

Estudio fisiológico de una cepa de levadura con potencialidades para el enriquecimiento proteico del bagazo de caña de azúcar

María Isabel Sánchez, Alietis Santos, Julio César Dustet,* Gilda Guerra, Teresa León, Juan Argüelles, Miguel Ramos-Leal, Ana Margarita Manzano, Gisela Casado y Bertha Gómez.

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 entre Calles J e I, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana. *Facultad de Química, Instituto Superior Politécnico "J.A. Echeverría". Correo electrónico: isabel@fbio.uh.cu

Palabras clave: levadura, *Pichia guilliermondii*, biomasa proteica, fermentación.
Key words: yeast, *Pichia guilliermondii*, protein biomass, fermentation.

RESUMEN. La producción de biomasa microbiana se presenta como una alternativa destinada a cubrir las necesidades nutricionales del hombre y los animales. Las levaduras son los microorganismos más ampliamente utilizados en la producción de proteína unicelular, fundamentalmente por poseer un elevado contenido de proteína, superior incluso al de los alimentos consumidos tradicionalmente. En el presente trabajo se realizó un estudio fisiológico de la cepa *Pichia guilliermondii* que tiene potencialidades para ser utilizada en un proceso de fermentación en estado sólido para obtener biomasa proteica. Esta cepa de levadura presentó una adecuada utilización de miel C como fuente de carbono y energía, tanto en cultivos sumergidos como en estado sólido. Toleró un amplio intervalo de pH en el medio de cultivo sin una merma apreciable en el crecimiento, no necesitó el suministro de extracto de levadura y utilizó adecuadamente la urea como fuente de nitrógeno.

ABSTRACT. Microbial biomass production is an alternative to supply the nutritional necessities for humans and animals. Yeasts are the most used microorganism in protein biomass production, mainly for their high protein content, higher than many traditional foods. In this work a physiological study of *Pichia guilliermondii* is presented. This strain has potential to be used in a solid state fermentation process for obtaining protein biomass. This yeast strain showed a good use of sugarcane molasses as sole carbon source and energy, in both submerged and solid fermentation. This strain tolerated a wide range of pH in the medium without decreasing their growth. It was not necessary to supply yeast extract in the medium and urea was the adequate nitrogen source chosen.

INTRODUCCIÓN

La población humana mundial se estima en 5,7 billones de habitantes y se incrementa anualmente en unos 94 millones. La agricultura convencional es incapaz de suministrar suficientes alimentos para satisfacer la demanda, por lo que la FAO predice un gran déficit de proteína en los países desarrollados y en vías de desarrollo.¹

El uso de levaduras como fuente proteica tiene ventajas sobre el res-

to de los microorganismos, no solo por poseer un elevado contenido de proteínas y vitaminas necesarias para el hombre, sino por la cultura que existe sobre su consumo. Las células de levadura durante mucho tiempo han contribuido a aumentar el valor nutricional de los alimentos.^{2,3}

La mayor tendencia es utilizar las levaduras como alimento animal y de esta forma, satisfacer los requeri-

mientos nutricionales de los animales, reduciendo así, el flujo de soya, harinas de pescado y cereales utilizados en su alimentación. Esta situación permite que estos productos sean más accesibles para el consumo humano.^{4,5}

Para obtener biomasa de levadura y destinarla a la alimentación animal se han desarrollado varias tecnologías, las más ampliamente utilizadas se basan en los cultivos sumergidos, pero el aumento de los costos de producción han disminuido su uso. Se presenta entonces, la fermentación en estado sólido como una alternativa con un costo de producción aceptable, que tiene la ventaja de que además de las proteínas y enzimas presentes en el producto, el material fibroso y los azúcares constituyen la fuente de fibra y energía necesaria para la dieta.⁶⁻⁸

El diseño del medio de cultivo es una de las tareas más importantes dentro de la tecnología biológica. Según Winklen, dentro del costo total de los productos biotecnológicos, las materias primas pueden representar entre un 30 y un 80 %.⁹ Además la composición del medio de cultivo tiene que satisfacer todos los requerimientos nutricionales del microorganismo. El empleo de subproductos de las cosechas agrícolas ha cobrado especial significado. Estas materias primas, además de su valor nutricional, son abundantes y baratas.^{7,10} En el caso de

Cuba, se ha dirigido fundamentalmente al uso de derivados de la industria azucarera, como por ejemplo mieles, bagazo, cachaza, jugo de caña, entre otros.¹⁰⁻¹²

El objetivo del presente trabajo fue estudiar fisiológicamente a la cepa *Pichia guilliermondii* LEV₁ que tiene potencialidades para ser utilizada en un proceso de fermentación en estado sólido para obtener biomasa proteica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Pichia guilliermondii LEV₁, perteneciente al cepario del laboratorio de Ecología Microbiana del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana.

Medios de cultivo

El medio 1 para fermentación en cultivos sumergidos estuvo constituido por miel C 2 %, (NH₄)₂HPO₄ 1 %, Ext Lev 0,5 %, pH 5,5.

El medio 2 para fermentación en estado sólido (FES) está constituido por una mezcla bagazo-zeolita natural (relación 5/1) como sustrato inerte, miel C 20 % (p/p_s), (NH₄)₂HPO₄ 1 %, extracto de levadura 0,5 %, pH 5,5

Todos los medios de cultivo se esterilizaron a 121 °C por 15 min .

Preparación del inóculo

En todos los casos, se prepararon los inóculos a partir de un precultivo de levadura crecida en cuña de agar extracto de malta, de 24 h de incubación a 30 °C . Se arrastró el crecimiento con asa de platino y se añadió a un erlenmeyer de 500 mL, con un volumen efectivo de 100 mL del medio 1. Los frascos de inoculación se mantuvieron agitados a 100 r/min durante 16 h, a una temperatura de 30 °C .

Condiciones de fermentación

Los cultivos sumergidos se realizaron en erlenmeyer de 500 mL de capacidad (20 % volumen efectivo). Los cuales una vez inoculados, a razón del 3 % (V/V), se mantuvieron agitados en zaranda orbital Biozart 2013 a 100 r/min y 30 °C durante 24 h .

