

# Estudio de estabilidad del inóculo LB-1 del bioproducto Lebame

Aidín Martínez-Sánchez\*, Grisel M. Ortega-Arias-Carbajal, Gisela González-Pardo, Silvia Armenteros-Galarraga, Miguel A. Peña-Martínez, Silvano Legrá-Mora, Emilia Carrera-Bocourt, Antonio Bell-García, Grizel Delgado-Arieta

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (Icidca)  
Vía Blanca 804 y Carretera Central. San Miguel del Padrón. La Habana Cuba.

\* aidin.martinez@icidca.azcuba.cu

---

## RESUMEN

Lebame, es un producto obtenido a través de un proceso de fermentación, a partir del inóculo LB-1, constituido por dos cepas de bacterias (*Bacillus subtilis* B/23-45-10 Nato y *Lactobacillus bulgaricum* B/103-4-1) y una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* L/25-7-12). En este trabajo se realizó la evaluación preliminar de la estabilidad del inóculo LB-1 a 12 °C y temperatura ambiente (25 - 32 °C) durante 49 días. No se detectó crecimiento de las bacterias después de los 28 días de conservación. La levadura mostró mejor estabilidad durante el tiempo ensayado. El análisis estadístico del factor tiempo tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad de las bacterias; el factor temperatura no mostró diferencia significativa para un 95,0 % de nivel de confianza. Analizando la levadura se detectó diferencia significativa con el factor temperatura. Los resultados obtenidos evidencian que el inóculo LB-1 es efectivo a las condiciones estudiadas hasta los 28 días de almacenamiento.

**PALABRAS CLAVE:** microorganismos eficientes, microorganismos benéficos, estabilidad, Lebame, bioproducto.

## ABSTRACT

Lebame, is a product obtained through a fermentation process, from the inoculum LB-1, consisting of two strains of bacteria (*Bacillus subtilis* B/23-45-10 Nato and *Lactobacillus bulgaricum* B/103-4-1) and a yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae* L/25-7-12). In this work the preliminary evaluation of the stability of the LB-1 inoculum was performed at 12 °C and at room temperature (25-32 °C) for 49 days. No bacterial growth was detected after 28 days of storage. Yeast showed better stability over the time tested. Statistical analysis of the time factor has a statistically significant effect on the viability of the bacteria; the temperature factor showed no significant difference for a 95.0 % confidence level. Analyzing the yeast, a significant difference was detected with the temperature factor. The results show that the LB-1 inoculum is effective at the conditions studied up to 28 days of storage.

**KEYWORDS:** efficient microorganisms, beneficial microorganisms, stability, Lebame, bioproduct.

---

## INTRODUCCIÓN

El concepto y tecnología de los Microorganismos Eficientes fue establecido por el Dr. Teruo Higa en Japón (1). El primer propósito de su uso fue mejorar la calidad del suelo y obtener un alto rendimiento de los cultivos sin usar agroquímicos ni tóxicos; actualmente se aplica más diversamente en la agricultura intensiva, pecuaria,

medio ambiente, acuicultura y otros.

Los microorganismos eficientes o EM son una combinación de microorganismos beneficiosos de origen natural, que se han utilizado tradicionalmente en la alimentación. Contiene principalmente organismos beneficiosos de cinco géneros principales: bacterias fototróficas, levaduras, bacterias ácido láctico, actinomicetos y hongos de fermentación (2).

Higa encontró que el éxito de su efecto potenciador estaba en su mezcla; por esto se dice que los microorganismos eficientes trabajan en sinergia, ya que la suma de sus componentes tiene mayor efecto que cada uno por separado (3).

Estos microorganismos cuando entran en contacto con materia orgánica secretan sustancias beneficiosas como vitaminas, ácidos orgánicos, minerales quelatados y fundamentalmente antioxidantes que promueven la descomposición de la materia orgánica y aumentan el contenido de humus.

El Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (Icidca), ha desarrollado el producto Lebame a través de un proceso de fermentación (4), a partir del inóculo LB-1, constituido por dos cepas de bacterias (*Bacillus subtilis* B/23-45-10 Nato y *Lactobacillus bulgaricum* B/103-4-1) y una de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* L/25-7-12).

Para obtener un producto que cumpla con los parámetros requeridos para su uso y comercialización es necesario partir de un inóculo que mantenga la estabilidad de los cultivos que lo constituyen. El objetivo de este trabajo es determinar la estabilidad del inóculo LB-1, en diferentes condiciones de almacenamiento, por un período de 49 días.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de inóculo LB-1: está compuesto por tres microorganismos dos bacterias *B. subtilis* B/23-45-10 Nato, *L. bulgaricum* B/103-4-1 y una levadura *S. cerevisiae* L/25-7-12. Cada uno de los cultivos fueron crecidos e incubados por separado en sus respectivos medios específicos a temperaturas óptimas de crecimiento. Posteriormente las tres cepas bien crecidas se transfieren a un medio formulado con miel y sulfato de amonio, se incubaron a la temperatura óptima, después de crecidos durante 48 horas se envasan en frascos plásticos de 1 litro de capacidad, se cerraron de forma hermética y se almacenaron en refrigeración (12 °C) y temperatura ambiente (25-32 °C) y por un período de 49 días.

