



Vol. 54, No. 3 – septiembre - diciembre - 2020

Caracterización climática de la zona norte de Holguín cultivada con caña de azúcar

Climatic characterization of the north zone of Holguín grown with sugar cane

Adrián Serrano-Gutiérrez, George Martín-Gutiérrez, Yakelín Cobo-Vidal, Carlos Lamelas-Felipe, Manuel Luciano Vidal-Díaz y Salvador García-Guerra

Determinación de las propiedades de las cenizas bagaceras para su uso en la construcción

Determination of the properties of the bagasse ashes for use in construction

Norma G. Barnes, Nicolás Cisterna, Patricia M. Albarracín y Daniel Borkosky

Composición de la cera de caña de azúcar y el empleo de solventes para su extracción y fraccionamiento. Enfoque orientado a su aplicación

Composition of the sugarcane wax and the use of solvents for its extraction and fractionation. Approach oriented to its application

Manuel Díaz-de los Ríos y Eduardo Hernández-Ramos

Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from sugarcane and sugarcane derivatives environments

Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos a partir de ambientes cañeros y derivados de la caña de azúcar

Lisandra Martínez-Valdés, María Teresa Fernández-Santisteban, Roberto C. Arísticas-Ribalta, Amanda Montes-Álvarez, Meinardo Lafargue-Gámez and Reinaldo Fraga-Vidal

Evaluación de fuentes de carbono para la producción de metabolitos antifúngicos a partir de *Bacillus* sp cepa VC3

Evaluación de fuentes de carbono para la producción de metabolitos antifúngicos a partir de *Bacillus* sp cepa VC3

Nayra Ochoa-Viñals, Jessica Mendoza-Rodríguez, Evelyn Faife-Pérez, Isis Amores-Sánchez, Orquídea Coto-Pérez y Antonio Bell-García

Escalado e implementación de un biorreactor para la producción de *Salmonella enteritidis*

Scaling and implementation of a discontinuous bioreactor for the production of *Salmonella enteritidis*

Yoel Alfonso-Acosta, Guido Riera-González y Plino Vargas-Zambrano

Procedimiento para determinar las potencialidades de producción de alimento en la provincia de Camagüey

Procedure to determine the production potential of animal feed in the province of Camagüey

Hilda de las Mercedes Oquendo-Ferrer, Luis Beltrán Ramos-Sánchez, Redimio Pedraza-Olivera, Lorena de Jesús Pazos-Amayuela, Yainerys Estrella Martínez-Fernández y Erenio González-Suárez

Consideraciones sobre el mercado internacional de la levadura *Torula (Candida utilis)*

Updating importance of *Torula* yeast (*Candida utilis*) in animal feed international market I

Arodis Caballero-Núñez

Evaluación de un rodenticida con inclusión de derivados de la caña de azúcar

Evaluation of the rodenticide including sugar cane derivatives

Juan Fernández-Rodríguez, Noel Suárez-Morales, Carlos Bravo-Pino, Fresy Pérez-Campos, Marta Salermo-Martínez y Albania Tamayo-Gómez

Aplicación de Microorganismos Eficientes para la disminución de la contaminación en lagunas de oxidación de la Granja Genética Porcina El Jigüe

Application of the efficient microorganisms to reduce contamination in oxidation lagoons of the swine genetic farm El Gigue

Luis A. Pérez-Fernández, Jorge Luis Gregorich-Fonseca, Silvano Legrá-Mora, Orly López-Delgado, Miguel A. Peña-Arias y Georgina Michelena-Álvarez

Certificación del Sistema de Gestión de la Calidad del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar con alcance a las producciones de FitoMas y Nitrofix

Certification of the ICIDCA Quality Management System with scope FitoMas and Nitrofix productions

Grisel María Ortega-Arias Carbajal, Marlyn Pérez-Rodríguez, Tania García-Martínez, Ana Nelis San Juan-Rodríguez, Santiago Estupiñán-Díaz, Adolfo Brown-Gómez, Marlen Lorenzo-Maiquez, Maricela Vega-Batista, Idania Blanco-Carvajal, Arlyn Reyes-Linares, Irma Rosa Ramos-Pouza, Marta González-Martínez, María Teresa Fernández-Santisteban, Rocío Jurado-Sánchez y Sidarma Hernández-Castellanos

Caracterización climática de la zona norte de Holguín cultivada con caña de azúcar

Adrián Serrano-Gutiérrez^{1*}, George Martín-Gutiérrez¹, Yakelín Cobo-Vidal¹, Carlos Lamelas-Felipe², Manuel Luciano Vidal-Díaz² y Salvador García-Guerra²

1. Estación Provincial de Investigaciones de la Caña de Azúcar de Holguín. Carretera Mayarí-Holguín, Guaro s/n, Holguín, Cuba.

*adrian.serrano@inicahl.azcuba.cu

2. Instituto de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA). Carretera CUJAE km 1½, Boyeros, La Habana, Cuba.

RESUMEN

El trabajo se desarrolló con los datos climáticos de la Estación Agrometeorológica de Guaro (coordenada 609.400 Norte y 223.700 Este) y la lluvia de los pluviómetros que posee el Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos (INRH) en la zona de estudio, con registros de 22 años. Los registros permitieron caracterizar el clima de la zona norte de Holguín, cultivada con caña de azúcar (precipitaciones, evaporación, temperatura máxima, temperatura mínima, humedad relativa, velocidad del viento y evapotranspiración). La evaporación supera las precipitaciones de enero a octubre, por lo que existe un déficit de agua durante gran parte del año. El mayor valor de evapotranspiración ocurre en el mes de julio. Las precipitaciones con un intervalo entre 50 y 75 % de probabilidad confirman que son insuficientes para la exigencia del cultivo. Las demás variables climáticas manifiestan un comportamiento favorable para el desarrollo del cultivo. Los valores de velocidad del viento no tienen influencia negativa, en cuanto a daños mecánicos, aunque esta afecta la evapotranspiración del cultivo.

Palabras clave: variables climáticas, evapotranspiración, caña de azúcar.

ABSTRACT

The work was developed with the climatic data of the Guaro Agrometeorological Station (coordinates 609,400 North and 223,700 East) and the rainfall from the rain gauges that the National Institute of Hydraulic Resources (INRH) has in the study area with records of 22 years. The records made it possible to characterize the climate of the northern area of Holguín cultivated with sugar cane (rainfall, evaporation, maximum temperature, minimum temperature, relative humidity, wind speed and evapotranspiration). Evaporation exceeds rainfall from January to October, so there is a water deficit for much of the year. The highest evapotranspiration value occurs in the month of July. The precipitations with an interval between 50 and 75 % of probability confirm that they are insufficient for the demand of the crop. The other climatic variables show a favorable behavior for the development of the crop. The wind speed values do not have a negative influence in terms of mechanical damage, although this affects the evapotranspiration of cultivation.

Key words: climatic variables, evapotranspiration, sugar cane.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las variables climáticas y la evapotranspiración en zonas cultivadas con caña de azúcar, es esencial para un manejo adecuado de este cultivo, estas permiten ajustar la norma y los intervalos de aplicación del agua a este cultivo en sistemas de riego. De igual forma estas variables

permiten hacer un uso racional del agua y la energía, minimizando el desperdicio de ambos recursos y la contaminación del medio ambiente. La evapotranspiración es el elemento más importante del balance hídrico, ya que toda el agua consumida en este proceso debe reponerse a través del riego, en caso de que la lluvia no supla toda la demanda del cultivo. El déficit en los acumulados anuales de lluvias se caracteriza por una disminución del 10 %, que se concentra en los meses del período húmedo mayo-octubre, y obliga a usar técnicas de riego ahorradoras de agua y de energía, para mitigar los efectos del cambio climático sobre la agricultura, según refiere Lapinel *et al.* (1). El objetivo del trabajo es caracterizar el clima de la zona norte del Holguín, cultivada con caña de azúcar.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló con las bases de datos climáticos de los últimos 22 años de la Estación Agrometeorológica de Guaro (ubicada en la coordenada 609.400 Norte y 223.700 Este) y la lluvia de la red de pluviómetros que posee el INRH, en la zona (28 pluviómetros), que determinó en el año entre un 50 y 75 % de probabilidad, este último como año medio seco. Las variables climáticas (temperatura máxima, mínima, humedad relativa y velocidad del viento) se utilizaron para calcular la evapotranspiración mensual. La evapotranspiración mensual (método de Penman-Monteith) se determinó utilizando el software CROPWAT 8.0 desarrollado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), además se valoraron las exigencias del cultivo con estas variables del clima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se observa el comportamiento de la lluvia y la evaporación asociada a la Estación Agrometeorológica de Guaro, se puede apreciar que existe un déficit de humedad durante una gran parte del año, solo desde la segunda quincena de septiembre hasta principio de noviembre las precipitaciones superan la evaporación, lo que indica que es necesario suministrarle agua al cultivo de la caña de azúcar prácticamente durante todo el año, estos resultados se corresponden con los de Pérez *et al.* (2), quienes definieron que el comportamiento del clima es más árido en la región oriental del país.

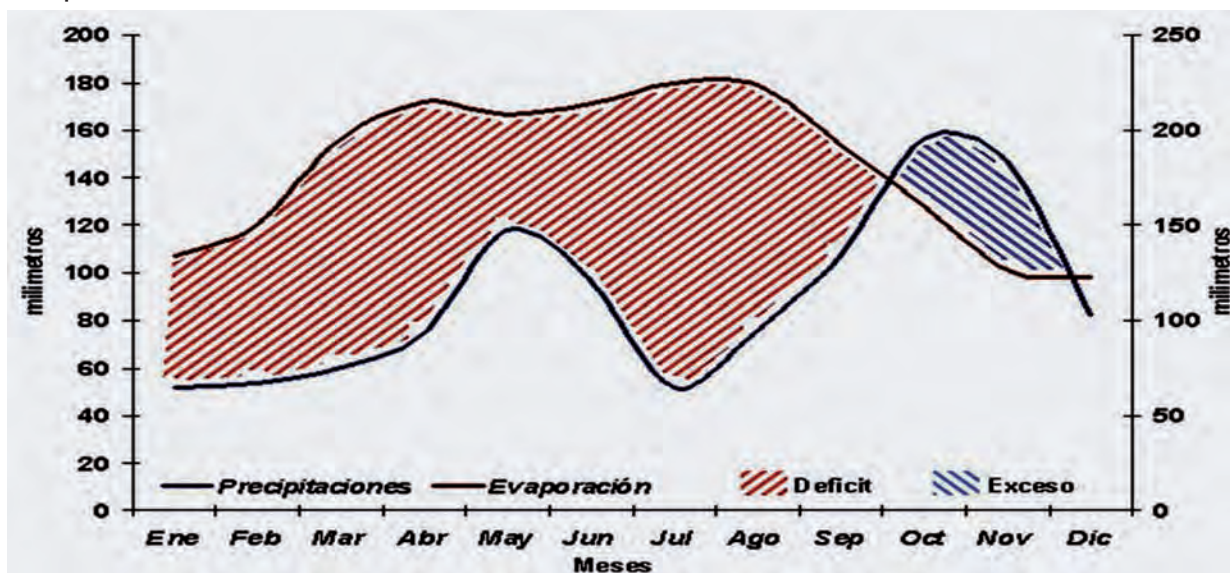


Figura 1. Comportamiento de la evaporación y las precipitaciones asociadas a la Estación Meteorológica de Guaro.

En la figura 2 se aprecia el comportamiento de la evapotranspiración promedio mensual, los valores más altos se encuentran entre los meses de abril y septiembre; se observan los picos más elevados en los meses de julio y agosto, que coincide con los meses de mayor temperatura. Resultados similares obtuvieron Avalos *et al.* (3), quienes reportaron los valores más altos de evapotranspiración durante este periodo. También Hernández (4), logró resultados similares en estudios realizados para determinar la evapotranspiración de la caña de azúcar en el Valle de Guantánamo, en condiciones de bajo nivel pluviométrico.

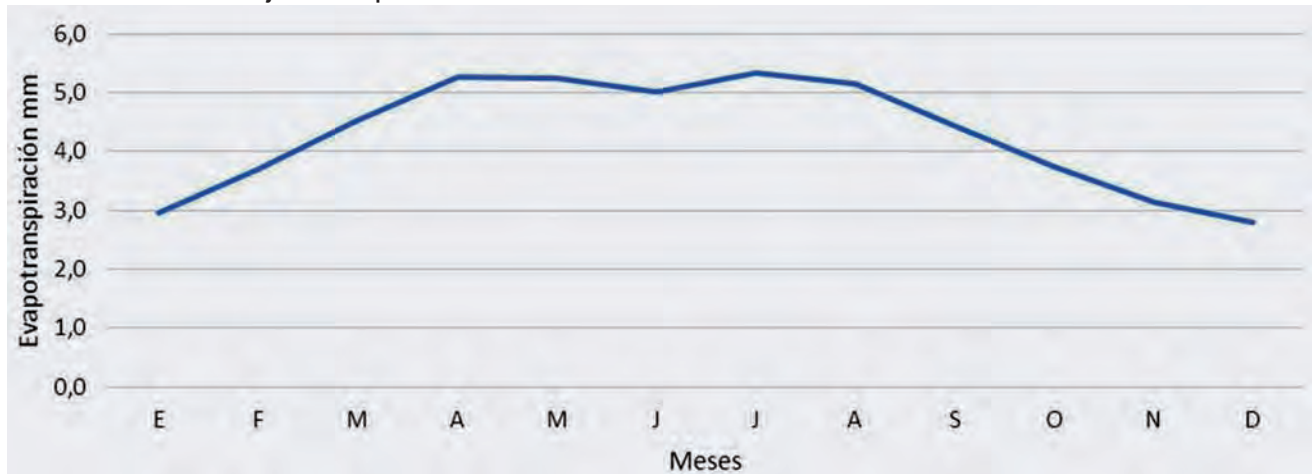


Figura 2. Evapotranspiración promedio mensual para la zona norte de Holguín.

La figura 3 muestra la probabilidad real y teórica de la lluvia anual, se observa que el año del 75 % de probabilidad se encuentra alrededor de los 863 mm anuales, sobre la base de estos valores se realizan los planes de riego para un año medio seco; además, se determinaron los valores del 50 % de probabilidad de ocurrencia de las precipitaciones, que se encuentra cercano de los 989 mm anuales, este valor indica que existe un 50 % de probabilidad de que ocurran precipitaciones cercanas a este valor. Después de hacer un análisis detallado de la figura 3, ambos valores están por debajo de los 1000 mm anuales, indica que aún están muy por debajo de las necesidades del cultivo. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Pérez *et al.* (2), quienes demostraron que en la zona oriental del país el clima, en su conjunto, es más árido que en el occidente, en correspondencia con lo planteado por Pérez *et al.* (5),

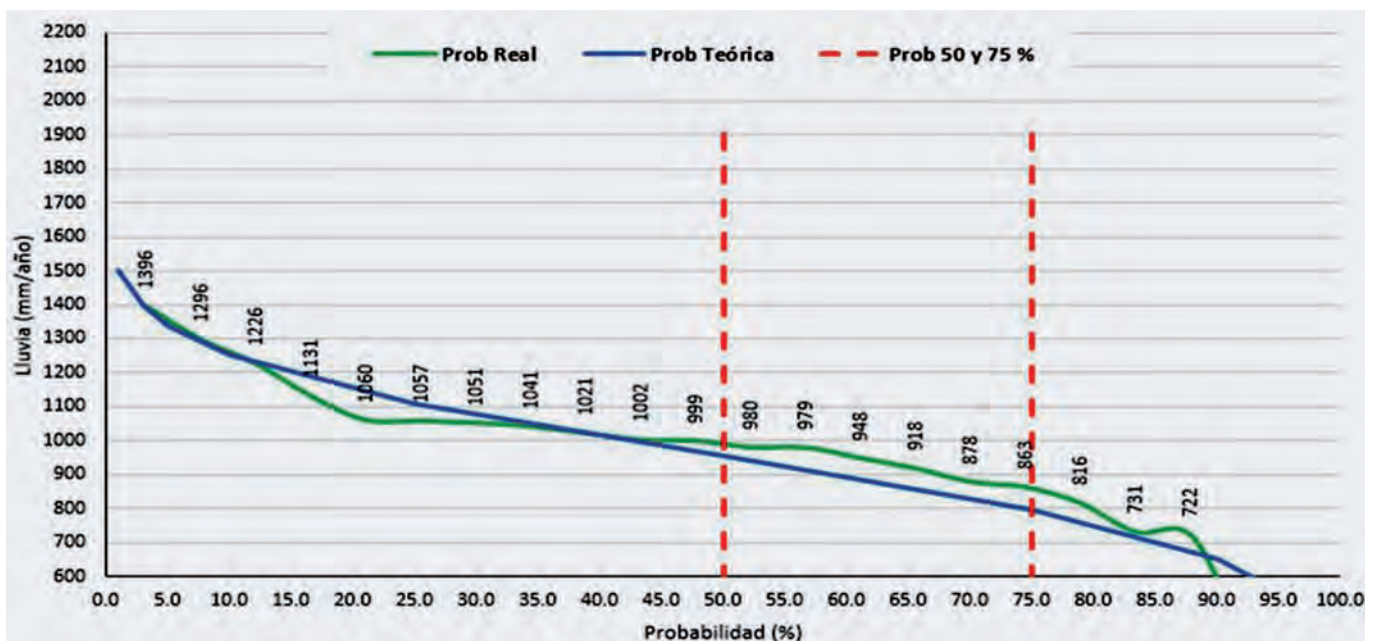


Figura 3. Probabilidad real y teórica de la lluvia anual.

quienes obtuvieron valores similares. Otros autores, al categorizar la ocurrencia de las precipitaciones en el periodo evaluado, definieron que estas clasifican en la categoría de inadecuadas y muy bajas, de acuerdo con las exigencias del cultivo, así lo plantea Inojosa *et al.* (6), que coincide con la clasificación presentada por Herrero (7), quien las definió, según su cantidad, como pobres.

En la figura 4 se representa el comportamiento de la temperatura máxima y mínima. La temperatura máxima se encuentra entre los 28.1 y 33.3 °C, valores que se corresponden con los meses enero y agosto, respectivamente; la temperatura mínima se encuentra entre valores de 18.4 y 22.9 °C, y coincide con los meses de enero y agosto, respectivamente; el promedio de la temperatura anual es de 25.9 °C, que se encuentra en el rango óptimo para la brotación de las yemas y el desarrollo del cultivo de la caña de azúcar. Resultados similares reportaron Cassalett *et al.* (8) y Liu *et al.* (9), quienes confirmaron rangos de temperaturas óptimas para el cultivo entre los 26 y 30 °C. Otros autores demostraron la estrecha y directa relación de esta variable del clima con la emergencia final y con las tasas medias de emergencia de elongación de los tallos primarios y de aparición de hojas verdes liguladas (10).

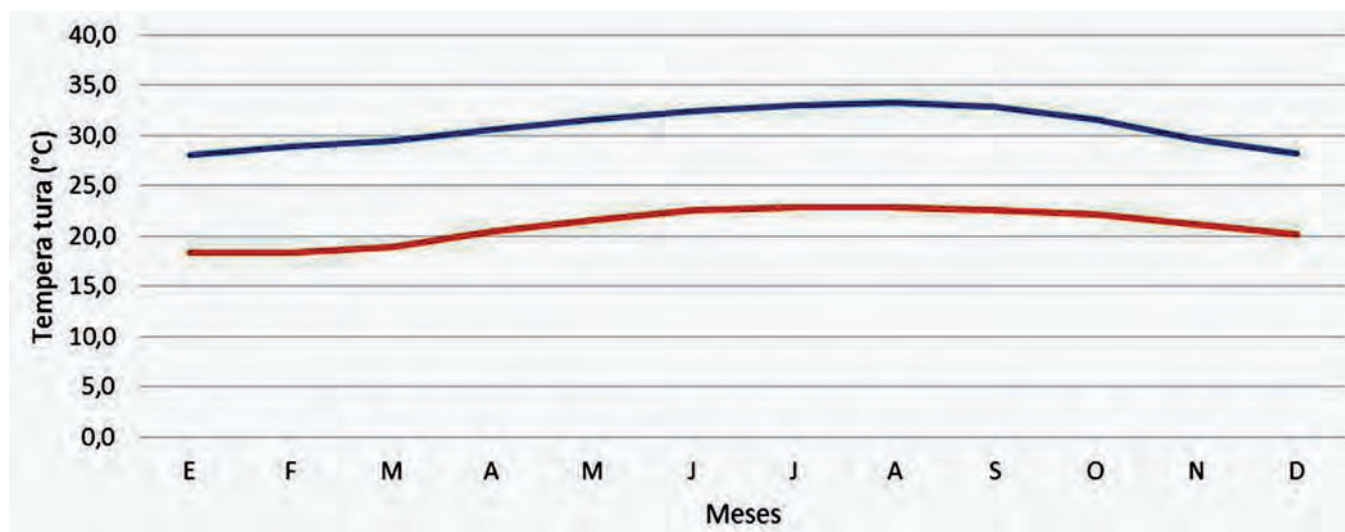


Figura 4. Comportamiento de las temperaturas máximas y mínimas.

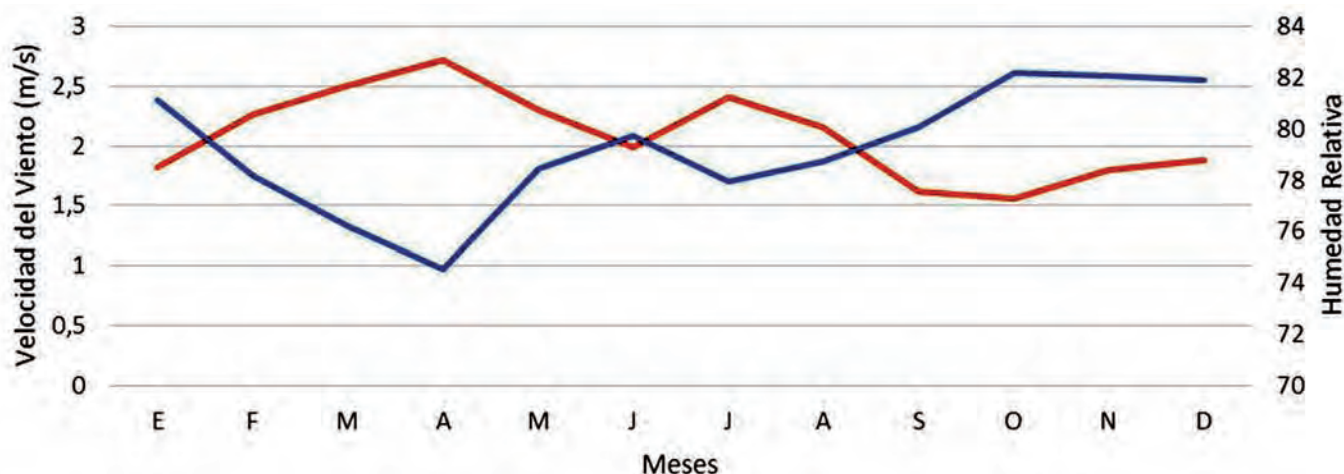


Figura 5. Comportamiento de la humedad relativa y la velocidad del viento.

Los valores de humedad relativa tienen un comportamiento variable durante todo el año, los mayores porcentajes se encuentran entre los meses de septiembre a enero y, los más bajos, en los meses de marzo a mayo y el promedio anual es de 79.2 %, indica que la humedad relativa es alta durante todo el año, lo cual es propicio para el crecimiento vegetativo del cultivo de la caña de azúcar. La velocidad del viento presenta sus mayores valores entre los meses de marzo y mayo y

en el mes de julio; y los menores se encuentran entre los meses de septiembre a enero con una media anual de 2.1 m.s^{-1} , estos valores no afectan, de forma general, los tallos, las cepas o las hojas de este cultivo, pero sí incide en el comportamiento de la evapotranspiración, ya que a medida que aumenta la velocidad del viento también aumenta la evapotranspiración.

CONCLUSIONES

1. La evaporación supera las precipitaciones entre los meses de enero a octubre, por lo que existe un déficit de agua durante gran parte del año.
2. El mes de mayor evapotranspiración para la caña de azúcar es el mes de julio y las precipitaciones entre el 50 y 75 % de probabilidad confirman que son insuficientes para la exigencia del cultivo.
3. Las variables climáticas (temperatura máxima, mínima, humedad relativa) manifiestan un comportamiento favorable para el desarrollo del cultivo en la zona y los valores de velocidad del viento no tienen influencia negativa para el cultivo, en cuanto a daños mecánicos, aunque esta afecta su evapotranspiración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lapinel, B; Cutre, V. y Fonseca, C. 2010. ¿Se humedecerá la sequía? Granma (Cu), junio 12:8. ISSN: 0864-0424.
2. Pérez, L. J., Cuellar, A., De León, M., Santana, S., Fonseca, A., Pérez, I. M. 2004. Caña de azúcar: Captación, conservación y manejo del agua y la humedad del suelo. Cuba & Caña. Boletín especial No.1. p. 43.
3. Avalos, J y J. Pacheco (2012). Programación del riego de la caña de azúcar en la provincia de Villa Clara, Cuba. Revista Ciencia y Técnica Agropecuaria, vol. 21, No 4, pp, 61-66. ISSN-1010-2760.
4. Hernández, I. 2007. Requerimientos hídricos para la caña de azúcar en las condiciones de bajo nivel pluviométrico. Cuba Caña No 3.p: 3 – 11
5. Pérez, D. Y., Herrera, P. J. & González, R. F. (2016). Estimación de los requerimientos de agua del sorgo (*Sorghum vulgare* L. Monech) en la región Los Palacios en Cuba. [Versión electrónica], Revista Ingeniería Agrícola, 6 (4), pp. 3-10, ISSN-2227-8761.
6. Inojosa, L., Menéndez, A., Angarica, E & R, Más. 2005. Preselección de áreas agrícolas destinadas al cultivo de la caña de azúcar para la producción de etanol combustible. Edo Zulia, Venezuela, 521 pp.
7. Herrero, M. (1985). Clasificación del régimen de lluvia anual según su cantidad en las zonas cañeras de Cuba.
8. Cassalet Dávila, C.; J. Torres Aguas y C. I. Echeverri. 1995. El cultivo de la caña de azúcar en la zona azucarera de Colombia. CENICAÑA, Cali, Colombia.
9. Liu, D. L.; G. Kingston and T. A. Bull. 1998. A new technique for determining the thermal parameters of phonological development in sugarcane, including suboptimum and supra-optimum temperature regimes. Agricultural and Forest Meteorology 90 (1998): 119-139.
10. Romero, R. E., Tonatto, J., Scandalari, J., Digonzelli, P y Leggio, N. M (2010). Efectos de la temperatura en la emergencia y el crecimiento inicial de caña planta y primera soca, variedad TUCCP 77-42. [Versión electrónica] Revista Industrial y Agrícola de Tucumán Tomo 87 (1), pp. 7-14, ISSN 0370-5404.

Determinación de las propiedades de las cenizas bagaceras para su uso en la construcción

Norma G. Barnes, Nicolás Cisterna, Patricia M. Albarracín y Daniel Borkosky

Departamento de Ingeniería de Procesos e Industrial, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología (FACET), Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Avenida Independencia 1800, 4000 S.M. de Tucumán, Argentina. nbarnes@herrera.unt.edu.ar

RESUMEN

La confección de ladrillo cerámico a partir de arcillas cocidas, la producción de eco-ladrillos, fabricados con residuos sólidos industriales, es una alternativa para solucionar la problemática ambiental generada por la producción de cenizas en calderas bagaceras. Para este trabajo, se determinaron en laboratorio las propiedades físicas, químicas y mineralógicas de la ceniza de bagazo. Se determinó la resistencia mecánica en una máquina de compresión simple marca SOILTEST. Se construyeron probetas por duplicado, con proporciones de ceniza del 10 al 60 %, activadas con 20 % de cal hidratada y se completó con arena. Estos ensayos mostraron una resistencia muy por debajo de la desarrollada por ladrillos cocidos. Se concluyó que la ceniza, por sí sola, no posee resistencia mecánica; sin embargo, puede ser utilizada como un soporte mecánico similar a la arena para la elaboración de unidades de construcción pre moldeadas, con pequeñas adiciones de cemento.

Palabras clave: cenizas bagaceras, resistencia mecánica, eco-ladrillos.

ABSTRACT

Due to the environmental problems generated by the production of ash in bagasse boilers and, on the other hand, the manufacture of ceramic bricks from cooked clays, the production of *eco-bricks* manufactured with industrial solid waste, is an alternative solution. In this work, the physical, chemical and mineralogical properties of the bagasse ash were determined in the laboratory. The mechanical strength was determined in a simple compression machine brand SOILTEST. Test tubes were constructed in duplicate, with ash proportions from 10 % to 60 %, activated with 20 % hydrated lime and completed with sand. These tests showed a much lower resistance than that developed by fired bricks. It was concluded that the ash itself does not have mechanical strength. However it can be used as a mechanical support similar to sand for the preparation of pre-molded construction units with small additions of cement.

Key words: bagasses ashes, mechanical strength, eco-bricks.

INTRODUCCIÓN

Producir materiales para la construcción requiere de grandes cantidades de energía y recursos, además de altos costos de producción. Por la estrecha relación que existe entre materiales, energía y medioambiente, es necesario recurrir a la producción y uso de nuevos materiales sustentables. Según la ONU, (Organización de las Naciones Unidas), es "...la capacidad de satisfacer las necesidades del presente sin comprometer las necesidades de las futuras generaciones." (1).

Actualmente, la industria azucarera en Argentina utiliza como principal combustible, para la generación de vapor en calderas, una biomasa de origen celulósico, obtenida como residuo de la mecanización de la caña de azúcar, su combustión genera sólidos finos volátiles. El filtro húmedo de gases denominado *scrubbers* es eficiente para el cumplimiento de las normativas vigentes para

efluentes gaseosos, requiere de un tratamiento posterior del agua efluente, que es la disposición de la cantidad de sólidos y cenizas bagaceras, obtenidas en la recuperación del agua.

El ladrillo cerámico, confeccionado a partir de arcillas cocidas a temperaturas de entre 800 y 1050 °C, es uno de los materiales de construcción más empleado en el mundo; sin embargo, para su obtención se requiere de un gran gasto energético que genera una importante cantidad de CO₂. Además, es evidente la creciente escasez de suelos-arcilla y limos aptos para la elaboración de ladrillos de óptimo desempeño y el negativo impacto ambiental en las zonas de donde se extraen esas materias primas.

En la industria de la construcción continuamente se consiguen avances en los materiales utilizados que ofrecen mejores prestaciones, mayor seguridad y preservan el medio ambiente. Ejemplo de esto son materiales puzolánicos que mejoran el comportamiento de los conglomerantes que los incorporan. El término puzolana incluye a todos los materiales inorgánicos, tanto naturales como artificiales, capaces de combinarse directamente con la cal o con el Ca(OH)₂, procedente de la hidratación de los cementos, a temperatura ambiente y en presencia de agua, para formar compuestos similares a los originados en la hidratación de los componentes principales del cemento Portland.

Es objeto de múltiples investigaciones el alto contenido de sílice en las cenizas procedentes de la combustión de residuos agrícolas (biomasa), dependiendo del proceso de combustión, puede tener carácter puzolánico; tal es el caso de materiales como la ceniza de cascarilla de arroz, la ceniza de hojas de bambú y el bagazo de caña de azúcar (2).

En este trabajo se propuso determinar el carácter puzolánico de las cenizas de bagazo. Para ello, se evaluaron sus propiedades físicas, químicas y mineralógicas y su resistencia mecánica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación experimental de composición química de la ceniza

Las muestras fueron secadas en una estufa durante 24 h, a temperatura controlada de 90 °C, posteriormente sobre una base de 50 g fueron calcinadas en una mufla a 700 °C, con el fin de eliminar cualquier resto de materia orgánica no combustionada. La composición química de las cenizas resultantes fue determinada en el Laboratorio de Metales de la Estación Experimental Agro-Industrial Obispo Colombres (EEAOC), Tucumán, Argentina.

Determinación experimental del tamaño de las partículas

Se pesaron 150 g de la muestra húmeda y se secaron 24 horas a temperatura controlada de 90 °C. De la muestra seca se pesaron 100 g, que fueron directamente tamizados en una serie de 8 tamaños de mallas (tamiz N°6, 10, 20, 40, 60, 100, 140, 230 y el fondo), y se obtuvo, directamente, el porcentaje de partículas retenidas en cada malla.

Morfología de las cenizas

Se utilizó un microscopio de barrido electrónico (SEM), a fin de determinar las estructuras en la ceniza. El estado predominante solo podrá ser determinado mediante ensayos de resistencia mecánica de probetas elaboradas con la muestra.

Características mecánicas de la ceniza

Se construyeron probetas de ensayos, constituidas por ceniza-cal-arena, variando las proporciones y fueron al esfuerzo de compresión. Se construyeron por duplicado, con las siguientes proporciones de ceniza: 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % y 60 %, todas ellas activadas con un 20 % de cal hidratada y se completaron con arena. Se utilizó un molde de 3 pulgadas (7.62 cm) de diámetro

interior y una altura 15 cm, con fondo fijo, provisto de un collarín de desarme para el desmolde y un dispositivo de compactación constituido por un enrasador y pistón martillo de 2.5 kg. Se utilizó el método de compactación de Proctor (3, 4) para definir el número de golpes de martillo.

Las probetas, curadas durante 28 días, fueron ensayadas en la máquina de compresión simple de marca Soiltest modelo U-160-A, con una celda de carga modelo Tedeá N° 616.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición química de las cenizas mostró altos porcentajes de SiO_2 y Al_2O_3 , lo que indica un buen comienzo para su potencial utilización como compuesto cementante Puzolánico (tabla 1).

Tabla 1. Composición química de las cenizas bagaceras, (% masa/masa, m/m)

Compuesto	% (m/m)
SiO_2	58
Al_2O_3	26
Fe_2O_3	5.5
CaO	4.6
MgO	1.2
K_2O	3.2
Na_2O	1.5

En la figura 1 se observa que la distribución de los tamaños de las partículas oscila entre 0.25 mm y 0.001 mm, siendo los valores predominantes 0.149 mm (21.84 %), 0.105 mm (18.55 %), 0.063 mm (38.28 %). Según los valores óptimos fijados por las nomas IRAM 35 -75 μm , se puede concluir que, aproximadamente, solo el 40 % de las partículas posee un tamaño aceptable.

La figura 2 muestra una imagen de la ceniza ampliada a través del microscopio de barrido electrónico (SEM). Se pueden diferenciar a simple vista 2 estructuras predominantes, una porosa (estado amorfo), que es la principal responsable de la actividad cementante puzolánica y otras estructuras compactas (estado cristalino) de los aluminosilicatos, que por su dureza semejante a la arena, son un gran soporte mecánico.

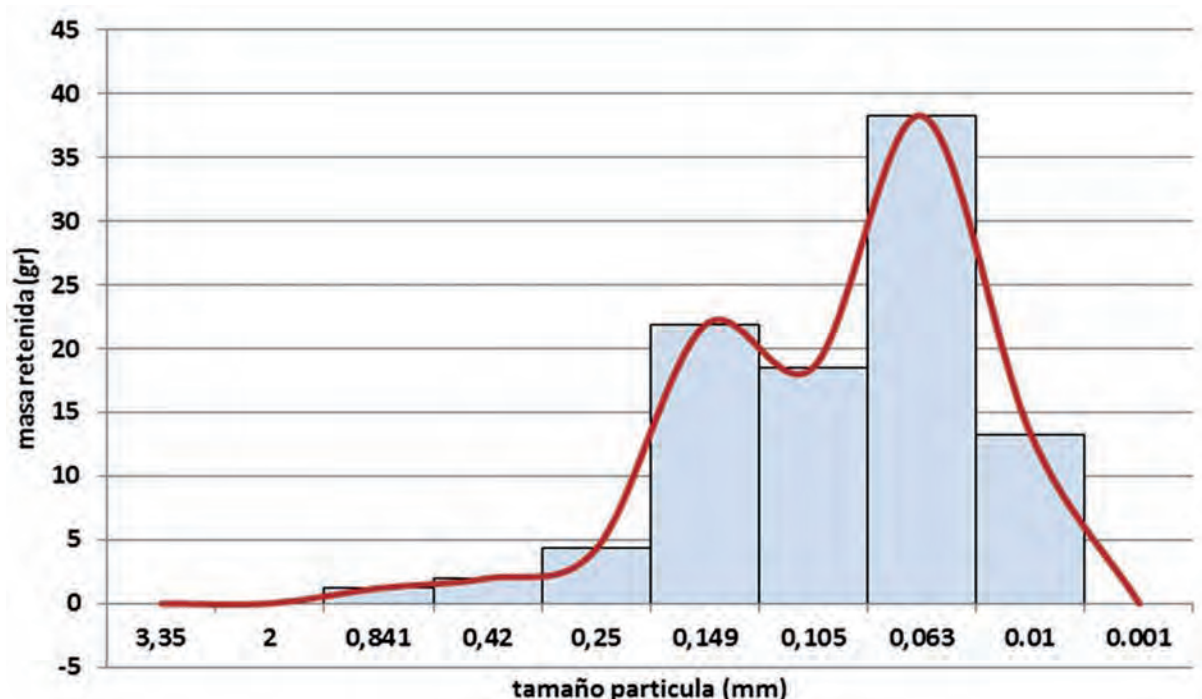


Figura 1. Histograma de distribución de tamaños de partículas de las cenizas bagaceras.

La tabla 2 muestra los valores promedio del esfuerzo de compresión tolerado por cada juego de 2 probetas, con las proporciones de ceniza de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % y 60 % antes mencionadas. Se observa que los morteros ensayados no desarrollaron una gran resistencia mecánica ni presentaron una tendencia a aumentar, cuando fueron sometidos a un esfuerzo de compresión simple, independientemente del incremento de ceniza.

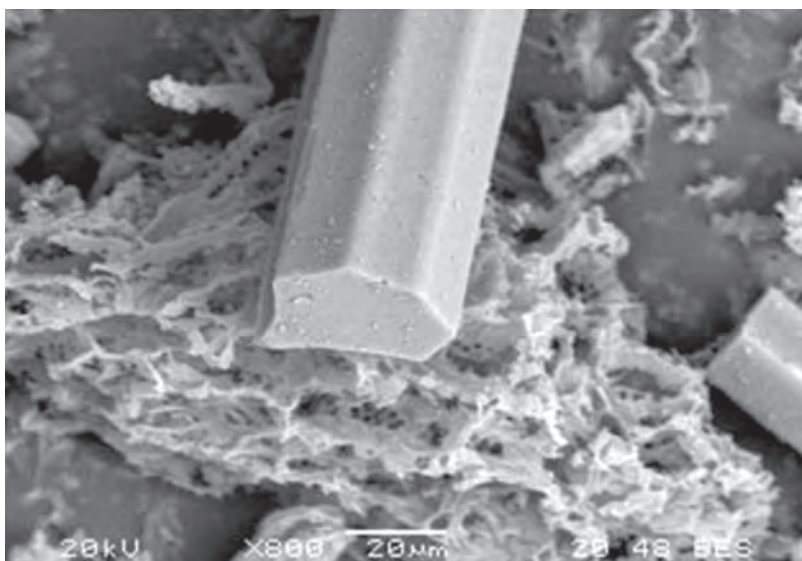


Figura 2. Imagen de la ceniza con microscopio de barrido electrónico (SEM).

Tabla 2. Resistencia mecánica de las cenizas bagaceras: dosificación vs esfuerzo de compresión

Dosificación (%)	Esfuerzo (kg/cm ²)
10	0.85
20	1.06
30	1.28
40	1.57
50	1.89
60	2.13

CONCLUSIONES

La ceniza posee un alto contenido de silicatos y aluminatos y una granulometría moderadamente aceptable, presenta baja actividad puzolánica debido al predominio de la fase cristalina sobre la fase amorfa. Esto queda corroborado mediante los ensayos mecánicos a distintas proporciones cenizas que desarrollaron una resistencia apenas superior a 2 kg/cm², muy por debajo de la resistencia desarrollada por otros elementos de construcción utilizados frecuentemente como ladrillos cocidos, que está en el orden de 22 kg/m².

El hecho que las cenizas posean una baja actividad puzolánica con los elevados porcentajes de aluminatos y silicatos presentes en ellas, se puede atribuir a que el bagazo es quemado a temperaturas muy elevadas en los hogares de las calderas, por encima de los 800 °C, pasando la mayor parte de los aluminatos y silicatos del estado amorfo al cristalino.

