ratas wistar hembra	15 o 82mg/kg	
Carcinogenicidad o exposición crónica	Embriones de ratas	1500 o 100 ppm	

3. Metodología

3.1. Equipo y reactivos

Los reactivos y equipo que se utilizaron para el desarrollo de esta investigación, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Reactivos y equipo con distribuidor y especificaciones

Reactivos y equipo	Distribuidor y especificaciones
Agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe)	Dibico
Caldo rojo de fenol con arabinosa	Dibico
Caldo base descarboxilasa de moeller	Dibico
L-Arginina	CIVEQ
Agua peptonada	Marca
Solución salina isotónica (SSI)	0.9% NaCl J.T.Baker
Formaldehído (biocida)	J.T. Baker, al 37%
Agar nutritivo	Dibico
Solución salina	Sol. acuosa de NaCl 0.45% a 0.5%, pH 4.5 a 7.0. Dibico
N-metilditiocarbamato de sodio (MS) (biocida)	Chem Service S.A. de C.V.
Cloruro de benzalconio (biocida)	CIVEQ, al 90%
Colorante cristal violeta	HYCEL de México S.A de C.V.
Safranina	HYCEL de México S.A de C.V.
Solución alcohol-cetona	Preparada en el laboratorio, con acetona J.T Baker y etanol al 95%.
Lugol	HYCEL de México S.A de C.V.
Tinta china	Pelikan
Cajas Petri de 100 x 15 mm	SyM Laboratorios
Tubo de ensaye de poliestireno claro de 12x75 mm	Dilabr
Asa bacteriológica	Veravitrum
Incubadora a 35°C	SEV-BIGM48S
Incubadora a 45°C	LUZEREN mod: DHP-9052
Campana de flujo laminar	SEV-CFL102
Autoclave	TUTTNAUER modelo 2340M
Equipo de análisis automatizado	MS-bioMérieux VITEK 2.0 systems 06.01
Hisopos estériles	Industrias Ruisánchez S.A de C.V.
Extractor casero	Oster mod. 333-08

3.2. Diseño experimental

Experimento 1. Es un diseño experimental unifactorial, debido a que se debe aislar y contabilizar las colonias existentes de los microorganismos de estudio *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes tiempos y a una misma temperatura de 37°C, el medio de cultivo utilizado es agar MRS realizando tres repeticiones.

Experimento 2. El diseño experimental es tipo factorial considerando dos factores (a) dosis; (b) tiempo y tres niveles dando como resultado 3^3 , es decir, 27 pruebas realizadas por triplicado, con un total de 81.

3.3. Procedimiento

3.3.1. Preparación del medio de cultivo agar MRS

Se rehidrataron 67g del medio en un litro de agua destilada durante 15 minutos (min), se calentó con agitación constante 1 min a ebullición para su disolución completa, se esterilizo a 121°C, 103.42 kPa (15 lb_f/in²) de presión 15 min, una vez estéril se dejo enfriar a 45°C, se vació en cajas petri estériles, las placas se conservaron en refrigeración de 2 a 8°C (DIBICO, 2015)

3.3.2. Preparación de agua peptonada

Se disuelve en un litro de agua destilada 10 g de peptona y 5 g de cloruro de sodio, se deja reposar de 10-15 min, se agita para disolver completamente y se esteriliza a 121°C, 103.42 kPa (15 lb_f/in²) de presión 15 min, se deja enfriar y se colocan 90 mL de agua peptonada en un matraz estéril, y 9 mL en tres tubos de ensayo estéril, se guarda en refrigeración para su conservación.

3.3.3. Lavado y pelado de caña

Se lleva a cabo un lavado de la caña utilizando agua solamente, con la finalidad de eliminar el exceso de tierra que posea, una vez que se lava se deja secar, para después pelar, quitando la corteza que posee.

3.3.4. Toma de la muestra

Se pesaron 344 g de caña de azúcar y mediante la utilización de un extractor casero se obtuvieron en un recipiente estéril, 61 mL del jugo de la caña.

3.3.5. Inoculación y lectura

Con una pipeta estéril se tomaron 10 mL del jugo de caña extraído y se colocaron en el matraz que contiene 90 mL de agua peptonada, de la solución anterior se toma 1 mL y se coloca en uno de los tubos que contiene 9 mL de agua peptonada, se realizó el paso anterior hasta conseguir una dilución de 10^{-4} , de esta última dilución se tomó 0.1 mL con una pipeta estéril, se colocó en una de las placas de agar MRS y con una varilla de vidrio en L se extendieron sobre la placa. Cada placa inoculada se incubó a 37°C, por 24, 48 y 72 h. Después de la incubación se seleccionaron las colonias típicas de *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*, las colonias seleccionadas se sembraron en placas de agar MRS por agotamiento en placa y se incubaron a 37°C por 24 h.

3.3.6. Pruebas primarias

3.3.6.1. Tinción de Gram (Ramírez *et al.*, 2008)

Para la caracterización morfológica de las colonias sembradas se realizó una tinción selectiva de Gram.

- a) A partir de una colonia pura de 24 h se colocó en los portaobjetos previamente desengrasados y rotulados, una asa de los microorganismos de estudio
- b) Se dejó secar y fijó pasándolo por la flama del mechero
- c) Se agregó a la muestra dos gotas de cristal violeta, dejar actuar por 1 min, para eliminar el exceso de colorante se lavó con agua destilada
- d) Se añadieron dos gotas de lugol (mordente), dejar actuar por 1 min, para eliminar el exceso de mordente se lavó con agua

- e) La muestra se decoloró con alcohol-cetona hasta que el efluente salga incoloro para retirar el exceso de solvente se lavó con agua
- f) Por último se agregaron dos gotas de safranina se dejó actuar 1 min y se lavó con agua para retirar el exceso de colorante
- g) Se dejó secar la muestra a temperatura ambiente y se observó al microscopio con objetivo de inmersión.

3.3.6.2. Tinción de cápsula (Ramírez *et al.*, 2008)

Para observar la presencia de cápsula se realizó una tinción diferencial (Anexo I)

- a) En el extremo del portaobjetos colocar una gota de agua destilada y suspender una asada del cultivo puro de 24 h de los microorganismos de estudio
- b) Agregar una gota de tinta china sobre la muestra y mezclar perfectamente
- c) Colocar el borde de otro portaobjetos limpio sobre la gota y deslizar éste sobre el portaobjetos que contiene la muestra formando una película delgada
- d) Dejar secar al aire, cubrir el frote con cristal violeta y dejar actuar 1 min
- e) Secar al aire y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

3.3.7. Pruebas bioquímicas

Para la realización de dichas pruebas se resembró una de las colonias aisladas por agotamiento en placa, para obtener un cultivo puro de 24 h.

3.3.7.1 Catalasa

En un portaobjetos desengrasado se colocó una gota de agua, se suspendió una asa del microorganismo de estudio y se agregó una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 %, se observó el burbujeo inmediato.

3.3.7.2. Descarboxilación de arginina

- a) Se rehidrató 1.0504 g de caldo descarboxilasa de Moeller en un 100 mL de agua destilada y se agregó 1% del aminoácido de estudio, se dejó reposar de 10-15 min, calentando con agitación constante hasta ebullición 1 min, se distribuyó en tubos

de ensayo cada uno con 4 mL del medio y se esterilizó a 121°C, 103.42 kPa (15 lb_f/in²) de presión 15 min (NO SOBREESTERILIZAR) (DIBICO 2015).

- b) Se rotularon dos tubos con SSI para las bacterias en estudio *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*
- c) Se suspendió una asada del cultivo bacteriano en un tubo con 5 mL de SSI hasta obtener una suspensión ligeramente turbia
- d) A partir de la suspensión anterior se inocularon mediante una asada los tubos que contenían el caldo descarboxilasa de Moeller, por triplicado para cada una de las bacterias
- e) Se dejó un tubo sin inocular para poder tener un control sobre la prueba. A cada tubo inoculado junto con el control se le agregaron 2 mL de aceite mineral
- f) Se incubaron a 35 °C por 4 días, con una revisión constante de la prueba.

3.3.7.3. Biodegradación de arabinosa

- a) Se rehidrataron 2.0020 g de caldo rojo de fenol con arabinosa 100 mL de agua destilada se dejaron reposar de 10-15 min, calentando con agitación constante hasta completa disolución.
- b) Se distribuyeron en tubos de ensayo con campana de Durham cada uno con 4mL del medio y se esterilizaron a 121°C, 103.42 kPa (15 lb_f/in²) de presión por 15 min (DIBICO, 2015).
- c) Se rotularon dos tubos con SSI para las bacterias en estudio *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*
- d) Se suspendió una asada del cultivo bacteriano en un tubo con 5 mL de SSI hasta obtener una suspensión ligeramente turbia
- e) A partir de la suspensión anterior se inocularon mediante una asada los tubos que contenían el caldo rojo de fenol con arabinosa, por triplicado para cada una de las bacterias
- f) Se dejó un tubo sin inocular para poder tener un control sobre la prueba y se incubaron todos los tubos con las tapas ligeramente abiertas a 35°C por 24 h.

3.3.8. Prueba automatizada en el equipo VITEK 2

- a) Se sembraron cada una de bacterias *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* por agotamiento en placa en agar nutritivo y se incubaron a 37°C, 24 h
- b) A partir del cultivo anterior se inoculó un tubo de ensayo con 3 mL de SSI (con NaCl 0.45-0.5 %), ajustando una turbidez de 0.5 McFarland
- c) Se colocaron, primero el tubo de ensayo en el cassette junto con la tarjeta de identificación, y después insertando el tubo de transferencia dentro del tubo con la suspensión
- d) Se instaló el cassette con las muestras en el sistema VITEK 2. Una vez dentro, las tarjetas se sometieron a inoculación, sellado e incubación (Anexo II).

3.3.9. Preparación de los biocidas de estudio

3.3.9.1. Cloruro de benzalconio (CB)

Se prepararon 25 mL de una solución madre de CB a una concentración de 50 mg L⁻¹. Para ello se pesaron 1.389 mg de CB con una pureza de 90%, los cuales se disolvieron en 10 mL de metanol grado cromatográfico (*HPLC*, en inglés), para después llevar a un aforo de 25 mL. De la solución anterior se realizaron tres disoluciones, tomando alícuotas de 1, 1.5 y 2 mL y aforando a 5 mL con agua desionizada estéril, para obtener las concentraciones de estudio 10, 15 y 20 mg L⁻¹.

3.3.9.2. Metam-sodio (MS)

Se prepararon 25 mL de una solución madre de MS a una concentración de 50 mg L⁻¹. Para ello se pesaron 1.274 mg de MS con una pureza de 99%, los cuales se disolvieron en 10 mL de metanol grado cromatográfico, para después llevar a un aforo de 25 mL. De la solución anterior se realizaron tres disoluciones, tomando alícuotas de 3, 4 y 4.5 mL y aforando a 5 mL con agua desionizada estéril, para obtener las concentraciones de estudio 30, 40 y 50 mg L⁻¹.

3.3.9.3. Formaldehído

Se prepararon 50 mL de una solución madre de formaldehído a una concentración de 300 mg L⁻¹. Se tomaron 45 µL de una solución de formaldehído al 37% y se llevó a un aforo de 50 mL con metanol grado cromatográfico. De la solución anterior se tomaron alícuotas de 35, 50 y 85 µL, las cuales se aforaron a 5 mL con agua desionizada estéril, para obtener concentraciones de 2, 3 y 5 mg L⁻¹.

3.3.10. Pruebas de resistencia a biocidas

Las pruebas con biocida se realizaron tomando como referencia el documento "*A concise laboratory manual. Arthur Productions Pty Ltd, Sydney. NSW: The antibiotic reference laboratory, South Eastern Area Laboratory Services*", de Bell *et al.* (1999), con algunas modificaciones.

- a) Para determinar la susceptibilidad de cada uno de los biocidas seleccionados, se distribuyeron 20 mL de agar en placas de Petri, las cuales se pusieron a secar boca abajo sin tapa en la incubadora a 35°C durante dos horas
- b) Se preparó una suspensión de SSI al 0.9% distribuida en tubos de ensaye cada uno con 4 mL
- c) Con una asa recta fue tomada una colonia (cultivo puro de 24 h) cuyo diámetro sea de entre 1 y 2 milímetros (mm). La masa bacteriana debe ser visible en la punta del alambre. Una vez que se tomó parte de la colonia, se inoculó la SSI girando el alambre recto al menos 10 veces con la punta en contacto con la parte inferior, hasta obtener una turbidez de 0.5 McFarland
- d) Con una micro pipeta se colocaron 100 µL de la suspensión bacteriana en cada una de las placas Petri y mediante un hisopo estéril se distribuyó el inóculo en la placa dejando secar de 5 a 10 min
- e) Esterilizar las pinzas de punta roma con alcohol y a la flama del mechero y en condiciones de asepsia, tomar un disco de papel filtro e impregnarlo con el agente químico a probar, eliminando el exceso por escurrimiento
- f) Depositar el disco sobre el agar presionando ligeramente sobre la superficie y repetir este paso para cada uno de los agentes químicos a evaluar

g) Se incubaron a 35°C por 24, 48 y 72 h, se revisaron y midieron cada halo de inhibición después de la incubación.

3.4. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de un factor para determinar el tiempo óptimo de crecimiento de las bacterias de estudio. Para la prueba de inhibición de los biocidas se determinó si los factores que pudieran afectar, mostrados en la Tabla 6, teniendo como base la información bibliográfica presentada en la Tabla 1, fueron analizados con una prueba de rango múltiple (Anexo III).