La FES tuvo lugar en erlenmeyer de 250 mL, con 6 g de materia seca, los cuales una vez inoculados, a razón del 20 % (V/P_H), se incubaron a 30 °C durante 24 h .

Procesamiento analítico

Determinación de peso seco. Se realizó por el método descrito por Herrera y Casado.¹³

Azúcares reductores totales (ART). Se determinaron por el método de Eynon Lane modificado.¹⁴

Determinación de pH. Se utilizó un potenciómetro digital Pracitronic, empleando alícuotas del medio de fermentación.

Procesamiento estadístico. Se emplearon análisis estadísticos para comprobar la normalidad y homogeneidad de la varianza (prueba de Kolmogorov - Smirnov y las pruebas de Bartlett respectivamente). Se utilizaron análisis de varianza de clasificación simple y para comparar las medias se utilizaron las pruebas de rangos múltiples de Duncan para $p < 0,05$. Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó el programa estadístico de computación TONYSTAT .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento en medio líquido con miel C

La miel final o melaza de caña de azúcar es la fuente de carbono más utilizada en la obtención de biomasa de levadura, por ser una fuente barata de la cual los microorganismos no solo obtienen el carbono, sino también, factores de crecimiento. En el perfil de crecimiento de la levadura *Pichia guilliermondii* en cultivos sumergidos se pudieron observar claramente todas las fases del crecimiento microbiano, así como la presencia de una etapa de adaptación de alrededor de 4 h (Fig. 1) .

La cepa LEV₁ presentó una fase exponencial de aproximadamente 8 h, donde alcanzó una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0,24 \text{ h}^{-1}$ con un tiempo de duplicación de 2,89 h . Obtuvo a las 24 h, 3,97 g/L de biomasa, para lo cual consumió el 86,2 % (p/p) del azúcar presente en el medio, con un rendimiento biomasa - sustrato del 30,7 % . La máxima productividad se alcanzó a las 14 h de crecimiento con un valor de 0,24 g/(L · h).

Los resultados en cuanto a biomasa y rendimiento biomasa - sustrato, concuerdan con los obtenidos por Herrera y Díaz, quienes utilizando medios que contenían vinazas de destilerías y mieles finales de caña de azúcar como fuente de carbono, lograron de 3 a 4 g/L de biomasa, con un rendimiento biomasa - sustrato entre el 20 y 30 %.¹²

Este resultado demostró que la levadura *P. guilliermondii* es capaz de obtener un adecuado crecimiento utilizando miel C como fuente de carbono.

Crecimiento en medio sólido

Se ha informado que los microorganismos que tienen buen comportamiento en cultivos sumergidos no necesariamente lo tienen en sólidos, debido a que los bajos contenidos de humedad y los gradientes de temperatura y nutrientes que se generan en estos últimos limitan el crecimiento y la formación de productos.⁷ Por ello, fue necesario evaluar el comportamiento de la referida levadura en lechos sólidos con mieles de caña.

Haciendo crecer a *P. guilliermondii* en FES a 70 % humedad durante 24 h de incubación a 30 °C se obtuvo un producto con 2,68 % (p/p seco) de biomasa con una adecuada eficiencia (Fig. 2). Producciones similares han sido alcanzadas por otros autores con levaduras en FES a esta escala de trabajo.^{15,16}

Crecimiento a diferentes pH

El pH es un factor abiótico que influye en el crecimiento y los procesos metabólicos de los microorganismos. El intervalo óptimo de crecimiento de las levaduras se encuentra entre 3 y 7.

Al estudiar la influencia de este factor en el crecimiento de *P. guilliermondii* (Tabla 1), el análisis estadístico arrojó que no existían diferencias significativas en el crecimiento de esta levadura en el intervalo de

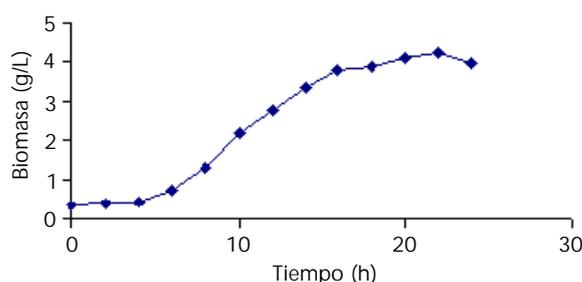


Fig. 1. Cinética de crecimiento de *Pichia guilliermondii* en medio líquido utilizando miel C a 30 °C, 100 r/min .

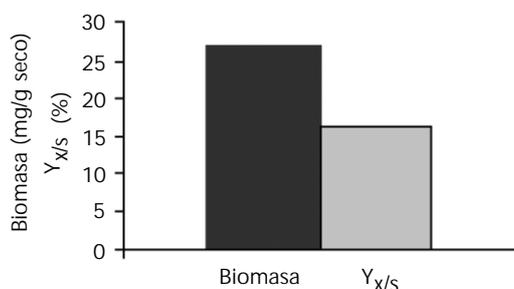


Fig. 2. Crecimiento y rendimiento biomasa - sustrato obtenido por *P. guilliermondii* en FES, a 70 % humedad a las 24 h de incubación a 30 °C.

Tabla 1. pH (inicial y final), contenido de biomasa y rendimiento biomasa - sustrato en cultivo sumergido de *P. guilliermondii* a 30 °C, a 100 r/min y a las 16 h de fermentación.

pH		Biomasa (g/L)	Y _{x/s} (%)
Inicial	Final		
3	3,275	1,725 d	14,63
3,5	3,825	4,925 c	29,28
4	4,125	5,495 bc	30,2
4,5	4,575	5,69 b	30,09
5	5,075	5,815 ab	29,78
5,5	5,675	5,795 ab	32
6	6,125	6,15 ab	33,11
6,5	6,51	6,415 a	35,91
7	6,985	6,44 a	35,67

Letras distintas difieren para $p < 0,05$.

pH entre 5 y 7, en el que se alcanzaron los mayores producciones de biomasa. También se puede trabajar de pH 4 a 4,5 sin una afectación marcada en el crecimiento. A medida que disminuye el pH, las diferencias se van incrementando. A pH 3, existió una afectación drástica del crecimiento debido a la gran acidez del medio.