La ceniza, por sí sola, como agente cementante no posee muy buen desempeño en cuanto a resistencia mecánica. Sin embargo, dado su gran volumen disponible como residuo de la industria azucarera y sus altos contenidos de silicatos y aluminatos en estado cristalino y en menor medida estado amorfo, continua siendo una fuente importante de materia prima, ya que puede ser utilizada como un soporte mecánico similar a los denominados áridos (arena) para la elaboración de unidades de construcción pre-moldeadas con pequeñas adiciones de cemento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo, Río de Janeiro, 3 al 14 de junio de 1992
2. Fuentes Molina, Natalia; Fragozo Tarifa, Oscar Iván; Vizcaino Mendoza, Lissette (2015) Residuos agroindustriales como adiciones en la elaboración de bloques de concreto no estructural, Revista Universidad Militar Nueva Granada Bogotá, Colombia, 25, (2): 99-116 <https://www.redalyc.org/pdf/911/91142868006.pdf>
3. William Lambe T. y Whitman Robert V. Mecánica de Suelos, Editorial Limusa, S.A. de C.V. grupo Noriega Editores, México. Capítulo 14, 2014, pag. 154-155, ISBN 968-18-1894-6
4. Normas de Ensayos de la Dirección Nacional de Vialidad. 1º Distrito Buenos Aires. VN -E6-84, pág. 33 a 55

Composición de la cera de caña de azúcar y el empleo de solventes para su extracción y fraccionamiento. Enfoque orientado a su aplicación

Manuel Díaz-de los Ríos y Eduardo Hernández-Ramos

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)

Vía Blanca 804 e/ Carretera Central y Calzada Vieja de Guanabacoa, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba

manuel.diaz@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

Se presenta un análisis de las experiencias internacionales sobre la extracción y refinación o fraccionamiento de la cera de caña de azúcar, su caracterización, así como los resultados más promisorios obtenidos mediante la extracción con solventes y su relación con los parámetros de solubilidad de Hansen. Se efectúa un análisis enfocado hacia la obtención de alcoholes superiores (policosanol), debido al interés internacional de su uso como nutraceutico.

Palabras clave: cera de caña de azúcar, cachaza, policosanol, extracción con solventes.

ABSTRACT

An analysis of international experiences on the extraction and refining or fractionation of sugar cane wax, its characterization, as well as the most promising results obtained by solvent extraction and its relationship with Hansen's solubility parameters, is presented. The analysis is carried out focused on obtaining higher alcohols (policosanol), due to the international interest in its use as a nutraceutical.

Key words: sugarcane wax, cachaza, policosanol, solvent extraction.

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones sobre la cera de la caña de azúcar datan del siglo IXX, cuando Avequin (1) extrajo un producto polvoriento al que denominó 'Cerosin'. Sin embargo, no es hasta 1916 que se instala y opera en Durban, Sudáfrica la primera planta industrial para la obtención de cera de caña, a partir de la torta resultante de la clarificación del jugo de caña, o cachaza, como también se le conoce en Cuba (2,3). La producción en el país inició en los antiguos centrales Delicias y Chaparra en los años 1944 y 1947, respectivamente. En la primera mitad del siglo pasado la producción y refinación de cera de caña estaba dirigida a la obtención de materia prima para la sustitución de ceras de carnauba, candelilla y cera de abejas, por lo que muchas plantas enfrentaron dificultades competitivas que llevaron al cierre de algunas de ellas. En 1990 se expande la producción en Cuba con la construcción de alrededor de 9 plantas de extracción y refinación de cera de caña, con vistas a la obtención de un concentrado de alcoholes superiores (policosanol), del que el octacosanol es el componente mayoritario, estas plantas operaron hasta 1995, fecha en que cerraron por razones técnico-económicas.

Los primeros estudios se dirigieron a determinar la composición de la cera de caña, mediante su extracción y fraccionamiento con el empleo de solventes, entre los que se destacaron los alcoholes etílico y metílico (4), hidrocarburos aromáticos no polares e inmiscibles en agua e hidro-

carburos alifáticos (5, 6), keroseno (7) y tolueno (8). Según Balch (8) la acetona y metil-etil cetona son los mejores solventes para el fraccionamiento de la cera de caña. En correspondencia con las aplicaciones que dominaron el mercado durante la primera mitad del siglo pasado, se definieron tres fracciones fundamentales que caracterizaban la cera de caña; una fracción aceitosa (fracción blanda), compuesta, fundamentalmente, por ácidos grasos saturados e insaturados, una fracción de cera refinada o cera dura, como también es denominada por diversos autores, que constituía el producto de mayor interés comercial y una fracción insoluble en la mayoría de los solventes, a la que se denominó resina (9). La fracción de cera dura es separada de la resina con solventes como metil-eter, hexano, pentano y heptano con relación solvente: cera de 4:1. Refiere Rao (10), que el mejor solvente para la refinación de la cera cruda es el alcohol isopropílico que, en la actualidad, es el solvente empleado por la técnica analítica destinada a evaluar el contenido de cera dura en la cera cruda de caña.

Whyte *et al.* (11), estudiaron la fracción de aceite de la cera cruda y concluyeron que la composición del aceite de cera de caña cubano no difiere de la reportada para esta fracción, obtenida en India, África del Sur y Luisiana, compuesta por esteroides y ácidos grasos, entre los cuales son mayoritarios los ácidos linoleicos, palmítico, arachídico y linolénico, entre otros.

La composición de la cera de caña de azúcar depende de muchos factores, entre los que se encuentran la variedad de la caña (12) y la sección de la planta que se analice (13), pues la corteza o cutícula, las hojas y los nudos de la planta muestran composiciones diferentes. La superficie cerosa en las plantas constituye un elemento protector contra insectos y previene la pérdida de humedad, por lo que las condiciones edafoclimáticas también inciden en la composición de la cera de caña de azúcar. Diversos trabajos abordan el estudio de la composición de la cera cuticular de la caña de azúcar, obtenida mediante variados procedimientos extractivos, en los que estas diferencias se manifiestan; sin embargo, la caracterización de la cera obtenida a partir de la torta de los filtros, también muestra diferencias con la cera cuticular ya que, además de depender del proceso de cosecha, existen factores vinculados al proceso de producción del azúcar que pueden incidir en el nivel de extracción y composición de la cera, tales como el nivel de preparación de la caña, la temperatura del agua de imbibición y el método de clarificación del jugo de caña que se emplee.

La clasificación de la cera cruda de caña de azúcar en fracciones aceite o cera blanda, cera dura y resina, dirigió el proceso industrial hasta mediados del siglo pasado; sin embargo, los nuevos usos de la cera en la industria farmacéutica y otras aplicaciones especiales exigen de un nuevo enfoque sobre la caracterización de la cera de caña y de los procedimientos para su fraccionamiento.

Composición de la cera de caña de azúcar

Entre los primeros estudios reportados sobre la determinación cuantitativa de los componentes de la cera de caña de azúcar, especialmente de la cutícula de esta, se destaca el trabajo desarrollado por Horn *et al.* (14), quienes mediante un complejo proceso de saponificación y fraccionamiento, así como el uso de técnicas de destilación molecular y columnas cromatográficas, entre otros, reportan la presencia de ácidos no saturados, hidrocarburos de alto peso molecular, alcoholes (octacosanol mayoritario entre estos), así como cetonas saturadas y α,β -insaturadas; no aldehídos.

La presencia de aldehídos en la caña ya había sido enunciada por Lamberton *et al.* (15), quienes destacaron la existencia de aldehídos de cadena larga en forma polimérica, como resultado de una posible reacción de Cannizzaro. Además, indican la presencia de alcoholes, ácidos e hidrocarburos en menor magnitud, pero no logran evidenciar la presencia de ésteres. Posteriormente, Asikin *et al.* (16), ratificó la presencia de aldehídos, esteroides y ésteres entre un 55-60 %, mientras los alcoholes y pequeñas cantidades de triglicéridos y ácidos alcanza un 32-40 %. En sus estudios empleó diversas técnicas de análisis instrumental, tales como HPLC, GC y GC con masa acoplada, que le permitieron identificar y cuantificar la composición de la cera.

Martínez *et al.* (17), quienes proponen un método para el fraccionamiento de los principales componentes de la cera cruda, identifican alcoholes superiores, ácidos grasos y esteroides; sin embargo, en su trabajo no identifican aldehídos libres ni en forma polimérica.

Otro estudio dirigido a la caracterización de la cera de la corteza de la caña (18), sustentado en técnicas de espectroscopía infrarroja, cromatografía de capa delgada y cromatografía gaseosa con espectroscopía de masa acoplada, reporta la presencia de ésteres, como componentes mayoritarios, ácidos grasos, así como alcoholes y aldehídos, aunque estos últimos en proporciones muy reducidas respecto a las concentraciones reportadas por otros autores (13, 16).

Un estudio reciente desarrollado por Attard, *et al.* (13) reporta una caracterización rigurosa de la cera de caña de azúcar extraída del bagazo, las hojas y los nudos de la planta, mediante métodos de extracción supercrítica con CO₂ y el empleo de hexano como solvente; y se evidencian ciertas diferencias en la composición de las diversas partes de la planta. En su estudio determinaron hasta 74 componentes diferentes mediante cromatografía gaseosa acoplada con masas, y evidencia que los aldehídos constituyen el componente mayoritario en el bagazo de caña y en los anillos de la planta, seguidos por el contenido de alcoholes superiores, que coincide con los resultados de Asikin *et al.* (16).

En la figura 1 se comparan los resultados de la caracterización obtenidos por varios autores, cuyas diferencias, además de estar determinadas unas por estudios que se refieren a cera de cachaza extraída con solventes, y otras aluden a cera de cutícula, existen diferentes factores imposibles de precisar mediante el estudio de los trabajos, como son la variedad de caña empleada y las condiciones climáticas bajo las cuales se desarrollaron los cultivos. No obstante estas diferencias, se puede afirmar que los aldehídos libres y/o polimerizados, los alcoholes de alto peso molecular y ésteres constituyen los componentes mayoritarios, así como una no menos importante fracción de ácidos grasos y esteroides.

Se observa que las áreas morada, gris y carmelita, tramadas o de color entero (aldehídos, alcoholes y ésteres), representan los mayores valores porcentuales, independientemente del origen de la cera. Los alcoholes están presentes entre el 15 y el 25 %, considerando los libres y los resultantes de la saponificación de ésteres.

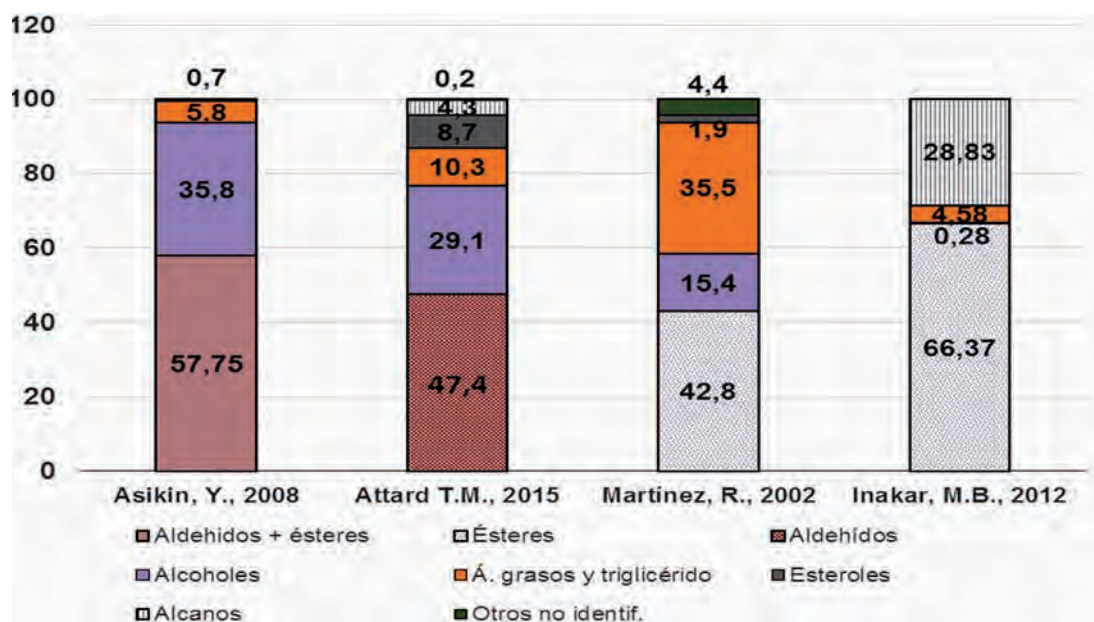


Figura 1. Composición de ceras según diversos autores (Asikin: cera en anillos de la caña, Attard: cera de bagazo, Martínez: cera cruda de cachaza, Inakar: cera de corteza de caña).

Por tanto, un fraccionamiento o refinación adecuada de la cera cruda está en correspondencia con el destino final de la fracción deseada. En el caso de la producción de policosanol se requieren separar las fracciones de ácidos grasos (4-36 %) y las fracciones de aldehídos (45-60 %).

Parámetros de solubilidad de Hansen (HSPs) como herramienta para la selección de solventes. Fundamentos básicos

El empleo de los parámetros de solubilidad de Hansen (19) como herramienta para la selección de solventes apropiados para la extracción y fraccionamiento de cera de caña no fue posible hasta después de 1967, fecha en que fue formulada esta teoría, por lo que la mayoría de los estudios previos, e incluso los posteriores, fundamentan la selección de solventes sobre experiencias prácticas. Dicha teoría se basa en el principio de que sustancias semejantes se atraen; *like attracts like*.

La fuerza de atracción entre dos moléculas se conoce como fuerzas de van der Waals, la cual se debe a la interacción electromagnética entre ellas. El valor total de estas fuerzas se refleja en un valor de solubilidad simple, denominado parámetro de Hildebrand, el que expresa la solvencia característica de un compuesto determinado, la cual se deriva de su calor de vaporización, según:

δ : parámetro de Hildebrand ($\text{MPa}^{1/2}$)

$$\delta = \sqrt{c} = \left[\frac{\Delta H - R \cdot T}{V_m} \right]^{1/2} \quad \text{Ec. 1}$$

ΔH : calor de vaporización (kJ.kg^{-1})

R : constante universal de los gases ($\text{L.Pa.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)

T : temperatura absoluta (K)

V_m : volumen molar (L.mol^{-1})

Dado que la teoría de Hildebrand se sustentó solo en el estudio de hidrocarburos, no consideró la influencia de los enlaces de hidrógenos y los solventes polares, por lo que presenta limitaciones para expresar el amplio espectro de las relaciones soluto:solvente de la vida real. El cuadrado del parámetro de Hildebrand es el resultado de tres fuerzas de carácter aditivo: fuerza de dispersión (δ_d), fuerza de enlace de hidrógeno (δ_h) y fuerza polar (δ_p).

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad \text{Ec. 2}$$

Los parámetros de Hansen de los diversos solventes y solutos pueden ser representados en un gráfico tridimensional x,y,z (δ_d , δ_p y δ_h). Los solventes en los cuales el soluto es soluble son aquellos cuya ubicación espacial es cercana al soluto. La distancia espacial entre el solvente (a) y el soluto (b), denominada usualmente R_a , puede ser determinada por la expresión:

$$R_a = \left[4 \cdot (\delta_{da} - \delta_{db})^2 + (\delta_{pa} - \delta_{pb})^2 + (\delta_{ha} - \delta_{hb})^2 \right]^{1/2} \quad \text{Ec. 3}$$

La evaluación experimental de un soluto con decenas de solventes permite clasificarlos en 'buenos' y 'malos' solventes, por lo que el soluto seleccionado debe poseer, entonces, parámetros de Hansen, de forma que todos los buenos solventes lo rodeen en una región esférica hipotética de diámetro R_0 , denominada esfera de Hansen; por lo que los buenos solventes tendrán una diferencia de energía relativa (RED), definida como la razón $R_a:R_0$, cuyos valores serán inferiores a 1, ya que para los buenos más alejados del soluto (superficie de la esfera) se cumple que $R_a=R_0$.

$$RED = \frac{R_a}{R_0} \quad \text{Ec. 4}$$

Los parámetros de Hansen pueden ser estimados también mediante métodos de contribución de grupos funcionales (20).

La determinación de los HSPs de la mezcla puede ser calculada por:

$$\delta_{im,j} = \sum_{j=1}^N X_{vj} \cdot \delta_{i,j} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde, $\delta_{im,j}$ es el parámetro de Hansen para la mezcla (δ_D , δ_P y δ_H para i igual a D, P o H); X_{vj} es la fracción volumétrica del componente j en la mezcla y $\delta_{i,j}$ es el correspondiente parámetro de Hansen (D, P o H) del componente j

El empleo de solvente en la extracción y fraccionamiento de cera de caña de azúcar.

Enfoque hacia la extracción de alcoholes superiores (policosanol)

Las primeras técnicas desarrolladas para la extracción y fraccionamiento de cera de caña de azúcar, a partir de la cachaza, se basaron en métodos de extracción con solventes. Posteriormente, se han desarrollado técnicas para la extracción de la corteza de la caña, así como métodos de extracción supercrítica con CO_2 , aunque los métodos de extracción con solventes continúan siendo atractivos para muchos productores, dada su relativa simplicidad. El presente trabajo pretende revisar los resultados obtenidos por diferentes autores en la extracción de cera de caña con el empleo de diversos solventes, así como su revisión a la luz de la teoría de solubilidad de Hansen y su orientación hacia la obtención de policosanol, por constituir esta fracción el uso más atractivo de la cera de caña de azúcar y, tal vez, su producto más revalorizado.

A partir de las definiciones analíticas existentes, donde se considera aceite a la fracción líquida soluble en acetona fría y la fracción cera dura a la extraída en isopropanol caliente, estudios recientes (21, 22) reportan los parámetros de solubilidad de Hansen (HSPs) de ambas fracciones, que se informan en la tabla 1. En esta se han incluido estimados de dichos parámetros para la fracción aldehído a partir de los resultados analíticos reportados por Attard, *et al.* (13), según la metodología descrita por Abbott *et al.* (20) para la estimación de los parámetros en mezclas de componentes y empleada por Díaz de los Ríos, para la cera de caña (23).

Tabla 1. Parámetros de Hansen de diversas fracciones de la cera de caña de azúcar

Fracción	δ_D	δ_P	δ_H	Referencia
Aceite	16.24	3.21	10.34	(21)
Cera dura o refinada	17.76	2.78	2.02	(22)
Aldehídos	15.90	1.90	4.50	Yamamoto, H. (21) y mezclas
Policosanol	15.90	1.70	4.41	Yamamoto, H. (21) y mezclas
Octacosanol	15.90	1.70	4.50	Yamamoto, H. (21)

La tabla 2 muestra los resultados alcanzados por diversos autores en la extracción de cera de caña, a partir de cachaza o de diversas partes de la planta mediante el empleo de solventes. En esta tabla solo han sido considerados aquellos estudios en los que el autor evalúa más de un solvente en iguales condiciones para compararlos entre sí, de acuerdo con el nivel de extracción alcanzado y su relación con los HSPs.

En el caso de extracción de aceite, Azzam (24) y Araújo de Olivera (25) los mejores resultados extractivos coinciden con los menores valores de R_a resultando, en este caso, el empleo de tolueno y limoneno, respectivamente. Esta coincidencia no se observa para los resultados reportados por Bhosale *et al.* (26) y García *et al.* (27).

Sin embargo, si se considera la fracción cera, se aprecia una coincidencia entre los mejores valores extractivos y los menores valores de Ra en los trabajos de Azzam, (24) y García *et al.* (27).

Tabla 2. Resultados extractivos en cera de caña obtenidos por diversos autores y el nivel de afinidad con diversas fracciones de la cera, expresada mediante la determinación de la distancia entre las moléculas soluto –solventes(Ra)

Cachaza									
Solvente	δ_D	δ_P	δ_H	% Extra. Cera	Ra_aceite	Ra_cera	Ra_aldeh	Ra_octac	Autor
Tolueno	18.0	1.4	2.0	12.71	9.23	1.46	4.91	4.90	(24)
Nafta	15.6	0.17	0.24	12.43	10.62	5.35	4.64	4.57	
Etanol fino	15.8	9.2	20.5	12.07	11.85	19.99	17.61	17.70	
Gasolina (dodecano)	16	0	0	11.90	10.84	4.92	4.89	4.81	
Benceno	18.0	0.0	2.0	7.15	9.60	2.82	5.24	5.17	(26)
Tolueno	18.0	1.4	2.0	5.50	9.23	1.46	4.91	4.90	
Corteza o cutícula									
Tolueno	18.0	1.4	2.0	4.22	9.23	1.46	4.91	4.90	(27)
Tricloroetileno	18.0	3.1	5.3	3.72	6.15	3.33	4.44	4.50	
Limoneno	17.2	1.8	4.3	64.45	6.49	2.72	2.61	2.61	(25)
Pineno	16.9	1.8	3.1	39.11	7.49	2.26	2.44	2.44	
Hexano	14.9	0.0	0.0	8.34	11.15	6.67	5.28	5.21	

Un aspecto interesante es que los HSPs determinados para la mezcla de aldehídos, según composición reportada por Attard *et al.* (13) y los del octacosanol y policosanol son semejantes, por lo que resulta difícil separar ambas fracciones y siempre se reporta en la cera refinada la presencia de aldehídos, en mayor o menor cuantía.

En la tabla 3 se registran los resultados obtenidos por diversos autores en la extracción, purificación y fraccionamiento de cera de caña de azúcar, así como los parámetros de Hansen de los solventes o mezclas de solventes empleados, calculados según el procedimiento descrito por Hansen (19). Aunque la comparación resulta difícil, pues se desconocen las posibles diferencias que pueden existir entre los diversos trabajos, se evidencia que entre los dirigidos a la separación de aceites se destacan como más afines a esta fracción las mezclas de solventes (28), particularmente la que emplea una mezcla cloroformo:metanol. Sin embargo, se evidencia un elevado nivel de extracción con el empleo de tricloroetileno; aunque, en ocasiones, el incremento del rendimiento está dado por el arrastre de otras fracciones de la cera y no por su selectividad por la fracción deseada, como ocurre durante la extracción con acetona o con etanol.

Entre las experiencias dirigidas hacia la extracción de cera, todos los solventes evaluados en la tabla 3 reportan valores aceptables, aunque el tolueno (tabla 1) parece ser un mejor solvente, ratificado por el bajo valor de Ra. Aunque el etanol no resulta un solvente adecuado para la extracción y refinación de cera (22) es utilizado con resultados aceptables, lo que se ve favorecido por ser un solvente “verde” de bajo costo y que se obtiene a partir de fuentes renovables.

Los trabajos de Asikin *et al.* (16) ratifican el valor del empleo de mezclas para la extracción de las fracciones de alcoholes superiores y aldehídos, dados los bajos valores de Ra reportados para las mezclas hexano: metanol y cloroformo: metanol. No obstante, la mezcla n-butil alcohol: tetracloruro de carbono pudiera propiciar un buen resultado para ambas fracciones.

Tabla 3. Solventes empleados en la extracción y/o fraccionamiento de la cera de caña de azúcar por diversos autores

Solvente	Ref.	δ_D	δ_P	δ_H	% extracc	Ra_aceite	Ra_cera	Ra_aldeh.	Ra_octac.	Objetivo	Fuente
n-hexano	29	14.9	0	0	9.80	11.15	6.67	5.28	5.21	a	1
heptano	9	15.3	0	0		10.99	6.00	5.03	4.96	a	2
etanol 96 % v/v	31	15.8	9.1	20.3	7.71	11.61	19.75	17.37	17.46	a	3
n hexano	32	14.9	0	0	9.69	11.15	6.67	5.28	5.21	a	1
hexano: metanol 20:1 v/v	16	14.9	0.6	1.1		10.01	6.22	4.20	4.14	b	4
cloroformo : metanol 2:1 v/v		16.8	6.2	11.2		3.26	10.02	8.16	8.26	c	4
cloroformo : metanol 2:1 v/v	30	16.8	6.2	11.2		3.26	10.02	8.16	8.26	d	5
benceno		18.0	0.0	2.0		9.60	2.82	5.24	5.17	d	5
hexano		14.9	0	0		11.15	6.67	5.28	5.21	d	5
n butil alcohol	29	15.1	5.7	15.9	25.30	6.50	15.15	12.12	12.19	e	6
isopropil alcohol		15.8	6.1	16.4	27.50	6.77	15.27	12.62	12.69	e	6
tetracloruro de carbono		17.8	0	0.6	26.90	10.72	3.12	5.77	5.70	e	6
dicloroetano		16.5	7.8	3	32.50	8.67	5.70	6.20	6.40	e	6
cis 1,2 dicloroetileno		17	8	3.2	31.80	8.73	5.56	6.61	6.80	e	6
diclorometano		17	7.3	7.1	33.40	5.43	6.97	6.38	6.55	e	6
tricloroetileno		18	3.1	5.3	46.00	6.15	3.33	4.44	4.50	e	6
n butil alcohol: tetraloruro de carbono 35:65 % v/v		16.9	2.0	6.0	30.70	4.71	4.40	2.40	2.42	e	6
n butilacohol: dicloroetano 15:85 % v/v		16.3	7.5	4.9	32.20	6.89	6.27	5.66	5.85	e	6
isopropil alcohol: dicloroetano 25:75 % v/v		16.3	7.4	6.4	33.81	5.77	6.94	5.84	6.03	e	6
n butil alcohol: 1,2 dicloroetileno 80:20 % v/v		15.5	6.2	13.4	31.10	4.49	12.68	9.87	9.95	e	6

Objetivo: a) Extracción de cera cruda, b) Extracción de policosanol, c) Extracción de aldehídos, d) Extracción de lípidos, e) Extracción de aceite

Fuente: 1: cachaza seca, 2: cachaza húmeda, 3: cachaza, 4: cera de anillos, 5: anillos de cala, 6: cera cruda.

Para la determinación de los HSPs de la fracción aceite, Hernández *et al.* (21) concluyen que el etanol puede ser empleado para separar esta, aunque los mejores solventes, de acuerdo con su valor de Ra, fueron 1-octanol, 1-decanol y etilenglicol monobutil éter. La elección de uno u otro debe efectuarse sobre la base de un análisis de costo-beneficio.

Sin embargo, la obtención de una fracción rica en octacosanol con un bajo contenido de aldehídos resulta, como se ha dicho, algo más compleja, debido a la similitud de los HSPs de alcoholes superiores y aldehídos. El análisis de los resultados de literatura y la determinación de los HSPs para ambas fracciones no permite arribar a soluciones conclusivas, considerando solo los aspectos de solubilidad, por lo que deberán valorarse otras propiedades físicas de ambas fracciones para sugerir un método de fraccionamiento altamente eficiente.

CONCLUSIONES

Se brinda un análisis de los diversos estudios reportados para la extracción y fraccionamiento de la cera de caña de azúcar enfocado en la obtención de policosanol, por ser este producto, su derivado comercialmente más atractivo. Se evidencia que se han reportado buenas mezclas de solventes para la extracción de la fracción aceite, así como la importancia de evaluar algunos solventes para este propósito, tales como el 1-octanol, 1-decanol y etilenglicol monobutil éter. La separación de la fracción rica en aldehídos, resulta más compleja, dada la semejanza de los HSPs con los de los alcoholes superiores, por lo que, a pesar de la existencia de producciones comerciales de policosanol, aún se requieren estudios para la introducción de mejoras tecnológicas de esta producción mediante la extracción con solventes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avequin, M. "de wasachtige Matter of Sugarcane" Ann. Chim. Phys. (2), 75, 218-222 (1840) Suikerriet wax, https://en.wikipedia.org/wiki/Sugarcane_wax.
2. Balch, R.T. and Hockett, R.C. "Wax and Fatty By-products from Sugar Cane" Technol. Rep. Ser. No. 3. Literary Licensing, LLC, 2013, ISBN: 1258611708, 9781258611705, 1947.
3. Ray, S.C. Studies of conversion of crude waste extracted from sugar cane pressmud in industrial quality wax, PhD Thesis, Faculty of Engineering & Technology, SwamiramanandTeerth-Marathwada University, 2003.
4. Rosales, M.A. and Oriental Negros, B. Extraction of Sugarcane wax, US Pat. 2009 522, Estados Unidos, 1931.
5. Swenson, O.J. Method of extracting wax from cachaza, US Pat. 2508002A, Estados Unidos, 1947.
6. Rhodes, F. H., and Swenson, O. J. U. S. Pat. 24228813A, Estados Unidos, 1947.
7. Lake, A.W. Recovery of sugarcane wax, US Pat. 3931258A, Estados Unidos, 1973.
8. Balch, T.R. Hard waxes and fatty products derived from crude sugar cane waxes, US Pat. 2381420, Estados Unidos, 1942.
9. Swenson, O.J. Method of extracting wax from cachaza, US Pat. 2464189A, Estados Unidos, 1946.
10. Rao, J.M. Need to develop cane wax production by the world sugar industry, <http://www.issct.org/pdf/proceedings/1980>.
11. Whyte, D.E and Hengeveld, B. Chemical Examination of Sugar Cane Oil, JAOCS, 27, 57–60, 1950.

12. Weerawatanakorn, M., Asikin, Y., Takahashi, M., Tamaki, H., Wada, K. Ho, Chi-Tang and Chuekittisak, R. Physico-chemical properties, wax composition, aroma profiles, and antioxidant activity of granulated non-centrifugal sugars from sugarcane cultivars of Thailand. *J. Food Sci. Technol.* 53, 4084–4092, 2016. [https://doi.org/ 10.1007/s13197-016-2415-5](https://doi.org/10.1007/s13197-016-2415-5).
13. Attard, T.M., McElroy, C.Rob, Rezende, C.A., Polikarpov, I., Clark, J.H. and Hunt, A.J. Sugar-cane waste as a valuable source of lipophilic molecules. *Ind. Crops Prod.*, 76, 95–103, 2015.
14. Horn, D.H.S. and Matic, M. An investigation of sugar-cane cuticular wax, *J. Sci. FoodAgric.*, 8, October, 571-577, 1957.
15. Lamberton, J.A and Redcliffe, A.H. The chemistry of sugar-cane wax. I- The nature of sugar-cane wax, 1959; <https://fddocuments.in/document/the-chemistry-of-sugar-cane-wax-i-the-nature-of-sugar-cane-wax.html>.
16. Asikin, Y. Waxes, policosanols and aldehydes in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and okinawan brown sugar (kokuto), Bogor Agricultural University, Master of Science Thesis, Department of Food Science and Technology, 2008.
17. Martínez, R., Castro, I. and Oliveros, M. Characterization of Products from Sugar Cane Mud, *Revista de la Sociedad Química de México*, Vol. 46, Núm. 1, 64-66, 2002.
18. Inarkar, M.B. and Lele, S.S. Extraction and Characterization of Sugarcane PeelWax. *ISRN Agron.*, Article ID 340158, 1-6, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/340158>.
19. Hansen C.M. 2007. Solubility parameters-an introduction. Hansen solubility parameters: a user's handbook. CRC, Boca Raton, 43-66. ISBN 978-0-9551220-2-6.
20. Abbott, S. and Yamamoto, H. HSPiP software, 5th Edition, 2015.
21. Hernández, E., Díaz, M. and Pérez, K. Determination of Hansen Solubility Parameters for sugarcane oil. Use of ethanol in sugarcane wax refining. *GrasasAceites* 72 (2), e408. (2021) In press.
22. Hernández, E., Díaz, M. Determination of Hansen solubility parameters of refined sugarcane wax, Informe interno, 2020.
23. Díaz de los Ríos, M. Interpretación de la relación entre aminoácidos y la cutícula de las hojas de la caña de azúcar durante su fertilización foliar mediante los parámetros de solubilidad de Hansen. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 53 (3) (2019).
24. Azzam, A.M. Separation and Analysis of Wax from Egyptian Sugar Cane Filter Press Cake. *Eur. J. Lipid Sci. Tech*, 86 (6), 247-250 (1984).
25. Araújo de Oliveira, R.M., Avaliação de terpenos como solventes no processo de extração da cera de cana-de-açúcar, Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2018.
26. Bhosale P. R., ChondeSonal G. and Raut P. D. Studies on extraction of sugarcane wax from press mud of sugar factories from kolhapur district Maharashtra, *Journal of Environmental Research And Development* Vol. 6 No. 3A, Jan-March 2012.
27. García, A., García, M.A., Ribas, M. and Brown, A. Recuperación de cera de cutícula de caña de azúcar mediante separación mecánica y extracción con solventes. *Grasas Aceites*, 54 (2), 169-174 (2003).
28. Prasad-Shukla, R. Studies on manufacture of refined and modified sugarcane wax from press mud a byproduct of sugar industry, PhD Thesis, University of Kanpur, Department of Organic Chemistry, 1987.
29. Chakhathanbordee, R., Khotavivattana, S. and Siroth, K. Development of sugarcane wax extraction methods from sugarcane filter cake for value creation. *Research and Development. Journal Science and Technology*, 11, 95-106, 2016.
30. Hiroko SHo, H., Chinen, I. and Uchihara, K. Separation and Partial Purification of Wax and Fatty Alcohol from Okinawan Sugar Cane Rind Lipids, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 29, 313-322, 1983.

31. San Anastacio-Rebollar, I.M., García, D.R., Hernández-González, R.C., Guerra-Rodríguez, L.E. and Villanueva-Ramos, G. Extracción de cera a partir de cachaza con etanol 96 °GL a escala de laboratorio, *Tecnol. Quim.*, XXXVII (1) 159-175, 2017.
32. Muñoz, M.R. Evaluación del potencial de la cera de cachaza como un coproducto de la caña de azúcar. <https://www.researchgate.net/publication/331021941>

Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from sugarcane and sugarcane derivatives environments

Lisandra Martínez-Valdés, María Teresa Fernández-Santisteban, Roberto C. Arísticas-Ribalta, Amanda Montes-Alvarez, Meinardo Lafargue-Gámez and Reinaldo Fraga-Vidal*

Cuban Research Institute on Sugarcane By-Products (ICIDCA). P.O. Box 4026, 11000, Havana, Cuba. Tel. 053-7-696-7015; Fax: 053-7-988243. ORCID: 0000-0002-6629-2056

*reinaldo.fraga@icidca.azcuba.cu

ABSTRACT

Phosphorus an essential element for the growth and development of plants, is found in most soils in insoluble form. A large number of microorganisms in the soil have a high capacity for solubilization and mineralization of P. In this sense, the efficiency with which plants are able to access this nutrient through microbial associations could be of considerable economic and environmental benefit. In the present work, phosphate solubilizing bacteria were isolated and characterized from rhizospheric soil, press mud and residual water from biogas production. The isolates were identified as *Pseudomonas luteola* and *Burkholderia cepacia* using the API 20NE system. In the microorganisms studied, their ability to solubilize mineral P and organic P mineralization was determined, showing different solubilization patterns and acid phosphatase activity. The results indicate the strain *Pseudomonas luteola* C3, is the most promising to be used as a microbial inoculant in biofertilizer formulations.

Key words: phosphate solubilization, phosphate mineralization, phosphatases, biofertilization, phosphate solubilizing bacteria.

RESUMEN

El fósforo un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, se encuentra en la mayoría de los suelos en forma insoluble. Un gran número de microorganismos en el suelo tiene la capacidad para la solubilización y mineralización de P. En este sentido, la eficiencia con la cual las plantas son capaces de acceder a este nutriente a través de asociaciones microbianas pudiera ser de considerable beneficio económico y ambiental. En el presente trabajo, bacterias solubilizadoras de fosfatos fueron aisladas a partir de suelo rizosférico, fango y agua residual de la producción de biogás y caracterizadas. Los aislados fueron identificados como *Pseudomonas luteola* and *Burkholderia cepacia* usando el sistema API 20NE. En los microorganismos estudiados se determinó su capacidad para solubilizar el P mineral y la mineralización del P orgánico, mostrando diferentes patrones de solubilización y actividad de ácido fosfatasa. Los resultados indican que la cepa de *Pseudomonas luteola* C3 es la más prometedora para ser utilizada como un inoculante microbial en formulaciones de biofertilizantes.

Palabras clave: solubilización de fosfato, mineralización de fosfato, fosfatasa, biofertilización, bacterias solubilizadoras de fosfato.

INTRODUCTION

Phosphorus (P) is an essential nutrient for the growth and development of plants. However, compared to the rest of the macronutrients, it is the element of less mobility and availability in most soils

(1, 2, 3). Although it is abundant in organic and inorganic forms, P is a limiting factor for the growth of plants (4). In contrast to the nitrogen (N) acquisition from the atmosphere through biological fixation, P has to be supplied by the application of phosphorus fertilizers to achieve and maintain high levels of crop productivity (5).

The global reserve of P can be reduced in the next 50-100 years (6), because it is a non-renewable source. Therefore, the efficiency with which plants are able to access soil P through microbial associations could be of considerable economic and environmental consequence. The problem is that the recovery of P by plants from fertilizer is poor; only 10-20 % of the applied P is obtained in the year of application (7, 8). This is because most of the applied P is rapidly "fixed" in the soil in fractions that are poorly available to the plant roots. Plant growth promoting bacteria (PGPB) exert a beneficial effect on crops and ecosystems. Within this large group, we found bacteria, capable of solubilizing mineral and organic P present in soil (9, 10, 11), thus playing a fundamental role in the increased availability of this nutrient for plants. The continuous use of these bacteria as natural fertilizers is a strategy for the development of a sustainable agriculture that allows an increased crop yield and an improved soil quality. In the present study, microorganisms with high capacity to solubilize mineral and organic P were isolated and identified.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria

In this study samples were collected in the areas adjacent to the Agro Industrial Complex "Heriberto Duquesne" located in the province of Villa Clara, Cuba. The sampling areas were: oxidation lagoon of the biogas plant, composted sugarcane press mud and rhizospheric cane soil.

For the isolation of bacteria from the oxidation pond, 0.1 ml of residual water was collected and plated on solid NBRIP medium (12). For the isolation from press mud and rhizospheric soil, 10 g of each were resuspended in 10 mL of sterile saline solution (0.85 % NaCl) and shaken vigorously for 45 minutes (min). 1 mL of each suspension was plated on NBRIP medium (12). All isolates were incubated at 30 °C for 48 h. After 48 h, colonies which showed translucent solubilization halos around them were selected. All isolates were deposited at the Microbial Culture Collection of the Cuban Research Institute on Sugarcane By-Products (ICIDCA).

Qualitative detection of inorganic phosphate solubilization

The NBRIP medium (Glucose: 10 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: 5 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.25 g, KCl: 0.2 g and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0.1 g bacteriological agar 20 g) was used to analyze the solubilization of inorganic phosphorus, indicated by the formation of translucent halos around the colonies (12).

Identification of isolated phosphate solubilizing bacteria

The taxonomic identification of the isolates was performed using the API Test 20NE (bioMérieux). The results were interpreted using API Web StandAlone® software.

Detection of Acid Phosphatase Activity

An indicator medium based on a histochemical detection system was used to detect the acid phosphatase activity on agar plates. LB agar supplemented with 2 mg/ml phenolphthalein diphosphate (PDP, SIGMA), and 0.05 mg/ml methyl green (SIGMA), pH 7.2. The use of the LB medium is a modification introduced to the system developed by Riccio *et al.* (13) using the Tryptose-Phosphate

(TP) medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). On this medium, strains expressing acid phosphatase activity (Pho⁺-phenotype) grow as green stained colonies.

Phosphatase activity from liquid cultures was evaluated in whole cells and supernatant fractions as follows: Cells were collected by centrifugation at 10,000 x g for 5 min and washed with 2 ml of 0.85 % NaCl. The pelleted cells were resuspended in 0.85 % NaCl to a final optical density (OD) of 1.5 (at 600 nm) and pre-incubated at 37 °C for 30 min at 75 rpm (moderate agitation). Then, 50 µl of this suspension was added to the reaction buffer (0.2 M Tris-maleic acid, pH 6.2). The reaction was initiated by the addition of 50 µl of 60 mM para-nitrophenylphosphate (pNPP, sodium salt, SIG-MA) and incubated at 37 °C for 30 min. Then the cells were separated by centrifugation and 1.5 ml of 0.33 N NaOH was added to 600 µl of the supernatant to stop the reaction. The liberation of pNP was determined by the change in the absorbance at 420 nm. One unit of activity was defined as the amount of enzyme able to liberate 1 nmol of pNP per ml andmin, under the assay conditions. The activity in the supernatant fractions was determined by the same method as for the intact cells, but without pre-incubation.

For the detection of protein bands with phosphatase activity, the technique described by Thaller *et al.* was used (14, 15). The gel was incubated at 37 °C for 3 h in the renaturation buffer (10 mM Tris-HCL, pH 7.4; 1 % [vol/vol] Triton X-100 and 2 mM MgCl₂), with changes at 30 min intervals with the same buffer. Then the gel was equilibrated for 90 min in the equilibration buffer (100 mM NaAc, pH 6.0 and 2 mM MgCl₂), with changes every 30 min. Finally, the gel was incubated overnight in a buffer containing 100 mM NaAc (pH 6.0), 4 mM PDP, 2 mM MgCl₂ and 0.005 % methyl green. With this detection system the phosphatase activity was visualized by the green colour of the protein bands due to the activity developed by the renaturated polypeptidic chains. The quantity of protein applied in the samples was 36 µg.

