



EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO DURANTE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO DE NOPAL FORRAJERO

H. Cabrera ^a, A. Aguilera ^a, E. Orozco ^a, T. Reis ^a, G. Bernal ^a, E. Díaz ^b

^a Maestría en Recursos Bióticos. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. hector.cabrera90@gmail.com, araba@uaq.mx, elba.orozco1@gmail.com, tercia@uaq.mx, dalia@uaq.mx, ^b LMVZ. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. quique.3092@hotmail.com

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el crecimiento y la diversidad de microorganismos presentes en el nopal forrajero fermentado en estado sólido (FES) con o sin levadura y/o urea a diferentes tiempos de fermentación. Los tratamientos de FES de nopal evaluados fueron: 1) 0% levadura y 0% urea; 2) 0.75% levadura y 0% Urea; 3) 0% levadura y 1% urea; y 4) 0.75% levadura y 1% urea. Los tratamientos se realizaron en cubetas con capacidad de 9 kg de nopal picado con tres repeticiones. A las 0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas de fermentación aeróbica se tomaron muestras homogéneas para evaluar el crecimiento y la diversidad de microorganismos en el nopal FES. Las muestras se molieron y se realizó su siembra por extensión de superficie por triplicado en un medio de cultivo selectivo para mohos y levaduras compuesto de dextrosa y papa y se incubaron a 30° Celsius durante 96 horas. De cada tratamiento y hora de la FES se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias y tinción de Gram para observar la morfología de células y la diversidad de microorganismos presente en el nopal fermentado. En los tratamientos 2 y 4, independientemente del tiempo de fermentación, presentaron una dominancia de levaduras; mientras que en el tratamiento 1 y 3 hubo mayor diversidad de microorganismos (cocos, bacilos, levaduras y mohos). El número de colonias fue directamente proporcional al tiempo de fermentación, el tratamiento 4 con levadura y urea presentó el mayor número, seguido del tratamiento 2 con levadura. Caso contrario en el tratamiento 3, donde la urea provocó un decremento en el número de colonias con respecto al tratamiento 1 sin urea. El crecimiento microbiano durante la FES de nopal se vio favorecido con la inclusión de levaduras y urea como fuente de nitrógeno.

1. INTRODUCCIÓN

El contenido de proteína del nopal es bajo, 3.4 - 4% en base seca, por lo que ésta se convierte en la principal limitante para llenar los requisitos de los animales cuando se alimentan con nopal (Aguilera *et al.*, 2001; Flores y Suassuna, 2006), por lo cual es primordial incrementar este nutrimento. Para aumentar el contenido de la proteína en el nopal se pueden utilizar levaduras, hongos y bacterias mediante fermentación aeróbica (Flores y Suassuna, 2006). En la bibliografía se reporta el uso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que permite el incremento de proteína desde un 7.8 a 41.13% en harina de maíz precocida (Gualtieri y Sánchez, 2003).



El objetivo del uso de la levadura es la transformación de materia sólida de forma aerobia sobre un sustrato insoluble sin una fase libre, donde puede existir una variación del nivel de humedad del 30 al 80% del sustrato donde se pretende realizar la inoculación del microorganismo (Subramaniyam, 2012; Raimbault, 1998; Ruíz, 2007; Bhargav, 2007).

En el presente trabajo se evaluó el crecimiento y la diversidad de microorganismos presentes en el nopal forrajero fermentado en estado sólido (FES) con o sin levadura y/o urea a diferentes tiempos de fermentación.

2. TEORÍA

El nopal forrajero es útil no sólo porque sobrevive a las sequías, sino también porque es más eficiente que muchas gramíneas o pastos forrajeros de hoja ancha. La importancia forrajera del nopal *Opuntia spp* aplica para el ganado, pero también ha sido usado como forraje para cerdos. Aún durante los períodos de sequía en el verano o el invierno, el nopal permanece verde, con buen nivel de vitamina A. Sin embargo, debe ser combinado con otros alimentos para complementar la dieta diaria, debido a que tiene bajo contenido de proteína, a pesar de ser rico en carbohidratos y calcio (Díaz *et al.*, 2012).

El término “proteína unicelular”, significa o identifica a alimentos proteicos derivados de microorganismos unicelulares o pluricelulares crecidos por procesos fermentativos en cultivos sumergidos, de diversas fuentes y en desechos orgánicos. También se le conoce como proteína microbiana, biomasa o SCP (*Single cell protein*). Suelen ser producidas por métodos no tradicionales y están asociadas al reciclaje de una gran variedad de desechos biodegradables de bajo valor económico (Gualtieri, 2003).