Tabla 6. Diseño experimental para seleccionar de la dosis óptima

Factores	Niveles		
	1	2	3
(a) Dosis	A	B	C
(b) Tiempo (h)	24	48	72
(c) Biocida	MS	CB	FA

MS: ditiocarbamato de sodio; CB: cloruro de benzalconio; A, B y C: 10, 15 y 20 mg L⁻¹; FA: Formaldehído, ; A, B y C: 2, 3 y 5 mg L⁻¹

4. Resultados y discusión

4.1. Inoculación y lectura

En la primera parte del experimento se determinó el tiempo óptimo de incubación para la bacteria de estudio *Weissella confusa* por lo que se realizaron 5 repeticiones para cada uno de los tiempos de estudio. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Unidades formadoras de colonias, UFC, a diferentes temperaturas para *Weissella confusa*

	Placas de agar inoculadas	Tiempo (h)		
		24	48	72
Unidades formadoras de colonias (UFC)	1	20x10 ⁴	11x10 ⁵	Incontables
	2	0*	17x10 ⁵	Incontables
	3	22x10 ⁴	13x10 ⁵	27x10 ⁵
	4	0*	24 x10 ⁵	Incontables
	5	**	**	**

* Las colonias presentes se consideraron como cero ya que el conteo de éstas es menor al intervalo de 30 a 300

**Las colonias presentes en estas placas no se consideraron ya que el agar en el que se inoculó sufrió fracturas

Para determinar el tiempo óptimo de incubación de *Leuconostoc mesenteroides* se presenta la información en la Tabla 8. El factor de estudio es el tiempo de incubación utilizando 5 repeticiones para cada uno de los tiempos de estudio.

Tabla 8. Unidades formadoras de colonias, UFC, a diferentes temperaturas para *Leuconostoc mesenteroides*

	Placas de agar inoculadas	Tiempo (h)		
		24	48	72
Unidades formadoras de colonias (UFC)	1	0*	14x10 ⁵	30x10 ⁵
	2	0*	11x10 ⁵	29x10 ⁵
	3	17x10 ⁴	14x10 ⁵	Incontables
	4	0*	13x10 ⁵	Incontables
	5	**	**	**

* Las colonias presentes se consideraron como cero ya que el conteo de éstas es menor al intervalo de 30 a 300

**Las colonias presentes en estas placas no se consideraron ya que el agar en el que se inoculó sufrió fracturas

4.2. Pruebas primarias

Las placas de agar MRS fueron incubadas a 37°C durante 24 h, después del tiempo de incubación se revisaron cada una de las placas encontrando que para *Weissella confusa* las colonias características son de color blancas, superficie lisa, opacas, consistencia viscosa suave de elevación convexa y borde entero (Fig. 11), las pruebas primarias que se realizaron como tinción de Gram y tinción de cápsula, muestran que se trata de un cocobacilo Gram positivo, agrupado en cadenas cortas o pares (Fig. 12), con presencia de cápsula (Fig. 13).

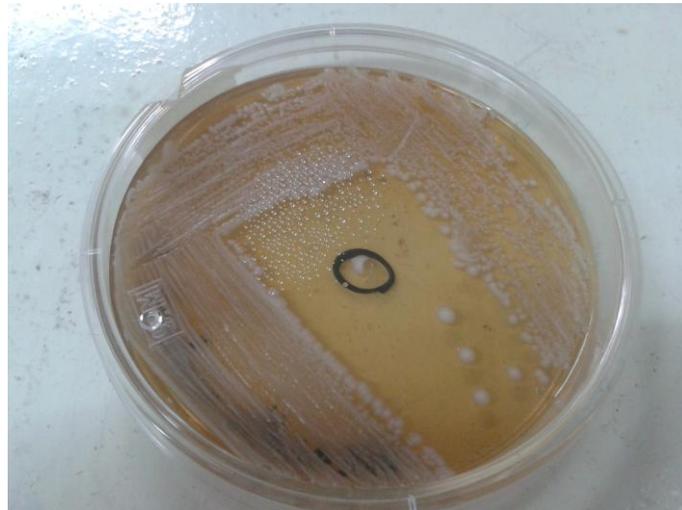


Fig. 11. Colonias en agar MRS de *Weissella confusa*

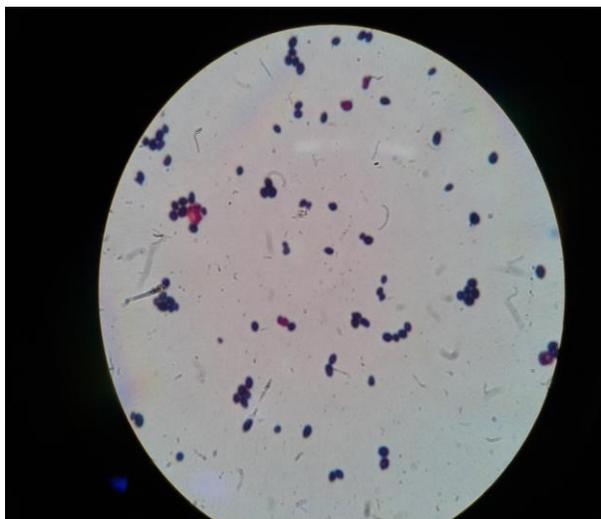


Fig. 12. Tinción de Gram y agrupación para *Weissella confusa*

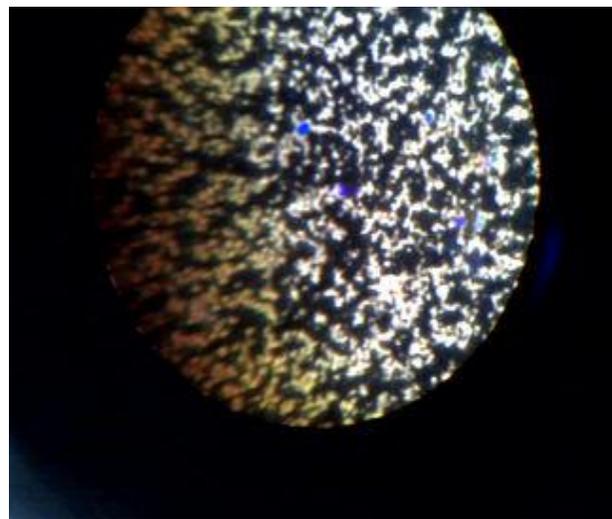


Fig. 13. Tinción de cápsula para *Weissella confusa*

En cuanto a *Leuconostoc mesenteroides* en el mismo agar presenta colonias de forma circular, superficie lisa, translúcida, color crema, consistencia viscosa, elevación convexa y borde entero (Fig. 14), las pruebas primarias mostraron que se trata de un cocobacilo Gram positivo, agrupado en cadenas cortas (Fig. 15), con presencia de cápsula (Fig. 16).

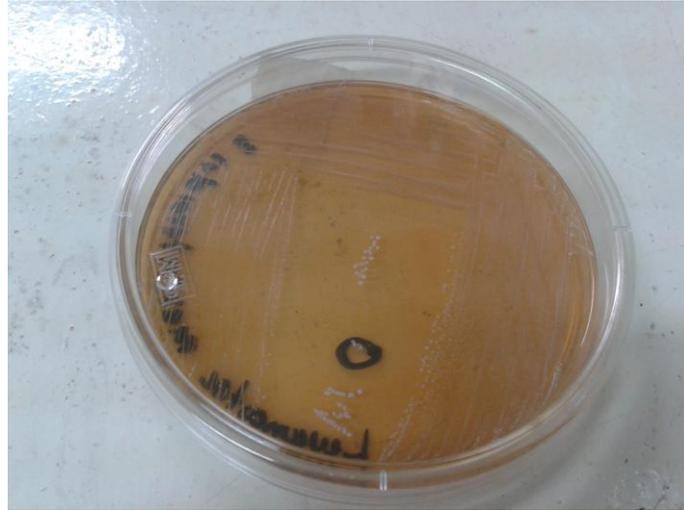


Fig. 14. Colonias en agar MRS de *Leuconostoc mesenteroides*

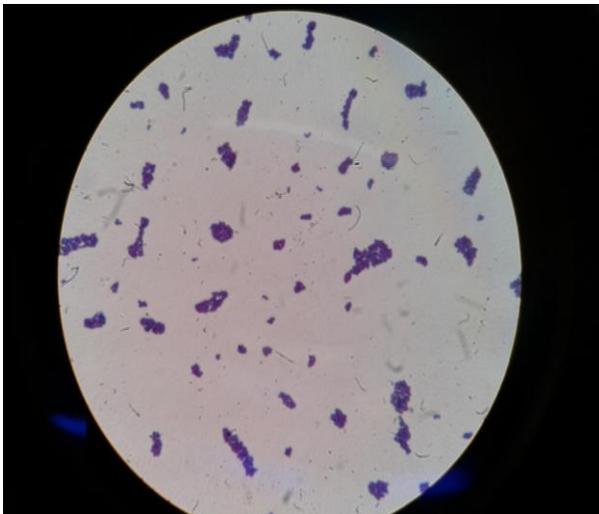


Fig. 15. Tinción de Gram y agrupación para *Leuconostoc mesenteroides*

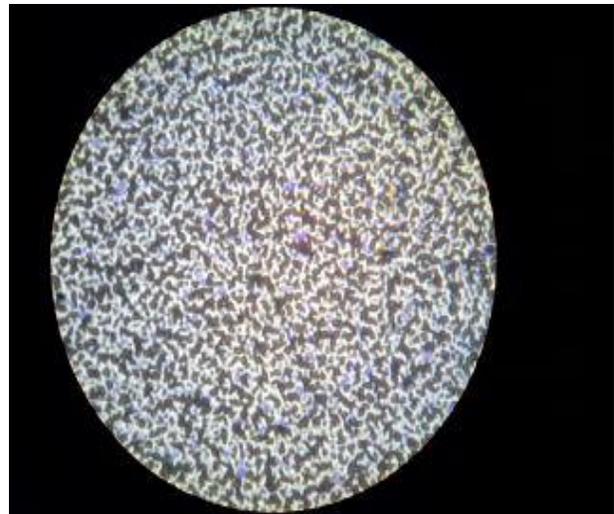


Fig. 16. Tinción de cápsula para *Leuconostoc mesenteroides*

4.3. Pruebas bioquímicas

4.3.1 Catalasa

En las Figs. 17 y 18 se muestran los resultados de la prueba de catalasa que se realizaron después de 24 h de incubación de las bacterias. Estas muestran que para ambas bacterias la prueba es negativa.



Fig. 17. Prueba negativa de catalasa para *Weissella confusa*



Fig. 18. Prueba negativa de catalasa para *Leuconostoc mesenteroides*

4.3.2. Descarboxilación de arginina

Los resultados de la prueba fueron revisados después de la incubación diariamente. La Fig. 19 muestra el tubo que se tomó como referencia de la prueba. En la Fig. 20 se observó un resultado positivo para *Weissella confusa*, mientras que para *Leuconostoc mesenteroides* el resultado fue negativo (Fig. 21).



Fig. 19. Tubo de referencia de la prueba de descarboxilación de arginina



Fig. 20. Prueba (+) de descarboxilación de arginina para *Weissella confusa*



Fig. 21. Prueba (-) de descarboxilación de arginina para *Leuconostoc mesenteroides*

4.3.3. Biodegradación de arabinosa

Para la prueba de biodegradación los resultados fueron revisados a las 24 h de su incubación, tomando como referencia el tubo de la Fig. 22, mostrando que para *Weissella confusa* el resultado fue positivo (Fig. 23), mientras que para *Leuconostoc mesenteroides* el resultado fue negativo (Fig. 24).



Fig. 22. Tubo de referencia de la prueba biodegradación de arabinosa



Fig. 23. Prueba (+) de biodegradación de arabinosa para *Weissella confusa*



Fig. 24. Prueba (-) de biodegradación de arabinosa para *Leuconostoc mesenteroides*

4.4. Prueba automatizada en el equipo VITEK 2

Para confirmar la presencia de las bacterias *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*, se utilizó el equipo VITEK 2, de acuerdo con los resultados se encontró que se aisló del jugo de caña a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides*, y a *Weissella confusa* con un 96% de confianza.

4.5. Pruebas de resistencia a biocidas

4.6. Cloruro de benzalconio (CB)

Para determinar la resistencia de *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* a los biocidas de estudio se les midieron los halos de inhibición después de su aplicación a

diferentes condiciones (dosis del biocida y tiempo de incubación). En las Tablas 9 y 10 se muestran los resultados obtenidos para cloruro de benzalconio frente a cada una de las bacterias de estudio.

Tabla 9. Halos de inhibición de *Weissella confusa*, utilizando CB

		Temperatura		
		35°C		
Tiempo (h)		24	48	72
Dosis (mg/L)		Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)
10		11	10	11
		12.5	12	12.2
		10	9.8	11
15		12	10.3	11
		13.5	13	13.2
		12.4	11	12
20		14.4	12.6	13.2
		15.7	14	14.5
		13.5	13	13

Tabla 10. Halos de inhibición de *Leuconostoc mesenteroides*, utilizando CB

		Temperatura		
		35 °C		
Tiempo (h)		24	48	72
Dosis (mg/L)		Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)
10		10.9	10.9	10
		10.5	10.3	10
		11.4	11.4	11
15		11.1	11	11.2
		12	12	11
		12	11.8	13
20		12.9	12.5	12
		13	12.9	12.3
		13.5	12.6	12

4.7. Metam-sodio (MS)

Para determinar la susceptibilidad de *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* en presencia del metam sodio, los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 11 y 12 respectivamente.