Estos resultados concuerdan con los informados por Herrera *et al.*, quienes obtuvieron un máximo de crecimiento a pH 4.5 y 5.2, aunque con ligeras variaciones del pH final del medio de fermentación.¹⁷

Martínez *et al.*, informaron que como resultado de la fermentación de azúcares por las levaduras se forman ácidos orgánicos, como los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) los cuales provocan la disminución de pH.¹⁸ Sin embargo, no se encontraron disminuciones significativas de esta variable después de la fermentación (Tabla 1), ya que la utilización del NH_4^+ , proveniente de la fuente de nitrógeno ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), provoca un ascenso del pH debido a su carácter básico. Un resultado

similar fue obtenido por Elías y Lezcano empleando esta misma fuente de nitrógeno.¹⁹

Se apreció que el pH no ejerce una marcada influencia sobre la eficiencia del uso de los azúcares presentes en la miel C (Tabla 1), excepto a pH 3, condición en que el rendimiento biomasa - sustrato disminuye apreciablemente. Este resultado sugiere que solo a pH muy bajo el cambio en la membrana celular afecta la entrada de los nutrientes a la célula.

El hecho de que *P. guilliermondii* tolere un amplio intervalo de pH en el medio durante su crecimiento puede ser muy beneficioso para su cultivo en FES, ya que este es uno de las condiciones que no se puede controlar en el proceso. Este resultado brinda la posibilidad de que si durante la fermentación se producen en el medio ácidos o bases que provoquen un aumento o disminución del pH, la levadura será capaz de tolerar dichas desviaciones y garantizar una producción de biomasa aceptable.

Influencia del extracto de levadura en el crecimiento

Algunos microorganismos además de macronutrientes y micronutrientes necesitan factores de crecimiento. El extracto de levadura es la sustancia que generalmente se utiliza para suplir estas necesidades.³

El análisis estadístico arrojó que para *P. guilliermondii* no se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de biomasa, ni en el rendimiento biomasa - sustrato en presencia o ausencia de extracto de levadura en el medio de cultivo (Fig. 3).

Madigan *et al.*, al igual que otros, reconocen que las levaduras necesitan factores de crecimiento para su desarrollo.²⁰ Sin embargo, la magnitud de los requerimientos puede variar de una cepa a otra, de manera que no hay un comportamiento homogéneo en cuanto a los requerimientos de factores de crecimiento en las levaduras. En el caso de *P. guilliermondii*, las mieles finales de caña de azúcar aportaron los factores de crecimiento necesarios para su crecimiento.

La posibilidad de prescindir del extracto de levadura permite simplificar el medio de cultivo, obteniéndose una producción de biomasa aceptable.

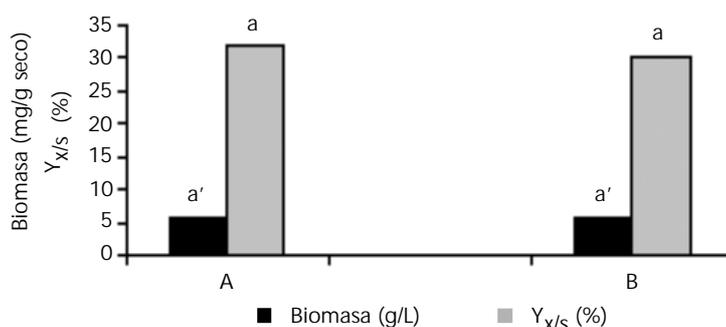


Fig. 3. Influencia del extracto de levadura sobre el crecimiento y el rendimiento biomasa - sustrato de la levadura *P. guilliermondii* en cultivos sumergidos a 30 °C y 100 r/min. A) Con extracto de levadura. B) Sin extracto de levadura. Letras distintas difieren para $p < 0,05$.

Crecimiento a expensas de diferentes fuentes de nitrógeno

El nitrógeno constituye alrededor del 10 al 12 % del peso seco celular y es incorporado a la célula en forma de proteínas y ácidos nucleicos.²¹ La miel C de caña de azúcar posee un bajo contenido de nitrógeno, el cual no es suficiente para sustentar el crecimiento de las levaduras, por lo que es necesario suplementarlas con otras fuentes de nitrógeno.

Para la concepción de un medio de cultivo se debe tomar como criterio de diseño que la composición del medio se elija de manera tal que se satisfagan todas las necesidades de los microorganismos y el costo de las materias primas sea mínimo.¹⁰

La fuente de nitrógeno utilizada hasta el momento en este estudio [(NH₄)₂HPO₄] no es de las más baratas encontradas en el mercado, por lo que se pudiera sustituir por otra más económica (Tabla 2).

El medio utilizado en este estudio tiene una concentración de (NH₄)₂HPO₄ del 10 %, (0,21 % de nitrógeno), el cual se podría sustituir por otras fuentes manteniendo constante la cantidad de nitrógeno en el medio.

La tabla 3 aporta seis variantes de fuentes de nitrógeno y sus costos respectivos, incluidos los de las variantes ensayadas (Tabla 3). En el caso de las fuentes combinadas, el diseño se realizó de forma que cada fuente aportara el 50 % de nitrógeno necesario.

La variante más factible desde el punto de vista económico es la urea, seguida por la combinación urea - sulfato de amonio, mientras que la variante menos económica como única fuente de nitrógeno es el hidrógenofosfato de amonio.

Este análisis económico no implica que exista una relación directa entre el comportamiento de los microorganismos frente a las fuentes de nitrógeno y sus costos respectivos, el análisis experimental para observar la respuesta fisiológica de la levadura será lo que determine la fuente de nitrógeno a utilizar.

