

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



**LACTOBACILOS HOMOFERMENTADORES AISLADOS EN TALLOS DE
CAÑA
DE AZÚCAR *Saccharum officinarum***

Autora: Majenklis N. Pérez F.

Tutor: Lic. José Manuel Jiménez MSc

Cotutora: Farm. Elaysa Salas Osorio PhD

Mérida, junio 201

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**LACTOBACILOS HOMOFERMENTADORES AISLADOS EN TALLOS DE
CAÑA
DE AZÚCAR *Saccharum officinarum***

**(Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título
de Licenciado en Bioanálisis)**

**Autora: Majenklis N. Pérez F.
Tutor: Lic. José Manuel Jiménez MSc
Cotutora: Farm. Elaysa Salas Osorio PhD**

Mérida, junio 2019

ii

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	VI
DEDICATORIA	VIII
AGRADECIMIENTOS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la Investigación.....	6
Objetivos de la Investigación	
<i>Objetivo General</i>	6
<i>Objetivos Específicos</i>	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación	
<i>Alcances de la Investigación</i>	7
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	7
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO	
Antecedentes de la Investigación.....	8
Bases Teóricas	
<i>Reseña Histórica de la caña de Azúcar</i>	10
<i>Descripción de la planta de la Caña de Azúcar</i>	10
<i>Constituyentes de la Caña de Azúcar</i>	11
<i>Fotosíntesis de la planta de Caña de Azúcar</i>	12
<i>Enfermedades bacterianas que afectan la planta</i>	13
<i>Uso de la planta</i>	13
<i>Ensilaje</i>	14
<i>Clases de silos o almacenaje</i>	19

<i>Aditivos</i>	20
<i>Bacterias Acido Lácticas</i>	21
<i>Lactobacillus spp.</i>	23
<i>Métodos de conservación bacteriana</i>	26
Definición de Términos	
<i>Medio de cultivo Man Rugosa Sharpe</i>	28
Sistema de Hipótesis.....	28
CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO.	
Naturaleza de la Investigación.....	29
Nivel, Tipo y Diseño de Investigación.....	29
Población de la Investigación.....	30
Muestra de Investigación.....	30
Procedimiento.....	31
Sistema estadístico.....	38
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	
Resultados.....	40
Discusiones.....	45
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
Conclusiones.....	47
Recomendaciones.....	48
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	49

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

LACTOBACILOS HOMOFERTADORES AISLADOS EN TALLOS DE CAÑA DE AZÚCAR

Autor: Majenklis N. Pérez F.

**Tutor: José Manuel Jiménez
Cotutor: Elaysa Salas Osorio**

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos cuya característica principal es la producción de ácido láctico, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, entre otros; características que les permiten competir contra otras bacterias potencialmente patógenas, tales propiedades han sido utilizadas para el diseño de nuevos productos de consumo. Dentro de este grupo resaltan los lactobacilos, bacterias Gram positivas, anaerobias aerotolerantes que forman parte de la microbiota humana. El género *Lactobacillus* tiene gran utilidad en la producción de alimentos para el consumo humano llegando a ser reconocidos como probióticos, por generar beneficios en la salud; adicionalmente se han utilizado a nivel agroindustrial para mejorar la alimentación del ganado bovino. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la presencia de *Lactobacillus* homofermentadores en tallos de caña de azúcar. Se recolectó una muestra de hojas y otra de tallos de caña de azúcar en agua peptonada modificada. En el laboratorio fueron sometidas a agitación durante 20 minutos. Se inocularon cinco tubos de caldo MRS con tubo de Durham suplementado con carbohidratos (Rafinosa, Arabinosa, Carboximetilcelulosa, Bactecelobiosa y Xilosa), se incubaron durante 24-48 horas a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se realizó aislamiento por agotamiento en agar MRS, de cada tubo. Se seleccionaron 3 colonias de cada placa, de acuerdo a características macroscópicas y microscópicas del género a las cuales se les realizó una curva de crecimiento en 24 horas y evaluaron los cambios tecnológicos en la leche. Solo se logró evidenciar la presencia de Lactobacilos en las muestras de tallo, observando no hubo producción de gas en ninguno de los 15 aislados, lo cual nos indica la presencia lactobacilos homofermentadores, donde los aislados A1, X2, y CMC3

presentaron el mejor comportamiento en el número de generaciones, tiempo y velocidad de crecimiento. Con respecto a los cambios producidos en la leche, las 15 cepas aisladas mostraron cambios físicos y químicos con características similares al queso (Q) y al Yogurt (Y). Se concluye que el tallo de caña de azúcar es una fuente para el aislamiento de *Lactobacillus* homofermentadores.

Palabras clave: *Lactobacillus*, Homofermentadores, caña de azúcar.

www.bdigital.ula.ve

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso quien siempre está junto a mí, siempre escuchando mis oraciones.

Al Universo por conspirar siempre a mi favor para lograr mis deseos y metas.

A mis padres Lisbeth del Carmen y José Luis, y mis hermanas quienes siempre han estado allí en las buenas y en las malas, para apoyarme y animarme a seguir adelante siempre con la mejor actitud ante cualquier situación y obstáculo que se presentaron durante la carrera y mi vida.

Mis abuelos Juana y José Pérez quienes son motivo de inspiración para seguir adelante.

A mi Familia en general quienes son gran apoyo y motivación en mi vida.

Profesores de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Escuela de Bioanálisis de la ULA, quienes con su pasión por nuestra carrera inspiran a cientos de estudiantes a querer ser mejores profesionales.

Finalmente a todos aquellos familiares y amigos que han contribuido en mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A la Ilustre Universidad de Los Andes, en especial a todos los profesores de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por mi formación académica.

A mi tutor MSc. José Manuel Jiménez por encaminarme a lo largo de mi trabajo de grado y por su apoyo y enseñanzas durante el desarrollo de este trabajo de investigación, por compartir sus conocimientos científicos y tener vocación para enseñar.

A la profesora Elaysa Salas por aportar sus conocimientos durante la asesoría de este trabajo.

Finalmente a todos aquellos familiares y amigos que contribuyeron en mi crecimiento profesional.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig 1. Fotosíntesis de la planta de la caña de azúcar... ..	13
Fig 2. Diluciones realizadas.....	32
Fig 3. Siembra en caldo MRS.....	34
Fig 4. Siembra en Agar MRS.....	35
Fig 5. Repique de la placa sembrada en un nuevo agar para conservación.	35
Fig 6. Prueba de Gram y Catalasa	36

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág
Gráfica #1. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSR-1. Man Rugosa Sharpe con Rafinosa.....	55
Gráfica #2. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSR-2. Man Rugosa Sharpe con Rafinosa.....	55
Gráfica #3. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSR-3. Man Rugosa Sharpe con Rafinosa.....	56
Gráfica #4. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSA-1. Man Rugosa Sharpe con Aranbinosa.....	56
Gráfica #5. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSA-2. Man Rugosa Sharpe con Aranbinosa.....	57
Gráfica #6. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSA-3. Man Rugosa Sharpe con Aranbinosa.....	57
Gráfica #7. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSCMC-1. Man Rugosa Sharpe con Carboximentilcelulosa.....	58
Gráfica #8. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSCMC-2. Man Rugosa Sharpe con Carboximentilcelulosa.....	58
Gráfica #9. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSCMC-3. Man Rugosa Sharpe con Carboximentilcelulosa.....	59
Gráfica #10. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSBC-1. Man Rugosa Sharpe con Bactocelobiosa.....	59
Gráfica #11. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSBC-2. Man Rugosa Sharpe con Bactocelobiosa.....	60
Gráfica #12. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSBC-3.	60

Man Rugosa Sharpe con Bactocelobiosa.....	60
Gráfica #13. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSX-1. Man Rugosa Sharpe con Xilosa.....	61
Gráfica #14. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSX-2. Man Rugosa Sharpe con Xilosa.....	61
Gráfica #15. Representación gráfica del crecimiento de la cepa MRSX-3. Man Rugosa Sharpe con Xilosa.....	62

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Terminología usada durante el estud.....	33
Tabla 2. Cepas en studio.....	33
Tabla 3. Visualización macroscópica en su indicador color, crecimiento y producción de gas de las muestras	40
Tabla 4. Características fenotípicas de los aislados de Lactobacilos ...	41
Tabla 5. Número de generaciones, tiempo y velocidad de crecimiento de cada cepa en estudio en placa MRS	42
Tabla 6. Cambios físicos y químicos observados en la leche.....	43

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

El género *Lactobacillus*, es muy diverso y se puede encontrar dentro de los alimentos vegetales, carnes, lácteos y sus derivados, en bebidas fermentadas, entre otros. Además forman parte de la microbiota habitual de la boca, tracto gastrointestinal y vagina de mamíferos, rara vez este género es considerado patógeno.

En este sentido, Kandler *et al.* (1986), refieren que el género *Lactobacillus*, se caracterizan por presentar células en forma de bacilos largos extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco bacilos. Son microorganismos Gram positivos, anaerobios aerotolerantes pero su crecimiento se ve favorecido en una atmósfera con 5-10% CO₂; crecen en todos los ambientes con carbohidratos, compuestos proteicos, ácidos nucleicos y vitaminas, donde el metabolismo puede ser fermentativo y sacarolítico.

Por su parte, Bergey (2001), considera importante mencionar que los *Lactobacillus* crecen en medios ligeramente ácidos, con un desarrollo óptimo de acuerdo a la especie y tipo de cepa, que disminuye notablemente en medios neutros ligeramente alcalinos. En este mismo orden de ideas, *Lactobacillus* se ha ubicado dentro de las bacterias ácido lácticas (BAL), siendo estas clasificadas sobre la base de las propiedades fenotípicas, morfología (cocos o bacilos), fermentación de los hidratos de carbono (homofermentativo o heterofermentativo), temperatura óptima de crecimiento (mesófilas o termófilas) y la tolerancia a la sal (halotolerantes y no halotolerantes).

Ante lo expuesto, es importante mencionar que *Lactobacillus* en su mayoría no presentan actividad proteolítica, tampoco producen indol, ni ácido sulfúrico. Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen una pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Respecto a los requerimientos nutricionales son complejos, requieren aminoácidos,

péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables.

De allí, que surge la necesidad de llevar a cabo una investigación con el objetivo de evaluar la presencia de lactobacilos homofermentadores en caña de azúcar. La misma se realizará dentro de un paradigma positivista con enfoque cuantitativo de diseño experimental tipo cuasi experimental. De la misma manera se estructurará en cinco capítulos:

En el capítulo I se desarrolla el planteamiento del problema, desde lo macro a lo micro estableciendo los objetivos de la investigación, su justificación, alcances y limitaciones.

En el capítulo II, se hace referencia al marco teórico, donde se presentan investigaciones previas relacionadas a la temática de estudio, así como las bases teóricas que respaldan el presente trabajo.

Seguidamente en el capítulo III, se presenta el marco metodológico, haciendo referencia al tipo y diseño de investigación, las técnicas e instrumentos utilizados para que pudiera llevarse a cabo.

En cuanto al capítulo IV se presentan los resultados de la investigación representado en tablas y gráficos y la discusión; finalmente en el capítulo V se presentan las conclusiones y recomendaciones del estudio seguido de las referencias bibliohemerográficas.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Problema

Los lactobacilos pueden ser clasificados como probióticos al ser ingeridos en cantidad adecuada confiriendo un beneficio saludable en el hospedero. Es por ello, que Kirjavainen, P. *et al.* (2003) refieren que la mayoría de las cepas que se emplean como probióticos, pertenecen al género *Lactobacillus*, que son comensales humanos y se han aplicado históricamente de forma segura en la fermentación de alimentos, aspectos que garantizan su inocuidad. Sin embargo, a pesar de que estas bacterias se consideran seguras, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que sean sometidas a pruebas para que su aplicación no tenga efectos colaterales, que perjudiquen la salud del hospedero.

Así mismo, cabe destacar que, los lactobacilos representan el grupo de BAL más difundido ya que pueden crecer en todos los hábitats que contengan azúcares fermentables, productos hidrolizados de proteínas, vitaminas, factores de crecimiento y baja tensión de oxígeno. Por su parte, Castellano *et al.* (2008), refieren que *Lactobacillus* son bacterias ácido lácticas (BAL) que se caracterizan por los diferentes usos e importancia a nivel industrial y, en ocasiones, utilizadas como fermentadores de alimentos cárnicos, lácteos y vegetales, además del uso en biopreservación, para incrementar la vida útil de los productos o como potencial probiótico en la industria. De la misma manera Lee *et al.* (1995), consideran que los probióticos tienen diferentes efectos en el ser humano modificando la

microbiota intestinal, influyen directa e indirectamente en el estado de la salud, a través de producción de vitaminas y ácidos grasos de cadena corta, colaboran con la degradación de sustancias alimenticias no digeribles, estimulan la respuesta inmune y dan protección frente a microorganismos enteropatógenos, es por ello que desde el siglo pasado estos microorganismos han demostrado múltiples efectos positivos en la salud de animales y del hombre.

En el ámbito Internacional, específicamente en Colombia estudios realizados por Vargas *et al.* (2004), refieren que las bacterias que manejan cultivos iniciadores, son cepas importadas de países europeos y Japón, lo que implica grandes costos de adquisición, por lo cual concluyen que si las empresas comercializadoras de alimentos fermentados (95% del mercado nacional), trabajaran en la búsqueda de cultivos y condiciones que proporcionen la obtención de mayores densidades del microorganismo ($>10^7$ UFC/g), generarían un mayor impacto en el desarrollo de estas bacterias, a partir de un medio no láctico para ampliar sus aplicaciones a otros alimentos.

En concordancia con lo expuesto, es importante mencionar que estudios realizados por Cogan *et al.* (1997), muestran que el MRS (Man, Rogosa y Sharpe) es un medio de cultivo adecuado para la recuperación de *Lactobacillus* en condiciones de laboratorio, y su costo se hace elevado para el uso industrial en grandes cantidades. En la industria se han evaluado diferentes sustratos para el crecimiento de BAL, como el medio de cultivo agar leche y leche descremada, que favorece el aislamiento de *Lactobacillus*.

Sin embargo, poca es la información disponible de sustratos utilizados para el cultivo de bacterias ácido lácticas a nivel industrial, pero tradicionalmente, se ha utilizado la miel o melaza “blackstrap”, que es un líquido denso, viscoso de color oscuro y que contiene sales y otros compuestos solubles en álcali; es un producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa, glucosa y fructosa procedente de la caña de azúcar; además, contienen sustancias no fermentables y melanoidinas (a

base de nitrógeno), derivados a partir de la condensación del azúcar y amino compuestos.

Del mismo modo, es importante mencionar que la caña de azúcar es una forrajera de gran importancia en la alimentación animal. Tradicionalmente se cosecha a diario, picada y suministrada a los animales, sin embargo, el corte diario tiene algunas desventajas, como la demanda de mano de obra diaria para cortes, desparramado y picado (Nussio *et al.*, 2003). La posibilidad del uso de la caña de azúcar en la forma de silaje puede ser una alternativa para resolver los problemas del corte diario, sin embargo, este silaje presenta intensa fermentación alcohólica por levaduras (Kung Jr. *et al.*, 1982).

