

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE
MICROORGANISMOS CAUSANTES DE PROBLEMAS A NIVEL INDUSTRIAL
EN EL VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA.**

LAURA VANESSA VESGA MONTAÑO

**Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Básicas
Departamento de Microbiología
Programa de Microbiología
Pamplona
2016**

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE
MICROORGANISMOS CAUSANTES DE PROBLEMAS A NIVEL INDUSTRIAL
EN EL VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA.**

LAURA VANESSA VESGA MONTAÑO

**Trabajo de grado para optar al título de
Microbióloga**

Tutor:

**Ángela Maritza Cajiao Pedraza
Docente Departamento de Microbiología**

**Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Básicas
Departamento de Microbiología
Programa de Microbiología
Pamplona**

2016

Nota de Aceptación

Firma 1º jurado

Firma 2º jurado

Pamplona, Diciembre de 2016.

*A mis padres,
mis pilares.*

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a mis padres, por su amor y confianza, mi mejor título es ser su hija.

A los docentes del Departamento de Microbiología de la Universidad de Pamplona por propiciar las bases para ver realizada esta meta.

A la docente Ángela Cajiao por aceptar ser mi directora y guiarme durante la elaboración del trabajo.

A la empresa Chemical Coaching SAS, en especial al Ingeniero Rafael Rodríguez por brindarme la oportunidad de realizar la pasantía en sus instalaciones, y por sus enseñanzas de “*coaching* para la vida”; al Químico Luis Fernando Castrillón y a la Microbióloga Johana Orozco por su asesoramiento en el desarrollo de la pasantía.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	- 1 -
1. OBJETIVOS	3
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. MARCO REFERENCIAL	5
3.1 BASES LEGALES	5
3.2 SISTEMA TEÓRICO	6
3.2.1 Sustancias inhibidoras de crecimiento	6
3.2.2 Producción de azúcar	7
3.2.3 Producción de bioetanol	12
3.2.4 Torres de enfriamiento	14
3.3 ANTECEDENTES	15
3.3.1 Antecedentes de la empresa	15
3.3.2 Antecedentes de estudio	15
4. METODOLOGÍA	18
4.1 METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE MOLIENDA DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN INGENIOS.	19
4.1.1 Población y muestra	19
4.1.2 Agentes antimicrobianos	19
4.1.3 Diseño experimental	19
4.2 METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOL CARBURANTE EN DESTILERÍAS.	20
4. 2.1 Población y muestra.	20
4.2.2 Agentes antimicrobianos	20
4.2.3 Diseño experimental	21

4.2.4 Conservación de cepas	23
4.3 METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN TORRES DE ENFRIAMIENTO.	24
4.3.1 Población y muestra	24
4.3.2 Agentes antimicrobianos	25
4.3.3 Diseño experimental	25
5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	26
6. RESULTADOS	27
6.1 EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LOS BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE MOLIENDA DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN INGENIOS	27
6.1.1 Muestra de báscula	27
6.1.2 Muestra de molinos 1 y 2	28
6.1.3 Muestra de filtración	28
6.2 EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOL CARBURANTE EN DESTILERÍAS.	29
6.2.1 Ingenio 2	29
6.2.2 Ingenio 3	33
6.2.3 Ingenio 4	34
6.2.4 Ingenio 5	36
6.2.5 Conservación de cepas y pruebas de viabilidad	38
6.3 EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN TORRES DE ENFRIAMIENTO	39
6.3.1 Torre de enfriamiento 1	39
6.3.2 Torre de enfriamiento 2	43
6.3.3 Torre de enfriamiento 3	44
6.3.4 Torre de enfriamiento 4	45
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	47

7.1 EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE MOLIENDA DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN INGENIOS.	47
7.2 EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOL CARBURANTE EN DESTILERÍAS.	48
7.3. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN TORRES DE ENFRIAMIENTO	49
8. CONCLUSIONES	51
9. BIBLIOGRAFÍA	52
10. ANEXOS	57
10.1 ANEXO 1. Concentraciones empleadas para la evaluación de la efectividad de los biocidas.	57
10.2 ANEXO 2. Resultados de la determinación de la efectividad de los biocidas.	62
10. 3 ANEXO 3. Imágenes tomadas durante el procesamiento de las muestras.	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismo de acción de los biocidas empleados.....	8
Tabla 2. Codificación de los biocidas empleados.....	18
Tabla 3. Descripción micro- y macroscópica de los morfotipos aislados del I2.	32
Tabla 4. Tamaño en milímetros (mm) de los halos de inhibición de biocidas frente a morfotipos aislados del I2.	33
Tabla 5. Concentraciones mínimas inhibitorias en ppm de biocidas frente a seis cepas de Bacterias Ácido Lácticas del I4.....	36
Tabla 6. Porcentajes de viabilidad de cepas conservadas con dos soluciones crioprotectoras.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Proceso de producción de azúcar.....	10
Figura 2. Proceso de producción de bioetanol.....	13
Figura 3. Comportamiento de Aerobios Mesófilos presentes en la muestra de jugo claro tomada en la etapa de preparación frente a cuatro biocidas a tres concentraciones.....	27
Figura 4. Comportamiento de AM presentes en la muestra de jugo claro tomada en los molinos 1 y 2 frente a cuatro biocidas a tres concentraciones.	28
Figura 5. Comportamiento de AM presentes en la muestra de jugo claro tomada en la etapa de filtración frente a cuatro biocidas a tres concentraciones.....	29
Figura 6. Ensayo 1 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 2 frente a diferentes biocidas.....	30
Figura 7. Ensayo 2 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 2 frente a diferentes biocidas.....	30
Figura 8. Ensayo 3 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 2 frente a diferentes biocidas.....	31
Figura 9. Comportamiento de BAL y concentración de ácido láctico en el ensayo 1 realizado al ingenio 3.....	34
Figura 10. Comportamiento de BAL y concentración de ácido láctico en el ensayo 2 realizado a la destilería del ingenio 3.....	34

Figura 11. Comportamiento de BAL y concentración de ácido láctico en el ensayo realizado a la destilería del ingenio 4.....	35
Figura 12. Ensayo 1 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 5 frente a diferentes biocidas.....	37
Figura 13. Ensayo 2 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 5 frente a diferentes biocidas.....	37
Figura 14. Ensayo 2 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 5 frente a diferentes biocidas.....	38
Figura 15. Ensayo 1 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).	40
Figura 16. Ensayo 2 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).	41
Figura 17. Ensayo 3 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).	41
Figura 18. Ensayo 4 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).	42
Figura 19. Ensayo 5 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).	42
Figura 20. Ensayo 6 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).	43
Figura 21. Efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 2 (TE2).....	44

Figura 22. Efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 3 (TE3).....45

Figura 23. Efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 4 (TE4).....46

ANEXOS

ANEXO 1. Concentraciones empleadas para la evaluación de la efectividad de los biocidas.

Tabla 1. Concentraciones empleadas para la evaluación de la efectividad de biocidas en el proceso de molienda de la caña de azúcar del I1.....	57
Tabla 2. Concentraciones empleados para la evaluación de la efectividad de biocidas sobre BAL presentes en las destilerías de los ingenios 2, 3 4 y 5.	58
Tabla 3. Concentraciones empleados para la evaluación de la efectividad de biocidas sobre AM en las torres de enfriamiento 1, 2, 3, 4.	60

ANEXO 2. Resultados de la determinación de la efectividad de los biocidas

Tabla 4. Carga microbiana encontrada en I1.....	62
Tabla 5. Concentración de BAL y ácido láctico, y porcentaje de viabilidad de levaduras en I2.	63
Tabla 6. Concentraciones de BAL y ácido láctico encontrados en el I3.	64
Tabla 7. Concentraciones de BAL y ácido láctico encontrado en el I4.	64
Tabla 8. Concentración de BAL y ácido láctico, y porcentaje de viabilidad de levaduras encontrados en I5.....	65
Tabla 9. Concentración de AM encontrada en TE1.....	66
Tabla 10. Concentración de AM encontrada en TE2.....	67
Tabla 11. Concentración de AM encontrada en TE3.....	67
Tabla 12. Concentración de AM encontrada en TE4.....	68

ANEXO 3. Imágenes tomadas durante el procesamiento de las muestras.

Figura 1. Sistema de fermentación.	69
Figura 2. Dilución para medición de concentración de ácido láctico.	69
Figura 3. Medición de ácido láctico con Reflectómetro Reflectoquant RQflex plus 10.	70
Figura 4. Dilución de muestra de mosto con adición de azul de metileno para recuento de levaduras.	70
Figura 5. Recuento de levaduras al microscopio, las células teñidas son contadas como muertas. Microscopio óptico 40x.	71
Figura 6. Cultivo de BAL provenientes de mosto, en cajas con agar MRS que contenía 5 % (v/v) de azul de anilina preparada al 0.1 % (p/v), y 5 % (v/v) de cicloheximida preparada al 1 % (p/v).	72
Figura 7. Cultivo de microorganismos AM provenientes de agua de una torre de enfriamiento en placas de recuento para bacterias aerobias Petrifilm.	72

INTRODUCCIÓN

En la microbiología industrial, los microorganismos son utilizados comercialmente con el fin de obtener productos de importancia económica, ambiental y social. Sin embargo, en las industrias existen microorganismos causantes de problemas que pueden originar serias pérdidas económicas debido a la alteración tanto de procesos como de productos (Tortora *et al.*, 2007).

Un ejemplo de esto ocurre durante el proceso de producción del azúcar en los ingenios, donde la pérdida de sacarosa en la caña de azúcar debido a la acción de microorganismos presentes desde el momento de la cosecha de la materia prima hasta la evaporación de los jugos extraídos de la misma conlleva a la disminución de la productividad de hasta un 1.5 % (Eggleston 2002). Durante el proceso de molienda de la caña de azúcar, la limpieza y desinfección de los molinos juega un papel crucial al momento de disminuir y/o evitar las pérdidas de sacarosa, pues las superficies de los molinos, además de los fangos que se acumulan en ellos, constituyen una fuente de microorganismos, principalmente ***Leuconostoc sp***, ***Lactobacillus sp***, ***Saccharomyces sp***, y ***Rhodotorula sp***, quienes además de realizar la inversión de la sacarosa en fructosa y glucosa, utilizan estos subproductos en la formación de dextranas, ácidos orgánicos y etanol que conllevan a pérdidas en otras etapas del proceso (Eggleston 2002; Solomon 2009; Osbel 2014).

Junto a las pérdidas de sacarosa, un problema asociado a los ingenios es la disminución de la producción de etanol carburante en las destilerías. Los jugos que llegan a los tanques de fermentación, constituyen una fuente de azúcares que en teoría deben ser fermentados por la levadura ***Saccharomyces cerevisiae*** adicionada al proceso. Sin embargo, si no existe un tratamiento adecuado, junto a los jugos pueden llegar microorganismos que afectan la productividad de dos formas: compitiendo con la levadura por los nutrientes presentes y/o la producción de ácidos láctico y acético por bacterias ácido lácticas y ácido acéticas, respectivamente, que inhiben el crecimiento de la levadura. Además de ser útil en la etapa fermentativa, dicha levadura es importante en la industria alimenticia, pues ha mostrado efectos probióticos y prebióticos en la alimentación de aves y cerdos, por lo que algunos ingenios están enfocados la búsqueda de alternativas para su recuperación (Bayrock *et al.*, 2004; Lucena *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2013).

Un tercer problema reside en las torres de refrigeración empleadas para el enfriamiento de grandes masas de agua en procesos que requieren la disipación de calor. El agua empleada en estos sistemas, puede contener microorganismos de interés económico y social. Primero, la formación de biofilms en las tuberías por parte tanto de bacterias como de algas y cianobacterias, disminuye la capacidad de

intercambio de calor de los procesos, además de causar corrosión en las mismas (Mouchtouri 2010; Rahmani *et al.*, 2015; Hauer *et al.*, 2016). En segundo lugar, la presencia de ***Legionella pneumophila*** en los sistemas supone un riesgo para la salud de los operarios al ser asociada a “brotes de neumonía relacionados con sistemas hídricos artificiales deficientemente mantenidos” (OMS, 2016).

Los problemas descritos anteriormente pueden ser resueltos mediante el empleo de sustancias activas que destruyan, contrarresten, neutralicen, impidan la acción o ejerzan un efecto control sobre los microorganismos problema (Michalak *et al.*, 2014). Por tal razón, el principal objetivo de este trabajo es evaluar la efectividad de biocidas producidos en la empresa Chemical Coaching frente a los microorganismos causantes de dichas problemáticas realizando pruebas de sensibilidad en el laboratorio de microbiología de la empresa en el Valle del Cauca, Colombia. Para ello se trabajó con muestras de jugo claro de un ingenio para la primera problemática descrita; de mosto de destilerías de cuatro ingenios para la segunda; y de agua de cuatro torres de enfriamiento para la tercera.

El presente trabajo busca proponer una alternativa de solución a la contaminación de los procesos mencionados, lo cual permitirá optimizar el uso de biocidas producidos en la empresa Chemical Coaching.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad de biocidas en la reducción del rango de acción de microorganismos causantes de problemas a nivel industrial en el Valle del Cauca, Colombia mediante pruebas de sensibilidad microbiana.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar mediante *Time Kill Test* un biocida de efecto inmediato como alternativa a problemáticas de contaminación presentados durante la molienda de la caña de azúcar.
- Establecer por medio de sistemas de fermentación a escala de laboratorio un biocida efectivo en el control de bacterias presentes en el proceso de producción de etanol carburante.
- Encontrar un biocida específico ante Aerobios Mesófilas que sirva de alternativa en la reducción de la carga microbiana presente en torres de enfriamiento por medio de *Time Kill Test*.

2. JUSTIFICACIÓN

La acción de agentes biocidas en las industrias con el fin de disminuir o eliminar microorganismos contaminantes de los procesos se ve afectada por factores como la concentración, el periodo de contacto, el pH, temperatura, la presencia de compuestos que interfieren, y la naturaleza, número, localización y condición del microorganismo al que ataca. Debido a esto, su uso inadecuado trae como consecuencia la malinterpretación de la efectividad de los mismos, y aún más importante, la generación de resistencia microbiana.

Durante los procesos de producción de azúcar y bioetanol en los ingenios, y de limpieza de las torres de enfriamiento, suelen emplearse agentes biocidas para mitigar los problemas causados por la presencia de microorganismos alterantes. Sin embargo, su uso no está sujeto a estudios previos de especificidad y dosificación, lo cual disminuye su efectividad. Por esta razón, la empresa Chemical Coaching busca proponer una alternativa que permita optimizar el uso de biocidas que produce y/o distribuye. Entorno a ello se requiere evaluar individualmente la efectividad de dichos productos frente a las problemáticas específicas de las industrias mediante pruebas de sensibilidad microbiana. Se espera que los resultados obtenidos sean de gran utilidad, permitiendo la reducción de impactos en la economía de las empresas por pérdidas de producción; en el ambiente al minimizar los residuos vertidos y en el ámbito social, al mitigar la generación de resistencia a los antimicrobianos, que además de aumentar la problemática en las industrias, es una amenaza cada vez mayor para la salud pública a nivel global.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 BASES LEGALES

Debido a que algunos biocidas además de ejercer efecto tóxico frente a microorganismos, pueden ser considerados un peligro potencial para la salud humana (al actuar como sustancias tóxicas, carcinogénicas o interruptores endocrinos) y para el ambiente al no ser fácilmente biodegradables, existen normativas que regulan la producción, comercialización y uso de estos productos:

- Regulación de la Unión Europea (EU) No. 528/2012, “Reglamento sobre productos biocidas”, regula la comercialización y el uso de biocidas que se utilizan para proteger a las personas y a los animales así como materiales o artículos contra organismos nocivos, como plagas o bacterias, gracias a la acción de las sustancias activas que contienen dichos biocidas. Esta regulación incluye una lista de las sustancias activas permitidas en la formulación de biocidas.
- Norma Técnica Colombia (NTC) 5131 de 2011 “ETIQUETAS AMBIENTALES TIPO I. SELLO AMBIENTAL COLOMBIANO. CRITERIOS PARA PRODUCTOS LIMPIADORES INSTITUCIONALES, INDUSTRIALES Y PARA USO DOMÉSTICO”, la cual tiene por objeto “especificar los criterios ambientales que deben cumplir los productos de limpieza institucional, industrial y de uso doméstico, en cualquier presentación (barra, polvo, líquido, entre otros) para obtener el Sello Ambiental Colombiano”

A efectos de probar la eficacia de los biocidas, en Colombia existe la siguiente norma técnica:

- Norma Técnica Colombiana (NTC) 5150 de 2003 “ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES QUÍMICOS. ACTIVIDAD BACTERICIDA BÁSICA. MÉTODO DE PRUEBA Y REQUISITOS (FASE 1)” tiene por objeto “especificar un método de prueba (Fase 1) y los requisitos mínimos para verificar la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos que forman una preparación homogénea físicamente estable en agua. Esta norma es aplicable a los productos utilizados en la agricultura (pero no para la protección de cultivos), en el servicio doméstico, en higiene alimenticia y otros campos industriales, y para aplicaciones institucionales, médicas y veterinarias.”