El análisis de varianza indicó que existen diferencias altamente significativas entre las diferentes fuentes de nitrógeno ensayadas (Fig. 4). La prueba de Duncan evidenció que la mejor variante es el (NH₄)₂HPO₄ combinado con la urea, en segundo lugar están el (NH₄)₂HPO₄ y la urea. La variante peor fue la que presenta (NH₄)₂HPO₄ combinado con (NH₄)₂SO₄. En todos los casos, hubo un agotamiento apreciable del sustrato

carbonado, los azúcares reductores al final de la fermentación no superaron el 10 % del valor inicial.

A partir de estos resultados, se seleccionó la urea como fuente de nitrógeno, no solo por ser la más económica y permitir un crecimiento aceptable de la levadura, sino porque también, es una fuente disponible en el país, que se produce industrialmente a gran escala. Por otra parte, la urea tiene efectos beneficiosos en algunos medios sólidos en los que produce un efecto regulador que controla el pH del medio.²²

CONCLUSIONES

La levadura *P. guilliermondii* es capaz de producir elevados niveles de biomasa y rendimiento biomasa - sustrato, utilizando miel C como fuente de carbono y energía, tanto en cultivos sumergidos como en fermentación en estado sólido.

El medio de cultivo diseñado es simple y contiene miel C como fuente de carbono, urea como fuente de nitrógeno y no necesita la presencia de extracto de levadura.

BIBLIOGRAFÍA

1. Smith J. Biotecnology, 3er edition, Cambridge, 124, 1996.
2. Crueger W. y Crueger A. BIOTECHNOLOGY: A Textbook of Industrial Microbiology, 2nd Edition, 357, 1990.
3. Stone CH. Yeast Products in the Feed Industry *A Practical Guide for Feed Professionals*, 1998. <http://www.diamondv.com/articles/booklet/booklet.html>
4. Figueroa V. Experiencias cubanas en el uso de las mieles de caña para la alimentación porcina. Taller de Alimentación Animal, GEPLACEA, Cali, Colombia. http://www.beekeeping.com/articulos/experiencias_cubanas.htm.
5. Chicas M., Porras A. y Soto S. Producción de proteína unicelular a partir de *Saccharomyces cereviceae* utilizando

Tabla 2. Precios de las diferentes fuentes de nitrógeno más utilizadas en fermentación en estado sólido.¹⁰

Fuente	(NH ₄) ₂ HPO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	Urea
Precio USD/t	235	107	180

Tabla 3. Fuentes de nitrógeno y precios de mercado de las variantes ensayadas.

Fuente	Concentración (g/L)	Precio (10 ⁻³ USD/L)
(NH ₄) ₂ HPO ₄	10	2,35
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	1,07
Urea	4,5	0,81
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5	1,71
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5	1,59
Urea	2,25	
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	0,94
Urea	2,25	

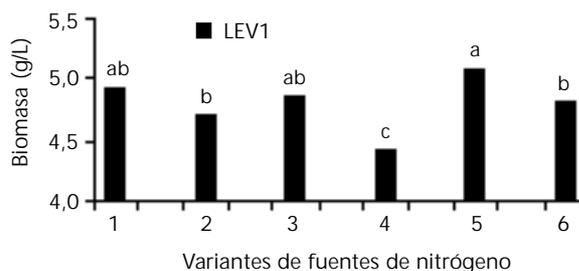


Fig. 4. Efecto de las diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento de *P. guilliermondii* a 30 °C, 100 r/min a las 16 h de fermentación. 1) (NH₄)₂HPO₄, 2) (NH₄)₂SO₄, 3) urea, 4) (NH₄)₂HPO₄- (NH₄)₂SO₄, 5) (NH₄)₂HPO₄- urea, 6) (NH₄)₂SO₄-urea. Letras distintas difieren para p < 0,05.

- un medio elaborado con banano, 2000. http://www.itcr.ac.cr/carreras/biotecnologias/trabajos_de_investigacion/produccion_proteina_unicelular.htm
6. Quintero R. Producción de proteína microbiana a partir de la caña de azúcar y sus subproductos. Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma de México, 124-151, 1993.
 7. Raimbault M. General and Microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, **1**, 1998. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol1/issue3/full/9/>.
 8. Brizuelas M., Antigua M. y Contreras R. Enriquecimiento proteico de residuos de cosecha cañera por fermentación en estado sólido con hongos filamentosos. **Lab. Acta**, **10**, 83-88, 1998.
 9. Winkler M. Optimisation and Time-Profiling in Fermentation Process. Progress in industrial Microbiology, 91- 150, 1988.
 10. Ramos L.B., Parra C. y García A. Formulación de medios de cultivo con residuos agroindustriales. Parte I. **Centro Azúcar**, No.1, 9-5, 2000.
 11. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar, Manual de los derivados de la caña de azúcar. Ed. Ciencia y Técnica, Ciudad de La Habana, 2000.
 12. Herrera N. y Díaz R. Los residuales de la industria alcoholera como fuente de sustrato para la producción de proteína unicelular, **Centro Azúcar**, **3**, 16-19, 1998.
 13. Herrera A. y Casado G. Manual de Microbiología Industrial. Facultad de Biología, UH, 1988.
 14. Biart J. Determinación de azúcares por el método de Eyrton-Lane modificado. Manual de técnicas analíticas de la subdirección de fermentaciones, Investigaciones de la Caña de Azúcar, 1975.
 15. Ramos L. Parra C. y García A. Formulación de medios de cultivo con residuos agroindustriales. Parte III. Optimización del crecimiento de *Candida utilis* en residuos de la industria azucarera. **Centro Azúcar**, **3**, 9-20, 2000.
 16. Christen P., Auria R., Vega C., Villegas E., Revah S. Growth of *Candida utilis* in Solid State Fermentation. **Biotechn. Adv.**, **11**, 549-557, 1993.
 17. Herrera N., García A., Vento Y., Obregón J., Acosta L., Meneses J. y Martínez P. Cultivo de microorganismos para la producción de biomasa a partir del jugo de caña. Condiciones del cultivo. **Centro Azúcar**, **1**, 3-9, 1995.
 18. Martínez P., Marín A., Manso M., Pacheco J. Estudio de la composición microbiológica del sustrato fermentado para la obtención de biomasa proteica. Influencia sobre algunos indicadores fermentativos. **Centro Azúcar**, **1**, 58-63, 1998.
 19. Elías A. y Lezcano O. Efecto de la fuente de nitrógeno y algunos factores de crecimiento en la población de levaduras que se establece en la producción de Saccharina. **Rev. Cubana de Ciencias Agrícolas**, **28**, 75-80, 1993.
 20. Madigan M.T., Martinko J. and Parker J. Brock Biology of microorganisms. Eighth Edition, 109-148, 1997.
 21. Shuler M. and Kargi E. Bioprocess Engineering Basic concepts. Prentice Inc. Englewood Cliffs, N. Jersey, 1992.
 22. Duran A., Renoud R., Maratray J., Almanza S. and Diez M. INRA - Dijon Reactors for SSF: Desings and Applications. **J. of Scientific & Industrial Research**, **55**, 317-332, 1996.



RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

LA BIOFUMIGACIÓN EN EL CONTROL DE FITONEMÁTODOS: UNA ALTERNATIVA SOSTENIBLE AL USO DEL BROMURO DE METILO

Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez"

Una primera tarea de la investigación fue la búsqueda de residuos orgánicos que tuvieran poder biofumigante, tomando en consideración la rentabilidad del cultivo y la eliminación de los gastos de transporte si fuera posible. Se tuvo en cuenta también para esta selección de materiales, los recursos locales existentes, su representatividad y abundancia en las diferentes áreas. Se estudiaron alternativas de utilización de abonos verdes, considerando los aspectos funcionales de las plantas seleccionadas y se eligieron también desechos agroindustriales, con el fin de que su reciclado permitiese, además, resolver problemas de impacto ambiental en la zona.

Se trabajó con 39 biofumigantes y 108 dosis y se determinó el efecto de cada uno sobre los nemátodos del suelo, tanto de especies fitopatógenas como de las formas libres (rhabdítidos), y sobre los enquitreidos y oligoquetos de gran interés en la transformación de restos orgánicos del suelo. También se estudió su repercusión en la fertilidad del suelo, así como el efecto sobre su crecimiento y nutrición de las plantas. Se elaboró una metodología de fácil aplicación por técnicos y agricultores y se analizaron las dosis óptimas de los biofumigantes seleccionados, así como los costos de cada aplicación.

La biofumigación se aplicó en casas de cultivo en las que se logró disminuir significativamente las poblaciones de *Meloidogyne* por debajo de umbrales de daño.

Los resultados permiten plantear que la biofumigación es una solución viable y sostenible como sistema de desinfección alternativo a la utilización del bromuro de metilo en rotaciones de cultivo y en sistemas de producción. Además, al no utilizar este producto químico como fumigante, se elimina un factor de agresión a la capa de ozono y se contribuye a los compromisos de Cuba con el Protocolo de Montreal.

Evaluación de la actividad antibacteriana de preservos industriales

Tatiana Molier Lemus y Nidia M. Rojas Hernández.*

Departamento de Desarrollo e Investigación, Grupo Empresarial LABIOFAM, Avenida Independencia kilómetro 16½, Boyeros, Ciudad de La Habana. Correo electrónico: labiofam@ceniai.inf.cu tatiana4099@yahoo.com.mx . *Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 No. 455 entre Calles I y J, El Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 6 de septiembre de 2006. Aceptado: 27 de noviembre de 2006.

Palabras clave: preservos antimicrobianos, actividad bacteriostática, actividad bactericida, concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida.

Key words: antimicrobial preservative, bacteriostatic activity, bactericide activity, minimal inhibitory concentration, minimal bactericide concentration.

RESUMEN Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de diferentes preservos industriales de uso común en Cuba y se seleccionaron los más efectivos frente al grupo de bacterias. Los preservos empleados fueron: benzoato de sodio, sorbato de potasio, Kathon CG, *p*-cloro-*m*-cresol y la combinación de cloruro de benzalconio con EDTA y metilparabeno con propilparabeno. Se utilizaron nueve cultivos bacterianos de colección: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Citrobacter freundii* ATCC 10625, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35150, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria de cada producto frente a las cepas sensibles y se hallaron las Concentraciones Mínimas Bactericidas y Mínima Efectiva para cada preservos. Se determinó que el benzoato de sodio y el sorbato de potasio no inhiben el crecimiento de las especies bacterianas probadas. Se comprobó que los preservos Kathon CG, *p*-cloro-*m*-cresol, cloruro de benzalconio con EDTA y metilparabeno con propilparabeno, presentan actividad bacteriostática contra todas las especies tratadas. Para la combinación de metilparabeno con propilparabeno, se detectó actividad bactericida frente a las especies utilizadas excepto para *Pseudomonas aeruginosa*. Los productos que mostraron mayor efecto antibacteriano fueron el Kathon CG, el *p*-cloro-*m*-cresol y el cloruro de benzalconio con EDTA, pues tuvieron efecto bacteriostático y bactericida contra el 100 % de las especies bacterianas probadas; las Concentraciones Mínimas Efectivas fueron de 0,6; 1,0 y 0,15; 1,0 mg/mL respectivamente.

ABSTRACT The antibacterial *in vitro* activity of common used industrial preservatives in Cuba were evaluated. The most effective ones in reaction with the bacteria group were selected. The preservatives were: sodium benzoate, potassium sorbate, Kathon CG, *p*-chloro-*m*-cresol and the combination of benzalkonium chloride with EDTA and methylparaben with propylparaben. Nine bacterial collection cultures were used: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Citrobacter freundii* ATCC 10625, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35150, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 7002 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The minimal inhibitory concentration values of each product in front of the sensitive strains were determined and the minimal bactericide concentration and the minimal effective concentration values of each product were determined. Sodium benzoate and potassium sorbate did not inhibit the growth of the bacterial species tested. It was demonstrated that the preservatives Kathon CG, *p*-chloro-*m*-cresol, benzalkonium chloride with EDTA, methylparaben with propylparaben showed a bacteriostatic effect against all the species tested. Bactericide activity was detected for the combination of methylparaben with propylparaben, against all the species used except for *Pseudomonas aeruginosa*. The products that showed a

higher antibacterial effect were Kathon CG, *p*-chloro-*m*-cresol and the combination of benzalkonium chloride with EDTA, as they showed bacteriostatic and bactericide action against all of the bacterial species tested; the minimal effective concentrations values were 0.6; 1.0 and 0.15; 1.0 mg/mL respectively.