Tabla 11. Halos de inhibición de *Weissella confusa*, utilizando MS

	Temperatura		
	35 °C		
Tiempo (h)	24	48	72
Dosis (mg/L)	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)
30	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
40	7.8	7.8	7.8
	7.8	7.8	7.8
	8.2	8.2	8.2
45	10	10	10
	11	11	11
	10	10	10

Tabla 12. Halos de inhibición de *Leuconostoc mesenteroides*, utilizando MS

	Temperatura		
	35 °C		
Tiempo (h)	24	48	72
Dosis (mg/L)	Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)
30	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
40	7.5	7.5	7.5
	7.6	7.6	7.6
	8	8	8
45	8.3	8.3	8.3
	8.3	8.3	8.3
	8.2	8.2	8.2

4.8. Formaldehído

Los resultados de susceptibilidad para *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* en presencia de formaldehído, los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 13 y 14 respectivamente.

Tabla 13. Halos de inhibición de *Weissella confusa*, utilizando formaldehído

		Temperatura		
		35 °C		
Tiempo (horas)		24	48	72
Dosis (mg/L)		Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)
2		7	6	8
		7	6	10
		5	9	9
3		7	9	11
		5	8	12
		6	7	10
5		10	11	14
		8	12	16
		9	9	17

Tabla 14. Halos de inhibición de *Leuconostoc mesenteroides*, utilizando formaldehído

		Temperatura		
		35 °C		
Tiempo (horas)		24	48	72
Dosis (mg/L)		Halo (mm)	Halo (mm)	Halo (mm)
2		6	6	9
		7	7	5
		8	10	9
3		7	9	9
		7	7	11
		5	8	10
5		5	9	11
		8	13	15
		6	12	14

4.9. Pruebas de antagonismo

Se realizó una prueba de antagonismo, para ver si *Weissella confusa* podía actuar como antagónico de *Leuconostoc mesenteroides* los resultados obtenidos muestran que *Weissella confusa* no puede actuar como antagónico de *Leuconostoc mesenteroides* puesto que ambas pueden desarrollarse en la placa de agar MRS sin ningún inconveniente (Figs. 25 y 26), esto puede deberse a que ambas bacterias provienen del mismo género.

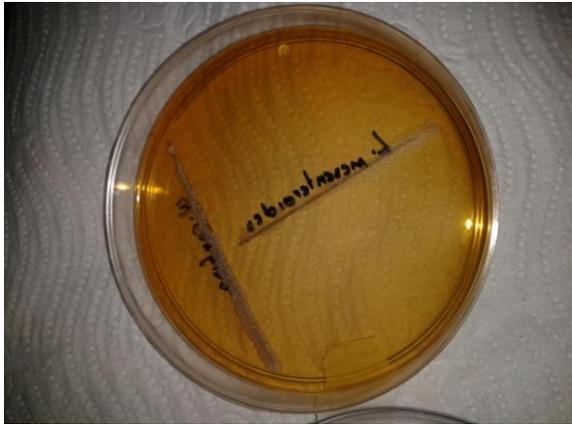


Figura 25. Prueba de antagonismo para *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*



Figura 26. Prueba de antagonismo para *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*

4.10. Análisis estadístico

4.10.1. Tiempos de incubación

En las Tablas 15 y 16 se muestran los resultados de los análisis de varianza realizados para cada uno de los experimentos de desarrollo de los microorganismos a diferentes tiempos. Se consideró un diseño unifactorial, por lo que se plantean las hipótesis:

H_0 : No hay diferencia significativa entre los tiempos de incubación para el desarrollo de los microorganismos

H_1 : Hay diferencia significativa en por lo menos uno de los tiempo de incubación para el desarrollo de los microorganismos

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para *Weissella confusa*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medias de cuadrados	Estadístico de prueba
Entre tratamientos	4.68×10^{12}	3	1.56×10^{12}	2.19
Del error	6.42×10^{12}	8	7.13×10^{11}	
Total	1.11×10^{13}	11		

$F_{0.05, 2, 13} = 4.07$

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para *Leuconostoc mesenteroides*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medias de cuadrados	Estadístico de prueba
Entre tratamientos	4.9×10^{12}	3	1.63×10^{12}	2.29
Del error	5.7×10^{12}	8	7.12×10^{11}	
Total	1.36×10^{13}	11		

F_{0.05, 2, 13} Tablas= 4.07

De acuerdo con los resultados obtenidos no existe diferencia significativa entre los tiempos de incubación para el desarrollo de los microorganismos de estudio, mostrando que las condiciones óptimas para su desarrollo es el medio de cultivo agar MRS a 37°C por 24 horas.

4.10.2. Prueba de resistencia a biocidas

Los resultados obtenidos para esta prueba fueron analizados mediante el programa Startgraphics Centurion XVI. El análisis de varianza que se realizó para *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* sobre los halos de inhibición frente a las diferentes condiciones muestran que para el cloruro de benzalconio y metam sodio. Existe una diferencia significativa entre la dosis empleada para poder inhibir el crecimiento de las bacterias de estudio; sin embargo, no existe diferencia alguna entre los tiempos que se utilizaron.

En cuanto al formaldehído, el análisis de varianza que se realizó indica que existe diferencia significativa en cuanto a la dosis y tiempo que se emplee para inhibir el crecimiento de *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*.

4.10.2.1. Análisis estadístico para cloruro de benzalconio

En la Fig. 27 se muestran los promedios de los halos de inhibición para *Weissella confusa* a las diferentes dosis empleadas de CB. Los gráficos de cajas y bigotes muestran el análisis estadístico de las dosis y tiempos empleados en el experimento. Este gráfico de cajas y bigotes (Fig. 28) muestra que la dosis a 20 mg L⁻¹ es la que presenta mayor respuesta para inhibir el crecimiento de dicha bacteria pues el halo de inhibición que se muestra es de 13.77 mm, a diferencia de las concentraciones de 10 y 15 mg/L las cuales no muestran diferencia significativa entre ellas. En cuanto al tiempo

el gráfico indica que no existe diferencia significativa para la inhibición del microorganismo (Fig. 29).

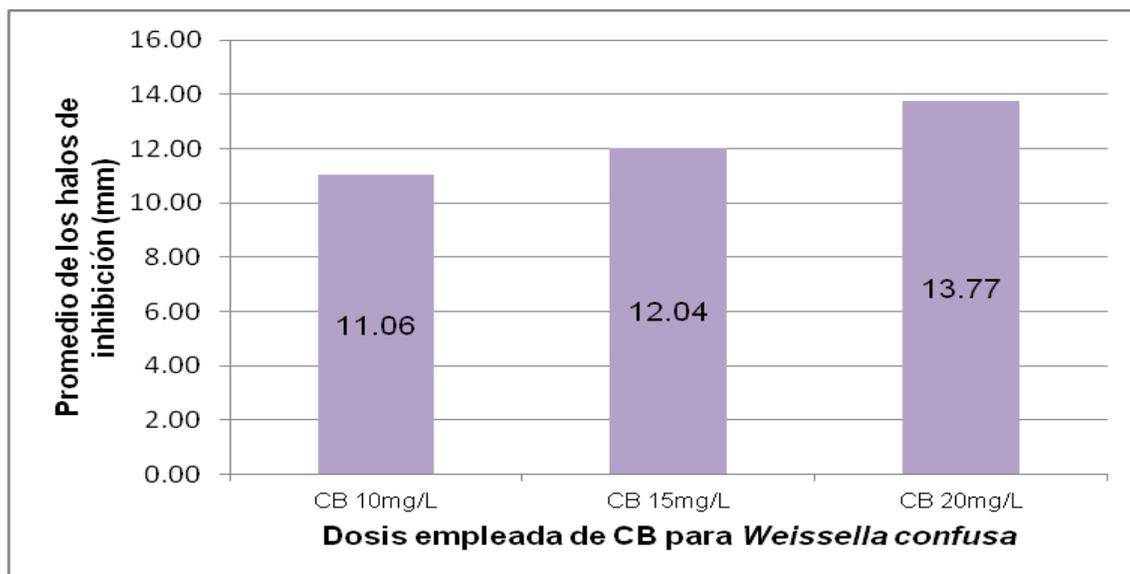


Fig. 27. Promedio de inhibición para *Weissella confusa* a diferentes dosis de CB

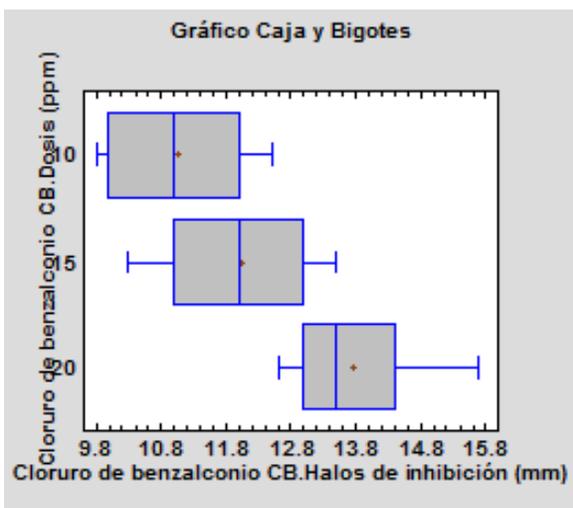


Fig. 28. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Weissella confusa* a diferentes dosis de CB

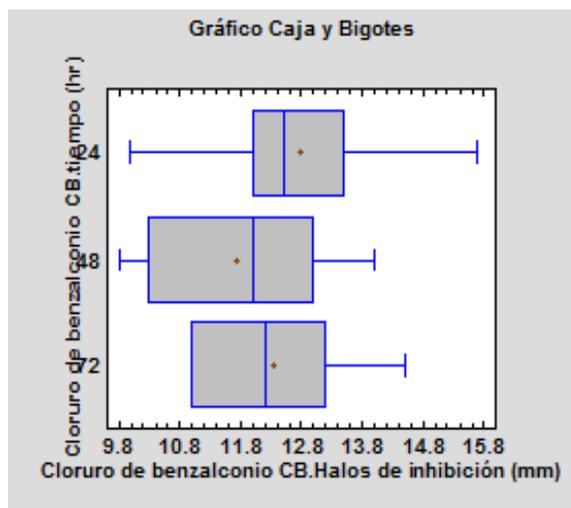


Fig. 29. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Weissella confusa* a diferentes tiempos

Los promedios de los halos de inhibición para *Leuconostoc mesenteroides* frente a las dosis empleadas de CB, se muestran en la Fig. 30. Los gráficos de cajas y bigotes muestran que, para todas las concentraciones empleadas de 10, 15 y 20 mg L⁻¹, existe una diferencia significativa entre ellas (Fig. 31). El mayor halo de inhibición que se presenta es de 12.63 mm, el cual corresponde a la dosis empleada de 20 mg L⁻¹, con

respecto al tiempo. El gráfico de cajas y bigotes indica que no existe una diferencia significativa (Fig. 32).

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron puede observarse que *Weissella confusa* ante las diferentes concentraciones de CB mostró los mayores halos de inhibición con respecto a los de *Leuconostoc mesenteroides* frente al mismo biocida de estudio.

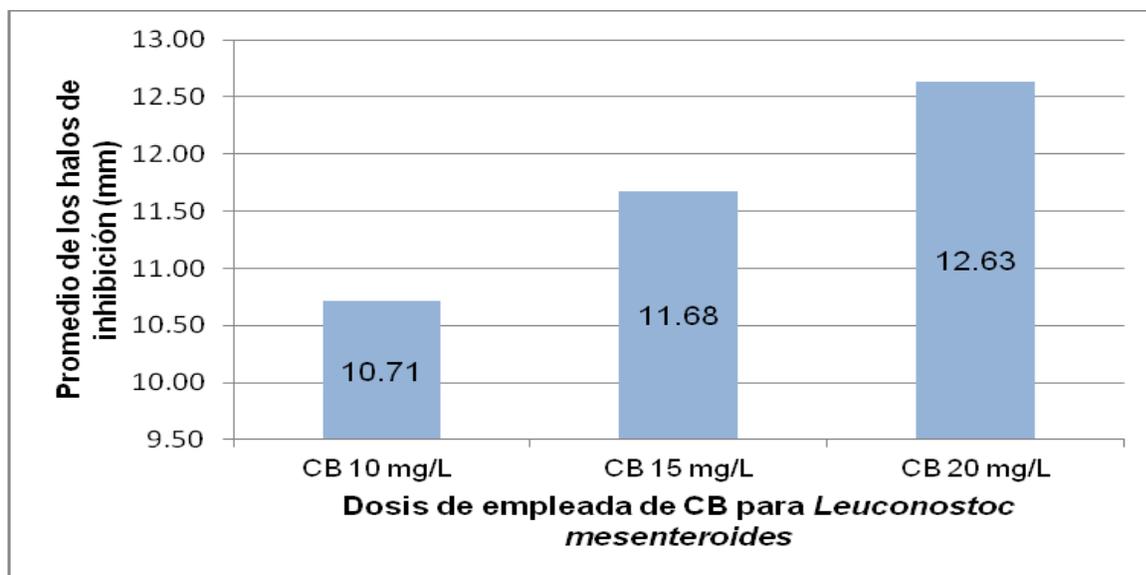


Fig. 30. Promedio de inhibición para *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes dosis de CB