Quantification of soluble phosphorus in liquid medium

Soluble phosphorus was evaluated and quantified in the supernatant of the liquid cultures as follows:

Cells were grown in 500 mL flasks with 50 mL of NBRIP liquid medium for 14 days at 30 °C in a rotating shaker at 175 rpm (Lab-Line). After this time, the entire culture was centrifuged (Centrifuge Sigma 3-18K) at 21 390 x g for 20 min and cells were discarded. Aliquots of 10 µl of supernatant were diluted in 990 µL of deionized water. From this dilution 50 µL was reacted with 150 µL of the Reagent Phosphate (BioVision). The mixture was manually shaken and incubated 30 min at room temperature. Subsequently the release of the soluble P was detected by the absorbance increase at a wavelength of 650 nm in a Genesys 6 spectrophotometer, with quartz cuvettes of 1 cm light path.

Determinations

Growth was followed by the absorbance at 600 nm. The statistical analysis and regression were carried out with the statistical package Statgraphics Statistical Graphics System version 5.0, with a level of significance of 95 %.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria

A total of 10 bacterial isolates were obtained that had the capacity to solubilize tricalcium phosphate, demonstrated by the formation of translucent halos around the colonies (Table 1). All were Gram

negative bacilli, did not form spores or capsules and were actively motile. The use of the NBRIP medium allowed the quick and simple analysis to confirm the phosphate solubilizing phenotype.

Table 1. Bacterial isolates in NBRIP medium at 48 hours

Samples	Isolates
Intermediate wastewater from the oxidation lagoon	RI1
Rhizosphere of sugar cane plants	R5, R7
Sugar cane press mud	C2, C3, C4, C6, C9, C10 (A), C10 (B)

C: sugarcane press mud, R: sugarcane rhizosphere, RI: intermediate residual water.

The number indicates the order of the isolates. A and B: type of colonies.

Qualitative analysis of inorganic phosphorus solubilization

The visual detection and even a semiquantitative estimation of the mineral P solubilization capacity by microorganisms has been possible by detecting clear zones around the colonies when solubilization of $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ occurs (12). This method has been successfully used for the detection of phosphate solubilizing bacteria (16).

In this study, all isolates grew on solid NBRIP medium (Figure 1). The formation of translucent halos was measured on days 2, 9 and 14. An increase in the diameter of the solubilization halos was observed. However, in the case of isolates C2, C3, and C6, the halo measurement could not be performed due to the production of a polymer.

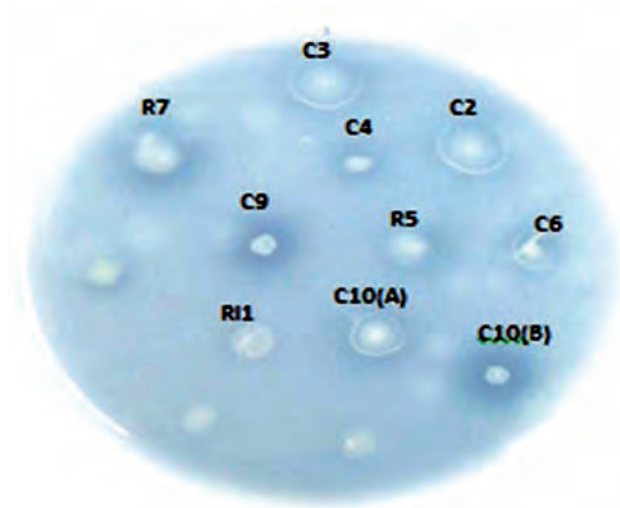


Figure1. Solubilization of tricalcium phosphate on NBRIP solid medium by isolates C2, C3, C4, C6, R7, C9, C10 (A), C10 (B), RI1, R5.

On day 2, isolates C4 and C9 had the largest solubilization halos, showing significant differences between them and the rest of the isolates. The isolates R5, R7, C10(A), C10(B), RI1 showed significant differences between them, although their solubilization halos were smaller than those of C4 and C9 (Figure 2A).

On day 9, isolates C4 and C10(B) showed the largest solubilization halo with respect to the rest of the isolates. Isolates C4 and C10(B) showed no significant differences between them. The isolates R5 and C10(A) also showed a larger solubilization halo than the isolates R7, C9 and RI1 but smaller than the isolates C4 and C10(B) (Figure 2B).

On day 14, isolate C10(B) exhibited the largest diameter solubilization halo compared to the rest of the isolates. Isolates C4, R5 and C10(A), exhibited no significant differences among them (Figure 2C).

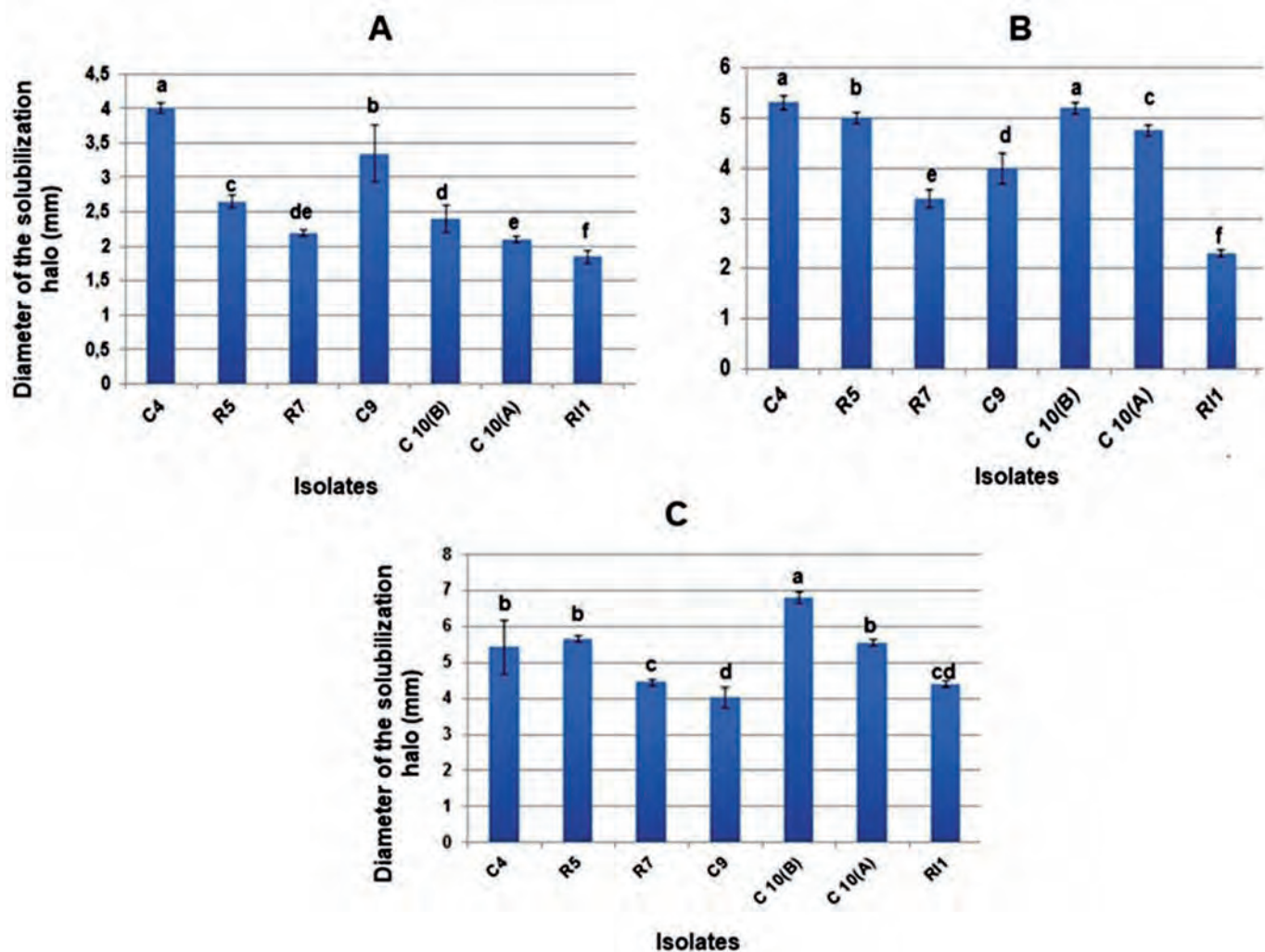


Figure 2. Diameter of the solubilization halo of tricalcium phosphate on NBRIP solid medium **(A)**: Diameter of the halo 2 days after inoculation. **(B)**: Diameter of the halo 9 days after inoculation. **(C)**: Diameter of the halo 14 days after inoculation. Uncommon letters indicate significant differences according to Duncan's test for $p < 0.05$ (l = standard deviation of the mean).

In this study it is demonstrated that the isolates C4, R5, C10(A) and C10(B) are the best phosphate solubilizers because they maintained during the 14 days the largest solubilization halos. However, the C9 isolate that was the one with the highest solubilization halo on day 2 remained below these. The qualitative Petri dish estimation to detect the P solubilization capacity of the isolates coincided with the results of Nautiyal (12), when the isolations made from soil samples showed solubilization halos of up to 7 mm. In addition, the results of the present study were higher than those of Park *et al.* (17), where solubilization halos are reported on NBRIP medium no greater than 4mm.

Identification of the selected isolates

Once the ability to solubilize P on NBRIP medium of all the isolates was verified, they were identified by the API 20NE test (bioMerieux) and the results were read according to the manufacturer's instructions. The isolates selected for their P solubilizing activity were included within the species *Pseudomonas luteola* (18) and *Burkholderia cepacia* (19) (Table 2).

Table 2. Identification of the isolates using the API20NE biochemical test gallery

Isolates	Identification
C2	<i>Pseudomonas luteola</i>
C3	<i>Pseudomonas luteola</i>
C4	<i>Pseudomonas luteola</i>
R5	<i>Burkholderia cepacia</i>
C6	<i>Pseudomonas luteola</i>
R7	<i>Burkholderia cepacia</i>
C9	<i>Pseudomonas luteola</i>
C10(A)	<i>Pseudomonas luteola</i>
C10(B)	<i>Pseudomonas luteola</i>
RI1	<i>Pseudomonas luteola</i>

in this work, *Pseudomonas luteola* was isolated from composted press mud and wastewater from biogas production. This result coincides with the fact that this particular species can be found in many ecosystems due to its capacity to degrade dissimilar organic and inorganic compounds.

The genus *Burkholderia* has been reported as PGPB by numerous authors due to its important role in the promotion and growth of plants. It produces plant growth regulators, performs biological control in several crops of economic importance and stands out for its high efficiency to solubilize and mineralize phosphates (27, 28, 29). The most studied species of this genus is *Burkholderia cepacia*, which has been found associated with the rhizosphere of plants, soil and river waters (30). Particularly, this species possesses antagonistic activity against a wide range of plant pathogens, mainly fungi. For example, root rot is caused by *Aphanomyces euteiches*. It is also considered an excellent bioremediator (31). On the negative side, it is the cause of rot in crops such as onions (19). Also it has been reported as an opportunistic pathogen of man; it has been found in the respiratory tract of patients with pulmonary fibrosis and chronic granuloma (32). Therefore, the necessary safety measures must be taken before commercial application of this microorganism. In this study, *Burkholderia cepacia* was isolated from the rhizosphere of sugarcane. This microorganism has been previously isolated in six varieties of cane, and found to solubilize inorganic phosphorus sources and increase agricultural yield by 25 % (33).

Qualitative detection of phosphatase activity and zymogram of acid phosphatase

The medium TPMG (Tryptose-Phosphate containing PDP and methyl green), was used to select bacteria with phosphatase activity. It is based on the principle that bacteria that do not produce detectable phosphatase activity grow as uncoloured colonies (negative phosphatase phenotype, Pho⁻), while bacteria that produce phosphatase activity grow as green colonies (positive phosphatase phenotype, Pho⁺) (13). In this study, a modification of the original medium which consisted of LB medium supplemented with PDP and methyl green, was used as a means to qualitatively detect phosphatase activity in the strains studied (Figure 3).

The intense green coloration in strains RI1, C2, C3, R5, C6, R7, C10(A) is due to the fact that they have the Pho⁺ phenotype and that they produce at least one active phosphatase enzyme. When this modifies the PDP substrate, it causes the color change of the indicator. In contrast, the uncolored growth of strains C4, C9, C10(B) indicates that they have a Pho⁻ phenotype under these test conditions.

The genus *Pseudomonas* has been associated with the rhizosphere of different plant species such as diazotrophs, and forms part of the rhizosphere of many crops (10, 20). In this study, a prevalence of the species *Pseudomonas luteola* was observed. This could be related to the adaptability that *Pseudomonas luteola* has to numerous ecosystems (21). This species plays an important role in the promotion of plant growth as an excellent P solubilizer, as well as in biological control in crops of economic importance (22, 23). Further, it has the capacity to degrade a large number of xenobiotic compounds, which makes it very effective as a bioremediation agent (24, 25). It is a causative agent of nosocomial infections, so its application in natural environments must proceed with care (26). In

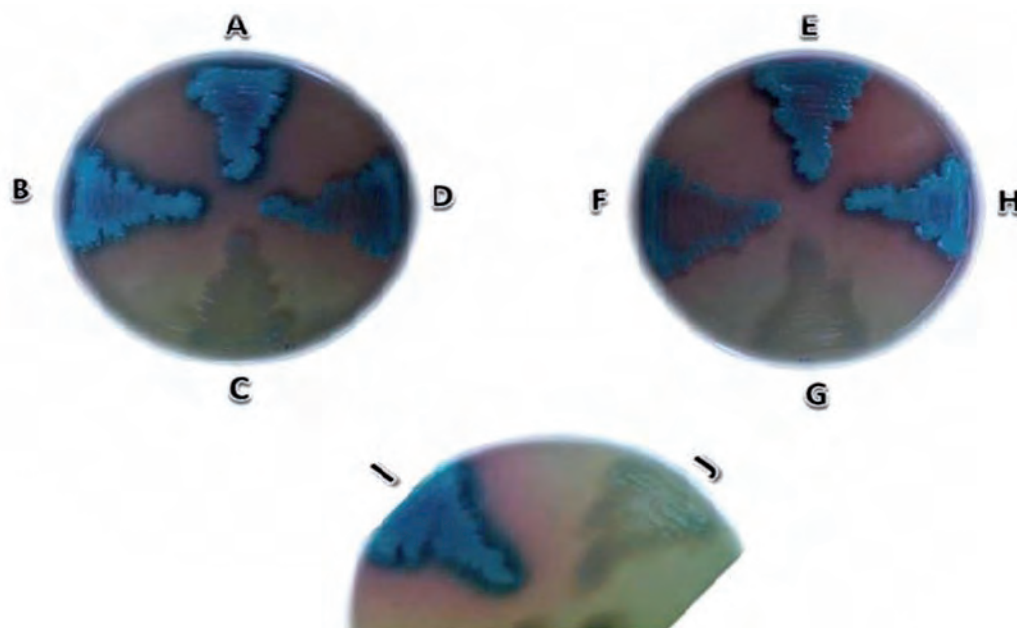


Figure 3. Qualitative histochemical detection of the phosphatase activity produced by the strains: A: C2, B: C3, C: C4, D: R5, E: C6, F: R7, G: C9, H: C10(A), I: RI1(B), J: C10(B).

The result of the zymogram for the cell fractions of the strains under study is shown in Figure 4.

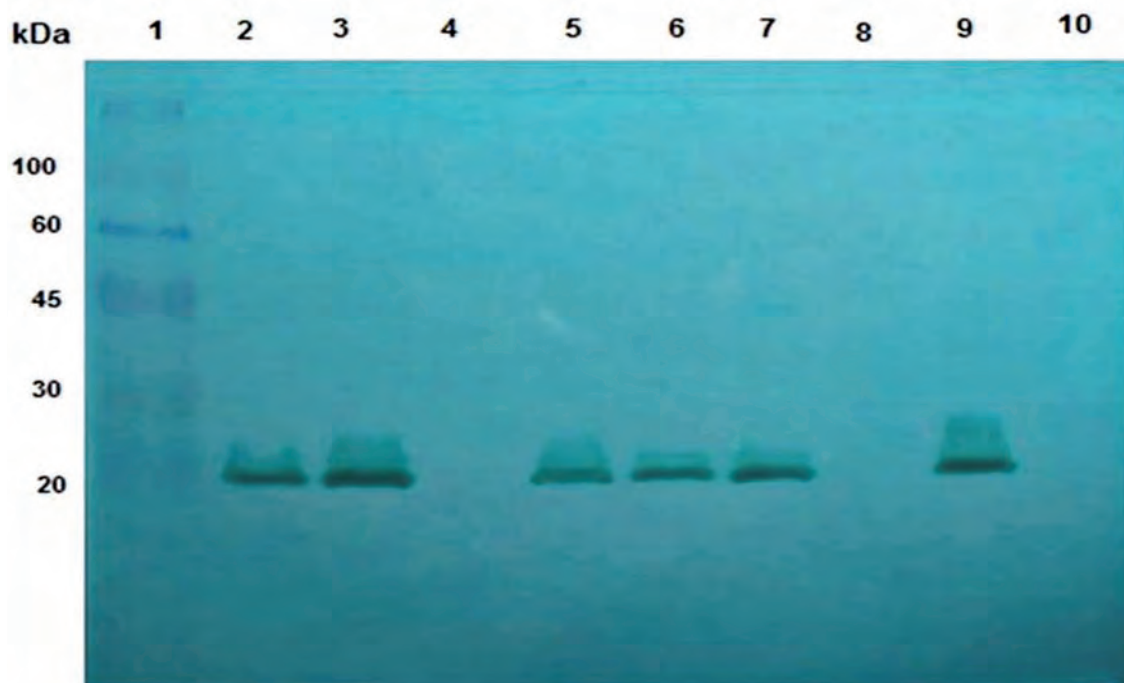


Figure 4. Zymogram for the detection of phosphatase activity in the selected isolates: Molecular weight marker (Color Burst™). 2: C2, 3: C3, 4: C4, 5: R5, 6: C6, 7: R7, 8: C9, 9: C10(A), 10: C10(B).

This technique detects acid phosphatase activity through the formation of a green precipitate, as a result of the activity developed by the renatured acid phosphatase polypeptide chains. In lanes 2, 3, 5-7, 9 (Figure 4) there is a protein band, for which we have estimated a size of approximately 25 kDa. The latter corresponds to the size of non-specific periplasmic acid phosphatases containing low molecular weight polypeptide chains (Lmmp-APs, 25-27 kDa) (15). Phosphatase activity is present in all members of the *Enterobacteriaceae* family. Some species of this family produce high levels of

phosphate-irrepressible acid phosphate activity (HPAP), such as Lmmp-APs, which are responsible for the HPAP phenotype (34, 35).

The results coincide with those of other authors, pointing out that this type of acid phosphatase is widely distributed in the genera *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia* (18, 36), and these results confirm the qualitative Petri dish studies (Figure 3).

In the case of lanes 4, 8 and 10 (Figure 4), the 25 kDa band is not observed, indicating that these strains do not show acid phosphatase activity under the conditions tested.

Quantification of acid phosphatase activity in liquid culture

Being soluble in the periplasm of the cell, or bound to the outer surface of the inner membrane, most of the phosphatase activities are detectable using pNPP, which diffuses freely into the periplasmic space of intact cells (37).

In this study, acid phosphatase activity was compared in liquid medium of the cell fractions of all the strains studied (Figure 5). During the 24 hour period analyzed, the RI1 strain showed the highest phosphatase activity compared with the other strains. However, strains C4, C9, C10(B) showed a basal phosphatase activity, not detected in the previous trials. From this we can infer that a negative phenotype in qualitative tests in solid medium does not constitute a criterion of absolute absence of this type of activity, but that it occurs in quantities not detectable by the lower sensitivity of the method or by not presenting the optimal conditions for the production of the enzyme.

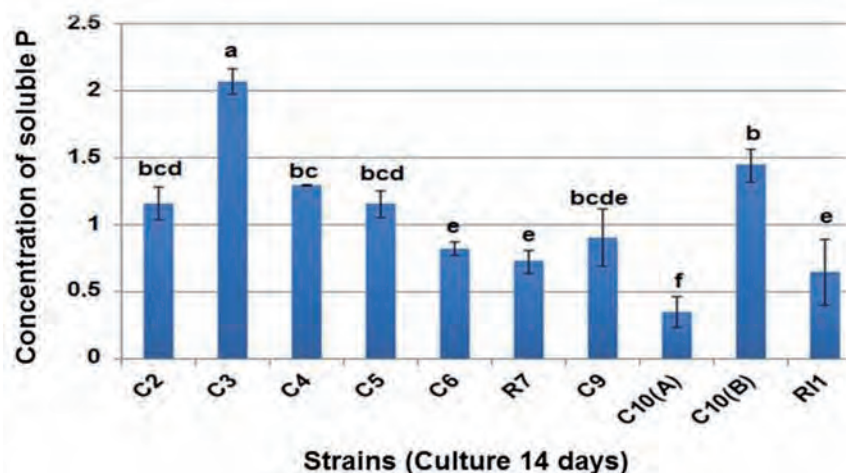


Figure 5. Acid phosphatase activity associated with cells, measured by the production of para-nitrophenol (pNP) nmol / mL by the strains: C2, C3, C4, R5, C6, R7, C9, C10(A), C10(B), CRI1. Uncommon letters indicate significant differences according to Duncan's test for $p < 0.05$ (l = standard deviation of the mean).

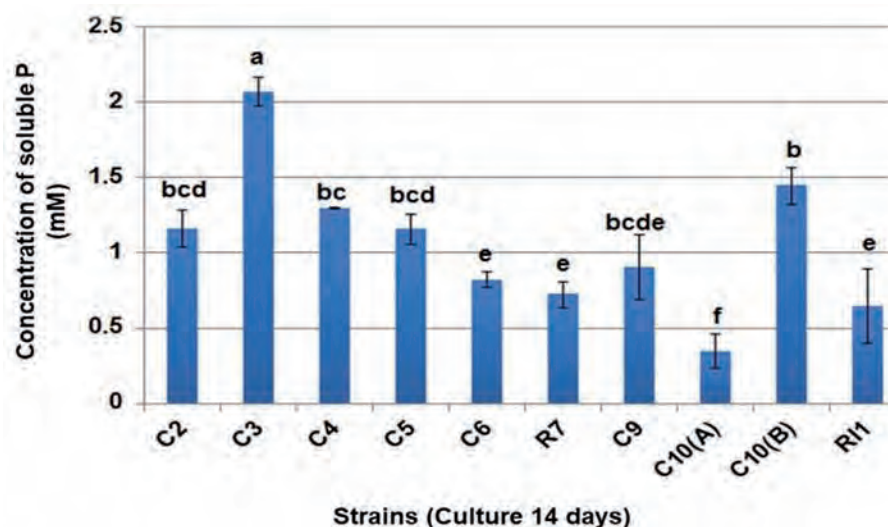


Figure 6. Solubilization of mineral P in liquid NBRIP medium at 14 days of inoculation, by the strains: C2, C3, C4, R5, C6, R7, C9, C10(A), C10(B), CRI1. Uncommon letters indicate significant differences according to Duncan's test for $p < 0.05$ (l = standard deviation of the mean).

Quantification of phosphate solubilization in liquid culture

The determination of soluble P in liquid NBRIP medium to detect the solubilizing activity of P mineral was carried out by means of a colorimetric assay (BioVision). In Figure 6, most strains showed the ability to solubilize tricalcium phosphate by releasing soluble P to the culture medium.

Strain C3 released more soluble P to the medium, showing a significant difference from the rest of the strains. Strains C10(B), C2, C4, R5 showed a moderate concentration of free P in the medium, with significant differences between them and with the rest of the strains, although the concentration of free P with respect to strain C3 was lower. These results coincide in a general way with those reported for *Pseudomonas* sp. by Nautiyal (12), using test conditions similar to those of this study. Similar results have also been reported by Lara *et al.* (38) in strains of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas luteola*, shown to be excellent P solubilizers according to the authors.

It is important to note that the C3 strain can be considered as a stimulator of plant growth and development because it shows a high solubilization of mineral P.

CONCLUSIONS

Ten bacterial isolates were obtained from rhizospheric soil of sugarcane, press mud and residual waters, with P solubilizing capacity. There were 8 isolates identified as *Pseudomonas luteola* and 2 isolates identified as *Burkholderia cepacia*. All strains had acid phosphatase activity, with *Pseudomonas luteola* R11 expressing the highest level of activity. All strains had the capacity to solubilize P mineral, with *Pseudomonas luteola* C3 solubilizing the largest amount. *Pseudomonas luteola* C3 is the most promising to be used as a biofertilizer.

ACKNOWLEDGEMENTS

Reinaldo Fraga thanks William David Rau (MS Rau Antiques, New Orleans, USA) for his kind support. We thank to Aidín Martínez for her technical support and advice with the use of the API Test 20NE (bioMerieux), as well as with the use of the API Web StandAlone® software. We also thank Dr. Joan Combie for the style correction of the manuscript.

REFERENCES

1. Khan MS, Zaidi A, Wani PA (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. *Agron. Sustain. Dev.* 27: 29-43. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8-34>.
2. Khan AA, Jilani G, Akhtar MS, Naqvi SMS, Rasheed M (2009). Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *Journal of Agricultural and Biological Sciences* 1: 48-58.
3. Khan MS, Zaidi A, Ahmad E (2014). Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In: *Phosphate solubilizing microorganisms: Principles and application of microphos technology*. Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (Eds.). Springer, Switzerland, pp. 31-62. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08216-5>.
4. Nisha K, Padma Devi SN, Vasandha S, Sunitha kumari K (2014). Role of Phosphorus Solubilizing Microorganisms to Eradicate P Deficiency in Plants: A Review. *Int. J. Sci. Res.* 4:1-5.
5. Richardson AE (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:897-906. <https://doi.org/10.1071/PP01093>.

6. Cordell D, Drangert JO, White S (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environ Chang* 19, 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>.
7. Holford ICR (1997). Soil phosphorus, its measurements and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research* 35: 227–239. <https://doi.org/10.1071/S96047>.
8. Zhu F, Qu L, Hong X, Sun X (2011). Isolation and characterization of a phosphate solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of yellow sea of China. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* Volume 2011, Article ID 615032, 6 pages. 10.1155/2011/615032. <https://doi.org/10.1155/2011/615032> 9.
9. Rodríguez H and Fraga R (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.* 17:319-339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2).
10. Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(4): 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>.
11. Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2:587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
12. Nautiyal CS (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>.
13. Riccio M L, Rossolini GM, Lombardi G, Chiesurin A, Satta G (1997). Expression cloning of different bacterial phosphatase-encoding genes by histochemical screening of genomic libraries onto an indicator medium containing phenolphthalein diphosphate and methyl green. *J. Appl. Bacteriol.* 82: 177-185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1997.tb03570.x>.
14. Thaller M C, Berlutti F, Schippa S, Lombardi G and Rossolini GM (1994). Characterization and sequence of PhoC, the principal phosphate-irrepressible acid phosphatase of *Morganella morganii*. *Microbiology*, 140, 1341-1350. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-6-1341>.
15. Thaller MC, Berlutti F, Schippa S, Iori P, Passariello C, Rossolini GM (1995b). Heterogeneous patterns of acid phosphatases containing low-molecular-mass Polypeptides in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Int J Syst Bacteriol*; 4:255–61. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-255>.
16. Konietzny U and Greiner R (2004). Bacterial phytase: Potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. *Brazilian. J. Microbiology* 35:12-18. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822004000100002>.
17. Park JH, Bolan N, Megharaj M and Naidu R (2011). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *J. Hazard. Mater.* 185: 829–836. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.095>.
18. Ha Kang S, Cho KK, Bok JD, Kim SC, Cho JS, Lee PC, Kang SK, Lee HG, Woo JH, Lee HJ, Lee SC, Choi YC (2006). Cloning, sequencing and characterization of a novel phosphatase gene *phoI*, from soil bacterium *Enterobacter* sp. 4. *Current Microbiology* 52 (4): 243-248. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4467-z>.
19. Burkholder WH (1950). Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40:115–118.
20. Othman AA, Amer WM, Fayed M, Hegazi NA (2004). Rhizosphere of Sinai desert plants is a potential repository for associative diazotrophs. *Microbiological Research* 159(3):285-293. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.05.004>.
21. Donate-Correa J, Leon-Barrios M and Perez-Galdona R (2004). Screening for plant growth promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant and Soil* 266, 261–272. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-0754-5>.

22. Midekssa MJ, Löscher CR, Schmitz RA and Assefa F (2015). Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from lentil growing areas of Ethiopia. Vol. 9(25), pp. 1637-1648. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7473>.
23. Kwak Y, Jung BK, Shin JH (2015). Complete genome sequence of *Pseudomonas rhizosphaerae* IH5T (= DSM 16299T), a phosphate-solubilizing rhizobacterium for bacterial biofertilizer. J Biotechnol 193:137–138. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.11.031>.
24. Lin Y-H, Leu J-Y (2008). Kinetics of reactive azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola* in a biological activated carbon process. Biochemical Engineering Journal 39(3):457-467. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.10.015>.
25. Chen J-P, Lin Y-S (2008). Decolorization of azo dye with *Pseudomonas luteola* in a membrane bioreactor. Journal of Biotechnology 136(Supplement 1): S675-S676. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1567>.
26. Dalamaga M, Karmaniolas K, Chavelas C, Liatis S, Matekovits H, Migdalis I (2004). *Pseudomonas luteola* Cutaneous Abscess and Bacteraemia in a Previously Healthy Man. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 36(6):495-497. <https://doi.org/10.1080/00365540310016196>.
27. Parke JL, Gurian-Sherman D (2001). Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. Annu. Rev. Phytopathol. 39:225–258. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.225>.
28. Zhao K, Penttinen P, Zhang X, Ao X, Liu M, Yu X, Chen Q (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. Microbiol. Res. 169 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.07.003>.
29. Istina IN, Widiastuti H, Joy B, Antralina M (2015). Phosphate-solubilizing microbe from Saprists peat soil and their potency to enhance oil palm growth and P uptake. Proc. Food Sci. 3 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.01.047>.
30. Vermis K et al (2003). Isolation of *Burkholderia cepacia* complex genomovars from waters. Syst. Appl. Microbiol. 26, 595–600. <https://doi.org/10.1078/072320203770865909>.
31. Lee EY (2003). Continuous treatment of gas-phase trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in a two-stage continuous stirred tank reactor/trickling biofilter system. J. Biosci. Bioeng. 96, 572–574.
32. Mahenthalingam E, Urban TA, Goldberg JB (2005). The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. Nat. Rev. Microbiol. 3:144–156. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1085>.
33. Torriente, D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en Cuba. cultrop v.31.
34. Pompei R, Cornagli G, Ingianni A, Satta G (1990). Use of a novel phosphatase test for simplified identification of species of the tribe proteaeae. J. Clin. Microbiol. 28: 1214–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.28.6.1214-1218.1990>.
35. Pompei R, Ingianni A, Foddiss G, Di Pietro G, Satta G (1993). Patterns of phosphatase activity among enterobacterial species. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 174–8. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-1-174>.
36. Rodríguez H, Fraga R, González T, Bashan Y (2006). Genetic of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and Soil. 287(1-2): 15-21. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>.
37. Gugi B, Orange N, Hellio F, Burini JF, Guillou C, Leriche F and Guespin-Michel JF (1991). Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. J. Bacteriol. 173: 3814-3820. <https://doi.org/10.1128/jb.173.12.3814-3820.1991>.
38. Lara C, Esquivel LM, Negrete JL (2011). Bacterias nativas solubilizadores de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba-Colombia. rev.bio.agro vol. 9 no. 2, 114-120.

Evaluación de fuentes de carbono para la producción de metabolitos antifúngicos a partir de *Bacillus sp* cepa VC3

Nayra Ochoa-Viñals^{1*}, Jessica Mendoza-Rodríguez², Evelyn Faife-Pérez¹, Isis Amores-Sánchez¹, Orquídea Coto-Pérez² y Antonio Bell-García¹

1. 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.

*nayra.ochoa@icidca.azcuba.cu

2. Departamento de Biotecnología de los Metales, Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

Calle 25 No. 455, Vedado, La Habana, Cuba.

RESUMEN

En este trabajo se realiza la evaluación del crecimiento de la cepa *Bacillus sp* cepa VC3, la actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Fusarium sporotrichum* F-13, *Fusarium oxysporum* F-44, *Fusarium moniliforme* F-22 y *Fusarium solani* F-29 y la actividad proteolítica, se emplean como fuentes de carbono: glucosa, glicerol, miel final de caña de azúcar y sacarosa. Las evaluaciones arrojaron que los valores superiores en cuanto al crecimiento de la bacteria, la actividad proteolítica y el porcentaje de inhibición, se obtuvieron con el empleo de miel, a pesar de solo alcanzar un valor 1.5 veces menor que alcanzado con el SLC del medio comercial de este último. Puede afirmarse que existe una relación sinérgica entre metabolitos como antibióticos, lipopéptidos y enzimas proteolíticas que, asociados a otros compuestos, causan la inhibición en hongos fitopatógenos. El empleo de la miel de caña de azúcar resulta el sustrato más adecuado para una producción industrial, considerando las ventajas económicas y nutricionales frente a otros medios de cultivos comerciales.

Palabras clave: *Bacillus*, actividad antifúngica, actividad proteolítica.

ABSTRACT

In this work was realized the evaluation of the growth of the strain *Bacillus sp* VC3, the antifungal activity against the phytopathogenic fungi: *Alternaria alternata*, *Fusarium sporotrichum* F-13, *Fusarium oxysporum* F-44, *Fusarium moniliforme* F-22 and *Fusarium solani* F-29 and the proteolytic activity, using as sources of carbon: glucose, glycerol, final sugarcane molassa and sucrose. As a result of the evaluations it was obtained that the higher values regarding the growth of the bacteria, the proteolytic activity and the percentage of inhibition were obtained using molasses, despite only reaching a value 1.5 times lower than reached with the SLC of the commercial medium. It can be said that there is a synergistic relationship between metabolites such as antibiotics, lipopeptides and proteolytic enzymes that, associated with other compounds, cause inhibition in phytopathogenic fungi. We suggest the use of molasses as the most suitable substrate for industrial production considering the economic and nutritional advantages over other commercial cultures media.

Key words: *Bacillus*, antifungal activity, proteolytic activity.

INTRODUCCIÓN

Cada año se pierde una parte de los alimentos por la incidencia de las plagas que atacan los cultivos de interés agroalimentario. El 50 % de las pérdidas son provocadas por organismos cau-

santes de enfermedades o daños en las plantas. El impacto negativo de tales enfermedades en los cultivos incrementa los costos de producción agrícola, por la necesidad de implementar estrategias adicionales para el control de microorganismos patógenos y la disminución de sus efectos sobre las cosechas (1).

Uno de los métodos que más se utilizan para contrarrestar estos males es el uso de agroquímicos. Estos desempeñan un papel decisivo en la reducción de los daños económicos en los cultivos, pero la toxicidad elevada de algunos de ellos, ha generado consecuencias negativas como: la erosión de los suelos, la contaminación de los alimentos, la aparición de cepas resistentes. Su persistencia en el medio y su mal uso han llevado a un replanteamiento de las tácticas de control de plagas (2).

El desarrollo de una agricultura sostenible y más eficiente, así como el conocimiento sobre los peligros asociados al uso de agroquímicos, han conducido al resurgimiento y empleo de microorganismos o sus metabolitos, como agentes de control biológico para uso en la agricultura (3).

Los ecosistemas de serpentina imponen a su microbiota condiciones de vida diferentes a las clasificadas como “normales” por el hombre, en cuanto a las concentraciones de metales pesados y cantidades de nutrientes esenciales que, en ellos, se depositan. Los microorganismos que habitan estos ecosistemas presentan excepcionales adaptaciones en sus sistemas enzimáticos y membranas, que les permiten tolerar el tipo y la composición del suelo, las características de las sustancias orgánicas e inorgánicas, su poder quelante, los márgenes de pH y su estado redox (4).

Las características distintivas de los suelos ultramáficos posibilitan que la microbiota existente en estos suelos pueda ser utilizada para obtener nuevos bioproductos, con alto valor agregado (5, 6). Los estudios con bacterias para el control biológico de enfermedades se han enfocado en especies rizosféricas, principalmente del género *Bacillus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Para el desarrollo de esta investigación se seleccionó la cepa VC3, perteneciente a la colección de microorganismos del Laboratorio de Biotecnología de los Metales, de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Esta cepa fue aislada de la rizosfera de una planta hiperacumuladora de Ni: *Mosiera bullata*, del depósito ultramáfico del Cuabal Cubanacán, Villa Clara, Cuba (7). La conservación de la cepa se realizó en tubos de cultivo con medio Luria- Bertani (LB) con 2 % de agar en plano inclinado, a temperatura de 4 °C, durante 6 meses y por crioconservación con el uso de glicerol al 20 %, a una temperatura de -20 °C. En el desarrollo del trabajo también se utilizaron cinco hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata*, *Fusarium sporotrichum* F-13, *Fusarium oxysporum* F-44, *Fusarium moniliforme* F-22 y *Fusarium solani* F-29, pertenecientes a la colección de microorganismos del Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). La conservación de los tres hongos filamentosos se realizó en los medios agar extracto de malta (AEM).

Composición de medios de cultivos

Se formularon cuatro medios de cultivo y se evaluaron cuatro fuentes de carbono, se mantuvieron constantes la composición de sales y la fuente de nitrógeno (8). Se utilizó como medio control Luria-Bertani (LB), compuesto por Triptona 10 g.L⁻¹; extracto de levadura 5 g.L⁻¹ y NaCl 10 g.L⁻¹. Durante la preparación de cada medio, se realizó un ajuste de pH a 7.0 ± 0.2 con HCl o NaOH 1M. Los medios fueron esterilizados por calor húmedo, en autoclave, aplicando 1 atm y 121 °C, durante 20 min.

Tabla 1. Composición de medios de cultivos diseñados

Medios de cultivos	Fuente de carbono (g.L ⁻¹)	Fuente nitrógeno (g.L ⁻¹)	Sales (g.L ⁻¹)
Medio A	Glucosa (15)	Extracto levadura 1.0	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.2 K ₂ HPO ₄ 3.0 KH ₂ PO ₄ 1.5 MgSO ₄ * 7H ₂ O 0.2 CaCl ₂ * 2H ₂ O 0.05 MnSO ₄ * 2H ₂ O 0.009 ZnSO ₄ * 7H ₂ O 0.001 Citrato trisódico 1.0
Medio B	Glicerol (15)		
Medio C	Miel final de caña de azúcar (15) (ART)*		
Medio D	Sacarosa (15)		

(ART)*: Azúcares reductores totales.

Condiciones de cultivo

La fermentación se realizó en Erlenmeyer de 1 L de capacidad con un volumen de trabajo de 200 mL. Los medios fueron inoculados con un preinoculo de 18 horas crecido en medio LB líquido para una relación de inóculo medio 1:10 (v/v). Posteriormente, los cultivos se incubaron a una velocidad de agitación de 150 r.min⁻¹ y 30 °C de temperatura, durante 24 horas. Los medios se centrifugaron a 10000 r.min⁻¹, durante 10 min. Los sobrenadantes se filtraron al vacío en condiciones de asepsia, se utilizó membrana de nitrato de celulosa con poros de 0.2 µm. Los sobrenadantes libres de células (SLC) se conservaron a 4 °C, hasta su utilización.

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células.

Con el objetivo de definir el tiempo de incubación de los ensayos de actividad antagonista se determinó, previamente, la cinética del crecimiento de los hongos fitopatógenos. El crecimiento se determinó mediante la medida del diámetro de la colonia en milímetro sobre medio agar extracto de malta. Las placas se incubaron a 30 °C durante, 96 horas (n=3). Los sobrenadantes libres de células (SLC), se adicionaron al medio de cultivo agar extracto de malta, a una concentración del 20 % v/v (9). Previamente, se ajustó el pH a un valor de 6.0, para evitar la inhibición del crecimiento fúngico por pH alcalino. Cada una de las placas se inoculó en el centro, con un ponchete de 5 mm del hongo fitopatógeno a evaluar. Se utilizaron tres placas por tratamiento. En cada bioensayo se utilizó un testigo que consistió en la inoculación del ponchete del hongo correspondiente en placas con medio agar extracto de malta (AEM) sin la adición de SLC. Todos los cultivos se incubaron a 30 °C, durante el tiempo de incubación determinado para el crecimiento de cada hongo fitopatógeno. El crecimiento del hongo se comparó con el testigo y se determinó el porcentaje de inhibición mediante la fórmula (10):

$$\% I = \left[\frac{(T - F)}{T} \right] \times 100 \quad (\text{Ec.1})$$

Donde:

T = Promedio de las mediciones del diámetro de la colonia fúngica del testigo (agar extracto de malta en ausencia de SLC)

F = Promedio de las mediciones del diámetro de la colonia fúngica en agar extracto de malta con adición de SLC, al 20 %

I = Inhibición del crecimiento micelial del hongo

Determinación de la actividad proteolítica de los sobrenadantes libres de células

La actividad proteolítica de los SLC de la cepa VC3 se midió mediante el método de Anson (11), con el empleo de caseína al 1 % como sustrato.