3.2 SISTEMA TEÓRICO

3.2.1 Sustancias inhibidoras de crecimiento

3.2.1.1 Biocidas sintéticos

Los biocidas son productos que contienen una o más sustancias activas destinadas a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un efecto de control sobre organismos perjudiciales tanto para la salud humana y animal, como para la industria. Entre las áreas de aplicación de estos productos se encuentran la higiene y salud humana y veterinaria, potabilización de agua, seguridad alimentaria, preservación de materiales como maderas, cuero y plástico, el control de plagas (fungicidas, rodenticidas, molusquicidas, piscicidas, insecticidas, acaricidas y alguicidas), la conservación de alimentos o materias primas, el embalsamamiento y la taxidermia (Michalak *et al.*, 2014).

3.2.1.1.1 Mecanismo de acción de los biocidas sintéticos

De modo general, los biocidas ejercen su acción a través de la interrupción de procesos metabólicos o de interacciones físicas o reacciones químicas con diferentes sitios diana en las células, como son los componentes celulares de la membrana externa, la membrana citoplasmática y los constituyentes citoplasmáticos. Los biocidas pueden funcionar como agentes electrofílicos, los cuales reaccionan con enzimas importantes para el crecimiento y metabolismo, este grupo incluye los electrófilos (aldehídos, carbamatos, cobre, plata y mercurio) y los oxidantes (Cloro, bromo, ozono y peróxidos). Otros biocidas funcionan como agentes activos de membrana, los cuales como su nombre lo indica, afectan directamente a las membranas celulares, incluyen los líticos (cuaternarios, fenoles y alcoholes) y los protonóforos (ácidos débiles, parabenos y piritonas) (Ortega *et al.*, 2013; Michalak *et al.*, 2014).

3.2.1.2 Antibióticos

Los antibióticos son compuestos producidos por organismos vivos destinados a combatir bacterias, hongos o protozoos. Los organismos incluyen bacterias, hongos, plantas y animales, siendo las actinobacterias, en especial especies de ***Streptomyces*** los mayores productores. A nivel industrial, se obtienen mediante procesos biotecnológicos a partir de la fuente, y pueden ser modificados químicamente o no para aumentar su eficacia; también pueden ser obtenidos mediante síntesis química imitando la estructura del compuesto de origen natural. Los antibacterianos pueden actuar como bactericidas al destruir la población presente, o como bacteriostáticos, al detener su crecimiento. Además, pueden ser empleados contra un amplio rango de patógenos (de amplio espectro), o contra un

grupo de cepas seleccionadas (de espectro reducido) (Albert 1950; Vardanyan *et al.*, 2016).

3.2.1.2.1 Mecanismo de acción de los antibióticos

A diferencia de los biocidas sintéticos, los antibióticos ejercen su acción sobre una región de ataque dentro de la célula a la vez. Los mecanismos de actuación incluyen la inhibición de la síntesis de pared celular (antibióticos beta-lactámicos, vancomicina, cicloserina); disrupción de las membranas celulares (polimixina y anfotericina B); inhibición de la síntesis de proteínas (aminoglucósidos, eritromicina, cloranfenicol y tetraciclinas) y la actuación sobre los ácidos nucleicos al inhibir su síntesis o su función (sulfonamidas, trimetropima, metronidazol) (FAO 2004; Vardanyan *et al.*, 2016).

3.2.1.3 Biocidas empleados

En el presente trabajo el término “biocida” es empleado indistintamente entre biocidas sintéticos y antibióticos. Así pues, el mecanismo de acción de los biocidas empleados se encuentra resumido en la tabla 1.

3.2.2 Producción de azúcar

3.2.2.1 Caña de azúcar

La caña de azúcar, *Saccharum spp.*, es una planta que pertenece a la familia Poaceae y clase Monocotiledóneas. El tallo de la planta está compuesto por agua en porcentajes entre un 73 y 76 %; sólidos solubles (sacarosa, azúcares reductores, vitaminas –tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico-, minerales –potasio, calcio, hierro- y ácidos -aconítico, málico y cítrico-) entre un 10 a 16 % y sólidos no solubles (fibra) entre un 11 y 16 %. Debido a que de su interior se extraen los jugos de sacarosa empleados como materia prima en la manufactura de azúcar, etanol y bebidas espirituosas, constituye la parte de la planta con mayor interés para la agroindustria (Amaya 1995; Santos *et al.*, 2015).

3.2.2.2 Sacarosa

La sacarosa (alfa-D-Glucopiranosil – (1 → 2) – beta-D-Fructofuranosa), o azúcar de mesa, es el azúcar extraído de la caña de azúcar o de la remolacha. Su estructura química es el resultado de la unión entre los carbonos anoméricos de una molécula de glucosa y una de fructosa mediante un enlace O- glucosídico, por lo que es considerado como un azúcar no reductor. Su síntesis es realizada naturalmente durante la fotosíntesis de las plantas, y es el edulcorante más empleado para endulzar los alimentos (Horton *et al.*, 2012).

Tabla 1. Mecanismo de acción de los biocidas empleados.

CÓDIGO	AGENTE ACTIVO	MECANISMO DE ACCIÓN	EFECTO
B00	Biguanida	Agente activo de membrana, catiónico. Desplazamiento de cationes de membrana.	Afecta procesos de osmorregulación y de transporte de solutos en la membrana. Lisis celular.
B01	1. Glutaraldehído 2. Amonio cuaternario	1. Agente electrofílico-electrófilo. Interacción con proteínas. 2. Agente activo de membrana, catiónico	1. Inhibición de crecimiento y/o enzimas del metabolismo celular. 2. Solubilización de membranas. Lisis celular.
B03	Clorhexidina	Agente activo de membrana, catiónico. Desplazamiento de cationes de membrana.	Afecta procesos de osmorregulación y de transporte de solutos en la membrana. Coagulación del citoplasma. Lisis celular.
B05	Producto enzimático	Enzima	Desconocida.
B06	Peróxido de hidrógeno concentrado	Agente electrofílico-oxidante. Oxidación de grupos químicos susceptibles. Interacción con ribosomas.	Inhibición de crecimiento y/o enzimas del metabolismo celular. Interrupción de la síntesis proteica.
B08	1. Peróxido de hidrogeno 2. Nanopartículas de plata	1. B06 2. Agente electrofílico-electrófilo. Interacción con membrana.	2. Inhibición de fuerza protón motriz, afecta permeabilidad de membrana, lisis celular.
B10	1. Cloruro de metil isotiazolina 2. Bronopol	1, 2. Agentes electrofílicos-electrófilos. Interacción con grupos tiol de proteínas y con enzimas de la respiración celular.	1, 2. Interrupción del transporte de electrones. Inhibición de enzimas del metabolismo y crecimiento. Producción de radicales intracelulares.
B12	Clorito de sodio	Agente electrofílico-oxidante. Inactivación de proteínas enzimáticas.	Inhibición de enzimas del metabolismo y/o crecimiento celular.
B14	Ácido peracético	Agente activo de membrana- protonóforo. Interacción con membrana celular.	Modificación del gradiente de concentración de la membrana celular.
B22	Benzoato de sodio	Agente electrofílico-oxidante. Inhibición de enzimas del metabolismo.	Inhibición del metabolismo del ácido acético y la fosforilación oxidativa.
B30	Carbamato	Agente electrofílico-electrófilo. Interacción con grupos tiol de proteínas.	Inhibición de enzimas del metabolismo y/o crecimiento celular.
B33	1. Clorhexidina 2. Monensina.	1. B03	2. Interrupción del intercambio iónico y modificación del

		2. Ionóforo. Unión a membrana.	gradiente de concentración de la membrana celular.
B50	Peróxido de hidrógeno	B06	-
B59	Dióxido de cloro	Agente electrofílico-oxidante. Oxidación de grupos químicos susceptibles de proteínas, enzimas.	Inhibición de crecimiento y/o enzimas del metabolismo celular.
B80	1. Penicilina 2. Virginiamicina 3. Estreptomina 4. Monensina	1. Beta lactámico, Unión a enzima transpeptidasa. 2. Estreptogramina. Inhibición de peptidil transferasa en subunidad 50s. 3. Monobactámico. Unión a unidad ribosomal 30 S. 4. B33	1. Bloqueo de síntesis de peptidoglicano. Muerte celular por lisis. 2. Inhibición de síntesis de proteínas. 3. Inhibición de síntesis de proteínas.
B81	Penicilina	B80	-
B90	Penicilina Virginiamicina Estreptomina	B80	-
B92	1. Formol 2. Amonio cuaternario 3. Glutaraldehído	1. Agente electrofílico-electrófilo. Alquilación de proteínas y ácidos nucleicos. 2, 3. B06	1. Inhibición de crecimiento celular.
B97	Monensina.	B33	-

Fuente: Autor.

(Albert 1950; Pinos *et al.*, 2000; FAO 2004; Sanchez, *et al.*, 2005; Ludensky 2005; Gilbert *et al.*, 2005; Finnegan *et al.*, 2010; Vardanyan *et al.*, 2016; Ortega *et al.*, 2013; Michalak *et al.*, 2014).

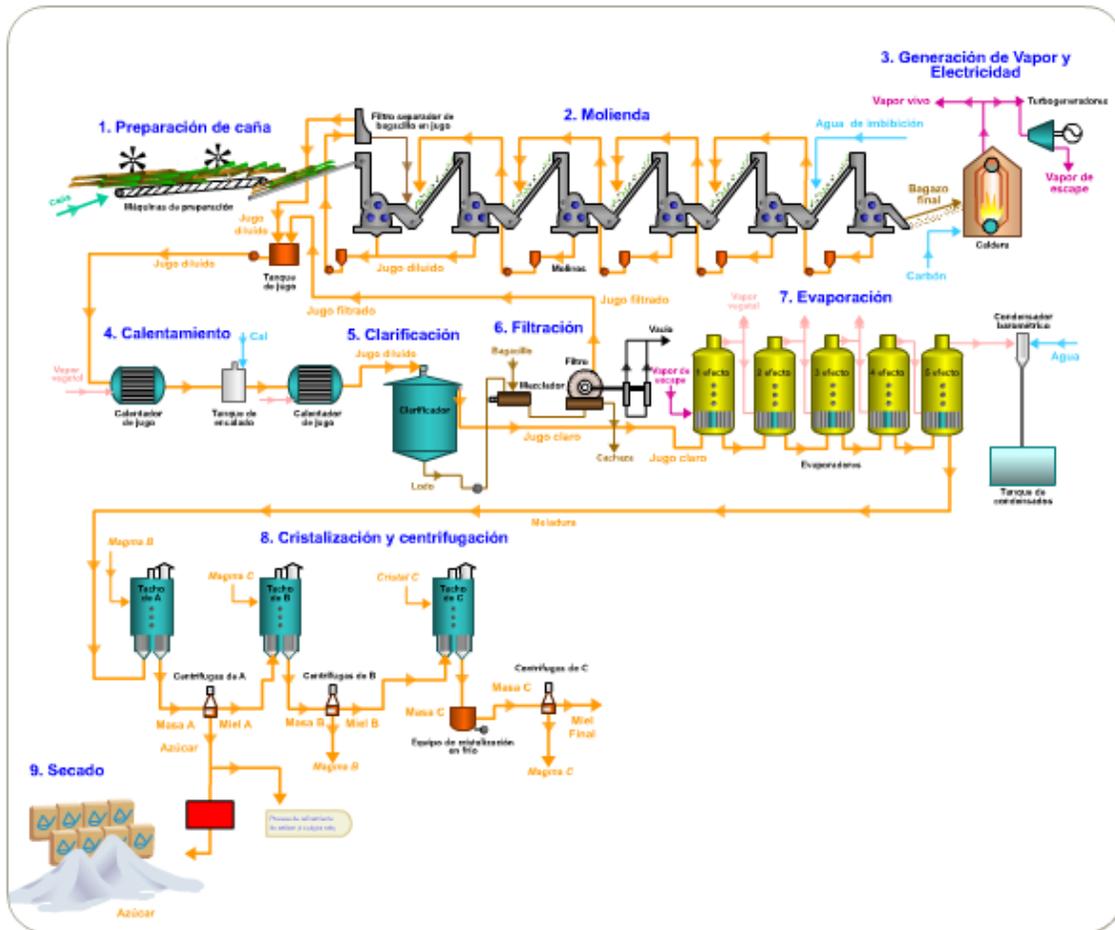
3.2.2.3 Azúcar en Colombia

El sector azucarero en Colombia está conformado por 15 ingenios distribuidos a lo largo del valle geográfico del río Cauca, que compone 48 municipios de los departamentos de Caldas, Risaralda, Quindío, Valle del Cauca y Cauca. La agroindustria del azúcar y la caña es un subsector generador de riquezas para el país. En el año 2014, el país ocupó el puesto 12 entre los mayores productores a nivel mundial. En el 2015 en Colombia el área de caña de azúcar sembrada fue de 323.070 hectáreas y se produjo un total de 2.3 millones de toneladas de azúcar; de estas, 725 millones toneladas fueron exportadas, posicionando al sector azucarero como el cuarto mayor exportador de productos derivados de la agroindustria Colombiana, luego del café, las flores y el banano (ASOCAÑA 2016; ASOCANA 2016a).

3.2.2.4 Proceso de producción del azúcar

El proceso de producción del azúcar inicia en el campo con el cultivo de la caña de azúcar. Al llegar el tiempo de madurez del tallo, entre 12 y 13 meses, la caña de azúcar es cosechada y llevada a los ingenios donde por medio de siete etapas, es convertida en azúcar, como se muestra en la figura 1 (CENICAÑA, 2004).

Figura 1 Proceso de producción de azúcar.



Fuente: CENICAÑA 2004

3.2.2.4.1 Preparación: Al llegar a los ingenios, los tallos son pesados en básculas, las cuales son lavados con agua de 43 a 48 ° C para garantizar un proceso más limpio. Luego, estos tallos son desfibrados por medio de máquinas para la posterior extracción de sus jugos.

3.2.2.4.2 Molienda: Los tallos procesados pasan por una serie de molinos de rodillo para la extracción de los jugos presentes. El primer molino emplea como materia

prima directamente los tallos de la caña, mientras que los demás de la serie utilizan el bagazo resultante de los anteriores. De los molinos 1 y 2 se obtiene el “jugo diluido” que es recolectado y luego filtrado (separándolo del bagacillo). El bagazo resultante de la última molienda es empleado para la generación de vapor y electricidad en la planta, y/o en la industria de papel.

3.2.2.4.3 Calentamiento: El jugo diluido pasa por una serie de tres calentadores que elevan la temperatura hasta aproximadamente 105 °C, temperatura de ebullición del jugo. Luego del primer calentador, el jugo es sometido a un proceso de encalado con el fin evitar la pérdida de sacarosa por inversión ácida y de eliminar impurezas.

3.2.2.4.4 Clarificación: Consiste en pasar el jugo diluido por un clarificador con el fin de separar mediante sedimentación los sólidos insolubles presentes como lodos. Se obtiene el “jugo claro”, caracterizado por su bajo nivel de turbidez.

3.2.2.4.5 Filtración: Dado que el lodo extraído del proceso anterior contiene aun sacarosa, este es mezclado con el bagacillo resultante durante la molienda. Esta mezcla es luego filtrada al vacío, donde se obtiene “jugo filtrado” con sacarosa, además de residuos de “cachaza”.

3.2.2.4.6 Evaporación: El jugo claro, es pasado por una serie de cinco evaporadores con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua posible de los jugos, obteniendo como resultado la “meladura”.

3.2.2.4.7 Cristalización y centrifugación: La meladura obtenida es pasada a una serie de tres tachos y tres centrifugas. Existen tres subproductos por cada pareja “tacho-centrífuga”: las masas (A, B y C), que consisten en una mezcla de cristales de sacarosa y miel; las mieles (A, B y Final) que son líquidos con sacarosa no cristalizada y los magmas (B y C), los cuales son cristales de sacarosa empleados como “semillas” para acelerar el proceso de cristalización. La miel final es la materia prima empleada en los procesos de producción de alcohol de los ingenios (CENICAÑA, 2004).

3.2.2.5 Pérdidas de sacarosa

A lo largo del proceso de producción se registran pérdidas en el porcentaje de sacarosa debido al deterioro de la caña de azúcar, lo cual tiene un impacto negativo en la producción y economía de los ingenios. La degradación de la sacarosa está dada por tres mecanismos principalmente: inversión ácida, donde el pH bajo permite la hidrólisis a glucosa y fructosa; inversión enzimática, donde la enzima invertasa presente “naturalmente” hidroliza la molécula; y acción microbiana, donde los microorganismos utilizan la sacarosa como materia prima en la generación de subproductos. Este último mecanismo representa el 93 % del total, por lo cual la

contaminación microbiana es el principal problema de la industria azucarera (Eggleston 2002).

La microbiota presente en la caña de azúcar está compuesta en un mayor porcentaje de bacterias, seguido de hongos y levaduras. Luego del corte de la caña, predominan las bacterias ***Leuconostoc spp***, ***Xanthomonas spp*** y ***Aerobacter spp***, y las levaduras ***Saccharomyces spp***, ***Torula spp*** y ***Pichia spp*** a lo largo del proceso, especialmente durante la molienda, es importante llevar a cabo un control sobre la población de ***L. mesenteroides*** y ***Saccharomyces spp***, pues estos utilizan la sacarosa presente como materia prima en la formación de dextranas, ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono, representando pérdidas mayores al 1.5 % del disacárido (Solomon 2009; Osbel 2014).