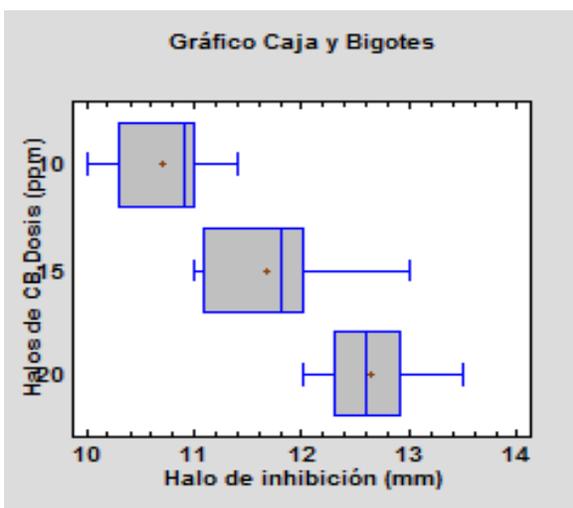


Fig. 31. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes dosis de CB

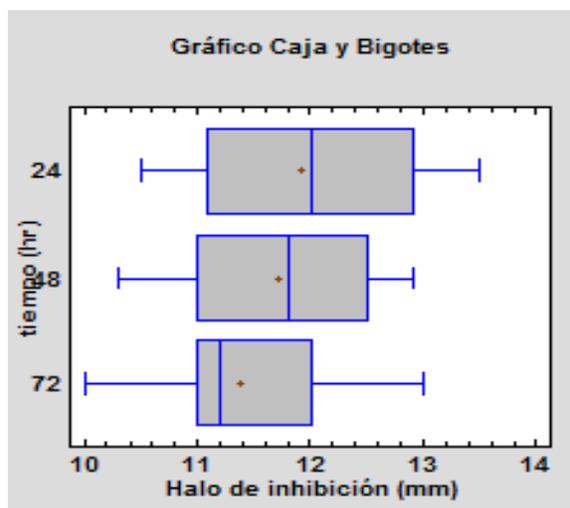


Fig. 32. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes tiempos

4.10.2.2. Análisis estadístico para metam sodio

En la Fig. 33 se muestran los promedios de los halos de inhibición para *Weissella confusa* ante las diferentes dosis empleadas de MS. Al igual que con el CB, los gráficos de cajas y bigotes muestran el análisis estadístico de las dosis y tiempos empleados para el estudio del biocida. De acuerdo con el gráfico de cajas y bigotes existe una diferencia significativa entre las tres concentraciones de estudio (Fig. 34), mostrando que a 45 mg L⁻¹ se presenta el mayor halo de inhibición 10.33 mm. Por otro lado, a una concentración de 30 mg L⁻¹ la bacteria no presenta inhibición alguna.

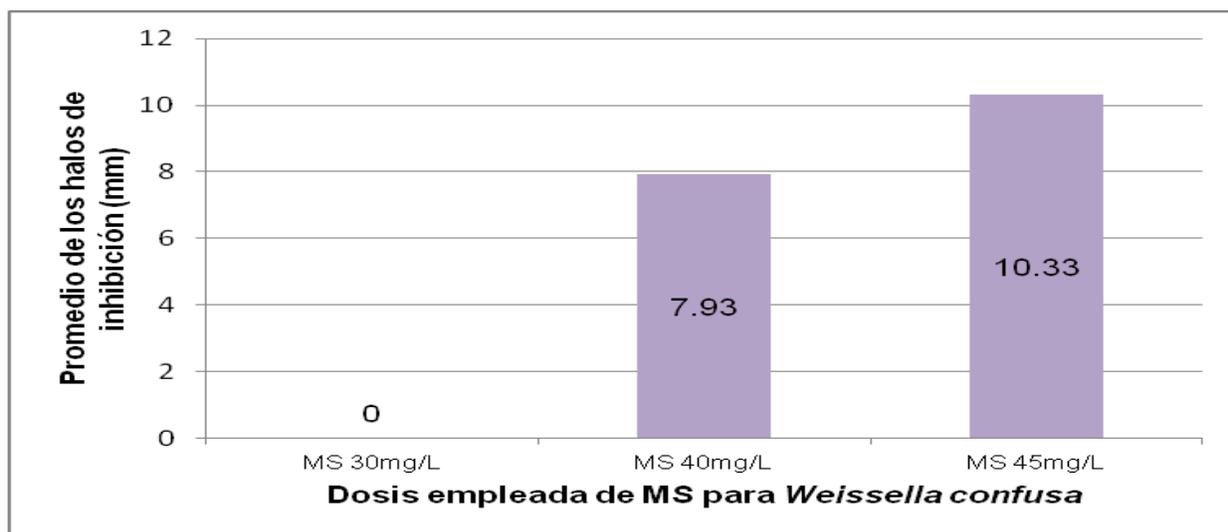


Fig. 33. Promedio de inhibición para *Weissella confusa* a diferentes dosis de MS

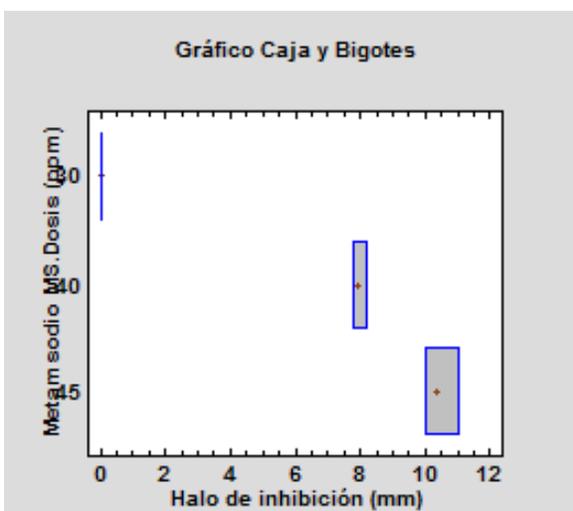


Fig. 34. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Weissella confusa* a diferentes dosis de MS

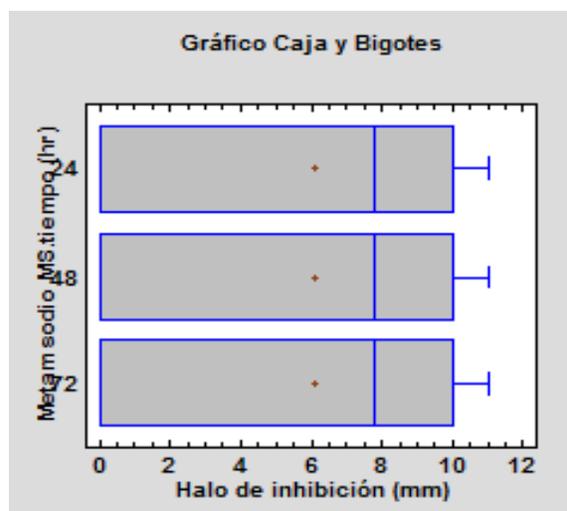


Fig. 35. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Weissella confusa* a diferentes tiempos

En cuanto a *Leuconostoc mesenteroides* los promedios de los halos de inhibición ante las diferentes dosis empleadas de MS se muestran en la Fig. 36. El análisis estadístico de la dosis (Figura 37) indica que existe una diferencia significativa entre las concentraciones de estudio mostrando que a una concentración de 30 mg L⁻¹ la bacteria no presenta inhibición alguna ante el MS, mientras que a 45 mg L⁻¹ se presenta un halo de 8.3 mm.

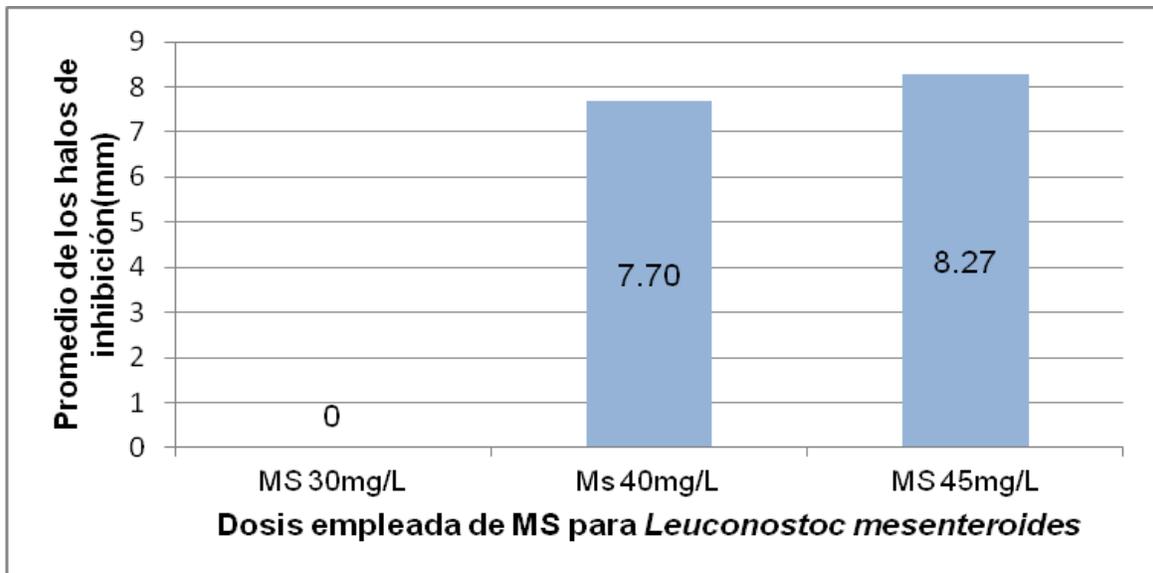


Fig. 36. Promedio de inhibición para *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes dosis de MS

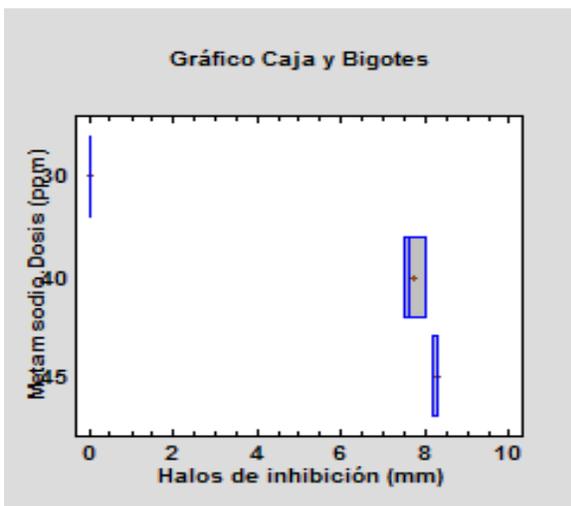


Fig. 37. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes dosis de MS

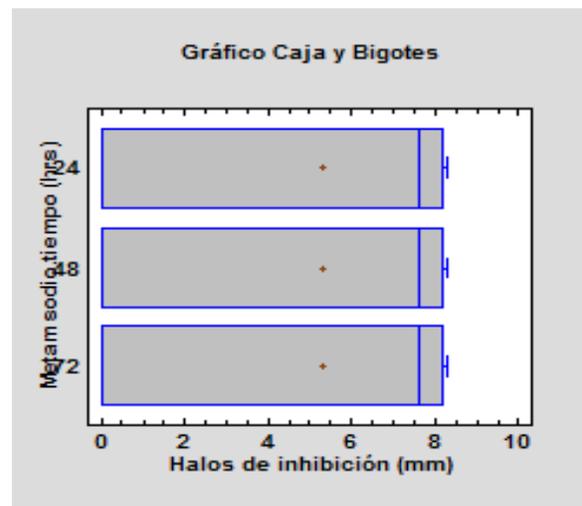


Fig. 38. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes tiempos

En cuanto al tiempo los gráficos de cajas y bigotes para *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 35 y 38), muestran que para ambas bacterias no existe diferencia significativa para la inhibición de los microorganismos.

De los resultados que se obtuvieron puede observarse que *Weissella confusa* muestra mayor resistencia a metam sodio que *Leuconostoc mesenteroides* de acuerdo con los promedios de los halos de inhibición que se tienen.

4.10.2.3. Análisis estadístico para formaldehído

Para el caso del formaldehído, la Fig. 39 muestra los promedios de los halos de inhibición para *Weissella confusa*. De acuerdo con el análisis estadístico de las dosis empleadas, los gráficos de cajas y bigotes (Fig. 40) indican que entre las concentraciones de 2 y 3 mg L⁻¹ no existe diferencia significativa alguna. Sin embargo, la concentración de 5 mg L⁻¹ muestra una diferencia significativa con respecto a las otras dos concentraciones. En cuanto al tiempo, el análisis estadístico indica que existe una diferencia significativa (Fig. 41), mostrando que los mayores halos de inhibición se presentan a las 72 h de incubación. De acuerdo con el análisis realizado puede decirse que las condiciones óptimas para obtener una mayor inhibición del microorganismo es utilizando una concentración de 5 mg L⁻¹ con un tiempo de incubación de 72 h.

