

**IDENTIFICACIÓN Y RESISTENCIA A BIOCIDAS DE ESPECIES  
BACTERIANAS PREDOMINANTES EN JUGOS MEZCLADOS DE SEIS  
INGENIOS GUATEMALTECOS**

OSBEL NUÑEZ\*, CRISTINNE FABIÁN\*\* Y RODOLFO ESPINOSA\*\*\*.

OPTIMISA, *Universidad del Valle de Guatemala (UVG)* y *CENGICAÑA*

**RESUMEN**

Es necesario trabajar en varias direcciones para reducir el efecto negativo de la actividad microbiana en el proceso azucarero; una de ellas es la caracterización microbiológica de los jugos circulantes, especialmente el jugo mezclado. El objetivo de este estudio fue identificar las bacterias predominantes mediante la amplificación y secuenciación de su gen 16S ARN en 11 tándems pertenecientes a 6 ingenios del Departamento de Escuintla. Se identificaron 7 géneros, de los cuales se determinaron 5 especies. El hallazgo más interesante fue la identificación de *Weissellia confusa*, en lugar de *Leuconostoc mesenteroides* como lactobacilo dextranogénico en todos los jugos estudiados. En la susceptibilidad de las cepas identificadas hacia los biocidas utilizados en los ingenios se observó mayor resistencia en las bacterias gram-negativas y que los biocidas químicos fueron más efectivos que los biológicos. Se necesitan mayores concentraciones de biocidas para inhibir el crecimiento bacteriano que las que se usan actualmente en la industria azucarera, por lo que se recomienda establecer políticas y supervisión sistemática de la aplicación de los mismos para su uso adecuado.

\*Osbel Núñez, 18 Ave, 3-38, Zona 1, Ciudad Guatemala, Guatemala; osbelnu@gmail.com

\*\*Cristinne Fabián, 6ta. Ave. 3-22 Centro.Médico2, Oficina 906, Zona10,Guatemala;

tin\_fa@hotmail.com

\*\*\*Rodolfo Espinosa, Carretera al Pacífico, Km. 92.5, Escuintla; rodolfoe@consultant.com

## INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de la industria azucarera es extraer la mayor cantidad posible de sacarosa formada en la caña de azúcar y que esta se preserve hasta su purificación final, evitando que la sacarosa se pierda durante el proceso de extracción. La pérdida de sacarosa se debe principalmente a su degradación mediante la hidrólisis molecular o “inversión” que la convierte en glucosa y fructosa a causa de la actividad enzimática de la misma caña, por la degradación química alcalina o ácida o por los microorganismos presentes en el proceso, siendo ésta última la más problemática. (Mora, 1994; Zepeda, 2012). La degradación de sacarosa por microorganismos puede empezar desde el corte de la caña. Algunos autores reportan a las bacterias del género *Leuconostoc* y al grupo coliformes como los principales microorganismos consumidores de sacarosa (Egan y Rehbein, 1963; Hernandez, 1978; Duarte, 1982 ). Estas bacterias pueden causar pérdidas del 3-5% de sacarosa debido a las condiciones ideales en las etapas iniciales del proceso de extracción de azúcar (Eggleston, 2012). Conjuntamente con la degradación de azúcar existe evidencia que las bacterias del género *Leuconostoc* producen dextrana, polisacárido causante de grandes daños en toda la producción (Hernández, 1978). Los jugos de caña mezclados tienen mejores condiciones para que las bacterias proliferen –concentración de azúcares, temperatura, pH, presión osmótica y otras- y les provee mayor tiempo para su reproducción, a diferencia del jugo primario si este ingresa directamente a la clarificación (Serrano, 2006; Zepeda, 2012).