3.2.3 Producción de bioetanol

3.2.3.1 Bioetanol

El bioetanol es un alcohol producto de la fermentación de materias primas ricas en carbohidratos como el maíz, la caña de azúcar, la remolacha, entre otros. El bioetanol, también conocido como etanol carburante o etanol anhidro es empleado como biocombustible o como aditivo de combustibles fósiles con el fin de mitigar problemas de disponibilidad, ambientales y de octanaje de estos últimos. El etanol anhidro posee un octanaje de 108 a 150, lo que permite mejorar la calidad de los combustibles fósiles, reemplazando al tetraetilo de plomo y el metil tert-butil éter (MTBE) anteriormente usados; además está libre de azufre, hidrocarburos aromáticos y parafinas, y su elevado contenido de oxígeno ayudar a reducir la emisión de sustancias tóxicas como CO₂ hasta un 80 % respecto al uso del petróleo, por lo que es reconocido como “combustible limpio” (Gracia 2004; Gray *et al.*, 2006; Joao 2015).

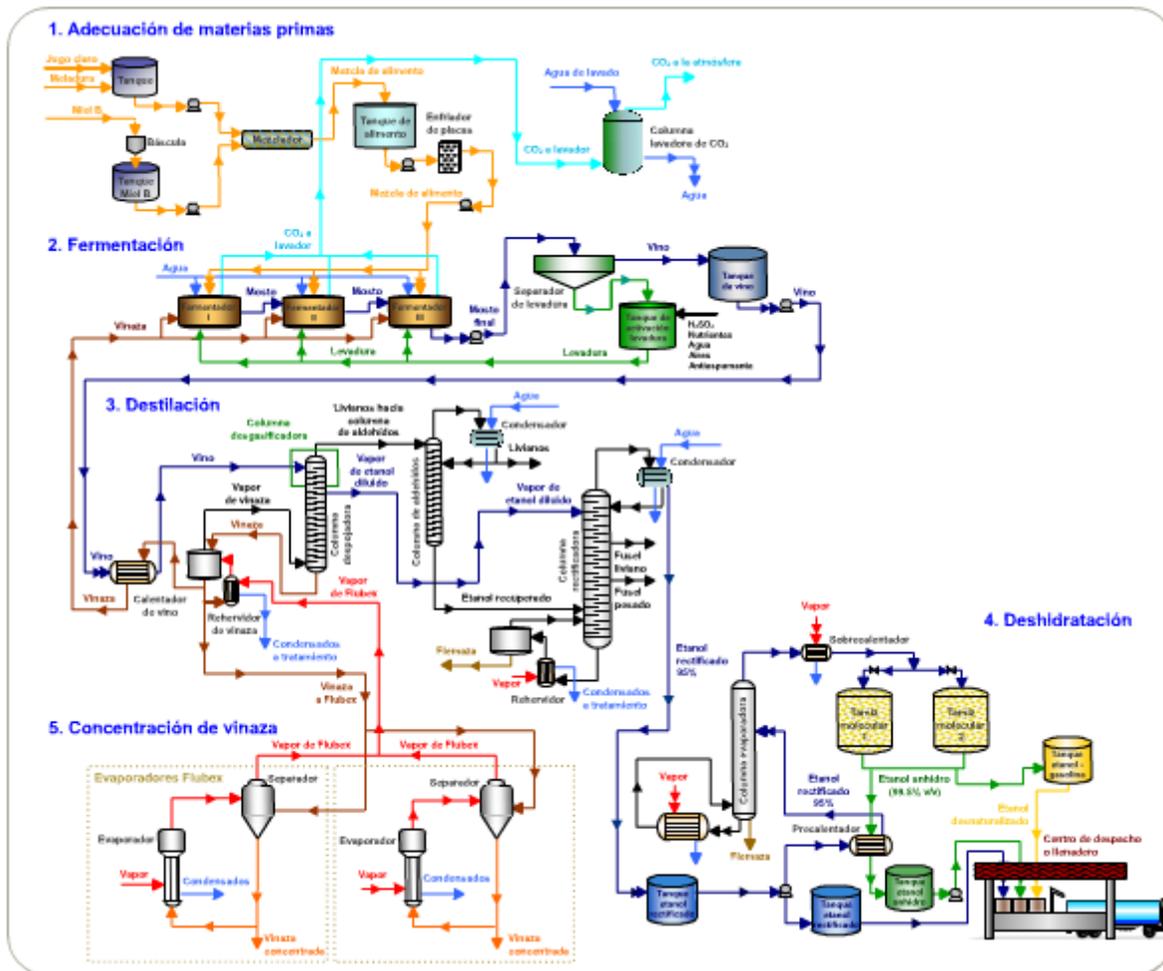
3.2.3.2 Bioetanol carburante en Colombia

Colombia cuenta actualmente con 6 destilerías de alcohol carburante pertenecientes a 6 de los 15 ingenios ubicados en el valle geográfico del río Cauca. En el año 2014 Colombia ocupó el octavo puesto entre los principales productores mundiales de etanol como combustible, sin embargo, en el 2015 registró el mayor valor de producción con 456.403.000 litros. Según un estudio realizado, el bioetanol colombiano es el más efectivo contra las emisiones de gases de efecto invernadero, pues las reduce en un 74 % respecto a la gasolina fósil, ubicándolo por encima de Brasil (65 %), la Unión Europea (53 %) y Estados Unidos (10 %) (ASOCAÑA 2016; ASOCANA 2016a).

3.2.3.3 Proceso de producción

El proceso de producción de etanol carburante a partir de residuos generados durante la producción de azúcar en los ingenios se lleva a cabo en cinco etapas como se muestra en la figura 2.

Figura 2. Proceso de producción de bioetanol



Fuente: CENICAÑA, 2008.

3.2.3.3.1 Adecuación de las materias primas: la miel B, meladura y jugo claro provenientes del proceso de producción de azúcar son adicionados en un mezclador, obteniendo el mix de alimento empleada como materia prima para la fermentación a una temperatura entre 29 °C y 32 °C.

3.2.3.3.2 Fermentación: la mezcla de alimento es llevada a los reactores, donde la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fermenta los azúcares de la mezcla de alimento mediante la ruta de la glucólisis. De este proceso se obtiene CO₂ además de mosto, una mezcla de etanol, agua y levadura que luego es pasada por un separador para obtener el vino.

3.2.3.3.3 Destilación: el vino obtenido atraviesa una serie de tres columnas de destilación, las cuales separan el etanol del agua de acuerdo a las diferencias del punto de ebullición hasta obtener etanol rectificado (95 % v/v) en la última columna.

3.2.3.3.4 Deshidratación: mediante un proceso de evaporación, el etanol rectificado es convertido en vapor de etanol, el cual posteriormente atraviesa unos tamices moleculares que retienen las moléculas de agua presentes, dejando pasar solo al etanol anhidro a una concentración > 99.5 % v/v.

3.2.3.3.5 Despacho: Al final del proceso se obtienen y distribuyen tres tipos de etanol: etanol rectificado, etanol anhidro y gasohol, que consiste en una mezcla de etanol anhidro y gasolina en proporción 10:90, empleado como biocombustible (E10) (CENICANA 2008).

3.2.3.4 Pérdidas en la productividad de bioetanol.

Durante la etapa fermentativa llevada a cabo en los reactores, coexisten microorganismos con *Saccharomyces cerevisiae* que traen como consecuencias disminución en la producción de alcohol, bien sea por competencia por los nutrientes presentes en el sistema o por la producción de metabolitos a concentraciones que inhiben la levadura (Bayrock *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2013).

Las condiciones de bajo pH, altas temperaturas y concentración de etanol desarrolladas durante el proceso, convierten en propicio el ambiente para el desarrollo de bacterias ácido lácticas (BAL), un grupo de bacterias Gram positivas caracterizado por la producción de ácido láctico a partir de la fermentación homo o heterofermentativa de hexosas. Estas bacterias se encuentran en el sistema a concentraciones entre 6.0×10^5 y 8.9×10^8 UFC/ml, siendo predominante el género *Lactobacillus spp*, y son causantes de pérdidas en la producción de etanol en las destilerías durante el proceso de fermentación (Lucena *et al.*, 2010).

3.2.4 Torres de enfriamiento

Las torres de enfriamiento son sistemas empleados para remover exceso de calor de corrientes de agua provenientes de procesos industriales. Dicha remoción se lleva a cabo mediante dos mecanismos de intercambio de calor entre el agua y el aire del sistema, la evaporación y la convección. Estos sistemas son alimentados

con aguas provenientes de ríos o de aguas subterráneas, las cuales son previamente tratadas con el fin de mitigar problemas de corrosión, incrustaciones y bioincrustaciones en las tuberías, causantes de pérdidas económicas para las industrias (Bott 1998; Martori 2005).

3.2.4.1 Contaminación microbiana en torres de enfriamiento

Las torres de enfriamiento son altamente susceptibles a la contaminación microbiana debido a factores como el material de construcción, la exposición constante a luz solar, calidad del agua empleada y la temperatura y pH del sistema. En estos lugares predominan las cianobacterias y algas como ***Cladophora spp*** y ***Ulothrix spp*** debido a su metabolismo fotoautótrofo, seguido por bacterias mesófilas, entre las cuales se destaca ***Legionella pneumophila*** debido a su importancia en temas de salud pública al ser el agente causal de la Legionelosis (Mouchtouri 2010; Hauer *et al.*, 2016).

A nivel industrial, estos microorganismos generan preocupación debido a su capacidad para formar biofilms sobre las estructuras, los cuales son difíciles de erradicar y traen como consecuencia al sistema menor capacidad de intercambio de calor, corrosión, disminución de la eficiencia energética, obstrucción local y mayor número de paros de mantenimiento (Rahmani *et al.*, 2015).

3.3 ANTECEDENTES

3.3.1 Antecedentes de la empresa

La empresa Chemical Coaching SAS, es una empresa colombiana del sector químico dedicada a la solución de problemas industriales asociados al uso de agua en la industria en general, y en los procesos de producción de azúcar, alcohol, petróleo, gas, aceite de palma africana y biodiesel, bien sea mediante la venta de productos químicos o asesorías químicas. El Laboratorio de Microbiología, nace con la finalidad de brindar respaldo a la acción de los biocidas distribuidos por la empresa, demostrando dicha efectividad a escala de laboratorio previo a su comercialización (ChemiCoaching , 2016).

3.3.2 Antecedentes de estudio

3.3.2.1 Producción de azúcar

La tesis “Empleo de bactericidas para controlar la inversión de la sacarosa en el jugo de caña” realizada en Perú en el año 2002, planteó como objetivo emplear biocidas para el control de la inversión de sacarosa en el jugo de caña en la Empresa Andahuasi S.A.C. Para esto, evaluó el rendimiento de sacarosa en los jugos extraídos de la molienda de la caña de azúcar luego de aplicar los biocidas

comerciales Bussan 881 y CMA a concentraciones de 10, 15 y 20 ppm sobre los molinos donde se llevaba a cabo el proceso. Los resultados obtenidos fueron: (i) los dos biocidas actuaron mejor a concentración de 20 ppm; y (ii) el biocida Bussan 881 tuvo mayor efecto sobre el rendimiento de la sacarosa respecto al CMA, con pérdidas de 1.673 kg de azúcar/ tn de caña versus 2.15 kg de azúcar/ tn y 3.19 kg de azúcar/ tn obtenidas con CMA y control respectivamente (Sanchez, 2013).

En India, se llevó a cabo el trabajo “*Use of Glutaraldehyde and Benzalkonium Chloride for Minimizing Post-Harvest Physio-Chemical and Microbial Changes Responsible for Sucrose Losses in Sugar Cane*” publicado en el año 2008. Entre sus objetivos, incluyeron evaluar la eficacia del glutaraldehído y el cloruro de benzalconio sobre la microbiota causante de pérdidas de sacarosa, para esto, llevaron a cabo ensayos con 4 tratamientos sobre tallos de caña de azúcar recién cortadas: (i) control, sin aplicación de sustancias biocidas; (ii) rociado de agua; (iii) rociado de una solución de glutaraldehído (1000 ppm, p/v); y (iv) rociado con una solución de glutaraldehído más cloruro de benzalconio (1000 + 250 ppm (p/v), respectivamente). Como resultado, se obtuvo con el tratamiento iv, una reducción en el conteo de bacterias totales, hongos, **Leuconostoc** y levaduras de 67.92 %, 51.3 %, 26.08 % y 51.2 %, respectivamente (Singh *et al.*, 2008).

3.3.2.2 Producción de bioetanol

En el trabajo “*Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process*” publicado en el 2010, centraron como objetivo analizar la abundancia y diversidad de BAL en el procesamiento de bioetanol en cuatro destilerías de Brasil. Para esto mensualmente (por 180 días) fueron recogidas muestras de mosto a partir de los tanques de fermentación de las destilerías, estas fueron diluidas en solución salina estéril hasta 10^4 y sembradas en superficie en agar MRS suplementado con cicloheximida al 0.1 %, la incubación se llevó a cabo en jarras de anaerobiosis por 4 días a 37 °C. Como resultados obtuvieron que la concentración de BAL en los tanques de fermentación varía entre 6.0×10^5 y 8.9×10^8 UFC/ml. El género **Lactobacillus** fue el más frecuentemente encontrado, predominando las especies **L. fermentum** y **L. vini** luego de 60 días (Lucena *et al.*, 2010).

En el 2013, el trabajo “*Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides*” buscó determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los biocidas triclosan, clorhexidina, cloruro de benzalconio e hipoclorito de sodio frente a una colección de 135 cepas **S. thermophilus**, 44 cepas de **S. salivarius**, 42 cepas de **L. garvieae** y 245 cepas pertenecientes al género **Lactobacillus**. El método empleado fue de microdilución en caldo con seis concentraciones diferentes para cada biocida y la medición de la CMI se realizó por espectrofotometría a una $D.O_{600\text{ nm}}$; obteniendo como resultado CMI de 0.06 a 4 $\mu\text{g/ml}$ para el Cloruro de

benzalconio; 1 a 256 µg/ml para el triclosan; 0.125 a 16 µg/ml para la clorhexidina y 0.256 a 4.096 µg/ml para el Hipoclorito de sodio. En general, las especies que presentaron menor susceptibilidad a los cuatro biocidas fueron *L. plantarum* y *L. paracasei* (Arioli *et al.*, 2013).

3.3.2.3 Torres de enfriamiento

En el trabajo “*Effect of oxidizing and non-oxidizing biocides on biofilm at different substrate level in the model recirculating cooling water system*” publicado en el 2011, plantearon entre sus objetivos evaluar la efectividad de los biocidas dióxido de cloro (ClO₂) y cloruro de amonio dodecil dimetil bencil (BDMDAC) sobre biofilms formados sobre superficies de acero inoxidable que simulaban las tuberías de torres de enfriamiento. Para esto realizaron mediciones de tasa de desprendimiento del biofilm y del efecto antimicrobiano por medición de la actividad deshidrogenasa (DHA) de los biocidas a cuatro concentraciones diferentes. El ClO₂ resultó ser el más efectivo pues a una concentración de 8 ppm a las 6 horas obtuvo un porcentaje de remoción de 40.8 % del biofilm; la DHA disminuyó a los 30 minutos con una concentración de 2 µg/L y la concentración mínima inhibitorio (CMI) fue de 6 ppm. Mientras que para el BDMDAC el biofilm la concentración necesaria para una tasa de remoción del 54 % fue de 400 ppm; con la dosis de 200 ppm estudiada no hubo inhibición total de la actividad DHA luego de los 360 minutos del estudio y la CMI fue de 400 ppm (Liu *et al.*, 2011).

En el trabajo publicado en 2016 “*Main photoautotrophic components of biofilms in natural draft cooling towers*” se recopiló información de las comunidades fototróficas encontradas en las torres de enfriamiento en República Checa; para esto realizaron análisis microscópico a muestras de diferentes partes de 18 torres, encontrando que en la parte inferior de las torres predominaban algas filamentosas, principalmente *Cladophora glomerata*; en la porción central biomasa de algas plantónicas, y la parte superior estuvo compuesta por biofilms principalmente de cianobacterias con heteroquistes de los géneros *Gleocapsa* y *Scytonema*. En general, los fotótrofos mayormente encontrados fueron el alga *Ulothrix*, y las cianobacterias *Leptolygbya* y *Phormidiu*. Además, se observó que la intensidad de crecimiento dependía de la intensidad de luz en el lugar (Hauer *et al.*, 2016).

4. METODOLOGÍA

Dado que se evaluó la efectividad de biocidas sobre microorganismos causantes de tres tipos de problema en industrias de los sectores alimenticio y químico, ubicadas en el Valle del Cauca- Colombia, la metodología se divide en tres partes:

1. Metodología para la evaluación de la efectividad de biocidas sobre microorganismos presentes en el proceso de molienda de la caña de azúcar en Ingenios.
2. Metodología para la evaluación de la efectividad de biocidas sobre microorganismos presentes en el proceso de producción de alcohol carburante en destilerías.
3. Metodología para la evaluación de la efectividad de biocidas sobre microorganismos presentes en torres de enfriamiento.

