



XL CONVENCIÓN y EXPOATAM 2018

"Enrique Luna Flores"

12, 13 y 14 de Septiembre

WTC Boca del Río, Veracruz México

ATAM

BACTERIAS COLIFORMES Y *LEUCONOSTOC* INVOLUCRADOS EN LA PÉRDIDA DE SACAROSA EN CAÑA DE AZÚCAR

COLIFORMS AND *LEUCONOSTOC* BACTERIA INVOLVED IN THE SUCROSE LOSSES IN SUGAR CANE

Vianey Flores Montiel¹, Juan Valente Hidalgo Contreras¹, Joel Velasco Velasco¹, Violeta Múgica Álvarez², Francisco Hernández Rosas^{1*}

Colegio de Postgraduados-Campus Córdoba-Programa de Innovación Agroalimentaria Sustentable. Carretera Federal Córdoba-Veracruz, Km. 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, C.P. 94953¹

Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Azcapotzalco²

Autor de correspondencia: fhrosas@colpos.mx*

RESUMEN

La sacarosa es el principal carbohidrato utilizado en la industria como edulcorante de alimentos y otros productos, sin embargo, es reducida debido a la pérdida que se genera en el cultivo después de la quema. La principal causa detectada y reportada hasta el momento ha sido el crecimiento de bacterias como *Leuconostoc* que invierten la sacarosa en monosacáridos y algunas dextranas. Para el presente estudio se realizó un muestreo de suelo en la zona de abasto de Ingenio Central El Potrero siguiendo la NOM-021-SEMARNAT-2000, en tres parcelas con la variedad MEX 69 - 290 con sistema de riego. Se tomaron muestras de tallos de caña y suelo en dos fases: sin quema y con quema. Para la caracterización de microorganismos se realizó una siembra en placa para obtención de colonias en medio Mayeux y la separación de colonias seleccionadas. Los aislamientos seleccionados fueron purificados y aislados en medios de cultivo diferenciales Eosina Azul de Metileno (EAM) y Salmonella-Shigella (SS) para coliformes, y tinción de Gram para *Leuconostoc*. Se obtuvieron 22 aislamientos de tallos de caña que crecieron en EAM y SS y 31 aislamientos de suelo. Los coliformes obtenidos fueron *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas*. Para las colonias que no crecieron en medios diferenciales se les realizó tinción de Gram identificando bacterias Gram (+), principalmente cocos y bacilos cortos agregados como posibles *Leuconostoc*. Con base a lo obtenido se considera que los microorganismos identificados hasta el momento son potenciales degradadores de sacarosa de acuerdo con el método de selección a partir de la obtención de coliformes y *Leuconostoc* de un medio de cultivo con alto contenido de sacarosa y esto coincide con la hipótesis que la inversión o formación de reductores no está directamente relacionada con bacterias ácido-lácticas como *Leuconostoc* sino de posibles coliformes.

Palabras clave: deterioro, reductores, dextranas, BAL's

ABSTRACT

Sucrose is the main carbohydrate used in the industry as a sweetener for food and other products, however, its extraction of raw material is limited due to the loss of it. The main cause detected and reported so far has been the growth of bacteria such as *Leuconostoc* that invert sucrose in monosaccharides and some dextrans. For the present study, a soil sampling was carried out in the

supply area of El Potrero Central Sugar Mill following the NOM-021-SEMARNAT-2000, in 3 plots with the MEX69-290 variety with irrigation system. Samples of ground and soil stems were taken in two phases: no burning and burning. For the characterization of microorganisms, a sample was made on the plate to obtain colonies in Mayeux® medium and the separation of selected colonies. The selected isolates were purified and isolated in differential media Eosin Blue Methylene (EAM) and Salmonella-Shigella (SS) for coliforms and Gram stain for *Leuconostoc*. We obtained 22 isolates that grew in EAM and SS of sugarcane stems and 31 soil isolations. The coliforms were *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella* and *Pseudomonas*. For colonies that did not grow in differential media, Gram stain was performed identifying Gram (+) bacteria, mainly cocci and short bacilli added as possible *Leuconostoc*. Based on what is considered that the microorganisms identified so far are the degraders according to the method of selection of coliforms and *Leuconostoc* from a culture medium with high sucrose content and this coincides with the hypothesis that the investment or formation of Reducers is not directly related to lactic acid bacteria such as *Leuconostoc* but to possible coliforms.