Actualmente los ingenios azucareros en Guatemala utilizan diferentes biocidas para controlar el crecimiento de la población bacteriana. Los biocidas se agregan constantemente en los jugos de caña mezclados, donde se ha determinado mayor población de bacterias (Antier, 1996). Los biocidas utilizados son inespecíficos y no es totalmente conocida la eficacia de su acción. Se han reportado casos dónde se observa bacterias resistentes a biocidas similares a los utilizados en la industria azucarera y la formación de biopelículas (Gilbert y McBain; 2003; Russel, 2003; Leather y Côte, 2008). El objetivo de este estudio fue identificar las bacterias mesófilas aerobias o facultativas predominantes en los jugos de caña mezclados, de seis ingenios guatemaltecos; y su susceptibilidad a cinco biocidas más comúnmente usados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Toma de muestra, inoculación y lectura.** Se realizaron tres muestreos durante la zafra 2012-2013 en los meses de Diciembre, Marzo y Abril, de cada tándem (11 tándems en total) en seis ingenios ubicados en el departamento de Escuintla, Guatemala. En un recipiente estéril se recolectó 250 cm<sup>3</sup> de jugo mezclado y seguidamente se realizó su inoculación en las instalaciones del propio ingenio en condiciones asépticas. Las inoculaciones se realizaron por el método de siembra en superficie en placas Petri, para lo cual cada muestra de jugo fue diluida en agua peptonada al 0.1% (Merck) hasta una dilución de 10<sup>-4</sup>. Se inoculó 0.1 cm<sup>3</sup> de las diluciones finales 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup>, en Agar de recuento en placa (APC), para la microbiota general y en un medio agarificado de prueba, originalmente concebido como selectivo y diferencial para *Leuconsotoc sp.* y que finalmente se le denominó Agar LBDG. Se realizó las observaciones de cada placa a las 24 y 48 horas luego de la incubación a temperaturas de 37°C y ambiente respectivamente.

**Selección y aislamiento de colonias bacterianas para identificar.** Se realizó una selección preliminar de patrones de colonias según sus características culturales y un estimado de la proporción de cada patrón. Se determinaron las características morfológicas y tintoriales (Gram) de un número de colonias proporcional a la distribución estimada del patrón, eligiéndose finalmente las más abundantes. También se utilizó como criterio de elección la repetición de las características en por lo menos 5 tándems o ingenios, aún cuando no fueran de las más abundantes en cada uno de ellos. (Chittrepol *et al.* 2008; López-Hontagas *et al.* 2007). Finalmente se obtuvo una colección de 20 bacterias reconocidas por su procedencia, características culturales, morfológicas y tintoriales.

**Identificación de cepas por ADN.** Se extrajo ADN de cada bacteria elegida. En 500uL de agua ultra pura se disolvió una colonia bacteriana y se colocó en un baño con agua hirviendo por 10 min. Luego se centrifugó por 10min a 3,000 rpm y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 500ul de agua ultra pura. Se comprobó la presencia de ADN por electroforesis en gel de 1% agarosa(Fisher, Grado Biol Mol) en 1X TBE teñido con gelred (BioRad) a 85v-100v/min; cada muestra contenía 1ul de colorante de carga (Invitrogen) y 2-5ul de ADN (Queipo-Ortuño *et. al* 2005; Sambrook *et. al* 2001)

**Amplificación de ADN.** Se realizó la amplificación del gen 16S por medio de la reacción en cadena de la polimerasa *-PCR-*. La reacción contenía 1X buffer con MgCl<sub>2</sub> 10X

(Invitrogen), 0.15mM de DNTp's (Invitrogen), 0.3uM de cada cebador, 1.25 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen), para un volumen final de 30ul. El programa del termociclador para la reacción fue la iniciación por 5min a 94°C, la elongación a 94°C, 55°C, 72°C por 45s cada uno con 35 repeticiones y la finalización a 75°C por 5 min. El producto de PCR fue cuantificado con una escalera molecular (NEB) mediante la comprobación de la amplificación por medio de electroforesis en gel, con las mismas condiciones previamente descritas. El cebador río abajo (*forward primer*) utilizado fue el 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' (Integrated DNA Technologies) (Frank et al. 2008) y el cebador río arriba (*reverse primer*) fue el 1078R 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3' (Integrated DNA Technologies). El producto de PCR tenía un tamaño de aproximadamente 1.0kb. El producto de PCR fue enviado sin purificar al laboratorio Macrogen, en Maryland (USA) el cual utiliza un secuenciador 3730XL (Applied Biosystems™) para su secuenciación. El producto fue secuenciado utilizando los mismos cebadores de la amplificación. La secuencia río abajo y río arriba obtenida se alineó con el software de acceso libre BLASTn® NCBI para determinar su integridad. La secuencia alineada luego fue comparada con la base de datos del software de acceso libre de My RDP (Ribosomal Data Base), que además de comparar la secuenciación del gen 16S de otras especies, también toma en cuenta la estructura secundaria de la proteína 16S, con la cual se pudo identificar a las bacterias hasta género, y en algunos casos especie cuando la similitud de la secuencia era mayor al 97% (Ward, 1998; Stackebrandt, et.al. 2002; Cole et. al 2009)