Las metodologías realizadas son el resultado de una adaptación entre procesos llevados a cabo por la empresa anteriormente teniendo en cuenta metodologías realizadas por sus clientes, además han sido soportadas con publicaciones científicas realizadas en otros países.

Los agentes antimicrobianos empleados en el presente estudio fueron suministrados por la empresa Chemical Coaching SAS. Es de resaltar que por practicidad, en el presente estudio serán denominados indistintamente los biocidas y los antibióticos (o mezclas de estos) como “biocidas”. La tabla 1 informa la codificación y los agentes activos presentes en cada uno de los biocidas empleados.

Tabla 2. Codificación de los biocidas empleados.

CÓDIGO	AGENTE ACTIVO
B00	Biguanida
B01	Glutaraldehído + amonio cuaternario
B03	Clorhexidina
B05	Producto enzimático
B06	Peróxido de hidrógeno concentrado
B08	Peróxido de hidrogeno + nanopartículas de plata
B10	Cloruro de metil isotiazolina + bronopol
B12	Clorito de sodio
B14	Ácido peracético

B22	Benzoato de sodio
B30	Carbamato
B33	Clorhexidina + monensina
B50	Peróxido de hidrógeno
B59	Dióxido de cloro
B80	Penicilina + virginiamicina + estreptomina + monensina
B81	Penicilina
B90	Penicilina + virginiamicina + estreptomina
B92	Formol + amonio cuaternario + glutaraldehído
B97	Monensina

Fuente: Autor

4.1 METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE MOLIENDA DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN INGENIOS.

4.1.1 Población y muestra

Fueron evaluadas muestras de jugo claro de tres etapas del proceso de la molienda de caña de azúcar (Báscula (BA), Molinos 1 y 2 (MO) y Filtración (FI)) de un ingenio (I1) ubicado en el Valle del Cauca, Colombia. Las muestras fueron tomadas en recipientes estériles y transportadas en neveras de icopor con termo gel (ThermoSafe, IE), hasta el laboratorio de Microbiología de la empresa Chemical Coaching SAS ubicada en Yumbo- Colombia, donde se procedió a realizar pruebas con biocidas a diferentes concentraciones (10, 25 y 50 ppm) con el fin de identificar el producto con efecto *killer* inmediato.

4.1.2 Agentes antimicrobianos

Se emplearon soluciones stock a 500 ppm de los biocidas B00, B01, B14 y B30.

4.1.3 Diseño experimental

4.1.3.1 Time Kill Test

En frascos schott con capacidad para 250 ml, se enfrentó la muestra de jugo claro de cada una de las etapas del proceso de molienda de la caña de azúcar seleccionadas versus los biocidas a concentraciones de 10, 25 y 50 ppm, escogidas de acuerdo al histórico de la empresa ChemiCoaching. La tabla 1 en el anexo 1, muestra los volúmenes y las concentraciones empleadas durante cada ensayo. Adicionalmente, por cada muestra se dejó un frasco con igual volumen como control, para un total de 39 ensayos. Los frascos fueron dejados a temperatura ambiente y la evaluación de la efectividad se realizó en tres tiempos: antes,

inmediatamente después y luego de 20 minutos del enfrentamiento con el biocida, designados como t0, t1 y t2, respectivamente (Milintawisamai *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2016).

4.1.3.2 Determinación de la población

4.1.3.2.1 Recuento de bacterias aerobias y bacterias ácido lácticas.

La efectividad de los biocidas fue evaluada al medir la concentración de bacterias aerobias y bacterias ácido lácticas (BAL) presentes contaminantes del proceso a los tiempos 0, 1 y 2. Para esto, a dichos tiempos se realizaron diluciones en agua destilada estéril hasta 10^{-5} . La concentración de aerobios totales se determinó sembrando 1 ml de las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} en placas de recuento para bacterias aerobias (Petrifilm, 3M, US) y para la determinación de BAL se sembró en profundidad la dilución 10^{-4} , empleando como medio de cultivo agar MRS (MERCK, DE) que contenía 5 % (v/v) de azul de anilina (Sigma Aldrich, US) preparada al 0.1 % (p/v), y 5 % (v/v) de cicloheximida (PanReacAppliChem, US) preparada al 1 % (p/v). Las siembras fueron incubadas a 32 °C (Mermert, DE) por 48 y 72 horas, para aerobios totales y BAL, respectivamente (Milintawisamai *et al.*, 2009).

4.2 METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOL CARBURANTE EN DESTILERÍAS.

4.2.1 Población y muestra.

Las muestras de mosto fueron tomadas a partir del último fermentador del proceso de producción de alcohol carburante en las plantas de destilería de cuatro ingenios ubicados en el Valle del Cauca, Colombia, designados en el presente trabajo como Ingenio 2 (I2), Ingenio 3 (I3), Ingenio 4 (I4) e Ingenio 5 (I5). Los recipientes empleados para la toma de muestras fueron previamente esterilizados. Las muestras fueron transportadas en neveras de icopor con hielo gel (ThermoSafe, IE) hasta el laboratorio de Microbiología de la empresa Chemical Coaching SAS donde fueron procesadas.

4.2.2 Agentes antimicrobianos

Se emplearon soluciones stock a 1000 ppm de los biocidas B03, B05, B12, B22, B33, B59, B80, B81, B90 Y B97.

4.2.3 Diseño experimental

4.2.3.1 Sistema de fermentación

En frascos schott con capacidad de 250 ml se llevó a cabo el enfrentamiento de las muestras de mosto de los últimos fermentadores en las plantas de destilería de los ingenios 2, 3, 4 y 5 versus los biocidas a concentraciones establecidas según el histórico de la empresa Chemical Coaching SAS, obteniendo un volumen final de 150 ml. La tabla 2 en el anexo 1 muestra las concentraciones evaluadas para cada ingenio. Adicionalmente, por cada ensayo se dejó un frasco con igual volumen como control. Los frascos fueron incubados en un *shaker* incubador (DiEs, CO) a una temperatura de 35 °C a 120 rpm durante 6 horas para I2 e I4 y 24 horas para I3, e I5. La evaluación de la efectividad de los biocidas se realizó a tres tiempos: antes, 4 y 6 horas después de la adición del biocida para los ingenios 2 y 4, los cuales tienen implementado un sistema de fermentación tipo *bach*; para I3 e I5, los tiempos fueron antes, 6 y 24 horas después de la adición del biocida, ya que estos trabajan con sistemas de fermentación continua (Leite *et al.*, 2013).

4.2.3.2 Determinación cuantitativa de ácido láctico

La concentración de ácido láctico presente al inicio y al final del proceso fue medida por el método reflectométrico con tiras de ensayo, empleando para esto un Reflectometro Reflectoquant RQflex plus 10 (MERK, DE). Tiras de ensayo Reflectoquant Test Ácido Láctico (MERCK, DE) fueron sumergidas en una solución de muestra diluida 1/100, seguidamente se retiró el exceso de líquido y se insertaron en el reflectómetro, registrando el valor obtenido en mg/ L (Merck Millipore 2013).

4.2.3.3 Determinación de la población

4.2.3.3.1 Recuento de levaduras

La concentración de levaduras presentes se determinó al inicio y al final del ensayo. Para esto, se realizó una dilución de 1 ml de la muestra en 100 ml de agua destilada con la adición de azul de metileno (MERCK, DE) preparado al 1 % (p/v) para distinguir células vivas y muertas al microscopio. Una gota de la dilución fue vertida en un cuadrante de la Cámara de Neubauer (BOECO, DE) y se procedió con el conteo de 5 cuadrantes medianos (extremos y centro) en microscopio óptico de campo claro (ZEISS, DE) bajo el objetivo 40 x (Ortiz J. 2015b).

4.2.3.3.1.1 Cálculo de población celular y viabilidad

A partir del recuento obtenido del total de levaduras, se determinó la población mediante la fórmula x y el porcentaje de viabilidad empleando la fórmula 1.

Fórmula 1. Determinación de la población de levaduras.

$$\text{Población levaduras} = \frac{\text{células contadas}}{\text{Superf. contada (mm}^2\text{)} \times \text{Prof. cámara (mm)} \times \text{dilución}}$$

(Ortiz J. 2015b)

Fórmula 2. Determinación del porcentaje de viabilidad de levaduras.

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{células totales} - \text{células muertas}}{\text{células totales}} \times 100$$

4.2.3.3.2 Recuento de bacterias ácido lácticas (BAL)

La concentración de BAL se determinó a las 0, 4 y 6 horas para el control y las 4 y 6 horas para las muestras con biocida en los ingenios I2 e I4; y 0, 6 y 24 horas para el control y 6 y 24 horas para I3 e I5. Para esto se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los ensayos en agua peptonada tamponada estéril (MERCK, DE) preparada al 0.1 %. Posteriormente se realizaron siembras en profundidad de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} en cajas de Petri con agar MRS (MERCK, DE) que contenía 5 % (v/v) de azul de anilina (Sigma Aldrich, US) preparada al 0.1 % (p/v), y 5 % (v/v) de cicloheximida (PanReacAppliChem, US) preparada al 1 % (p/v) para recuento de BAL. Las cajas fueron incubadas a 35 °C durante 72 horas. Pasado este tiempo, se procedió al conteo de las colonias, expresadas en UFC/ml, y los diferentes morfotipos obtenidos fueron aislados en agar MRS (MERCK, DE) (Leite *et al.*, 2013).

4.2.3.4 Antibiograma por difusión con discos

Se realizaron antibiogramas por difusión con discos a las colonias aisladas del ingenio 2. Para esto, se inocularon 4 colonias jóvenes de cada morfotipo en 5 ml de caldo MRS (MERCK, DE), y se incubó “overnight” a 30 °C. Con la ayuda de un espectrofotómetro UV/VIS DR2800 (HACH, US) se midió la absorbancia del cultivo hasta alcanzar una D.O._{600 nm} aproximada de 0.132 equivalente a una concentración bacteriana de 1.5×10^8 UFC/ml (Ortiz J. 2015a). Con la ayuda de un hisopo estéril, se realizó una siembra masiva del caldo cultivado en cajas con agar MRS (MERCK, DE) que contenía 5 % (v/v) de azul de anilina (Sigma Aldrich, US) preparada al 0.1 % (p/v), y 5 % (v/v) de cicloheximida (PanReacAppliChem, US) preparada al 1 % (p/v). Cinco minutos después, discos estériles preparados en el laboratorio fueron impregnados con soluciones de los biocidas B12 a 250 ppm, B22 150 ppm, B80 a 5 y 8 ppm y B97 a 5, 10, 15 y 30 ppm y luego se ubicaron sobre las cajas previamente sembradas, cuidando que la distancia entre ellos fuera de aproximadamente 2 cm. Las cajas fueron incubadas en una incubadora (Memmert, DE) a 35 °C y se realizó la medición de los halos obtenidos a las 16 horas (Bernal *et al.*, 1984).

4.2.3.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

4.2.3.5.1 Microorganismos

Se emplearon las cepas *Lactobacillus farranginis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici* y *Weissella confusa*, designadas en el presente trabajo como LFA, LFE, LD, LM, PA Y WC respectivamente; estas cepas fueron proporcionadas por el ingenio I4 del cual fueron aislados. Las cepas fueron mantenidas en crioviales con caldo MRS (MERCK, DE) + glicerol comercial al 50 % a -18 °C. Para su empleo se activaron primero a temperatura ambiente (20 °C) por 30 minutos y luego a 35 °C en una incubadora (Memmert, DE) por 15 minutos. Los crioviales fueron agitados en un vortex y 200 µL se sembraron en superficie de cajas con agar MRS (MERCK, DE). Las cajas fueron incubadas a 35 °C por 48 horas. Luego se preparó una solución stock de cada cepa diluyendo el crecimiento obtenido en las cajas con solución salina estéril al 0.85 %, la concentración de microorganismos fue medida en un espectrofotómetro UV/VIS DR2800 (HACH, US) hasta obtener una DO_{600nm} aproximada de 1.3.

4.2.3.5.2 Agentes antimicrobianos

Se emplearon soluciones stock a 100 ppm de los biocidas B05, B80 y B97.

4.2.3.5.3 Dilución en caldo

La metodología realizada corresponde a la llevada a cabo por el ingenio 3 en la evaluación de biocidas. A partir de las soluciones stock, se prepararon soluciones de cada biocida a concentraciones de 32, 16, 8, 4, 2 y 1 ppm en tubos de ensayo con caldo MRS (MERCK, DE) en un volumen final de 2 ml. A cada uno de estos tubos fueron añadidos 100 µL de la solución stock de cada una de las cepas con DO_{600nm} 1.3. Adicionalmente, se trabajó un tubo que contenía la cepa y el medio sin adición de biocida como control positivo (C+) y un tubo con antibiótico y el medio como control del antibiótico (CA). Se procedió a incubar a 35 °C, transcurridas 48 horas se realizó la observación de la CMI en el tubo que anterior al último que presentaba turbidez.

4.2.4 Conservación de cepas

4.2.4.1 Cepas conservadas

Se conservaron las cuatro cepas de BAL según sus características morfológicas, aisladas en la empresa a partir del I2, designadas como M1, M2, M3 y M4; y las cepas LFA, LFE, LD, LM, PA Y WC del I4. Cada microorganismo fue sembrado por duplicado en cajas con agar MRS (MERCK, DE) de forma masiva, e incubados a 35 °C por 48 horas.

4.2.4.2 Solución crioprotectora

Se probaron dos soluciones crioprotectoras a fin de escoger la más efectiva. La primera, designada como A, contenía caldo MRS (MERCK, DE) + glicerol al 20 %; en la segunda (B), la concentración de glicerol y caldo MRS fue de 50 % cada uno.

4.2.4.3 Conservación por congelación

Transcurridas 48 horas de crecimiento, por cepas fueron añadidos 5 ml de las soluciones crioprotectoras A o B a las cajas, diluyéndolas con un asa de hockey. Con una micropipeta p1000 fue trasferido el volumen total de la caja a un tubo de ensayo estéril, el cual fue agitado con un vórtex por 15 segundos. Luego, las soluciones fueron distribuidas en tubos Eppendorf de 1.5 ml, obteniendo 4 tubos por cada ensayo rotulados como LFA-A, LFA-B, LFE-A, LFE-B, LD-A, LD-B, LM-A, LM-B, PA-A, PA-B, WC-A, WC-B, M1-A, M1-B, M2-A, M2-B, M3-A, M3-B, M4-A Y M4-B dependiendo de la solución crioprotectora empleada, obteniendo un total de 80 tubos Eppendorf. Los tubos fueron almacenados en nevera a -18 °C (Ortiz, 2015).

4.2.4.4 Evaluación de la viabilidad

Las cepas conservadas fueron evaluadas para determinar (i) la viabilidad de las mismas y (ii) la concentración más efectiva de la solución crioprotectora. Para esto, los días 1, 7 y 15 fueron sacados de la nevera un tubo de cada uno de los ensayos, se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos y luego a 35 °C por 15 minutos. Se realizaron diluciones en agua destilada estéril hasta 10^{-7} los días 1 y 7 y hasta 10^{-5} el día 15, sembrando en superficie de cajas con agar MRS (MERCK, DE) las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} el día 1; 10^{-5} y 10^{-7} el día 7; 10^{-3} y 10^{-5} el día 15 (Ortiz, 2015).

4.3 METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN TORRES DE ENFRIAMIENTO.

4.3.1 Población y muestra

Se evaluaron torres de enfriamiento de tres industrias de los sectores azucarero y petroquímico, dos de ellas ubicadas en el departamento del Valle del Cauca y una en el departamento de Antioquia. En una de las industrias ubicadas en el departamento del Valle del Cauca, fueron evaluadas dos de las torres presentes, para un total de 4 torres de enfriamiento, designadas como TE1, TE2, TE3 y TE4. Las muestras fueron tomadas en recipientes estériles y transportados al laboratorio de Microbiología de la empresa Chemical Coaching SAS, a temperatura ambiente

o en neveras de icopor con hielo gel (ThermoSafe, IE), dependiendo de la cercanía de las plantas con el laboratorio.

4.3.2 Agentes antimicrobianos

Se emplearon soluciones stock a 1000 ppm de los biocidas B50, B59, B10, B08, B06, B00, B01, B30, B92.

4.3.3 Diseño experimental

4.3.3.1 Time Kill Test

En frascos schott con capacidad para 500 ml, se enfrentó la muestra de agua versus los biocidas a diferentes concentraciones, obteniendo un volumen final de 150 ml. La tabla 3 en los anexos muestra las concentraciones empleadas en cada tratamiento. Una muestra de igual volumen fue dejada como control del proceso. Los frascos fueron incubados en un shaker incubador (DiEs, CO) a 37 °C y 120 rpm, durante 24 horas (Chen *et al.*, 2016).

4.3.3.2 Determinación de la población

4.3.3.2.1 Recuento de bacterias aerobias

La eficiencia de los biocidas fue evaluada midiendo el total de bacterias aerobias a las horas 0, 6 y 24. Para ello, se realizaron diluciones en agua destilada estéril, y se sembró 1 ml de las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} en placas de recuento para bacterias aerobias (Petrifilm, 3M, US), las cuales fueron incubadas a 37 °C en una incubadora (Mettler, DE) por 48 horas.