Keywords: deterioration, reducers, dextrans, LAB's.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es un gramínea de la que se obtiene sacarosa a partir del jugo contenido en los tallos, de donde se produce alrededor del 70% del azúcar del mundo (Xu *et al.*, 2018). La sacarosa es el principal carbohidrato utilizado en la industria como edulcorante de alimentos y otros productos, sin embargo, su extracción de la materia prima es reducida debido al deterioro que se genera en el cultivo desde antes del corte posterior a la quema (Misra *et al.*, 2017).

La pérdida o degradación de sacarosa, se debe a distintos factores como la hidrólisis molecular, actividad enzimática y principalmente por la presencia de microorganismos que son promovidos por la quema al hacer disponible el jugo (sacarosa), donde inician su desarrollo pasando por el corte, alce y transporte hasta el procesamiento en fábrica (Farine *et al.*, 1997; Misra *et al.*, 2017; Sharma & Chandra, 2017)

La principal causa detectada y reportada hasta el momento ha sido el crecimiento de microorganismos como *Leuconostoc* que invierten la sacarosa en monosacáridos y algunas dextranas (Jiménez, 2009; Misra *et al.*, 2017; Naessens *et al.*, 2005; Sharma & Chandra, 2017). El presente trabajo tuvo como objetivo identificar las bacterias y coliformes que junto con *Leuconostoc* involucradas con la degradación de sacarosa en suelo y tallo de la caña de azúcar sin quema y con quema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo de suelos en la zona de abasto de Ingenio Central El Potrero siguiendo la NOM-021-SEMARNAT-2000 para la obtención de una muestra compuesta, esto se realizó en tres parcelas con la variedad MEX69-290 bajo sistema de riego. Para llevar a cabo el estudio se utilizaron tallos de caña y suelo en dos fases: sin quema y con quema.

Mediante el método de zigzag establecido con la norma, se tomaron nueve muestras de suelo en cada punto y estos mismos en cada una de las parcelas; en cada uno de estos puntos se tomó un tallo y una porción de suelo en ambos tratamientos: sin quema y con quema. Las muestras tomadas de suelo y tallos se juntaron por parcela y se tomaron como muestras compuestas para ambos casos.

Para el aislamiento de bacterias y coliformes se realizaron soluciones madre (concentradas) con el lavado de los tallos de caña, estos fueron lavados con Tween 20® al 0.03%, las seis soluciones obtenidas que fueron colectadas por parcela se colocaron en frascos Shott estériles y mantenidas a

temperatura ambiente. Para las muestras de suelo, se tomó 1 g de cada muestra compuesta y se colocó en 10 mL de Tween 20® al 0.03%, esto se realizó para cada una de las muestras compuestas. Una vez obtenidas las soluciones madre de tallos y suelo, se procedió a hacer la técnica de unidades formadoras de colonias (UFC) con diluciones con agua peptonada al 1%, de esta se tomaron las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} y fueron sembradas en cajas Petri con medio de cultivo Mayeux y se incubaron a 37°C hasta observar el crecimiento de colonias.

Una vez crecidas las colonias se procedió a purificarlas mediante un estriado por dilución en medio de cultivo Mayeux, una vez crecidas se llevaron a medios de cultivo diferenciales Salmonella-Shigella (SS) y Eosina Azul de Metileno (EAM). Para los aislamientos que no crecieron en medios de cultivo diferenciales se realizó tinción de Gram.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los tratamientos considerados para el estudio, se encontró que el tratamiento con tallos en crudo obtuvo una gran presencia de colonias mediante UFC a 37°C, siendo la parcela 1 la de mayor presencia. Para el tratamiento de tallos con quema, se observó una disminución de colonias, notando como único factor de cambio el incremento de la temperatura. Para las muestras de suelo no se pudo realizar un conteo de UFC debido al crecimiento inusual de la formación de colonias invasivas y con bordes irregulares de las colonias después de 216 horas de incubación.