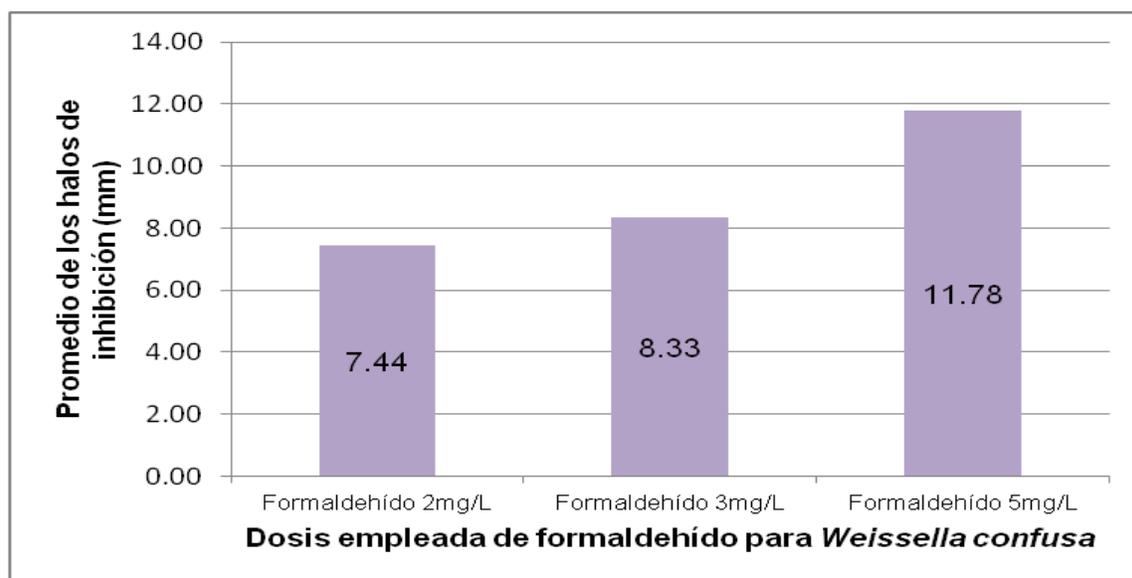


Fig. 39. Promedio de inhibición para *Weissella confusa* a diferentes dosis de formaldehído

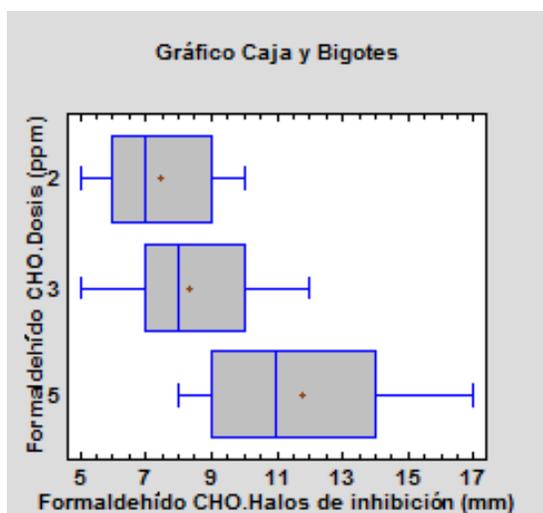


Fig. 40. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Weissella confusa* a diferentes dosis de formaldehído

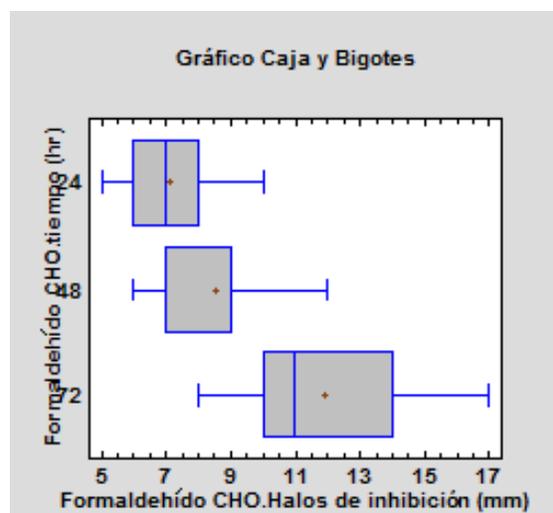


Fig. 41. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Weissella confusa* a diferentes tiempos

En cuanto a los resultados para *Leuconostoc mesenteroides*, los promedios de los halos de inhibición a las diferentes dosis empleadas de formaldehído se muestran en la Fig. 42. El análisis estadístico de las dosis en gráficos de cajas y bigotes (Fig. 43) indican que existe diferencia significativa entre la dosis empleada, de 5 mg L⁻¹, con respecto a las dosis de 2 y 3 mg L⁻¹. En cuanto al tiempo, en el gráfico de cajas y bigotes se observa que existen diferencias significativas entre los tres tiempos de estudio (Fig.44), mostrando que las condiciones óptimas para inhibir el crecimiento de la bacteria son utilizando una concentración de 5 mg L⁻¹ incubándola por 72 h.

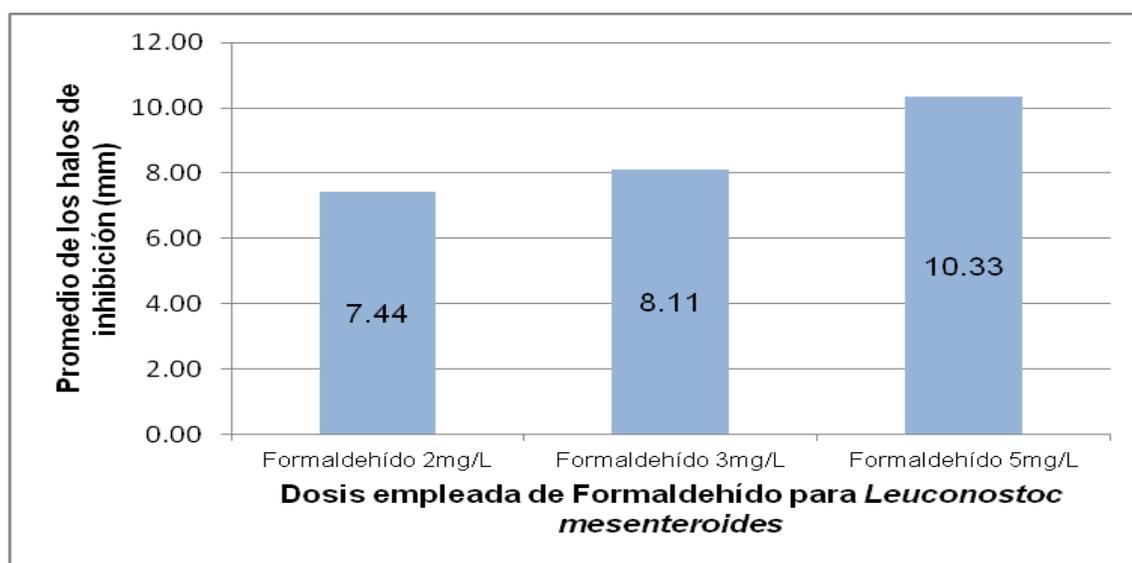


Fig. 42. Promedio de inhibición para *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes dosis de formaldehído

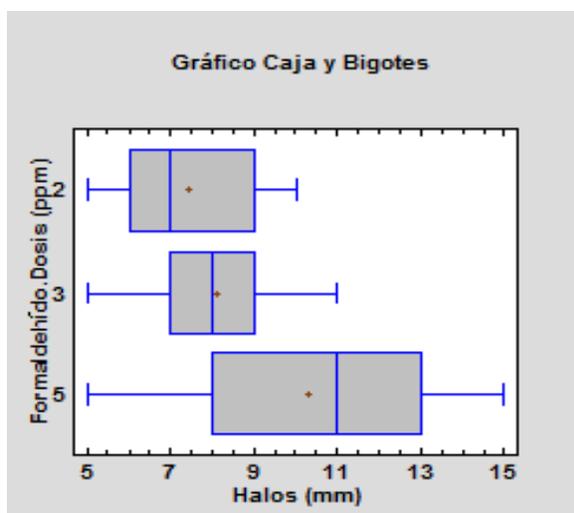


Fig. 43. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes dosis de formaldehído

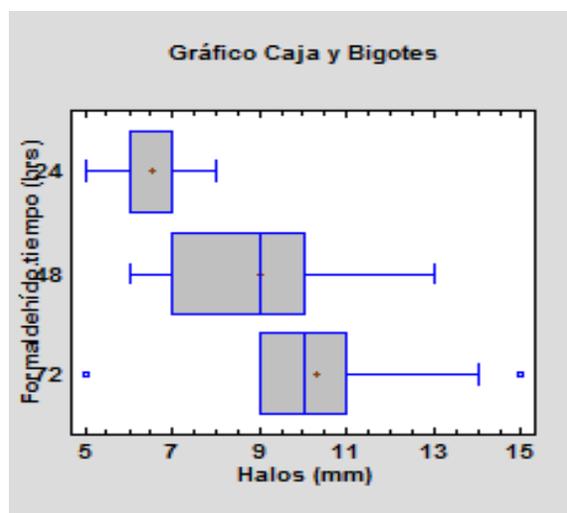


Fig. 44. Gráfico de caja y bigotes de halos de inhibición para *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes tiempos

4.11. Efecto inhibitorio del segundo experimento

Para poder conocer el efecto inhibitorio de los biocidas de estudio se tomó como referencia o biocida control al formaldehído, debido a que su efecto inhibitorio está demostrado (Zarco-Mercado, 2015). Sin embargo, debido a sus efectos adversos al ambiente y su toxicidad hacia los humanos no puede ser utilizado como biocida en alimentos para humanos (OMS, 1982).

Para poder obtener el porcentaje de efecto inhibitorio, se utilizó el mejor promedio de inhibición proveniente de la concentración de 5 mg L⁻¹. De esta manera se calcularon los porcentajes de efecto inhibitorio para los dos biocidas de estudio probados en *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* (Tablas 17 y 18). Para el cálculo del porcentaje inhibitorio se tomaron en cuenta las ecuaciones 1 y 2:

$$\% \text{ Efecto inhibitorio} = \frac{\text{Halo promedio de inhibición de CB } 10 \text{ mg L}^{-1}}{\text{Halo de inhibición del formaldehído } 5 \text{ mg L}^{-1}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Efecto inhibitorio} = \frac{11.06 \text{ mm}}{11.78 \text{ mm}} \times 100 = 93.89\% \text{ respecto al formaldehído (5 mgL}^{-1}) \quad (2)$$

Los porcentajes que se obtuvieron de cloruro de benzalconio (CB) y metam sodio (MS) para *Weissella confusa* muestran que los porcentajes de efecto inhibitorio de CB son

mayores que los del MS. Al realizar el análisis estadístico se observa que existe una diferencia significativa en el uso de los biocidas (Fig. 45), mostrando que el cloruro de benzalconio tiene una mayor respuesta de inhibición ante el microorganismo de estudio en este caso sobre *Weissella confusa*. Además, las dosis utilizadas para inhibir su crecimiento son menores.

Tabla 17. Efecto inhibitorio del cloruro de benzalconio (CB) y metam sodio (MS) en porcentaje para la bacteria *Weissella confusa*

Biocida	Dosis	Promedio del halo de inhibición (mm)	% Efecto inhibitorio
CB	10	11.06	93.89
CB	15	12.04	102.21
CB	20	13.77	116.89
MS	30	0	0
MS	40	7.93	67.32
MS	45	10.33	87.69

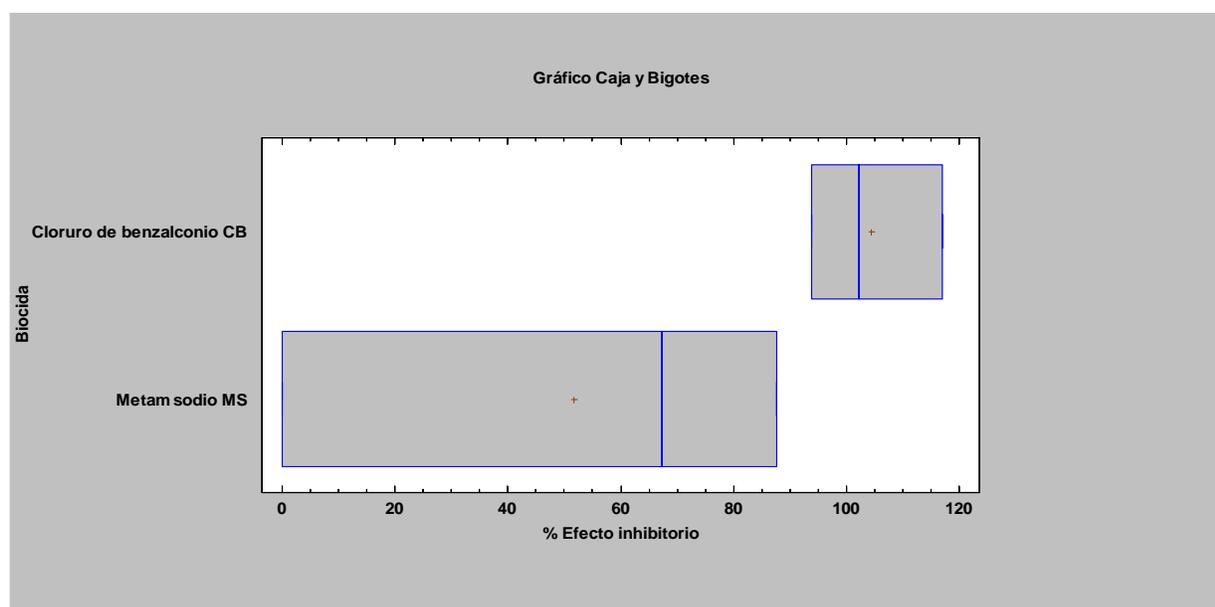


Fig. 45. Gráfico de cajas y bigotes para el % de efecto inhibitorio para *Weissella confusa* versus biocida (cloruro de benzalconio y metam sodio)

En cuanto a los resultados obtenidos para *Leuconostoc mesenteroides* con respecto de los porcentajes que se obtuvieron de cloruro de benzalconio y metam sodio se puede decir que los porcentajes de efecto inhibitorio del CB superan el 100%, por lo que son eficaces para inhibir el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, mientras que los de MS son menores que el 100%. De acuerdo con el análisis estadístico existe una

diferencia significativa entre los biocidas de estudio para inhibir el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides* (Fig. 46), indicando que el cloruro de benzalconio tiene un mayor porcentaje de efecto inhibitorio utilizando concentraciones más bajas que el metam sodio.