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Evaluación de la efectividad de biocidas sobre microorganismos causantes de problemas a nivel industrial en el Valle del Cauca, Colombia																		
ACTIVIDADES/ SEMANA	AGOSTO			SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE		
	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3
Inducción a la empresa	x																	
Planteamiento del trabajo	x	x																
Revisión bibliográfica		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Realización de inventario	x																	x
Procesamiento TE		x	x	x	x	x		x	x		x							
Procesamiento Destilerías				x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Procesamiento Molinos							x											
Aislamiento de BAL					x	x				x	x			x				
Conservación de BAL											x	x	x		x			x
Redacción del trabajo		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
Entrega de avances								x				x			x			
Entrega final																x		
Sustentación																	x	

Fuente: Autor

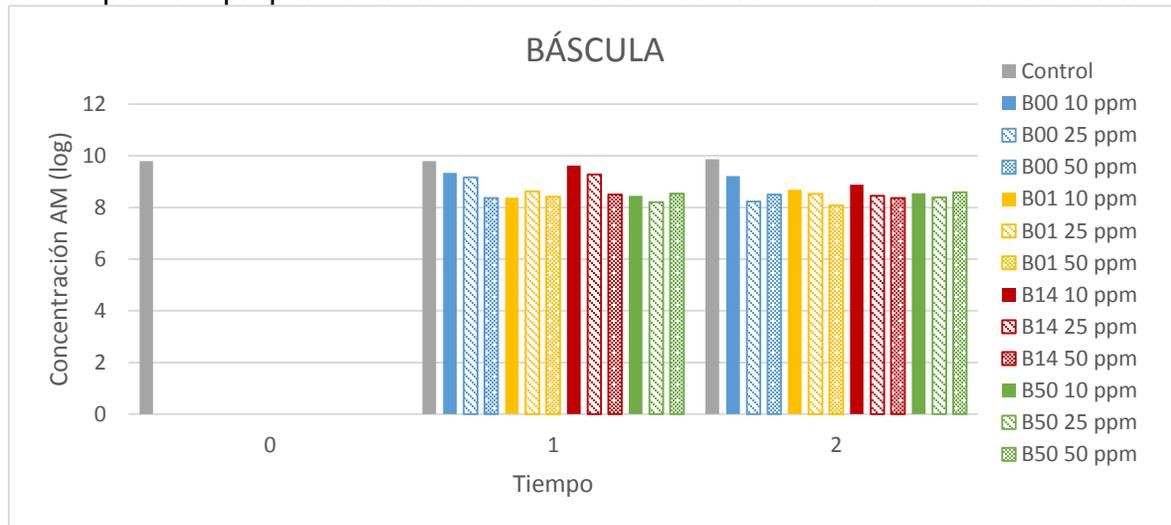
6. RESULTADOS

6.1 EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LOS BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE MOLIENDA DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN INGENIOS

6.1.1 Muestra de báscula

La muestra de jugo claro tomada en la báscula durante la etapa de preparación de la caña de azúcar fue sometida a la exposición frente a cuatro biocidas a 3 concentraciones cada uno. Se obtuvo como resultado que los biocidas B00 y B30 bajo la concentración más alta evaluada (50 ppm) y los biocidas B01 y B30 a las tres concentraciones (10, 25 y 50 ppm), lograron una reducción de una unidad logarítmica de aerobios mesófilos respecto al control (Figura 1). En el caso de las bacterias ácido lácticas, no pudo establecerse efectividad alguna, pues se obtuvieron resultados incontables en las siembras realizadas de la dilución 10^4 , es decir, la concentración estaba por encima de 7 unidades logarítmicas (datos no mostrados).

Figura 3. Comportamiento de AM presentes en la muestra de jugo claro tomada en la etapa de preparación frente a cuatro biocidas a tres concentraciones.

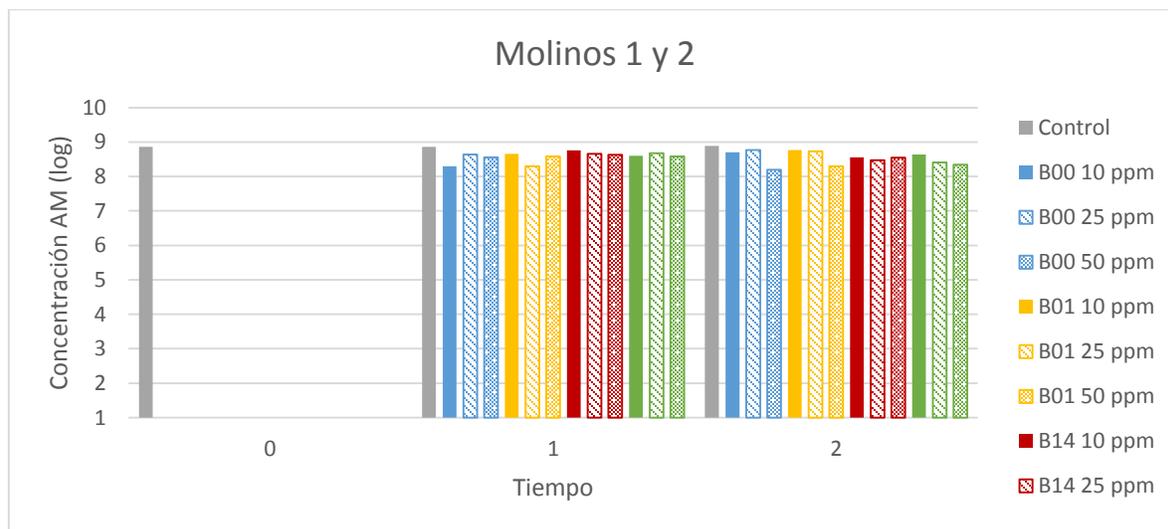


Fuente: Autor.

6.1.2 Muestra de molinos 1 y 2

La muestra de jugo claro tomada en los molinos durante la etapa de molienda de la caña de azúcar fue sometida a la exposición frente a cuatro biocidas a 3 concentraciones cada uno. Se obtuvo como resultado que ningún biocida bajo las concentraciones evaluadas disminuyó la concentración de aerobios mesófilos presentes en la muestra, pues luego de los tiempos t1 y t2, esta permaneció igual al control (9 unidades logarítmicas) (Figura 2). Al igual que en la muestra tomada de báscula, no pudo establecerse la concentración de BAL ni la efectividad de los biocidas sobre estas, pues los resultados fueron incontables (>1600 ufc/ml) en la dilución sembrada.

Figura 4. Comportamiento de AM presentes en la muestra de jugo claro tomada en los molinos 1 y 2 frente a cuatro biocidas a tres concentraciones.

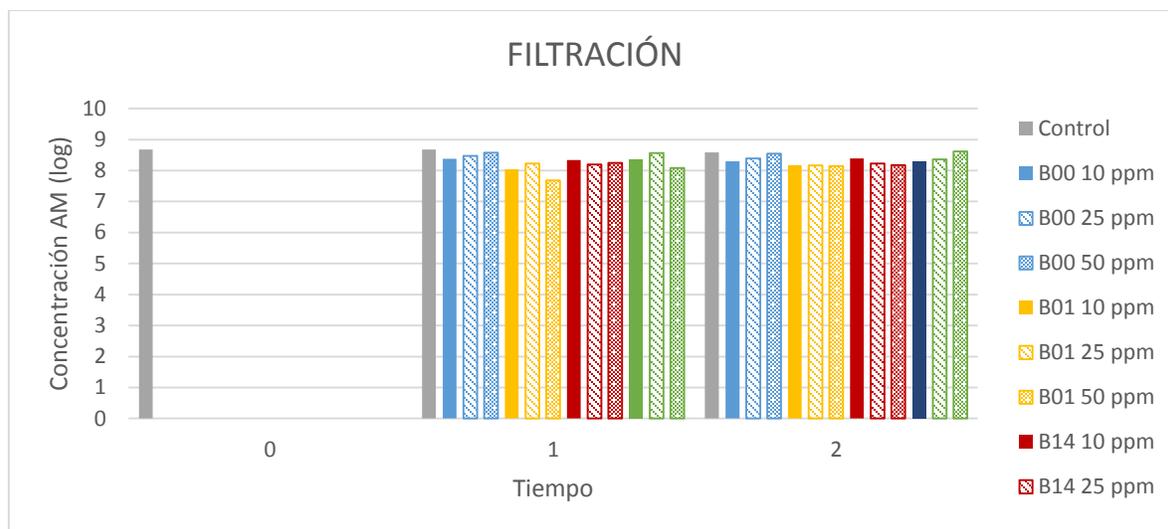


Fuente: Autor.

6.1.3 Muestra de filtración

La muestra de jugo claro tomada durante el proceso de filtración del jugo obtenido de la molienda de la caña de azúcar se evaluó frente a cuatro biocidas a 3 concentraciones cada uno. Los resultados de este ensayo fueron similares a los obtenidos durante la evaluación a muestras tomadas de los molinos, es decir, las concentraciones de los biocidas evaluados no resultaron efectivas sobre los aerobios mesófilos (Figura 3) y las bacterias ácido lácticas presentes.

Figura 5. Comportamiento de AM presentes en la muestra de jugo claro tomada en la etapa de filtración frente a cuatro biocidas a tres concentraciones.



Fuente: Autor.

6.2 EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOL CARBURANTE EN DESTILERÍAS.

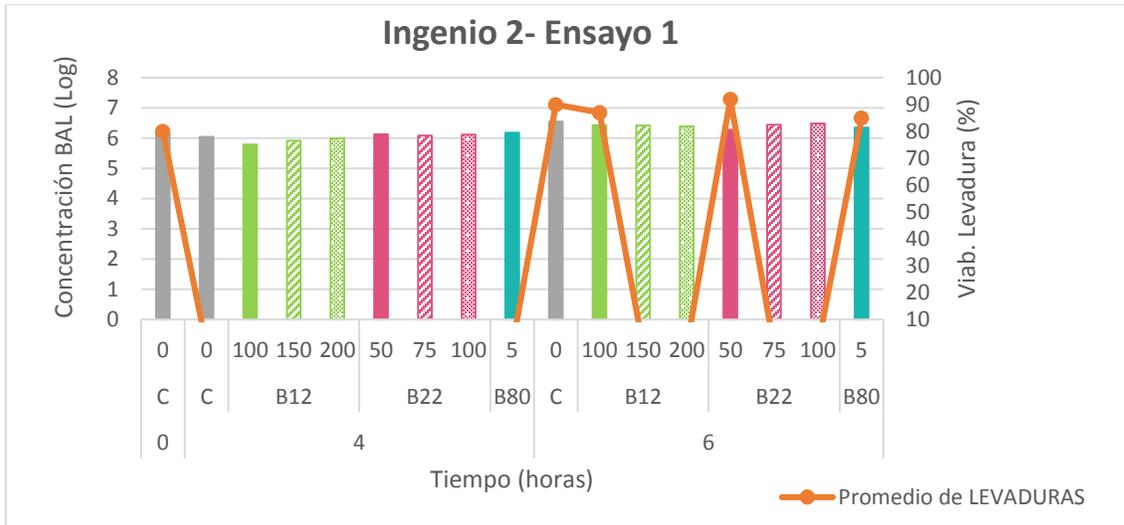
6.2.1 Ingenio 2

6.2.1.1 Sistema de fermentación.

En los tres ensayos realizados a las muestras de mosto provenientes del último tanque fermentador de la destilería del I2 se evaluó un total de 4 biocidas (incluidos mezclas con antibióticos) a diferentes concentraciones. En las Figuras 4, 5 y 6 se observa que en general, los biocidas distintos de B80, no tuvieron efecto sobre la carga microbiana presente a las concentraciones evaluadas; sin embargo, es de resaltar que tampoco se observó que estos tuvieran efecto sobre las levaduras presentes, es decir, su viabilidad se mantuvo por encima de 70 % en todos los casos.

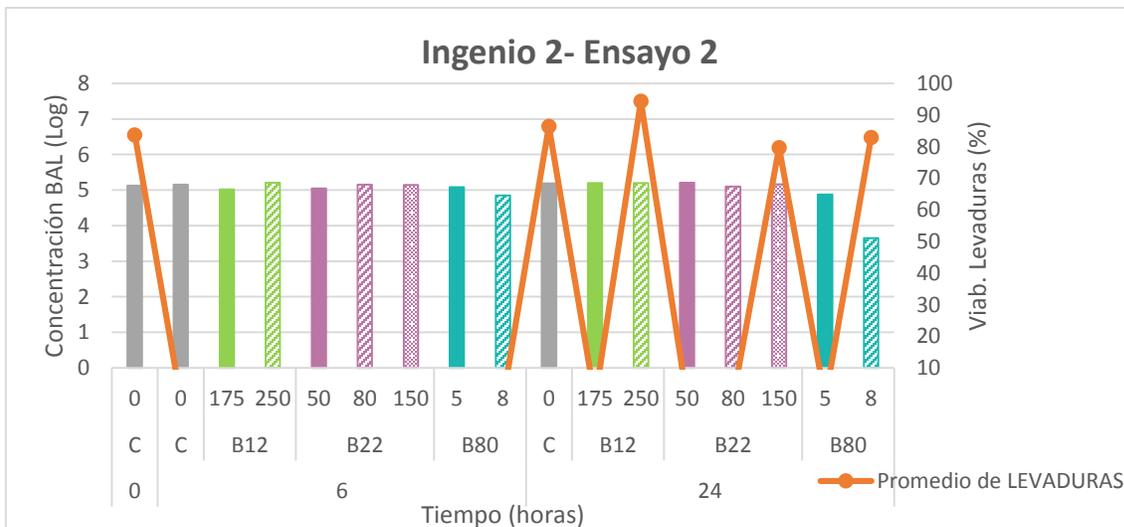
El B80 por su parte, en los dos ensayos en que fue evaluado a 8 ppm, logró la disminución de una unidad logarítmica de BAL respecto a la población inicial; sumado a esto, la viabilidad de las levaduras no se vio mayormente afectada, obteniendo porcentajes de viabilidad de 70 % y 82.9 %, observados en las figuras 5 y 6 respectivamente.

Figura 6. Ensayo 1 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 2 frente a diferentes biocidas.



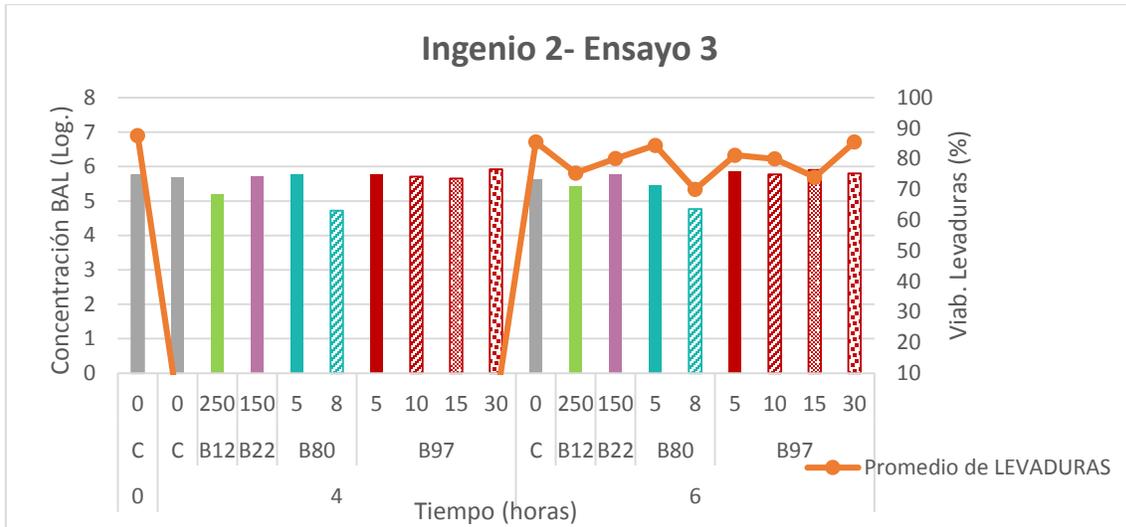
Fuente: Autor.

Figura 7. Ensayo 2 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 2 frente a diferentes biocidas.



Fuente: Autor.

Figura 8. Ensayo 3 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 2 frente a diferentes biocidas.

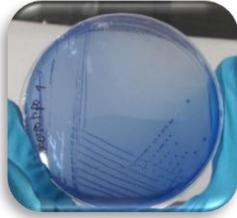
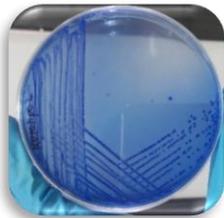
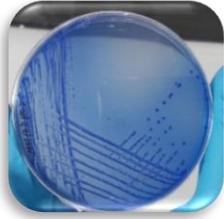


Fuente: Autor.

6.2.1.2 Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL)

En las tres muestras analizadas fueron predominantes cuatro morfotipos distintos en los controles sin adición de biocida, estos fueron aislados y designados como M1, M2, M3 y M4. La tabla 2 muestra las características micro y macroscópicas que presentaron.

Tabla 3. Descripción micro- y macroscópica de los morfotipos aislados del I2.