En consecuencia, el ensilado de caña de azúcar ha resultado en pérdidas de hasta 30% de la materia seca, lo que ocasiona la acumulación de componentes de la pared celular y reducción de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (Ferreira *et al.*, 2007). Además, los silajes presentan alto contenido de carbohidrato residual y ácido láctico, sustratos potencialmente utilizables por los microorganismos deterioradores del silaje después de la apertura de los silos (McDonald *et al.*, 1991). Con ello, en los últimos años, ha crecido el interés (principalmente por parte de investigadores en Brasil) por aditivos para ensilado de caña de azúcar capaces de inhibir el crecimiento de levaduras.

Asimismo, se han estudiado bacterias productoras de ácido láctico como inoculantes en silajes y actualmente ha sido mayor la atención a la adición de bacterias heterolácticas, principalmente de la especie *Lactobacillus buchneri*, la cual ha presentado resultados prometedores principalmente en la inhibición del crecimiento de los hongos y el aumento la estabilidad aerobia.

Debido a la necesidad de hallar materia prima de fácil adquisición y bajo costo, que además cumpla con condiciones necesarias para favorecer el crecimiento de BAL, surge la siguiente interrogante:

¿Es posible obtener cepas de *Lactobacillus* homofermentadores de caña de azúcar?

Justificación de la Investigación

La mayoría de los cultivos iniciadores utilizados en Venezuela para favorecer el desarrollo del ensilaje son importados, siendo esto un inconveniente para su adquisición, sobre todo por la economía actual, impulsando así la búsqueda de materia prima para la producción autóctona de *Lactobacillus*.

Investigadores han utilizado como materia prima: quesos, productos cárnicos, pastos, caña de azúcar, entre otros, para la obtención de *Lactobacillus*.

En Venezuela la producción de caña de azúcar es de bajo costo, además sus tierras favorecen la siembra, por lo que representa un sustrato útil tanto para la obtención de cepas de interés tecnológico o con potencial probiótico de uso humano o animal, como para la producción a escala industrial de silajes como suplemento para la alimentación animal.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evidenciar la presencia de *Lactobacillus* homofermentadores en caña de azúcar.

Objetivos Específicos

- Obtener aislados de lactobacilos a partir de muestras de caña de azúcar.
- Caracterizar fenotípicamente los lactobacilos mediante la tinción de Gram.

- Identificar las características bioquímicas mediante la prueba de catalasa y los cambios en la leche.
- Estudiar las características fisiológicas de los aislados de *Lactobacillus* mediante la determinación de número de generaciones, tiempo y velocidad de crecimiento de cada cepa en estudio.

Alcances y Limitaciones

Alcances

En relación con la ejecución de este proyecto de investigación se busca primeramente obtener Lactobacilos a partir de caña de azúcar, que posteriormente serán evaluadas en sus capacidades tecnológicas y probióticas que puedan emplearse en la elaboración de tratamientos e inoculantes para ensilaje. En vista de la escasa literatura los resultados fueron novedosos con un importante aporte científico y a nivel de la industria agropecuaria venezolana.

Limitaciones de la Investigación

Una de las grandes limitantes que se presentaron durante el procesamiento de las muestras fueron las constantes interrupciones eléctricas que no permitieron que las bacterias alcanzaran un crecimiento efectivo. Por otra parte y a pesar de existir un gran interés en lactobacilos homofermentadores la información disponible sobre bacterias ácido lácticas en caña de azúcar es escasa

CAPITULO II

MARCO TEORICO

Antecedentes de la Investigación.

Rocha *et al.* (2008), en su trabajo de investigación “Efecto de la adición de *Lactobacillus spp* en el ensilado de caña de azúcar”, cuyo objetivo fue evaluar el efecto de aditivos microbianos con bacterias heterofermentativas u homofermentativas sobre las características de los silajes de caña de azúcar (*Saccharum spp*). El efecto de la inoculación sobre las características bromatológicas fue variable; los valores de pH y nitrógeno amoniacal para todos los silos estuvieron en el estándar aceptable para silajes de buena calidad. Los inoculantes retardaron el aumento de la temperatura, en aerobiosis, otorgando mayor estabilidad.

De la misma manera otro estudio realizado por Silva *et al.* (2008), sobre “Calidad del silaje de caña de azúcar inoculada con una cepa de *Lactobacillus buchneri*”, el mismo tuvo como objetivo, evaluar el efecto de un inoculante bacteriano sobre las características químicas y microbiológicas del silaje de caña de azúcar. Los tratamientos fueron silaje sin inoculante y silaje inoculado con una cepa identificada como la especie *Lactobacillus buchneri*. La población de BAL fue mayor para el silaje inoculado, y la población media de levaduras y los valores de pH fueron menores, los autores recomienda la aplicación de *Lactobacillus buchneri* en el ensilado de la caña de azúcar.

Neto, Nussio, Zopollatto, Junges y Wosniak (2009), en su estudio titulado Silo de maíz o de caña de azúcar con *Lactobacillus buchneri* exclusivamente o en combinación con *L. plantarum*, tuvo como objetivo evaluar el efecto de *Lactobacillus buchneri* aplicado exclusivamente o en combinación con *L. plantarum* en el perfil fermentativo, en la estabilidad aerobia y en el valor nutritivo de los silajes de maíz y de caña de azúcar. El tratamiento de los silos de maíz no afectó la mayoría de las variables relacionadas al valor nutritivo, las características fermentativas, los perfiles microbiológicos, las pérdidas y la estabilidad aerobia. En los silajes de caña de azúcar, el tratamiento con *L. buchneri* presentó mayor contenido de materia seca, sin presentar diferencias para las variables de valor nutritivo. Además, se observaron otros resultados típicos de la adición de *L. buchneri*: menor pérdida total de materia seca y menores pérdidas debidas a la producción de gases. La aplicación exclusiva de *L. buchneri* o en la asociación a *L. plantarum* no altera la calidad y la eficiencia de conservación de los silajes de maíz. Sin embargo, en silos de caña de azúcar, la aplicación exclusiva de *L. buchneri* reduce las pérdidas de conservación.

Timbuntam Sriroth Tokiwa (2009) estudiaron los efectos de una cepa indígena y comercial de *Lactobacillus buchneri* sobre la calidad del ensilado de caña de azúcar, cuyo objetivo fue evaluar los efectos de la adición de una nueva cepa de *Lactobacillus buchneri* y un inoculante comercial en la fermentación y la estabilidad aeróbica de los ensilajes de caña de azúcar (*Saccharum spp.*). La adición de *L. buchneri* dio como resultado una mayor concentración de ácido acético y poblaciones reducidas de levaduras en ensilaje en comparación con los otros tratamientos de ensilaje, y una menor concentración de etanol en el ensilaje. El nuevo aislamiento de *L. buchneri* y el inoculante comercial también mejoraron la estabilidad aeróbica de los ensilajes de caña de azúcar. Se concluyó que se puede recomendar la adición de los nuevos inoculantes *L. buchneri* al ensilaje de caña de azúcar.

Bases Teóricas

Caña de azúcar

Reseña Histórica de la caña de azúcar (Saccharum officinarum)

El cultivo de caña de azúcar se originó hace aproximadamente 3.000 años en la isla de Nueva Guinea ubicada actualmente en el extremo norte de Australia, extendiéndose desde allí a Borneos, Sumatra e India. Entre los años 500 y 300 A.C. se desarrollaron los primeros procedimientos para obtener azúcar cristalizada, hasta entonces solo se consumía mascada para obtener una miel parecida a la de las abejas. Cristóbal Colón logró con éxito introducirla en América en el año 1501 aproximadamente a través de lo que hoy es la República Dominicana, de ahí se extendió por el Caribe y por América del Sur. A Hernán Cortés se le atribuye haberla introducido en el año 1524 en La Nueva España, en donde también se estableció el primer trapiche en lo que hoy es el Estado de Veracruz. La técnica utilizada para la construcción de los molinos, consistía en grandes masas de madera accionadas por tracción animal (Subirós Ruiz, 1995).

La etimología de la palabra azúcar deriva del hispano árabe *assúkkar* pasando por el árabe clásico *sukkar*, el griego *sakjar*, el persa *sakar* y su origen en el sanscrito *sharkara* (Subirós Ruiz, 1995).

Descripción de la planta de caña de azúcar

La caña de azúcar es una planta herbácea perenne que forma parte de la familia de las gramíneas; por lo tanto, está emparentada con el arroz, el maíz, el sorgo, la avena y el bambú. Un grupo de tallos duros, jugosos, no ramificados y con entrenudos crece a partir de una red de rizomas de la que

aparecen tallos secundarios. Los tallos miden unos 5 metros de altura, pero el rango es de 3 a 8 metros. Muestran colores que van desde el verde hasta el rosado o púrpura. Sus hojas son largas, lanceoladas y fibrosas, con bordes dentados y una nervadura central gruesa. Miden entre 30 y 60 centímetros de longitud y alrededor de 5 centímetros de ancho. Desarrolla panículas, un tipo de inflorescencia, en la que se alojan espiguillas de flores minúsculas y en cuyos extremos se aprecia una especie de pelusa larga y sedosa. El fruto es una cariósida de 1.5 milímetros de largo, con una sola semilla en su interior .Recuperado de <https://www.bioenciclopedia.com>.

Constituyentes de la caña de azúcar

El tronco de la caña de azúcar está compuesto por una parte sólida llamada fibra y una parte líquida, el jugo, que contiene agua y sacarosa. En ambas partes también se encuentran otras sustancias en cantidades muy pequeñas. Las proporciones de los componentes varían de acuerdo con la variedad (familia) de la caña, edad, madurez, clima, suelo, método de cultivo, abonos, lluvias, riegos, entre otros. Sin embargo, unos valores de referencia general pueden ser:

Agua	73 - 76 %
Sacarosa.....	8 - 15 %
Fibra.....	11 - 16 %
...	

La sacarosa del jugo es cristalizada en el proceso como azúcar y la fibra constituye el bagazo una vez molida la caña. Pueden encontrarse otros constituyentes de la caña presentes en el jugo, tales como:

Glucosa.....	0,2 - 0,6 %
Fructosa.....	0,2 - 0,6 %
Sales.....	0,3 - 0,8 %

Ácidos orgánicos.....	0,1 - 0,8 %
Otros.....	0,3 - 0,8 %

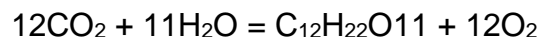
Las hojas de la caña nacen en los entrenudos del tronco. A medida que crece la caña, las hojas más bajas se secan, caen y son reemplazadas por las que aparecen en los entrenudos superiores. También nacen en los entrenudos las yemas que bajo ciertas condiciones pueden llegar a dar lugar al nacimiento de otra planta, Sánchez, 2010.

Fotosíntesis de la planta.

El desarrollo de la caña de azúcar depende en gran medida de la luz solar, razón por la cual su cultivo se realiza en las zonas tropicales que poseen un brillo solar alto y prolongado.

La clorofila existente en las células de las hojas de la caña absorbe la energía de la luz solar (1), la cual sirve como combustible en la reacción entre el dióxido de carbono que las hojas toman del aire (2) y el agua que junto con varios minerales, las raíces sacan de la tierra (3), para formar sacarosa (4) que se almacena en el tallo y constituye la reserva alimenticia de la planta, a partir de la cual fabrican otros azúcares, almidones y fibra (5). (Ver **Fig. 1**).

Dióxido de carbono + agua = sacarosa + oxígeno.



La caña de azúcar se encuentra dentro del grupo más eficiente de convertidores de la energía solar que existen, Sánchez, 2010.

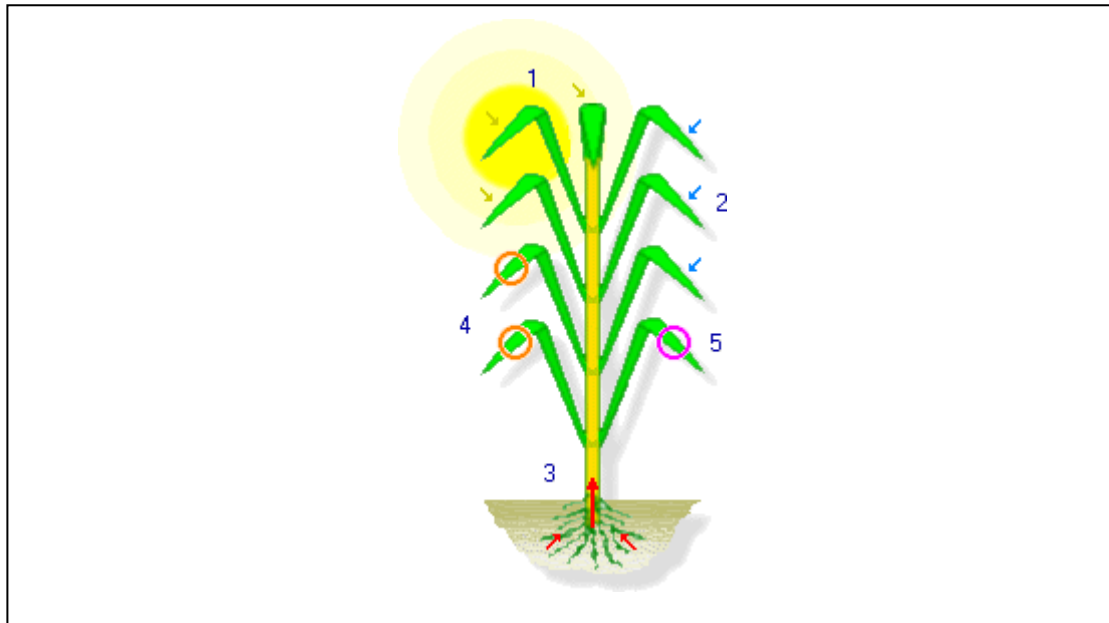


Fig 1. Fotosíntesis de la planta de caña de azúcar.

Enfermedades bacterianas que afectan la caña de azúcar

- *Xanthomonas campestris pv vasculorum*: Gomosis de la caña de azúcar.
- *Clavibacter xyl* subsp *xyl*: Enanismo de los retoños de la caña de azúcar.
- *Xanthomonas campestris pv albilineans*: Escaldadura foliar.
- *Pseudomonas rubrilineans*: Raya roja y pudrición del cogollo de la caña de azúcar.
- *Pseudomonas rubrisualbican*: Raya moteada de la caña de azúcar y raya de la hoja del sorgo.
- *Erwinia chrysanthemi* (*Dickella chrysanthemi*, Sánchez, 2010).