**Prueba de resistencia a biocidas.** Para determinar la susceptibilidad de cada cepa a los biocidas seleccionados, se utilizó como guía el “método estandarizado de prueba de susceptibilidad por disco, versión 8” de la sociedad británica de quimioterapia antimicrobiana, 2009 con algunas modificaciones. Los biocidas fueron obtenidos de los propios ingenios donde son utilizados de forma sistemática, y uno suministrado por su proveedor, y se identifican por su principio activo: carbamato, amina cuaternaria, Tiocianometiltio benzotiazol, Ácido beta y Polivinilrridona (povidone). Se inoculó una colonia de cada bacteria del mismo cultivo de agar nutritivo o Agar LBDG en agua peptonada al 0.1% y se comparó con un estándar de McFarland 0.5 para que todas tuvieran aproximadamente la misma concentración. Luego se tomó una alícuota de 100uL y se

dispersó en la superficie de placas Petri con APC o Agar LBDG según su aislamiento original. En cada caja inoculada se colocaron tres discos de papel filtro no. 2 (Whatman) de 6mm de diámetro, impregnados con 8ul de cada biocida a distintas concentraciones ( $10^1$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) y un cuarto disco con formaldehído  $10^{-1}$  (Merck) como control. Cada placa se incubó a 37°C por 24h y luego se midió el radio del halo de inhibición, desde la orilla del disco hasta donde empezó el crecimiento bacteriano más cercano

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Cuadro 1. Cepas identificadas hasta especie (98% de similitud) o género (con más de 85%), con especie más probable, de similitud genética del gen 16S y su procedencia.**

Especies	Procedencia	Géneros con especie más probable	Procedencia
<i>Enterobacter cloacae</i>	MagdalenaB	<i>Bacillus sp / amyloliquefacies o subtilis</i>	MagdalenaC, PantaleónAB
<i>Bacillus cereus</i>	Santa Ana B	<i>Bacillus sp/ thurigenis</i>	LaUnión A
<i>Staphylococcus sciuri</i>	Concepción	<i>Bacillus sp / pumilus</i>	La Unión A
<i>Bacillus pumilus</i>	Pantaleón B	<i>Microbacterium sp / paraoxydans</i>	Concepción
<i>Weissella confusa</i>	Magdalena, Santa Ana, La Unión, Pantaleón	<i>Klebsiella sp / pneumoniae o variicola</i>	Santa Ana A MagdalenaA
		<i>Pseudomona sp / aeruginosa</i>	Magdalena A

De las cepas aisladas y sometidas al proceso de amplificación de gen se lograron identificar 8 hasta especie y 9 hasta género, en algunos casos con la especie más probable. Como algunas se repitieron, se obtuvo finalmente 5 especies y 4 géneros más. Lo más significativo de este resultado es que el lactobacilo dextranogénico encontrado en todos los casos y, por ende seguramente predominante, no es *Leuconostoc mesenteroides* como han reportado la mayoría de los autores sino *Weissella confusa*, bacteria de la misma familia Leuconostocaceae con propiedades similares que puede confundirse con *L. mesenteoides*. Esta especie en los últimos tiempos ha sido objeto de diferentes estudios en los cuales ha sobresalido su capacidad para la formación de biopelículas y de excreción de bacteriocinas inhibitoras de otras bacterias. (Marchal, et.al ;Björkroth et. al 2006; Amari et. al 2012).

Las bacterias del género *Bacillus* y del grupo coliformes como *Klebsiella* y *Enterobacter* han sido repetidamente incluidas en descripciones previas de la microbiota de los productos azucareros. También se mencionan los géneros *Staphylococcus*, *Microbacterium* y *Pseudomona*, esta última de mucho interés por su amplia capacidad de mutar que la hace muy resistente a los agentes bactericidas.

Se encontró múltiple susceptibilidad para las cepas aisladas diferenciadamente según el tipo de biocida (figura 1). Es evidente que los productos químicos presentan una efectividad muy superior contra las bacterias aisladas y también que la susceptibilidad de las cepas a menores concentraciones del biocida disminuye drásticamente, resultando muy baja o nula en algunas cepas, a la concentración de 1 % (1000 ppm). En las cepas aisladas es también evidente que el biocida a base de carbamato es superior al resto de los químicos, siguiéndole en ese orden la amina cuaternaria y el tiocianometiltio benzitiazol, mientras que en los biológicos (según fabricante), el povidone es ligeramente superior al ácido beta.