INTRODUCCIÓN

La calidad de un producto incluye la garantía de su inocuidad durante su uso. La presencia de microorganismos en productos industriales puede provocar su deterioro y en ocasiones, implica un riesgo en la salud del usuario. Por ello, la adición de preservos antimicrobianos destinados a controlar el crecimiento de los microorganismos es una práctica común en la industria.¹

Entre los preservos más utilizados en Cuba se encuentran: las sales de los ácidos benzoico y sórbico, los compuestos de amonio cuaternario, los ésteres del ácido parahidroxibenzoico (parabenos), los fenoles y más recientemente, el Kathon CG.

A pesar de que las empresas productoras de preservos recomiendan el empleo de determinadas concentraciones de sus productos, en ocasiones, los microorganismos contaminantes pueden presentar gran resistencia a estos compuestos.²⁻⁴ Esto evidencia la necesidad de verificar su efectividad antimicrobiana antes de incluirlos en una formulación comercial y la realización de pruebas *in vitro* con microorganismos

mos de colección, lo que constituye uno de los primeros pasos en este proceso.⁵

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de diferentes preservos industriales de uso común en Cuba (benzoato de sodio, sorbato de potasio, Kathon CG, *p*-cloro-*m*-cresol y la combinación de cloruro de benzalconio con EDTA y metilparabeno con propilparabeno), frente a una batería de cultivos bacterianos de colección para seleccionar los más efectivos frente al grupo de bacterias.

Este trabajo forma parte de un conjunto de evaluaciones iniciales destinado a la selección y empleo de preservos antimicrobianos para la reformulación de algunos productos industriales del Grupo Empresarial LABIOFAM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards establecen los métodos de referencia más difundidos y más utilizados para realizar estudios de correlación con la clínica, por lo que constituyen la regla de oro de las técnicas de sensibilidad a los antibióticos convencionales.^{6,7} En este estudio, se utilizaron metodologías similares a las empleadas en estas técnicas.⁸

Se determinó la actividad antibacteriana de los preservos antimicrobianos benzoato de sodio, sorbato de potasio, Kathon CG (mezcla de 5-cloro-2-metil-3(2H)-isotiazolinona y 2-metil-3(2H)-isotiazolinona, Rohm y Haas), *p*-cloro-*m*-cresol y los productos combinados cloruro de benzalconio con EDTA y metilparabeno con propilparabeno (Tabla 1) frente a un grupo de nueve cepas bacterianas pertenecientes a la colección ATCC (Tabla 2).

Determinación de la actividad antibacteriana

- Se realizó una prueba cualitativa (tamizaje general) destinada a detectar la presencia de acción inhibidora del crecimiento microbiano a la mayor concentración de cada producto mediante el método de dilución en medio con agar.⁹
- La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas sensibles frente a cada producto evaluado se llevó a cabo mediante el método de diluciones dobles seriadas en caldo nutriente.⁸ Se determinó como CMI de cada producto la menor

concentración del preservos con ausencia de turbidez en el medio.

- Se determinaron las Concentraciones Mínimas Bactericidas (CMB) efectuando pases a las 24 h de incubación (30 a 35 °C) en caldo nutriente a placas con medio agar nutriente.⁸

Se realizaron tres réplicas de cada concentración del preservos frente a cada cepa.

En todos los casos, se emplearon controles positivos que consistieron en medio de cultivo con el inóculo sin incluir el preservos. Esto tuvo como objetivo descartar la ausencia de crecimiento durante el experimento por baja concentración del inóculo, poco tiempo de incubación u otros factores. También se utilizaron controles negativos de caldo nutriente sin inocular como un control de la esterilidad del medio de cultivo.

Se empleó un inóculo bacteriano de $9 \cdot 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC)/mL en disolución salina fisiológica estéril ajustado a esa concentración por densidad óptica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microorganismos seleccionados en este estudio constituyeron una representación dentro del grupo de bacterias Gram positivas y

Gram negativas. Además, la evaluación con cultivos de colección tiene como ventaja que permite la reproducibilidad de los resultados.

A partir del tamizaje general, se pudo determinar que los productos benzoato de sodio y sorbato de potasio, no inhibieron el crecimiento de las especies bacterianas empleadas (Tabla 3). Los productos Kathon CG, *p*-cloro-*m*-cresol y la combinación del cloruro de benzalconio con EDTA y el metilparabeno con el propilparabeno, inhibieron el crecimiento de todas las especies bacterianas estudiadas, por lo que el próximo paso consistió en determinar las CMI y CMB de estos compuestos frente a las cepas seleccionadas para el estudio (Tablas 4 y 5).

En este trabajo, se evaluó la acción combinada del cloruro de benzalconio y la sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA). De los derivados del amonio cuaternario, el cloruro de benzalconio fue el primer compuesto de este tipo introducido en el mercado, con buena actividad bactericida frente a Gram positivas, pero con poca actividad frente a Gram negativas, particularmente *Pseudomonas*.^{10,11}

Por otra parte, la sal sódica del EDTA se usa en algunas ocasiones para incrementar la actividad contra

Tabla 1. Preservos evaluados y concentraciones máximas analizadas.

Preservos	Concentración máxima (mg/mL)
Benzoato de sodio	1,0
Sorbato de potasio	2,0
Cloruro de benzalconio con EDTA	0,2
Kathon CG	1,0
Metilparabeno con propilparabeno	0,3
<i>p</i> -Cloro- <i>m</i> -cresol	1,0

Tabla 2. Especies bacterianas empleadas.