Usos de la planta

La caña de azúcar se utiliza mayormente para la producción de azúcar, adicionalmente se puede utilizar como fuente de materias primas para una amplia gama de derivados, algunos de los cuales constituyen alternativas de

sustitución de otros productos con impacto ecológico adverso (cemento, papel obtenido a partir de pulpa de madera, entre otros). Los residuales y subproductos de esta industria, en las destilerías contienen una gran cantidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos que permiten su reciclaje en forma de abono, para alimento animal, entre otros. En este sentido es importante señalar el empleo de la cachaza como fertilizante, las mieles finales y los jugos del proceso de producción de azúcar pueden emplearse para la producción de alcohol, lo que permite disponer de un combustible líquido de forma renovable y la incorporación de los derivados tradicionales (tableros aglomerados, papel y cartón, cultivos alternativos para alimento animal y mieles finales). Una pequeña parte la producción de caña de azúcar tiene fines de producción de piloncillo, el cual se obtiene de la concentración y evaporación libre del jugo de la caña, también es conocido como panela. El piloncillo tiene varios usos, como materia prima en la industria de la repostería, pastelería, y como endulzante en diversos alimentos y también se usa para la elaboración de alcohol y otros licores. Otra cantidad de caña aún más pequeña se utiliza como fruta de estación, aunque se vende todo el año, se concentra en la temporada navideña para las piñatas y el tradicional ponche Ecuared (s.f.).

El ensilaje

El ensilaje es un método de preservación para el forraje húmedo y su objetivo es la conservación del valor nutritivo del alimento durante el almacenamiento. En las ganaderías modernas, los forrajes son segados en la fase donde el rendimiento y el valor nutritivo están al máximo y se ensilan para asegurar un suministro continuo de alimento durante el año. El ensilaje es un proceso principalmente empleado en países desarrollados; se estima que 200 millones de toneladas de materia seca son ensilados en el mundo anualmente, a un costo de la producción entre US \$100-150 por tonelada.

Este costo comprende: la tierra y el cultivo (aproximadamente 50%), segado y polietileno (30%), silo (13%) y aditivos (7%). En Europa, los agricultores de países como Holanda, Alemania y Dinamarca almacenan más del 90 por ciento de sus forrajes como ensilaje. Aún en países con buenas condiciones climáticas para la henificación, como Francia e Italia, cerca de la mitad del forraje es ensilado. Las cosechas más importantes para el ensilaje a nivel mundial son las de maíz, alfalfa y pastos, aunque también se ensilan trigo, sorgo y algunas legumbres (Garcés Molina, A. M., Berrio Roa, L., Ruiz Alzate, S., Serna de León, J.G. y Builes Arango, A.F. 2014).

El ensilaje se logra por medio de una fermentación láctica espontánea en condiciones anaerobias. Las bacterias epifíticas de ácido láctico (BAC) fermentan los carbohidratos hidrosolubles (CHS) del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción. El proceso del ensilaje se puede dividir en cuatro etapas (Garcés Molina, A. M., Berrio Roa, L., Ruiz Alzate, S., Serna de León, J.G. y Builes Arango, A.F. 2014).

Fase 1. Fase Aeróbica

Esta fase dura pocas horas. El oxígeno atmosférico presente en la masa vegetal disminuye rápidamente debido a la respiración de los microorganismos aerobios y aerobios facultativos como las levaduras y enterobacterias. Además, hay actividad de varias enzimas vegetales, como las proteasas y las carbohidrasas, siempre que el pH se mantenga en el rango normal para el jugo del forraje fresco (pH 6,5-6,0).

Las levaduras son microorganismos anaerobios facultativos y heterótrofos; cuya presencia en el ensilaje es indeseable porque bajo condiciones anaerobias fermentan los azúcares produciendo etanol y CO₂. La producción de etanol disminuye el azúcar disponible para producir ácido láctico y

además, en condiciones aerobias muchas especies de levaduras degradan el ácido láctico en CO₂ y H₂O, lo que eleva el valor del pH del ensilaje, permitiendo el desarrollo de otros organismos indeseables.

Las enterobacterias son organismos anaerobios facultativos y la mayoría de las que se encuentran en el ensilaje no son patógenas. Su desarrollo en el ensilaje es perjudicial porque compiten con las BAC por los azúcares disponibles y porque degradan las proteínas. La degradación proteica causa una reducción del valor nutritivo del ensilaje y genera compuestos tóxicos como aminas biogénicas y ácidos grasos de cadena múltiple (Garcés Molina, A. M., Berrio Roa, L., Ruiz Alzate, S., Serna de León, J.G. y Builes Arango, A.F. 2014).

Fase 2. Fase de Fermentación

Se inicia al producirse un ambiente anaerobio, puede durar de días a semanas dependiendo de las características del material ensilado y de las condiciones ambientales en el momento del ensilaje. Si la fermentación se desarrolla con éxito, la actividad BAC proliferará y se convertirá en la población predominante, debido a la producción de ácido láctico y otros ácidos, el pH bajará a valores entre 3,8 a 5,0. Las bacterias que producen ácido láctico (BAC) pertenecen a la microflora epifítica de los vegetales. Los componentes BAC que se asocian con el proceso de ensilaje pertenecen a los géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. La mayoría de ellos son mesófilos, o sea que pueden crecer en un rango de temperaturas que oscila entre 5° y 50 °C, con un óptimo entre 25° y 40 °C. Son capaces de bajar el pH del ensilaje a valores entre 4 y 5, dependiendo de las especies y del tipo de forraje. Todos los miembros del BAC son aeróbicos facultativos, pero muestran cierta preferencia por la condición anaerobia.

Las características del cultivo como contenido de azúcares, de materia seca y composición de los azúcares, combinados con las propiedades del grupo BAC, así como su tolerancia a condiciones ácidas o de presión osmótica y el uso del substrato influirán sobre la capacidad de competencia de la flora BAC con las enterobacterias durante la fermentación del ensilaje (Garcés Molina, A. M., Berrio Roa, L., Ruiz Alzate, S., Serna de León, J.G. y Builes Arango, A.F. 2014).

Fase 3. Fase Estable

La mayoría de los microorganismos de la fase 2 lentamente reducen su presencia. Algunos microorganismos acidófilos sobreviven este período en estado inactivo; otros, como clostridios y bacilos, sobreviven como esporas. Sólo algunas proteasas y carbohidrasas, y microorganismos especializados, como *Lactobacillus buchneri* que toleran ambientes ácidos, continúan activos pero a menor ritmo. Si el ambiente se mantiene sin aire ocurren pocos cambios. Algunas bacterias indeseables en la fase 3 son las bacterias acidófilas, ácido tolerantes y aerobias. Por ejemplo *Acetobacter spp.*, es pernicioso en el ensilaje porque puede iniciar una deterioración aeróbica, ya que puede oxidar el lactato y el acetato produciendo CO₂ y agua. El género *Clostridium* es anaerobio, forma endosporas y puede fermentar carbohidratos y proteínas, por lo cual disminuyen el valor nutritivo del ensilaje, crea problemas al producir aminos biogénicos. La presencia de *Clostridium* en el ensilaje altera la calidad ya que sus esporas sobreviven después de transitar por el tracto digestivo y se encuentran en las heces; además puede contaminar. *Bacillus spp* son bacterias aerobias facultativas que forman esporas, fermentan un amplio rango de carbohidratos produciendo ácidos orgánicos (p. ej.: acetatos, lactatos y butiratos) o etanol, 2,3-butanodiol o glicerol. Algunas especies de *Bacillus* producen sustancias fungicidas y se los ha utilizado para inhibir el proceso de deterioro aeróbico en ensilajes,

pero con excepción de estas especies, el desarrollo de los bacilos en el ensilaje es considerado como indeseable, porque son menos eficaces como productores de ácido láctico y acético comparado con el grupo BAC y que en la etapa final incrementan el deterioro aerobio (Garcés Molina, A. M., Berrio Roa, L., Ruiz Alzate, S., Serna de León, J.G. y Builes Arango, A.F. 2014).

Fase 4. Fase de deterioro aerobio

Ocurre en todos los ensilajes al ser abiertos y expuestos al aire para su empleo, pero puede ocurrir antes por daño de la cobertura del silo (p. ej. roedores o pájaros). El período de deterioro puede dividirse en dos etapas:

La primera se debe al inicio de la degradación de los ácidos orgánicos que conservan el ensilaje por acción de levaduras y ocasionalmente por bacterias que producen ácido acético. Esto aumenta el valor del pH, lo que permite el inicio de la segunda etapa de deterioro; en ella se constata un aumento de la temperatura y la actividad de microorganismos que deterioran el ensilaje, los bacilos. La última etapa también incluye la actividad de otros microorganismos aerobios, también facultativos, como mohos y enterobacterias. Los mohos son organismos aerobios cuya presencia en el ensilaje se detecta por la aparición de filamentos de diversos colores, de acuerdo a las especies presentes. Se desarrollan en cualquier sitio del ensilaje donde encuentren oxígeno, inclusive trazas. En un buen ensilaje eso ocurre sólo al inicio del almacenamiento y se restringe a la capa exterior de la masa ensilada, pero durante la fase del deterioro aerobio todo el ensilaje puede ser invadido por mohos. Las especies que se presentan frecuentemente pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Byssosclamyces*, *Absidia*, *Arthrinium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Scopulariopsis* y *Trichoderma*. (Garcés Molina, A. M., Berrio Roa, L., Ruiz Alzate, S., Serna de León, J.G. y Builes Arango, A.F. 2014).

Los mohos disminuyen el valor nutritivo, la palatabilidad del ensilaje y son un riesgo para la salud de los animales y las personas.

Fermentación

La fermentación ácida es una reacción de oxidación-reducción balanceada, en la cual algunos átomos de la fuente de energía quedan reducidos y otros quedan oxidados. Solamente una pequeña cantidad de energía se libera durante la fermentación de la glucosa, la mayor parte de la energía permanece en el producto de fermentación reducido. El catabolismo de la glucosa por una bacteria del ácido láctico: La energía liberada en la fermentación de la glucosa a ácido láctico se conserva por fosforilación a nivel de sustrato en forma de enlaces fosfato de alta energía en el ATP, con una producción neta de dos de esos enlaces en cada caso, Ferrari,2015.

Clases de silo o almacenaje

El ensilaje es guardado en una estructura llamada silo. La capacidad del silo se determina de acuerdo a las necesidades (el tamaño de la manada y número de raciones). Varios tipos de silo se pueden usar para almacenar el ensilaje como:

- Silo en montón:** Es una pila cubierta y sellada con plástico y luego con tierra u otros materiales.
- Silo en trinchera o zanja:** Es una zanja cubierta con plástico y luego con una capa de tierra, debe tener canaleta para el escurrimiento de agua lluvia. Sus dimensiones se calculan para establecer una profundidad que garantice una exposición mínima del forraje ensilado al aire.
- Silo en torres:** Torres de almacenamiento con zonas independientes de llenado y descarga.

•**Silo canadiense:** Es una combinación del silo de montón y de trinchera. Se hace la pila y se cubre con plástico y tierra, y se sella lateralmente con barro, Ferrari,2015.

Aditivos

Se pueden emplear diferentes aditivos para acelerar el proceso como melaza, pulpa de cítricos y maíz triturado. Estos proveen una fuente de azúcares solubles que la bacteria utiliza para producir ácido láctico. Si el forraje ensilado posee niveles de humedad superiores al 70%, los aditivos aseguran que el nivel de azúcares solubles sean suficientes para realizar el proceso.

Los ensilajes de maíz y de sorgo contienen suficiente cantidad de azúcares solubles y normalmente no requieren aditivos. Los forrajes que contienen pocos azúcares solubles para fermentar o un bajo contenido de materia seca no producen un ensilaje de buena calidad; por lo tanto, para inducir una buena fermentación es preciso aumentar el contenido de azúcares, ya sea agregándolos directamente (p. ej. usando melaza) o introduciendo enzimas que puedan liberar otro tipo de azúcares presentes en el forraje.

Otro tipo de aditivos son los inóculos, que son bacterias vivas disponibles comercialmente y que agregando ciertos BAC pueden acelerar y mejorar el proceso del ensilaje. En casos de ensilajes con alto contenido de materia seca y poca disponibilidad de agua, la presencia de un BAC que sea tolerante a la alta presión osmótica pasa a ser el factor crítico para una buena fermentación. Se debe tener en cuenta que este tipo de bacterias representan una porción muy pequeña de la microflora natural de los cultivos forrajeros. Forrajes con más del 50% de materia seca se consideran muy difíciles de ensilar. Garcés Molina, A. M., Berrio Roa, L., Ruiz Alzate, S., Serna de León, J.G. y Builes Arango, A.F. 2014).

Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las interacciones de bacterias ácido lácticas (BAL) y los alimentos se conocen desde hace mucho tiempo. La capacidad de las bacterias lácticas para producir ácido láctico desde sustratos fermentables se ha utilizado como método de preservación de alimentos debido a que la acidificación del medio impide el crecimiento de la flora acompañante.

Así, las BAL fueron típicamente involucradas en forma empírica desde el Neolítico (Mesopotamia) en fermentaciones espontáneas de alimentos.

En 1873, Lister aisló a partir de la leche, el primer cultivo bacteriano puro que denominó *Bacterium Lactis Lactucoccus Lactis*. El uso de cultivos iniciadores Startes para fabricación de quesos fue introducido en 1890 por Weigmann en Kiel y Storch en Copenhague (Stiles et al, 1997)

Las primeras definiciones del grupo BAL basadas en la capacidad para fermentar y coagular la leche incluían a las bacterias coliformes junto con las lácticas. En 1901, Berjerinck describió a los organismos *Lactobacillus* como bacterias Gram positivas separando las coliformes de las BAL.

Para Kandler (1983), las bacterias lácticas son microorganismos Gram positivos cuyo metabolismo es estrictamente fermentativo y presentan altos requerimientos nutricionales. Son inmóviles, no esporo formadoras, anaerobias aerotolerantes, que carecen de catalasa. Algunas solo producen ácido láctico como producto principal de la fermentación de carbohidratos (homofermentativas) o una mezcla de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético (heterofermentativas).

Comprende los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Weissella* y *Enterococcus*.

La taxonomía clásica se basó en características morfológicas y fisiológicas para definir a las bacterias lácticas. Sin embargo, las herramientas

moleculares permitieron redefinir el grupo, en particular fundamentándose en la secuencia del ARN ribosomal 16s. Estas evidencias genéticas indican que la definición de bacterias lácticas agrupadas en función de las características fisiológicas enumeradas anteriormente concuerda con la relación a nivel filogenético (Stackebrand, 1988) Así, se las clasifica como Gram positivas dentro de la subrama *Clostridium* que incluye organismos con un contenido G+C en el ADN inferior al 50%. Quedaría excluido del grupo del género *Bifidobacterium* que pertenece a la rama de *Actinomycetes* con un porcentaje de G+C superior al 50%.

Características Nutricionales

Las BAL son muy exigentes ya que requieren una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas principalmente del grupo B y fuentes de carbono). La mayor parte de las BAL obtienen energía sólo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares.

La mayoría de las especies necesitan aminoácidos y vitaminas del grupo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido fólico) (Parra, 2010).

Características Ecológicas

Los hábitats son muy variados, pudiéndose encontrar en flora normal de la superficie de material vegetal (frutas y verduras), alimentos fermentados y ricos en azúcares, leche y sus derivados, cárnicos y mucosas del cuerpo de mamíferos como boca, tracto nasofaríngeo, gastrointestinal y vagina (Mora y García, 2007).

Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas

Las BAL son conocidas por producir, durante su crecimiento, sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Esta característica se utiliza para la destrucción de bacterias indeseables o patógenas en la fabricación de los alimentos. La mayor parte de estos compuestos no están caracterizados ni en cuanto a su naturaleza bioquímica, ni su mecanismo de acción. Con frecuencia, incluso los productos activos no son más que metabolitos excretados por la bacteria como el ácido láctico que es inhibidor de esporas de bacterias y es antimicrobiano o derivados del metabolismo del oxígeno como el H₂O₂ (Mora y García, 2007).

www.bdigital.ula.ve

Lactobacillus spp

De acuerdo con Delgado (2005), *Lactobacillus spp* es ubicuo en la naturaleza pudiéndose encontrar en alimentos lácteos, vegetales, carnes y sus derivados, bebidas fermentadas, entre otras. Además, forman parte de la microbiota habitual de la boca, tracto gastrointestinal y vagina de mamíferos, rara vez este género es considerado patógeno.

De igual manera Kandlery Weiss, 1986, refiere que el género *Lactobacillus*, se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos tipo corineformes. Son microorganismos Gram positivos, anaerobios aerotolerantes pero su crecimiento se ve favorecido en una atmósfera con 5-10% CO₂; crecen en todos los ambientes con carbohidratos, compuestos proteicos, ácidos nucleicos y vitaminas. El metabolismo puede ser fermentativo y sacarolítico.

Es por ello que Contreras, Domínguez, González, González (2007), consideran que en medio de cultivo con agar, las colonias de *Lactobacillus* son pequeñas (2-5 mm), convexas, lisas, con bordes enteros, opacas y sin pigmentos. Algunas especies forman colonias rugosas; otras como *Lactobacillus confusus*, presentan colonias viscosas. Se han diseñado medios ricos ideales para el crecimiento de estos microorganismos; tal es el caso del agar Man Rogosa Sharpe (MRS), al cual se le puede adicionar sales biliares, cisteína al 0,05% o antibióticos como agentes selectivos.

Sin embargo, Prescott, Harley y Klein (2004), refieren que en su mayoría no presentan actividad proteolítica, tampoco producen indol, ni ácido sulfúrico. Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen una pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Respecto a los requerimientos nutricionales son complejos, requieren aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ester de ácidos grasos y carbohidratos fermentables.

En concordancia con Bergey (2001), los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con un desarrollo óptimo entre pH 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 dependiendo la especie y tipo de cepas; de igual forma disminuye notablemente en medios neutros ligeramente alcalinos. La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30-40°C). Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido-dismutasas ni catalasas.

En cuanto a la sensibilidad a los antibióticos y drogas se describe en la literatura que los lactobacilos son sensibles a la mayoría de los antibióticos activos contra las bacterias Gram positivas. Raramente son patógenos, en ocasiones puede asociarse a caries dentales y otros procesos infecciosos tales como, abscesos, septicemias y endocarditis bacterianas, provocados por *L. casei*, *subs rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y ocasionalmente *L. salivarius*.

Para Bergey (2001), los lactobacilos se ubican en el Phylum *Firmicutes*, Clase III *Bacilli*, Orden II *Lactobacillales*, Género *Lactobacillus* del cual se han descrito más de 200 especies.

Tradicionalmente, *Lactobacillus spp* se ha ubicado dentro de las BAL, siendo estas clasificadas sobre la base de las propiedades fenotípicas, morfología (cocos o bacilos), fermentación de los hidratos de carbono (homofermentativo o heterofermentativo), temperatura óptima de crecimiento (mesófilas o termófilas) y la tolerancia a la sal (halotolerantes y no halotolerantes).

Grupos Fenotípicos de los *Lactobacillus*

Principalmente la clasificación de las BAL en géneros está basada en la morfología, en el modo de degradación de hexosas a lactato (vía homofermentativa) y productos adicionales como acetato, etanol, CO₂, formiato o succinato (vía heterofermentativa) (Parra, 2010), así como también en el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido y la habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina. Así se han definido tres grupos fenotípicos:

Lactobacilos homofermentativos: que crecen a temperaturas altas (>45°C), como especies representativas encontramos *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. deklbrueckii ssp. L. lactis* y *L. helveticus*.

Lactobacilos heterofermentativos facultativos: como *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* y *L. sakei*.

Lactobacilos heterofermentativos obligados: fermenta hexosas a ácido láctico, ácido acético o etanol y dióxido de carbono; una especie representativa de este grupo es *L. kéfir* utilizado en la elaboración del kéfir, otras especies de este grupo son: *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum* y *L. reuteri*.

Métodos de conservación bacteriana

La preservación de bacterias es una etapa crucial para todo laboratorio de investigación, así como para la industria alimenticia y farmacéutica, dado el gran recurso biotecnológico de diversos microorganismos, entre estos las bacterias ácido lácticas reconocidos ampliamente por su uso como probiótico.

En el caso de *Lactobacillus* estas bacterias representan un potencial biotecnológico enorme, de tal manera que, si guardamos a estos microorganismos, de cierta forma estamos resguardando dicho potencial para futuras generaciones e incluso investigaciones.

Para Uruburu, (2003), el resguardo de las bacterias puede realizarse mediante preservación a corto, mediano y largo plazo. Es importante mencionar que la forma de preservar a las bacterias ha sido poco explorada y mucho del conocimiento que se tiene recabado en la actualidad se ha obtenido de forma empírica. Existen diferentes métodos de conservación para los distintos microorganismos, ninguno de ellos es universal por lo que se debe elegir el método que más se ajuste a las condiciones y la infraestructura del laboratorio, además del tipo de microorganismo que se desea preservar.

Para la correcta conservación de los diferentes microorganismos se debe tomar en consideración 3 recomendaciones (García y Uruburu, 2000):

1. Evitar en lo posible contaminación durante el proceso de conservación.
2. Durante el tiempo en que los microorganismos permanezcan conservados conviene que sobrevivan en números elevados.
3. Los microorganismos conservados deben de permanecer genéticamente estables.

Sin embargo, Cooper, 2002; citado por Morales *et al* (2010), consideran que la conservación a corto plazo se utiliza cuando los laboratorios no cuentan con suficientes recursos económicos ni con un ultra-congelador. El

método comúnmente usado es la resiembra continua. Es decir, el microorganismo en estudio se siembra en un medio adecuado y una vez crecido se almacena a 4°C donde se mantiene unos días para su uso y se vuelve a resembrar en un tiempo no mayor a un mes. El gran problema de la resiembra continua, es que se pueden generar mutaciones y adaptación al medio de cultivo, lo que termina generando cepas domesticadas cuyo comportamiento ya no representa a la especie inicialmente aislada.

De la misma manera, Fages, (1990); Pravaakaran y Hoti; (2008), citados por Morales *et al.* (2010), refiere que para evitar la domesticación y mutación de bacterias, se ha intentado inactivar su metabolismo, mediante técnicas de conservación conocidas como métodos restringidos. Estos métodos se basan en la paralización del crecimiento bacteriano mediante la eliminación del agua disponible en la célula; donde se permite la desecación de bacterias en un soporte inerte y estéril. En este caso las bacterias se pueden colocar en soportes como papel filtro, piedra pómez (pumita), turba, bolitas de alginato e incluso sal gorda.

Es importante destacar que la desecación en bolitas de alginato es un procedimiento bastante eficaz para preservar bacterias, las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua, las células son conservadas en tubos estériles, cerrados herméticamente y a una temperatura de entre 4°C y 18°C. La desecación en sal gorda, es un método usado para halobacterias en el cual, las células se mezclan con una solución de sal y se secan aprovechando la higroscopicidad de la sal; la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por el nivel insuficiente de agua disponible en el medio.

Medio de Cultivo Man, Rogosa y Sharpe

El Agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido láctico. El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas (Morales, 1980).

Sistema de Hipótesis

Hipótesis Afirmativa: En la caña de azúcar se puede evidenciar la presencia de bacterias ácido lácticas homofermentadoras pertenecientes al género *Lactobacillus*.

Hipótesis Nula: En la caña de azúcar no se evidenció la presencia de bacterias ácido lácticas homofermentadoras pertenecientes al género *Lactobacillus*.

Hipótesis Alternativa: En la caña de azúcar se puede evidenciar la presencia de bacterias ácido lácticas homofermentadoras diferentes al género *Lactobacillus*.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

En esta etapa del trabajo se describen sistemas para el desarrollo de la investigación, que van a permitir operacionalizar los procesos idóneos de la investigación. Al respecto Palella y Martins (2006) aseveran que es “el camino que se sigue para lograr un fin”. Por consiguiente, en esta fase del trabajo se indican aspectos tales como; población, muestra, confiabilidad, tipo y diseño de la investigación.

www.bdigital.ula.ve

Naturaleza de la Investigación

El modelo paradigmático asumido es el cuantitativo positivista; en este sentido, los datos obtenidos para el logro de los objetivos son susceptibles a medición. De esta manera Hernández, Fernández y Baptista (2006), refieren que los modelos cuantitativos son aquellos que utilizan patrones y escalas de medición aplicando la información registrada en la investigación.

Nivel, Tipo y Diseño de la Investigación

Según la profundidad como se aborda el estudio y los objetivos planteados es de Nivel y Tipo descriptiva. Al respecto, Hernández, Fernández

y Baptista (2003), indica que “los estudios descriptivos miden la manera más bien independiente de los conceptos o variables”.

En cuanto al diseño de la investigación Balestrini (2006) dice “el diseño experimental es aquel según el cual el investigador manipula una variable experimental no comprobada, bajo condiciones estrictamente controladas”. Su objetivo es describir de qué modo y por qué causa se produce o puede producirse un fenómeno.

Población y muestra

Población

Según Balestrini (2010) se entiende por población “a cualquier conjunto de elementos de los cuales pretendemos indagar y conocer sus características, o una de ellas, para el cual serán válidas las conclusiones obtenidas en la investigación”.

En relación al concepto descrito, de esta manera se aclara que la población del presente estudio está compuesta de hojas y tallos de caña de azúcar tomada de una siembra ubicada en la población de Ejido del estado Mérida.

Muestra

Para Balestrini (2006) la muestra “es una parte representativa de una población, cuyas características deben reproducirse en ella lo más exactamente posible”, de allí que en el presente estudio se tomó un trozo de hoja y tallo de caña de azúcar.

Procedimiento

Recolección y Transporte de la muestra

Se realizó la asepsia con alcohol isopropílico al 70%, de los materiales a utilizar para la obtención de la muestra (bolsas, cuchillos, entre otros), se cortó 1 tallo de 26 cm de la planta y 1 hoja de 1 m de alto y se introdujeron en las bolsas debidamente rotuladas.

Preparación de la muestra y siembra inicial en medios de cultivo

Las muestras obtenidas se trasladaron al Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas, "Prof. Celina Araujo de Pérez", adscrito al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, donde fueron colocadas en un recipiente con agua peptonada modificada (APM) preparada con 0,1% de peptona, 0,1% de tween 80 y 0,05% de cisteína, este último para disminuir el potencial de óxido reducción del diluyente. Se usaron dos recipientes: Recipiente 1: envase con muestra de hoja, Recipiente 2: envase con muestra del tallo, la muestra fue colocada en agitación por 20 min, con la finalidad de favorecer la liberación de los microorganismos presentes. Se realizaron 7 diluciones seriadas en caldo de APM. Tubos 1: muestra de hoja, se realizaron 4 diluciones de 0,5 μ L de muestra en 9,5 mL de APM (-1 hasta -4); Tubos 2: muestra de tallo, se realizaron 3 diluciones de 0,5 μ L de muestra en 9,5 mL de APM (-1 hasta -3), se incubaron a 37°C por 48 horas. (Ver **Fig.2**).

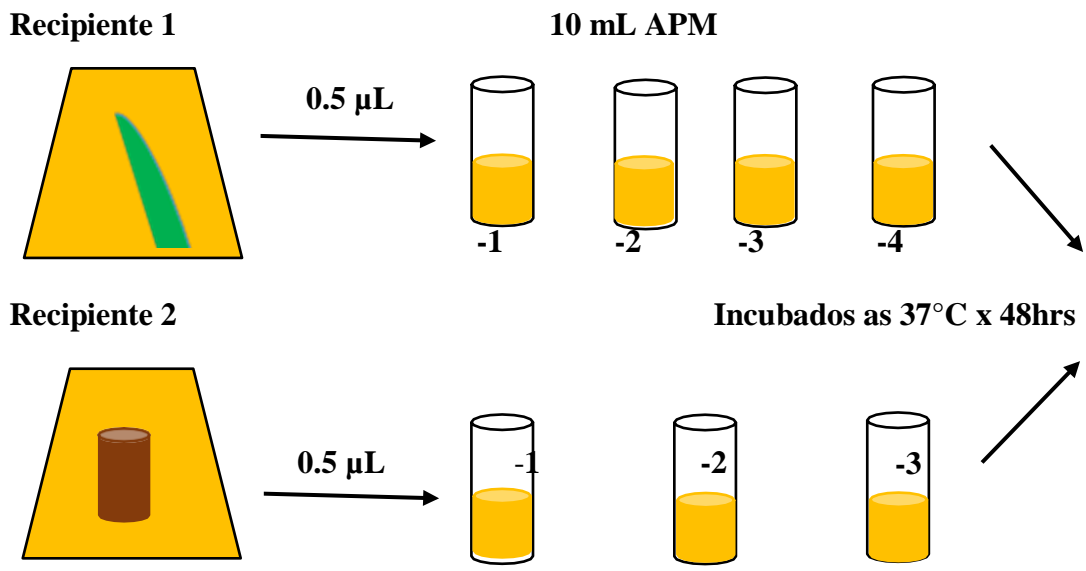


Fig.2 Diluciones realizadas.

Haciendo uso del asa en aro, se subcultivó en caldo MRS suplementado con un carbohidrato (R: Rafinosa; A: Arabinosa; CMC: Carboximetilcelulosa; BC: Bactocelobiosa; X: Xilosa) (Ver **Tabla 1.**) con tubo de Durham invertido para evidenciar la formación de gas. Se seleccionó el tubo 1 de la muestra de hoja de la tercera dilución y el tubo 2 muestra de tallo de la tercera dilución quienes presentaban abundante crecimiento bacteriano (turbidez), posteriormente los tubos obtenidos se incubaron a 37° por 48 horas, Alvarado(2009). (Ver **Fig.3**).

Tabla 1. Terminología usada.

CMRSR: Caldo de Man Rugosa Sharpe con Rafinosa.
CMRSA: Caldo de Man Rugosa Sharpe con Arabinosa.
CMRSCMC: Caldo de Man Rugosa Sharpe con Carboximetilcelulosa.
CMRSBC: Caldo de Man Rugosa Sharpe con Bactocelobiosa.
CMRSX: Caldo de Man Rugosa Sharpe con Xilosa.
CMRSR: Agar Man Rugosa Sharpe con Rafinosa.
MRSA: Agar Man Rugosa Sharpe con Arabinosa.
MRSCMC: Agar Man Rugosa Sharpe con Carboximetilcelulosa.
MRSBC: Agar Man Rugosa Sharpe con Bactocelobiosa.
MRSX: Agar Man Rugosa Sharpe con Xilosa.