*S. sciuri* y *Microbacterium sp.* son las cepas más susceptibles, tanto a los químicos, como a los biológicos. Las cepas del género *Bacillus* en general y *W. confusa* le siguen en la susceptibilidad, aunque con la singularidad de que en *Bacillus sp.* es mucho menor la susceptibilidad a los productos biológicos, mientras *W. confusa* es en comparación con las otras cepas aisladas, más sensible a los biocidas de origen biológico. Por otra parte, se pueden encontrar algunas diferencias entre las respuestas según el origen del biocida, como se muestra de forma ponderada en la figura 2. Atendiendo a sus características de coloración las bacterias Gram-negativo (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomona*) fueron las más resistentes lo que indicaría, de confirmarse en estudios posteriores esta tendencia, la necesidad de buscar productos que sean efectivos contra este grupo. Una consideración particular que debe hacerse para la susceptibilidad de las cepas de acuerdo con la concentración del biocida es que las concentraciones utilizadas en este estudio son superiores a las permitidas en la industria, y como ya se mencionó, se reduce la inhibición

Figura 1. Susceptibilidad de cepas a biocidas de prueba.

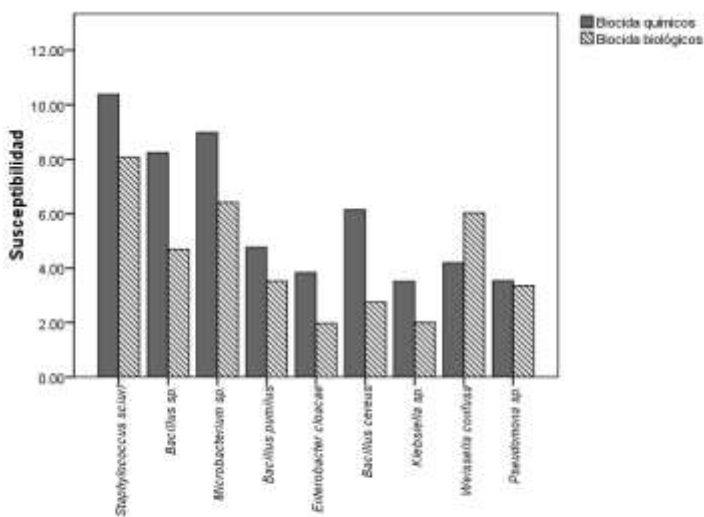
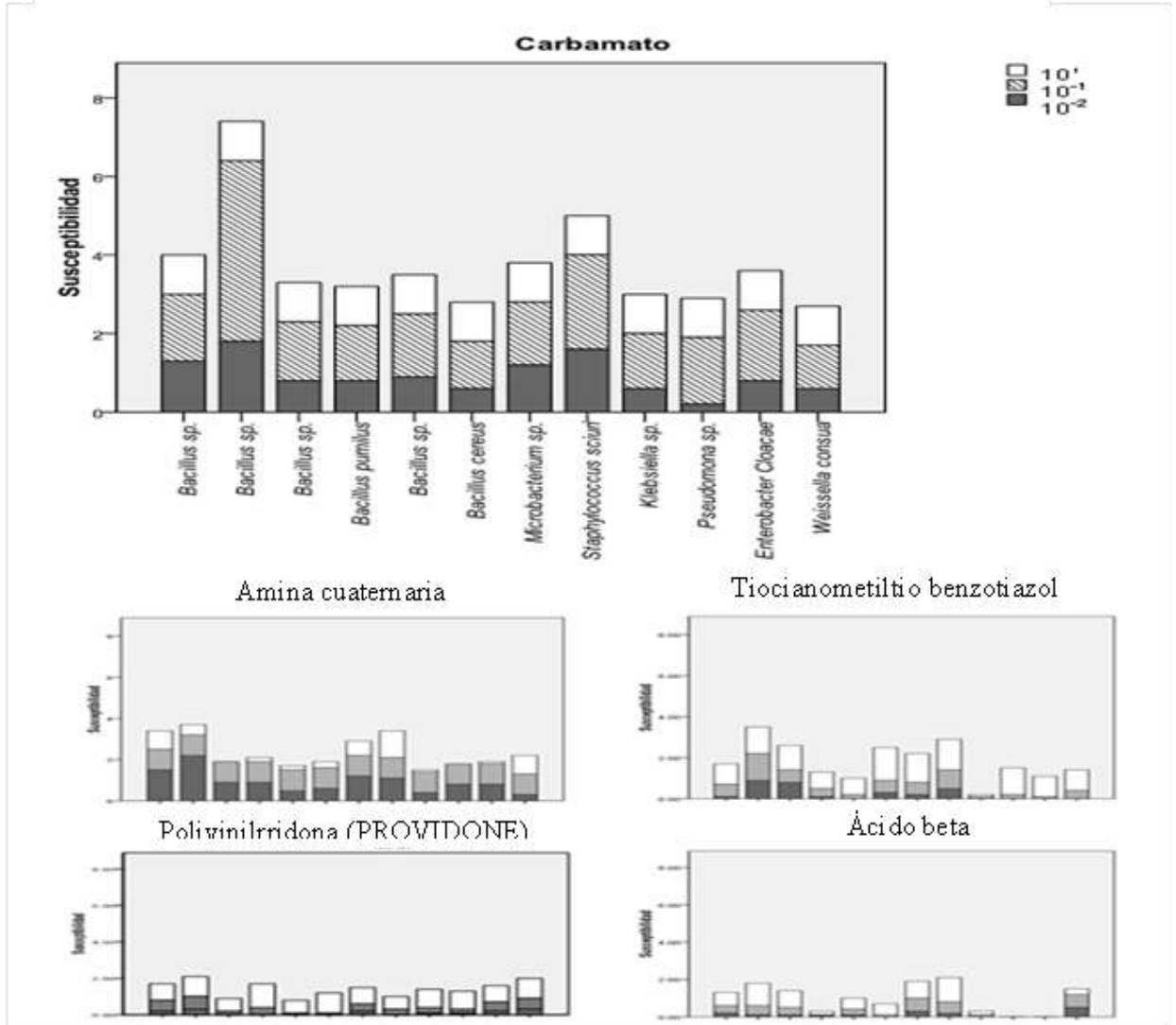