Se puede mejorar el valor nutritivo del nopal mediante un proceso de fermentación en presencia de algunos microorganismos, los cuales transforman los polisacáridos de las hojas o cladodios del nopal, en moléculas más simples de carbono que, al agregar fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio; urea), pueden transformarlas en proteína. Este proceso ha sido ya ensayado con técnicas de macrofermentación con el fin de emplearlo como forraje (Aranda *et al.*, 2009, Flores y Aranda, 1997). Asimismo, se ha usado del nopal, en su forma natural, como complemento de forrajes ya empleados para alimentar ganado ovino o caprino (Hernández, 2012).

Dentro de los microorganismos que han sido autorizados para su empleo en la alimentación animal podemos distinguir diferentes grupos de bacterias probióticas (*Bacillus cereus*, *Bacillus cereus toyoi*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus facíminis*, *Pediococcus acidilactici*) y entre las levaduras el género más común es el *Saccharomyces*, especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces cerevisiae* variedad Boulardii. Todas estas cepas han demostrado efectos positivos en diferentes especies tales como rumiantes, aves, porcinos, peces y conejos. Las levaduras son microorganismos eucariotas y sus propiedades son completamente diferentes a las de las bacterias. Por ejemplo, las levaduras son resistentes a los antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacteriales. Esta resistencia es genéticamente natural y no es susceptible a ser modificada o transmitida a otros microorganismos. El tamaño de las levaduras varía alrededor de 5 x 10 µm y es también significativamente mayor al de la bacteria (0.5 x 5 µm) (Bazay, 2010).



El uso de *S. cerevisiae* como suplemento en dietas fibrosas produce modificaciones en los patrones de fermentación en el rumen como la mejora en la utilización de la fibra y disponibilidad de los nutrientes, aumento en el número de bacterias celulolíticas y disminución en la concentración de ácido láctico (Rodríguez, 2012).

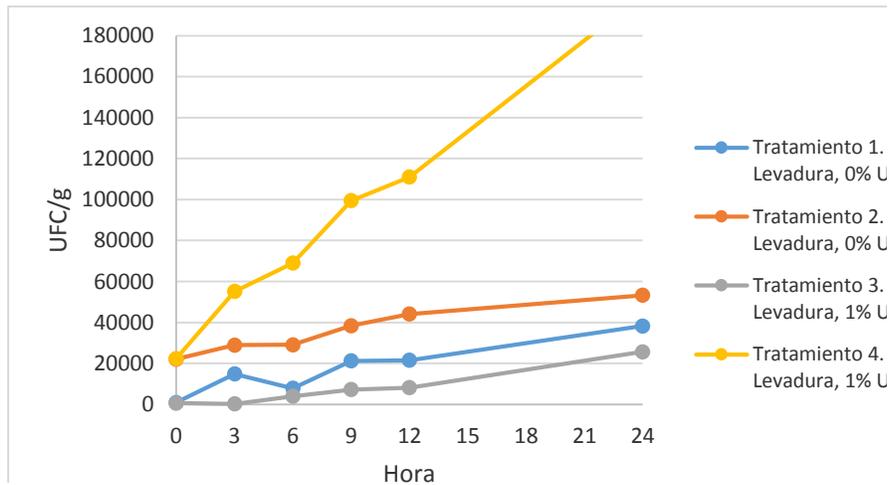
3. PARTE EXPERIMENTAL

Se realizaron cuatro tratamientos en base a muestras húmedas de nopal por triplicado, 1) 0% levadura y 0% urea; 2) 0.75% levadura y 0% Urea; 3) 0% levadura y 1% urea; y 4) 0.75% levadura y 1% urea. Las pencas de nopal se seleccionaron con un peso aproximado de 1.2 - 1.5 kg y de 30 cm de largo por 20 cm de ancho de 1 año de edad, se picaron en una picadora con tamaños de 4 a 10 cm² y se depositaron en botes de plástico de 9 kg de capacidad previamente lavados. Posteriormente se adicionó el inóculo de levadura y/o urea correspondiente a cada tratamiento. Los botes se taparon con gasa y se colocaron en condiciones de temperatura ambiente permaneciendo bajo estas condiciones durante 36 horas. Posteriormente se tomaron muestras a las: 0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 horas de fermentación aeróbica en estado sólido, llevándose inmediatamente a su siembra diluyendo 25 g de muestra en 250 g de agua peptonada, después se homogeneizó en el Stomacher y se sembraron por la técnica de extensión de superficie tomándose 0.1 ml de cada dilución, haciéndose por triplicado en un medio de cultivo selectivo para mohos y levaduras compuesto de dextrosa y papa incubándose a 30° C durante 96 horas. De cada tratamiento y hora de la FES se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) donde se obtuvo un promedio de los triplicados (NOM 092, 1994). Para conocer las UFC de la levadura inóculo se realizaron las diluciones 10³, 10⁶, 10⁷ y 10¹⁰, tomándose 0.1 ml de cada dilución, se incubó a 30° C durante 96 horas, se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (NOM 110, 1994). Con el objetivo de conocer si el crecimiento de microorganismos se debía al inóculo de levadura o a contaminación del ambiente se realizó una tinción de Gram, para observar en el microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión la morfología de células y la diversidad de microorganismos presentes en el nopal fermentado.