Se preparó una mezcla de 300 μL de caseína, 600 μL del Tampón Tris-HCl 50 mM a pH = 8 y 100 μL de SLC y se incubó a 55 °C, durante 30 minutos. La reacción se detuvo por adición de 100 μL de ácido tricloroacético (TCA), a una concentración final de 100 %, se incubó durante 10 minutos a 4 °C. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 r.min⁻¹ y se midió la absorbancia a 280 nm, en un espectrofotómetro de luz ultravioleta Genesys-6. Se realizó de forma simultánea una curva de tirosina, a concentraciones conocidas (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.0313 mM). La actividad enzimática se definió como la cantidad de μmoles de L-tirosina liberados en 1 min, mediante la comparación de los resultados con la curva patrón de tirosina.

Determinación del crecimiento microbiano

Para determinar la concentración celular en los cultivos se tomaron muestras de la suspensión celular de los Erlenmeyer. Se empleó el método turbidimétrico con un espectrofotómetro de luz ultravioleta Genesys-6, para realizar las lecturas de densidad óptica a 600 nm y correlacionar esta con la concentración celular.

Procesamiento y análisis estadístico de los datos

Para el procesamiento y análisis estadístico de los datos se utilizó el editor de gráficos GraphPad Prism, versión 5.0. En la determinación de la homogeneidad de la varianza y la normalidad de los datos se empleó las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Para la determinación del efecto de los medios A, B, C y D en la actividad proteolítica, se realizó el análisis de los datos por prueba de Tukey. En los ensayos que los datos no mostraron homogeneidad de varianza y/o una distribución normal se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y las comparaciones múltiples se realizaron por la prueba de Dunn.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación e influencia de los componentes del medio de cultivo sobre la síntesis de metabolitos antifúngicos

Un primer paso en la búsqueda de los requerimientos nutricionales adecuados es identificar aquellas variables que tengan una mayor influencia en la respuesta. De aquí que con el objetivo de examinar el efecto de diferentes componentes del medio de cultivo en la síntesis de metabolitos antifúngicos, se seleccionaron como la fuente de carbono la glucosa, sacarosa, glicerol y miel de caña de azúcar.

Evaluación de la actividad antifúngica

Los resultados sobre el estudio *in vitro* de la evaluación de la actividad antifúngica de los metabolitos secretados por *Bacillus* sp. cepa VC₃ con diferentes fuentes de carbono adicionadas a los medios de cultivo se presentan en la figura 1. El ensayo se realizó con los sobrenadantes libres de células (SLC) contra cinco hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme* F-29, *Fusarium sporotrichum* F-13, *Fusarium solani* F-22, y *Fusarium oxysporum* F-44. Se determinó el porcentaje de inhibición, que demostró la influencia de la fuente de carbono sobre la síntesis o expresión de los metabolitos antifúngicos.

Los mayores valores se alcanzaron con los SLC(s) de los medios con miel (49.0 \pm 0.8 %) y sacarosa (36.7 \pm 0.29 %) para cuatro de los hongos evaluados, excepto para *F. moniliforme* (figura 1), la glucosa también estimuló este efecto. El SLC obtenido en los medios con adición de glucosa mostró mayor inhibición contra *F. moniliforme* que el SLC de sacarosa. No hubo diferencias significativas entre estos SLC(s) en los porcentajes de inhibición en *A. alternata* y *F. oxysporum*.

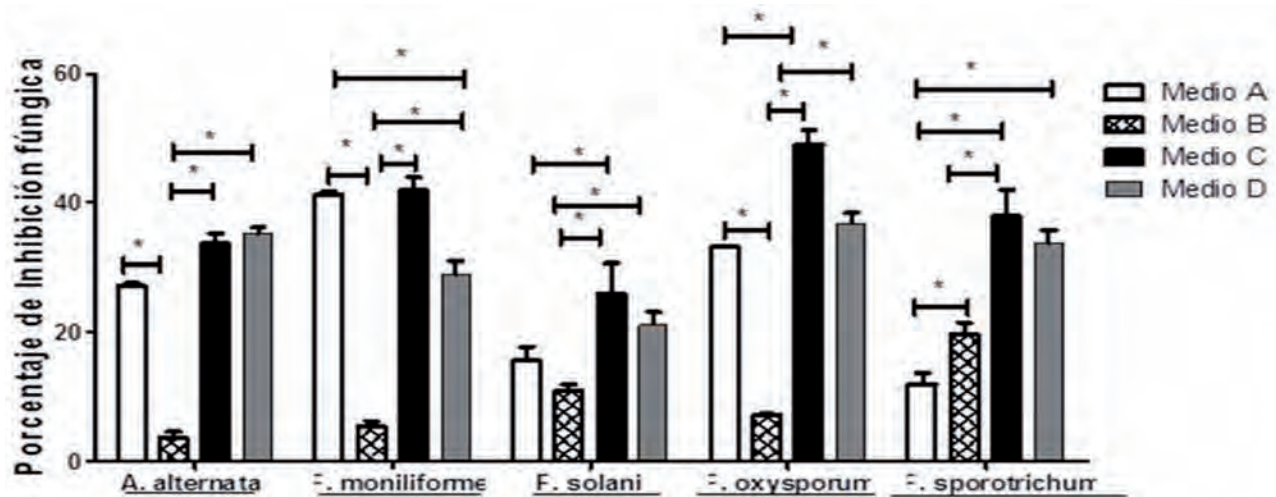


Figura 1. Porcentaje de inhibición de los SLC de los medios con glucosa (Medio A), glicerol (Medio B), miel final de caña de azúcar (Medio C) y sacarosa (Medio D). Se evaluó *A. alternata*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. sporotrichum*, sembrados en AEM al 20 % envenenado. Incubado durante 96 horas, a 30 °C. Prueba de Dunn.

Los SLC(s) de los medios con miel y sacarosa inhibieron más de un 30 %, lo cual se informa en la literatura como criterio de selección de cepas promisorias para el control biológico (12).

La utilización de miel, sacarosa y glucosa potenciaron la síntesis de metabolitos antifúngicos, este efecto ha sido ampliamente estudiado en el género *Bacillus* sp. (13,14;15).

Al comparar los porcentajes de inhibición obtenidos con los porcentajes de inhibición del SLC, del medio LB (50 % - 70 %), se encontró que aunque la miel mostró los mejores resultados fue 1,5 veces menor que en el SLC del medio comercial. Por lo planteado anteriormente se hace necesario formular un medio para potenciar la actividad antifúngica, que alcance valores similares al medio LB.

La actividad antifúngica en el género *Bacillus* está determinada por factores como: la producción de lipopéptidos y la producción de enzimas extracelulares, que fueron identificados en *Bacillus mojavensis* y *Bacillus subtilis*, respectivamente (16).

Evaluación de proteasas

Al relacionar el perfil de crecimiento de la bacteria en diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, glicerol y miel final de caña de azúcar) con la actividad enzimática (figura 2), se aprecia que la síntesis de enzimas proteasas comenzó simultáneamente, con el crecimiento de la bacteria en el caso de las fuentes glucosa (figura 2A) y glicerol (figura 2B), sus mayores actividades se expresaron en la fase de desaceleración del crecimiento, mientras que en los medios con miel final de caña de azúcar (figura 2C) y sacarosa (figura 2D), los mayores valores de la actividad proteasa se alcanzó en la fase estacionaria del crecimiento. La máxima actividad de la proteasa se alcanzaron antes del comienzo de la fase estacionaria y, luego, declinó a un nivel bajo, y se mantuvo casi constante.

La miel final de caña de azúcar y la sacarosa resultaron ser superiores al resto de las fuentes carbonadas, al incrementar 5 veces la actividad proteasa, comparadas con la glucosa y el glicerol. La velocidad específica de crecimiento de la cepa VC3 en el medio con sacarosa fue 1.7 veces mayor que las velocidades específicas de crecimiento del glicerol y la miel. Entre el medio con glucosa y sacarosa no se observaron diferencias en cuanto al crecimiento. Bajo estas condiciones el microorganismo regula su metabolismo, dirigido al incremento de la maquinaria enzimática, capaz de degradar los compuestos complejos y transformarlos en sustratos asimilables, según el principio de economía celular.

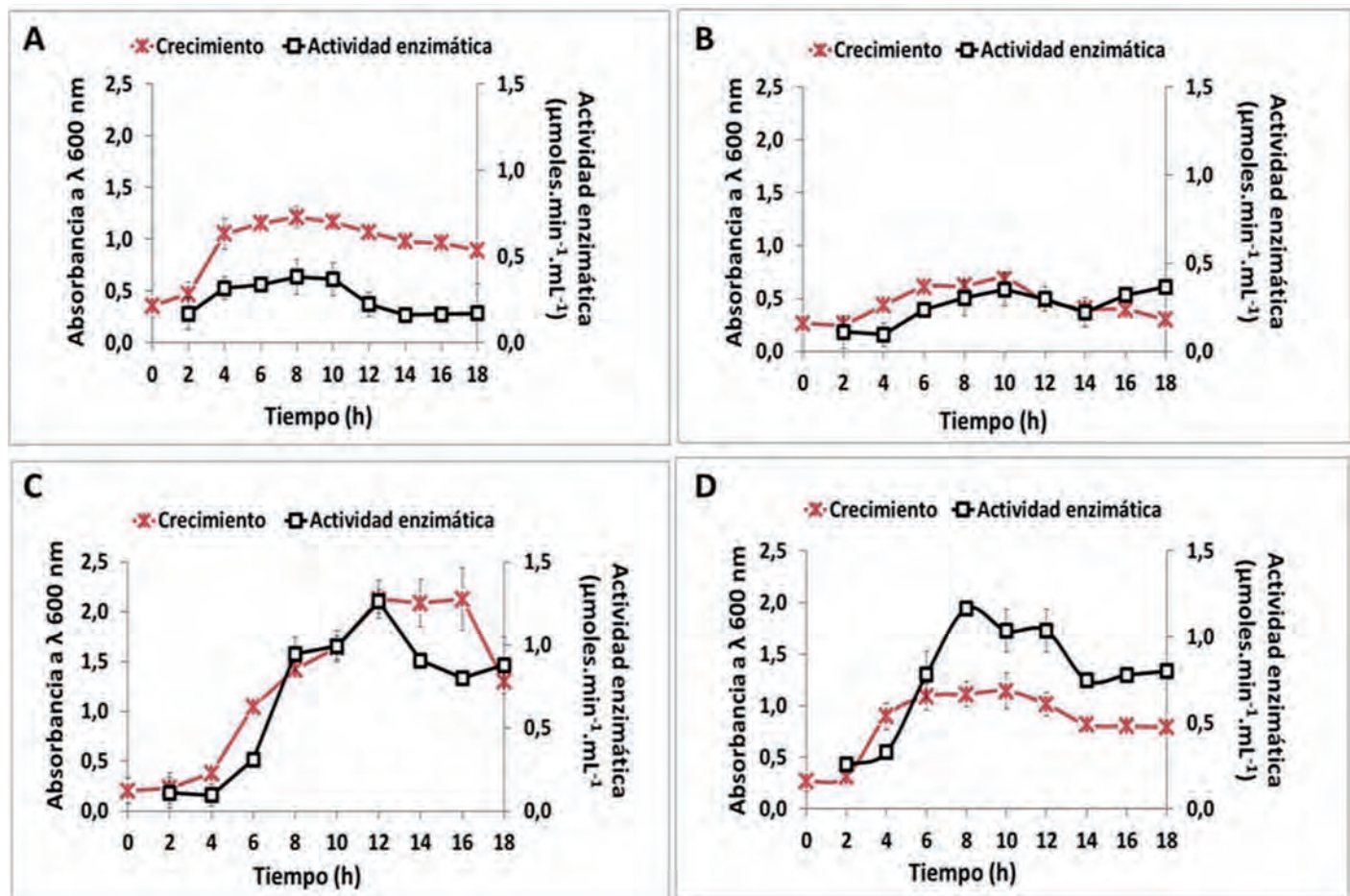


Figura 2. Cinética de crecimiento y actividad enzimática de proteasas en *Bacillus* sp. cepa VC₃, en diferentes medios de cultivo: A: glucosa; B: glicerol; C: miel final caña de azúcar; D: sacarosa, durante 18 horas. La fermentación se realizó en cultivo discontinuo a 30 °C, a 150 r.min⁻¹. La actividad enzimática se realizó por el método de Ansón modificado, con la caseína al 1 % como sustrato.

Estos resultados pudieran estar relacionados con el fenómeno de represión catabólica o “efecto glucosa” en fuentes de carbono fácilmente metabolizables (17). La represión catabólica se ha definido como la represión de la síntesis de enzimas, relacionada con el metabolismo de una fuente de carbono que es rápidamente catabolizada. La expresión de operones catabólicos inducibles se reprime en respuesta a la presencia de un carbohidrato eficiente como la glucosa (18). Por tanto, el crecimiento a expensas de glucosa, disminuye los niveles intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), reduciendo la expresión de los operones catabólicos inducibles. En su medio natural las bacterias están rodeadas de una variedad de fuentes de carbono adecuadas para el crecimiento, y pudiera ser perjudicial para el organismo el sintetizar las enzimas inducidas del catabolismo para todos los azúcares disponibles. La represión catabólica ofrece al organismo un medio de coordinar su metabolismo energético y de carbono.

Krishnaveni (19) observó que la mejor actividad enzimática en *Bacillus subtilis* se obtenía cuando utilizaba cebada de trigo como fuente de carbono, MgSO₄, y extracto de carne como fuente de nitrógeno. La producción de enzimas en el género *Bacillus* ha favorecido la biotecnología agrícola, debido a las potencialidades antifúngicas que estas presentan; sin embargo, se ha comprobado la existencia de otros metabolitos antifúngicos como: las iturinas, fengicinas, y surfactinas (19, 20).

Se planteó anteriormente que, en los medios con miel y sacarosa, el SLC de la cepa VC3 fue capaz de ocasionar mayores efectos antifúngicos medidos por la inhibición de crecimiento del hongo

(figura 1), coincidiendo con los mayores valores de actividad proteasa (figura 2). Por tanto, existe una relación sinérgica entre metabolitos como antibióticos, lipopéptidos y enzimas proteolíticas, que asociados a otros compuestos, causan la inhibición en hongos fitopatógenos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el medio con miel sustentan su utilización como sustrato idóneo para la producción de enzimas y metabolitos. Las mieles aportan azúcares fermentables, como la glucosa, rafinosa y sacarosa y es esta última la que se encuentra en mayor concentración. Además, contienen vitaminas del grupo B, aminoácidos esenciales y minerales como el calcio, sodio, cloro, magnesio, potasio, hierro y cobre. Por tanto, las mieles de caña de azúcar son ampliamente utilizadas en la producción de biomasa, metabolitos extracelulares y suplemento en los medios de cultivos. Este compuesto presenta ventajas económicas y nutricionales frente a otros medios de cultivos comerciales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez, F., Castro, M., Principe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofre, E., (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. J. Appl. Microbiol. 112 (1), 159–174.
2. Arrebola, E., Jacobs, R. and Korsten, L. (2010) Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. J Appl Microbiol 108, 386–395.
3. Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., Ongena, M., (2014). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyoliquefaciens*. Microb. Biotechnol. 8, 281–295.
4. Chandler, S., Van Hese, N., Coutte, F., Jacques, P., Höfte, M., De Vleeschauwer, D., (2015). Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). Physiol. Mol. Plant Pathol. 91, 20–30.
5. Govin, A., Coto, O., Marrero, J, (2015). Caracterización fenotípica de una colección bacteriana aislada del yacimiento laterítico Yagrumaje Norte, Moa, Cuba. Revista Cubana de Ciencias Biológicas, 4(1) 18-24.
6. Amores, I. (2013). Caracterización de dos rizobacterias aisladas de plantas acumuladoras de níquel. Tesis presentada para optar por el título de Máster en Microbiología. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
7. Villa, P.; R. Batista; R. Fernández; I. Amores y C. O. (2009). Rizobacterias de plantas hiperacumuladoras de níquel: fuente potencial de metabolitos de interés agrícola. XXIV Reunión Latinoamericana de Rizobiología y I Conferencia Iberoamericana de interacciones beneficiosas microorganismo-planta-ambiente. Memorias.
8. Zhang SM, Wang YX, Meng LQ, Li J, Zhao XY, Cao X, et al. (2012). Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. Afr J Microbiol Res; 6(8):1747-55.
9. Prapagdee B., Kuekuluong C., Mongkolsuk S. (2008). Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against Phytopathogenic Fungi. Short Research Communication. Int J. Biol Sci, 4: 330-337.

10. Villa P., Frías A. (2005): Evaluación de cepas de *Pseudomona* ssp. para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar, 39 (3): 41- 45.
11. Anson M L. (1938): The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. 2279-84.
12. Mounia Y, Noredine K, chaouche, laid dehimat, Insafbataiche, Mounira K, Hélène C, y Philippe (2014): Antifungal activity and bioactive compounds produced by *Bacillus mojavensis* y *Bacillus subtilis*. African Journal of Microbiology Research Vol. 8(6), pp. 476-484.
13. Sip V., Chrpova J., Leisova L., Sykorovvesna S., Lucera L., Ovesna J. (2007): Implications for *Fusarium* head blight control from study of factor determining pathogen and content in grain of wheat cultivars. Stressed Environments, 281-287.
14. Bing L, Huang L., Buchenauer H, Kang Z. (2010): Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4. Pesticide Biochemistry and Physiology, 98 305-311.
15. On-Uma R, Chang C, Amadou L.S, and Liang W.J, (2012): Identification of antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* LB5 with ability to control anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* African Journal of Microbiology Research Vol. 6 (16), pp. 3732-3738.
16. Ben S. Khedher, et al., "Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato," C. R. Biologies (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2015.09.005>.
17. Kaur, S., Vohra, R.M., Kapoor, M., Khalil, Q., Hoondal, G.S., (2001): Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. World J. Microbiol. Biotechnol. 17, 125-129.
18. Botsford J, Harman J. (1992): Cyclic AMP in procaryotes. Microbiol. Rev. 56:100-122.
19. Krishnaveni M S. (2010): Studies on Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) in Rhizosphere and Non-Rhizosphere Soils in Different Varieties of Foxtail Millet (*Setaria italica*). International Journal of Agriculture and Food Science Technology, 1: 23-39.
20. Zouari, I., Jlaiel, J., Tounsi, S., Trigui, M., 2016. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. Biol. Control 100, 54–62.

Escalado e implementación de un biorreactor para la producción de *Salmonella enteritidis*

Yoel Alfonso-Acosta¹, Guido Riera-González^{1*} y Plino Vargas-Zambrano²

1. Universidad Tecnológica de La Habana. Cujae. Calle 114 No. 11901 e/ Ciclovía y Rotonda, Marianao, La Habana, Cuba.

*guido@quimica.cujae.edu.cu

2. Dpto. de Procesos Agroindustriales, Universidad Técnica de Manabí. Av. Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Manabí, Ecuador.

RESUMEN

En este estudio se realizó el escalado y la implementación de un biorreactor discontinuo para la producción de *Salmonella enteritidis*. El diseño se apoyó en un modelo cinético para la obtención de la biomasa y el consumo de sustrato. Este modelo fue ajustado con datos experimentales desde un biorreactor de 50 L. El diseño mecánico se basó en el principio de similitud geométrica entre el modelo y el prototipo. Se empleó el criterio de escalado potencia consumida por unidad de volumen, criterio que marca el régimen de cambio. La potencia consumida por el agitador fue de 70.41 W para el biorreactor de 150 L. Se realizó en ambas escalas una estimación del coeficiente de transferencia de oxígeno y se obtuvieron 2.59 h⁻¹ y 3.18 h⁻¹. En la validación del diseño propuesto del fermentador de 150 L no hubo diferencias estadísticamente significativas en los parámetros estudiados. Resultó que en los biorreactores la concentración de células viables fue de 8 x 10⁹ y 4,5 x 10⁹.

Palabras clave: escalado, biorreactor, *Salmonella enteritidis*.

ABSTRACT

In this study, the scale up and implementation of a discontinuous bioreactor for the production of *Salmonella enteritidis* was developed. The design was based on a kinetic model to obtain biomass and substrate consumption. This model was fitted using experimental data from a 50 L bioreactor. The mechanical design was based on the principle of geometric similarity between the model and the prototype. Scale power consumed per unit volume was used as criteria that marks the exchange rate. The power consumed by the agitator was 70.41 W for the bioreactor of 150 L. An estimate of the oxygen transfer coefficient was obtained in both scales, obtaining 2.59 h⁻¹ and 3.18 h⁻¹. In the validation of the proposed design of the 150 L fermenter, no statistically significant differences were found in the parameters studied. In the bioreactors was obtained as result that the viable cell concentration was 8 x 10⁹ and 4.5 x 10⁹.

Key words: fermentation, bioreactor, *Salmonella enteritidis*.

INTRODUCCIÓN

Salmonella enteritidis, es una bacteria aislada, inicialmente en roedores, se define como fagotipo 6^a (PT6^a), lisina negativa, sensible a muchos antimicrobianos y que presenta tres plásmidos de 59, 4 y 3 Mda. El perfil plasmidial de esta cepa fue caracterizado en el "Public Health Laboratory Service" en Colindale, Inglaterra, por el Dr. E. J. Threlfall, que determinó que el plásmido de mayor peso molecular (59 Mda) contenía los genes de virulencia de (spv), según refiere Alfonso (1).

La bacteria *Salmonella enteritidis*, fagotipo 6^a, es el principio activo del Biorat. Está incluida en un cebo a base de arroz sin descascarar. Es monopatógena para roedores múridos y algunos integrantes de la familia *Cricetidae*, y ha sido probada su inocuidad para la especie humana y otros animales (2).

Con el objetivo de aumentar la productividad de la Planta de Biorat se decide realizar el diseño de un biorreactor con una capacidad de fermentación de 150 L. para evitar adquirir el inóculo de *Salmonella enteritidis* de la Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas, que representa ahorro en la adquisición, transportación y almacenaje adecuado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para la fermentación consta de 2 productos nutrientes que permiten el crecimiento de la *Salmonella enteritidis* var. danysz, lisina negativa, fagotipo 6a, estos componentes son: la salsa de pescado, obtenida por un proceso de fermentación de pequeños peces, que posee un contenido de proteínas por encima del 35 g/L y soya en polvo, con una cantidad de proteínas entre el 45 – 55 %.

Los componentes se agregan en proporción con el volumen de fermentación que se desee realizar, a razón de 10 g de soya en polvo por litro de la cantidad total a fermentar (1.0 %), y 25 mL de salsa de pescado por litro de la cantidad total a fermentar (2.5 % v/v).

Al terminar, se adiciona NaOH o HCL, si fuese necesario, para regular el pH hasta 7. Se enrasa con agua suave hasta el 75 % del fermentador. Una vez realizada esta operación se cierra.

Se parte de un tubo que contiene 10 ml de medio Merezkhonski, en el cual se encuentra conservada la cepa de *Salmonella enteritidis*. Con una aguja larga se toma el contenido y se siembra en un Erlenmeyers de 250 mL, que contiene 100 mL de medio caldo nutriente, se añaden 5 mL del contenido de cepa en el Erlenmeyers. A este cultivo se le realiza tinción de Gram, control de esterilidad en medio tioglicolato y caldo soya triptona para el control del microorganismo. Luego el Erlenmeyers se incuba a 37 °C, durante 20 horas.

Siembra en el fermentador de 50 L

Pasado el periodo de incubación se realiza una observación microscópica para corroborar preliminarmente que no exista contaminación. Una vez obtenido el microorganismo típico de la cepa se procede a sembrar el fermentador de 50 L, que contiene caldo nutriente estéril. El cultivo se mantiene en condiciones de operación de 300 r.p.m. a 37 °C.

Determinación de la cinética de crecimiento de la *Salmonella*

En el diseño del reactor biológico es necesario conocer la cinética de crecimiento del microorganismo, el consumo de sustrato, el rendimiento de biomasa y la velocidad específica de crecimiento.

Para la obtención de los parámetros cinéticos del cultivo de *Salmonella enteritidis*, se utiliza una cepa liofilizada y certificada del cepario de la Empresa de Vacunas Virales y Bacteriana, perteneciente al Grupo Empresarial Labiofam. Con el objetivo de reproducir el microorganismo fue inoculado el fermentador de 50 L, con dicha cepa a 37 °C, por 24 horas. Luego se siembra en agar verde brillante, un medio diferencial, donde las colonias que presentaron las características morfológicas típicas de *Salmonella enteritidis* fueron replicadas en el mismo medio hasta obtener un cultivo puro (3, 4).

Para la realización de la cinética se toman, asépticamente, muestras de 10 mL, desde el comienzo a la 0 hora, hasta las 5 horas, con una frecuencia de 0.15 hora. Las muestras se centrifugaron a 5000 r.p.m., por 10 minutos, para separar la biomasa del sobrenadante, según metodología planteada por Villarreal *et al.* (5).

La concentración de biomasa se establece por peso seco (6, 7). En el sobrenadante se determina la concentración de proteínas totales mediante la técnica espectrofotométrica de Lowry (8, 9). En el cálculo del rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) y el consumo de sustrato (C_s) se emplean las ecuaciones 1 y 2.

$$Y_{x/s} = -\frac{X_o - X}{S_o - S} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$C_s = \frac{(S_o - S)}{S_o} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

El crecimiento microbiano fue estudiado y modelado según la ecuación de cinética de crecimiento celular para un sistema discontinuo, y en la etapa exponencial se obtiene la velocidad específica de crecimiento (10).

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_o}\right)}{t_f + t_o} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

X = Concentración final de biomasa (g/L)

X_o = Concentración inicial de biomasa (g/L)

S = Concentración final de proteínas totales (g/L)

S_o = Concentración inicial de proteínas totales (g/L)

μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

t_f = Tiempo final (h)

t_o = Tiempo inicial (h)

El inóculo de *Salmonella enteritidis* tiene que tener una titulación de 2×10^9 UFC/mL, según PNO-08-01-002-2010 (11), para esto se realiza la concentración de microorganismos mediante una cámara Neubauer de un área de 0.0025 mm^2 y una profundidad de 0.1 mm (4), junto con un microscopio Olympus.

Ensayo microbiológico para el conteo de *Salmonella enteritidis* viable

Se toma 10 mL de la muestra y se vierte en 90 mL de solución reguladora de fosfato, pH 7.2, realizando una dilución 1:10. Posteriormente, se realizan diluciones decimales desde 10^7 hasta 10^{11} , con 9 mL de caldo soya triptona, se realizan tres replicas con 1 mL de las diluciones 10^6 a 10^{11} , en cada una de las placas de Petri. En estas se depositan de 15 a 20 mL de medio agar verde brillante estéril fundido y enfriado a temperatura de 45°C . Se rotan suavemente las placas para homogeneizar y se deja solidificar el medio, a temperatura ambiente. Se invierten las placas y se incuban a una temperatura de 35 a 37°C , de 24 a 48 horas.

Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa)

La expresión de kLa relaciona la potencia (P), el volumen (V) y la velocidad del gas (V_s). Para sistemas no viscosos, las correlaciones más utilizadas son las propuestas por van Riet. K. (12), según Alfonso (2015), empleadas por diferentes autores con éxito, obteniéndose la ecuación 4 (13).

$$kLa = 0.026 \cdot \left(\frac{P}{V}\right)^{0.4} \cdot V_s^{0.5} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$V_s = \frac{Q}{A_{\text{transversal}}} \quad (\text{Ec. 5})$$

Para el cálculo de la velocidad superficial del gas se utiliza la razón entre el flujo volumétrico de aire (Q) y el área de sección transversal del biorreactor ($A_{\text{transversal}}$).

Diseño del biorreactor

Estableciendo las relaciones de magnitudes en el reactor modelo o banco, se busca los criterios de escalado más apropiadas para el caso de estudio. En el sistema se mantiene el principio de semejanza geométrica entre el modelo y el prototipo; pero, en procesos biológicos es necesario, además, un criterio de escalado que asegure el funcionamiento exitoso del prototipo (14).

Para este caso el criterio de escalado, que marca el régimen de cambio, es el de potencia consumida por el agitador, por unidad de volumen del cultivo (P/V), representado por la relación:

$$\left(\frac{P}{V}\right)_1 = \left(\frac{P}{V}\right)_2 \quad (\text{Ec. 6})$$

Siendo:

P_1 = Potencia consumida por el sistema aireado del biorreactor modelo (W)

P_2 = Potencia consumida por el sistema aireado del biorreactor prototipo (W)

V_1 = Volumen del biorreactor modelo (m³)

V_2 = Volumen del biorreactor prototipo (m³)

Para el completamiento del diseño de un fermentador prototipo se debe conocer el dimensionamiento del fermentador, estimar el consumo de potencia de agitación y los calores involucrados en el proceso. Al conocer los calores que intervienen en la fermentación se puede conocer la masa del agente de calentamiento, para mantener 37 °C en el medio de cultivo.

Dimensionamiento del biorreactor

Para el cálculo del dimensionamiento hay que tener en cuenta el espacio disponible en la planta. Las dimensiones se calculan con una relación de altura/diámetro igual a 1 (15, 16), mediante la siguiente ecuación:

$$V_F = \frac{\pi \cdot D^2 \cdot H}{4} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

H= Altura del líquido en el reactor (m)

D= Diámetro del reactor (m)

V= Volumen del líquido en el reactor (m³)

Dimensionamiento de los impulsores

Los impulsores son cuchillas planas tipo Roushton, por lo que sus dimensiones se calculan con las ecuaciones:

$$D_i = \frac{D_F}{3} \quad (\text{Ec. 8})$$

$$A_i = \frac{D_i}{5} \quad (\text{Ec. 9})$$

$$D_d = \frac{2 \cdot D_i}{3} \quad (\text{Ec. 10})$$

$$L_i = \frac{D_i}{4} \quad (\text{Ec. 11})$$

Se necesita que los impulsores estén ubicados estratégicamente dentro del biorreactor.

$$H_a = 1 \cdot D_i \quad (\text{Ec. 12})$$

$$H_b = 2 \cdot D_i \quad (\text{Ec. 13})$$

$$H_c = 3 \cdot D_i \quad (\text{Ec. 14})$$

Donde:

V_F = Volumen del biorreactor (m^3)

H = Altura (m)

D_F = Diámetro del biorreactor (m)

D_i = Diámetro del impulsor (m)

A_i = Ancho de las cuchillas (m)

D_d = Diámetro del disco (m)

L_i = Longitud de las cuchillas, desde el impulsor al primer cojinete (m)

H_a = Distancia entre el fondo del biorreactor al primer agitador (m)

H_b = Distancia entre el fondo del biorreactor al segundo agitador (m)

H_c = Distancia entre el fondo del biorreactor al tercer agitador (m)

Para el completamiento del diseño de un biorreactor prototipo se debe estimar el consumo de potencia de agitación y los calores involucrados en el proceso. Conociendo los calores que intervienen en la fermentación se puede conocer la masa del agente de calentamiento para mantener 37°C en el medio de cultivo (15).

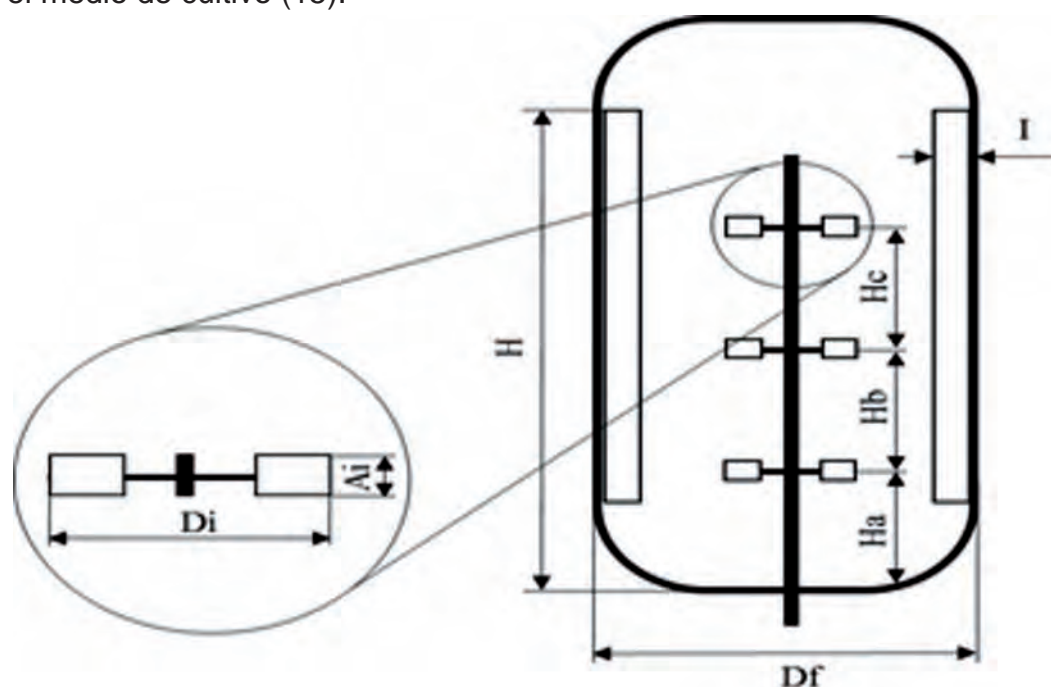


Figura 1. Fermentador de 50 L de capacidad con sus relaciones de magnitud estándar para agitadores de turbina de hojas planas.

Potencia consumida para la agitación

La potencia requerida para mezclar fluidos no aireados depende de la velocidad del agitador, la forma y el tamaño del impulsor, la geometría del tanque y la densidad y viscosidad del fluido. La relación entre estas variables generalmente se expresa en términos de números adimensionales, como el número de Reynolds (Re), ecuación (15) citada en (14) y el número de Potencia (N_p) ecuación (16) citada en (13). Este para biorreactores agitados mecánicamente se define como

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot D^2}{\mu_m} \quad (\text{Ec. 15})$$

$$P = N_p \cdot \rho N^3 D_i^5 \quad (\text{Ec. 16})$$

Siendo:

Re = Número de Reynolds (adimensional)

ρ = Densidad del medio de cultivo (kg/m^3)

μ_m = Viscosidad del medio (kg/m s)

N = Velocidad del agitador (rpm)

N_p = Número de potencia (adimensional)

D_i = Diámetro del impelente (m)

P = Potencia consumida por el agitador (W)

Balance de calor

Se realizó un balance de calor en el proceso de fermentación con la metodología planteada por Ortega (17).

$$\begin{array}{ccccccc} \text{Razón de} & & & & & & \\ \text{acumulación} & = & \text{Calor} & - & \text{Calor} & + & \text{Calor} \\ \text{de calor} & & \text{entra} & & \text{sale} & & \text{evolucionado} \\ & & & & & & - \text{Calor} \\ & & & & & & \text{transferido} \end{array}$$

Se desprecian las pérdidas de calor al exterior, por tanto queda el balance de calor de la forma:

$$Q_a = Q_g + Q_{met} - Q_{int} \quad (\text{Ec. 17})$$

Calor disipado por el agitador

Energía disipada por el agitador, se formula como la energía específica que suministra el agitador, para una velocidad de giro dada. Esta potencia se considera que se transforma totalmente en flujo de calor (17):

$$Q_{agit} = N_p \cdot \rho N^3 D_i^5 \quad (\text{Ec. 18})$$

Calor intercambiado con la chaqueta

Por medio de un balance de calor en el sistema de proceso fluido térmico en la chaqueta, se llega a la expresión:

$$Q_{int} = U \cdot A \cdot \Delta T_{media} \quad (\text{Ec. 19})$$

Calor metabólico

Este es el calor producido por los microorganismos como resultado del metabolismo, es necesaria para el crecimiento y producción de energía, con la metodología empleada por Mendoza (18), que expresa:

$$Q_{met} = V_f \cdot \frac{Y_{x/s} \cdot S_0 \cdot \mu}{Y_{kcal}} \quad (\text{Ec. 20})$$

Cantidad de agua

Se realiza un balance para el agua de enfriamiento, el flujo másico de agua se puede obtener con la ecuación:

$$Q_{\text{agua}} = 60.54 \frac{\text{kcal}}{\text{h}} \quad (\text{Ec. 21})$$

Donde:

Q_{ac} = Velocidad de acumulación de calor (kcal/h)

Q_{ag} = Velocidad de generación de calor debido a agitación (kcal/h)

Q_{met} = Velocidad de generación de calor metabólico (kcal/h)

U = Coeficiente global de transferencia de calor (kW/m² °C)

ΔT = Diferencia de temperatura entre el medio de cultivo y el medio de enfriamiento (°C)

A = Área de transferencia de calor (m²)

C_p = Capacidad calórica (kcal/kg °C)

m = Flujo másico de agua (kg/h)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la cinética de crecimiento de la *Salmonella enteritidis* en fermentador de 50 L

Durante el tiempo de operación de la fermentación fue monitoreado el rendimiento de biomasa en función del sustrato, la concentración de biomasa y el consumo de sustrato contra el tiempo entre otros parámetros. Después de 4 horas de fermentación la densidad óptica se mantuvo constante y el pH alcanzó el valor de 7.2 y dio por terminado el proceso de fermentación. En la tabla 1 se observan los parámetros estudiados.

Tabla 1. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Salmonella enteritidis* en biorreactor de 50 L

Corridas del proceso de fermentación											
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	
X_0	1.83	1.43	1.37	1.91	1.58	1.34	1.47	1.82	1.43	1.69	g/L
X	6.94	6.76	6.29	6.34	6.59	6.53	6.67	6.97	6.21	6.86	g/L
S_0	9.94	9.59	9.81	9.54	9.65	9.35	9.47	9.13	9.25	9.32	g/L
S	1.26	1.48	1.53	1.78	1.43	1.72	1.12	1.20	1.94	1.68	g/L
μ_{max}	0.619	0.628	0.636	0.633	0.691	0.644	0.662	0.658	0.635	0.657	h ⁻¹
$Y_{x/s}$	0.645	0.694	0.649	0.617	0.682	0.643	0.664	0.609	0.622	0.684	g/g
Cs	85.45	84.58	85.32	83.81	84.52	85.14	84.58	85.37	85.49	84.57	%

En la curva de crecimiento (figura 2), se definen dos de las fases características para *Salmonella enteritidis*, durante un proceso de fermentación. La fase denominada exponencial se observa con claridad, esta culmina a las tres horas de cultivo y se alcanzó una concentración celular de 6.01 g de peso seco/ L. La velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) promedio calculada, a partir de los datos experimentales de esa etapa, es igual a 0.672 h⁻¹.

En la literatura se reportan valores de μ_{max} para varias especies del genero *Salmonella* en función de la temperatura de cultivo. En la tabla 2 se relaciona esta variable, teniendo en cuenta la temperatura de cultivo estudiada (19).

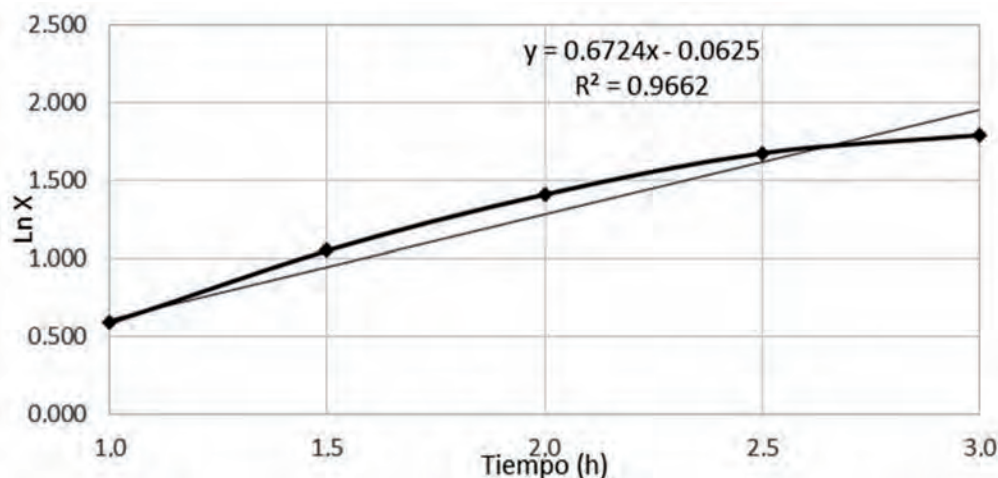


Figura 2. Cinética de crecimiento promedio de los 10 procesos de fermentación.

Tabla 2. Velocidad máxima de crecimiento de varias especies de *Salmonella* publicada en la literatura

Temperatura de cultivo	<i>Salmonella enteritidis</i> (20)	<i>Salmonella typhimurium</i> (21)	<i>Salmonella heidelberg</i> (22)
37.8 °C ± 2	0.743 h ⁻¹	0.906 h ⁻¹	1.236 h ⁻¹

Estos valores son superiores a los reportados en el presente estudio. Es preciso destacar que estas diferencias que existen en los valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ pueden deberse a la diferencia de los medios de cultivos empleados, ya que estos valores reportados fueron empleados como medio de cultivo, carne de cerdo y pollo.