Tabla 2. Cepas en estudio.

Cepa en estudio	Nº Colonia		
	1	2	3
MRSR	R1	R2	R3
MRSA	A1	A2	A3
MRSCMC	CMC1	CMC2	CMC3
MRSBC	BC1	BC2	BC3
MRSX	X1	X2	X3

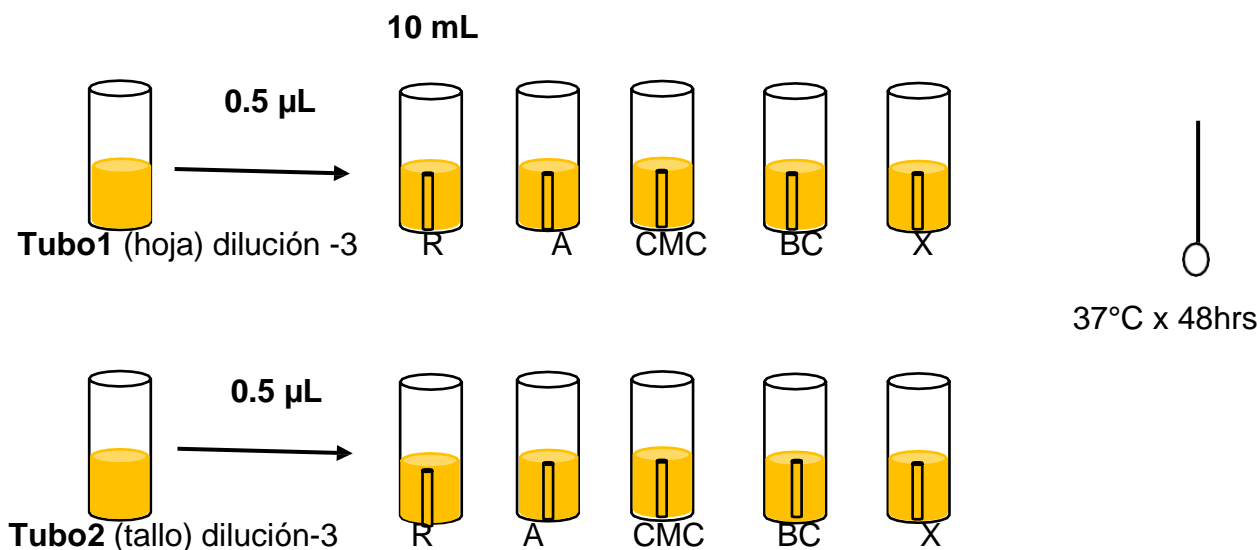


Fig.3 Siembra en caldo MRS.

Se observaron los tubos, realizando un estudio de distintas características: Crecimiento, producción de gas y color, se decidió trabajar con los tubos inoculados con el tallo ya que se presentaron crecimiento, mientras que los tubos inoculados con la hoja se observó crecimiento sólo en dos, y se decidió descartar.

Aislamiento

Haciendo uso de un asa de platino se repicó de cada tubo con crecimiento evidente y se inoculó en placas de agar MRS, se incubaron en microaerobiosis a 35°C por 48 horas, (Ver **Fig.4**) .Concluido el tiempo de incubación se observaron las placas y se seleccionaron 3 colonias de cada una (colonias que presentaran las características macroscópicas propias del género *Lactobacillus*) (Ver **Tabla 2.**) y se subcultivaron, fueron repicadas en agar MRS (Ver **Fig.5**), mediante la técnica de agotamiento en cuatro cuadrantes e incubadas en microaerobiosis a 35°C durante 24 horas.

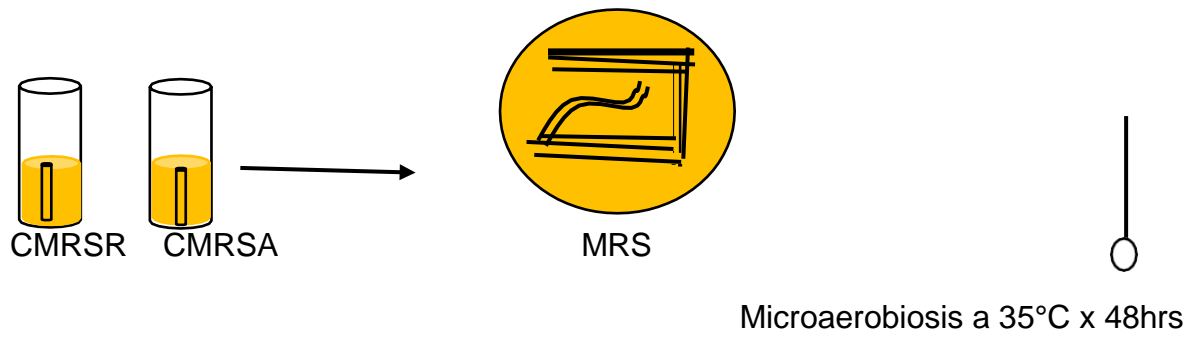
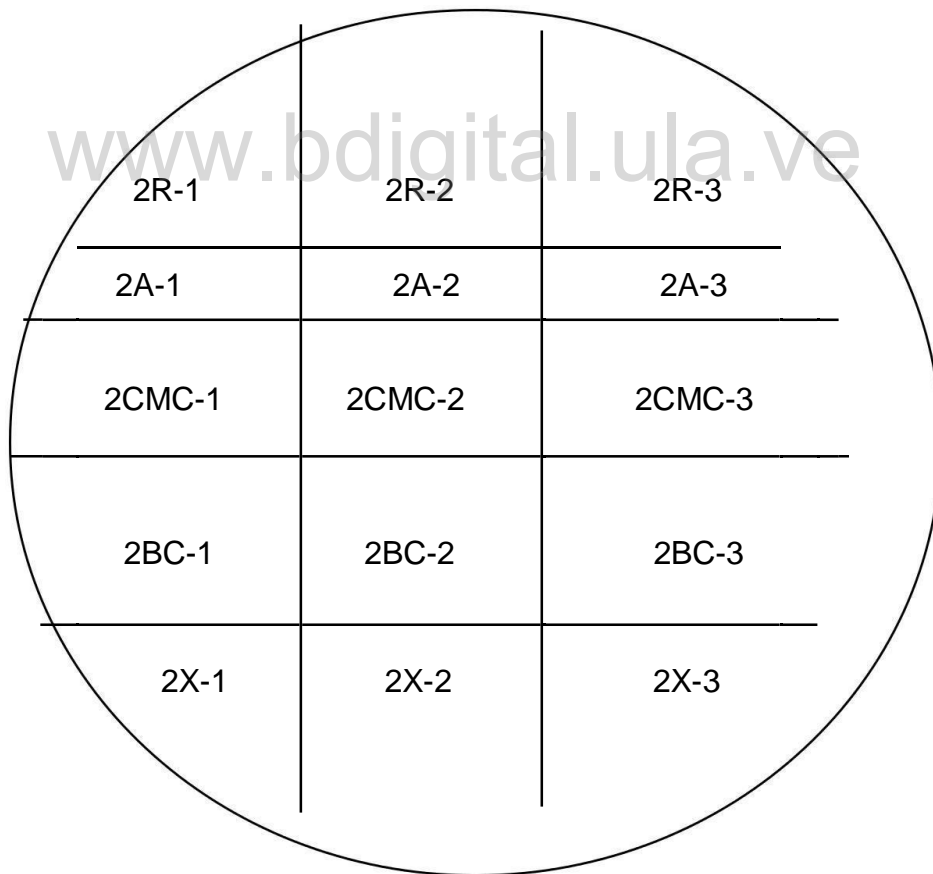


Fig.4 Siembra en Agar MRS.

Fig.5 Repique de la placa sembrada en un nuevo agar para conservación.



Pruebas Bioquímicas y Fisiológicas

Prueba de Gram y Catalasa

Se observaron las características macroscópicas de las colonias y las características morfotintoriales utilizando la tinción de Gram, así como también se realizó la prueba de la catalasa. (Ver **Fig.6**).

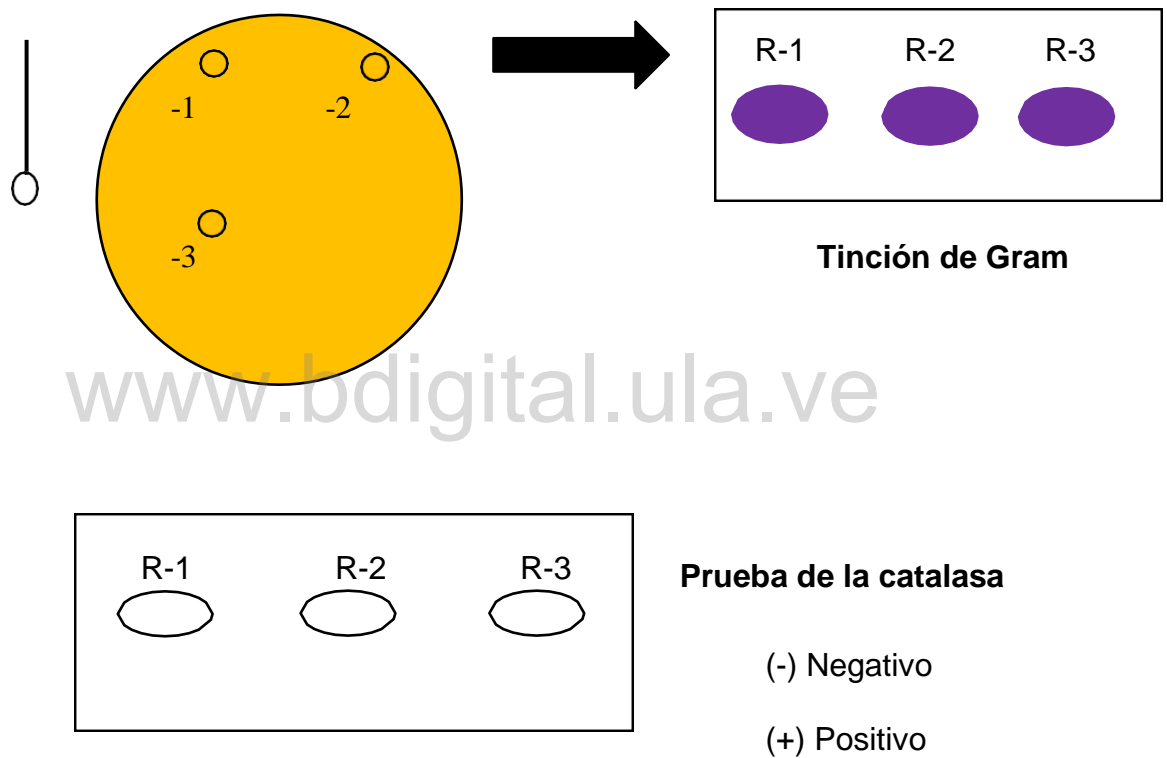


Fig.6. Prueba de Gram y Catalasa.

Curva de crecimiento bacteriano

Se inoculó cada cepa en 30 mL de caldo MRS, con la finalidad de reactivarlas, dichos tubos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente fueron centrifugados a 8000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y con el sedimento bacteriano se prepararon suspensiones en solución salina fisiológica estéril (SSFE) ajustadas al patrón Mc Farland 1×10^8 UFC/mL. A partir de cada suspensión, se tomaron 30 μ L y se inocularon en 3 mL de caldo MRS y se procedió a leer la densidad óptica de cada suspensión de lactobacilos a 540nm en un espectrofotómetro, comenzando a leer en tiempo inicial T^0 . Se realizaron medidas de densidad óptica cada hora hasta completar tres horas, después se realizaron medidas cada media hora (30 min), hasta las 24 horas. Los resultados obtenidos fueron transformados en UFC/mL, se calculó la tasa de crecimiento celular para el análisis estadístico hallando el número de generaciones, tiempo de generación y la velocidad específica de crecimiento haciendo el uso de las formulas respectivas.

Dónde:

_____ = número de generaciones

T= tiempo final

T^0 = tiempo inicial

_____ = tiempo de generación

Dónde:

_____ = tiempo de generación

N= número de microorganismos final

N^0 = número de microorganismos inicial

T= tiempo final

T^0 = tiempo inicial

Dónde:

μ = velocidad específica de crecimiento

N= número de microorganismos final

g= tiempo de generación

Pruebas de Acidificación en Leche

Se preparó leche en polvo completa para estudiar la capacidad acidificante que tienen los lactobacilos:

12 Cucharadas de leche \longrightarrow 900 mL de Agua destilada

2 Cucharadas de leche: X \longleftarrow 150 mL de Agua destilada

En un cilindro graduado se mezclaron 150 mL de agua destilada y 2 cucharadas de leche en polvo, y se prepararon 15 tubos de ensayo con 10 mL de leche. Se tomaron 100 μ L de la suspensión bacteriana 1 Mc Farland y se inocularon en la leche, los mismos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas. Se midió el pH con un pHmetro, la capacidad de cuajar la leche antes y después de ser agitado el tubo (si presentaba formación de coágulo se agitaba por 15 segundos y se observa nuevamente) y la captación de producción de olores (se agita el tubo, se destapa y se percibe el olor) y caracterizarlos por olores conocidos (se diferenciarán los aromas percibidos por el olfato).

Sistema estadístico

El análisis se efectuó a través de la estadística descriptiva. Además, se determinó el número de elementos en estudio ubicándolos en un mismo intervalo para hacer el cálculo de la frecuencia, y una vez determinada la frecuencia, calcular el porcentaje a cada uno en función de la sumatoria de la

misma. De allí, que toda la información se resumió en tablas y gráficos, para obtener una información concisa y fundamentada.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Tabla 3. Visualización macroscópica en su indicador color, crecimiento y producción de gas de las muestras.

	1: Hoja			2: Tallo		
	Color	Crecimiento	Gas	Color	Crecimiento	Gas
CMRS	Ao	Positivo	Negativo	Ac	Positivo	Negativo
CMRSR	Ac	Negativo	Negativo	Ac	Positivo	Negativo
CMRSA	Am	Negativo	Negativo	Ac	Positivo	Negativo
CMRSCMC	Ao	Positivo	Negativo	Ao	Positivo	Negativo
CMRSBC	Os	Negativo	Negativo	Ac	Positivo	Negativo
CMRSX	Os	Negativo	Negativo	Os	Positivo	Negativo

Fuente: Elaboración propia de la autora.

Color: **Ao:** Amarillo oscuro; **Ac:** Amarillo claro; **Am:** Amarillo medio; **Os:** Oscuro.

Crecimiento: **(Negativo)** No hay crecimiento; **(Positivo)** Si hay crecimiento.

Gas: **(Negativo)** No hay producción de gas; **(Positivo)** Si hay producción de gas.