Especie bacteriana	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Citrobacter freundii</i>	10625
<i>Escherichia coli</i> (a)	25922
<i>Escherichia coli</i> (b)	35150
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883
<i>Micrococcus luteus</i>	9341
<i>Proteus mirabilis</i>	7002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538

Tabla 3. Sensibilidad de las especies bacterianas empleadas frente a los diferentes preservos antimicrobianos probados y el control.

Especie bacteriana	1	2	3	4	5	6	7
<i>B. subtilis</i>	+	+	—	—	—	—	+
<i>C. freundii</i>	+	+	—	—	—	—	+
<i>E. coli</i> (a)	+	+	—	—	—	—	+
<i>E. coli</i> (b)	+	+	—	—	—	—	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	—	—	—	—	+
<i>M. luteus</i>	+	+	—	—	—	—	+
<i>P. mirabilis</i>	+	+	—	—	—	—	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	—	—	—	—	+
<i>S. aureus</i>	+	+	—	—	—	—	+

+ Crecimiento. — Inhibición del crecimiento. 1. Benzoato de sodio (1,0 mg/mL). 2. Sorbato de potasio (2,0 mg/mL). 3. Cloruro de benzalconio¹ con EDTA² (0,2¹; 1,0² mg/mL). 4. Kathon CG (1,0 mg/mL). 5. *p*-cloro-*m*-cresol (1,0 mg/mL). 6. Metilparabeno³ con propilparabeno⁴ (2,0³; 0,3⁴ mg/mL). 7. Control positivo sin preservos.

Tabla 4. Valores de Concentración Mínima Inhibitoria de los preservos evaluados frente a las especies bacterianas en estudio.

Especies bacterianas	Cloruro de benzalconio; EDTA	Kathon CG	<i>p</i> -Cloro- <i>m</i> -cresol	Metilparabeno; propilparabeno
	(mg/mL)			
<i>B. subtilis</i>	0,005; 0,03	0,2	0,25	2,0; 0,3
<i>C. freundii</i>	0,075; 0,50	0,6	0,25	2,0; 0,3
<i>E. coli</i> (a)	0,038; 0,25	0,6	0,25	1,0; 0,2
<i>E. coli</i> (b)	0,038; 0,25	0,3	0,25	1,0; 0,2
<i>K. pneumoniae</i>	0,075; 0,50	0,6	0,25	1,0; 0,2
<i>M. luteus</i>	0,019; 0,13	0,6	0,25	2,0; 0,3
<i>P. mirabilis</i>	0,075; 0,50	0,6	0,25	2,0; 0,3
<i>P. aeruginosa</i>	0,075; 0,50	0,3	0,50	2,0; 0,3
<i>S. aureus</i>	0,019; 0,13	0,3	0,50	2,0; 0,3

Tabla 5. Valores de Concentración Mínima Bactericida de los preservos evaluados frente a las especies bacterianas en estudio.

Especies bacterianas	Cloruro de benzalconio; EDTA	Kathon CG	<i>p</i> -Cloro- <i>m</i> -cresol	Metilparabeno; propilparabeno
	(mg/mL)			
<i>B. subtilis</i>	0,005; 0,03	0,2	1,00	2,0; 0,3
<i>C. freundii</i>	0,150; 1,00	0,6	0,25	2,0; 0,3
<i>E. coli</i> (a)	0,038; 0,25	0,6	0,25	2,0; 0,3
<i>E. coli</i> (b)	0,075; 0,50	0,6	0,50	2,0; 0,3
<i>K. pneumoniae</i>	0,075; 0,50	0,6	0,25	2,0; 0,3
<i>M. luteus</i>	0,019; 0,13	0,6	0,25	2,0; 0,3
<i>P. mirabilis</i>	0,075; 0,50	0,6	0,25	2,0; 0,3
<i>P. aeruginosa</i>	0,150; 1,00	0,6	1,00	—
<i>S. aureus</i>	0,019; 0,13	0,6	0,50	2,0; 0,3

ciertas especies de *Pseudomonas*, particularmente, con el cloruro de benzalconio. Esta actividad se asocia con su acción quelante sobre cationes divalentes.¹² Lo anterior se corresponde con los resultados obtenidos en este trabajo, en los que

se detectó actividad bacteriostática y bactericida para la combinación de cloruro de benzalconio con EDTA frente a todas las especies probadas. Además, dentro del grupo de bacterias, las especies más susceptibles fueron las Gram positivas y dentro

de estas, *B. subtilis* fue la que presentó las menores CMI y CMB. También se observó que la combinación de estos compuestos resultó eficaz contra la especie *P. aeruginosa*, para la cual se reporta resistencia frente al cloruro de benzalconio cuando se

usa individualmente.¹³ Las mayores CMI y CMB para la combinación cloruro de benzalconio - EDTA fueron de 0,075; 0,5 mg/mL, así como 0,15; 1,0 mg/mL respectivamente. Las concentraciones permitidas como preservos para el cloruro de benzalconio son de 0,1 a 0,2 mg/mL. Las concentraciones a las que es compatible el EDTA, están en el intervalo de 0,1 a 1,0 mg/mL.¹² Teniendo en cuenta esto, los valores determinados en este trabajo están en el límite del intervalo de uso de estos productos.