MORFOTIPO	DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA		DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA	
	MRS + Azul de anilina			MRS
	Descripción	Colonias	Morfología	
M1	Mediana, circular, borde completo, convexa, azul claro, opaca.		Mediana, circular, borde completo, convexa, blanco, opaca.	Coco (+)
M2	Mediana, circular, borde completo, convexa, azul oscuro, opaca.		Mediana, circular, borde completo, blanco, opaca.	Bacilo (+)
M3	Mediana, circular, borde completo, umbonada, azul oscuro, opaca.		Mediana, circular, borde completo, umbonada, blanco, opaca.	Bacilo (+)
M4	Pequeña, puntiforme, borde completo, convexa, azul claro, translúcida.		Pequeña, puntiforme, borde completo, convexa, translúcida.	Bacilo (+)

Fuente: Autor.

6.2.1.3 Antibiograma en disco

Al realizar el antibiograma en discos con las cepas aisladas del I2, se demostró la efectividad del B80, pues fue observado que actuó frente a los cuatro morfotipos aislados del I2, creando halos de inhibición mayores a 6 mm (datos no mostrados). Por su parte, el B97 fue el segundo con mejores resultados, sin embargo no demostró efectividad frente al morfotipo 4. Los biocidas B12 y B22, al igual que en

los ensayos por sistemas de fermentación, no lograron afectar a los morfotipos estudiados (Tabla 3).

Tabla 4. Tamaño en milímetros (mm) de los halos de inhibición de biocidas frente a morfotipos aislados del I2.

BIOCIDA		MORFOTIPO			
B	C	M1	M2	M3	M4
B12	250	x	x	x	x
B22	150	x	x	x	x
B80	5	8.8	7.9	12.0	6.9
	8	6.9	6.6	10.4	8.9
B97	5	6.4	11.2	8.5	x
	10	6.5	9.1	7.3	7.2
	15	12.9	12.1	7.9	x
	30	11.4	14.0	9.5	9.2

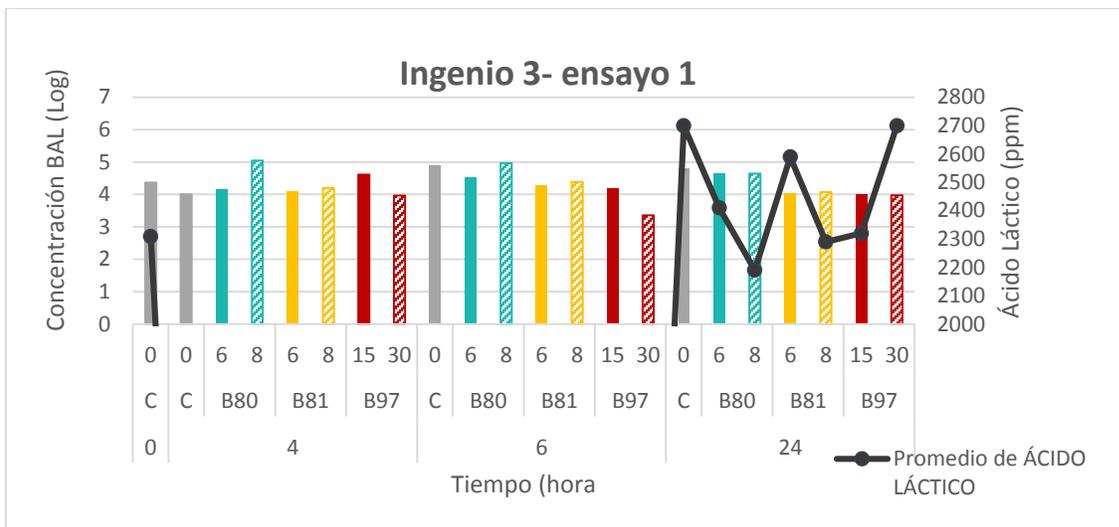
X= No hubo inhibición.

Fuente: Autor.

6.2.2 Ingenio 3

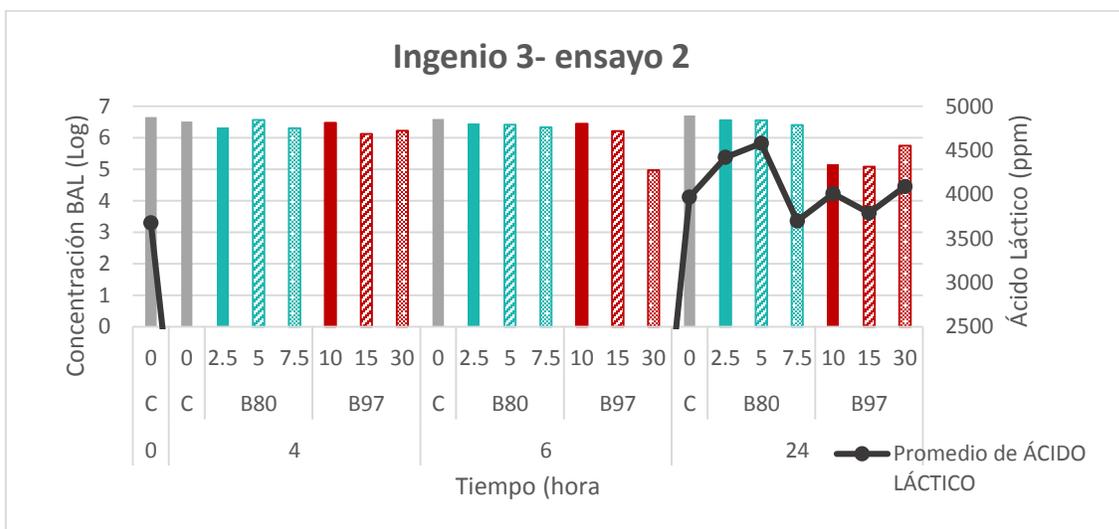
Para este ingenio, fueron evaluadas tres mezclas de antibióticos a diferentes concentraciones durante dos ensayos. Se obtuvo como resultado que el B97 a 30 ppm fue el único con la habilidad de disminuir la concentración inicial de BAL en una unidad logarítmica, resultados obtenidos transcurridas 6 horas de adicionado (Figuras 7 y 8). En ambos casos, la viabilidad de las levaduras no pudo ser evaluada. Por otra parte, el nivel de ácido láctico presente se mantuvo por debajo de los 3000 ppm (Figura 7), en el ensayo 2 aumentó considerablemente con el empleo de B80 (Figura 8).

Figura 9. Comportamiento de BAL y concentración de ácido láctico en el ensayo 1 realizado al ingenio 3.



Fuente: Autor.

Figura 10. Comportamiento de BAL y concentración de ácido láctico en el ensayo 2 realizado a la destilería del ingenio 3.



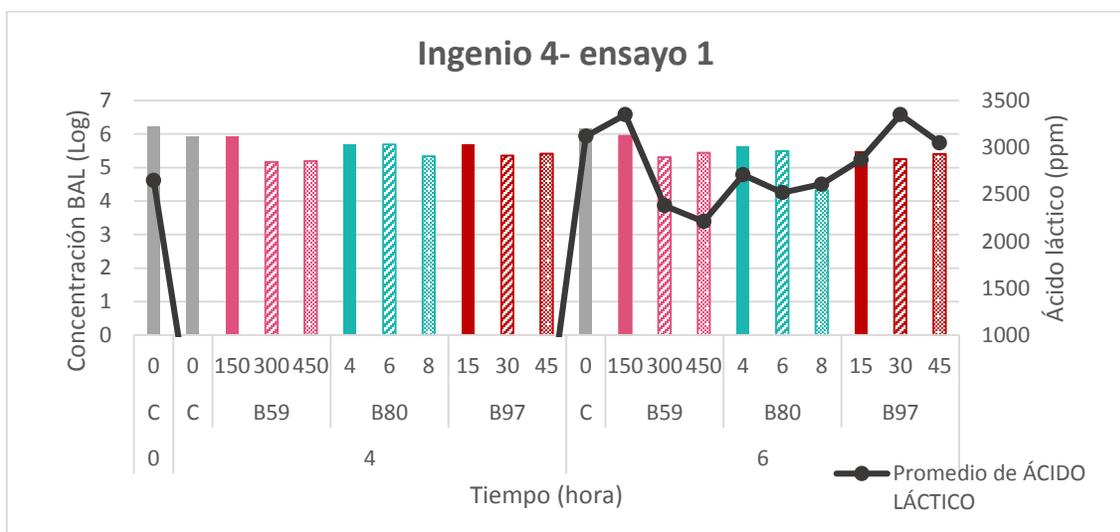
Fuente: Autor.

6.2.3 Ingenio 4

En este ingenio se evaluó la efectividad de un biocida (B59) a tres concentraciones y dos mezclas de antibióticos (B80 y B97) a tres concentraciones cada uno. Se obtuvo que el B59 fue efectivo a dosis de 300 ppm y 450 ppm, disminuyendo una unidad logarítmica; B80 a 8 ppm logró la disminución de una y dos unidades

logarítmicas a las 4 y 6 horas, respectivamente; por su parte, B97 redujo una unidad bajo las concentraciones de 30 y 45 ppm a las dos horas evaluadas (Figura 9). Es decir, las concentraciones mínimas a emplear de los agentes antimicrobianos ensayados para lograr la reducción de al menos una unidad logarítmica son 300, 8 y 30 ppm para B59, B80 y B97, respectivamente.

Figura 11. Comportamiento de BAL y concentración de ácido láctico en el ensayo realizado a la destilería del ingenio 4.



Fuente: Autor.

6.2.3.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por dilución en caldo.

Al evaluar individualmente los biocidas sobre las cepas entregadas por el I4 bajo el método de dilución en caldo, no fue posible establecer un biocida y CMI específico, pues no hubo un patrón de comportamiento entre las mismas (tabla 4). Además, se pudo establecer que las cepas LD y LM son resistentes a B05 y B97, lo cual es un indicio de su comportamiento en los sistemas de fermentación cuando se emplean estos biocidas.

Tabla 5. Concentraciones mínimas inhibitorias en ppm de biocidas frente a seis cepas de bacterias ácido lácticas del I4.

CEPA	CMI DEL BIOCIDA (ppm)		
	B05	B80	B97
LFA	16	8	8
LFE	8	16	8
LD	x	16	x
LM	x	16	x
PA	32	8	4
WC	16	4	4

X= No se encontró una CMI entre las concentraciones evaluadas.

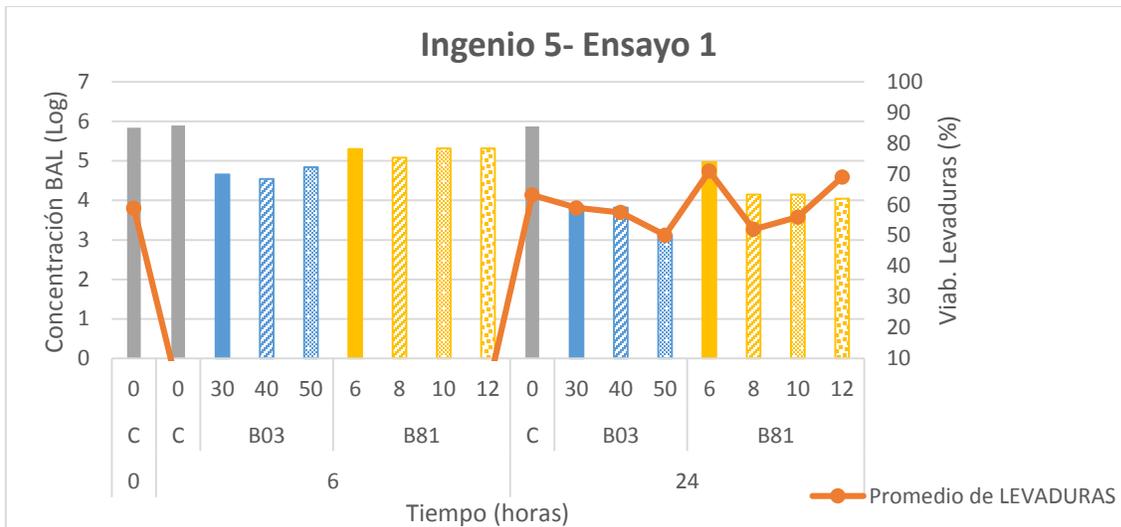
Fuente: Autor.

6.2.4 Ingenio 5

Para el I5 se realizaron tres ensayos y fue evaluado un total de cinco biocidas. En términos generales, con dichos biocidas se obtuvo la reducción de al menos una unidad logarítmica transcurridas 24 horas de su adición (Figuras 10, 11 y 12). Las concentraciones mínimas establecidas para lograr este resultado fueron 4, 10 y 30 ppm para B81, B90 y B03 respectivamente; sin embargo, concentraciones mínimas de 40 y 15 ppm de B33 y B97 fueron suficientes para lograr dicha reducción en un tiempo de seis horas.

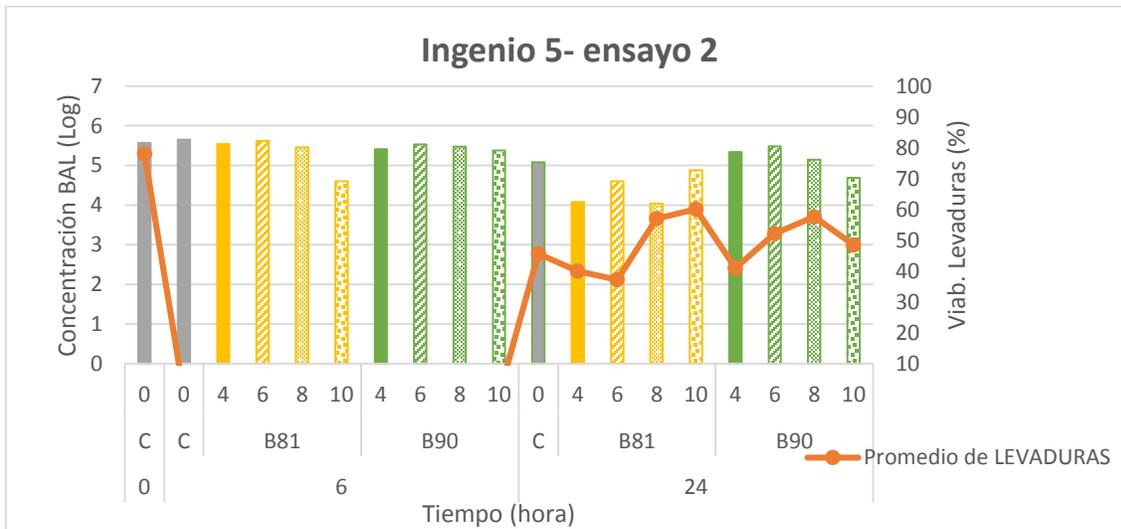
Por otra parte, el porcentaje de viabilidad de las levaduras en el ensayo 1 se mantuvo por encima de 50 % en todos los casos, siendo B81 a 6 ppm el de mejor resultado (Figura 10). Durante el segundo ensayo, este porcentaje disminuyó drásticamente con todos los biocidas empleados respecto al inicial (Figura 11), sin embargo, fue durante este ensayo donde se encontraron las concentraciones más altas de ácido láctico (Tabla 8, anexo 2). Con el ensayo 3, la viabilidad de las levaduras fue elevada, incluso, fue más alta luego de realizar los diversos tratamientos con biocidas respecto al control inicial (Figura 12), además, la concentración de ácido láctico, a diferencia del ensayo 2, no sobrepasó los 5000 ppm en ninguno de los casos (Tabla 8, anexo 2).

Figura 12. Ensayo 1 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 5 frente a diferentes biocidas.



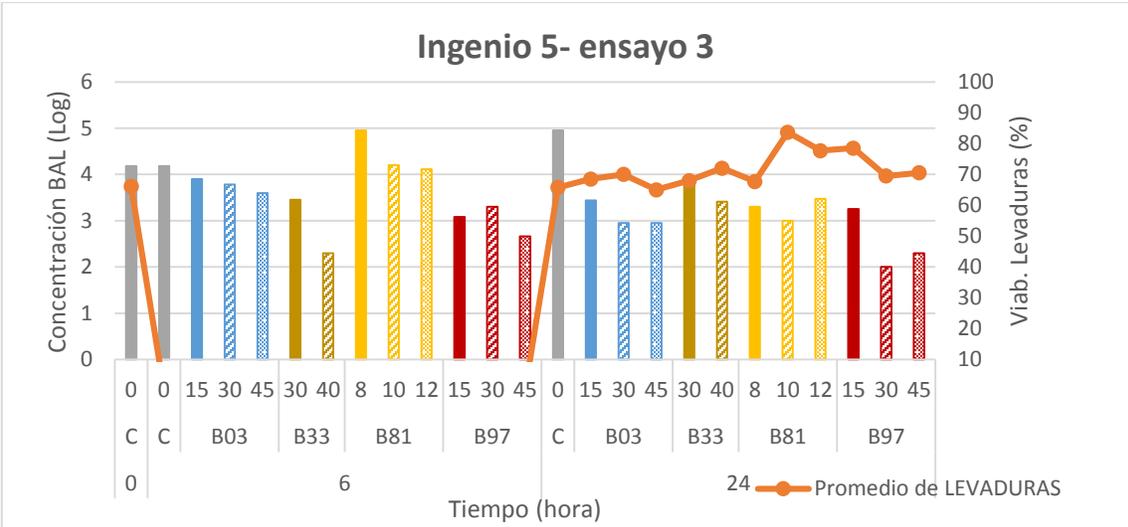
Fuente: Autor.