Determinaciones microbiológicas: la viabilidad de los microorganismos fue determinada con una frecuencia de siete días, durante 49 días, mediante la determinación de las UFC/mL. Para ello las muestras fueron sembradas por el método de diseminación en la superficie, en placas con medio Agar Nutritivo WL (5).

Análisis estadístico de los resultados: Utilizando el programa Statgraphics Centurion XV, 2007 (6), mediante un análisis Anova Multifactorial, teniendo en cuenta los factores: temperatura y tiempo. La prueba de múltiple rangos en cada caso se realizó mediante el método: 95,0 % LSD de Fisher.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento de la estabilidad de los microorganismos, en el lote del inóculo LB-1 almacenados en diferentes condiciones: refrigeración (12 °C) y a temperatura ambiente (25-30 °C), por un período de aproximadamente 49 días, se muestran en la tabla 1.

Se puede apreciar que a temperatura ambiente los conteos de la UFC/mL de las bacterias oscilaron entre  $1,0 \times 10^7$  y  $4,6 \times 10^6$  UFC/mL hasta los 28 días de ensayo, después de este tiempo no se detectó crecimiento en las diluciones sembradas, mientras que el conteo de levaduras fue disminuyendo desde  $1,1 \times 10^8$  hasta  $2,4 \times 10^5$  UFC/mL. Se puede apreciar que la mayor muerte celular ocurrió entre los 28 y 49 días de almacenamiento.

En las muestras almacenadas a temperatura de 12 °C, las mayores pérdidas de la viabilidad de las bacterias ocurrieron después de los 21 días con una disminución desde  $1,0 \times 10^7$  hasta  $5,5 \times 10^5$  UFC/mL, las levaduras oscilaron entre  $1,1 \times 10^8$  y  $8,7 \times 10^7$ , mostrando una mejor estabilidad durante los 49 días de almacenamiento.

En la tabla 2, se aprecian los resultados del análisis estadístico, de varianza, del inóculo LB-1 en las condiciones de almacenamiento, estudiando los factores: temperatura y tiempo.

Se puede observar que para las bacterias el valor de probabilidad P- del factor tiempo es

**Tabla 1.** Estabilidad en el tiempo del inóculo LB -1 a diferentes temperaturas de almacenamiento

| Tiempo (días) | Estabilidad de los cultivos (UFC/mL) |                   |                       |                   |
|---------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
|               | 12 °C                                |                   | ambiente (25 -32 °C ) |                   |
|               | Bacterias                            | Levaduras         | Bacteria s            | Levaduras         |
| 0             | $1,0 \times 10^7$                    | $1,1 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^7$     | $1,1 \times 10^8$ |
| 7             | $1,5 \times 10^6$                    | $1,0 \times 10^8$ | $7,2 \times 10^7$     | $8,6 \times 10^8$ |
| 14            | $1,5 \times 10^6$                    | $3,5 \times 10^8$ | $4,6 \times 10^6$     | $3,0 \times 10^8$ |
| 21            | $4,0 \times 10^5$                    | $6,6 \times 10^6$ | $1,1 \times 10^8$     | $1,5 \times 10^7$ |
| 28            | $5,5 \times 10^5$                    | $1,4 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$     | $1,4 \times 10^8$ |
| 35            | ND                                   | $1,1 \times 10^8$ | ND                    | $3,7 \times 10^6$ |
| 42            | ND                                   | $1,3 \times 10^8$ | ND                    | $9,7 \times 10^6$ |
| 49            | ND                                   | $8,7 \times 10^7$ | ND                    | $2,4 \times 10^5$ |