Conteo de *Salmonella enteritidis* viable en fermentador de 50 L

El conteo de células viables en proceso de fermentación de 50 L (0.05 m³) de *Salmonella enteritidis*, según procedimiento PNO – 8-01-002 (11), muestra valores muy por encima de lo normado (2×10^9 UFC/mL), esto se debe a que la fermentación es a pequeña escala y se tiene más control del proceso de fermentación. Los valores de células viables obtenidas están entre 7×10^9 y 9×10^9 UFC/mL. Estos resultados se muestran en la figura 3.

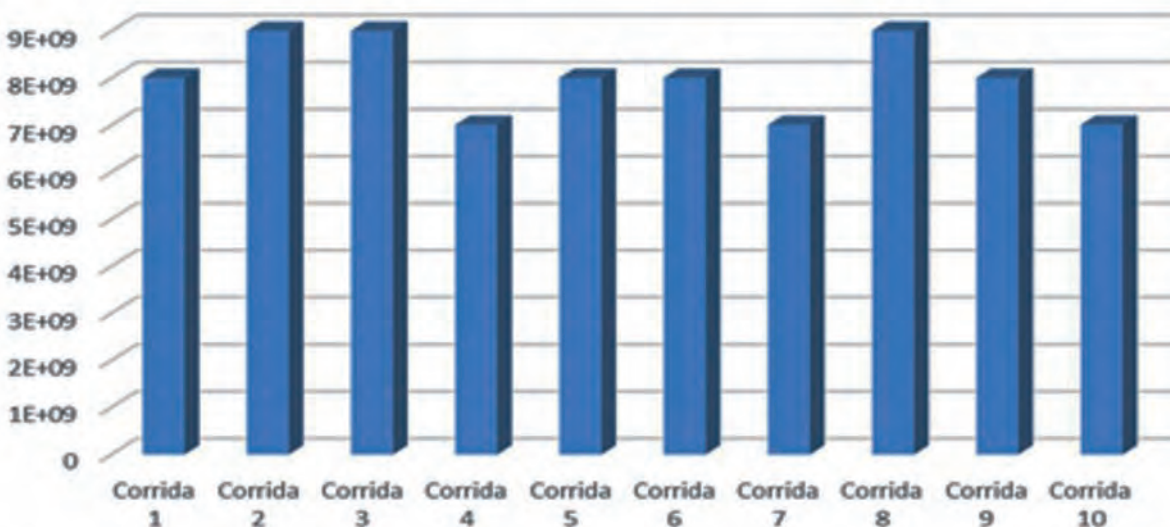


Figura 3. Conteo de *Salmonella enteritidis* viable en fermentador de 50 L.

Estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa)

En todas las escalas, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno aumenta a medida que el volumen de líquido se incrementa. Esto se debe a que, al trabajarse con un sistema de agitación múltiple, la corriente de aire se desplaza desde el aspersor hacia la punta del agitador, donde la probabilidad de ruptura de las burbujas de aire es mayor (23). Esto se evidencia en los resultados de la estimación del coeficiente de transferencia de oxígeno en los biorreactores modelo y prototipo. Estos valores se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Valores de coeficiente de transferencia de oxígeno calculado en ambas escalas en condiciones de fermentación

kLa en fermentador de 50 L (0.05 m ³)	kLa en fermentador de 150 L (0.150 m ³)	U/M
2.59	3.18	h ⁻¹

Esta característica inherente al disco turbina hace que las burbujas se trasladen hacia las paletas, se rompan y provoquen que, a cualquier tiempo, exista una cantidad mínima de burbujas que se dispersan por los costados del reactor.

En la literatura hay informes de valores de kLa obtenidos en el intervalo de 0.98 h⁻¹ a 11.49 h⁻¹ para cultivos de varias especies de género *Salmonellas* (23). Como se observa en la tabla 3, los valores de kLa se encuentran en el intervalo publicado.

Diseño del biorreactor en fermentador de 150 L

Dimensionamiento del fermentador

En la tabla 4 se muestra el dimensionamiento del fermentador diseñado. El sistema de agitación del fermentador es de turbina, tipo Rushton de seis hojas planas, para asegurar homogeneidad en todo el volumen de trabajo. Se emplean tres turbinas a lo largo del eje de agitación, que se encuentran de manera equidistantes. Asimismo, cuenta con cuatro deflectores, con la finalidad de mejorar el sistema de agitación y facilitar la limpieza.

Tabla 4. Resultados del diseño del biorreactor prototipo

Elementos		Valores	Unidades
V _F	Volumen del fermentador	150 (0.150)	L (m ³)
D _F	Diámetro del fermentador	0.576	m
H _f	Altura total	0.720	m
D _i	Diámetro del impulsor	0.192	m
A _i	Ancho de las cuchillas	0.0384	m
D _d	Diámetro del disco	0.128	m
L _i	Longitud de las cuchillas	0.048	m
H _a	Distancia del fondo al primer agitador	0.192	m
H _b	Distancia del fondo al segundo agitador	0.384	m
H _c	Distancia del fondo al tercer agitador	0.576	m
N _b	Número de deflectores	4	U

Potencia consumida por el agitador y velocidad de agitación

Para hallar la potencia consumida por el agitador del fermentador de 150 L, se emplea la relación de P/V con respecto al fermentador de 50 L, donde se tiene:

$$P_2 = 70.41 \text{ W}$$

Para lograr que no exista muerte celular por agitación excesiva, es necesario calcular la velocidad de agitación para el fermentador prototipo. Este parámetro se estima a partir de la ecuación 16, manteniendo el N_p constante.

$$N_2 = 196 \text{ rpm}$$

Balance de calor

Para estas determinaciones se emplean las ecuaciones descritas en el acápite de materiales y métodos. Los resultados obtenidos son:

- Calor acumulado.
Se desprecia por ser este un sistema estacionario.
- Calor disipado por el agitador

$$Q_{agit} = 60.54 \frac{kcal}{h}$$

- Calor intercambiado con la chaqueta

$$Q_{int} = 7205.31 \frac{kcal}{h}$$

- Calor metabólico

$$Q_{met} = 1177.02 \frac{kcal}{h}$$

- Cantidad de agua de calentamiento

El flujo másico de agua se calcula con un 10 % de pérdida de calor.

$$m_{(agua)} = 128.90 \frac{kg}{h}$$

$$m_{(agua)} = 0.128 \frac{m^3}{h}$$

El flujo másico de agua se calculó con un 10 % de pérdida de calor (24). La cantidad de agua es de 0.128 m³/h, este flujo de agua será capaz de mantener la temperatura a 37 °C, durante la fermentación.

Determinación de la cinética de crecimiento de *Salmonella enteritidis* en fermentador de 150 L (0.150 m³)

En la fermentación, en el biorreactor de 150 L (0.150 m³), fueron determinados varios parámetros cinéticos que se relacionan a continuación. Al alcanzar las 4 horas de fermentación, la densidad óptica se mantuvo constante y el valor de pH alcanzó el entorno de 7.4. Se evaluaron el rendimiento de biomasa y el consumo de sustrato, entre otros parámetros. La tabla 5 muestra cómo los parámetros cinéticos tienen un comportamiento similar en las 10 corridas.

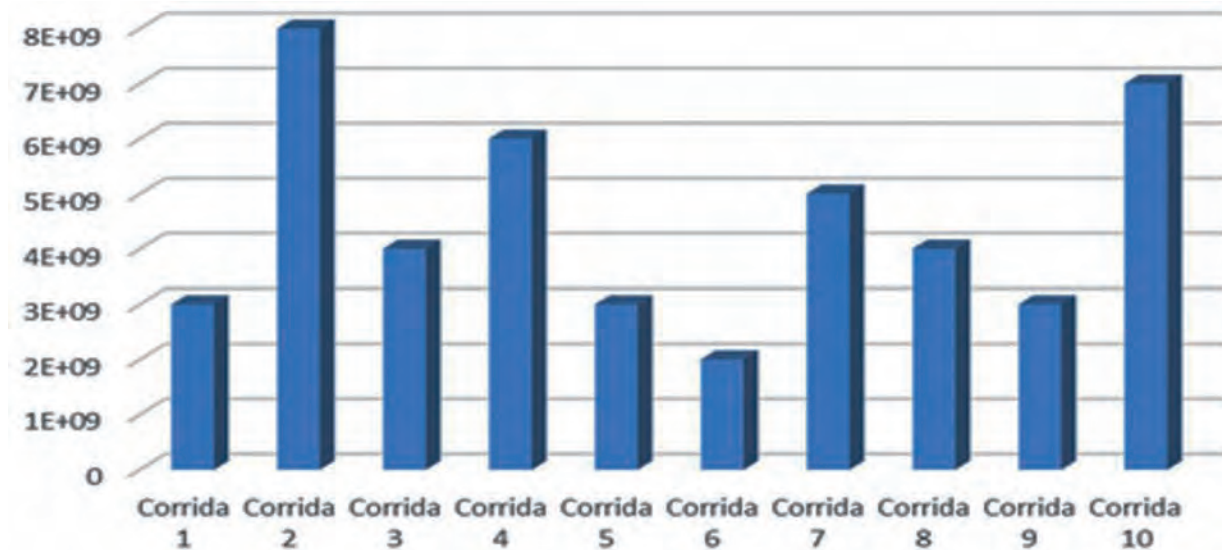
Conteo de *Salmonella enteritidis* viable en fermentador de 150 L (0.150 m³)

Los estudios realizados en el conteo de células viables en proceso de fermentación de 150 L (0.150 m³) de *Salmonella enteritidis* resultaron positivos al obtenerse valores por encima de 2x10⁹ UFC/mL, como lo establece el PNO 8-01-002 (11).

En la figura 4 se muestra el comportamiento del conteo de *Salmonella enteritidis* viable en las 10 fermentaciones que se realizaron, los valores de células viables reportadas están entre 2x10⁹ y 8x10⁹ UFC/mL.

Tabla 5. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Salmonella enteritidis* en biorreactor de 150 L (0.150 m³)

Corridas de procesos de fermentación											
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	
X_0	1.22	1.81	1.45	1.39	0.99	1.52	1.05	1.32	1.28	1.09	g/L
X	6.41	6.27	6.53	6.02	6.49	6.53	6.43	6.92	6.87	6.92	g/L
S_0	9.02	9.59	9.43	9.53	8.93	9.49	9.09	9.22	9.83	9.91	g/L
S	1.96	1.46	1.33	1.64	1.38	1.56	1.27	1.42	1.61	1.16	g/L
μ_{max}	0.638	0.675	0.628	0.661	0.611	0.633	0.681	0.663	0.682	0.691	h-1
$Y_{x/s}$	0.554	0.549	0.561	0.551	0.543	0.557	0.558	0.559	0.558	0.553	g/g
Cs	85.04	84.82	85.29	83.49	84.07	85.62	84.97	85.64	85.57	84.32	%

**Figura 4.** Conteo de *Salmonella enteritidis* viable en fermentador de 150 L (0.150 m³).

Validación del escalado

Para la validación del escalado se realizaron comparaciones estadísticas con los resultados de las corridas experimentales realizadas en ambos fermentadores.

Análisis estadístico en el fermentador de 50 L (0.050 m³)

En la tabla 6 se presentan los resultados estadísticos de las mediciones de las corridas experimentales estudiadas en el fermentador de 50 L.

Tabla 6. Resumen estadístico de las variables en las fermentaciones

	X_0	X	S_0	S	μ_{max}	$Y_{x/s}$	Cs
Recuento	10	10	10	10	10	10	10
Promedio	1.587	6.616	9.505	1.514	0.646	0.551	84.884
Varianza	0.0608	0.0858	0.1111	0.0513	0.0007	0.00003	0.5231
Desviación estándar	0.210	0.272	0.2531	0.2685	0.0210	0.0296	0.5526
Coefic. de variación	13.27 %	4.12 %	2.66 %	17.73 %	3.85 %	4.56 %	0.65 %
Error estándar	0.0666	0.0862	0.0800	0.0849	0.0066	0.0093	0.1747
Sesgo estandarizado	0.5209	-0.2407	0.3864	0.0028	1.2405	0.0773	-0.7942
Curtosis estandarizada	-1.0289	-0.8870	-0.3761	-0.6735	0.6442	-0.8568	-0.22514

Como se observa en la tabla 6, todas las variables analizadas tienen pocas variaciones al tener pequeñas desviaciones estándar. El coeficiente de variación tiende a un comportamiento menor de 20 %, por lo que el promedio es representativo del conjunto de datos, indica que existe homogeneidad en la muestra. Ninguna de las variables muestra valores de sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada fuera del intervalo de -2 a 2, lo cual permite afirmar que todas las variables cumplen con la distribución normal.

Análisis estadístico en el fermentador de 150 L (0.150 m³)

En la tabla 7 se presentan los resultados estadísticos de las mediciones de las corridas experimentales estudiadas en el fermentador de 50 L.

Tabla 7. Resumen estadístico de las variables en las fermentaciones

	Xo	X	So	S	μ_{\max}	Yx/s	Cs
Recuento	10	10	10	10	10	10	10
Promedio	1.312	6.539	9.404	1.479	0.656	0.554	84.88
Varianza	0.0612	0.0863	0.1109	0.0518	0.0008	0.00004	0.5229
Desviación estándar	0.2466	0.2930	0.3334	0.2266	0.0271	0.00547	0.7232
Coefic de variación	18.80 %	4.48 %	3.54 %	15.32 %	4.87 %	0.83 %	0.85 %
Error estándar	0.0780	0.0926	0.1054	0.0716	0.0085	0.0017	0.2287
Sesgo estandarizado	0.8660	-0.1136	0.0756	1.1113	-0.4818	-1.2044	-1.0371
Curtosis estandarizada	0.3101	-0.2711	-0.7144	0.7980	-0.8122	0.3502	-0.1361

En la tabla 7 se observa cómo las variables muestran valores de sesgo estandarizado y de curtosis estandarizada, fuera del intervalo de -2 a 2, permite afirmar que todas las variables cumplen con la distribución normal. El coeficiente de variación muestra un comportamiento menor a 20 %, significa que el promedio es representativo del conjunto de datos y, por ende, homogéneo. Todas las variables analizadas tienen pocas variaciones al tener pequeñas desviaciones estándar.

Análisis estadístico entre ambas escalas

En el análisis de los parámetros cinéticos entre el modelo y el prototipo se realizaron dos pruebas, la prueba de rangos múltiples y prueba de hipótesis. A continuación se muestran los resultados.

Pruebas de Múltiples Rangos

La tabla 8 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes a otras.

La tabla muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0 % de confianza. Esto demuestra que estos valores pertenecen a una misma población. Por lo que se evidencia reproducibilidad entre ambas escalas.

Tabla 8. Resumen estadístico de las variables en las fermentaciones

Método: 95.0 porcentaje LSD	Casos	Media	Grupos homogéneos
Biomasa final (X_{50L}) Fermentador 50 L	10	6.616	X
Biomasa final (X_{150L}) Fermentador 150 L	10	6.539	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
X_{50L} F-50 L - X_{150L} F-150		0.077	0.0256734
Método: 95.0 porcentaje LSD	Casos	Media	Grupos homogéneos
Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) Fermentador 50 L	10	0.546	X
Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) Fermentador 150 L	10	0.556	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
μ_{max} F-50 L - μ_{max} F-150		-0.01	0.0228157
Método: 95.0 porcentaje LSD	Casos	Media	Grupos homogéneos
Rendimiento de biomasa (Yx/s) Fermentador 50 L	10	0.650	X
Rendimiento de biomasa (Yx/s) Fermentador 150 L	10	0.654	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Yx/s F-50 L - Yx/s F-150		0.0034	0.0200575

CONCLUSIONES

El proceso de fermentación discontinua desarrollado es escalable a 150 L, lográndose se reprodujeron los resultados de concentración de biomasa ($X_0 = 1.312$ g/mL - $X = 6.539$ g/mL), rendimiento de biomasa (0.554 g/g) y velocidad específica de crecimiento (0.672 h⁻¹) empleando como criterio de escalado P/V constante. En la validación del diseño propuesto del fermentador de 150 L con respecto al fermentador de 50 L no se obtuvieron diferencias significativas estadísticamente, en los parámetros estudiados como: concentración de biomasa y sustrato y la velocidad específica de crecimiento. Se determinó la concentración de células viables en el cultivo de *Salmonella enteritidis* en ambas escalas que mostró para los biorreactores de 50 L y 150 L resultados de 8×10^9 y 4.5×10^9 , respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alfonso, Y. Propuesta de diseño de los principales equipos tecnológicos de la Planta de ron-denticida biológico Biorat. Cuba, Universidad de Matanzas. 2015.
2. Alfonso, Y. Diseño de los principales equipos de la planta de Biorat. Lituania, Editorial Académica Española. 2019
3. Moreno, E., Venegas D. Diseño y construcción de un biorreactor esterilizable y de bajo costo para el estudio de crecimiento de microorganismos. Bogota, Colombia, Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 2017.
4. Serna, L., et al. Actividad antimicrobiana y cinética de fermentación de *Weissella confusa* contra *Xanthomonas albilineans*. Acta Agronómica 62(2). 2013.
5. Villarreal, J., et al. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Revista Salud Uninorte 30(1). 2014

6. Martínez, D. Obtención de un biocatalizador termoestable a partir de la expresión de la β -fructosidasa de *Thermotoga maritima* en *Pichia pastoris* GS115 para la producción de azúcares invertidos. Cuba, Universidad Central Marta Abreu de las Villas. 2015
7. Martin, A. Control del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* en la síntesis de Glutati6n. España, Universidad de Granada. 2005
8. Flores, L. and A. Ruiz. Implementaci6n de una metodologí a analít ica para la cuantificaci6n de proteínas en la microalga *Arthrospira platensis*. Revista de la Sociedad Quím ica del Perú 4(83). 2017
9. Waterborg, J. H. The Lowry Method for Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook. H. Press. New York, Estados Unidos. 2009
10. Ruiz, O. Proceso de fermentaci6n para la obtenci6n del plásmido pIDKE2 en *E. coli*, un candidato vacunal contra el virus de la Hepatitis C. Cuba, Instituto Superior Politécnico Jose Antonio Echeverría. 2013
11. Labiofam. Pureza microbiol6gica del in6culo de BIORAT obtenido por fermentaci6n. Labiofam. Cuba. PNO – 08-01-002. 2010
12. van´ Riet K. apud Alfonso, Y. van´ Riet K. (1979) Review of measuring methods and results in non-viscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels, Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev., 18, 367-375.
13. Quir6s, J. Determinaci6n de los modelos para la predicci6n de los coeficientes volumétr icos de transferencia de masa (kLa) oxígeno-medio de cultivo en biorreactores tipo tanque agitado. San Juan, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 2014
14. Doran, P. Bioprocess Engineering Principles. Oxford. United Kindon, Elsevier Science & Technology Principles. 2013
15. Muñoz, E. Escalamiento del proceso de obtenci6n de fructo oligosacáridos a partir de jugo de caña mediante síntesis enzimática con células permeabilizadas de *Candida apícola*. Centro de investigaci6n y asistencia en tecnologí a y diseño del estado de Jalisco. Mexico. 2016
16. Arezo, F. Puesta a punto del proceso de producci6n de antígen o fimbriales K99 y F17 de *Escherichia coli*. Uruguay, Universidad ORT. 2016.
17. González, K. and Torres M. (2015). “Diseño de un tanque agitado para la etapa de hidrólisis en la producci6n de miel de agave.” Revista Jóvenes Investigadores 3(1).
18. Ortega F, Pérez O, López E. Modelo Semifís ico de Base Fenomenol6gica del Proceso Continuo de Fermentaci6n Alcoh6lica. Informaci6n Tecnol6gica, 27(1). 2016
19. Mendoza, J. Diseño de un biorreactor para elaborar vino de frutas Instituto Politécnico Nacional. 2006
20. Almeida, C. The transfer and growth of *Salmonella* modelled during pork processing and applied to a risk assessment for the catering sector. Denmark, Technical University of Denmark. 2012
21. Zhang, J., Liu, G., Li, P. and Qu, Y. Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat. Food Control 21, 198-202. 2010
22. Moller C.O.A., Nauta M.J., Christensen B.B., Dalgaard P., Hansen T.B. Modelling transfer of *Salmonella Typhimurium* DT104 during simulation of grinding of pork. Journal of Applied Microbiology. 112 (1), 90-98. 2012.
23. Alban L., Baptista F.M., Møgelmoose V., Sorensen L.L., Christensen H., Aabo S., Dahl J. *Salmonella surveillance* and control for finisher pigs and pork in Denmark – A case study. Food Research International. 45, 656-665. 2012
24. Arias, M., et al. Determinaci6n de coeficientes de transferencia de calor y masa en un agitador rotatorio para utilizarlo en procesos fermentativos de *Salmonella* spp. Revista Colombiana de biotecnologí a 3(1). 2016
25. Serrat Diaz, M.; Mendez Hernandez, A. A. “Construcci6n y Validaci6n Experimental de un Biorreactor Artesanal Tipo Tanque Agitado para Fermentaciones Sumergidas a Escala de Laboratorio”. Revista Tecnologí a Quím ica [online]. 2015, 35, (3), 362-375. ISSN 2224-6185.

Procedimiento para determinar las potencialidades de producción de alimento en la provincia de Camagüey

Hilda de las Mercedes Oquendo-Ferrer^{1*}, Luis Beltrán Ramos-Sánchez¹, Redimio Pedraza-Olivera¹, Lorena de Jesús Pazos-Amayuela¹, Yainerys Estrella Martínez-Fernández¹ y Erenio González-Suárez²

1. Universidad de Camagüey Ignacio Agramonte Loynaz, Facultad de Ciencias Aplicadas, Dpto. Ingeniería Industrial, Carretera Circunvalación Norte, entre Camino Viejo a Nuevitas y Avenida Ignacio Agramonte. Camagüey, Cuba.
[*hilda.oquendo@reduc.edu.cu](mailto:hilda.oquendo@reduc.edu.cu)
2. Universidad Central de Las Villas Martha Abreu. Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara. CP 54830, Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

En la provincia de Camagüey existe un alto déficit de alimento animal. Se valoran alternativas que aprovechen las capacidades existentes de las plantas de miel-urea-bagacillo (MUB) en los centrales azucareros, se definió como objetivo: establecer un procedimiento que evalúe las potencialidades de producción y el impacto económico de los productos propuestos. El procedimiento incluye métodos para la determinación de capacidades de las plantas, considerando la incertidumbre en la demanda y disponibilidad de materia prima, métodos de optimización para la distribución del producto y cálculo de indicadores económicos de las inversiones: Valor Actual Neto (VAN), Tasa Interna de Rendimiento (TIR), Rentabilidad del VAN (RVAN) y Período de Recuperación al Descontado (PRD). El estudio de capacidades arrojó que, considerando la demanda, la capacidad puede ser de 4100 t/d, por la disponibilidad de materia prima 44 832 t/d y que la instalada es de 165 t/d, demostrándose que existe un gran potencial de producción. Se propusieron tres esquemas tecnológicos y se determinó el más factible a partir de los indicadores económicos, empleando como criterio el máximo VAN. El procedimiento propuesto facilita la toma de decisiones en estos procesos.

Palabras clave: procedimiento, alimento animal, capacidades, incertidumbre, factibilidad, toma de decisiones.

ABSTRACT

Camagüey has a high deficit of animal feed. Measured alternatives to take advantage of existing capacities of plants molasses-urea-bagacillo (MUB) in the sugar mill, being defined as objective establish a procedure assess the potential production and the economic impact of the products proposed. The procedure includes methods for the determination the capabilities of plants considering uncertainty in demand and availability of raw materials, optimization methods for product distribution and calculation of economic indicators of investment: Net Present Value (VPN), Internal Rate of Return (TIR), profitability of VPN (RVAN) y Payback period at Discounted (PRD). As a result of the study of capacities it was obtained that, considering the demand, the ability can be of 4100 t/d, for availability of raw materials 44 832 t/d and installed capacity is 165 t/d, showing is that there is a great potential production. Three technological schemes were proposed and the most feasible was determined from the economic indicators, using VPN as the maximum criterion. The procedure proposed facilitates decision-making.

Key words: procedure, animal feed, capacities of plants, uncertainty, feasibility, decision-making.

INTRODUCCIÓN

La producción de alimentos resulta cada vez más estratégica y priorizada en los planes de desarrollo sostenible del país (1). El recrudecimiento sin precedentes de bloqueo económico del gobierno de EE. UU. y la crisis mundial provocada por la pandemia de la Covid-19 obligan al país a reducir las costosas importaciones de alimentos y a alcanzar la total soberanía alimentaria. El ministro cubano de Agricultura, Gustavo Luis Rodríguez Rollero, en el programa televisivo Mesa Redonda (2), exhortó a que la producción de alimento animal “gane más terreno”, resulta impostergable, dentro de la estrategia nacional para sustituir importaciones; ya que el país gasta alrededor de 500 millones de dólares en la compra de materias primas o piensos.

Las producciones pecuarias son muy complejas de lograr; sobre todo, debido a las altas exigencias de la alimentación de las especies y categorías de animales. El sector pecuario en Cuba está afectado por el cambio climático y la inestabilidad de las precipitaciones en el país, la falta de materias primas y fertilizantes para los potreros y otras áreas que limitan el fomento de plantaciones de pastos, forrajes y leguminosas.

La producción nacional de alimento animal constituye una de las vías fundamentales para garantizar la producción de alimentos en el país y las producciones azucareras, tienen en los derivados de la caña un paliativo para sostener la masa animal, constituyen un potencial enorme para las producciones de carne, leche y otras (3).

La industria de la caña de azúcar en Cuba, ofrece una variedad considerable de productos, materias primas y residuales del proceso industrial, que constituyen fuente de alimentos para los animales, con grandes posibilidades. Por ello, deben seleccionarse los más provechosos y convenientes, de acuerdo con las condiciones locales, el mercado y la situación económica actual.

Camagüey constituye la principal provincia ganadera del país y está convocada a elevar su desarrollo. Las plantas de miel urea bagacillo existentes, no satisfacen el total de cabezas de ganado, cubren solo un pequeño porcentaje de la demanda, menos del 10 % (4). Se impone buscar vías para aumentar la productividad y la calidad nutritiva de sus producciones, junto con la realización de nuevas inversiones que incrementen la capacidad productiva y el desarrollo local.

Se necesita proyectar adecuadamente los alimentos a producir y en qué proporciones, para maximizar el impacto socioeconómico de las plantas de alimento animal y lograr establecer encadenamientos productivos con el potencial local y generar un desarrollo sostenible del área (5-8).

Desde inicios de los años 80, la Universidad de Camagüey ha estado vinculada al desarrollo de productos y aditivos para la alimentación animal con el central Siboney, así como con otras universidades e instituciones del país, en el enriquecimiento proteico de los residuos azucareros por fermentación sólida, que resultó una patente para un nuevo alimento animal (9).

La miel-urea-bagacillo es un producto que cuenta con una alta demanda por los campesinos de la región; pero es un producto húmedo de fácil descomposición, que dificulta su conservación.

Actualmente, la Universidad de Camagüey valora nuevos productos, secos y enriquecidos proteicamente (probióticos), que aumenten su valor agregado y mitiguen el déficit de alimentos de la región, como el bagazo hidrolizado y la miel amoniaca, que actualmente, se producen en el país de forma rústica; y otros 10 alimentos desarrollados durante décadas en el país (10) que, potencialmente, podrían producirse, pero habría que determinar cuáles escoger y en qué proporción producirlos.

Estas producciones deben ser sostenibles, ello se conseguirá con el rediseño del central Siboney desde un enfoque de biorrefinería (7, 8), con economía circular (5), concebida por un modelo de encadenamientos productivos (6) que integre las producciones industriales con flujos de productos y materias primas a otros sectores de la región como el agropecuario, el energético y la construcción.

Es necesario evaluar la demanda y la disponibilidad de materias primas para poder determinar las capacidades de las plantas de producción, considerando la incertidumbre presente en estos es-

cenarios y la incertidumbre financiera, valorar alimentos que aprovechen las capacidades existentes para que se minimicen las inversiones, se baje el costo de producción con la calidad requerida y, finalmente, valorar el impacto en el desarrollo agroindustrial de la provincia y del país.-

El objetivo de este estudio es evaluar de forma integral las potencialidades de producción de alimento animal con herramientas de ingeniería económica.

Estos se emplean en estudios previos inversionistas, estudios de capacidades productivas, de proyección de la demanda, localización de plantas, entre otros, pueden ser aplicados cuando se propone una nueva tecnología o un producto, de manera que aporten elementos importantes para la toma de decisiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se presenta el procedimiento propuesto para determinar las potencialidades de producción de alimento animal, el cual integra métodos de determinación de capacidades de producción óptimas, de macrolocalización de plantas y evaluación económica.

Procedimiento

1. Caracterización de las plantas de alimento animal en la provincia.
2. Caracterización de la demanda de alimento animal.
3. Cálculo de las capacidades de las plantas considerando la incertidumbre.
4. Planteamiento de posibles variantes tecnológicas.
5. Evaluación económica de alternativas.
6. Determinación de la distribución óptima del alimento.

A continuación, se explican cada uno de los pasos:

Paso 1. Caracterización de las plantas de alimento animal en la provincia

Se realiza de acuerdo con la cantidad de plantas, su ubicación, capacidad, tecnología, turnos de trabajo, productos elaborados, características, aceptación en el mercado, fuentes de materia prima, animales que lo consumen.

Paso 2. Caracterización de la demanda de alimento animal

Se hace un levantamiento de la cantidad de consumidores en la provincia, por municipio, por granja, por tipo de animal, ejemplo, para el ganado vacuno y se especifican la cantidad de terneros, toros, vacas, añejos, novillas, y proporciones en las dietas

Paso 3. Cálculo de las capacidades de las plantas considerando la incertidumbre

Se emplea el procedimiento metodológico para la determinación de capacidades óptimas de inversiones y ampliaciones en condiciones de incertidumbre desarrollado por los clásicos (11).

- Obtención del modelo: Se considera la adaptación de la demanda de un sistema a una situación, en que existe una demanda inicial, D_0 , y que su variación es lineal en el tiempo:

$$D = D_0 + a\theta$$

donde a es la pendiente, θ es el tiempo y D_0 es la demanda inicial.

- Determinación del factor de sobre diseño

En lo cual es necesario considerar que la fiabilidad de los equipos incide en la disponibilidad anual de la instalación y, por ello, en su sobre diseño.

- Determinación de la capacidad inicial recomendada:

$$Q_i = D_0 + F_{sd} a/i$$

donde: i es la tasa de interés financiero, F_{sd} es el factor de sobre diseño, Q_i la capacidad, a es la pendiente y D_0 demanda inicial.

- Determinación del tiempo al que debe realizarse la primera expansión:

$$\theta = (Q_i - D_0)/a$$

donde: Q_i es la capacidad, D_o la demanda inicial, a es la pendiente y θ es el tiempo.

- Determinación de la capacidad de la expansión:

$$Q^* = a / i$$

donde: Q^* es la capacidad, a es la pendiente e i es la tasa de interés financiero.

Rudd *et al.* (11) describieron este procedimiento, aplicado a la demanda, es decir, consideraron la incertidumbre por las variaciones en la demanda y puede ser aplicado, como plantean los autores, a otros casos como las predicciones en los precios, costos, la energía, capacidad del mercado y otros, siempre que se pueda tratar el crecimiento como un modelo lineal.

También ha sido empleado para considerar la incertidumbre en la disponibilidad de materia prima de la industria de la caña de azúcar, si se demuestra que las proyecciones de los crecimientos de caña en el tiempo tienen un comportamiento lineal y, por tanto, las cantidades de miel, bagazo, cachaza, materias primas fundamentales en las producciones de alimento animal (12).

Paso 4. Planteamiento de posibles variantes tecnológicas

Se resumen las características de las alternativas, considerando intensificar las producciones existentes, se valoran alimentos enriquecidos que aportan más a las dietas por categoría de animal, se proponen modificaciones tecnológicas con un mínimo de inversiones, con el fin de disminuir costos, incrementar calidad y cantidad de alimento.

Paso 5. Evaluación económica de alternativas

Se determinan para cada alternativa, los costos de inversión, los costos de producción, los ingresos por ventas de la producción, se calculan los flujos de caja para 10 años como mínimo. Se calculan los indicadores dinámicos Valor Actual Neto (VAN), la Tasa Interna de Rendimiento (TIR), utilizando las funciones financieras del EXCEL, el Período de Recuperación al descuento (PRD), a partir de los flujos de caja actualizados acumulados, donde cambia el signo, en ese año se recupera la inversión y la rentabilidad del VAN (RVAN) por la fórmula:

$$RVAN = \frac{VAN}{I}$$

Donde VAN es el Valor Actual Neto, I es el valor de la inversión.

El VAN es un indicador financiero que mide los flujos de los futuros ingresos y egresos que tendrá un proyecto, para determinar, si luego de descontar la inversión inicial, quedará alguna ganancia. Basta con hallar VAN de un proyecto de inversión para saber si dicho proyecto es viable o no. El VAN permite determinar cuál proyecto es el más rentable entre varias opciones de inversión (13).

La Tasa Interna de Retorno (TIR) es la tasa de interés o rentabilidad que ofrece una inversión. El criterio de selección será el siguiente donde “ k ” es la tasa de interés elegida para el cálculo del VAN:

- Si $TIR > k$, el proyecto de inversión será aceptado. En este caso, la tasa de rendimiento interno que obtenemos es superior a la tasa mínima de rentabilidad exigida a la inversión.
- Si $TIR = k$, estaríamos en una situación similar a la que se producía cuando el VAN era igual a cero. En esta situación, la inversión podrá llevarse a cabo si mejora la posición competitiva de la empresa y no hay alternativas más favorables.
- Si $TIR < k$, el proyecto debe rechazarse. No se alcanza la rentabilidad mínima que le pedimos a la inversión.

El indicador RVAN expresa lo que se gana por cada peso invertido y el PRD el tiempo al que se recupera la inversión.

Paso 6. Determinación de la distribución óptima del alimento

Aquí se aplica el método clásico de transporte, que constituye una variante del problema lineal de optimización, en el que concurren variables enteras y continuas, aplicado a la macrolocalización de plantas considerando la incertidumbre (14).

Se define la función objetivo, las variables y las restricciones.

Función objetivo:

$$\text{Mínimo Costo} = \sum_{i=0}^m \sum_{j=1}^n C_{ij} X_{ij} Y_{ij}$$

Variables continuas: X_{ij} (Cantidad de producto de la planta i al destino ganadero j),

Variables enteras: Y_i (la ubicación de la planta en i)

Restricciones de capacidad de las plantas (tantas como ubicaciones de plantas):

$$X_{i1} + X_{i2} + \dots + X_{ij} \leq K_i$$

Restricciones de demanda de los destinos: $\sum X_{ij} * Y_i \geq D_j$ (tantas como destinos)

El problema se puede programar en las hojas de cálculo de EXCEL y se resuelve con la macro SOLVER, se aplica el método de programación lineal y se obtienen las cantidades a distribuir de cada posible ubicación hacia los destinos.

$$\sum_{i=0}^m \sum_{j=1}^n X_{ij} Y_i \geq D_j$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La provincia de Camagüey cuenta con seis centrales azucareros activos: Siboney, Batalla de las Guásimas, Argentina, Carlos Manuel de Céspedes, Brasil y Panamá, los cuales poseen plantas de miel-urea-bagacillo. Las plantas de alimento animal actuales son iguales y presentan una capacidad nominal de 3 t/h. Su proceso tecnológico se basa en la mezcla de bagacillo y miel urea en las siguientes proporciones: bagacillo 60 % con un 50 % de humedad y miel final o miel C al 34.6 %, 2 % de urea, 3.2 % de agua, 0.18 % de sal.

La provincia, en esta etapa, cuenta con una masa ganadera de 181 907 machos y 602 562 hembras, para un total de 784 469 cabezas de ganado vacuno, a los que va destinado este alimento.

Se calculó la capacidad de las plantas de alimento animal considerando la demanda y la disponibilidad de la materia prima principal (la caña).

Para la demanda se determinaron los consumos de alimento por tipo de animal.

Cálculo de la dieta por categoría de animal

Un animal vacuno consume el 10 % de su peso vivo en alimentos frescos.

En Cuba, el peso se registra en Unidad de Ganado Mayor (UGB), 1 UGB = 450-500kg. La tabla 1 muestra la estimación de la dieta según la categoría del animal para ganado vacuno.

Tabla 1. Estimación de la dieta

Categoría	Edad	UGB	Estimación de dieta del nuevo alimento (% del consumo)
Terneros	1-12 meses	0.25	5
Añojos	-	0.50	10
Toretas	-	0.70	15
Toros de ceba	-	0.70	15
Bueyes	-	0.85	20
Sementales	-	0.85	30
Terneras	-	0.25	5
Añojas	-	0.50	10
Novillas	-	0.70	15
Vacas	-	0.85	20

Consumo de la materia prima

Para realizar el consumo de la materia prima se tienen en cuenta los porcentos de extracción que poseen las materias primas principales (miel, bagazo y bagacillo) a partir de la caña, y los índices de consumo de estas materias primas para el alimento animal (ver tabla 2).

Tabla 2. Consumo de materia prima

Materias primas	Se extrae de la caña	Para producir MUB
Miel	3.5 % del total de caña	34.6 % de miel final
Bagazo	25.0 % del total de caña	
Bagacillo	10.0 % del bagazo	60 % de bagacillo

MUB: Miel-urea-bagacillo.

Cálculo de la capacidad de la planta

A partir de las necesidades de alimento animal, se ajustó un modelo lineal en el tiempo, como muestra la figura 1.

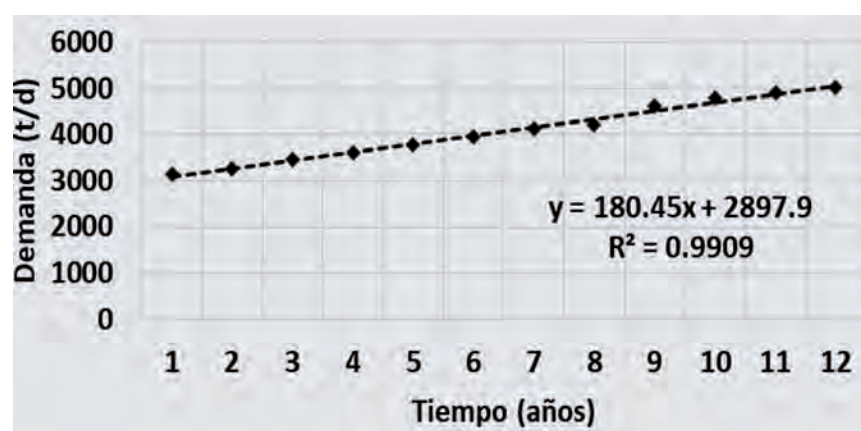


Figura 1. Proyección de la demanda de alimento animal en la provincia de Camagüey.

Para calcular la capacidad por el método de Rudd *et al.*(11) se ajusta un modelo lineal utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS, se le realiza la prueba t de significación del coeficiente y la prueba F de significación del modelo y, como se aprecia en la tabla 3, la probabilidad es casi cero, por lo que son altamente significativos, el coeficiente y modelo, el coeficiente de determinación es alto y el análisis de residuos muestra la normalidad de los datos.

Tabla 3. Validación de modelo

Modelo	R ²	Significación coeficiente y modelo	Análisis de residuos
Y = 2897.88 + 180.447 X	99.09	0.000	aleatorios

Una vez validado el modelo se procede al cálculo de la capacidad de la planta, en función de la demanda, para diferentes intereses financieros, lo que se resume en la tabla 4:

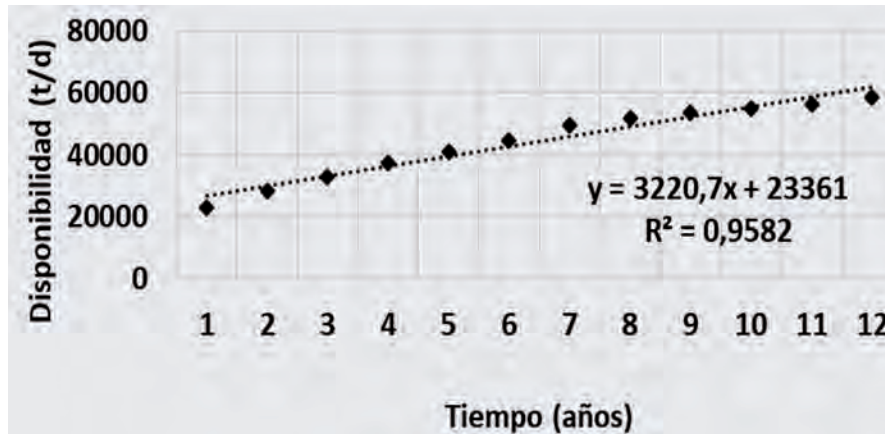
A partir de la disponibilidad de la materia prima, se ajustó un modelo lineal, considerando las proyecciones de caña y de miel en los próximos 10 años, según figura 2.

Se ajustó un modelo lineal, utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS, se le realizan la prueba t de significación del coeficiente y la prueba F de significación del modelo, como se aprecia la probabilidad es casi cero, por lo que son altamente significativos, el coeficiente de determinación es alto y el análisis de residuos muestra la normalidad de los datos (tabla 5).