En relación a los resultados obtenidos se pudo evidenciar que en la muestra de la hoja de caña de azúcar inoculada en caldo MRS y en caldo MRS con sustitución de dextrosa por carboximetilcelulosa, presentaron crecimiento positivo al igual que todas las muestras inoculadas del tallo, en cuanto a la producción de gas ninguna muestra lo produjo.

Tabla 4. Características fenotípicas de los aislados de Lactobacilos.

Cepa		Gram	Catalasa
MRSR	R-1	Bacilos y cocobacilos Gram positivos dispuestos en cadena.	Negativo
	R-2		Negativo
	R-3		Negativo
MRSA	A-1	Bacilos Gram positivos dispuestos en cadena.	Negativo
	A-2		Negativo
	A-3		Negativo
MRSCMC	CMC-1	Bacilos Gram positivos dispuestos en empalizadas.	Negativo
	CMC-2		Negativo
	CMC-3		Negativo
MRSBC	BC-1	Bacilos y cocobacilos Gram positivos dispuestos en cadena.	Negativo
	BC-2		Negativo
	BC-3		Negativo
MRSX	X-1	Bacilos Gram positivos dispuestos en empalizadas.	Negativo
	X-2		Negativo
	X-3		Negativo

Fuente: Elaboración propia de la autora.

Mediante la selección de tres cepas de cada placa inoculada se mantuvo la uniformidad en las características fenotípicas, como: tipo colonial, tinción de Gram y catalasa, donde arrojaron como resultados para las cepas MRS,R: R1, R2 y R3 bacilos y cocobacilos Gram positivos dispuestos en cadena y una catalasa negativa.

En cuanto a las cepas MRS, A: A1, A2, A3 se observaron bacilos Gram positivos dispuestos en cadena y catalasa negativo, sin embargo en las cepas MRS, CMC: CMC1, CMC2, CMC3, se observaron bacilos Gram positivos dispuestos en empalizadas y catalasa negativo. Por otro lado, las cepas MRS, BC: BC1, BC2, BC3 se observaron bacilos y cocobacilos Gram positivos dispuestos en cadena y catalasa negativo, y en las cepas MRS, X: X1, X2, X3 se observaron bacilos Gram positivos dispuestos en racimo y catalasa negativo.

Tabla 5. Número de generaciones, tiempo y velocidad de crecimiento de cada cepa en estudio en placa MRS.

CEPA	NÚMERO DE GENERACIONES	TIEMPO DE GENERACIÓN EN HORAS	VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO EN R , A, CMC, BC,X μh^{-1}
R-1	711251590	1,68	$5,77 \times 10^{-3}$
R-2	366866811	3,27	$6,43 \times 10^{-10}$
R-3	385069205	3,11	$6,54 \times 10^{-10}$
A-1	394645974	3,04	$6,95 \times 10^{-10}$
A-2	367464725	3,26	$6,65 \times 10^{-10}$
A-3	389855455	3,07	$6,12 \times 10^{-10}$
CMC-1	406567701	2,95	$6,46 \times 10^{-10}$
CMC-2	330528914	3,63	$7,29 \times 10^{-10}$
CMC-3	445059568	2,69	$5,11 \times 10^{-10}$
BC-1	434206019	2,76	$5,81 \times 10^{-10}$
BC-2	401980487	2,98	$5,86 \times 10^{-10}$
BC-3	364404578	3,29	$6,97 \times 10^{-10}$
X-1	402097650	2,98	$5,91 \times 10^{-10}$
X-2	460311719	2,6	$5,09 \times 10^{-10}$
X-3	427995531	2,8	$5,48 \times 10^{-10}$

Fuente: Elaboración propia de la autora.

En relación a las cepas con mejor comportamiento fueron R-1, X-2 Y CMC-3 debido a los valores encontrados en tiempo de generación medido en horas con una velocidad específica de crecimiento mayor que los demás aislados.

Tabla 6. Cambios físicos y químicos observados en la leche.

Cepa	Coagulación	Coagula DA	Olor	Característica	pH
R-1	-		*	Q	4,8
R-2	-		*	Q	5,2
R-3	-		*	Q	5,1
A-1	++		*	Y	4,9
A-2	++		*	Q	4,8
A-3	++	X	*	Y	4,8
CMC-1	++++	X	*	Y	4,6
CMC-2	+		**	Y	4,6
CMC-3	+		**	Y	4,8
BC-1	-		*	Y	5,1
BC-2	+		**	Y	4,6
BC-3	++		**	Y	4,8
X-1	-		*	Q	5,1
X-2	++++		*	Y	4,8
X-3	+		*	Y	4,8

Fuente: Elaboración propia de la autora.

Coagulación: (-) no hay formación de coágulo; (+): baja formación de coágulo, (++) Media formación de coágulo, (+++), Alto formación de coágulo, (++++), muy Alto formación de coágulo.

Coagula después de agitación: (X) coagulación después de agitación

Olor: (*) escaso olor (**) abundante olor

Característica: (Q) queso; (Y) yogurt.

En las cepas R1, R2, R3 no hubo formación de coágulo, ni antes y ni después de la agitación, presentaron escaso olor característico al queso, arrojando un pH R1 igual a 4,8; R2 a 5,5; y R3 a 5,1. Las cepas A1, A2, A3 coagularon medianamente antes de agitación, sin embargo la A1 y A2 no coagularon posterior a la agitación. La Cepa A3 coaguló posterior a la agitación, de igual manera todas las cepas presentaron escaso olor y características y pH diferentes: la A1 yogurt, pH de 4,9; A2 queso, pH 4,8; A3 yogurt, pH 4,8.

En cuanto a la cepa; CMC1 presentó muy alta formación de coágulo antes de la agitación, y después de la agitación, con escaso olor característico a yogurt y pH de 4,6. En la CMC2 se observó una baja formación de coágulo antes de la agitación, con abundante olor característico a yogurt y un pH de

4,6. CMC3 presentó baja formación de coágulo antes de agitación, abundante olor característico a yogurt y un pH de 4,8.

En la cepa BC1, no hubo formación de coágulo, ni antes ni después de agitación, presentando un escaso olor característico al yogurt y un pH de 5,1. Para BC2, hubo baja producción de coágulo antes de la agitación, abundante olor característico a yogurt y pH de 4,6. En BC3, se formó medianamente coágulos antes de la agitación, con abundante olor característico a yogurt y un pH de 4,8.

En la cepa X1; no hubo formación de coágulo ni antes ni posterior a la agitación, escaso olor característico a queso y un pH de 5,1. En X2; arrojó muy alta formación de coágulo antes de agitación, con escaso olor característico a yogurt y un pH de 4,8. Y en X3; hubo baja producción de coágulo antes de agitación, escaso olor característico a yogurt y pH de 4,8.

www.bdigital.ula.ve

DISCUSIÓN

Basados en los objetivos planteados en la presente investigación se realizó una discusión tomando en consideración los resultados obtenidos y los trabajos relacionados disponibles, tal como se explica a continuación:

En relación al aislamiento de cepas de *Lactobacillus*, Rocha *et al.* (2009) aislaron a partir de un ensilaje de *Saccharum officinarum*, bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* que luego de su identificación resultó ser *Lactobacillus buchneri*, la cual fue utilizada para procesos de ensilaje como inoculante unitario o combinado. Por su parte Silva *et al.* (2008) aislaron *Lactobacillus buchneri* a partir de silajes de caña de azúcar con la finalidad de inocularlo en silos para mejorar la calidad del ensilaje, lamentablemente en este trabajo no se pudo llegar hasta la identificación de los lactobacilos aislados.

En lo concerniente a las características fenotípicas de los *Lactobacilos* mediante la tinción de Gram y Catalasa, se encontraron bacilos y cocobacilos Gram positivos y catalasa negativa, con buen crecimiento en medio MRS a las 24 y 48 horas de incubación, estos resultados concuerdan con los de Ávila *et al.* (2010) y con los obtenidos por Alvarado en el 2009 al aislar y caracterizar muestras vegetales. La prueba de catalasa de las cepas fueron negativas, característica general del género *Lactobacillus*, y concuerda con Martín *et al.* (2009) al igual que en el presente trabajo, donde todas las cepas cumplieron con estas características.

En el comportamiento del *Lactobacillus* en leche, se pudo evidenciar que las cepas aisladas provocan cambios tecnológicos que pueden ser de interés para la elaboración de productos alimenticios como yogures y quesos, lo que se compara con estudios realizados por Alicia Hernández *et al.* (2008), donde clasifican los lactobacilos para la producción de quesos y yogures, tomando en cuenta pruebas de pH, los resultados obtenidos en la capacidad acidificante en leche demostró que cada cepa presenta hallazgos diferentes,

la opción de seleccionar la cepa por formación de coágulo antes o después de agitación, producción de olor característico ya sea de queso o yogurt, así como también la disminución del pH. Estos hallazgos muestran relación con nuestro estudio ya que las 15 cepas aisladas presentaron características similares al queso y al yogurt.

Con respecto al número de generaciones, tiempo y velocidad de crecimiento, se observó un buen desarrollo de las distintas cepas seleccionadas R1, R2, R3, A1, A2, A3, CMC1, CMC2, CMC3, BC1, BC2, BC3, X1, X2, X3, cumpliendo con un criterio importante como es el hecho de que presenten niveles superiores a 10^7 UFC/mL (FAO/WHO, 2001). En este sentido, Ávila aisló *Lactobacillus plantarum* a partir de pastos para ensilaje, los cultivos crecieron alcanzando una población de 10^7 UFC / mL, lo cual es significativo dado que en el presente trabajo las cepas cumplieron con esta condición.

En relación al aislamiento de cepas de *Lactobacillus* mediante el uso de medios MRS y tubos Durham, se logró el aislamiento de cepas homofermentadoras en las muestras de tallo, lo que resulta ser positivo para Ávila *et al.* (2013) y Carvalho *et al.* (2013) quienes aislaron diferentes cepas de caña de azúcar y compararon los resultados obtenidos utilizando cepas homofermentadoras y heterofermentadoras, concluyendo que las primeras resultaban en menores pérdidas de materia seca y mayor producción de ácido láctico lo cual es muy beneficioso para obtener un ensilaje de calidad.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Se obtuvieron 15 cepas de *Lactobacillus spp* a partir del tallo de la caña de azúcar. Las cepas aisladas cumplieron con las características morfológicas y hallazgos en pruebas preliminares propias del género *Lactobacillus*.

Se observaron importantes cambios tecnológicos en la leche que pudieran sugerir el uso de estos microorganismos como cultivos iniciadores para la elaboración de productos de ensilaje o alimentos, las cepas que presentaron mejor olor CMC-2, CMC-3, BC-2, y BC-3, siendo esta característica una de las propiedades biotecnológicas utilizables para suplementar alimentos lácteos o con propiedades organolépticas agradables a los consumidores; las cepas que presentaron formación de coágulo muy alto fueron CMC-1 y X-2, siendo esta característica una de las propiedades biotecnológicas utilizables para suplementar la fabricación de quesos o yogures.

De acuerdo a los parámetros evaluados, las 15 presentaron colonias superiores a 10^7 UFC/mL, sin embargo las cepas con mejor comportamiento fueron R-1, X2 y CMC-3 debido a los valores hallados a partir de los datos: número de generaciones, tiempo de generación y la velocidad específica de crecimiento, se debe a que crecen con mayor rapidez en menor tiempo de generaciones.

Recomendaciones

En vista de los resultados que se han obtenido en el presente estudio, en esta sección se presenta una serie de recomendaciones para la realización de estudios similares sobre la presencia de *Lactobacillus spp* en caña de azúcar.

1. Identificación del género y especie de las cepas conservadas mediante la ejecución de galerías API y por Biología Molecular.
2. Continuar el estudio mediante la aplicación de las pruebas de motilidad, acidez gástrica, actividad antimicrobiana, antagonismo y adherencia a la mucosa, que permitan completar los requerimientos para que las cepas aisladas y conservadas sean clasificadas como cepas probióticas.
3. Estudiar diferentes géneros de bacterias presentes en la caña de azúcar, en busca de posibles propiedades biotecnológicas, agroindustriales, farmacéuticas, cosméticas y probióticas.

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Alvarado, C., y Díaz, C. (2009 a). **Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera**. Revista de la Facultad de Farmacia, 51(1), 8-14.
- Alvarado, C., y Díaz, C. (2009 b). **Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera**. RESPYN: Revista Salud pública y Nutrición, 10(1).
- Arias, F. (2009). **El proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica**. (5ta ed.). Caracas, Venezuela: Editorial Espíteme.
- Ávila, J.; Ávila, M.; Tovar B.; Brizuela, M.; Perazzo, Y; y Hernández, H. (2010). **Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja**. Revista Científica (Maracaibo), 20 (2), 161-170.
- Balestrini (2006), **Como se elabora el proyecto de investigación**. Caracas. Consultores asociados, BL servicio editorial.
- Bergey (2001), **Manual of Determinative Bacteriology has been a major work** of reference on bacterial classification for more than 50 years.
- Bergey (2001), **Manual of Systematic Bacteriology**. Segunda edición. Garrity, G.M. y otros (eds.). Springer. 2001 (volumen 1).
- Bioenciclopedia (2015). Caña de azúcar. Consultado el 7 de junio de 2019, desde la web: <https://www.bioenciclopedia.com/cana-de-azucar/>
- Castellano et al. (2008), **A Review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina**. Meat Sci. 79(3):483-499.
- Cogan et al. (1997), **Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa**. Revista Cubana Aliment Nutr; 16(1):63-8.

- Contreras, Domínguez, González, González (2007), **Proceso de biotransformación láctica del jugo de Aloe vera**. Tecnol. Ciencia. Recuperado de <http://www.imiq.org/documentos/8102007133343.pdf>
- Corbo MR, Bevilacqua A, Petruzzi L, Casanova FP, **Sinigaglia M. Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods**. Compr Rev Food Sci Food Saf 2014; 13(6):1192-1206.
- Delgado (2005), **Selección de cepas de bacterias lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probiótica**. La Habana, Cuba: Universidad de la Habana, 2005. Tesis Doctoral.
- Ecured (s.f.). Caña de azúcar. Consultado el 7 de junio de 2019, desde: https://www.ecured.cu/Ca%C3%B1a_de_az%C3%BAcar#Morfolog.C3.ADa_de_la_planta
- Ferreira et al., (2007), **Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales**. Ciencia e Investigación, v.6, n.1, p.30-35, 2007.
- Ferrari, C, 2015, Ensilaje, Centro Regional Chaco Formosa, EEA Sáenz Peña, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, Gobierno de Argentina.
- FAO/WHO (2001) **Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Acid Bacteria**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina.
- Garcés Molina, A. M., Berrio Roa, L., Ruiz Alzate, S., Serna de León, J.G. y Builes Arango, A.F. (2014). Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. *Revista Lasallista de Investigación*, 1(1), 66-70.
- García MD & Uruburu F (2000) **La conservación de cepas microbianas**. SEM 30: 12-16.
- González, Cuello, Pérez y Morón, (2015), **Bacteriocinas de probióticos**. Revista Salud Pública y Nutrición, v.4, n.2, p.99-106.
- Hernández, Fernández y Baptista (2003), **Metodología de la Investigación cuantitativa** 2da Edición. Mc Graw Hill México.