Los ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico (parabenos) son los preservantes más utilizados en los productos cosméticos. Las formas que con más frecuencia se emplean son los ésteres metil, *n*-propil y *n*-butil. Se utilizan solos o en combinación.¹⁴ Son eficaces inhibidores de crecimiento de levaduras, mohos y bacterias, a pH próximos a la neutralidad.¹⁵ En el presente estudio, se demostró la actividad bacteriostática de la combinación metilparabeno con propilparabeno frente a todas las cepas empleadas y las CMI oscilaron entre 1,0; 0,2 mg/mL y 2,0; 0,3 mg/mL para las bacterias probadas. Se detectó acción bactericida de estos compuestos frente a todas las cepas empleadas excepto para *Pseudomonas aeruginosa*. La CMB para las especies sensibles coincidió en todos los casos y resultó de 2,0; 0,3 mg/mL. En las formulaciones farmacéuticas el empleo de combinaciones de metilparabeno (0,3 a 1,0 mg/mL) con propilparabeno (0,1 a 0,2 mg/mL) resultan eficaces para el control microbiano.¹⁶ En este trabajo, se obtuvieron concentraciones ligeramente superiores. El hallazgo de CMI y CMB por encima de los recomendados, indica la necesidad de evaluar la efectividad *in vitro* de los preservos antimicrobianos con cepas de colección como las utilizadas en este trabajo.

El Kathon CG se utiliza en varias aplicaciones industriales,¹⁴ tiene un amplio espectro de actividad, es activo contra bacterias (Gram positivas y Gram negativas) y hongos (levaduras y hongos filamentosos).¹⁷ En este trabajo, se demostró su actividad bacteriostática y bactericida frente a las especies probadas. Las CMI y CMB estuvieron entre 0,2 y 0,6 mg/mL, siendo la especie más susceptible *Bacillus subtilis*. Los niveles típicos de uso de este preservos son de 0,4 a 1,0 mg/mL (del producto suprido, v/v),¹⁷ por lo que las concentraciones obtenidas en este estudio, se encuentran dentro del intervalo de uso de este producto.

Los derivados del fenol al parecer, actúan a bajas concentraciones rompiendo la fuerza proton motriz, sugiriendo que la membrana celular es el sitio blanco. Los compuestos más lipofílicos, tienen una mayor actividad antibacteriana.¹⁴ En este trabajo, se muestra que el *p*-cloro-*m*-cresol tiene acción bacteriostática y bactericida. Los valores de CMI están entre 0,25 y 0,5 mg/mL, mientras que los valores de CMB están entre 0,25 y 1,0 mg/mL. Las especies más resistentes a este preservos fueron *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. La concentración utilizada de este producto como preservante es de 1,0 mg/mL,¹⁶ por lo que las determinadas en este trabajo se encuentran dentro del límite permitido para su uso como preservos.

Las Concentraciones Mínimas Efectivas como biocidas (concentración mínima del preservos que mata a todas las cepas probadas) para los productos de mayor espectro de actividad fueron: Kathon CG de 0,6 mg/mL; *p*-cloro-*m*-cresol de 1,0 mg/mL y para la combinación cloruro de benzalconio - EDTA de 0,15; 1,0 mg/mL.

CONCLUSIONES

Se determinó que el benzoato de sodio y el sorbato de potasio no inhiben el crecimiento de las especies bacterianas probadas.

Los preservos Kathon CG, *p*-cloro-*m*-cresol y la combinación de cloruro de benzalconio con EDTA y el metilparabeno con el propilparabeno presentan actividad bacteriostática contra todas las especies tratadas.

De los productos estudiados, el Kathon CG, *p*-cloro-*m*-cresol y cloruro de benzalconio con EDTA son los que presentan el mayor efecto antibacteriano, pues presentan efecto bacteriostático y bactericida contra todas las especies probadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Rojas N.M., Pazos V. y Coto O. Manual Práctico de Microbiología Clínica 1, Editorial Pueblo y Educación, Cuidad de La Habana, Cuba, 44-51, 1986.
- Lunden J., Autio T., Markkula A., Helstrom S. and Korkeala H. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.*, **82**, 265, 2003.
- Kucken D., Feucht H. and Kaulfers P. Association of *qacE* and *qacEDelta* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **183**, 95, 2000.

- Braoudaki M. and Hilton A.C. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 73, 2004.
- Rojas N.M., Herrera R., Guerra A.G. y Lugo D. Actividad antimicrobiana del G-0 sobre bacterias y hongos aislados de tejas de cemento. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, **33**, 23, 2001.
- Cuenca M. y Rodríguez J.L. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad?. *Rev. Iberoam. Micol.*, **19**, 133, 2002.
- Obregón G. y Zavaleta A. Control de calidad de sensibilidad antibiótica comercializados en el mercado peruano (1998-1999). *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública*, **17**, 12, 2000.
- Baron M.J., Peterson L.R. and Finegold S.M. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, Chapter 14, 9th Edition, Mosby, Toronto, EUA, 168-188, 1994.
- Rojas N.M., Avellaneda S. y Romeu B. Evaluación de actividad antimicrobiana en productos naturales: fuente potencial de compuestos bioactivos, Convención Trópico, La Habana, G13-208, 2004.
- Sánchez L. y Sáenz E. Antisépticos y Desinfectantes. *Dermatología Peruana*, **15**, 82, 2005.
- Rueda J., Amigot Lázaro J.A. and Duchá J. Evaluación de desinfectantes de amonio cuaternario sobre cepas bacterianas de origen animal. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **22**, 1097, 2003.
- Hecht G., Roehrs R.E. and Shively C.D. Design and Evaluation of Ophthalmic Pharmaceutical Products en: Banker G. S. and Rhodes C. T. Modern Pharmaceutics, Chapter 12, Vol. 7, Marcel Dekker, Inc. New York, EUA, 491-493, 1979.
- Loughlin M.F., Jones M.V. and Lambert P.A. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49**, 631, 2002.
- Sox T.E. Mechanisms of action of cosmetic preservatives en: Brannan D.K. Cosmetic Microbiology, Chapter 7, CRS Press, Boca Raton, New York, EUA, 163-174, 1997.
- Von der Becke C. Glosario. Ácidos orgánicos. Disponible en: <http://pub.ufasta.edu.ar/ohcop/acorgani.html> 1999.(consultado: 15 de abril de 2002.)
- Reynolds J.E.F. Martindale, Part I, Thirty Edition, The Pharmaceutical Press, London, England, 1117-1121, 1999.
- Supelco Kathon® CG/ICP Preservative for Media Biocide Applications, *Bulletin*, **912**, 1, 1997.