4. RESULTADOS

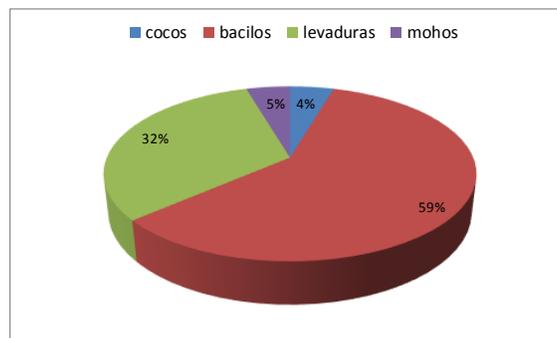
La levadura inóculo empleada en los tratamientos 2 y 4 presentó 34.5 X 10⁶ UFC por gramo.

El crecimiento microbiano representado por las UFC en los diferentes tratamientos, se observó que en el tratamiento 4 donde se adicionó levadura y urea hubo un mayor crecimiento de microorganismos conforme paso el tiempo de fermentación, mientras que en el tratamiento 3 donde solo se adicionó urea fue donde existió un menor crecimiento con respecto al tiempo posiblemente por inhibición por la urea (Gráfica 1). En el tratamiento 4 después de las 12 horas de fermentación no se pudo realizar el conteo debido a su alto número de colonias.

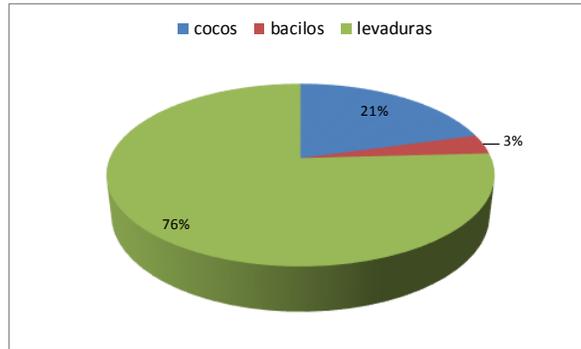


Gráfica 1. Unidades formadoras de colonias en la fermentación del nopal a diferentes horas

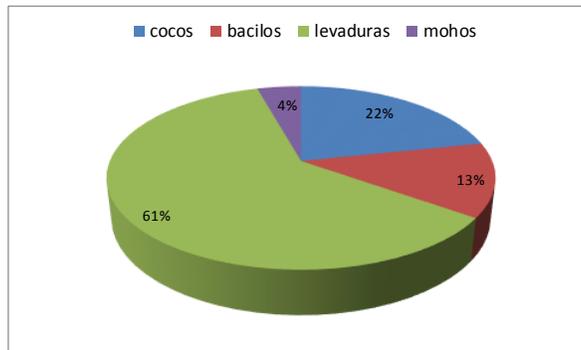
De los resultados de diversidad microbiana con la tinción de Gram, se observó que en el tratamiento 1 predominaron los bacilos seguidos de las levaduras (Gráfica 2). Los tratamientos 2 y 4 (Gráfica 3 y 5) propiciaron las condiciones para que las levaduras fueran el principal microorganismo presente con 76 y 93%, respectivamente, posiblemente la presencia de urea inhibió el crecimiento de cocos. En el tratamiento 3 (Gráfica 4) se distinguió por una mayor diversificación de microorganismos, sin embargo, las levaduras dominaron a los cocos y bacilos.