Figura 3 Susceptibilidad de las cepas aisladas a biocidas químicos y biológicos en uso o prueba

del crecimiento drásticamente a concentraciones menores. Si tomamos en cuenta que los productos químicos más efectivos tienen severas restricciones en cuanto a la concentración en la que pueden añadirse por las normas de seguridad alimentaria, a diferencia de los biocidas biológicos, los cuales pueden utilizarse en las dosis en que son realmente eficaces, es aconsejable que la industria considere en hacer cambios para reducir la actividad microbiológica en forma efectiva, como pudiera ser aplicar mayores dosis de productos permitidos en forma de choque, en los momentos y/o lugares en que se establezca con un control adecuado. Esto es mucho más significativo considerando que los lactobacilos dextranogénicos como *W. confusa*, la más abundante y seguramente la más perjudicial de las cepas aisladas, es una de las más susceptibles a los biocidas de origen biológico. Otra sugerencia de estos resultados se origina en la variación con que las diferentes cepas son más o menos susceptibles a cada biocidas, lo que indica la necesidad de mantener monitoreos sistemáticos que indiquen a los productores el que es más conveniente y la dosis a aplicar de acuerdo a la identidad y severidad de los componentes de su microbiota en condiciones operativas.

## CONCLUSIONES

- Se aislaron e identificaron 17 cepas bacterianas, 8 de ellas hasta especie y 9 hasta género con especies más probables.
- La especie identificada en todos los aislamientos de lactobacilos dextranogénicos fue *W. confusa* en lugar de *L. mesenteroides*, que era el esperado y reportado en trabajos anteriores.
- Las respuestas de las cepas individuales aisladas a los diferentes biocidas fue muy diferente, aunque *S. sciuri*, *Microbacterium* y gran parte de las de *Bacillus* se catalogan como las más susceptibles, mientras que las gram-negativas *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomona* resultaron las más resistentes.
- *W. confusa*, presumiblemente la cepa más abundante y perjudicial, es en comparación con otras cepas, relativamente más susceptible a los biocidas biológicos.
- Al disminuir la concentración de los biocidas a valores cercanos al 1% (1000 ppm) se redujo ostensiblemente la susceptibilidad de la mayoría de las cepas, y en algunos casos se anuló, lo que sugiere establecer políticas más eficaces en el uso de biocidas en el proceso,

como sería aplicar mayores dosis en forma de choque en los momentos y/o lugares en que se establezca.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Amari et. al (2012)** Characterization of a novel dextransucrase from *Weissella confuse* isolated from sourdough. *Appl Microbiol Biotechnology* 4447-4478

**Antier, P. (1996)** Microbiological control in a cane sugar mill: implications on sugar quality and losses. *Proc s afr sug technol ass* 70: 185-187.