Tabla 18. Efecto inhibitorio del cloruro de benzalconio (CB) y metam sodio (MS) en porcentaje para la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*

Biocida	Dosis	Promedio del halo de inhibición (mm)	% Efecto inhibitorio
CB	10	10.71	103.68
CB	15	11.68	113.07
CB	20	12.63	122.27
MS	30	0	0
MS	40	7.70	74.54
MS	45	8.27	80.06

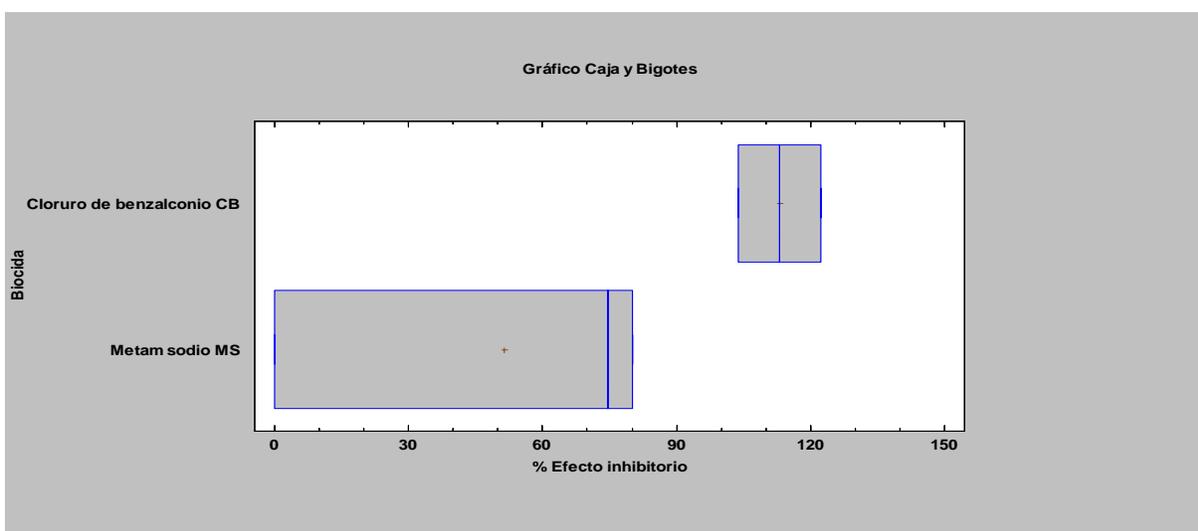


Fig. 46. Gráfico de cajas y bigotes para el % de efecto inhibitorio para *Leuconostoc mesenteroides* versus biocida (cloruro de benzalconio y metam sodio)

La Tabla 19 presenta la comparación de los porcentajes de efecto inhibitorio del cloruro de benzalconio y metam sodio ante las dos bacterias de estudio, *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*. Los resultados muestran que los porcentajes de efecto inhibitorio son muy similares para ambas bacterias; sin embargo, puede verse una leve superioridad de los porcentajes para *Leuconostoc mesenteroides* (Fig. 47). De acuerdo con el análisis estadístico que se realizó no existe diferencia alguna entre los porcentajes de efecto inhibitorio para las bacterias de estudio (Fig. 48).

Tabla 19. Comparación del % de efecto inhibitorio para las bacterias de estudio ante los biocidas de estudio (cloruro de benzalconio y metam sodio)

Biocida	Dosis	<i>Weissella confusa</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
		% Efecto inhibitorio	% Efecto inhibitorio
CB	10	93.89	103.68
CB	15	102.21	113.07
CB	20	116.89	122.27
MS	30	0	0
MS	40	67.32	74.54
MS	45	87.69	80.06

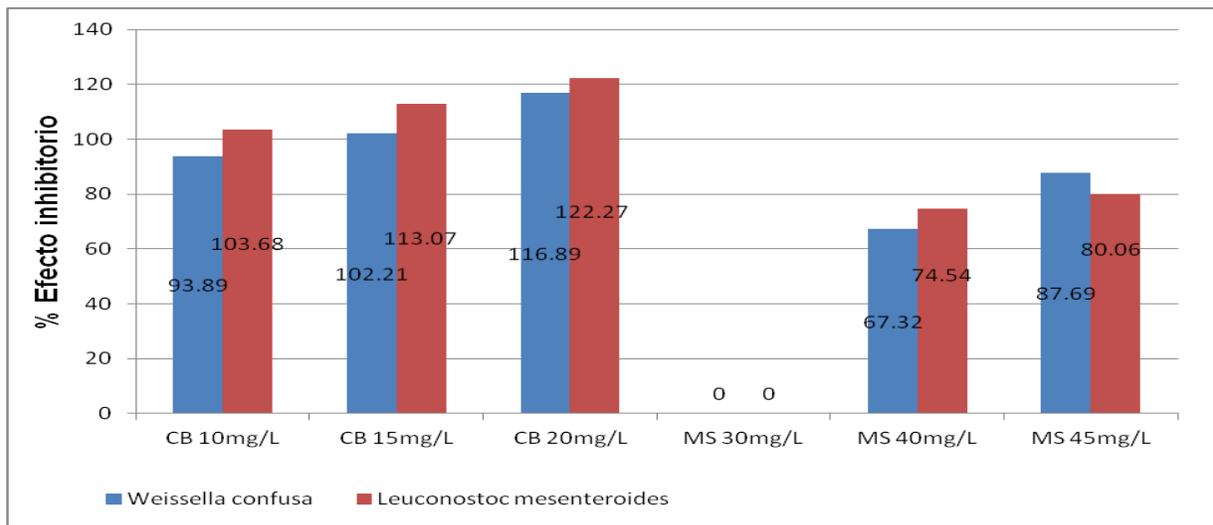


Fig. 47. Gráfico de la comparación del % de efecto inhibitorio de *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* versus biocida (cloruro de benzalconio y metam sodio)

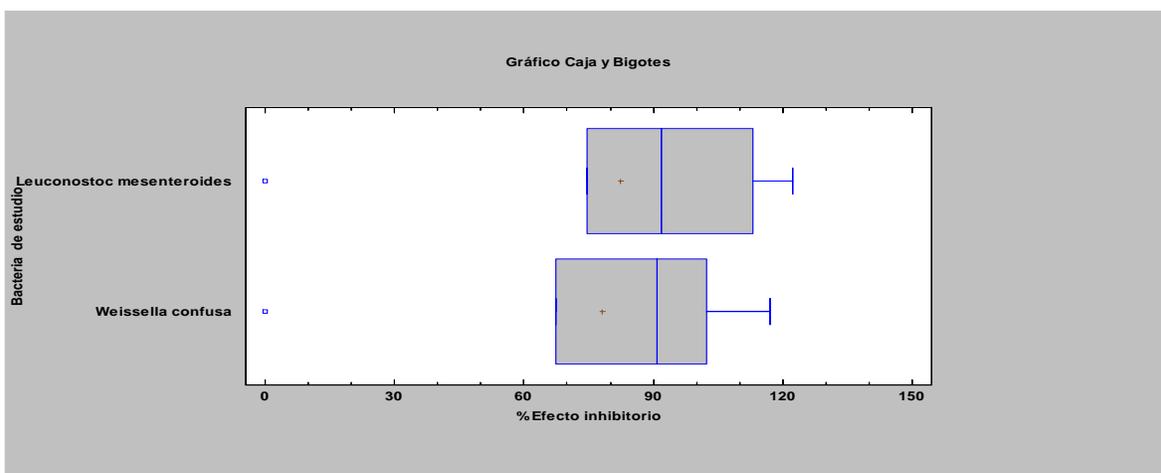


Fig. 48. Gráfico de cajas y bigotes para el % de efecto inhibitorio versus bacteria de estudio (*Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*)

5.1. Conclusiones

Considerando que el objetivo general era identificar a dos bacterias predominantes del jugo de caña *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* evaluando su susceptibilidad a dos biocidas comerciales (cloruro de benzalconio y metam sodio) y comparando las dosis empleadas para cada una de ellas y que los objetivos particulares fueron revisar las características que presenta la bacteria *Weissella confusa*, así como las aplicaciones que tiene en los diferentes campos de la ciencia, de aislar e identificar de jugo de caña de un ingenio azucarero a *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides*, de evaluar la susceptibilidad de ambas bacterias ante dos biocidas comerciales comparando las dosis y determinar si *Weissella confusa* puede actuar de forma antagónica o como bacteriocida ante *Leuconostoc mesenteroides* y, finalmente, comparar ambos biocidas con el formaldehído, considerándolo como referencia, a continuación se presentan las conclusiones alcanzadas.

- Se alcanzó el objetivo general, ya que se identificaron con un 96% de confianza a *Weissella confusa* y a *Leuconostoc mesenteroides*, aisladas del jugo de caña y se logró comparar su efecto inhibitorio ante los dos biocidas comerciales empleados, cloruro de benzalconio y metam sodio, usando 10, 15 y 20 mg L⁻¹ y 40 y 45 mg L⁻¹, respectivamente, para inhibir el crecimiento de ambas bacterias
- Se revisaron las características típicas de *Weissella confusa*, mostrando que se trata de una bacteria ácido láctica, Gram positiva, que puede actuar como antagónica de algunas bacterias patógenas
- Se logró aislar de jugo de caña de un ingenio azucarero cooperante (acuerdo de confidencialidad), tanto a *Leuconostoc mesenteroides* como a *Weissella confusa*, identificándolas mediante su caracterización morfológica y pruebas bioquímicas
- Las bacterias en estudio *Weissella confusa* y *Leuconostoc mesenteroides* presentan características morfológicas muy similares, ya que *Weissella confusa* proviene de la familia de *Leuconostoc*, por lo que existen pocas pruebas bioquímicas que las diferencien

- El diseño de experimento unifactorial que se efectuó permitió conocer las condiciones óptimas para el desarrollo de los microorganismos en estudio, destacando el medio de Agar MRS, a 37°C durante 24 horas
- Mediante el segundo experimento se logró determinar la susceptibilidad de *Weissella confusa* y de *Leuconostoc mesenteroides* ante los agentes biocidas en estudio, cloruro de benzalconio y metam sodio
- La bacteria *Weissella confusa* presentó los mayores halos de inhibición ante los biocidas como el cloruro de benzalconio y metam sodio; sin embargo, al calcular el % de efecto inhibitorio usando al formaldehído como control, *Leuconostoc mesenteroides* tiene una superioridad de los porcentajes, por lo que *Weissella confusa* no puede ser utilizado como bactericida para inhibir el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*
- Se corroboró que el biocida usado como referencia, el formaldehído, es el más eficaz de la experimentación. Sin embargo, también es un biocida poco convencional para ser utilizado en la industria alimentaria debido a su toxicidad (Anexo IV, Anexos 4a, b). En esta investigación con su referencia se calcularon los % de efecto inhibitorio de los otros dos
- Se comprobó que *Weissella confusa* no actúa como organismo antagónico de *Leuconostoc mesenteroides* debido a que ambas pueden proliferar sin ningún inconveniente en el medio de cultivo empleado

5.2. Perspectivas

Con base en esta experimentación y los resultados y conclusiones alcanzados se esbozan a continuación las perspectivas para la continuación de estas investigaciones.

- Realizar una búsqueda más detallada de por qué *Weissella confusa* no puede actuar como bactericida de *Leuconostoc mesenteroides*, a pesar de que posee efectos inhibitorios ante algunos patógenos causantes de enfermedades en alimentos (Serna-Cock *et al.*, 2010)

- Se debe continuar con la investigación para encontrar una bacteria que actúe como bactericida ante *Leuconostoc mesenteroides* y de esta manera poder ser usada en la industria azucarera para coadyuvar en la resolución de los problemas que esta última genera en la industria.