Se calculó la capacidad de la planta en función de la disponibilidad de materia prima, para diferentes intereses financieros, lo que se resume en la tabla 6.

Tabla 4. Determinación de la capacidad de la planta en función de la demanda de alimento animal

	0.12	0.15	0.18	Fórmulas
Pendiente	180.45	180.45	180.45	a
Intercepto	2897.88	2897.88	2897.88	D_o
Capacidad inicial (t/d)	4401.60	4100.86	3900.36	$Q_i = D_o + F_{sd} \cdot a/i$
Primera ampliación (años)	8.33	6.67	5.56	$\theta = (Q_i - D_o) / a$
Capacidad de la ampliación (t/d)	1503.72	1202.98	1002.48	$Q^* = a / i$
Total	5905.33	5303.84	4902.84	$Q_t = Q_i + Q^*$

**Figura 2.** Proyección de la disponibilidad de materia prima para la producción de alimento animal en la provincia de Camagüey.**Tabla 5.** Validación de modelo

Modelo	R ²	Significación coeficiente y modelo	Análisis de residuos
Y=23361.1+3220.66X	95.81	0.000	aleatorios

Tabla 6. Determinación de la capacidad de la planta en función de la disponibilidad de la materia prima

	0.12	0.15	0.18	Fórmulas
Pendiente	3220.66	3220.66	3220.66	a
Intercepto	23361.07	23361.07	23361.07	D_o
Capacidad inicial (t/d)	50199.89	44832.13	41253.62	$Q_i = D_o + F_{sd} \cdot a/i$
Primera ampliación (años)	8.33	6.67	5.56	$\theta = (Q_i - D_o) / a$
Capacidad de la ampliación (t/d)	26838.82	21471.06	17892.55	$Q^* = a / i$
Total	77038.72	66303.19	59146.17	$Q_t = Q_i + Q^*$

Se comparan los resultados de la estimación de la capacidad inicial de la planta, para un interés financiero de un 15 %, por la demanda y la disponibilidad de materia prima y se aprecia que no se satisface la demanda, pero hay potencialidades en la provincia para producir más alimento.

Tabla 7. Comparación de las capacidades estimadas a partir de la demanda y la disponibilidad de materia prima

Demanda de alimento t/d	Capacidad por materia prima t/d	Capacidad instalada MUB t/d
4100	44832	165

A partir de estos resultados se propuso aprovechar las instalaciones existentes de las plantas de MUB, agregando un fermentador para obtener un probiótico que enriquece el alimento y un secador, para secar el producto y que tenga más durabilidad, como se aprecia en la figura 3.

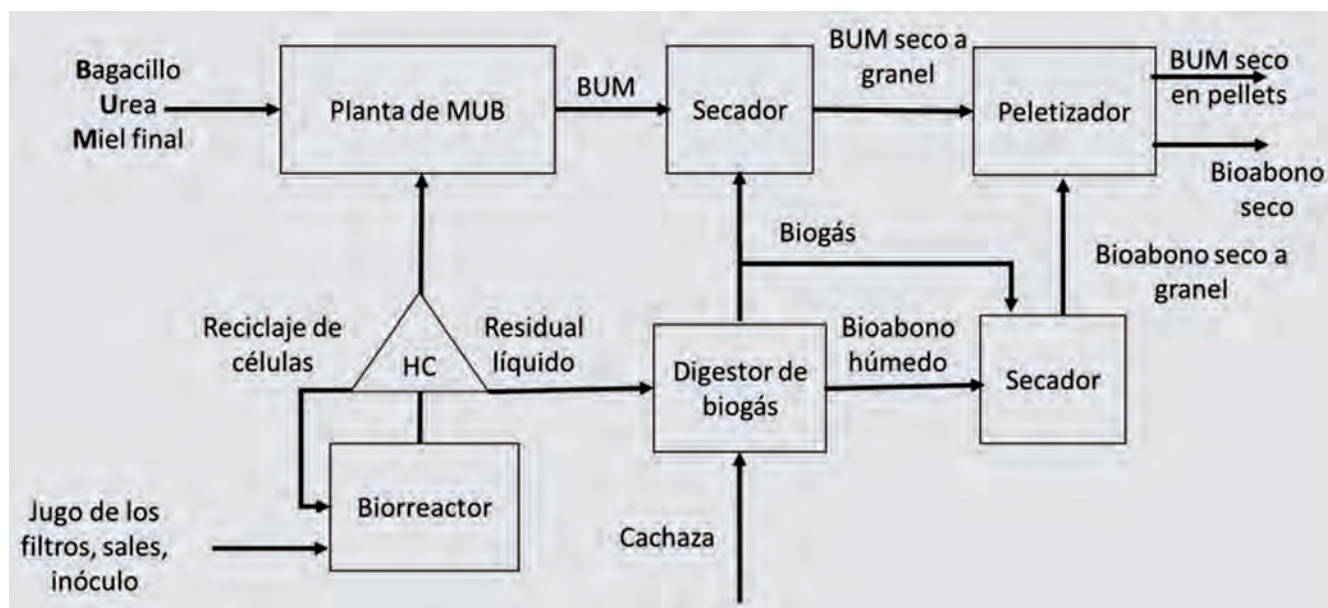


Figura 3. Esquema tecnológico para la obtención de MUB enriquecida, seca y húmeda.

Se evaluaron tres esquemas tecnológicos, todos enriquecidos con el probiótico y en las variantes del producto seco, se introduce el secador:

MUB Crema 11 horas

MUB Crema 11 horas - MUB Seca 11 horas

MUB Seca 22 horas

Se calcularon los indicadores de las inversiones para las seis plantas de MUB de la provincia, a modo de ejemplo se presentan, en la tabla 8, los resultados para el central Siboney.

Tabla 8. Indicadores económicos de las alternativas evaluadas

Indicador	Variante I	Variante II	Variante III
VAN	\$197846.67	\$217148.73	\$602708.18
TIR	414 %	175 %	566 %
PRD	1 año	1 año	1 año
RVAN	\$19.78	\$9.87	\$27.40

Como se aprecia, la mejor variante es la tres, debido a que el producto es más competitivo; no obstante, son variantes atractivas, pues requieren de pequeñas inversiones que se recuperan rápidamente, en el primer año.

Se obtuvieron las cantidades óptimas a distribuir desde las plantas de alimento hacia las UBPC, se presentan los resultados en la tabla 9, a modo de ejemplo, también para Siboney.

Tabla 9. Distribuciones óptimas para el alimento animal

Central	UBPC	Producción (t/d)
Siboney	Nuevitas	137.50
	Guáimaro (Rectángulo)	571.97
	Jimaguayú (Triángulo 1)	32.51
	Jimaguayú (Rescate de Sanguily)	37.56
	Najasa (Triángulo 4)	210.99

CONCLUSIONES

1. Con el fin de minimizar los costos de inversión y reducir los costos de producción se propone aumentar la productividad de las plantas existentes de miel-urea-bagacillo, sólo introduciendo un secador para producir, además, MUB Seca y un fermentador para obtener el probiótico que enriquecerá el alimento.
2. Como variantes tecnológicas se propone la producción de las 33 t/d de MUB crema en un turno, que se producen actualmente y que ya tienen mercado, 33 t/d de MUB crema, en un turno más 16.5 t/d de MUB seca en otro turno, que se pueden conservar y 33 t/d de MUB seca, en dos turnos.
3. Se calcula la demanda de alimento animal para las 602 562 cabezas de ganado que habían en la provincia, en el 2019, cuando se hizo el estudio y hasta el 2030, diferenciando el consumo por categoría de animal, lo que permitió un cálculo más exacto de la demanda.
4. Se presenta un procedimiento que emplea elementos de capacidad de las plantas, macrolocalización y distribución mediante la programación lineal con enteros, lo que permite un análisis integral para evaluar el impacto económico de un alimento propuesto.
5. Con el estudio de capacidad considerando la disponibilidad de materias primas, la demanda de alimento y la capacidad instalada, para la producción de alimento animal en la provincia, se aprecia que hay posibilidades de producir más alimento animal para satisfacer la demanda.

RECOMENDACIONES

Valorar alternativas de producción de alimento animal, a partir de los desarrollados por el ICA y el ICIDCA e incorporarlas a las producciones diversificadas en cada central, según sea posible.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodríguez-Rollero, G. Discurso pronunciado en la apertura del taller nacional “La producción de alimentos con más ciencia”. 2019 [cited 2020 22 de julio]; Discurso]. Available from: <http://www.cubadebate.cu/especiales/2019/06/07/gustavo-rodriguez-rollero-lograr-alimentos-con-mas-ciencia/>.
2. Oliva-Ferrales, M. El alimento animal no puede depender de las importaciones, in Granma. 2020: La Habana. p. 1-2.
3. Chandel, A.K. and M.H.L. Silveira, Advances in Sugarcane Biorefinery- Technologies, Commercialization, Policy issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products. 2018: Elsevier Inc. 344.
4. Lazarte-Viciedo, R.J. Evaluación del impacto económico de un alimento animal enriquecido en la provincia de Camagüey, in Ingeniería Industrial. 2019, Universidad de Camagüey: Camagüey. p. 128.
5. Gopinath, A. A circular framework for the valorisation of sugar industry wastes: Review on the industrial symbiosis between sugar, construction and energy industries. Journal of Cleaner Production, 2018.
6. Manavalan, E. and K. Jayakrishna, An Analysis on Sustainable Supply Chain for Circular Economy. Procedia Manufacturing, 2019. 33: p. 477–484.
7. Nizami, A.S. Waste Biorefineries: Enabling Circular Economies in Developing Countries. Bio-resource Technology, 2017.

8. Renó, M.L.G. Sugarcane biorefineries: Case studies applied to the Brazilian sugar–alcohol industry. *Energy Conversion and Management*, 2014. 86: p. 981–991.
9. Olivera, R.P., L.C. Zafra, and L.B. Ramos-Sánchez, Método de obtención de un alimento para el ganado a partir de la caña de azúcar y el producto obtenido, OCPI, Editor. 1994: Cuba.
10. ICA, Productos para la alimentación animal a partir de la caña de azúcar y sus derivados, ICA, Editor. 2019, Instituto de Ciencia Animal.
11. Rudd, D.F. and C.C. Watson, *Strategy of Process Engineering*. 1968, New York, U. S. : McGraw Hill.
12. Oquendo Ferrer, H. Cálculo de capacidades de producción iniciales óptimas considerando elementos de incertidumbre. *Centro Azúcar*, 2016. 43(2): p. 24-34.
13. Leland T.Blank, A.J.T., *Ingeniería Económica*. IV ed. 958-600-966-1, ed. 0-07-063110-7. 1999, Colombia: McGrawHill. 740.
14. Martínez, A.P. La macrolocalización de plantas derivados de la caña de azúcar considerando la incertidumbre financiera, en la demanda y la disponibilidad de materias primas. Su importancia en el diseño de procesos. *Revista de Investigaciones de la Universidad Le Cordon Bleu*, 2017. 4(1): p. 27-39.

Consideraciones sobre el mercado internacional de la levadura *Torula* (*Candida utilis*)

Arodís Caballero-Núñez

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.

arodis.caballero@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

La levadura forrajera es comercializada en el mundo para la alimentación animal (en formulados de pienso seco para la cría porcina, la acuicultura y en la producción de sustituto lácteo para el ganado mayor). También se utiliza como aditivo de otros alimentos humanos. En el mercado internacional de levaduras secas predomina el producto que se destina a la alimentación humana, con valores superiores a los 6 mil millones de dólares anuales, con crecimientos estimados entre el 7 y el 8 %. Dentro de ellas, a lo largo de las dos últimas décadas, se ha producido un incremento notable de la comercialización de levadura forrajera que alcanzó los 738 millones de dólares, con un grupo de productos hechos a partir de varios sustratos, mieles de caña y remolacha, residuos de la producción de vino, residuos lignocelulósicos, entre otros. La levadura forrajera puede hallarse en el mercado internacional con precios que oscilan entre los 10 y 60 USD el kilogramo, para formatos pequeños y, en función del tamaño del envío, los precios oscilan desde 1500 hasta 2800 USD la tonelada. El costo nacional es comparable al de otras latitudes, aunque debe estudiarse la sustitución de fuentes de nitrógeno, la introducción de los avances tecnológicos vinculados con el consumo de los equipos y la operación de secado y el tratamiento de residuales. Este reporte actualiza el conocimiento que existe en el mercado internacional de las levaduras forrajeras y, en especial, la *Candida utilis* e inicia nuevas investigaciones.

Palabras clave: levadura, *Torula*, mercado, alimento animal.

ABSTRACT

Forage yeast is marketed in the world for animal feed (in dry feed formulations for pig farming, aquaculture and in the production of dairy substitutes for large livestock). It is also used as an additive to other human foods. In the international market for dry yeasts, the product is intended for human consumption predominates, with values higher than 6 billion dollars per year, with estimated growths between 7 and 8 %. Within them, over the last two decades there has been a notable increase in the commercialization of fodder yeast that reached 738 million dollars, with a group of products made from various substrates, sugar cane and beet molasses, residues from wine production, lignocellulosic residues, etc. Forage yeast can be found on the international market with prices ranging around USD 10-60 per kilogram for small formats, and prices range from USD 1,500 to USD 2,800 per ton depending on the size of the shipment. The national cost is comparable to that of other latitudes, although the substitution of nitrogen sources, the introduction of technological advances related to the consumption of equipment and the drying operation and waste treatment must be studied. This report updates the existing knowledge of the international market for forage yeasts and especially *Candida utilis* and opens up new research.

Key words: yeast, *Torula*, market, animal feed.

INTRODUCCIÓN

El antecedente histórico más notable del uso masivo de la levadura *Torula* fue en la Segunda Guerra Mundial, utilizada por el ejército alemán en la alimentación de sus soldados (1). Sin embargo, remover el alto contenido de ácidos nucleicos requiere pasos tecnológicos costosos de purificación que incidieron, que no fuera ese el destino comercial más importante. Por otra parte, su alto contenido de proteínas y otros aminoácidos esenciales y su relativa facilidad de producción a partir de los sustratos más variados, orientaron su uso como alimento animal.

De esta manera, para los países que no disponen de otras fuentes proteicas para la producción de alimento animal la levadura *Torula* constituye una alternativa interesante reforzada, además, por el aporte significativo de lisina, significativamente superior al de otros alimentos de origen vegetal, como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Comparación del contenido de aminoácidos de la levadura de vinazas con la soya (2)

Aminoácidos (g aminoácido/100 g proteína)	Levadura de vinaza	Soya
Arginina	2.04	3.45
Histidina	1.71	1.41
Isoleucina	1.95	1.98
Leucina	3.90	3.29
Lisina	4.07	2.90
Metionina +cistina	1.08	1.15
Fenilalanina +tirosina	3.24	3.63
Treonina	2.19	1.71
Triptofano	1.07	0.90
Valina	2.29	2.15

Este factor es importante para evaluar el uso de la producción de levadura *Torula* obtenida a escala industrial, mediante un proceso biotecnológico más costoso que la producción agrícola de fuentes proteicas. Los procesos han sido perfeccionados en los últimos años y han favorecido la disminución del consumo de energías, cuyo costo puede hacerlo económicamente inviable para determinadas condiciones locales, lo cual debe ser valorado, considerando las particularidades de cada región y el mercado destino.

La producción de microorganismos unicelulares con fines de alimentación, es de especial interés en aquellos lugares que tengan grandes cantidades de fuentes de carbohidratos barato para su uso, como sustrato y limitadas fuentes de proteínas y vitaminas (3). Entre esos sustratos, los de más amplio uso son las mieles de azúcar, remolacha y extractos del procesamiento industrial de la madera, del maíz, trigo, otras frutas y, en menor medida, los derivados del petróleo.

La levadura forrajera es comercializada en el mundo (código internacional armonizado HS 210220) (4) y entre los destinos más establecidos del producto se encuentran la alimentación animal (la cría porcina, mediante el empleo de levadura en crema, utilizada en Cuba o en formulados de pienso seco, la acuicultura y la producción de sustituto lácteo, para el ganado mayor) y la alimentación humana (como aditivo de otros productos).

Desde mediados del siglo pasado ya están disponibles varias tecnologías para la producción a escala industrial, desarrolladas principalmente por Estados Unidos, Alemania, Francia y Austria. En Cuba, luego de la primera planta de procedencia francesa, establecida en la provincia de Camagüey

en 1963, fue llevado a efecto un intenso proceso inversionista que abarcó 10 plantas, distribuidas desde Matanzas hasta Granma, con dos de esas tecnologías que en los años 80 ocupaban la vanguardia mundial: la Vogel Busch, que lograba proteína de alta concentración, de procedencia austriaca y la Speichim, francesa, con aportes de otros fabricantes de equipos. En 1990 se produjeron en Cuba 79 mil toneladas de levadura *Torula* base seca y los ingresos por exportaciones superaron los 5 millones de USD, además de constituir un producto estratégico en las relaciones comerciales de intercambio con los países socialistas, en especial la República Democrática Alemana (RDA), donde se cambiaba por leche en polvo para la industria nacional (5).

En las últimas décadas del siglo XX, Rumania, Checoslovaquia, Yugoslavia y China producían levadura *Torula* (*Candida utilis*) en plantas cuyas capacidades iban desde 15 hasta 40 toneladas por día de levadura seca, usando como sustrato mieles de caña, de remolacha, incluso, residuales de la industria del papel, y se conoce que el destino final del producto podía ser sustituto lechero, formulación de piensos como aporte vitamínico o como alimentación directa en varias especies de animales (6).

La producción de levadura forrajera está frecuentemente vinculada a la industria maderera y azucarera, que suministra el sustrato. En Cuba y Brasil se establece el vínculo con la industria de la caña de azúcar, pero en Estados Unidos, la República Checa y otros países del norte de Europa está asociada a la de algunos cereales y a la industria de la madera, por la gestión de sus agresivos efluentes. Más recientemente se producen levadura *Torula* y sus derivados en plantas biotecnológicas flexibles, no asociadas a grandes industrias primarias, y en países como Japón y Corea del Sur, se recuperan los ácidos nucleicos, y otros componentes.

EL MERCADO ACTUAL

En el mercado internacional de levaduras secas (*Saccharomyces*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces* y otros microorganismos) predomina el producto que se destina a la alimentación humana, con valores superiores a los 6 mil millones de dólares anuales, con crecimientos estimados entre el 7 y el 8 % (7).

En un estudio reciente se establecieron los factores que marcan el crecimiento de este mercado:

- Crecimiento del consumo de las bebidas alcohólicas (sobre todo la cerveza) y no alcohólicas.
- Crecimiento del uso del bioetanol, como alternativa a los altos precios de los combustibles fósiles.
- Crecimiento del uso de medicamentos con base proteica.
- La tendencia al uso de levaduras orgánicas, que disminuyen el insumo de sales de amonio e hidróxido de sodio.

Dentro de la tendencia del mercado de este tipo de productos, también se observa el crecimiento de las ventas de levadura forrajera, destinadas a la alimentación animal.

Las dos últimas décadas se han caracterizado por el incremento de la comercialización internacional de levadura forrajera, que alcanzó los 738 millones de dólares, con un grupo de productos hechos a partir de varios sustratos, como: mieles de caña y remolacha, residuos de la producción de vino, residuos lignocelulósicos, entre otros. En la tabla 2 se listan los principales exportadores y, en la tabla 3, los países importadores (4).

Tabla 2. Lista de los exportadores del producto seleccionado (2015-19).

Producto: 210220 Levaduras inactivas y microorganismos unicelulares

Exportadores	Valores exportados (miles de USD)				
	2015	2016	2017	2018	2019
Mundo	628 619	664 668	737 289	789 701	738 698
Brasil	81 268	87 831	96 241	92 33	85 08
USA	61 925	66 413	76 683	73 523	76 037
Francia	57 971	56 732	56 35	63 063	67 761
China	38 993	37 748	49 023	56 203	61 763
Bélgica	43 315	42 42	54 991	56 286	54 125
Alemania	28 966	34 641	38 327	40 852	37 489
Italia	30 657	31 783	35 915	34 815	33 585
Estonia	26 95	30 846	32 195	32 264	33 083
Países Bajos	18 35	21 971	25 141	32 777	29 039
Polonia	18 65	23 089	22 415	27 667	26 785
Rusia	25 29	26 46	32 286	35 131	26 327
Reino Unido	50 43	49 721	48 912	50 267	23 914
Dinamarca	13 352	16 821	18 892	22 39	22 978
Canadá	20 519	20 181	23 082	22 61	18 225
España	6 002	6 395	10 964	12 822	16 816
Corea del Sur	5 763	5 924	9 464	13 706	16 738
Japón	12 616	13 955	13 236	15 464	13 124
República Checa	6 601	8 246	7 094	8 994	10 59
México	14 301	16 118	11 205	16 94	9 615
Tailandia	5 615	7 152	6 623	7 627	8 097

Fuente: Cálculos del Centro Internacional del Comercio (ITC, por sus siglas en inglés) basados en estadísticas de UN COMTRADE e del ITC (4).

Tabla 3. Primeros diez países importadores del producto en 2019.

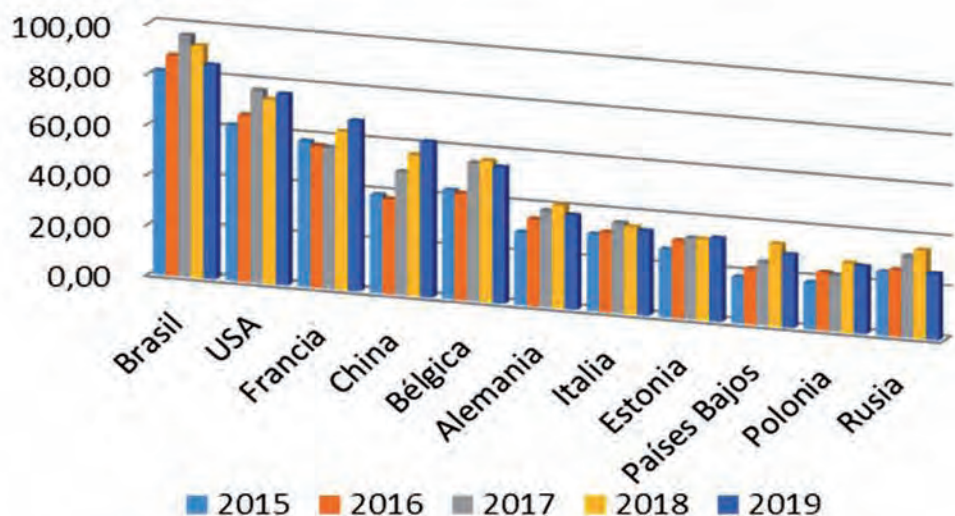
Producto: 210220 Levaduras inactivas y microorganismos unicelulares

País	Cantidad, t	Valor (Miles USD)	Valor unitario (USD/t)
Estados Unidos	40 179	147 063	3 660
Francia	22 378	60 870	2 720
Alemania	63 367	53 555	859
Reino Unido	15 636	49 986	3 197
Belgica	21 334	47 925	2 246
Japon	15 593	45 254	2 902
Países Bajos	11 418	42 805	3 749
Italia	12 047	34 745	2 884
Canada	8 396	30 465	3 629
Arabia Saudita	6 568	23 553	3 586

Fuente: Cálculos del ITC basados en estadísticas de UN COMTRADE e del ITC (4).

Brasil, Estados Unidos, Francia y China, por ese orden, son hoy los principales exportadores, con valores de ventas por encima de los 50 millones de dólares anuales, cada uno. Otros diez países europeos, dos asiáticos y Canadá aparecen con exportaciones superiores a los 10 millones de dólares anuales. Como se observa en la figura 1, la tendencia de los últimos cinco años es aumentar este mercado, siendo el incremento más notable el de China, que duplica sus ventas desde 2015.

Millones de USD



Fuente: ITC (4). Unidad de medida: millones de USD.

Figura 1. Valor de las exportaciones de levadura forrajera de once máximos exportadores, en los últimos cinco años.

Estados Unidos es el principal mercado de *Torula* y destacan las empresas productoras y comercializadoras: la compañía franco-canadiense *Lallemand*, *Kenegrade*, *Kohjin*, *Gluthatheon*, *Koninklijke DSM* y *Oriental Yeast*. En Brasil: *Manuport Logistica Do Brasil Ltd* y *Acucareira Quarta SA* con más de 10 envíos de entre 1000 y 5000 t en lo que va de año. En el mercado europeo prácticamente todos los países producen, exportan e importan levadura forrajera en cantidades significativas, aunque la característica es el movimiento entre ellos de las materias primas y la exportación de productos terminados hacia América Latina y África. En el mercado asiático, el principal productor y suministrador es China, con un listado amplio de empresas como la *Nanyang Biotogether*, *Xian Le Sen Biotechnology*, *Welgreen* y *Shaanxi Underson Biomedtech*.

En Centroamérica y el Caribe, solo Cuba y México producen levadura forrajera, los movimientos que se registran en la región tienen su raíz en la alianza de empresas guatemaltecas con la empresa Suiza *Attisholz* y los laboratorios *Abbott* de Guatemala, para distribuir el producto en el área (7).

El mercado norteamericano es también el principal importador debido a la alta demanda interna en la producción de alimento animal y piensos balanceados. Tres empresas parecen monopolizar las importaciones de levadura forrajera a ese mercado: *PTx Food Corp*, *GET* y *Agrisent* establecida en Texas, las que recibieron envíos de Brasil, República Checa e Irlanda, entre otros países.

Las empresas que hicieron en 2019 exportaciones de levadura forrajera con destino al alimento animal se muestran en la tabla 4. Las formas más comunes de presentación son bolsas de 20 o 25 kg de peso, con especificaciones de calidad estándares, en las que predomina un contenido de proteínas por encima del 50 %. El tamaño de los lotes de exportación oscila alrededor de las 100 t, pero también se registran embarques mayores.

La empresa *Lallemand*, de Canadá, es una de las más importantes, con plantas en las ciudades de Blagnac y Saint Simon, en Francia y, recientemente, adquirió la importante empresa norteamericana productora de levadura *Torula Lake States* de Wisconsin, que utiliza como sustrato los residuos de la industria papelera. *Alpha Chemical* de Egipto y *Barkat* de la India destacan; también

dentro de los países en vías de desarrollo; aunque, como se observa, los niveles de producción y exportación más importante están en los países más desarrollados.

Tabla 4. Empresas exportadoras de levadura forrajera 2019 (HS 210220) (4)

Nombre de la compañía	Número de producto o servicio en el mercado	Número de empleados	País	Ciudad	Sitio web
Alpha ChemicalsEgypt	16	50-99	Egypt	Beheira	http://www.alphachemical-egypt.com
Barkat Frozen Foods Private Limited	148	50-99	India	Mumbai	http://www.barkatfoods.com
BODIT TACHOV s.r.o.	15	20-49	Czech Republic	Stříbro	http://www.bodit.cz
Dansk LandbrugsGrovvare-selskaba.m.b.a.	40	More than 5000	Denmark	København v	http://www.dlg.dk
EgyptianStarch, Yeast&De-tergents	20	1000-4999	Egypt	Ramleh, alexandria	http://www.egsysd.com
ENZYM Lviv Yeast Plant, PrivJSC	9	500-999	Ukraine	Lviv	http://www.enzym.lviv.ua
Hedegaard A/S	49	100-249	Denmark	Nørresundby	http://www.hedegaard-agro.dk
Johan Hansson, AB	32	10-19	Sweden	Uppsala	http://www.johanhanesson.se
LALLEMAND	5	100-249	France	Saint simon	http://www.lallemmand.com
LALLEMAND	5	100-249	France	Blagnac	http://www.lallemmand.com
LeiberGmbH	9	100-249	Germany	Bramsche	http://www.leibergmbh.de
NUTRILAC SA	19	20-49	France	Verton	http://www.nutrilac.fr
OhlyGmbH	6	100-249	Germany	Hamburg	http://www.ohly.com
Poliskyi Production and Ex-perimental Plant, Ltd	15	20-49	Ukraine	Chernihiv	http://www.p-pezh.com.ua
Qingdao Yijia Foodstuffs I/E Co. Ltd.	145	50-99	China	Qingdao city, shandong	http://www.qdfco.com
Silvaco A/S	45	10-19	Denmark	Hillerød	http://www.silvaco.dk
SOCIETE INDUSTRIELLE LESAFFRE	10	1000-4999	France	Marcq en ba-roeuil	http://www.lesaffre.com
Trinova, Handel& Marketing AG	18	0-9	Switzer-land	Wangen sz	http://www.trinova.ch
VandenAvenueCommodities NV	17	10-19	Belgium	Kortrijk	http://www.vda.be

Muchas de las plantas chinas y de otros países que producen levadura *Torula* (*Candida utilis*) no necesariamente se anexan hoy a una industria azucarera o que aporte un tipo específico de sustrato, sino que son plantas biotecnológicas de uso flexible, que utilizan distintos tipos de sustratos y también distintos tipos de levaduras, incluyendo la *Sacharomyces* y la *Kluyveromyces marxianus*. Esto es un elemento importante puesto que, normalmente, son plantas que han disminuido los importantes consumos de energía térmica de las tecnologías originales y los han sustituido por el uso de energías más limpias y baratas, como la electricidad. El precio del kilowatt consumido varía mucho de un país a otro.

LOS PRECIOS

La levadura forrajera puede hallarse en el mercado internacional en diferentes presentaciones, desde bolsas de 1, 5 y 10 kg hasta bolsas mayores de 20 y 25 kg. En los formatos más pequeños se obtienen precios más altos en la transacción comercial, que oscilan alrededor de los 10 USD el kilogramo y, en determinadas formulaciones y mercados, se registran ventas minoristas de hasta 60 USD el kilogramo.

En formatos mayores, como forma más utilizada en el mercado internacional, en función del tamaño del envío, se reportan precios que oscilan desde 1500 hasta 2800 USD la t.

Los precios promedios también se incrementan en los últimos años. Sin embargo, hay que considerar que la levadura forrajera con destino a la alimentación animal no es un *commodity* como la soya o como el azúcar, sujeto a manipulaciones especulativas, sino que se mueve en transacciones directas, con intermediarios especializados. Considerando los 11 principales países exportadores, el precio promedio fue de US \$ 1.60 el kilogramo, pero con una gran variación de un país a otro (8). En las transacciones comerciales del 2019, el valor unitario de la t de levadura forrajera exportada fue, como promedio, de 1839 USD, también con variaciones notables entre los diferentes países. Como elemento importante de este mismo estudio, los autores eliminan del análisis a países como Japón, Taiwán y Dinamarca, debido a que éstos disponían de tecnologías que generaban subproductos muy valiosos asociados a la separación de ácido nucleico y otros componentes activos,

por lo cual sus costos de producción son más altos y el precio de venta es demasiado alto en comparación de los restantes países. La tabla 5 resume los precios comparativos de la levadura forrajera entre 2003 y 2019.

Tabla 5. Comparación de precios para levadura forrajera en años diferentes en países seleccionados, USD/t.

Fuente: ITC, (4)

País	2003	2019
Francia	1.94	1.76
USA	1.64	3.90
México	2.13	1.32
Alemania	1.25	2.56
Brasil	0.36	1.82
República Checa	0.29	1.38
Suiza	0.99	0.42
Países Bajos	0.70	5.43

Todos los países seleccionados en la tabla 5 vendieron más de 10 mil toneladas de levadura forrajera por año, en esos dos momentos de la comparación.

Los precios de la levadura forrajera también guardan relación con la cadena de valor a la que se integren, y muchos compradores están dispuestos a pagar mejor, en función del uso final que tiene en su propio proceso productivo.

LOS COSTOS

Ninguna empresa productora ofrece al público sus costos reales de operación y, además, los costos se mueven aleatoriamente de un país a otro.

Para una referencia de costos actuales de la producción de levadura forrajera (*Candida utilis*) en el mundo, se utilizará un estudio de factibilidad de una planta de levadura Torula de 9500 t anuales en España. Esta planta, que utilizaría como sustratos mieles de caña y de remolacha, tiene los siguientes indicadores técnico-económicos en Euros (1).

- Inversión total de la planta: 17 millones y medio.
- De ello, Costo de equipamiento: 4.8 millones.
- Precio de venta del producto : 1.29 €/kg de levadura prensada.
- Producción anual: 9458 t de levadura prensada.
- Ingresos por ventas son de 12 221 636 € por año.

- Costo de las materias primas : 4 056 765 € por año.
- Costo de energía eléctrica : 319 168 € por año.
- Costo de mano de obra: 306 600 € por año.
- Costo del tratamiento de residuales: 902 423 € por año.
- Costo de acondicionamiento de melazas y del procesamiento final de la levadura: 1 222 164 € por año. Este costo incluye el consumo de energía térmica y el consumo adicional de electricidad en el peletizado.
- Costo total de operación de 6 807 120 € por año, que equivale a 716 € por t; o sea, casi 800 USD.

El proyecto demuestra su factibilidad con un TIR de 17 y un VAN de 26 millones de euros, a partir de que la venta de su producción tiene un precio similar al que se obtiene en el mercado internacional.

El valor total de la inversión y otros indicadores, como los precios de los equipos, coinciden con referencias de plantas de levadura Torula (1).

En Cuba existen dos fichas de costos para la levadura Torula, en función de si es producida a partir solo de mieles finales (Planta Alfredo Pérez, en Ciro Redondo, CA) o si se incorporan las vinazas de las destilerías, como en el resto de las plantas. Estos valores se corresponden a los datos reales de producción obtenidos en las plantas cubanas con tecnología de los años 80, con un intenso nivel de explotación y que tienen, en general, un deterioro alto de su equipamiento (9). Estos costos se revisan frecuentemente y los costos reales se aproximan bastante en ambos sentidos al planificado. En la tabla 6 se muestran ambas fichas (10).

Tabla 6. Fichas de costo de levadura torula vigentes en Cuba 2020

Insumos	UM	Precios USD	Torula/miel final		Torula/vinazas	
			Índice t/t	Costo	Índice t/t	Costo
Miel final	t	72	5.420	390.24	0.5	36.00
Antiespumante	t	2526.00	0.015	37.89	0.025	63.15
Hidróxido de sodio	t	1071.00	0.010	10.71	0.010	10.71
Fosfato de amonio	t	1195.00	0.105	125.48	0.130	155.35
Sulfato de amonio	t	348.20	0.330	114.91	0.380	132.32
Urea	t	434.00	0.040	17.36	0.000	0.00
Sacos papel	miles	400.00	0.042	16.80	0.042	16.80
Fuel oíl	t	417.00	0.650	271.05	0.650	271.05
Energía eléctrica	kWh	0.16	1600	256.00	1438.00	230.08
Totales				1240.43		915.46

La comercialización del producto en crema permite rebajar los costos en, aproximadamente, 70 USD por tonelada (fuera de la fábrica).

En la tabla 7 se comparan las partidas fundamentales del costo de la levadura Torula que se producen con las similares del estudio de factibilidad de referencia.

Los costos de energía y de la mano de obra no son comparables porque en Cuba no adquiere un valor en divisas convertibles.

En el caso del costo global de las materias primas hay alguna similitud, aunque difieren algunos precios de los productos químicos utilizados. Tampoco las mieles utilizadas como sustrato tienen el mismo costo que en Cuba. No obstante, en las condiciones cubanas este es un elemento importante, porque los insumos químicos principales se importan. Obviamente, en Cuba salen más caros los químicos que en España y en España salen mucho más caras las mieles que en Cuba.

Tabla 7. Costos comparativos de levadura torula entre planta en Cuba y en España

Concepto	Cuba (con vinazas)	Estudio de referencia Cádiz, España	Diferencia
Materias primas	414.33	427.07	-12.74
Electricidad	230.08	33.60	196.4
Energía (fuel)	271.05	128.65	142.4
Otros (incluye mano de obra y tratamiento de residuales)	-	209.28	-209.28
Total	915.46	798.60	116.86

Con relación al gasto energético, hay que considerar el avance de la tecnología que se propone en el estudio. Aunque se expone un proyecto con fermentación continua similar a la que utilizamos acá, se introducen dos diferencias notables: el fermentador tiene enfriamiento forzado (las concentraciones son de 18 g/L y casi duplican las obtenidas en Cuba) y el producto final es prensado y presentado en forma de pellets.

Aunque el estudio no describe la tecnología utilizada para el tratamiento de residuales, este conforma un gasto importante dentro de los costos de producción. En la ficha de costo nacional, este concepto tampoco conforma un gasto en divisas.

También, se proponen centrífugas separadoras más grandes y eficientes, la reducción de la humedad de la crema en evaporador de mayor eficiencia térmica y el secado con calentamiento del aire de secado por electricidad. Esto unido al pelletizado del producto final reduce la utilización del fuel a los elementos de esterilización de los equipos y el termolisado de la crema. Aunque se debe profundizar en ello, un análisis simple indica que los cambios tecnológicos relacionados hacen, en su conjunto, un aporte positivo a la reducción del consumo específico de los portadores energéticos, a favor del mejor uso de la electricidad y la disminución de combustible fósil.

LA INNOVACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE LEVADURA TORULA

Son identificados dos campos en los que se requiere la innovación en la cadena de valor de la levadura *Torula* en Cuba.

La primera innovación es de orden tecnológico. Las soluciones tecnológicas encontradas en el estudio de factibilidad de referencia en el análisis de los costos, son similares a las presentadas en sendos trabajos llevados a cabo por separado en la Universidad de Villa Clara y el ICIDCA en los últimos años, a fin de disminuir el costo de producción de la levadura seca.

El primero de ellos, si bien establece los elementos que afectan los costos y la eficiencia del proceso de la *Torula* en la planta de Antonio Sánchez, no supone un cambio radical de la tecnología. Recomienda la reparación de los sopladores y las mejoras en el área de instrumentación, algo que se ejecutó recientemente y que, en efecto, tuvo el impacto positivo que esperaba el autor (9).

Estudios informan (10) sobre la influencia de los costos en los productos químicos y del consumo energético, según cuatro alternativas cuya aplicación tendría un impacto, desde un 5 hasta un 30 %, en los costos de producción en divisas. En la primera de ellas, solo se cambia la fuente de nitrógeno por otra más barata que en ese momento fue la urea, algo que en los últimos tres años ha tenido variaciones drásticas en Cuba, si se atiende a las fuentes de suministro y los financiamientos. La segunda, hace cambios de motores en sopladores y centrífugas, la tercera propone el tratamiento de los residuales con una planta de biogás anexa, que produce el combustible necesario para el secado y otras demandas de calor; y, la cuarta, las integra todas, en un cambio tecnológico radical.

El otro campo de innovación está en el objetivo y alcance de la participación de la levadura *Torula* en la alimentación animal. El Instituto de Ciencia Animal (ICA), el Instituto de Investigaciones Porcinas (IIP), el ICIDCA y otras instituciones científicas han insistido en que, además, del aporte proteico de la levadura *Torula* en la dieta, este producto hace una contribución importante por su contenido de aminoácidos esenciales, especialmente la lisina; oligosacáridos, β glucanos, con efectos notables en el sistema inmune de los animales, biopéptidos, nucleótidos y elementos para enfrentar micotoxinas (11).

De esta forma, este producto debe utilizarse como parte de la dieta del cerdo (y de otras especies) y cambia el enfoque de competencia con la soya y otras fuentes proteicas que prevalece en los análisis de costo de la levadura *Torula*. Este cambio de enfoque consiste en situar la levadura forrajera en una posición sinérgica con el resto de los componentes de la dieta, incluyendo la soya. De lo que se trata, entonces, es de lograr piensos más baratos y, sobre todo, más eficientes en el aprovechamiento de los animales.

El Instituto de Investigaciones Porcinas (IIP) ha desarrollado investigaciones sobre el uso de la levadura *Torula* de vinazas (tabla 8) y de la miel B en la alimentación de cerdos, proponiendo formulaciones que sustituyen parcialmente el aporte proteico de otras fuentes (12). Uno de los resultados más notables es el *Nutrovim*, un núcleo proteico que ha tenido amplia aceptación en los productores (13).

Tabla 8. Comportamiento de la ganancia de peso en cerdos alimentados con distintos niveles de inclusión de levadura de vinaza en la dieta

	Días			EE +-
	0	30	60	
n	12	12	12	-
Peso (kg) inicial	27.8	27.7	27.5	0.5
Peso (kg) final	94.1 ^a	93.7 ^a	88.7 ^b	3.01 *
Consumo kgMS/día	2.84	2.75	2.81	0.04
Ganancia g/día	789 ^a	786 ^a	686 ^b	25.0
Conversión kg MS/ kg ganancia	3.60	3.50	4.10	

* $P \leq 0.05$. ^{ab}Medias sin letra común en la misma fila difieren significativamente entre sí.

Los resultados afirman que la sustitución de hasta un 30 % de la proteína bruta total de la dieta no afecta los principales rasgos de comportamiento de los cerdos y que, adicionalmente, pueden ahorrarse hasta el 60 % de vitaminas del complejo B, con excepción de la vitamina B₁₂.