Figura 13. Ensayo 2 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 5 frente a diferentes biocidas.



Fuente: Autor.

Figura 14. Ensayo 2 del comportamiento de BAL y levaduras presentes en una muestra de mosto de la destilería del ingenio 5 frente a diferentes biocidas.



Fuente: Autor.

6.2.5 Conservación de cepas y pruebas de viabilidad

Los morfotipos aislados del ingenio 2 fueron conservados con dos soluciones crioprotectoras, la primera (A) contenía MRS + glicerol al 20 % y la segunda (B) MRS + glicerol al 50 %. Se observó que a excepción de las cepas LFE y WC, la solución A, ofrece mejor efecto de protección, pues los porcentajes de viabilidad fueron mayores (Tabla 5).

Tabla 6. Porcentajes de viabilidad de cepas conservadas con dos soluciones crioprotectoras.

CEPA	CONCENTRACIÓN BAL									
	A					B				
	t0 C (log)	t1		t2		t0 C (log)	t1		t2	
	C (log)	%V	C (log)	%V		C (log)	%V	C (log)	%V	
M1	8.09	7.49	92.58	7.20	88.99	7.84	7.12	90.82	6.86	87.5
M2	9.18	8.41	91.61	8.07	87.9	9.02	8.31	92.13	7.37	88.6
M3	9.13	8.18	89.59	8.36	91.56	8.08	5.95	73.64	5	61.88
M4	6.05	5.84	96.53	5	82.6	7.15	4*	55.94	4.14	57.9
LFA	9.24	8.52	92.21	9.33	100	9.19	8.19	89.11	8.97	97.61
LFE	8.26	4*	48.43	3.01	36.4	8.14	7.60	93.37	5.47	67.2
LD	8.84	8.43	95.36	8.30	93.89	9.09	7.98	87.78	8.69	95.59
LM	9.41	8.30	88.29	8.92	94.79	10.1	7.19	71.19	6.97	69.00
PA	8.46	5.90	69.74	5.70	67.37	8.25	5.47	66.30	5.30	64.24
WC	9.93	9.57	96.37	8.38	84.39	8.73	7.77	89.00	8.02	91.87

% V= porcentaje de viabilidad. t0= tiempo inicial. t1= tiempo 1. t2= tiempo 2 *
Menor a 10⁵ UFC/ ml

Fuente: Autor.

6.3 EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN TORRES DE ENFRIAMIENTO

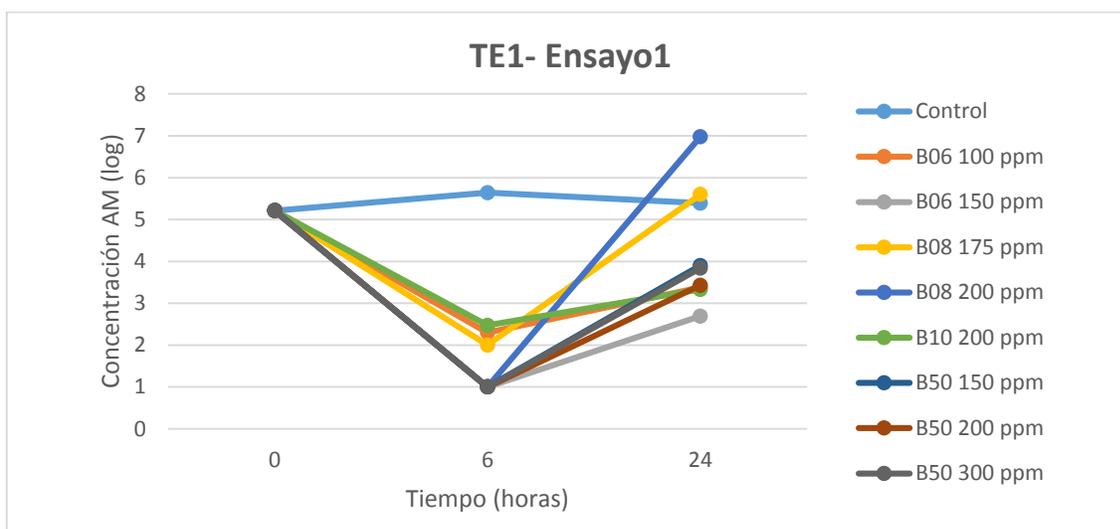
6.3.1 Torre de enfriamiento 1

Durante los seis ensayos realizados a esta torre se emplearon siete biocidas a diferentes concentraciones. Como resultado se obtuvieron reducciones en la concentración de aerobios mesófilos mayores a una unidad logarítmica incluso

transcurridas 24 horas del inicio de los experimentos, exceptuando el B08 que aunque obtuvo reducciones hasta de tres unidades en las cuatro concentraciones evaluadas a las seis horas, no logró mantener el control transcurridas 24 horas de su adición (Figuras 13 a 18).

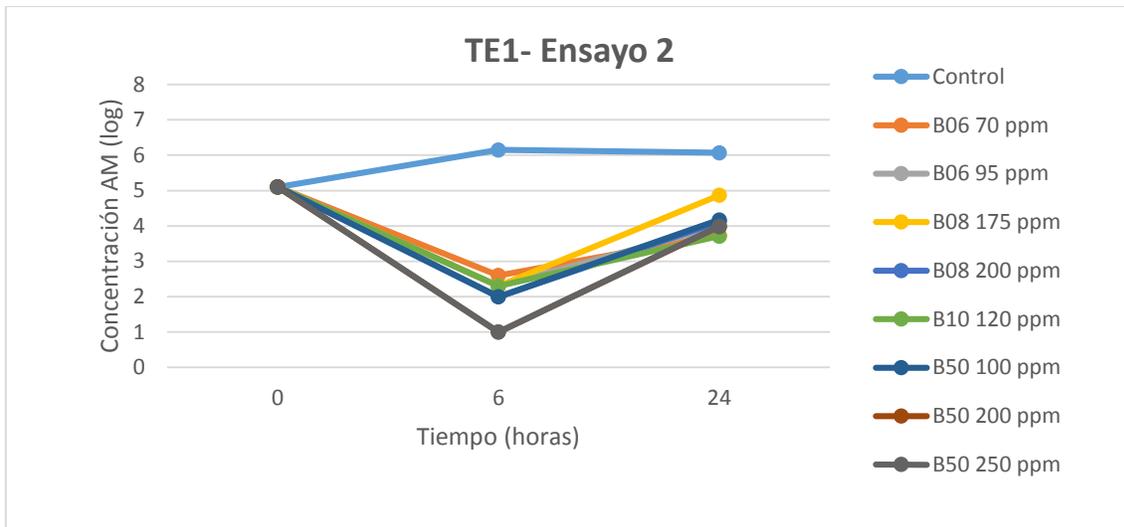
Por otra parte, se observó que dicha reducción dependió en gran medida de las dosis empleadas, así pues, las dosis mínimas encontradas para obtener este resultado fueron 70 ppm del biocida B06 (2), 30 ppm del B10 (6); 150 ppm del B50 (1), 200 ppm para el B00 *(3); 80 ppm para el B01 (4) y 80 ppm para el biocida B92.

Figura 15. Ensayo 1 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).



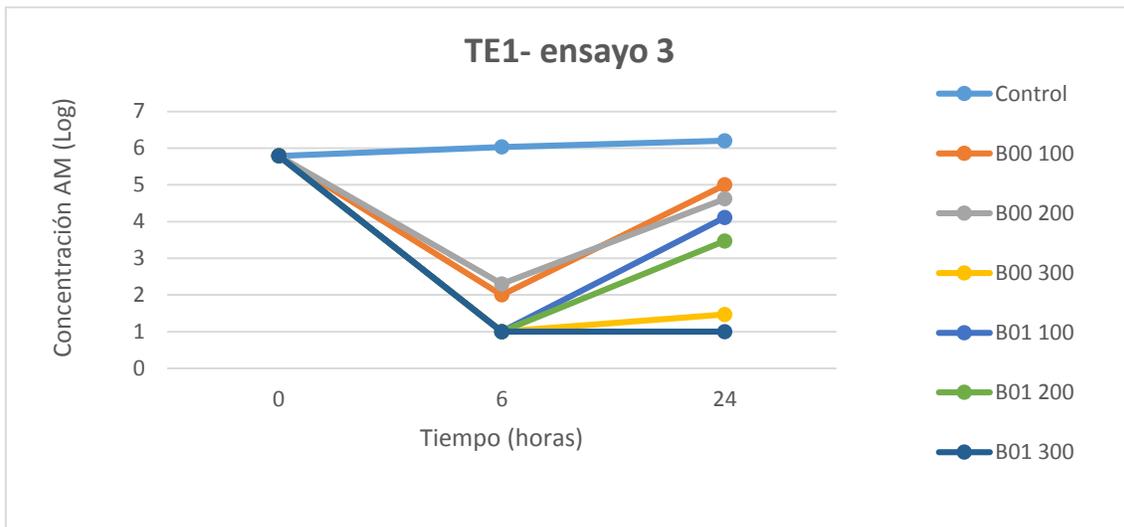
Fuente: Autor.

Figura 16. Ensayo 2 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).



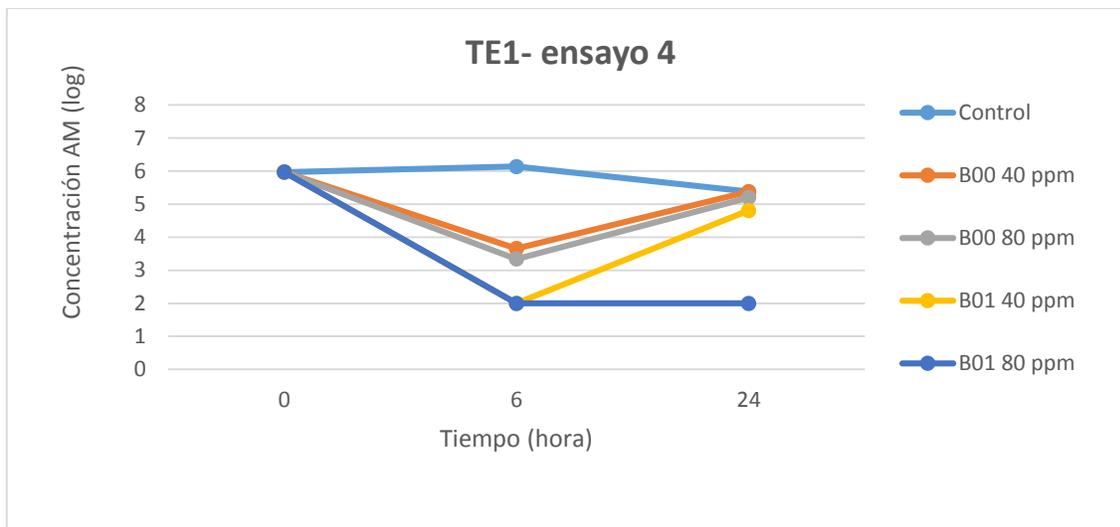
Fuente: Autor.

Figura 17. Ensayo 3 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).



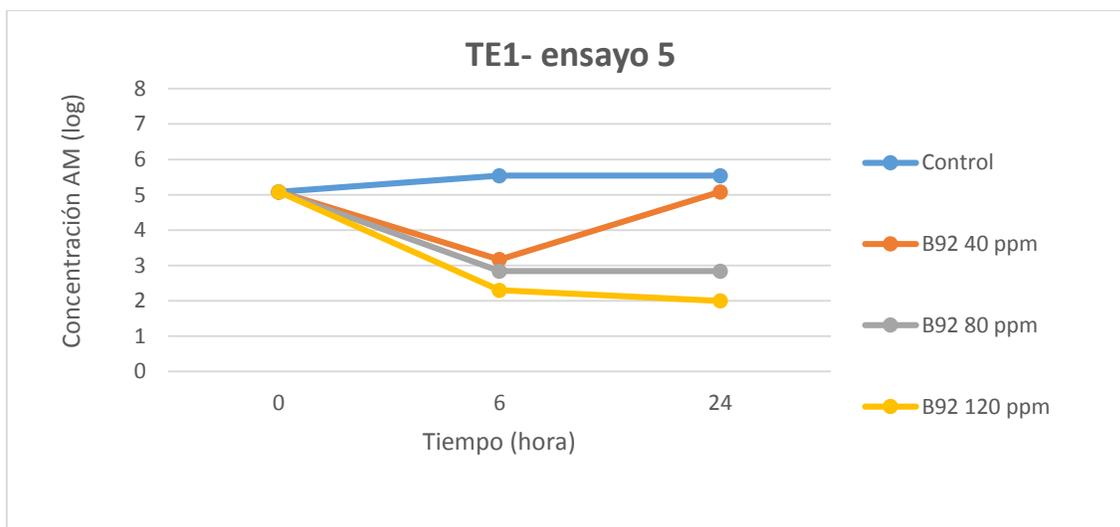
Fuente: Autor.

Figura 18. Ensayo 4 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).



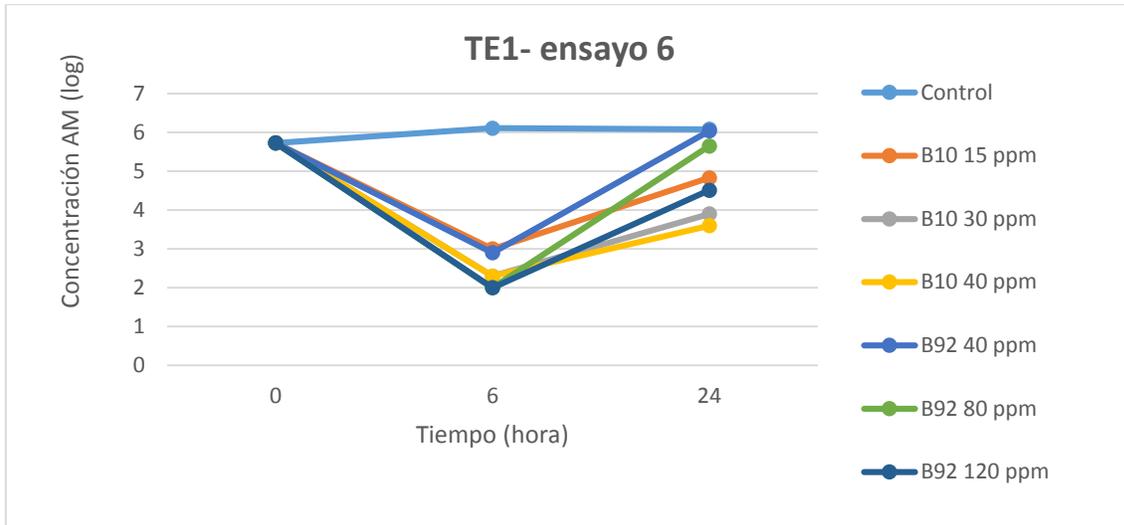
Fuente: Autor.

Figura 19. Ensayo 5 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).



Fuente: Autor.

Figura 20. Ensayo 6 de la efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 1 (TE1).

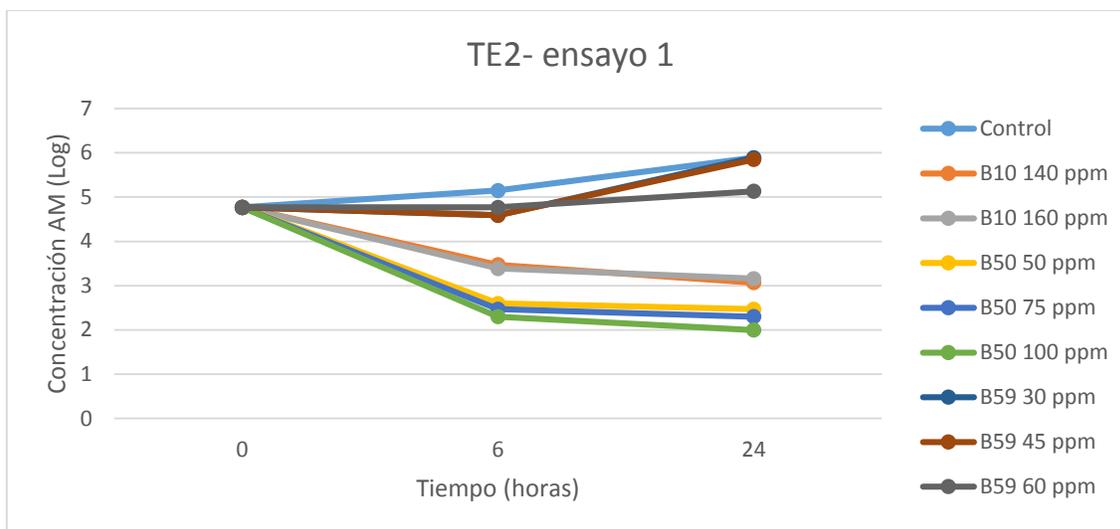


Fuente: Autor.

6.3.2 Torre de enfriamiento 2

En esta torre fueron evaluados tres biocidas durante un único ensayo, obteniendo como resultado que los biocidas B10 y B50 a concentraciones mínimas de 140 y 50 ppm, respectivamente, redujeron la concentración de aerobios mesófilos por encima de una unidad logarítmica transcurridas 24 horas del ensayo. Por su parte, el biocida B59 no demostró ejercer un control sobre la microbiota presente en la torre a las concentraciones evaluadas, incluso a las 6 horas del experimento (Figura 19).