Nota: Los residuos producidos en esta investigación experimental fueron estabilizados antes de disponer de ellos (Anexo IV, Anexo 4b)

Bibliografía

- Arvizu-Bernal, D.I. y Ramos-Medina, J.C. (2010). Degradación del ditiocarbamato de sodio usado como plaguicida en el proceso de elaboración de azúcar en México mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, D.F. México
- Bell, S. M., Gatus, B. J., Pham, J. N., y Rafferty, D. L. (1999). Antibiotic susceptibility testing by the CDS method. *A concise laboratory manual. Arthur Productions Pty Ltd, Sydney. NSW: The antibiotic reference laboratory, South Eastern Area Laboratory Services.* Disponible: <http://web.med.unsw.edu.au/pathology-cds/CDS2006/CDSBOOK2.PDF>
- Bonilla-Vidal, F. (2013). Efecto de algunos factores de proceso sobre la degradación de la metilamina, uno de los subproductos del ditiocarbamato de sodio utilizado como agente biocida contra *Leuconostoc mesenteroides* en los ingenios azucareros mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Tesis profesional de Química de Alimentos. Facultad de Química, UNAM. México DF. México.
- CENICAÑA. (2010). Dirección electrónica (Consultada el 12 de Febrero 2015). http://www.cenicana.org/pop_up/fabrica/diagrama_obtencion.php
- Cock, L. S., Duque, L. F. R., Castillo, N. B. L., Valencia, C. E. E. (2012). *Weissella confusa* como un agente bioprotector en la inocuidad alimentaria contra patógenos Gram negativos. *Alimentos Hoy*, 21(27), 102-114.
- Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. y Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 595-603.
- CONADESUCA. (2015). Dirección electrónica (consultada el 31 octubre 2015) <http://www.cndsca.gob.mx/regionesparticipacionestatal.html>
- Crespo, H. G. (1988). *Historia del azúcar en México*. Vol. 1. Fondo de Cultura Económica. Vol. I. ISBN: 9681629884. México DF. México.
- Cuervo-Mulet, R. A., Ledesma, A. J., Durán-Vanegas, J. A. y Argote-Vega, F. E. (2010). Aislamiento y control microbiológico de *Leuconostoc mesenteroides*, en un ingenio

- para optimizar el rendimiento de azúcar y etanol. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(2), 31-40.
- DIBICO. (2015). Dirección electrónica (Consultada el 11 de enero 2015). <http://www.dibico.com/productos.php?t=med&m=d&ldCat=1>
- DOF. (2015). Dirección electrónica (Consultada el 17 de junio 2015). http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5393379&fecha=22/05/2015
- DOF. (2009). Norma Oficial Mexicana. Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. Jueves 24 de septiembre de 2009. Diario Oficial (Primera Sección). Tabla 21 - Reglas para la escritura de los números y su signo decimal. Signo decimal. El signo decimal debe ser una coma sobre la línea (,) o un punto sobre la línea (.). Si la magnitud de un número es menor que la unidad, el signo decimal debe ser precedido por un cero. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. México D.F. México.
- Espeche, M. C., Otero, M. C., Sesma, F., y Nader-Macias, M. E. F. (2009). Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary Microbiology*, 135(3), 346-357.
- Flores-Santillán, B.A., Pérez-Cordero, V.A. (2013). Determinación y cuantificación del isotiocianato de metilo (MITC) bajo diferentes parámetros de operación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), Tesis de licenciatura. México, D.F.: UNAM, Facultad de Química.
- INAZUCAR. (2015). Dirección electrónica (consultada el 30 de mayo 2015). http://www.inazucar.gov.do/obtension_azucar.htm
- Jiménez, E. R. (2005). La dextranasa a lo largo de la Industria azucarera. *Biotecnología Aplicada*, 22(1), 11-19.
- Kochergin, V. (2002). Processing opportunities for the future. *Int. Sugar J.*, 104 (1243), 290-300.
- Larrahondo, J. E. (1995). Calidad de la caña de azúcar. *El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia*. Eds. Cassalet, C, 337-354.
- MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana. México D.F. México. (Traducción

- del libro *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria* de Jean F Mac Faddin, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, 912 páginas).
- MAPFRE. (2015). Dirección electrónica (consultada el 17 de agosto 2015). https://www.fundacionmapfre.org/documentacion/publico/i18n/consulta/resultados_navegacion.cmd?busq_autoridadesbib=MAPA20080634452
- McMurry, J. (2008). *Química Orgánica*. 7a Edición Cengage Learning Editores, SA Capitulo 26. a, 1050, 1016. México DF, México.
- Mendoza-Hernández, H. (2010). Técnicas de análisis de control de calidad aplicadas a la problemática que representa *Leuconostoc mesenteroides* en la industria azucarera. Tesis de licenciatura. UNAM FES Cuautitlán. Estado de México, México.
- Nam, H., Ha, M., Bae, O., y Lee, Y. (2002). Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4642-4645.
- OMS. (1982). FAO/OMS. Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organización Mundial de la Salud. Residuos de plaguicidas en los alimentos. Estudio FAO: Producción y Protección Vegetal N° 37. Roma: Informe de la Reunión Conjunta 1981 del Cuadro de Expertos de la FAO en Residuos de Plaguicidas y el Medio Ambiente y el Grupo de Expertos de la OMS en Residuos de Plaguicidas. Disponible:
www.codexalimentarius.org/input/download/report/205/al03_24s.pdf
- Ramírez-Gama, R.M., Luna-Millán, B., Velázquez-Madrado, O., Vierna-García, L., Mejía-Chávez, A., Tsuzuki-Reyes, G., Hernández-Gómez, L., Muggenburg, I., Camacho-Cruz, A. Urzúa-Hernández, M. del C., (2008). Manual de prácticas de microbiología general. México D.F.: Facultad de Química, UNAM.
- SAGARPA. (2012). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Importancia de la agroindustria de la caña de azúcar. Disponible en <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documents/Cultivos%20Agroindustriales/Impactos%20Ca%C3%B1a.pdf>
- Serna-Cock, L., Valencia-Hernández, L. y Campos-Gaona, R. (2010). Kinetic of fermentation and antimicrobial activity of *Weissella confusa* against

- Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (55), 55-65.
- Shandong IRO. (2016). Dirección electrónica (consultada el 05 febrero 2016)
<http://www.irowater.com/span/index.htm>
- SIAP. (2015). Dirección electrónica (consultada el 26 mayo 2015).
<http://www.siap.gob.mx/siaprendes/contenidos/3/03-cana-azucar/contexto-3.html>
- Villa, M.D. (2008). Efectos de microbicidas y antagonistas microbianos sobre microorganismos causales del deterioro poscosecha de caña y su impacto en las pérdidas de sacarosa en el ingenio. Tesis de Maestría en Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional. Tlaxcala, México. Disponible en:
web.med.unsw.edu.au/cdstest/GTF_CDS_site/Files/manuals/EarlierVersions/CDS_Manual_5_Simplex.pdf. 25 de noviembre de 2014.
- ZAFRANET. (2015). Dirección electrónica (consultada el 5 octubre 2015)
<http://www.zafranet.com/productores-caneros/>
- Zarco-Mercado, E. (2014). Identificación de bacterias mesófilas aerobias predominantes en el jugo de caña de un ingenio y su susceptibilidad a tres biocidas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. México.
- Zepeda-Guardado, E. R. (2012). *Propuesta de alternativas para la reducción de pérdidas de sacarosa en un ingenio azucarero*. (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador). San Salvador, El Salvador. Disponible en:
http://ri.ues.edu.sv/1647/1/TESIS-PROPUESTA_DE_ALTERNATIVAS_DE_REDUCCI%C3%93N_DE_P%C3%89RIDAS_DE_SACAROSA.pdf



Fig. A1. Aislamiento masivo de *Leuconostoc mesenteroides* a las 24 horas



Fig. A2. Aislamiento masivo de *Weissella confusa* a las 24 horas



Fig. A3. Aislamiento de *Leuconostoc mesenteroides* a las 72 horas



Fig. A4. Aislamiento de *Weissella confusa* a las 72 horas



Fig. A5. Aislamiento por agotamiento de *Leuconostoc mesenteroides*



Fig. A6. Aislamiento por agotamiento de *Weissella confusa*

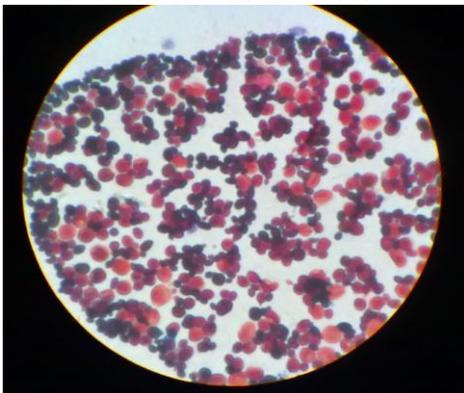


Fig. A7. Cocos Gram negativos y coccobacilos Gram positivos obtenidos del aislamiento

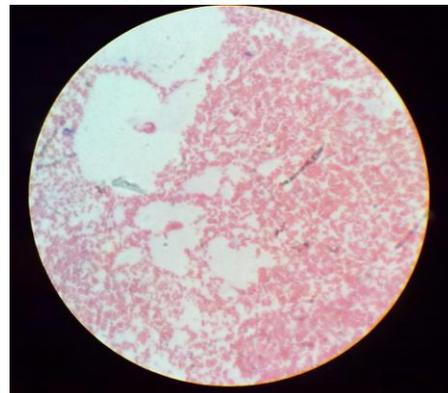


Fig. A8. Cocos Gram negativos obtenidos del aislamiento

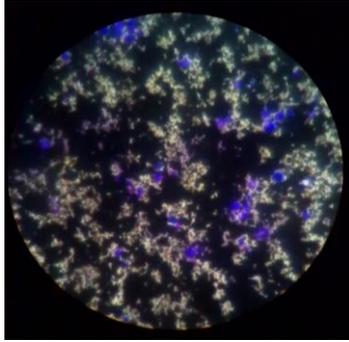


Fig. A9. Cocobacilos Gram positivos con ausencia de cápsula obtenidos del aislamiento

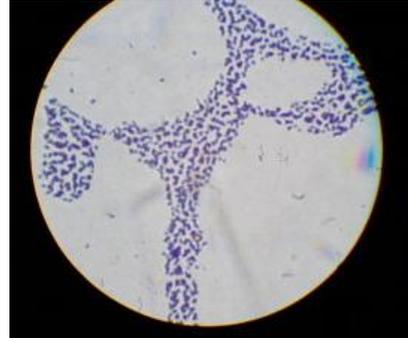


Fig. A10. Micrococos Gram positivos agrupados en cadenas cortas o pares



Fig. A11. Cocos Gram positivos agrupados en tétradas

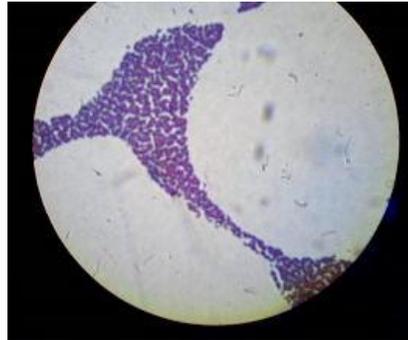


Fig. A12. Cocobacilos Gram positivos agrupados en cadenas cortas

Resultado de VITEK. Para *Leuconostoc mesenteroides*

Facultad de Química UNAM

Nº de cliente: VTK DOS 60
Equipo Nº: 144FD785

Informe de examen

Editado 10-dic-2015 11:28 CST
Editado por: ejuarez

Nombre del paciente:
Examen: L norma-1

Nº paciente:
Sección: CEPARIO

Bionúmero: 160001044733731
Organismo seleccionado: *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides*

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	Nº de lote: 242354610	Fecha caduc.: 29-ago-2016 12:00 CST
	Finalizado: 09-dic-2015 21:29 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 8,00 horas
Organismo seleccionado	96% Probabilidad <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides</i>		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 160001044733731		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>mesenteroides</i> dMAN(81),dXYL(89),			

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	-	9	BGAL	+	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	+	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	(-)	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	-	37	dGAL	+
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	(+)	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	+	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 06.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Fig. A13. Formato de Registro de la prueba de VITEK para *Leuconostoc mesenteroides*

Resultado de VITEK. Para *Weissella confusa*

Facultad de Química UNAM

Nº de cliente: VTK DOS 60
Equipo Nº: 144FD785

Informe de examen

Editado 09-dic-2015 13:26 CST
Editado por: ejuarez

Nombre del paciente:
Examen: w norma-1

Nº paciente:
Sección: CEPARIO

Bionúmero: 050000042651651
Organismo seleccionado: Unidentified Organism

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	Nº de lote: 242354610	Fecha caduc.: 29-ago-2016 12:00 CST
	Finalizado: 07-dic-2015 19:17 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 6,50 horas
Organismo seleccionado	Unidentified Organism		
Organismo SRF	Bionúmero: 050000042651651		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	+	8	ADH1	+	9	BGAL	+	11	AGLU	(+)
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	+	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	-	37	dGAL	+
38	dRIB	-	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	-	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	-	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	-	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 06.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Fig. A14. Formato de Registro de la prueba de VITEK para *Weissella confusa*

Debido a que el VITEK, no detecta a *Weissella confusa* de los resultados que se obtuvieron se compararon con los datos bibliográficos de Serna *et al.* (2010). La mayoría de los resultados comparados fueron similares

Tabla A1.-Comparación de los resultados teóricos presentados por Serna *et al.*, 2010 con los obtenidos en la prueba de VITEK

#	Prueba	Nombre de la prueba	Resultado experimental	Resultado teórico
2	AMY	D-AMYGDALINA	-	+
5	dXYL	D-XILOSA	+	+
8	ADH1	ARGININA DIHIDROLASA	+	+
9	BGAL	BETA- GALACTOSIDASA	+	+
11	AGLU	ALFA- GLUCOSIDASA	+	+
25	AGAL	ALFA-GALACTOSIDASA	+	+
30	dSOR	D-SORBITOL	-	-
31	URE	UREASA	-	-
37	dGAL	D-GALACTOSA	+	+
38	dRIB	D-RIBOSA	-	-
42	LAC	LACTOSA	-	-
44	NAG	N-ACETIL- D-GLUCOSAMINA	-	+
45	dMAL	D-MALTOSA	+	+
46	BACI	Resistencia BACITRACINA	+	+
47	NOVO	Resistencia NOVOBIOCINA	+	+
50	NC6.5	Crecimiento en 6.5% NaCl	+	+
52	dMAN	D-MANITOL	+	-
54	MBdG	METHIL-B-D-GLUCOPIRANOSIDASA	-	-
57	dRAF	D-RAFINOSA	-	-
58	O129R	O129 RESISTENCIA (com vibrio)	+	+
59	SAL	SALICINA	+	+
60	SAC	SACAROSA	+	+
62	dTRE	D-TREALOSA	-	-
63	ADH2s	ARGININA DIHIDROLASA 2	+	+

Anexo III. Análisis estadístico de los resultados

Tabla A2. Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de *Weissella confusa* ante CB

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Dosis	33.8822	2	16.9411	15.67	0.0001
B:tiempo	4.84667	2	2.42333	2.24	0.1351
INTERACCIONES					
AB	1.17778	4	0.294444	0.27	0.8919
RESIDUOS	19.46	18	1.08111		
TOTAL (CORREGIDO)	59.3667	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla de análisis de varianza, ANOVA en inglés, descompone la variabilidad de halos de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre halos de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla A3. Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de *Weissella confusa* ante las dosis de CB

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Dosis</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
10	9	11.0556	0.346588	X
15	9	12.0444	0.346588	X
20	9	13.7667	0.346588	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
10 - 15		-0.988889	1.02977
10 - 20	*	-2.71111	1.02977
15 - 20	*	-1.72222	1.02977

* indica una diferencia significativa

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al

lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (*LSD*) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a cero.