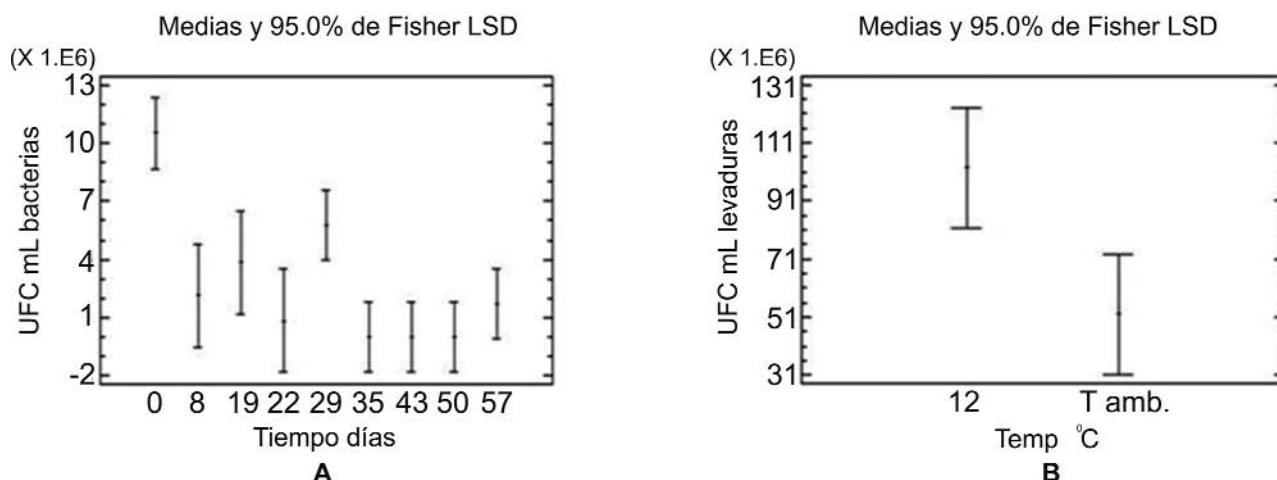
ND: No se detecta

**Tabla 2.** Análisis de varianza para la estabilidad de las bacterias y las levaduras a las diferentes condiciones de almacenamiento

| Efectos principales | Valor de probabilidad - P |           |
|---------------------|---------------------------|-----------|
|                     | Bacterias                 | Levaduras |
| Temperatura         | 0,2062                    | 0,0196    |
| Tiempo              | 0,0001                    | 0,5200    |

po de la estabilidad del inóculo donde se puedan detectar todos los microorganismos que integran el inóculo LB-1, con una concentración celular lo suficientemente alta para poder garantizar la producción del inoculante Lebame (7).

Teniendo como base los resultados del análisis realizado se puede señalar que bajo las condiciones de trabajo establecidas, el inóculo LB-1 presenta estabilidad hasta los 28 días de almacenamiento.



**Figura 1.** Análisis estadístico de la influencia de los factores temperatura (A) y tiempo (B) en las bacterias y levadura, respectivamente.

menor que 0,05 por lo que tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad de las bacterias; el factor temperatura no mostró diferencia significativa, ya que el valor de probabilidades fue mayor que 0,05 para un 95,0 % de nivel de confianza. Analizando la levadura se detectó diferencia significativa con el factor temperatura, este efecto no fue observado con el factor tiempo.

En la figura 1 se muestran las medias de la viabilidad en UFC/mL de las bacterias analizando el factor tiempo, y de las levaduras analizando el factor temperatura, en los cuales se detectó diferencias significativas, con respecto al valor inicial para todos los microorganismos.

Estos resultados evidenciaron lo descrito en la tabla 2. Aunque no existe una diferencia significativa entre el factor tiempo para las bacterias y el factor temperatura para las levaduras (figura 1), se debe de establecer un compromiso para el tiem-

## CONCLUSIONES

1. El factor tiempo tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad de las bacterias, no así para el factor temperatura. En la levadura se detectó diferencia significativa con el factor temperatura, este efecto no fue observado con el factor tiempo.
2. El inóculo LB-1 del bioproducto Lebame es estable hasta los 28 días de almacenamiento

## RECOMENDACIONES

Aunque el inóculo LB-1, es estable hasta los 28 días, se recomienda su utilización hasta los 21 días de almacenamiento en condiciones ambientales sin refrigeración.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Higa, T. (1991). Effective microorganisms: A biotechnology for mankind. p.8-14. In J.F. Parr, S.B. Hornick, and C.E. Whitman (ed.) Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., USA.
  2. Microorganismo Efectivos, (2008). Los espíritus buenos del microcosmos EM (pdf) [http://www .microorganismos-efectivos.com](http://www.microorganismos-efectivos.com) Recuperado 4/Febrero/2008.
  3. Higa, T. and G.N. Wididana (1991). The concept and theories of Effective microorganisms. p. 118-124. In Parr, S.B. Hornick, and C.E. Whitman (ed.) Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., USA.
  4. Díaz de Villegas M.E.; Delgado; G.; Martínez, A.; González, G.; Sánchez, N.; Carrera, E.; et al. Evaluación de cepas de colección para la producción del inóculo LB-1 (microorganismos eficientes). Resumen del Congreso Internacional LABIOFAM 2014, 22-25 Septiembre 2014, Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba.
  5. Agar nutritivo WL 110866 - Merck Millipore. [https://www.merckmillipore.com/INTL/es/.../WL-nutrient-agar,MDA\\_CHEM-110866](https://www.merckmillipore.com/INTL/es/.../WL-nutrient-agar,MDA_CHEM-110866). Recuperado 24/Marzo/2017.
  6. Statgraphics. Programa Statgraphics. Centurion XV. 2007.
  7. Ortega, G.M; Díaz de Villegas, M.E.; Delgado, G.; Martínez, A.; González G.; Armenteros, S.; et al. Estudio de estabilidad del bioproducto LEBAME. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar (La Habana) Vol. 49, No. 3, 3-8. ISSN. 0138-6204, 2015.
-