**Azasgua. 2012.** Estadística de producción zafra 2011/12.

**Björkroth, J., y W. Holzapfel. (2006)** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*, p.267 -319. In M. Dworkin (ed.), *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, Vol 4. 3era Edición, Springer.

**Cole et. al. (2009)** The Ribosomal Database Project: improved alignments and new Tools for rRNA análisis. *Nucl. Acids Res.* 37(1): D141-D145

**Duarte, E.; Guillermo, A.; Polanco, N.;López, N. (1982)** Análisis microbiológico de productores azucareros. *Revista científico-técnica [cuba]*.

**Egan, B.T y Rehbein, C.A (1963)** Bacterial deterioration of mechanically harvested cut-up sugarcane during storage over weekends. *Proc Queensland Soc Sug Cane Technol* 30:11-25

**Eggleston, G. (2012)** Deterioration of cane juice-sources and indicators. *Food Chemistry* 78:95-103.

**Eggleston, G; Marel du Boil PG; Wlaford SN. (2008)** A review of sugarcane deterioration in the United States and South Africa. *Proc S Afr Sug Technol Ass* 81:72-85.

**F. Marchal1 H. Robert, N. Merbahi, C. Fontagné-Faucher, M. Yousfi, C. E. Romain.**

(s.f) Treatment of *Weissella confusa* biofilms with low temperatura plasma jet at

atmospheric pressure. Université de Toulouse, France F-32000.

**Francisco, G.; Li, Z. et al. (2003)** Phenyl thiazolyl urea and carbamate derivatives as new inhibitors

**Frank, J.; Reich, C.; Sharma, J.; Weisbaum, J.; Wilson, B y Olsen G. (2008)** Critical evaluation of two primers commonly used for amplication of bacterial 16S rRNA genes. Appl and Environ Microbiol: 2461-2470

**Guerin-mechin, I; Dubois-brissonnet, F; Heyd, B. et al. (2000)** Quaternary ammonium compound stresses induce specific variation in fatty acid composition of *Pseudomona aeruginosa*. International journal of food microbiology (55): 157-159

**Hernández, M.T; Dauval, C; Pérez, M. E. (1978)** Acción de *L. mesenteroides* y otros microorganismos sobre los componenetes del jugo de caña. Centro azúcar 5(1): 69-97. Cuba

**Leather, T.D y Côte, G.I. (2008)** Biofilm formation by exopolysaccharide mutants of leuconostoc mesenteroides strain nrrl b1335. Appl microbiol biotechnol 78:1025-1031.

**Maxwell, A. (1997)** Dna gyrase as drug target. Trend in Microbiol 5(3): 102-109.

**Mora, Z. (1994)** Impacto de la microbiología en la fabricación del azúcar: estudio del impacto de las microfloras contaminantes durante la etapa de molienda de caña y sus efectos en el proceso de elaboración de azúcar. Colombia: programa fondo de nuevos desarrollos. Asocaña y Cenicaña. Editorial Orstom,195pp.

**Queipo-Ortuño, M.; Colmener, J.; Macias, M; Bravo, M.; Morata, P. (2008)** Preparation of bacterial DNA template by Bowling and effect of immunoglobulin G as inhibitor in Real-Time PCR for serum samples from patients with brucellosis. Clin Vaccine Immunol 15(2): 293-296

**Russell, A. D. (2003)** Review: similarities and differences in the resposes of

microorganisms to biocides. *J of antimicrob chemotherapy* (52): 750-763

**Samaraweera, I; Buschette, I; Rheult, I. et.al. (2011)** Bench studies and factory trials with the use of the beta hop acid, betastab 10a. *American crystal Sugar Company* (31): 103-124.

**Sambrook, J y Russell, D. (2001)** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3era Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

**Serrano, I. (2006)** Determinación de las poblaciones microbiológicas en el proceso de extracción de jugo de caña de azúcar en el ingenio manuelita, s.a. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana (Tesis de graduación de microbiología industrial).

**Stackebrandt, E.; Frederiksen, W. et. al. (2002)** Taxonomic note: Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology). *Int J of Syst and Ev Microbiol* 52:1043-1047.

**Ward, D. (1998)** A natural species concept for prokaryotes. *Current Opinion in Microbiol* 1:271-277.

**Zepeda Guardado, E. R (2012)** Propuesta de alternativas para la reducción de pérdidas de sacarosa en un ingenio azucarero. Universidad de El Salvador. (Tesis de Ingeniería Química).