Tabla A4. Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de *Weissella confusa* ante MS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Dosis	526.427	2	263.213	2042.17	0.0000
B:tiempo	0	2	0	0.00	1.0000
INTERACCIONES					
AB	0	4	0	0.00	1.0000
RESIDUOS	2.32	18	0.128889		
TOTAL (CORREGIDO)	528.747	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla de análisis de varianza, ANOVA en inglés, descompone la variabilidad de halos de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre halos de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Anexo III. Análisis estadístico de los resultados

Tabla A5. Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de *Weissella confusa* ante las dosis de MS

Método: 95.0 porcentaje *LSD*

<i>Dosis</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
30	9	0	0.11967	X
40	9	7.93333	0.11967	X
45	9	10.3333	0.11967	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
30 - 40	*	-7.93333	0.35556
30 - 45	*	-10.3333	0.35556
40 - 45	*	-2.4	0.35556

* indica una diferencia significativa

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (*LSD*) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a cero.

Tabla A6. Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de *Weissella confusa* ante formaldehído

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Dosis	94.2963	2	47.1481	30.31	0.0000
B:tiempo	108.074	2	54.037	34.74	0.0000
INTERACCIONES					
AB	13.7037	4	3.42593	2.20	0.1097
RESIDUOS	28.0	18	1.55556		
TOTAL (CORREGIDO)	244.074	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla de análisis de varianza, ANOVA en inglés, descompone la variabilidad de halos de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre halos de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla A7. Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de *Weissella confusa* ante las dosis de formaldehído

Método: 95.0 porcentaje LSD

Dosis	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
2	9	7.44444	0.41574	X
3	9	8.33333	0.41574	X
5	9	11.7778	0.41574	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2 - 3		-0.888889	1.23523
2 - 5	*	-4.33333	1.23523
3 - 5	*	-3.44444	1.23523

* indica una diferencia significativa

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a cero.

Tabla A8. Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* ante CB

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Dosis	16.6274	2	8.3137	26.91	0.0000
B:tiempo	1.29852	2	0.649259	2.10	0.1512
INTERACCIONES					
AB	0.985926	4	0.246481	0.80	0.5420
RESIDUOS	5.56	18	0.308889		
TOTAL (CORREGIDO)	24.4719	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla de análisis de varianza, ANOVA en inglés, descompone la variabilidad de halos de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre halos de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla A9. Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* ante las dosis de CB

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Dosis</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
10	9	10.7111	0.185259	X
15	9	11.6778	0.185259	X
20	9	12.6333	0.185259	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
10 - 15	*	-0.966667	0.550435
10 - 20	*	-1.92222	0.550435
15 - 20	*	-0.955556	0.550435

* indica una diferencia significativa

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (*LSD*) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a cero.

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* ante MS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Dosis	383.847	2	191.923	7851.41	0.0000
B:tiempo	0	2	0	0.00	1.0000
INTERACCIONES					
AB	0	4	0	0.00	1.0000
RESIDUOS	0.44	18	0.0244444		
TOTAL (CORREGIDO)	384.287	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla de análisis de varianza, ANOVA en inglés, descompone la variabilidad de halos de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre halos de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla A11. Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* ante las dosis de MS

Método: 95.0 porcentaje LSD

Dosis	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
30	9	0	0.0521157	X
40	9	7.7	0.0521157	X
45	9	8.26667	0.0521157	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
30 - 40	*	-7.7	0.154844
30 - 45	*	-8.26667	0.154844
40 - 45	*	-0.566667	0.154844

* indica una diferencia significativa

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a cero.

Tabla A12. Análisis de varianza (ANOVA, en inglés) para halos de inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* ante formaldehído

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Dosis	41.1852	2	20.5926	7.41	0.0045
B:tiempo	66.0741	2	33.037	11.89	0.0005
INTERACCIONES					
AB	33.037	4	8.25926	2.97	0.0477
RESIDUOS	50.0	18	2.77778		
TOTAL (CORREGIDO)	190.296	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La tabla de análisis de varianza, ANOVA en inglés, descompone la variabilidad de halos de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre halos de inhibición con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla A13. Pruebas de rangos múltiples para halos de inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* ante las dosis de CB

Método: 95.0 porcentaje LSD

Dosis	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
2	9	7.44444	0.555556	X
3	9	8.11111	0.555556	X
5	9	10.3333	0.555556	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2 - 3		-0.666667	1.65064
2 - 5	*	-2.88889	1.65064
3 - 5	*	-2.22222	1.65064

* indica una diferencia significativa

El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a cero.

Anexo 4a. Referencia sobre la toxicidad del formaldehído (Venezuela)

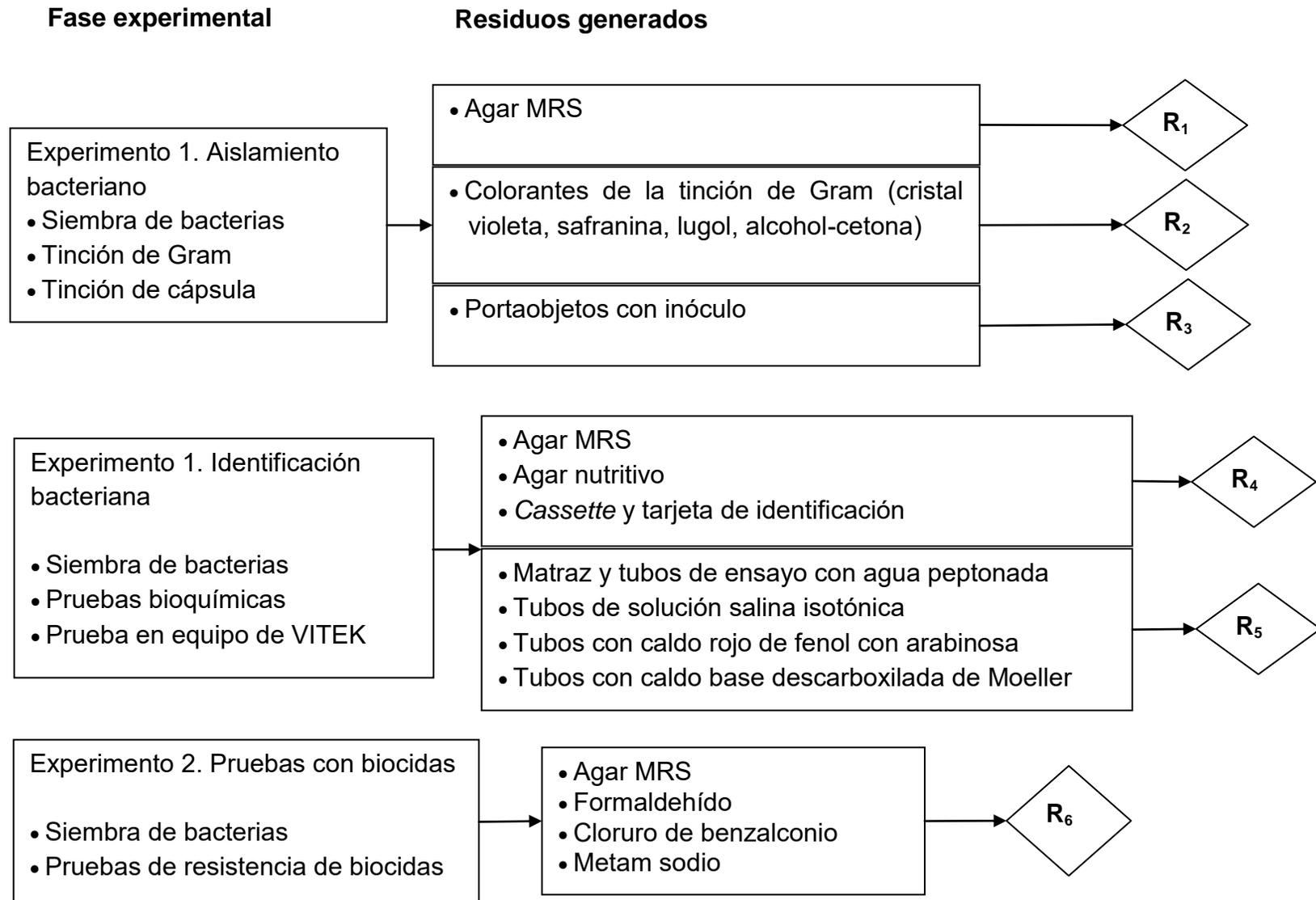
Russo-de-Méndez, T. 2000. Efectos tóxicos crónicos del formaldehído. **MedULA**. 9(1-4):45-57. Dirección electrónica: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=36667&id_seccion=2437&id_ejemplar=3790&id_revista=147

Resumen

Se describen los efectos tóxicos de la exposición ocupacional crónica al formaldehído. Se estudiaron 66 personas, adultas, hombres y mujeres, expuestos en forma crónica al formaldehído. Se utilizó un cuestionario como instrumento de medición. Los resultados son: 31 Estudiantes (47%), 11 Profesores (17%), 4 Obreros (6%) de la Cátedra de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Los Andes; 16 Empleados de los Servicios Funerarios de la ciudad de Mérida (24%) y 4 Empleados (6%) de la morgue del Cuerpo de Policía Científica (Región Mérida). Edad entre 18 y 56 años (media: 37 años). Sexo: predominio del sexo masculino, 44 personas (66.6%). Tiempo de Trabajo: de 1 a 30 años (media: 15 años). Tiempo de Exposición de 8 a 72 h/semana (media: 28 h/sem). Alteraciones respiratorias: representaron un 30% (6) de las patologías observadas: irritación nasal, obstrucción nasal, ardor de garganta, y tos seca, se presentaron en los cinco grupos de estudio con frecuencia de una vez al día; epistaxis y disnea se presentaron en los cinco grupos de estudio, con frecuencia de cada 30 días. Alteraciones neurológicas, representaron un 30% (6) de las patologías observadas: dolor de cabeza, una vez al día en estudiantes; cada 7 días en los obreros, funerarios y empleados CPTJ y cada 15 días en profesores y obreros; mareos, una vez al día en estudiantes y cada 7 días en los grupos restantes; fatiga, se presentó una vez al día en los cinco grupos de estudio; somnolencia, una vez al día en cuatro de los grupos y cada siete días en los profesores; irritabilidad, una vez al día en estudiantes y empleados funerarios, disminución de la memoria reciente, una vez al día en los profesores, obreros y empleados funerarios. Alteraciones dermatológicas, representaron un 25% (5) de las patologías observadas: urticaria, en los cinco grupos con una frecuencia de vez al día; ampollas, en cuatro de los grupos menos los profesores cada 15 días; daños en las uñas, cada 30 días en estudiantes, obreros y empleados funerarios y dermatitis en los estudiantes, obreros y empleados funerarios cada 30 días; prurito, en los estudiantes, empleados funerarios y empleados PTJ, una vez al día. Alteraciones oculares, representaron un 15% (3) de las patologías observadas: lagrimeo, irritación ocular una vez al día en los cinco grupos estudiados; la conjuntivitis, se presentó solo en los empleados funerarios, cada 30 días. Los resultados revelaron que la toxicidad del formaldehído sobre las personas expuestas o en contacto con él generan como patologías más frecuentes las respiratorias, neurológicas, dermatológicas y oculares; se encontró como coadyuvantes la ausencia de medidas de higiene y seguridad en el medio laboral y el desconocimiento del marco jurídico laboral y de seguridad e higiene por parte de los trabajadores.

Palabras clave: Formaldehído, toxicidad, riesgo laboral, exposición laboral, enfermedad profesional, cáncer

4b. Diagrama de flujo de los residuos generados durante la investigación



Anexo IV. Disposición controlada de los residuos producidos en esta investigación

R1 y R4. Las cajas de agar (MRS y nutritivo), *cassette* y la tarjeta de identificación fueron incinerados. Para ello fueron colocados en bolsas rojas (color asignado a residuos peligrosos) y etiquetados bajo los lineamientos de la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM, para que dicha dependencia los recolectara.

R2. Generados de la tinción de Gram para observar la morfología de las bacterias de estudio, los cuales fueron una combinación de los colorantes, por lo que se consideran dañinos para el ambiente, por lo que fueron almacenados y etiquetados bajo los lineamientos de la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM para su disposición controlada.

R3. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 min en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10% a partir de una solución comercial, se lavan con detergente líquido, se enjuagan y sumergen en alcohol al 95% durante 24h.

R5. Proveniente de las pruebas de identificación bacteriana, todo el material con las soluciones utilizadas fueron esterilizadas en autoclave a 121°C, 103.42 kPa (15 lb_f/in²) de presión 15 min, para su posterior disposición como residuos orgánicos, mientras que el material fue lavado con detergente líquido se enjuagaron y secaron para su uso posterior.

R6. Corresponden a desechos generados de las pruebas con biocidas (cloruro de benzalconio, metam sodio y formaldehído), los cuales son considerados peligrosos y tóxicos para la salud, por lo que fueron almacenados y etiquetados bajo los lineamientos de la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM para su disposición controlada.