Con las pruebas bioquímicas realizadas a las diferentes colonias aisladas de tallos y suelo con quema y sin quema, se pudieron identificar algunos coliformes dentro de las parcelas muestreadas. Se obtuvieron 87 placas con medio de cultivo Mayeux con colonias purificadas y mediante los medios EAM y SS se pudo confirmar que 22 aislamientos de caña y 31 aislamientos de suelo fueron identificados como coliformes.

De acuerdo con las características presentadas en los medios diferenciales de EAM y SS, los microorganismos obtenidos fueron *Klebsiella* sp., *E. coli* y *Pseudomonas* sp. Para las colonias que no crecieron en medios diferenciales se les hizo tinción de Gram, se identificaron bacterias Gram (+), de los que principalmente fueron cocos y bacilos cortos agregados como posibles *Leuconostoc* spp.

Para autores como Coelho *et al.*, (2011); Misra *et al.*, (2017) y Reid & Abratt, (2005), los aislamientos del género *Leuconostoc* crecidos en medios ricos en sacarosa producen dextranas, y que coincide con los aislamientos obtenidos en este trabajo por la formación de una gota sobre las colonias de la bacteria.

Los coliformes encontrados a través del medio de cultivo Mayeux, de igual manera permiten confirmar a través de lo reportado por Tayuan *et al.*, (2011) y Stiles & Holzappel, (1997) que pueden estar presentes microorganismos diferentes a *Leuconostoc* involucrados en el deterioro de la caña.

CONCLUSIONES

Con base a lo obtenido se considera que los aislamientos de coliformes y *Leuconostoc* identificados hasta el momento están relacionados con la degradación de sacarosa. Se aislaron colonias con las características propias de *Leuconostoc* Gram (+) y *Klebsiella*, *E. coli* y *Pseudomonas* Gram (-), por lo que de manera preliminar se da bases a la hipótesis que la inversión o formación de reductores no está directamente relacionada con bacterias ácido-lácticas como *Leuconostoc* sino que posibles coliformes están involucradas.

REFERENCIAS

- Tayuan, C., Tannock, G. W., & Rodtong, S. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Weissella* sp. from low-cost substitutes for sucrose. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22), 3696-3710. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.486>
- Coelho, L. F., de Lima, C. J. B., Bernardo, M. P., & Contiero, J. (2011). d(-)-Lactic Acid Production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 Using Different Carbon and Nitrogen Sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(7), 1160-1171. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9202-6>
- Farine, S., Villard, C., Moulin, A., Mouren, G. M., & Puigserver, A. (1997). Comparative quantitative analysis of sucrose and related compounds using ion exchange and reverse phase chromatographic methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 6.
- Jiménez, E. R. (2009). Dextranase in sugar industry: a review. *Sugar tech*, 11(2), 124–134.
- Misra, V., Mall, A. K., Pathak, A. D., Solomon, S., & Kishor, R. (2017). Microorganisms affecting Post-Harvest Sucrose Losses in Sugarcane. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(7), 2554-2566. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.361>
- Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2005). *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(8), 845-860. <https://doi.org/10.1002/jctb.1322>
- NOM-021-SEMARNAT-2000. (s. f.). *Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio y muestreo y análisis.*
- Reid, S. J., & Abratt, V. R. (2005). Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 312-321. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1885-y>
- Sharma, A., & Chandra, A. (2017). Identification of New *Leuconostoc* Species Responsible for Post-harvest Sucrose Losses in Sugarcane. *Sugar Tech*, 20(4), 492-496. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0562-2>
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Xu, S., Wang, J., Shang, H., Huang, Y., Yao, W., Chen, B., & Zhang, M. (2018). Transcriptomic characterization and potential marker development of contrasting sugarcane cultivars. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19832-x>