- Hernández, Fernández y Baptista (2006), **Metodología de la Investigación Cuantitativa. Sexta Edición**. Editorial Mc Graw- Hill. México.
- Hernández, Fernández y Baptista (2010), **Metodología de la Investigación Cuantitativa. Sexta Edición**. Editorial Mc Graw- Hill. México.
- Hernández, A., Alfaro, I., Arrieta, R., **Microbiología industrial** .Editorial Universidad Estatal a Distancia, 2008.
- Kandler, O., N. Weiss, 1(986).**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Eds), Vol. 2, Baltimore: Williams and Wilkins, 1209 – 1234.
- Kandlery Weiss (1986), **Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria**.
Antonie van Leeuwenhoek. 3. Microbiol. Serol. 42: 209-224.
- Kandlery Weiss, (1986), **Regular, Nonsporulating Gram-positive Rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 1. ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1986. 1235p.
- Kirjavainen, P y col (2003), **Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses**. J. Ferment. Bioeng. 79(5):449-452.
- Kung Jr. & Stanley, (1982), **Probiotics: an overview of beneficial effects**.
Antonie Van Leeuwenhoek, v.82, n.1-4, p.279-289,
- Lee y Salminen y Cols (1995), **The coming age of probiotic**. Trends in Food Sci. Techn. 6:241-245.
- McDonald et al., (1991). **Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora**, Reseña. Córdoba, Colombia: Universidad de Córdoba.
- Neto, Nussio, Zopollatto, Junges y Wosniak (2009), **Silo de maíz o de caña de azúcar con Lactobacillus buchneri exclusivamente o en combinación con L. plantarum**. Trabajo de Grado no Publicado.
- Nussio et al., (2003), **Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena**. Revista Mexicana de Ingeniería Química, v.3, n.2, p.181- 191,

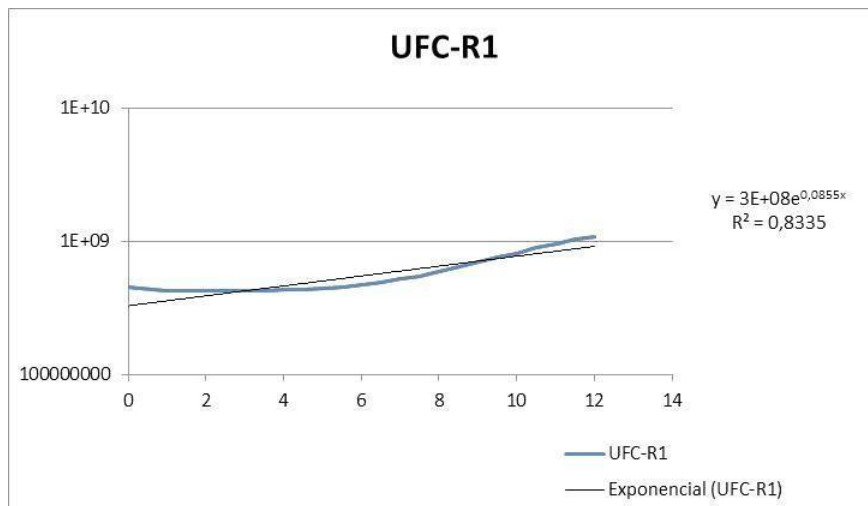
- Palella y Martins (2006), **Metodología de la Investigación Cuantitativa**. FEDEUPEL Caracas.
- Prescott, Harley y Klein (2004), **Microbiología**. (5ta ed). Madrid, España: McGraw- Hill.
- Querra, R y col, (2005), **Obtención de Microorganismos Probióticos en un medio no láctico**. 166-175 (Colombia). Disponible desde internet en: <http://revistaing.uniandes.edu.co/pdf/Rev1917.pdf?ri=821d8c5b0c8193719707a9a8131daacc> (con acceso 04/02/19).
- Rocha, Pinto, Silva, y et al (2008), **Efecto de la adición de Lactobacillus sp., en el ensilado de caña de azúcar**. Trabajo de Grado no Publicado.
- Rodríguez y Col (2009), **Isolation of bovine intestinal Lactobacillus plantarum and Pediococcus acidilactici with inhibitory activity against Escherichia coli O157:H7**. JApplMicrobiol. 106 (2):393-401.
- Rosas-Flores, Ramírez, Salazar-Montoya, (2013), **Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud**. Revista Fuente, v.2,n.7, p.1-16, 2013
- Shimizu, (2014), **Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans**. Journal of Dairy Science, 66, 959–966.
- Silva Á, Pinto, Sugawara, Silva, Freitas (2008), **Calidad del silaje de caña de azúcar inoculada con una cepa de Lactobacillus buchneri** Trabajo de Grado no Publicado.
- Stiles M.E. & Holzapfel W., 1997. **Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy**. Int. J. Food Microbiol., 36(1), 1-29.
- Subirós Ruiz, F., (1995). **Cultivo de la Caña de Azúcar**. Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica.
- Timbuntam Siroth Tokiwa (2009). **Efectos de una cepa indígena y comercial de Lactobacillus buchneri sobre la calidad del ensilado de caña de azúcar**. Trabajo de grado no Publicado.

- Uruburu, (2003), ***Evaluación del potencial probiótico de Bacterias Ácido Lácticas para reducir el colesterol in vitro***. Scientia Agropecuaria. Vol.1 pp. 45 – 50
- Vargas, E.; Gómez, C.; Parra, M.; Romero, M. ***Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno*** (primera parte). Rev Ing. Univ. De los Andes, 2004.
- Villafranca (1996), ***Metodología de la Investigación Cuantitativa***. Panapo. Caracas.
- Zorrilla (1992), ***Guía para elaborar una Tesis***. México Mc-Graw-Hill.

www.bdigital.ula.ve

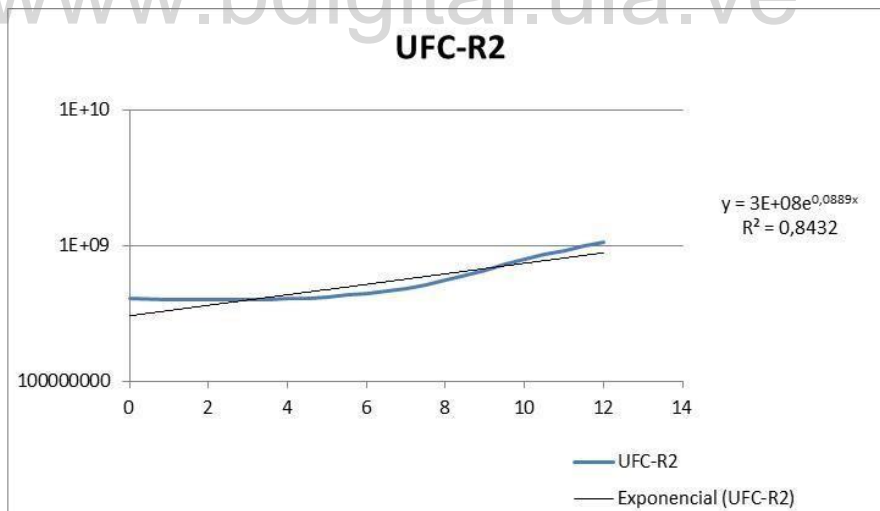
www.**ANEXOS**.ve

GRÁFICAS REALIZADAS

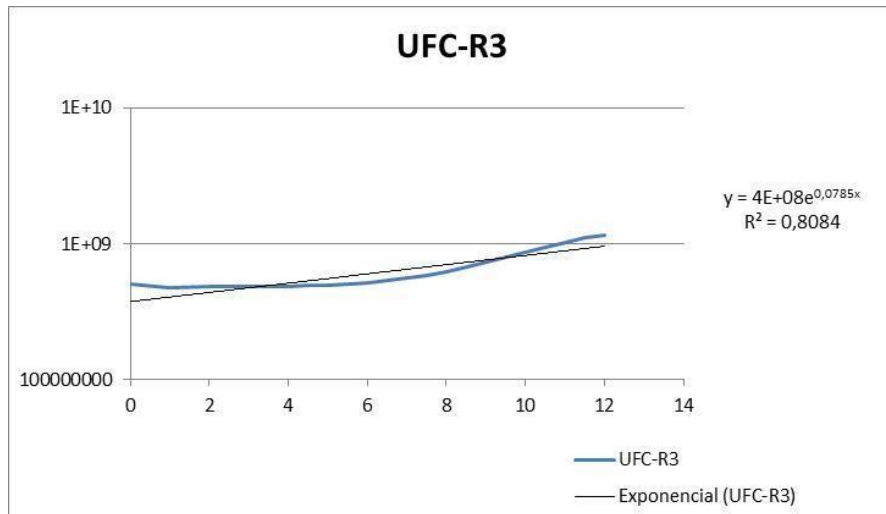


Gráfica #1. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSR-1) en medio MRS aislada de rafinosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.

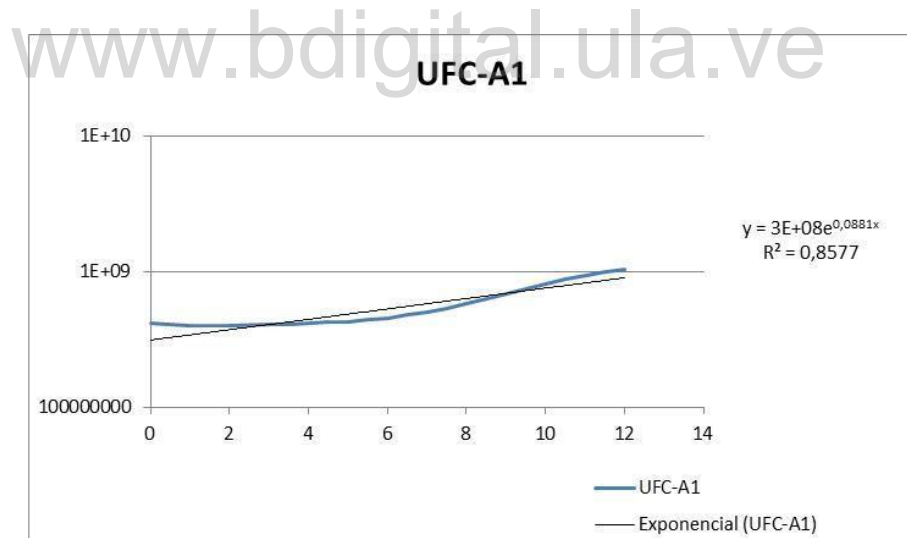
www.bdigital.ula.ve



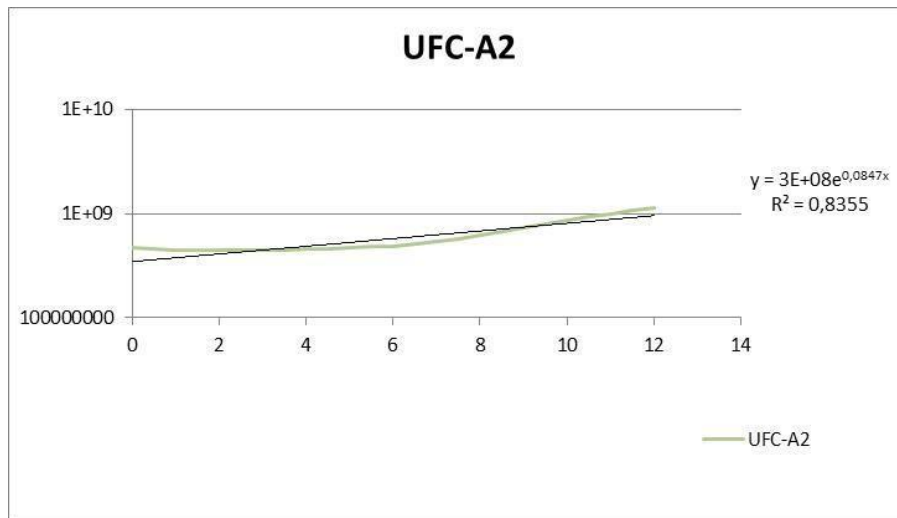
Gráfica #2. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSR-2) en medio MRS aislada de rafinosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



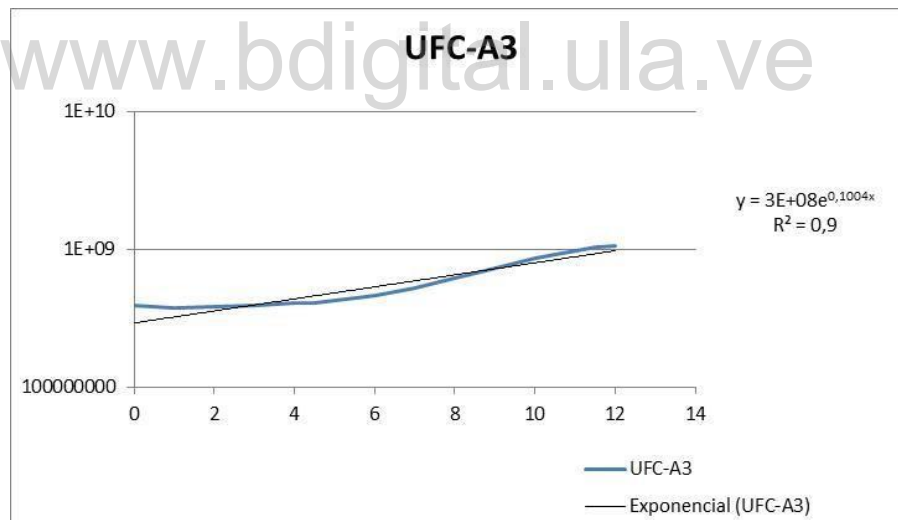
Gráfica #3. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSR-3) en medio MRS aislada de rafinosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



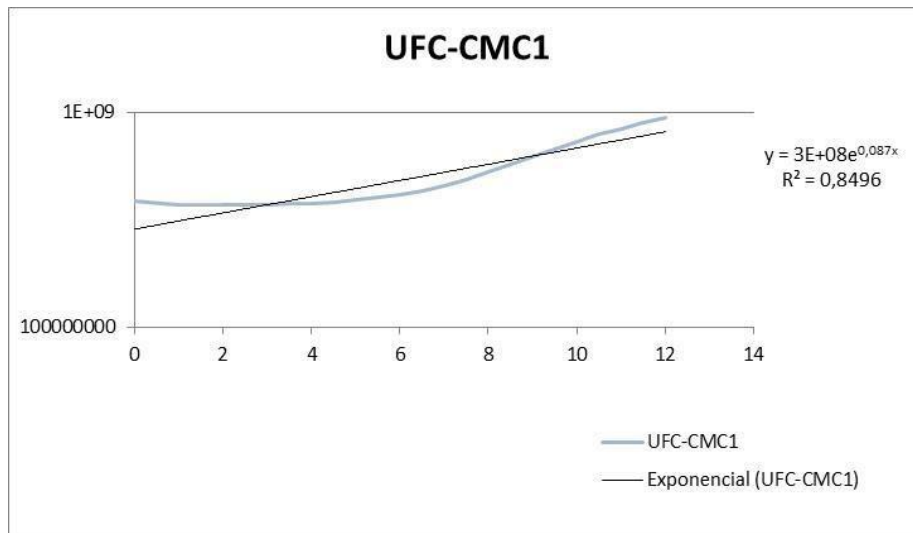
Gráfica #4. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSA-1) en medio MRS aislada de arabinosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