Es importante la demanda identificada para otros usos que añaden valor a la levadura *Torula*, por su participación en la fabricación de otros bioproductos como los bioestimulantes, biofertilizantes, aditivos alimenticios y sustitutos lácteos. Estos destinos cubren una buena parte del comercio internacional de levadura forrajera, particularmente la que logra los mejores precios.

CONCLUSIONES

Se actualiza el conocimiento del mercado internacional de las levaduras forrajeras y, en especial, la *Candida utilis* y abre nuevas investigaciones en este campo. El ICIDCA, el ICA, el IPP y otros centros de investigaciones de Cuba tienen en estos temas un amplio campo de trabajo para reconsiderar propuestas para la innovación, tanto tecnológica como en el alcance del uso de la levadura *Torula* en Cuba.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Olmedo, J. P. (2017). Diseño de las etapas de fermentación y de acondicionamiento de la materia prima para la producción de SCP. Tesis de Grado Ingeniería Química y Tecnología de Alimentos, Universidad de Cadiz, <https://rodin.uca.es/xmlui/handle/10498/20092>.
2. Saura, G.; Otero, M. A.; Rambla, J.A.; Martínez-Valdivieso, N.G. & Pérez, I. (2008) Producción de levadura forrajera a partir de vinazas de destilería. En: X Congreso Internacional sobre Azúcar y Derivados. Diversificación. La Habana. Cuba. p. 341.
3. Frazier, W. C and Westhoff (1978) Food microbiology. 3rd (Ed) mc Gram Hill pub.co. New Delhi Tata Nutrient utilization profile of *Saccharomyces cerevisiae* from palm wine in tropical fruit fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek 86: 235.
4. <https://www.datamyne.com/hts/21/210220>.
5. ONE 2001. Informe interno MINAZ 2002.
6. Díaz, M.; Saura, G.; Pérez, I. La producción de levadura *Candida utilis* (Levadura Torula), November 2019, In book: Los resultados de los Institutos Cubanos de Investigación, Desarrollo e Innovación en las tecnologías sobre Azúcar y Derivados, Publisher: ICIDCA.
7. Yeast Market Research Report . 2018. <https://www.industryarc.com>.
8. <https://comtrade.un.org/> TradeMap. International Trade Center, basado en estadísticas de UN Comtrade.
9. Quiñonez, R.; Arechavaleta, C.D; Sánchez, R. (2013) Propuesta de mejoras tecnológicas en la producción de Torula a partir de vinazas en la UEB derivados “Antonio Sánchez”. Revista Centro Azúcar, 40 (4).
10. Torres, A.; Diaz, M.; Saura G. (2016) Factibilidad económica de las alternativas para reducir el costo de la producción de levadura Torula. Centro azúcar, 43 (1).
11. Shurson, G. C. (2018) Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods, Animal Science. Research output: Contribution to journal. DOIs. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>. State, Published - Jan 2018, Animal Feed Science and Technology (235): 60 – 76.
12. Piloto, J. L.; Mederos, C.M.; Almaguel, R.E.; Cruz, E. (2019) Utilización de la levadura Torula de vinazas como fuente de proteínas y vitaminas del complejo B en la alimentación de cerdos en crecimiento-ceba. Revista de Producción Porcina, 26 (2).
13. Almaguel, R.E.; Piloto, J.L.; Mederos, C.M.; Domínguez, P.L.; Ramírez, J.; Ponce, G. y Cruz, E. (2019) Efectividad del proceso de generalización de la tecnología basada en Nuprovim, miel B y otros alimentos locales para cerdos en crecimiento y ceba, Revista Computarizada de Producción Porcina, 26 (2): 59 – 69.

Evaluación de un rodenticida con inclusión de derivados de la caña de azúcar

Juan Fernández-Rodríguez^{1*}, Noel Suárez-Morales², Carlos Bravo-Pino¹, Fresy Pérez-Campos², Marta Salermo-Martínez¹ y Albania Tamayo-Gómez²

1. 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.

* juan.fernandez@icidcamy.azcuba.cu

2. Instituto Nacional de Sanidad Vegetal (INISAV).

Calle 110, e/ 5ta A y 5ta F, Miramar, La Habana, Cuba.

RESUMEN

Se evaluaron la eficiencia letal y la palatabilidad del cebo rodenticida con la inclusión de melaza, harina de bagazo y cera de caña, junto con brodifacoum, como agente tóxico y otros ingredientes. Se compararon los resultados con un rodenticida comercial y un placebo (Ratonina). La mortalidad fue de 100 % para el cebo diseñado y el período letal fue de 5 a 9 días. En las pruebas de alimentación no selectiva, se obtuvo un consumo de 5.62 g para el cebo diseñado al 0.005 % de brodifacoum, sin recubrimiento; mientras que para el placebo, fue de 6.98 g, sin diferencias significativas entre los tratamientos. La palatabilidad del rodenticida diseñado fue de 19.17 % para el cebo sin recubrimiento, 17.05 % para el cebo recubierto con cera y 16.71 % para el cebo recubierto con parafina, superiores al rodenticida comercial. El cebo diseñado mostró una alta eficiencia letal y alta palatabilidad y no se degrada química o biológicamente de forma rápida, ya que conserva sus propiedades rodenticidas por más de un año de almacenamiento bajo condiciones apropiadas. Este cebo en forma de pellets reúne los requisitos de calidad necesarios para su producción y comercialización, y la inversión de una planta de 625 t/a presenta indicadores de factibilidad económica favorables.

Palabras clave: brodifacoum, eficiencia letal, factibilidad, palatabilidad, rodenticida.

ABSTRACT

The lethal efficiency and palatability of the rodenticide bait with the inclusion of molasses, bagasse flour and sugarcane wax, together with brodifacoum as a toxic agent and other ingredients, were evaluated. The results were compared against a commercial rodenticide and a placebo (Ratonin). Mortality was 100 % for the designed bait and the lethal period was between 5 and 9 days. In the non-selective feeding tests, a consumption of 5.62 g was obtained for the bait designed with 0.005 % brodifacoum and without coating, while for the placebo it was 6.98 g, with no significant differences between the treatments. The palatability of the designed rodenticide was 19.17 % for the uncoated bait, 17.05 % for the wax-coated bait and 16.71 % for the paraffin-coated bait, superior to the commercial rodenticide. The designed bait showed high lethal efficiency and high palatability and does not rapidly degrade chemically or biologically, retaining its rodenticidal properties after more than one year of storage under appropriate conditions. This bait in the form of pellets meets the quality requirements necessary for its production and marketing. The investment of a 625 t/y plant shows favorable feasibility indicators.

Key words: brodifacoum, feasibility indicators, lethal efficiency, palatability, rodenticide.

INTRODUCCIÓN

Los roedores son mamíferos con amplia presencia en todo el mundo, devoran y destruyen plantaciones agrícolas y productos almacenados, por lo que ocasionan pérdidas económicas y también

causan enfermedades que pueden ser letales para el hombre (1). Para el control de esta plaga se emplean rodenticidas químicos o biológicos. Los rodenticidas químicos crónicos son los más utilizados actualmente a nivel internacional y están constituidos por un principio activo de acción anticoagulante que se mezcla con otros componentes, formando un cebo atrayente para que el roedor lo localice y lo consuma. La elección de los componentes del cebo y su formulación juegan un importante papel, por lo que los productores mantienen en secreto la composición exacta y el procedimiento de elaboración del rodenticida; pero por lo general, en la conformación de cebos duros (bloques o pellets) se utilizan los cereales como base, por ser muy palatables, y además, otros componentes como saborizantes, atrayentes, aglutinantes, antioxidantes, insecticidas y un principio activo altamente tóxico.

En el caso de la agricultura cañera los niveles de pérdidas por roedores pueden alcanzar entre el 0.2 y 30 % de la cosecha, según el grado de infestación (2).

En Cuba se conoce esta problemática, pero los trabajos encaminados hacia el control integrado de plagas carecen de sistematicidad debido a la escasez de rodenticidas, pues la producción en fábricas especializadas en el país no satisface la demanda, en particular en el sector agrícola; por otra parte, su importación es cara. El objetivo del trabajo fue diseñar y producir un rodenticida, que incluyera derivados de la caña de azúcar y sustituyera importaciones, luego evaluar la palatabilidad y la eficiencia letal de este cebo, así como estimar los indicadores de factibilidad para el montaje de una planta comercial para su producción.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la elaboración de los cebos (pellets) se incluyó la melaza, a una concentración de 82 °Brix, de elevado contenido de energía metabolizable y adecuada palatabilidad que se utilizó como aglutinante y atrayente; también la harina de bagazo obtenida a partir del bagazo integral proveniente del ingenio azucarero Manuel Fajardo, de Quivicán, que mediante un procedimiento innovador, y molinada en un molino de discos de 305 mm de diámetro, se utilizó para sustituir cereales y acelerar la ingesta del pellet. La cera cruda de caña, de la planta de cera del ingenio azucarero Jesús Menéndez, con un índice de saponificación de 98 y un punto de fusión de 65 °C, actuó como recubrimiento superficial y elemento repelente al agua. La base de la formulación está conformada por una mezcla de cereales que incluyen subproductos industriales del molinado de los granos que en su conjunto le aportan al pellet adecuada textura, palatabilidad y almidones con un efecto aglutinante.

Los ingredientes, conjuntamente con el agente tóxico a base de brodifacoum con cargas entre 0.0025 % y 0.005 %, se mezclaron en un mezclador de paletas. La mezcla obtenida se ajustó a 12 % de humedad y se peletizó. Los pellets se recubrieron con parafina o cera de caña mediante inmersión en baño de material fundido. El análisis bromatológico se ejecutó en concordancia con los protocolos establecidos por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (3). La digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica se determinó por el método enzimático. Para la realización de los ensayos se emplearon ratones procedentes del Centro de Producción de Animales de Laboratorio CENPALAB, de la raza OF-1 correspondiente a la especie *M. musculus*, separados en jaulas individuales. Se utilizó un diseño completamente al azar compuesto por 5 animales para cada tratamiento. Se empleó un rodenticida comercial con 0.0025 % de brodifacoum como estándar de comparación y un placebo correspondiente al pienso balanceado para ratones (Ratonina). Terminado el período de adaptación se les suministró a los ratones, de manera obligada, las diferentes formulaciones durante siete días. El consumo del cebo se evaluó diariamente, según la alimentación no selectiva de WHO (4). La mortalidad y el tiempo letal se evaluaron durante 21 días. A los datos de consumo se les determinó la homogeneidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y se sometieron a un análisis de varianza aplicando la prueba de Newman-Keuls. Las medias se transformaron $\sqrt{X+1}$. Los datos

experimentales se procesaron mediante el programa Infostat. La palatabilidad, en pruebas de alimentación no selectivas, se calculó según lo planteado en la Norma Ramal (NRAG 968) (5). Para las pruebas de alimentación selectiva se tomaron cinco animales del sexo masculino y cinco del femenino, en las que se colocaron dos recipientes, uno que contenía las formulaciones de estudio y otro con Ratonina y se evaluó el consumo y la aceptación durante tres días. La palatabilidad se calculó por la fórmula citada por Shell (6). Para la realización del análisis económico financiero se utilizó la base de cálculo sustentada en los datos suministrados por los inversionistas en cuanto a: materias primas, materiales, insumos en general, producción y programa de la misma, fuerza de trabajo y costos de los elementos que integran la inversión inicial y se siguió la metodología orientada por el Ministerio de Economía y Planificación (MEP) de la República de Cuba.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En búsquedas realizadas en bases de datos como: ScienceDirect, Embase, EBSCO, SciELO y en el Registro Oficial de Plaguicidas de la República de Cuba no se han evidenciado estudios sobre formulaciones rodenticidas que contengan simultáneamente derivados de la caña de azúcar como la harina de bagazo, la miel y la cera, por lo que se requirió de un proceso de experimentación preliminar con el fin de establecer el porcentaje de inclusión, su efecto y su aceptación en el cebo.

La base de la formulación del cebo rodenticida diseñado corresponde a una mezcla de cereales que incluye subproductos del procesamiento de granos, los cuales aportan consistencia, textura y palatabilidad. Por otra parte, el resto lo integran harina de bagazo de caña de azúcar, que puede sustituir hasta un 30 % de los cereales, melaza como aglutinante y atrayente, parafina o cera de caña como recubrimiento superficial (repelente al agua en una proporción entre 4 y 5 %), brodifacoum (agente activo altamente tóxico (0.0025 – 005 %) que ha demostrado su efectividad, especialmente cuando se enmascara con bases gustativas y atrayentes) (7) y BITREX (benzoato de denatonium) (10 ppm) para evitar la ingesta por humanos.

En la figura 1 se puede apreciar la forma de los pellets rodenticidas formulados, tanto los no recubiertos (utilizados para interiores) como los recubiertos con cera de caña (utilizados para exteriores). Los pellets tienen un diámetro de 19.5 mm y una longitud de 40 mm.



Figura 1. Pellets rodenticidas formulados en este trabajo.

En la tabla 1 se aprecia la caracterización bromatológica de la harina de bagazo en base seca, donde se compara con las harinas integrales de trigo y maíz reportadas por León (8). La presencia de diferentes componentes en el cebo aumenta las posibilidades de que el animal diana detecte uno entre ellos, y lo consuma.

Tabla 1. Caracterización bromatológica de las harinas integrales de bagazo, maíz y trigo

Harinas	PB (%)	EE (%)	FC (%)	ELN (%)	Cenizas (%)	Digestibilidad (%)	Energía (Kj/g)
Bagazo	1.75	1.24	38.51	53.20	7.5	34.0	4.6
Trigo	15.26	2.08	13.59	67.27	1.7	69.0	18.5
Maíz	7.74	4.37	8.19	78.00	1.6	76.0	12.5

PB: proteína bruta, EE: extracto etéreo, FC: fibra cruda, ELN: extracto libre de nitrógeno.

La digestibilidad de la harina de maíz es la mayor, debido a su alto contenido de carbohidratos solubles, fácilmente asimilables y a su bajo contenido de fibra; mientras el trigo tiene más proteína que el maíz, pero contiene menos almidón y más polisacáridos y como resultado, el valor de digestibilidad es menor que para el maíz. En la harina de bagazo la digestibilidad es baja, especialmente para animales monogástricos, debido fundamentalmente a su relativo elevado contenido de lignina y celulosa, además presenta bajo contenido de proteína bruta y alto contenido de cenizas, por lo que su función es fundamentalmente como relleno. Por otra parte, su bajo contenido de energía metabolizable y su alto contenido en fibra cruda provocan que actúe como fibra dietética, acelerando el paso del alimento por el tracto intestinal, lo que a su vez hace que el ratón sienta necesidad de comer nuevamente, garantizando así la ingesta que contiene la dosis sub-letal, especialmente cuando se reduce la carga del agente activo en el cebo, lo cual tiene la ventaja de disminuir los riesgos por efectos a largo plazo en exposición en humanos y organismos no diana.

La inclusión de harina de bagazo en la formulación rodenticida no debe sobrepasar ciertos límites, ya que disminuirá la compresibilidad de la mezcla con el resto de los ingredientes, debido a un incremento del efecto de resiliencia de las partículas de bagazo molido; a su vez, esto produciría un pellet menos denso y poco resistente; así mismo, se disminuiría la palatabilidad del cebo por lo que el roedor discriminaría dichas partículas que al no estar enmascaradas con partículas de cereales resultarían menos gustativas.

En la tabla 2 se puede apreciar la caracterización de los pellets, desde el punto de vista del control de la calidad, a la salida de la prensa peletizadora.

Tabla 2. Características de los pellets diseñados

Densidad (kg/m ³)	Humedad (%)	pH	Durabilidad (%)	Rotura y fisuración (%)
750-1200	< 15	5.7 - 6.2	< 2 %	< de 0.5

La densidad se afecta por las condiciones de molienda de los ingredientes, donde se alcanza el tamaño de partícula y la granulometría requerida; los valores obtenidos con una compresión entre 5 y 10 MPa rebasan los 750 kg/m³, lo cual resulta apropiado para la formulación en pellets. A su vez, la densidad de las harinas influye en el factor de cohesividad, la densidad absoluta y de bulto de los pellets. La alta densidad propicia que los pellets no se desgranen fácilmente y conserven su forma original. El control de la humedad es fundamental para lograr la formación del pellet, son apropiados contenidos de humedad entre 12 y 15 %, valores más altos provocan problemas operacionales en la peletizadora y la aparición de hongos en el cebo y, como consecuencia, su deterioro y pérdida de palatabilidad. El índice de durabilidad da un criterio de la resistencia a la desintegración física del pellet y la generación de finos, que teóricamente tendría el producto durante el manejo, almacenamiento y transportación desde la fábrica hasta sus destinos. Valores de retención del 97 % o 3 % como merma, son requeridos como norma. El cebo diseñado no se degrada química o biológicamente de forma rápida y ha conservado sus propiedades rodenticidas después de más de un

año de almacenamiento bajo condiciones apropiadas. La dureza del pellet satisface la necesidad de roer, típica de esa especie de animales y por otra parte, el índice de rotura y la fisuración del pellet son adecuados.

En la tabla 3 se presentan los resultados de la efectividad de los rodenticidas. La formulación se mantuvo invariable en todas las variantes, solamente se disminuyó la carga de brodifacoum a 0.0025 % para estudiar su efecto en los pellets sin recubrimiento. Se obtuvo un consumo de 2.02 g para el cebo sin recubrimiento al 0.005 %, 4.99 g para el cebo parafinado y 2.89 g para el cebo recubierto con cera. Solamente existen diferencias significativas entre el cebo sin recubrimiento y el parafinado, el resto de las formulaciones son iguales estadísticamente, en cuanto al consumo del cebo. Al bajar la carga del brodifacoum a 0.0025 % se incrementó el consumo del cebo hasta 6.76 g, con un promedio de tiempo letal ligeramente superior y un rango más estrecho de este, que incide en una disminución de los costos del cebo. La mortalidad fue de 100 % para todos los tratamientos, superando la norma que establece el 95 %.

Tabla 3. Prueba de efectividad biológica de los rodenticidas formulados

Tipo de cebo rodenticida	Consumo (g)		Mortalidad (%)	Período letal (días)	
	\bar{X}	Rango		\bar{X}	Rango
Sin recubrimiento al 0.005 %	2.02 b	1.44- 3.13	100	7	5-9
Sin recubrimiento al 0.0025 %	6.76 c	6.44-7.07	100	7.5	7-8
Recubierto con parafina	4.99 a	3.08-7.23	100	7	5-9
Recubierto con cera	2.89 ab	1.17-5.75	100	7	5-9
Rodenticida comercial	3.69 ab	2.43-4.72	100	7	5-9
Ratonina	3.58 ab	1.50-6.33	-	-	-

CV=22.13% ES \bar{X} = 0.1584

Medias con letras similares no difieren significativamente para Newman-Keuls $p \geq 0.005$ %.

En la tabla 4 se aprecian los resultados de las pruebas de palatabilidad con alimentación no selectiva. El consumo fue de 5.62 g para el cebo sin recubrimiento al 0.005 %, mientras que para la Ratonina fue de 6.98 g. El resto de los datos estuvo dentro de este rango, sin que existan diferencias significativas entre ellos. Aparentemente, la palatabilidad de los cebos formulados, sin recubrimiento o recubierto con cera o parafina, fue superior a la del rodenticida comercial y la del placebo, aunque estadísticamente no existe confirmación de esta suposición para el nivel de significación probado.

Tabla 4. Prueba de alimentación no selectiva

Tipo de cebo	Peso (g)	Consumo (g)		Mortalidad (%)	Período letal (días)		Palatabilidad (%)
		\bar{X}	Rango		\bar{X}	Rango	
Sin recubrimiento	29.30	5.62 a	3.51- 7.59	100	5.50	4-7	19.17 a
Recubierto con parafina	36.70	6.13 a	2.86-7.17	100	8.50	5-7	16.71 a
Recubierto con cera	38.90	6.63 a	4.01-7.94	100	8.50	4-9	17.05 a
Rodenticida comercial	43.50	6.08 a	4.51-6.54	100	9.50	5-9	13.98 a
Ratonina	43.70	6.98 a	5.50-7.73	-	-	-	15.97 a

CV=12.83 % ES \bar{X} = 0.0950 CV=16.20 % ES \bar{X} = 0.4030

Medias con letras similares no difieren significativamente para Newman-Keuls $p \geq 0.005$ %.

El consumo en esta prueba fue superior a lo planteado por Torres (9), de 1 a 3 gramos diarios, mientras que en la Norma Ramal NRAG 968 (5) se plantea que una buena palatabilidad corresponde a un valor de 7 %, inferior a los valores obtenidos para el rodenticida diseñado en este trabajo. Estos resultados evidencian que los derivados de la caña empleados en la formulación no interfieren en la palatabilidad.

En las pruebas de palatabilidad con alimentación selectiva (tabla 5), en el caso de ratones machos, se obtuvieron consumos en el rango comprendido entre 9.83 g para cebos recubiertos con cera y 16.33 g para cebos sin recubrimiento.

Tabla 5. Prueba de palatabilidad con alimentación selectiva para el cebo diseñado

Tipo de cebo	Sexo	Consumo (g)		Palatabilidad (%)
		Cebo diseñado	Ratonina	
Sin recubrimiento al 0.005 %	M	16.33 a	22.00	70.12
	H	11.50 a	24.00	75.53
Recubierto con parafina	M	9.50 a	9.50	66.67
	H	11.17 a	19.50	73.31
Recubierto con cera	M	9.83 a	18.17	74.01
	H	13.67 a	22.50	72.58
Rodenticida comercial	M	15.50 a	27.90	73.68
	H	19.33 a	23.67	68.98

CV=18.93 % ES \bar{X} = 0.2010

Woldeamanuel *et al.* (10) plantean un valor mínimo de 33 % como una palatabilidad (alimentación selectiva) aceptable para un cebo rodenticida, lo que es inferior a lo alcanzado con el rodenticida formulado, cuya palatabilidad rebasa el 65 % en todas sus variantes de presentación.

Para los ensayos de campo se escogen lugares representativos del hábitat donde se va a utilizar el rodenticida (interior/exteriores edificios, vertederos, alcantarillas, áreas abiertas, entre otros) y que deben estar infestados con un número suficiente de roedores. En este caso la prueba se realizó en un almacén de productos alimenticios con un nivel de infestación medio (figura 2). La mayor palatabilidad se alcanzó con el cebo parafinado, mientras que la menor fue para el cebo con cera de caña, corroborándose lo sucedido en los ensayos con ratones de laboratorio donde la formulación más apetecida fue también la que contenía parafina, esta situación puede ser atribuida a la necesidad que tienen estos animales de roer. Los valores de palatabilidad obtenidos son igualmente superiores al valor de 33 % planteado por Woldeamanuel *et al.* (10).

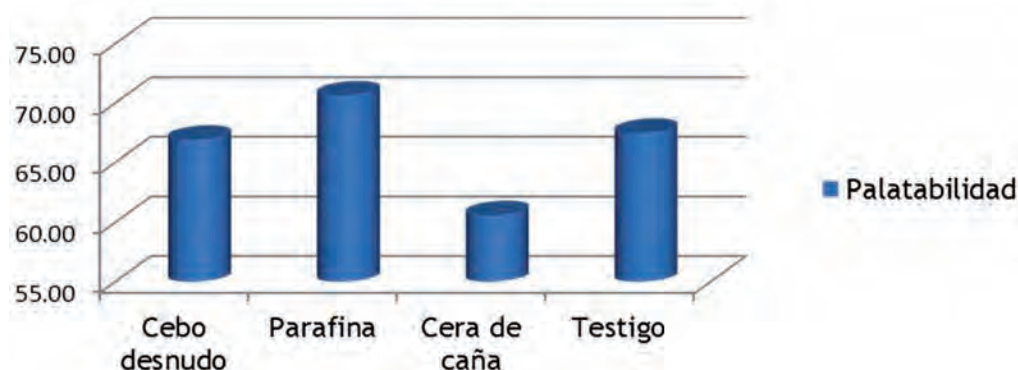


Figura 2. Palatabilidad de los cebos formulados empleados en un almacén.

Estos resultados están en concordancia con aspectos contemplados en la Directiva de Biocidas, donde se establecen los requisitos para la inscripción de los biocidas (en particular los rodenticidas)

entre los que se destacan las evaluaciones de eficacia y ecotoxicológicas; por lo que se preparó el expediente de solicitud de marca comercial con el registro de RodenBag. Con la inversión de una planta de 625 t/a del rodenticida se cubre la demanda solicitada por el Grupo Empresarial Azucarero AZCUBA y por el sector de salud pública de los territorios de Mayabeque y Artemisa. El estudio de factibilidad económica de esta planta mostró indicadores favorables con un valor actual neto (VAN) positivo de 1 152 000 MN, una tasa TIR del 83.5 % y un período de recuperación de la inversión de 3.6 meses. La ficha de costo del rodenticida, con un precio resultante de 1072.02 MT (moneda total) y de ellos 355.50 CUC, permite obtener ingresos totales de 4 609 690 MT en el horizonte de análisis del proyecto de inversión. Esto posibilitaría la sustitución de importaciones de rodenticidas cuyo precio en el mercado internacional oscila entre 3500 y 5000 USD/t.

CONCLUSIONES

La inclusión de los derivados de la caña de azúcar, estudiados en la formulación del cebo rodenticida diseñado en este trabajo, no tuvo interferencia con la aceptación por los roedores. La carga de brodifacoum se puede reducir satisfactoriamente hasta 0.0025 %, con menos riesgos de toxicidad. El cebo diseñado mostró una alta eficiencia letal y alta palatabilidad y no se degrada química o biológicamente de forma rápida, conserva sus propiedades rodenticidas por más de un año de almacenamiento bajo condiciones apropiadas. Este cebo en forma de pellets reúne los requisitos de calidad necesarios para su producción y comercialización, por lo que constituye un rodenticida potencial para ser empleado en la lucha contra roedores. El estudio de factibilidad para el montaje de una planta de 625 t/a del rodenticida, en la UEB Bioprocesos de Quivicán, mostró indicadores favorables, con un valor actual neto (VAN) positivo de 1 152 000 MN, una tasa TIR del 83.5 % y un período de recuperación de la inversión de 3.6 meses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez, E. *et al.* (2010). Manejo integrado de plagas en almacenes, silos, instalaciones de la industria molinera y transportación de alimentos. Editorial CIDISAV. Impreso Editora Centenario, Santo Domingo, República Dominicana: 69 pp. ISBN: 959-7194-05-8.
2. Padrón, V. (1997). Estudio de daños y pérdidas causados por roedores en el cultivo de la caña de azúcar a través de encuestas nacionales. I Simposio Internacional de Control Biológico de Ratas y Ratones. Ciudad Habana. 3-5 de diciembre.
3. AOAC International. 1990. Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15° Ed. Washington, DC, Association of Official Analytical Chemists.
4. W.H.O. (1975) Instructions for determining the susceptibility or resistance of rodents to anticoagulant rodenticides. W.H.O./UBC/75:595.
5. MINAGRIC. NRG 968 (2016) Sanidad vegetal. Rodenticidas químicos. Pruebas de palatabilidad.
6. Shell. (1987). Guide to rodent control. Principles of Rodenticides Evaluation. Section 3, 8 pp.
7. Cruz Montañez, J. S. (2016). Evaluación de la efectividad de brodifacoum con bases gustativas en roedores de laboratorio de la especie "Rattus rattus". Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/3>
8. León, A; Rosell, C.(2007). De tales harinas, tales panes. Granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Publisher ISEKI. ISBN 978987131107. 480 pp.
9. Torres, A. (2014). Determinación de las propiedades rodenticidas de *Lantana aculeatavarparviflora*. Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Artemisa. Junio.
10. Woldeamanuel, A; Kumsa, M; Teshome, M. (1997). The toxicity of four anticoagulant rodenticides to common field rat in the laboratory. Pest Management Journal of Ethiopia. 77-81 pp.

Aplicación de Microorganismos Eficientes para la disminución de la contaminación en lagunas de oxidación de la Granja Genética Porcina El Jigüe

Luis A. Pérez-Fernández¹, Jorge Luis Gregorich-Fonseca¹, Silvano Legrá-Mora², Orly López-Delgado², Miguel A. Peña-Arias² y Georgina Michelena-Álvarez^{2*}

1 Empresa Laboratorio de Productos Hemoderivados, Sueros, Bioterios y de Producción Agropecuaria, UP3, LABIOFAM S. A., Avenida Rancho Boyeros, La Habana, Cuba.

2 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.

*georgina.michelena@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

Las granjas agropecuarias de cría porcina intensiva son fuente de contaminación, debido a que generan altos volúmenes de residuales líquidos de gran poder contaminante. Esto ha provocado restricciones cada vez más severas por el vertimiento de sus efluentes, ya que estos deben ser tratados adecuadamente, a fin de reducir la contaminación ambiental. Las cargas contaminantes de las granjas agropecuarias inciden en el medioambiente debido al accionar del hombre. En el presente trabajo se estudiaron los niveles de contaminación de las lagunas de oxidación de la granja genética porcina El Jigüe, para determinar el comportamiento de las propiedades físico-químicas de los residuales y su influencia en el medio ambiente. Se realizó la caracterización de estas aguas residuales en el laboratorio Laguazur, del Laboratorio de medio ambiente del ICIDCA, y se determinaron los valores de DQO, DBO, pH, conductividad eléctrica, nitrógeno, fósforo y sólidos. Los resultados obtenidos demuestran que con la aplicación de 500 litros de Microorganismos Eficientes en las lagunas (con un volumen aproximado de 3700 m³), para una relación de 0.13 L/m³ de residuales de laguna, 2 veces al mes, es posible disminuir la contaminación (enunciada como DQO) al 92 % de remoción en el período analizado y, acercarse progresivamente, a la NC ISO 27:2012, que regula los vertimientos. Estos resultados validan la factibilidad de las aplicaciones de los microorganismos eficientes para disminuir el impacto ambiental en las lagunas de oxidación. Los ensayos continuarán con aplicaciones sistemáticas del bioproducto y las actividades de monitoreo, así como otras acciones de adecuación tecnológica, que pueden favorecer en este resultado.

Palabras clave: carga contaminante, medio ambiente, laguna de oxidación, empresas agropecuarias.

ABSTRACT

The intensive pig farming farms are one of the sources with the greatest impact on contamination due to the generation of high volumes of highly polluting liquid waste. This has led to increasingly severe restrictions in relation to the discharge of its effluents, so these must be adequately treated in order to reduce environmental pollution. The determination and monitoring of the polluting loads of agricultural farms affect the environmental impact, referring to the effects and consequences of man's actions in the environment. In the present work, a study of the contamination levels of the oxidation lagoons of the swine genetic El Jigüe was carried out, to determine the behavior of the physicochemical properties of these residuals and their influence on the environment. The characterization of these residual waters was carried out in the Laguazur laboratory of the Environmental Laboratory of the ICIDCA, determining the values of COD, BOD, pH, electrical conductivity, nitrogen, phosphorus, solids. The results obtained show that with the application of 500 liters of Efficient Microorganism in the lagoons (with an approximate volume of 3700 m³) for a ratio of 0.13 L / m³ of lagoon residuals and with a frequency of

2 times a month, a decrease in contamination (stated as COD) of 92 % removal in the analyzed period and a progressive approach to NC ISO 27: 2012 that regulates discharges. These results validate the feasibility of Efficient Microorganism applications for reducing the environmental impact in oxidation ponds. The trials will continue with systematic applications of the bioproduct and monitoring activities, as well as other technological adaptation actions that may favorably affect this result.

Key words: pollutant load, environment, oxidation lagoons, agricultural companies.

INTRODUCCIÓN

La Granja Genética Porcina El Jigüe, del municipio Bauta, en Artemisa, provoca una grave contaminación a los ambientes acuáticos con el vertimiento de sus aguas residuales. El tratamiento que se realiza a los residuales líquidos de la UEB es el vertimiento directamente a un sistema de laguna de oxidación y, de ella, al río, lo que provoca una severa contaminación de las aguas por saturación de materia orgánica, que no cumple con la norma cubana de vertimiento NC ISO 27:2012.

Los Microorganismos Eficientes (EM) son la base de los estudios realizados por el Dr Teruo Higa (1), de la Universidad de Ryukus, Japón, que se basan en un cultivo mixto de microorganismos aislados del medio ambiente, que pueden aplicarse como inoculantes, con el fin de incrementar la calidad de los suelos así como el rendimiento y calidad de las cosechas. Además, la aplicación de estos productos en el tratamiento de residuales líquidos, resulta de gran interés, con el fin de lograr la disminución de los índices de contaminación, que se muestra, principalmente en el valor de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).

Los Microorganismos Eficientes, cuando entran en contacto con la materia orgánica, secretan sustancias beneficiosas como vitaminas, ácidos orgánicos, minerales quelatos y antioxidantes. El tratamiento de aguas residuales con este bioproducto es una forma de obtener un nivel deseable de calidad del agua y lodo residual para el ambiente, descomponiendo y transformando la materia orgánica. Por otra parte, constituye una solución a los principales problemas ambientales generados por la producción porcina, debido a la emisión de gases nocivos, como el amoníaco, uno de los más perjudiciales y más abundante que, a su vez, es el precursor de los malos olores.

En Cuba se ha extendido la aplicación de los Microorganismos Eficientes producidos por vía artesanal, con resultados satisfactorios que los avalan como solución local ya que su composición microbiana no está identificada. Para su producción a nivel industrial se requiere la reproducibilidad y el control de calidad, que solo es posible mediante el empleo de microorganismos conocidos. En el caso de este estudio se aplicó un bioproducto a partir de cepas microbianas identificadas, obtenidas con una tecnología del ICIDCA, transferida a Labiofam y un control de proceso que garantizan la calidad.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la aplicación de Microorganismos Eficientes sobre la calidad de los residuales líquidos que resultan de la laguna de oxidación de la Granja Genética Porcina El Jigüe, a partir del análisis de las muestras tomadas a la salida de la laguna de oxidación y antes del vertimiento al río y otros canales y realizar una comparación de los principales parámetros que se deben considerar para el vertimiento de los residuales, se tomó como referencia la NC ISO 27:2012 (2).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Granja Genética Porcina El Jigüe, en Anafe, municipio Bauta, provincia de Artemisa, durante el primer trimestre del 2019. Se tomaron muestras a la salida del biodigestor, que corresponde a la entrada del sistema de laguna y en la salida final de este sistema; siempre antes de que se realizara la aplicación del producto y antes de que el residual se vertiera al río receptor. Se realizaron dos aplicaciones mensuales, asperjando los Microorganismos Eficientes, pri-

meramente, dirigidos hacia los bordes de las lagunas de oxidación y, a continuación, hacia el espejo de agua, a dosis de 0.13 L/m³.

Se realizó la caracterización de las aguas residuales provenientes de las lagunas de oxidación de la Empresa Agropecuaria, en el laboratorio Laguazur, del Centro Nacional de Gestión de Medio Ambiente (CENGMA) y se determinaron los valores de:

- Demanda Química de Oxígeno, método de reflujo con dicromato de potasio (3, 4).
- Demanda Bioquímica de Oxígeno, método DBO5, 20 °C, equipo Oxitop Box WTW (5).
- pH, método electrométrico (6).
- Conductividad eléctrica, método electrométrico (7).
- Nitrógeno, método Kjeldahl (8).
- Fósforo, método colorimétrico (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra el comportamiento en el tiempo de la DQO (mg/L) en las aguas de estancadas, a la salida del sistema de lagunas de oxidación de los residuales líquidos de la Granja Genética Porcina El Jigüe. Como puede observarse en la figura 1, los índices de contaminación han disminuido significativamente. Los valores de remoción de la carga contaminante superan el 90 %, lo cual avala la efectividad del trabajo que se ha realizado a favor de la reducción de la contaminación ambiental, en el tratamiento de los residuales estancados en las lagunas.

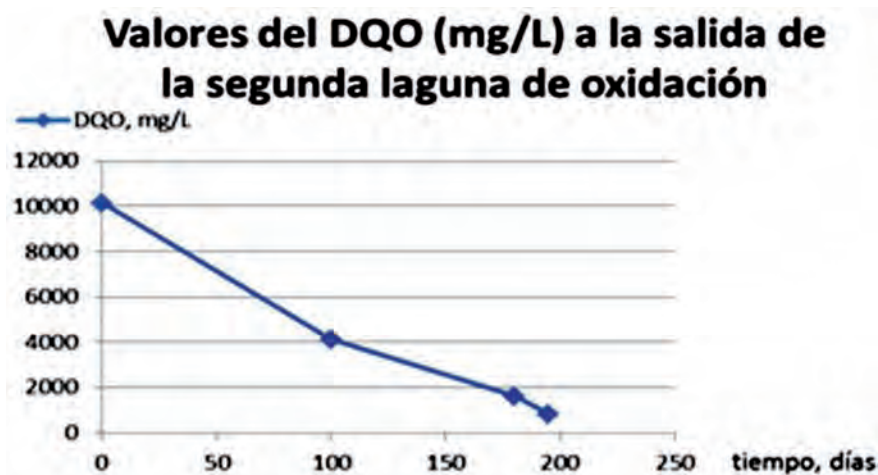


Figura 1. Resultados de la determinación de la DQO de los residuales líquidos tratados en un sistema de lagunas de la Granja Genética Porcina El Jigüe.

La tabla 1 compara los valores de la caracterización físico-química de las aguas de vertimiento inicial con las tratadas con los Microorganismos Eficientes, en el tiempo de aplicación de dosis y monitoreo. Cuando se analizan los valores de DQO, que resultaron a la salida de la segunda laguna y se comparan con la NC ISO 27:2012, se observa que aunque aún no cumplen la normativa de vertimiento, los valores se están acercando a los exigidos por la normativa.

Tabla 1. Caracterización físico-química de las aguas de vertimiento a la salida del sistema de lagunas a la hora inicial y en su cinética de tratamiento con LEBAME

	Día 0	Día 100	Día 180	Día 195	Valores NC 27:2012 Vertimiento
DQO mg/l	10136	4110	1608	807	< 250
DBO mg/l	3214	1511	815	338	< 100
pH	9.35	7.44	7.29	7.47	6-9
Fósforo, mg/l	26.4	7.21	3.84		< 10

La figura 2 evidencia el efecto de la aplicación de los Microorganismos Eficientes en el sistema de lagunas. Se observa el cambio de coloración en las aguas, reducción de los malos olores y reducción de lodos en la superficie de la laguna.

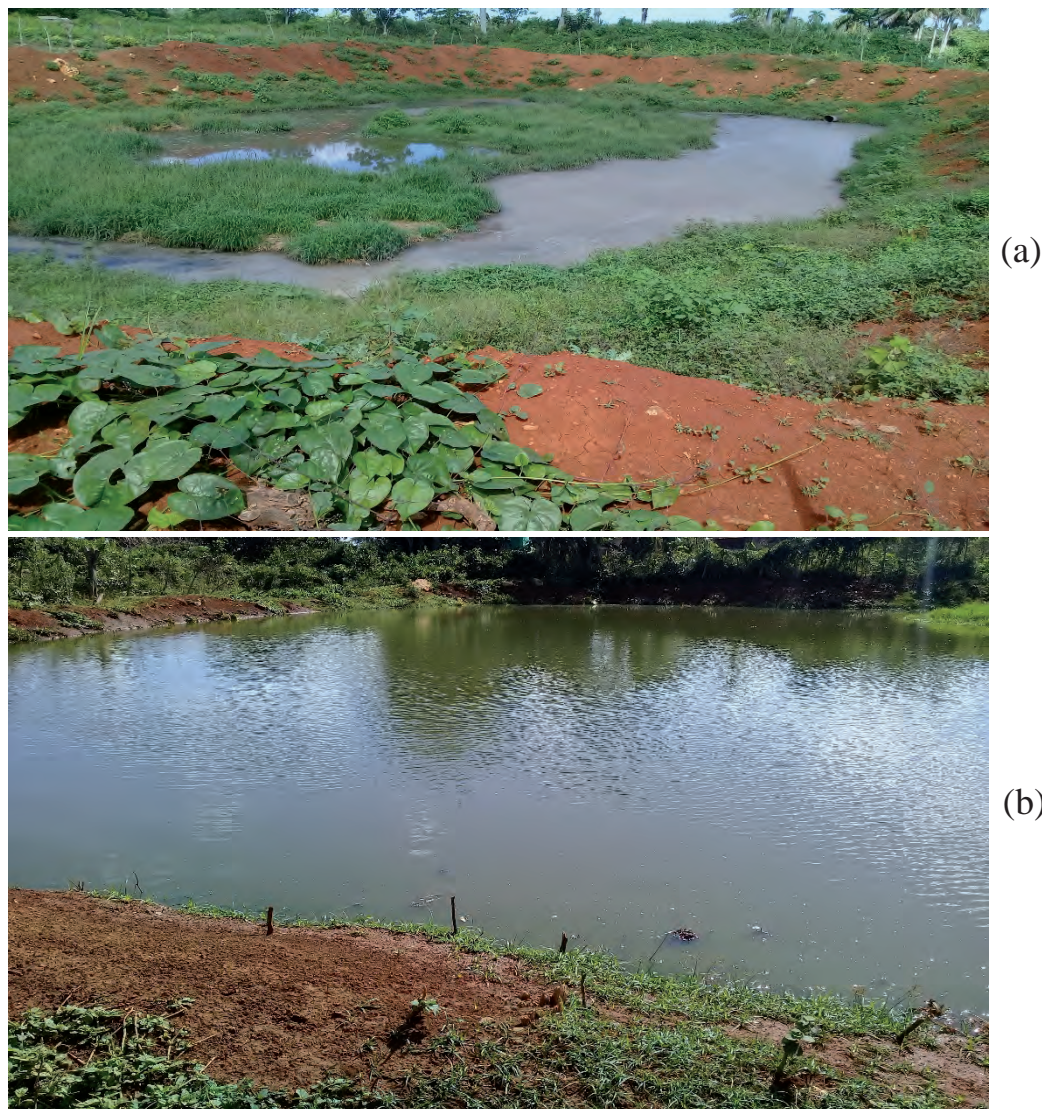


Figura 2. Efecto de la aplicación de los Microorganismos Eficientes en el sistema de lagunas **(a)** día 0, **(b)** día 180.