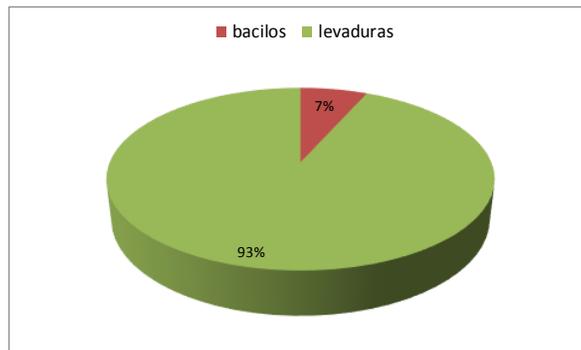
Gráfica 2. Diversidad microbiana del tratamiento 1 (0% levadura y 0% urea)



Gráfica 3. Diversidad microbiana del tratamiento 2 (0.75% levadura y 0% urea)



Gráfica 4. Diversidad microbiana del tratamiento 3 (0% levadura y 1% urea)



Gráfica 5. Diversidad microbiana del tratamiento 4 (0.75% levadura y 1% urea)



4. CONCLUSIONES

El crecimiento microbiano en el nopal fermentado está directamente relacionado con el tiempo de fermentación aeróbica en estado sólido y de la adición de levadura y/o urea. El nopal lleva consigo una diversidad de microorganismos, duplicándose durante la FES. La urea favorece la diversificación de bacilos, cocos y predominantemente de levaduras, pero inhibe su crecimiento. La levadura con o sin urea propicia un ambiente óptimo para el crecimiento dominante de levaduras.

Proyecto financiado por FOFI – UAQ 2013

BIBLIOGRAFÍA

1. S.J.I. Aguilera, L.R.G. Ramírez, L.F. Méndez, "Utilización de nopal como alimento animal. In: Opuntia as Forage". FAO (2001. ed.), pp. 45-52.
2. A.O.A.C. "Official Methods of Analysis". 14th Edition. Association of Official Analytical Chemist, Washington, 1984, DC. pp. 152-157.
3. G. Bazay, "Uso de los probióticos en la alimentación animal con énfasis en *Saccharomyces cerevisiae*", 2010, Revisión bibliográfica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú.
4. S. Bhargav, B. Panda, M. Ali, y S. Javed, "Solid state fermentation: an overview", Chem. Biochem. Engin. Quarterly, Vol. 22, 2008, pp. 49-70.
5. D. Díaz, C. Rodríguez, P. Mancillas, N. Ruíz, S. Mena, F. Salvador, L. Duran, "Fermentación in vitro de nopal forrajero con un inóculo de levadura *Kluyveromyces lactis* obtenida a partir de manzana de desecho". 2012, Revista electrónica de Veterinaria - ISSN 1695-7504, 2012. Málaga España.
6. V.C. Flores, A. Suassuna. "Experiencias en el enriquecimiento proteico del nopal en Brasil y México. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial". 2006, Chapingo, México.
7. M. Gualtieri, C.J.A. Sánchez, "Producción de proteína unicelular de levaduras crecidas en desechos de harina de maíz precocida (*Zea mays*)". Rev. Fac. Farmacia 45, 2003, pp.17-22.
8. O.E. Gutiérrez, A. Elías, H.A. Santos, A. Facundo, T.H. Morales, B.H. Bernal, "Uso del nopal nativo y cultivado en la alimentación de rumiantes". VIII Simposio Taller Nacional y 1er Internacional "Producción y aprovechamiento del nopal", 2008, pp. 66-74.
9. J. Hernández, A. Boyzo, "Alimentos ricos en proteína: sistema nopal – proceso microbiano". Ciencia Innovación y Tecnología para el Desarrollo de México, Vol. 5, 108, pp.1
10. Petróleos Mexicanos, 2014. Obtenido de: <http://www.ref.pemex.com/index.cfm?action=content§ionID=11&catID=222&contentID=1693>. Consultado [01/12/14].
11. M. Raimbault, "General and microbiological aspects of solid substrate fermentation", 1998, Electr. J. Biotech., Vol. 1, 3, 1998, pp.1-15
12. M.C. Rodríguez, "Tecnologías para la suplementación del ganado en épocas críticas", 2012. Obtenido de: http://www.uach.mx/noticias/2012/03/20/expogan_panelistas/
13. Norma Oficial Mexicana 092, bienes y servicios. "Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa". 1994. Obtenido de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>. Consultado [12/04/2015].



14. Norma Oficial Mexicana 110, bienes y servicios. "Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico". 1994. Obtenido de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>. Consultado [12/04/2015].
15. H. Ruíz, R. Rodríguez, R. Rodríguez, J. Contreras, C. Aguilar, "Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido", Rev. Méx. Ing. Quim. Vol. 6, 1, 2007, pp. 33-40.
16. R. Subramaniyam, R. Vimala, "Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study", Internat. J. Sci. Nat. Vol. 3, 2012, pp. 480-486.