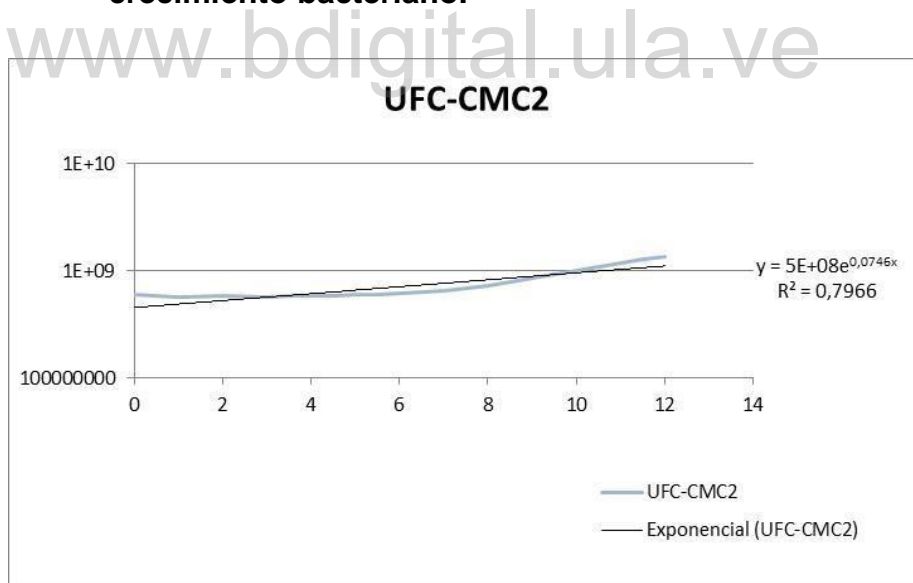
Gráfica #5. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSA-2) en medio MRS aislada de arabinosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



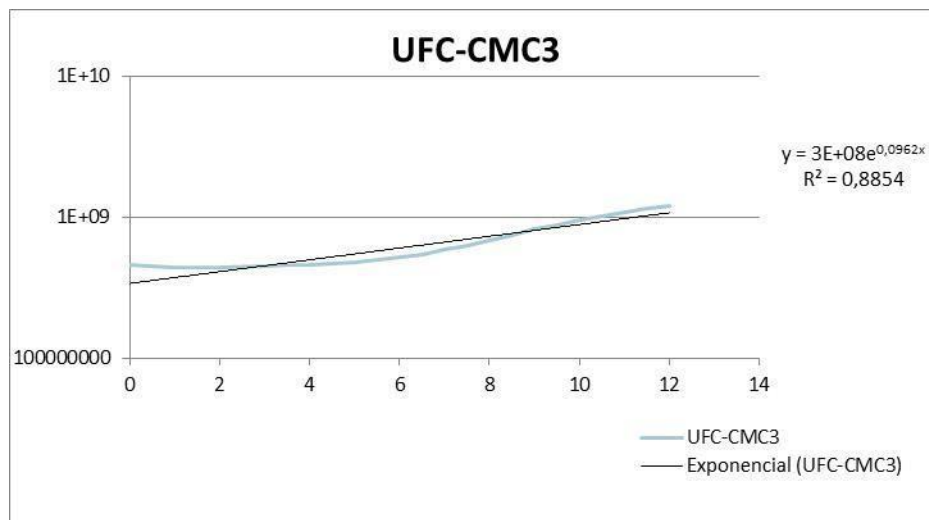
Gráfica #6. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSA-3) en medio MRS aislada de arabinosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



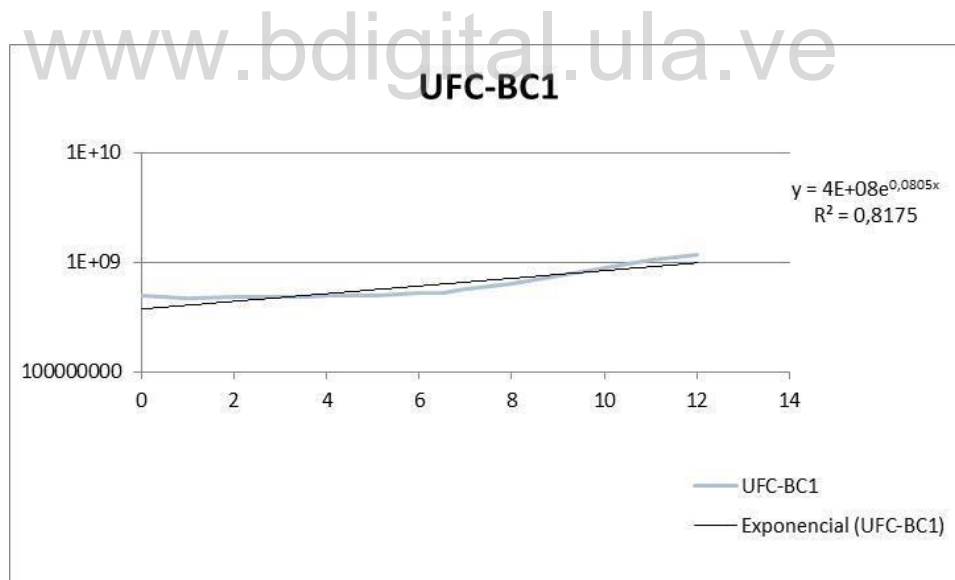
Gráfica #7. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSCMC-1) en medio MRS aislada de carboximetilcelulosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



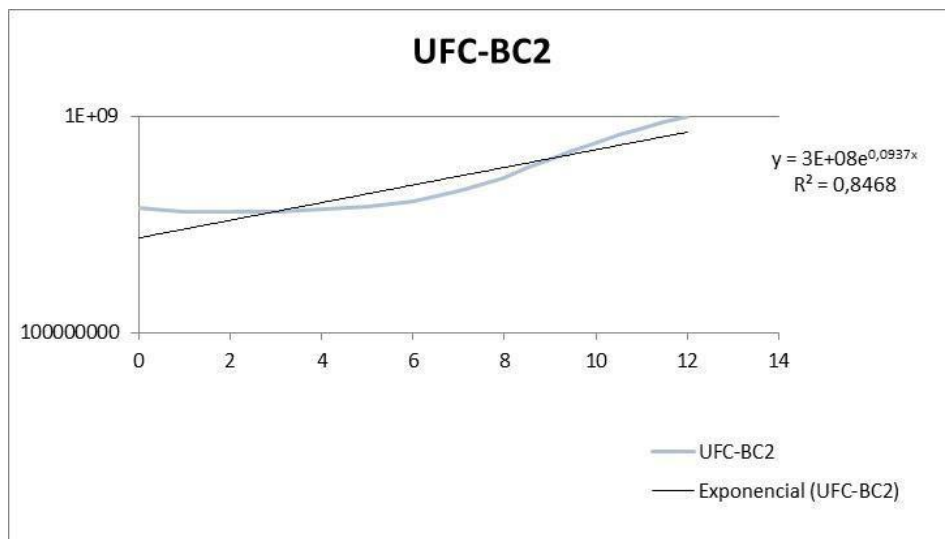
Gráfica #8. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSCMC-2) en medio MRS aislada de carboximetilcelulosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



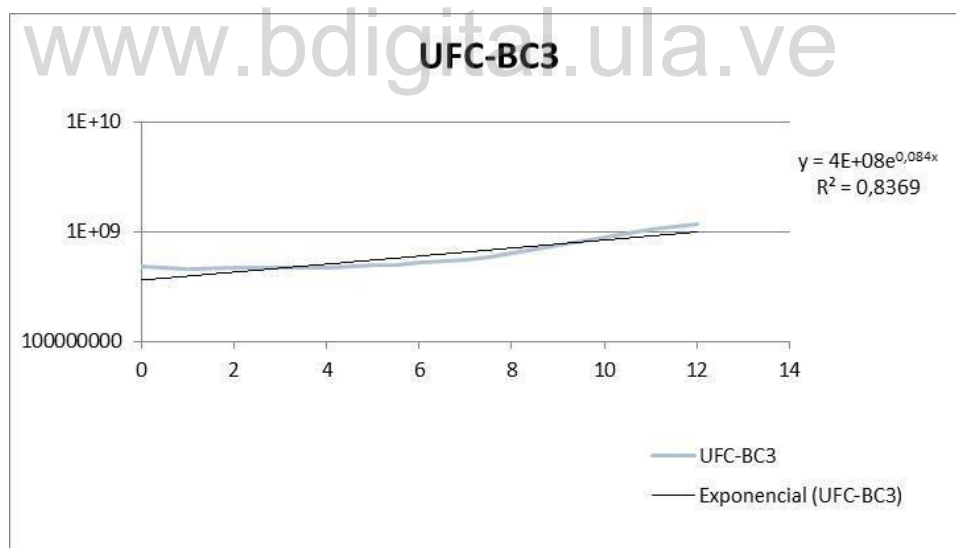
Gráfica #9. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSCMC-3) en medio MRS aislada de carboximetilcelulosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



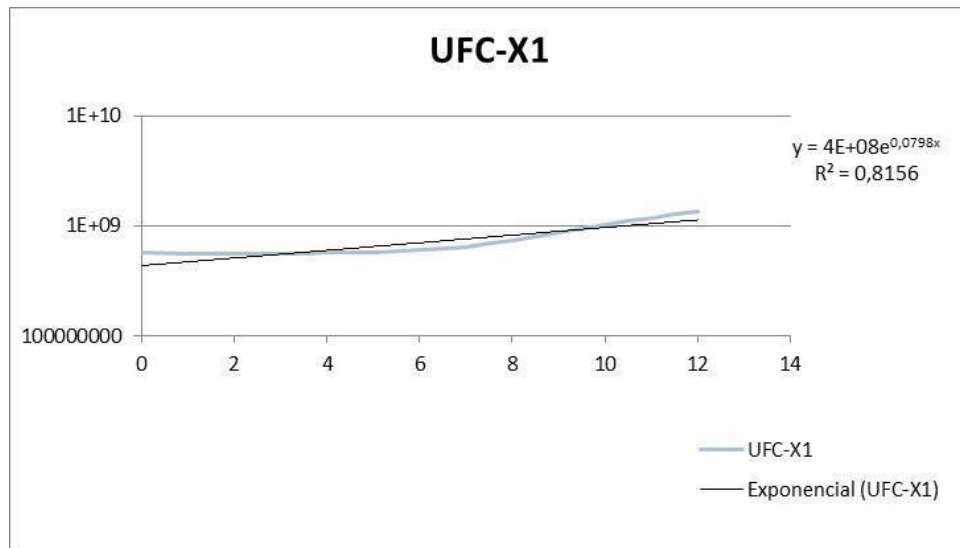
Gráfica #10. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSBC-1) en medio MRS aislada de bacteriocelobiosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



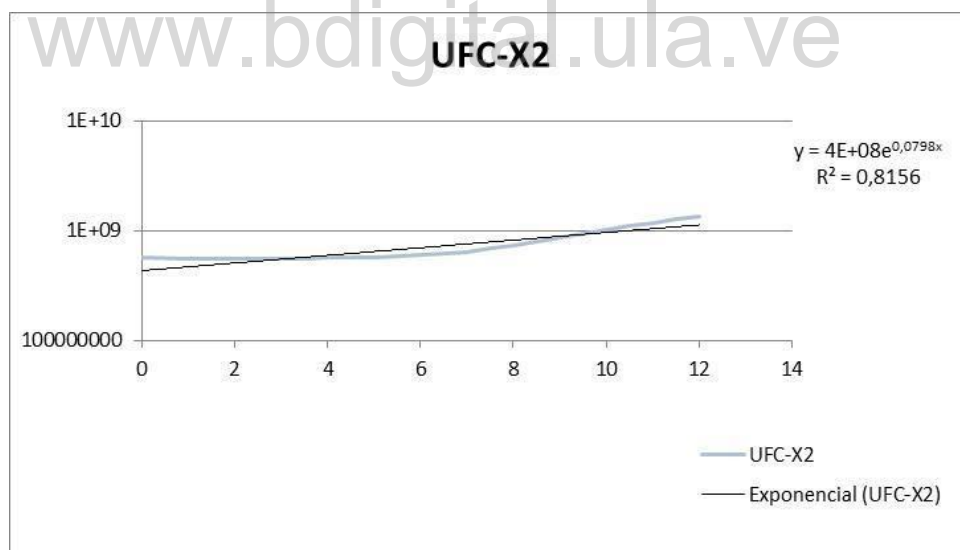
Gráfica #11. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSBC-2) en medio MRS aislada de bacteriolobiosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



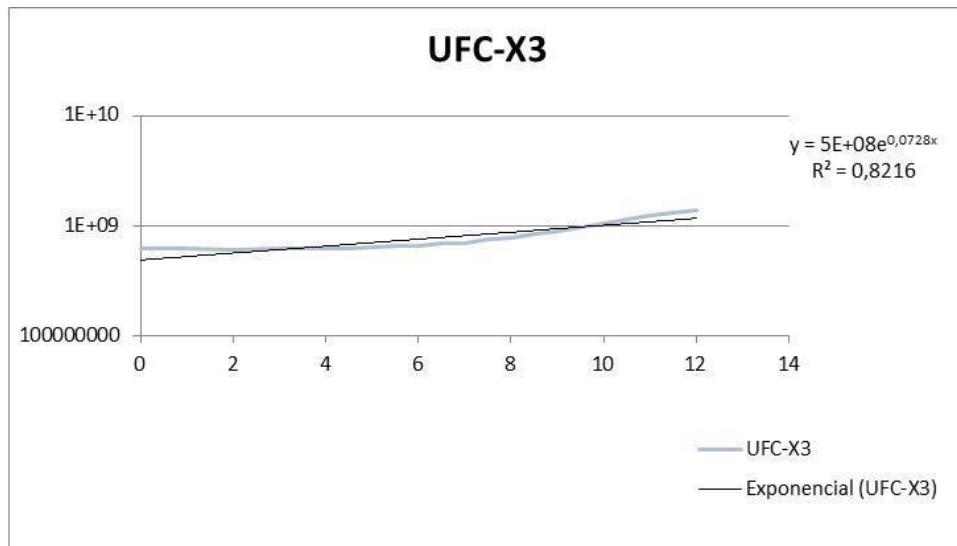
Gráfica #12. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSBC-3) en medio MRS aislada de bacteriolobiosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



Gráfica #13. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSX-1) en medio MRS aislada de xilosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



Gráfica #14. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSX-2) en medio MRS aislada de xilosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.



Gráfica #15. Representación gráfica del crecimiento de la cepa (MRSX-3) en medio MRS aislada de xilosa, se presenta en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en función del tiempo y a su vez se pueden observar las fases iniciales del ciclo de crecimiento bacteriano.

www.bdigital.ula.ve