Los ensayos continuarán con aplicaciones sistemáticas del bioproducto y las actividades de monitoreo, así como otras acciones de adecuación tecnológica que pueden incidir favorablemente en este resultado.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que con dosis de aplicación de 0.13 L/m³ de Microorganismos Eficientes en las lagunas de oxidación de la Granja Genética Porcina El Jigüe, se redujo la DQO (indicador de contaminación orgánica) al 92 % en el período analizado.

Se obtuvo un acercamiento progresivo a la NC ISO 27:2012, que regula los vertimientos líquidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oficina Nacional de Normalización. NC 27: 2012. Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y al alcantarillado - Especificaciones. Cuba. ICS. 13.060.30. Octubre 2012.
2. Higa, T. Una Revolución para Salvar la Tierra. Traducción Ma. Del Mar Riera. EM 3. Research Organization. Okinawa. Japón. Versión en español 2002. 352 p.
3. Conde, J.; Bartós, J.; Reyes, A. (1978). Determinación rápida de la demanda química de oxígeno (DQO) Rev. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar Vol. XII, 3, 21-31.
4. 5220 Chemical Oxygen Demand. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 21 Edition. 2005. APHA-AWWA-WPCF.
5. 5210 Biochemical Oxygen Demand. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 21 Edition. 2005. APHA-AWWA-WPCF.
6. Norma ISO 10523 (2008) Calidad de agua, Determinación del pH.
7. 2510 Conductivity. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters. 21 Edition. 2005. APHA-AWWA-WPCF.
8. 4500-N Nitrogen. Standard Method for the Examination of water and wastewater. 21 Edition. 2005. APHA-AWWA-WPCF.
9. 4500-P Phosphorus. Standard Method for the Examination of water and wastewater. 21 Edition. 2005. APHA-AWWA-WPCF.

Certificación del Sistema de Gestión de la Calidad del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar con alcance a las producciones de FitoMas y Nitrofix

Grisel María Ortega-Arias Carbajal*, Marlyn Pérez-Rodríguez, Tania García-Martínez, Ana Nelis San Juan-Rodríguez, Santiago Estupiñán-Díaz, Adolfo Brown-Gómez, Marlen Lorenzo-Maiquez, Maricela Vega-Batista, Idania Blanco-Carvajal, Arlyn Reyes-Linares, Irma Rosa Ramos-Pouza, Marta González-Martínez, María Teresa Fernández-Santisteban, Rocío Jurado-Sánchez y Sidarma Hernández-Castellanos

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.

*grisel.ortega@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

El Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), empresa que pertenece al Grupo Azucarero AZCUBA, cuenta con un Sistema Integrado de Gestión de la Calidad e Inocuidad por las normas NC ISO 9001:2015 y NC ISO 22000:2005, certificado por la Oficina Nacional de Normalización (ONN), con alcance a la producción de rones, *Premium* Vigía: Vigía Gran Añejo y Gran Reserva 18 años. Estos productos se encuentran certificados con la Marca Cubana de Conformidad.

Se realizaron diversas acciones con vistas a implementar el Sistema de Gestión de la Calidad en otras producciones de importancia económica y comercial, específicamente en las producciones de FitoMas y de Nitrofix, productos de aplicación en el sector agrícola, en varios cultivos. Se solicitó a la Oficina Nacional de Normalización la ampliación del alcance del Sistema de Gestión a estas producciones y se logró su Certificación acorde a la NC ISO 9001: 2015, que conllevó a un incremento de la imagen de la organización, al valor agregado del producto, a la mejora del desarrollo organizacional y a la satisfacción de los clientes y partes interesadas.

Palabras clave: sistema de gestión, calidad, certificación.

ABSTRACT

The Cuban Research Institute of the Sugar Cane By-products (ICIDCA), enterprise that belongs to the Sugar Production Group, AZCUBA, has an integrated Quality- FoodSafe Management System according to the NC ISO 9001:2015 and NC ISO 22000: 2005 standards, certified by the National Normalization Office, with scope to the production of *Premium* rums Vigía: Vigía Gran Añejo and Gran Reserva 18 years old. These products are certified with the Cuban Brand of Conformity.

Various actions were carried out to implement the Quality Management System in other productions of economic and commercial importance, specifically the productions of FitoMas and Nitrofix, whose products are widely applied in the agricultural sector in various crops. The National Normalization Office was requested to expand the scope of the Management System to these productions and its Certification was achieved according to NC ISO 9001: 2015, which allowed an increase in the image of the organization, the added value of the products, the improvement of organizational development and the satisfaction of clients and other interested parts.

Key words: management system, quality, certification.

INTRODUCCIÓN

La Calidad pasó de considerarse tan sólo un desafío retórico, a ser un requisito previo para la competitividad, su papel resulta cada vez más relevante para el desempeño eficaz de las organizaciones. Autores como Broedling, en 1990; Cole en 1993, Ishikawa, en 1990, plantean: "Lo que en sus inicios podía ser considerada una herramienta para el control y aseguramiento de los procesos de producción industrial, ha llegado a ser toda una filosofía y modelo para la gestión empresarial, siendo considerado un cambio de paradigma y revolucionado el pensamiento administrativo, con la introducción de la "Gestión de la Calidad Total" (1).

La calidad constituye un valor y eje alrededor del que giran las estrategias competitivas de un número creciente de organizaciones y tiene un conjunto de implicaciones, entre las que se destacan la necesidad de la mejora del desempeño general, mantenimiento de una posición en el mercado, el logro de los compromisos y aceptaciones de las personas, con el objetivo de contribuir a la mejora continua de la organización.

Un Sistema de Gestión es el modo en el que una empresa u organización ordena sus procesos para intentar conseguir la satisfacción del cliente y de las partes interesadas. Al decidir implantar un Sistema de Gestión, se debe tener en cuenta que se puede obtener la certificación ISO 9001:2015 (2). Esto conseguirá que, tanto clientes como proveedores o terceras partes relacionadas con la organización, tengan una mejor imagen de esta, entre otros aspectos, lo cual se traduce en mayores oportunidades de negocio. Los beneficios potenciales para una organización, de implementar un Sistema de Gestión de la Calidad (SGC), basado en la ISO 9001:2015 son: la capacidad para proporcionar regularmente productos y servicios que satisfagan los requisitos del cliente, los legales y reglamentarios aplicables, facilitar oportunidades de aumentar la satisfacción del cliente, abordar los riesgos y oportunidades asociadas con su contexto y objetivos, así como la capacidad de demostrar la conformidad con los requisitos del sistema de gestión de la calidad especificados (2, 3).

El Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) es una empresa que pertenece al Grupo Azucarero AZCUBA, en su misión contempla investigar, desarrollar, innovar y transferir tecnologías, brindar servicios científico-técnicos y capacitación especializada, producir y comercializar productos de alto valor agregado en el campo de la agroindustria azucarera, por lo que implantar sistemas de gestión se reconoce como una vía idónea para cumplir los objetivos estratégicos y para alcanzar altas metas. Desde el año 2009, en el ICIDCA, se acometieron acciones para implementar un SGC con alcance a las producciones de rones Vigía y, en años posteriores, FitoMas y Nitrofix, que hoy constituyen sus producciones principales, así como en los servicios y en las transferencias de tecnologías que presta a la agroindustria azucarera y sus derivados y a otros sectores del país e implementar un SGC basado en la NC ISO 9001:2015 también en la investigación y el desarrollo (4).

En el año 2011 se certificó el Sistema Integrado de Gestión de la Calidad e Inocuidad por las normas NC ISO 9001:2008 y NC ISO 22000:2005 (5 y 6) por la Oficina Nacional de Normalización, con alcance a la producción de rones *Premium* Vigía, productos que se encuentran certificados con la Marca Cubana de Conformidad NC 113:2009. (7). Posteriormente, en el 2018, se llevó a cabo la transición a la NC ISO 9001: 2015 (8); se renovó la certificación del Sistema Integrado de Gestión (NC ISO 9001:2015) (8)-NC ISO 22000:2005) (6) con alcance a la producción de rones Vigía, así como la renovación de la certificación de dichos productos, con la Marca Cubana de Conformidad NC 113: 2009 (7).

La producción de FitoMas y de Nitrofix (productos líderes del ICIDCA), son de amplia aplicación en el sector agrícola, por su efectividad y su contribución a la protección del medioambiente.

El FitoMas es una familia de productos derivados de la industria de derivados del sector azucarero, conformada por el FitoMas-E y el FitoMas-M. El FitoMas-E es un Fitoestimulante a base de

sustancias bioquímicas de alta energía, propias de los vegetales superiores, principalmente aminoácidos, bases nitrogenadas, sacáridos y polisacáridos bioactivos, que puede usarse en cualquier cultivo. Es un producto antiestrés, no tóxico, que estimula y vigoriza prácticamente cualquier cultivo, desde la germinación hasta la fructificación. Reduce el ciclo del cultivo y potencia la acción de los fertilizantes. El FitoMas-M es un madurador de la caña, no tiene carácter tóxico, no afecta cultivos aledaños durante la aplicación aérea y resulta amigable con el medioambiente en general, lo cual es una ventaja muy apreciable, con respecto a los productos químicos con funciones similares.

El Nitrofix es un biofertilizante que sustituye parcialmente (hasta 40 %) el uso de fertilizantes químicos nitrogenados y sus efectos tóxicos y contaminantes. Su principio activo son células bacterianas de *Azospirillum brasilensis*, propias del suelo, que estimulan el crecimiento vegetal y mejoran la calidad y productividad de cultivos como caña de azúcar, papa, malanga, boniato, maíz, frijol y tabaco, según Ortega *et al.* 2019 (9).

El presente trabajo muestra las acciones realizadas por el ICIDCA para implementar la Gestión de la Calidad en las producciones de FitoMas y de Nitrofix y lograr su Certificación, acorde a la NC ISO 9001: 2015.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó acorde con los requisitos de la NC ISO 9001:2015 (8) y la información documentada, elaborada e implantada en el Sistema Integrado de Gestión del ICIDCA, con alcance a las producciones de Rones Premium Vigía, además la estrategia proyectada por el ICIDCA para ampliar el alcance del Sistema, según Ortega *et al.* 2013, (10), la cual partió de la planificación por la alta dirección, de tareas enfocadas en la gestión de la calidad, en una primera etapa, con respecto a la producción de FitoMas, Ortega *et al.* (11). Posteriormente, se trabajó para ampliar también la producción de Nitrofix.

Todo ello permitió también tomar decisiones para desarrollar el trabajo con vistas a lograr ampliar el alcance del Sistema y su certificación. Se utilizó la técnica de revisión de documentos.

La alta dirección definió las siguientes acciones:

1. Creación y luego la actualización del grupo gestor de la calidad.
2. Definición, análisis y aprobación del nuevo alcance del Sistema de Gestión.
3. Definición de responsabilidades con respecto al nuevo alcance.
4. Preparación y ejecución del ciclo de formación (capacitación de directivos, especialistas y trabajadores).
5. Rediseño del Sistema de Gestión: definición de la información documentada requerida, su elaboración e implementación, con respecto al nuevo alcance del Sistema de Gestión:
 - ✓ Revisión y actualización de la política del Sistema de Gestión
 - ✓ Revisión y actualización de los objetivos de calidad
 - ✓ Actualización del mapa de procesos
 - ✓ Revisión de la documentación de las producciones de FitoMas y Nitrofix
 - ✓ Revisión de la información documentada del Sistema Integrado de Gestión para la producción de rones Premium Vigía
 - ✓ Elaboración de la información documentada respecto al nuevo alcance del Sistema de Gestión.
 - ✓ Implantación de la información documentada para el nuevo alcance.
6. Realización de auditoría interna al Sistema de Gestión para el nuevo alcance.
7. Realizar la Revisión por la Dirección del Sistema de Gestión.

7. Solicitar la Certificación del nuevo alcance del Sistema de Gestión, a la Oficina Nacional de Normalización.

Para realizar estas acciones se elaboró un cronograma y se le dio seguimiento en las reuniones del Consejo de Calidad. Para rediseñar el Sistema Integrado de Gestión de la Calidad e Inocuidad implementado en el ICIDCA y Certificado para las producciones de rones Vigía, se tomaron en cuenta los reportes de Ortega *et al.* (12), así como la documentación específica de las producciones FitoMas y Nitrofix.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Grupo gestor de la calidad. Creación y actualización

En 2016 se crea el grupo gestor de la calidad en el ICIDCA. Este grupo está integrado por especialistas e investigadores de experiencia en la temática Sistemas de Gestión de la Calidad. Su composición se actualiza en 2018, se incluyeron los representantes de calidad de cada uno de los procesos productivos involucrados en el nuevo alcance. Se llevaron a cabo reuniones del Grupo Gestor para proyectar, organizar e implementar el trabajo.

Definición, análisis y aprobación del nuevo alcance del Sistema de Gestión

En el Consejo de Calidad y luego en el Consejo de Dirección, se presentó y aprobó el nuevo alcance para el Sistema de Gestión: la producción de FitoMas, producido en la UEB Habana y la producción del biofertilizante Nitrofix, producido en la UEB Bioprocesos Cuba 10, además de la implementada y certificada producción de Rones Premium Vigía.

Las responsabilidades para el sistema de gestión se definieron, según reportes de Ortega *et al.* (11), como sigue: el director general, el jefe del Grupo de Calidad del ICIDCA, el Grupo Gestor, el Consejo de Calidad. Por otra parte, se incluyen además responsabilidades para los grupos de mejora, creados en cada UEB productiva.

Cada grupo de mejora está integrado por el director de la UEB como presidente, el especialista en calidad como vicepresidente, un secretario y los representantes de procesos, en el caso de la UEB Bioprocesos Cuba 10, y de las áreas como miembros en la UEB Habana. Este órgano es el encargado de implementar y dar seguimiento al funcionamiento del sistema de gestión y la mejora, en cada UEB, según lo dispuesto por el consejo de calidad.

Preparación y ejecución del ciclo de formación

Para la capacitación del personal vinculado al Sistema de Gestión conviene involucrar al responsable del Sistema (Alta Dirección) y debe incluir a todas las personas involucradas en cualquier parte del proceso, dentro de la organización. Considerando esto, se llevaron a cabo cursos de capacitación, que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Capacitación en Gestión de la Calidad para transitar a NC ISO 9001:2015

Cursos/Seminarios
1. Seminario Actualización en Gestión de la Calidad NC ISO 9001:2015, a la alta dirección.
2. Curso Sistema de Gestión de la Calidad NC ISO 9001:2015 al personal de los procesos involucrados en el alcance del Sistema de Gestión.
3. Curso Formación de Auditores Internos de la Calidad.

La capacitación permitió que el personal adquiriera nuevos hábitos, nuevos comportamientos en relación con sus prácticas habituales de trabajo; por ejemplo, si debe controlar y registrar toda actividad que antes no se registraba, eso contribuirá a que se eviten errores, retrasos o pérdidas. Con la capacitación se producen efectos de motivación y claridad en las prácticas, se reduce la resistencia al cambio, que es paulatino. Por lo que se deduce que todos los que componen la empresa deben saber las reglas establecidas en las normas de referencia y la alta dirección se compromete, formalmente y es con esta convicción, con la que se pueden lograr avances y hacer las correcciones que el nuevo sistema demandará, con respecto al que existe en la empresa.

En cada capacitación, se midieron los conocimientos adquiridos por el personal, y se evidenciaron, en general, altas calificaciones en los exámenes realizados. La capacitación permitió la elaboración de la información documentada requerida en cada proceso, así como adquirir una cultura en la organización, para implementar el SGC acorde con la NC ISO 9001:2015 (8), en las producciones de Nitrofix y FitoMas. Además, permitió incrementar la cantidad de auditores en el centro y les brindó las herramientas necesarias para ejecutar auditorías internas.

Rediseño del Sistema de Gestión: definición de la información documentada requerida, su elaboración e implementación, respecto al nuevo alcance del Sistema de Gestión

- **Rediseño del Sistema de Gestión del ICIDCA**

Se procedió a rediseñar el Sistema de Gestión que incluye, además de las producciones de Rones Vigía, el nuevo alcance: las producciones de FitoMas y de Nitrofix. Para ello, se revisaron y actualizaron: la política de calidad, los objetivos de calidad y el mapa de procesos. Se revisó la documentación que existe en los procesos FitoMas y Nitrofix, y la información documentada del Sistema Integrado de Gestión con alcance a la producción de rones *Premium* Vigía. Se definió la información documentada necesaria para ampliar el alcance propuesto, así como la actualización y adecuación de la existente. Se elaboró e implementó dicha documentación.

- **Revisión y actualización de la política del Sistema de Gestión**

A partir de su importancia y del impacto satisfactorio en la agricultura de las nuevas producciones de FitoMas y Nitrofix, que se requieren certificar, se rediseñó y aprobó la política del Sistema de Gestión, como se describe a continuación:

“La alta dirección del ICIDCA y todos sus trabajadores tienen el compromiso de garantizar la sostenibilidad de la institución, atendiendo a su propósito, contexto y dirección estratégica, la conformidad con los requisitos de los clientes y partes interesadas, cumplir con los requisitos aplicables y la reducción del impacto sobre el medioambiente de todos sus productos, servicios e investigaciones científicas, enfatizando en las producciones de rones Vigía, FitoMas, Nitrofix y en los servicios constructivos. Para ello, se trabaja en la mejora continua de los procesos, gestionando los riesgos y las oportunidades, especialmente los que puedan afectar el entorno, y en la garantía de la inocuidad del Ron Vigía y de las producciones que lo requieran. Se cumplirá con las medidas y requisitos de seguridad biológica en las instalaciones, en las que se trabaje con agentes biológicos y sus productos, además con las buenas prácticas de fabricación y de laboratorio, con lo que se asegura, que las producciones, servicios e investigaciones sean eficaces, confiables y seguras, con lo cual se incrementa la satisfacción de los clientes. Se gestiona de forma integral, la actividad empresarial y científica, de acuerdo a lo establecido en la NC ISO 9001: 2015, NC ISO 22000: 2005 y NC ISO 14001: 2015” (6, 8, 13).

Esta política se encuentra disponible para las partes interesadas y los clientes, a nivel de instituto, y una copia en las unidades productivas: Unidades Empresariales Básicas (UEBs), en la UEB Haba-

na y en la UEB Bioprocesos Cuba 10. Se comunica a todo el personal y se revisa periódicamente, para que continúe siendo pertinente y apropiada para la organización.

- **Revisión y actualización de los objetivos de calidad**

Como parte de los objetivos se establecieron los relacionados con las producciones que se requieren certificar, además de los de la producción de rones Vigía ya certificada. Su cumplimiento se chequea, trimestralmente en el Consejo de Dirección y, semestralmente, en el Consejo de Calidad.

- **Actualización del mapa de procesos**

En la figura 1 se presenta el mapa de procesos y sus interacciones para el Sistema de Gestión del ICIDCA.

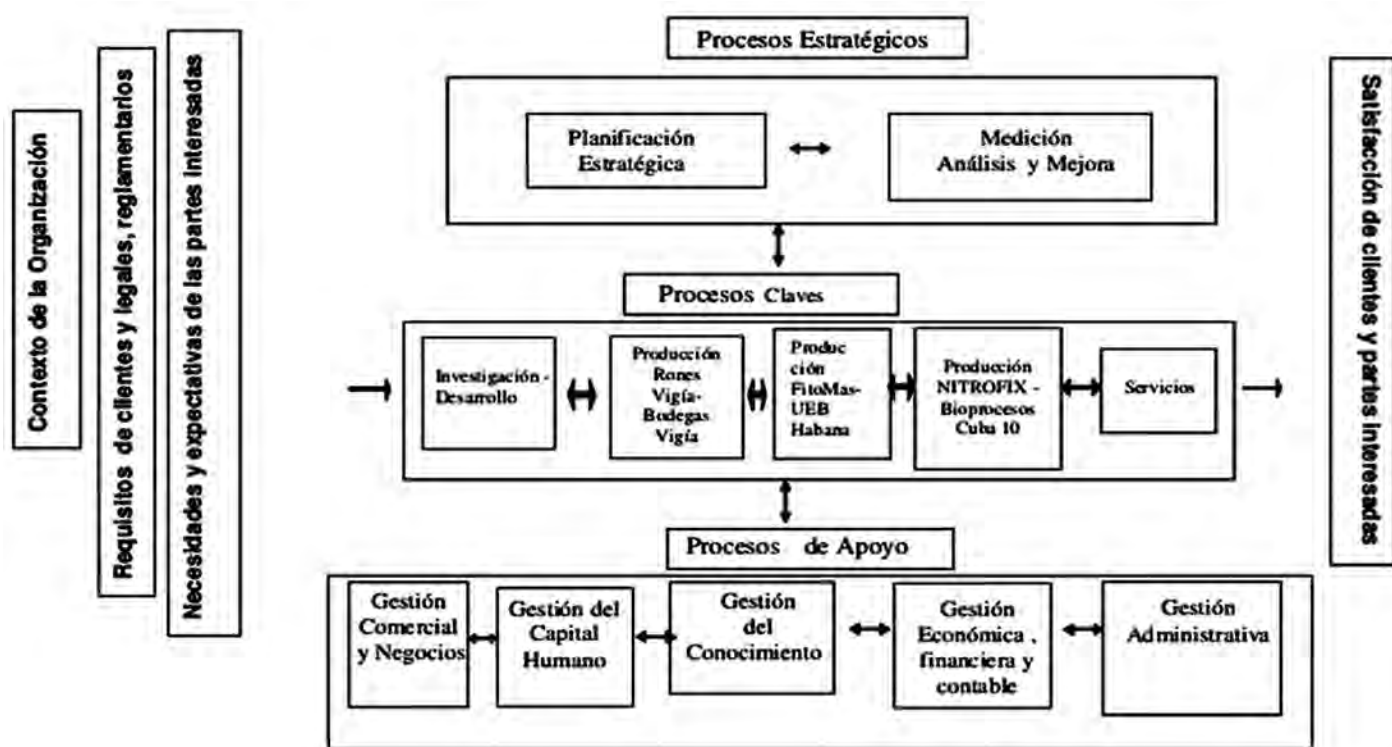


Figura 1. Mapa de Procesos del ICIDCA y las interacciones.

Revisión de la información documentada de las producciones de Nitrofix y FitoMas

Para ampliar el alcance del SGC en principio, se tuvieron en cuenta las acciones con respecto a la gestión de la calidad que existía en estas producciones, las cuales constituyen los antecedentes para el Rediseño del Sistema de Gestión del ICIDCA, con alcance a las producciones de Nitrofix y FitoMas.

- **Producción de Nitrofix**

Como antecedente en la producción de Nitrofix, la Dirección Cuba 10 y de Biotecnología del ICIDCA han desarrollado proyectos de investigación dirigidos a la obtención de biopreparados de origen microbiano. Con vistas a incrementar el nivel de excelencia en estas producciones, se procedió a la implementación del SGC en la Dirección Cuba 10, que ha permitido obtener productos de formas seguras y eficientes.

Entre las primeras experiencias desarrolladas al respecto, San Juan *et al.* reportan (14) la implementación de la NC ISO 9001:2001 y la actualización a la NC ISO 9001:2008 (5, 15), en las que se

establecen los controles que inciden de forma significativa en la calidad de los productos microbianos, en las etapas: desarrollo de inóculos, producción, recobrado, secado, formulación del producto final y almacenamiento, estableciendo nueve puntos de control, lo cual permitió verificar, validar y dar seguimiento a las producciones y de esta forma dar respuesta a los tres tipos de control que fueron establecidos por el Grupo Activo de Control de Calidad, de la Organización Internacional de Productos Biológicos.

Se estableció la documentación necesaria para las producciones y servicios biotecnológicos en plantas y laboratorios. Se elaboraron los Procedimientos Normalizados de Operación para la producción de varios bioproductos: Probicid, Gluticid, Nitrofix, Verticid y Nemacid, en la planta piloto.

Se comenzó, en el 2013, la explotación de una planta a escala industrial, con un volumen de fermentación de 6000 litros, única de su tipo en el país. En este propio año y con la re-estructuración del ICIDCA, la Dirección Bioprocesos Cuba 10 se convierte en la Unidad Empresarial de Base Bioprocesos Cuba 10, incorporando a las actividades de la investigación y desarrollo de bioproductos, la producción a gran escala de productos biológicos. A partir de que se cuenta con una planta de producción a nivel industrial de bioproductos se replantea el rediseño del SGC implementado con alcance a la producción de Nitrofix. Para lo cual se lleva a cabo, en una primera etapa, el diagnóstico de la UEB Bioprocesos Cuba 10; desarrollado por Pérez *et al.* (16), que permitió ejecutar la caracterización de la entidad objeto de estudio, el análisis del contexto interno y externo, se identificaron las principales barreras que frenan el SGC en la UEB Bioprocesos Cuba 10 y se estableció la estructura organizativa para gestionar la calidad.

Posteriormente, Pérez *et al.*, (17), llevan a cabo el rediseño del SGC para la producción de Nitrofix, incorporando elementos relacionados con el medio ambiente, seguridad biológica y las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), según las normas NC ISO 9001:2015, NC ISO 14001: 2015 y NC 18001 vigente. Las BPF establecen el conjunto de requisitos y actividades relacionados entre sí, que aseguran que los productos sean consistentemente producidos y controlados, de acuerdo con los estándares de calidad adecuados al uso que se le pretende dar y conforme a las condiciones exigidas para su comercialización (18).

Para la implementación de las BPF se tuvo en cuenta el SGC, implementado en la UEB Cuba 10 y, a partir de ello, se establecieron varias etapas de ejecución:

Etapas 1: Conformación del equipo de trabajo.

Etapas 2: Capacitación y entrenamiento del equipo de trabajo.

Etapas 3: Diagnóstico.

Etapas 4: Rediseño del SGC con alcance a la producción de Nitrofix

Etapas 5: Implementación y monitoreo.

Se señala, además, la creación de un Grupo de Mejora en la UEB Bioprocesos Cuba 10.

• Producción de FitoMas

La producción de FitoMas comenzó en el año 2008. Desde sus inicios se elaboraron los procedimientos de trabajo relacionados con la producción, el control de la calidad y el mantenimiento. A partir del 2015 se comenzó a trabajar en la documentación de acuerdo con los requisitos de la NC 9001:2008 (5) y la adecuación de la documentación existente según los procedimientos generales del SGC implementado en el Instituto. A partir del 2016 se comenzó a trabajar en la implementación según la NC 9001:2015 (8). Entre las acciones realizadas, se capacitó al personal y se actualizó e implementó la documentación requerida. Se actualizaron e implementaron los procedimientos específicos para la producción en planta, para el control de la calidad de las producciones y para el mantenimiento industrial. Además, se elaboraron e implementaron procedimientos, para el envasado del producto, para el uso de equipos, almacenamiento, verificación de materias primas y materiales de

producción, criterios de conformidad de lotes, entre otros, así como los correspondientes registros. En el 2017 se creó el Grupo de Mejora de la UEB Habana.

Revisión de la información documentada del Sistema Integrado de Gestión con alcance a la producción de rones *Premium Vigía*. Elaboración e implantación de la información documentada, respecto al nuevo alcance del Sistema de Gestión

- Se reelaboró la información documentada correspondiente a los procesos que se incluyen en el nuevo alcance, en los procesos estratégicos: Planificación estratégica; Medición análisis y mejora; en los procesos clave: Producción de FitoMas y Bioprocesos Cuba-10- Producción de Nitrofix y en los procesos de apoyo: Gestión del Capital Humano, Gestión Comercial y Negocios, Gestión del Conocimiento, Gestión Administrativa y Gestión Económica, Financiera y Contable. Al documentar cada proceso, se tuvieron en cuenta, las interrelaciones correspondientes con las UEBs productivas, se unificó en un único sistema la información documentada general a nivel ICIDCA, que incluye a la UEB Habana y la UEB Bioprocesos Cuba 10.
- Se realizó el análisis del contexto interno y externo en cada proceso. Definiéndose como estas cuestiones inciden en el sistema de gestión.
- Se determinaron las partes interesadas y sus requisitos. Se ha establecido y se chequea en las revisiones por dirección de cada proceso, el cumplimiento con los requisitos de las partes interesadas así como las partes interesadas cumplen con el sistema de gestión.
- Se identificaron los riesgos y oportunidades por proceso, incluyendo los relacionados con la planificación y sus cambios para definir las acciones para abordarlos, elaborándose un plan de Prevención de Riesgos actualizado e integrado al Control Interno. Se encuentran definidas las oportunidades en relación con el negocio, con sus correspondientes acciones para abordarlas y se evalúa semestralmente la eficacia de las acciones para abordar riesgos y oportunidades. Se elaboró en cada proceso un programa para la mejora que incluye oportunidades a considerar en el Sistema de Gestión y las acciones para abordarlas.
- Se llevó a cabo la revisión y actualización de la información documentada en cada proceso, se adecuaron las fichas de procesos, especificando las entradas y salidas, con indicadores de desempeño que permiten evaluar su eficacia.
- Se actualizó el Manual de calidad – inocuidad, acorde con NC ISO 9001:2015 (8) y NC ISO 22000:2005 (6) para el alcance a las producciones de rones y acorde con NC ISO 9001:2015 (8) para las producciones de FitoMas y Nitrofix.
- Específicamente para las producciones biológicas de Nitrofix, se incorporaron elementos relacionados con el medio ambiente, seguridad biológica y las Buenas Prácticas de Fabricación, según las normas NC ISO 9001:2015, NC ISO 14001:2015 y NC 18001, vigente.
- La aplicación de este sistema de gestión de la Calidad en las producciones de Nitrofix, armonizado con las Buenas Prácticas de Fabricación, ha incidido en el incremento de las producciones biológicas, el incremento de la calidad del producto final con el seguimiento del lote en cada una de sus etapas productivas y la aplicación del proceso de liberación de este para la comercialización.
- Se realizó la transición a NC 9001:2015 (8) y en 2018 se certifica el Sistema Integrado de Gestión (NC ISO 9001:2015) (8) - (NC ISO 22 000:2005) (6), con alcance a la producción de rones Vigía, así como la renovación de la certificación de dichos productos, con la Marca Cubana de Conformidad (NC 113: 2009) (7).

La información documentada del Sistema de Gestión, que incluye en su alcance las producciones de FitoMas, Nitrofix, además de las de Rones Vigía, quedó establecida como se describe:

- Manual de calidad- inocuidad. Se adecuó al nuevo alcance del sistema de gestión.

- Política y objetivos de calidad e inocuidad.
- Procedimientos generales del sistema.
- Fichas de proceso.
- Procedimientos generales del proceso.
- Procedimientos y registros específicos en cada proceso.
- Procedimientos y registros específicos de inocuidad alimentaria, según NC ISO 22 000:05.
- Instrucciones específicas en cada proceso.
- Reglamentaciones internas y externas.

Se elaboraron e implementaron todos los documentos requeridos, contando con la participación activa de los jefes del proceso. La información documentada contribuye a lograr la conformidad con los requisitos del cliente, a la trazabilidad del sistema, a la mejora de la calidad y a evaluar la eficacia del sistema de gestión de la calidad.

• **Realización de auditoría interna al Sistema de Gestión para el nuevo alcance**

Se realizaron las auditorías internas planificadas, según el programa anual de auditorías y el plan para cada auditoría en cuestión. Se evidenció la implementación del nuevo alcance: la producción de FitoMas y de Nitrofix en el Sistema de Gestión de la Calidad y la mejora continua, así como el mantenimiento del Sistema para el alcance producción de Rones Vigía.

• **Revisión por la Dirección del Sistema de Gestión**

El Sistema de Gestión ha sido revisado por la alta dirección, semestralmente, en las revisiones por dirección se han tenido en cuenta los requisitos de entradas y salidas que exige la NC ISO 9001:2015 (8) para las producciones de FitoMas y Nitrofix así como los que exige la NC ISO 22000:2005 (6) para la producción de rones Vigía.

Por otra parte, la metrología es un aspecto importante dentro del sistema implantado, teniendo en cuenta esto, a continuación, se describen las acciones realizadas en el Instituto.

- Se elabora anualmente un plan de aseguramiento metrológico. En éste se incluyen todos los instrumentos del instituto que se encuentran en uso.
- Solicitud de servicios de calibración o verificación, así como reparación de equipos (en diferentes magnitudes de medición: masa, físico-químico, temperatura, dimensionales, presión, volumen, tiempo, validación de gabinetes de seguridad, entre otros). Esto se realiza de forma permanente.
- Se ejecutan sistemáticamente, según el plan establecido, los servicios de calibración o verificación de equipos.
- Levantamiento sobre procedimientos y registros requeridos, relativos al nuevo equipamiento que se reciba, se realiza de forma permanente, siempre y cuando se adquiera un nuevo equipo.

En el Consejo de Calidad se le da seguimiento y se monitorea el Sistema de Gestión implementado para las producciones y se toman las acciones necesarias cuando se requiera para su mejora continua.

Solicitud de la Certificación del nuevo alcance del Sistema de Gestión, a la Oficina Nacional de Normalización (ONN)

Para realizar la solicitud de auditoría de ampliación de alcance del Sistema de Gestión a la ONN, se solicitó previamente al Grupo Azucarero AZCUBA, que revisara y avalara los resultados alcanzados en el sistema de gestión con vistas a solicitar la auditoría de certificación a la ONN, como organismo certificador.

Se procedió a conformar el expediente de Solicitud de la certificación del sistema de gestión para el nuevo alcance, para la ampliación de alcance a las producciones de FitoMas y Nitrofix y, a finales del año 2018, se presentó a la ONN.

Certificación del Sistema de Gestión del ICIDCA, con el nuevo alcance

La ONN llevó a cabo la auditoría de certificación del nuevo alcance, del Sistema de Gestión por la NC ISO 9001:2015 (8) y la supervisión del Sistema con alcance a la Producción de Rones Vigía, y otorgó la ampliación de la Certificación del Sistema de Gestión de la Calidad, junto con la Certificación del Sistema Integrado de Gestión del ICIDCA, de conformidad con las normas NC ISO 9001:2015 Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos y NC ISO 22000: 2005 Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos. Requisitos para cualquier organización de la cadena alimentaria (8, 6) y resuelve que el alcance común de la Certificación del Sistema Integrado comprende los procesos involucrados en la producción de rones de la marca Vigía Gran Añejo y Gran Reserva 18 años, producidos por las Bodegas Vigía, y el alcance de la certificación del Sistema de Gestión de la Calidad comprende los procesos involucrados en la producción de estos rones, producidos por Bodegas Vigía, la producción de FitoMas por la Unidad Empresarial de Base Habana y de Nitrofix por la Unidad Empresarial de Base Bioprocesos Cuba 10, según Resolución 184/2019 (19), otorgándose el certificado correspondiente que se emitió a los 20 días del mes de diciembre de 2019.

CONCLUSIONES

El ICIDCA logró implantar el Sistema de Gestión de la Calidad con alcance a las producciones de FitoMas, producido en la UEB Habana y a la producción de Nitrofix, producido en la UEB Bioprocesos Cuba 10, de conformidad con la NC ISO 9001:2015, y su certificación por la Oficina Nacional de Normalización y mantiene la certificación del Sistema Integrado de Gestión Calidad e Inocuidad Alimentaria (NC ISO 9001:2015- NC ISO 22000:2005), con alcance a los rones *Premium* Vigía y la certificación de dichos productos con la Marca Cubana de Conformidad. Con la aplicación de las BPF y el SGC implementado con alcance a Nitrofix, se obtuvo un mejor seguimiento, en cuanto a la trazabilidad de cada uno de los lotes del proceso de producción; permitiendo el incremento productivo, así como la obtención de productos seguros y confiables para el cliente mediante el cumplimiento de las especificaciones de calidad, que inciden en una mayor satisfacción del cliente.

El éxito de la gestión para implementar el Sistema de Gestión fue involucrar a todo el personal que participó en el cambio organizacional y en los desafíos que la integralidad requiere. Como resultado se incrementan la imagen de la organización y el valor agregado del producto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández I., Hernández R. de la C., Herrera J. M. "Gestión de la Calidad". Monografías. <https://www.monografias.com/trabajos76/gestion-calidad/gestion-calidad3.shtml>. Matanzas 2009. 2019.
2. ISO 9001: 2015. Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos. 2015.
3. Torres Sánchez Leidy Marcela. Transición de la norma ISO 9001-2015 en la organización de las empresas del Sector Público. Universidad Militar Nueva Granada. Facultad Ciencias Económicas. Especialización en Finanzas y Administración Públicas. Cajica. 2017.
4. Ortega, G.; Reyes, A.; Sánchez, A.; Santo Tomás, J.; Blanco, I.; Vega, M.; García, T. El ICIDCA: más de 10 años de experiencias y logros en Gestión de la Calidad. I Memorias I Convención Internacional de Calidad de La Habana 2016. 2016.

5. Oficina Nacional de Normalización. NC ISO 9001: 2008, Sistema de Gestión de la Calidad. Requisitos. Norma Cubana. 2008.
6. Oficina Nacional de Normalización. NC ISO 22000:2005. Sistemas de Gestión de la Inocuidad de los Alimentos. Requisitos para cualquier organización de la cadena alimentaria. 2005.
7. Oficina Nacional de Normalización. NC 113: 2009. Ron Especificaciones. Norma Cubana, 2da Ed. ICS: 13.060.30. 2009.
8. Oficina Nacional de Normalización. NC ISO 9001: 2015. Sistema de Gestión de la Calidad. Requisitos. Norma Cubana, Quinta edición 2015-09-15. 2015.
9. Ortega G, Lorenzo M, Ramos I., Pérez M. Libro Compendio monográfico “La Gestión de la Calidad en el ICIDCA” “Una herramienta para la Excelencia”. ISBN 978-959-7165-61-8. 2019.
10. Ortega, G.; Hernández, A.; Villamil, G.; Fernández, F.; Casanova, E.; Blanco I., *et al.* Estrategia para ampliar el alcance del sistema integrado de gestión del ICIDCA. Memorias Congreso Internacional Diversificación 2013. Editorial ICIDCA, octubre 2013, pág. 1490- 1501. ISBN 978-959-7165-39-2. 2013.
11. Ortega, G.; Vega, M.; García, T.; Hernández, A.; Villamil, G.; Pérez, M.; *et al.* Experiencias en la implementación de un nuevo alcance en el Sistema Integrado de Gestión del ICIDCA. Memorias Diversificación 2015. 2015.
12. Ortega, G; Vega, M; Blanco, I; Reyes, A; Pérez, M; García, T.; *et al.* “Transición a la NC ISO 9001:2015 y recertificación del sistema integrado de gestión del ICIDCA, con alcance a los rones Premium Vigía”. Memorias del Diversificación 2019. 2019.
13. Oficina Nacional de Normalización. NC ISO 14001: 2015. Sistema de Gestión ambiental. Requisitos con orientación para su uso. Norma Cubana, Tercera edición, 2015-09-15. 2015.
14. San Juan, A. N.; Reyes, I.; Hernández, S.; Ortega, G.; Hernández, Y.; Díaz, A. Implantación del sistema de gestión de la calidad para producciones biológicas. Proyecto Código: 276 Institución ejecutora: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Informe ICIDCA II- 4753 .2008.
15. Oficina Nacional de Normalización. NC ISO 9001: 2001. Sistema de Gestión de la Calidad. Requisitos. Norma Cubana. 2001.
16. Pérez, M; San Juan, A N; Rodríguez, J A. Diagnóstico de la situación actual de la UEB Bioprocesos Cuba 10, en relación a la calidad. Memorias del Congreso Diversificación 2015. 2015.
17. Pérez, M; San Juan, A. N; Guevara, Y; Serrano, J. El uso de las Buenas Prácticas de Fabricación en la Unidad Empresarial de Base Bioprocesos Cuba-10. Memorias del Congreso Diversificación 2017. 2017.
18. CEMED. Regulación No. 19-2006: “Requisitos y procedimientos para la liberación de lotes de productos biológicos”, 2006. website: <https://www.cecmed.cu>. CECMED. 2006.
19. Oficina Nacional de Normalización. Resolución 184/2019, ONN. 2019.