Figura 21. Efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 2 (TE2).

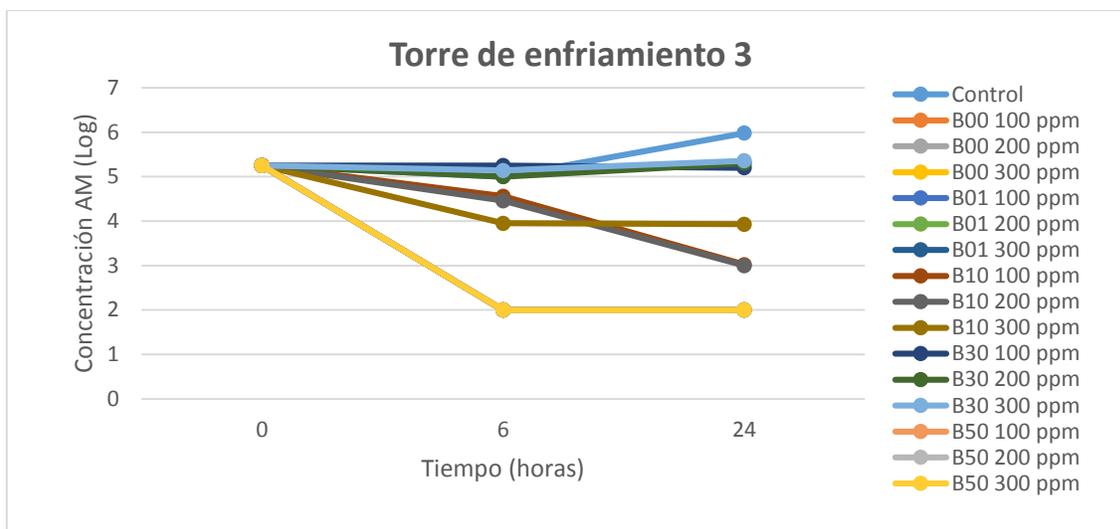


Fuente: Autor.

6.3.3 Torre de enfriamiento 3

Durante el ensayo realizado a esta torre se evaluaron cinco biocidas a tres concentraciones cada uno. A excepción del B30, los biocidas demostraron ser efectivos al disminuir más de una unidad logarítmica a las tres concentraciones transcurridas 24 horas (Figura 20). Por tanto, la dosis mínima para los biocidas B00, B01, B10 y B50 encontrada fue de 100 ppm.

Figura 22. Efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 3 (TE3).

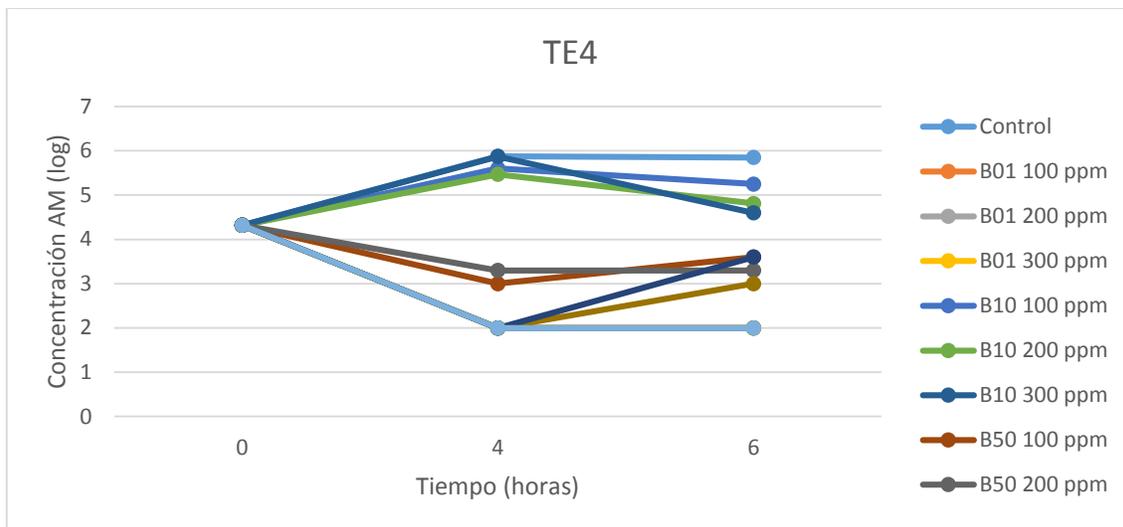


Fuente: Autor.

6.3.4 Torre de enfriamiento 4

En esta torre se evaluó la efectividad de cuatro biocidas a tres concentraciones cada uno, obteniendo como resultado que concentraciones (dosis mínimas) de 100 ppm del B01, y 200 ppm de B50 y B92 pudieron disminuir la concentración de aerobios mesófilos en más de una unidad logarítmica transcurridas 6 horas. El biocida B10 no demostró ser eficaz bajo ninguna concentración en el tiempo estudiado (Figura 21).

Figura 23. Efectividad de biocidas sobre AM presentes en muestras de agua de la torre de enfriamiento 4 (TE4).



Fuente: Autor.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE MOLIENDA DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN INGENIOS.

La caña de azúcar posee las condiciones óptimas para el desarrollo de microorganismos, es por esto que la contaminación durante el proceso de obtención del azúcar es algo inherente; sin embargo, dichos microorganismos deben ser controlados en el proceso para evitar y/o disminuir los problemas industriales que traen como consecuencia, siendo más importante las pérdidas de sacarosa por consumo o por formación de dextranas (Solomon 2009).

Durante el presente estudio se observó la reducción de una unidad logarítmica con cuatro biocidas en las muestras de jugo claro tomadas del proceso de preparación para la molienda de la caña de azúcar, siendo las dosis mínimas 50 ppm para B00 y B54, y 10 ppm para B01 y B14 para la reducción de una unidad logarítmica; sin embargo, dicha reducción no es suficiente para controlar las pérdidas de sacarosa en el sistema. Debido a lo expuesto, se establece que las concentraciones de los biocidas evaluados no son efectivas para la eliminación de la microbiota presente, y por consiguiente, para la disminución de las pérdidas de sacarosa en el ingenio 1. Sin embargo, estos resultados no son ajenos a los obtenidos en estudios previos, por ejemplo, al tratar mezclas de jugo claro de un ingenio en Tailandia, con agua caliente (45 °C) y cloruro de dimetil bencil amonio a dosis de 2 y 6 ppm no se obtuvo reducción alguna de la población total ni de bacterias ácido lácticas transcurridos 10 minutos (Milintawisamai, *et al.*, 2009).

Una de las razones por las cuales los biocidas no tienen el efecto deseado en este tipo de muestras son las características de las mismas, pues la acción de los biocidas se ve afectada además de por su concentración, por factores como pH, temperatura y presencia de materia orgánica que interfiere (Michalak 2014); por ejemplo, la actividad de los compuestos de amonio cuaternario y del ácido peracético presentes en los biocidas B01 y B30, respectivamente, disminuye cuando el pH es muy ácido y/o cuando existe alta concentración de materia orgánica (Ortega, *et al.*, 2013), lo cual concuerda con el hecho de que en el ensayo con las muestras de bascula, el B14 haya resultado efectivo solo bajo la dosis más alta, a diferencia de los otros biocidas.

Se recomienda por tanto, aumentar las dosis de los biocidas que demostraron tener mejor efecto durante los ensayos, a pesar de no reducir la carga en unidades logarítmicas. Pues en un estudio previo de Singh *et al.* en el 2008 quedó demostrado que una mezcla de los mismos agentes activos que contiene el B01, a dosis mayores (100 ppm de glutaraldehído y 200 ppm de cloruro de benzalconio), se redujo la concentración de bacterias totales, hongos, *Leuconostoc* y levaduras en porcentajes de 67.92, 51.3%, 26.08, y 51.2%, respectivamente, además de que las pérdidas de sacarosa disminuyeron de un 30.8 % a un 7.1 %.

7.2 EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOL CARBURANTE EN DESTILERÍAS.

Es sabido que en los tanques de fermentación en las destilerías que producen etanol carburante es común la presencia de bacterias ácido lácticas, Lucena *et al.* en el 2010 reportaron este tipo de bacterias en cuatro destilerías de Brasil en órdenes de 5 a 8 unidades logarítmicas. Su presencia se debe a factores intrínsecos del material empleado para la fermentación, el mosto, que proviene del proceso de producción de sacarosa a partir de caña de azúcar, la cual llega a los ingenios con una alta carga microbiana que no es removida por completo durante el proceso y luego, las condiciones de la fermentación, propician un ambiente para su proliferación (Eggleston 2002; Skinner *et al.* 2007).

Normalmente, las destilerías evaluadas llevan un control de BAL diario en sus sistemas que busca mantener la concentración de estas bacterias a un nivel que no afecte la viabilidad de las levaduras por el tiempo estimado de fermentación; existe un indicio que indica que estos valores son menos de 4 unidades logarítmicas de BAL (Leite *et al.*, 2013). Debido a que las muestras evaluadas en el presente trabajo fueron recolectadas los días previos a los “días de parada”, es decir, cuando los sistemas se detienen para llevar a cabo procesos de limpieza y/o mantenimiento, y dar inicio a una nueva fermentación; no se tuvo en cuenta la concentración inicial de BAL como un indicativo para la evaluación de la efectividad de los biocidas empleados, dicha efectividad fue evaluada en términos de reducción de unidades logarítmicas. Además, el nivel de ácido láctico encontrado durante los ensayos fue inferior a porcentajes de 1 % (10000 ppm) (tablas 5, 6, 7 y 8 del anexo 2), lo que indica que la viabilidad de las levaduras no se vio afectada por este factor, pues porcentajes de 3.44 % de este ácido reducen hasta un 53 % las UFC/ml de *S. cerevisiae* (Bayrock *et al.*, 2004).

Durante el presente estudio se demostró que el antibiótico monensina es el mejor controlador de la contaminación microbiana durante la producción de bioetanol, pues con los biocidas que incluyen este antibiótico en su composición, se obtuvo reducción de una unidad logarítmica incluso en las menores concentraciones

estudiadas. Este biocida ha demostrado previamente su eficacia, incluso con mejores resultados; Leite *et al.*, en el 2013, encontraron que una concentración de 6 ppm fue suficiente para reducir BAL de 8 a 5 unidades en tan solo 8 horas; sin embargo, dosis de 40 ppm son empleadas normalmente debido a la generación de bacterias cada vez más resistentes a antibióticos; además, hallaron que el porcentaje de etanol producido por ***S. cerevisiae*** fue de 72.2 %, lo que significó que este antibiótico no afectó el metabolismo de la levadura y guarda relación con los resultados aquí presentados (Leite *et al.* 2013).

Debido a que se requiere disminuir la cantidad residual de antibióticos en estos sistemas, los biocidas con clorhexidina y dióxido de cloro fueron evaluados, sin embargo, aunque exhibieron disminución de una unidad logarítmica, no demostraron ser tan efectivos como otros estudios, donde se encontró que la CMI de clorhexidina para especies de ***Lactobacillus*** estaba en el rango de 0.125 a 16 µg/ ml (Arioli *et al.* 2013), y concentraciones de 50, 75 y 125 de dióxido de cloro fueron las CMI de ***Leuconostoc mesenteroides***, ***Lactobacillus fermentum*** y ***Lactobacillus plantarum***, respectivamente (Meneghin *et al.* 2008).

7.3. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE BIOCIDAS SOBRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN TORRES DE ENFRIAMIENTO

La presencia y crecimiento excesivo de microorganismos en torres de enfriamiento es uno de los principales problemas que afectan la operación eficiente de estos sistemas; debido a esto, las industrias han tomado medidas que incluyen el uso de biocidas para disminuir su concentración (Ludensky 2005).

Aunque la efectividad de los biocidas depende de la carga inicial del sistema, en el presente estudio se encontró que la mayoría de las dosis mínimas establecidas para la reducción de más de una unidad logarítmica en las diferentes torres, corresponden a las dosis mínimas a emplear para llevar que este sistema se mantenga en funcionamiento normal, pues estabilizaron la concentración de aerobios mesófilos por debajo de 5 unidades logarítmicas, concentración adecuada para evitar problemas asociados a la contaminación biológica en los sistemas de enfriamiento de recirculación abierta (Rahmani, *et al.*, 2015).

Así pues, teniendo en cuenta únicamente la dosis a emplear, los biocidas de mayor efectividad son B10 a 30 ppm para la torre 1; B50 a 50 ppm para la torre 2; B00, B01, B10 o B50 a 100 ppm para la torre 3; B01, B50 o B92 a 100 ppm para la torre 4. Para estas dos últimas torres, cabe resaltar que es necesario realizar ensayos con estos biocidas a concentraciones inferiores para establecer una dosis mínima a emplear.

Además de lo dicho anteriormente, los biocidas B06, B01 y B92 a 80 ppm y B10 a 140 ppm, se podrían considerar como una alternativa durante la rotación de biocidas en las torres 1 y 2 respectivamente, lo cual evitaría la generación de resistencia de la microbiota presente (Ludensky 2005). Sin embargo, teniendo en cuenta que estos sistemas son abiertos, para su escogencia, además de evaluar la efectividad, se deben tener en cuenta los impactos ambientales y de seguridad que estos traen, es decir, estos deben ser de rápida degradación y mínima toxicidad a organismos *no target* (Chelossi *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta estos criterios, el biocida B06 es la mejor alternativa para el control de crecimiento de microorganismos en la TE1 y el B50 para la TE2. Sin embargo, si existe indicio o certeza de la presencia de biofilms en estas torres, se deberá emplear un biocida que contenga en su composición un agente capaz de penetrar estas estructuras, como la isotiazolina (Guiamet *et al.*, 1996) presente en el B10 y el glutaraldehído (Gardner *et al.*, 2002) presente en B01, B92, siendo entonces la mejor opción el B10, pues el glutaraldehído tiene efecto tóxico en medio acuático y es tóxico por inhalación a los seres humanos, lo cual podría convertirse en un problema social debido a su liberación al ambiente (Ludensky 2005).

El biocida B10, es el mayor recomendado de los biocidas evaluados, pues el agente isotiazolina presente posee un amplio espectro, actuando incluso frente a algas, normalmente encontrados en las torres de enfriamiento debido a la continua exposición a luz solar (Covarrubias, *et al.*, 2016), como fue observado en las muestras de agua de la TE1, la cual presentaba residuos color verde al momento de iniciar las pruebas (datos no mostrados). Además, este agente es fácilmente degradado luego de su descarga al ambiente por hidrólisis, biodegradación y/o fotocátalisis, lo cual lo hace amigable con el ambiente (Ludensky 2005). Sin embargo, un problema observado con este biocida, es la presencia del agente bronopol, el cual aunque presenta acción frente a patógenos como ***Pseudomonas spp*** y ejerce un control sobre bacterias anaerobias (Ozzie Chemical, 2008), incluidas las bacterias sulfato reductoras (BSR) causantes de corrosión inducida por microorganismos (MIC, por sus siglas en inglés) en tuberías (Rahmani, *et al.*, 2015); cuando se encuentra en condiciones muy alcalinas y de altas temperaturas (fácilmente encontradas en estos sistemas de enfriamiento), se descompone liberando nitritos y bajos niveles de formaldehído, compuestos que pueden entrar en contacto con aminas presentes en el sistema y formar nitrosaminas, altamente tóxicas (Safety 2012), por lo que se recomienda que durante su aplicación, se utilice además un compuesto inhibidor de la nitrosación que evite la generación de este problema.

8. CONCLUSIONES

- No se logró la identificación de un biocida de efecto inmediato en la eliminación de microorganismos contaminantes del proceso de molienda de azúcar, ya que los biocidas y dosis empleados no fueron suficientes para lograr la reducción de BAL y AM presentes en la muestra evaluada. Es recomendable realizar estudios en los que se aumente la concentración de los biocidas y así observar si se obtienen resultados más favorables.

- La efectividad de los biocidas en los sistemas de fermentación varió para cada uno de los ingenios estudiados; los biocidas y dosis mínimas establecidas para lograr la reducción de una unidad logarítmica fueron B80 8 ppm para el I2, B97 30 ppm para el I3; B59 300 ppm, B80 8 ppm y B97 30 ppm para I4; B33 40 ppm, B97 15 ppm, B03 30 ppm, B81 4 ppm y B97 15 ppm para I5.

- Durante la evaluación de los biocidas en torres de enfriamiento, se encontró que el B10 fue el más efectivo, pues redujo al menos una unidad logarítmica de la concentración de Aerobios Mesófilos al emplearse en las torres TE1, TE2 y TE3. Además, se encontró que la mayoría de los biocidas evaluados tienen capacidad de controlar estas poblaciones, lo que permite tener alternativas para la rotación en su mantenimiento.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Albert A. (1950). Selective toxicity. *Nature*, 165(4184), 12–6.
- Amaya, A., Cock, J. H., Hernández, a D. P., & Irvine, J. E. (1995). Biología. *El Cultivo de La Caña En La Zona Azucarera de Colombia*, 31–63.
- Arioli, S., Elli, M., Ricci, G., & Mora, D. (2013). Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides. *International Journal of Food Microbiology*, 163(1), 1–5.
- aASOCAÑA. (2016). Anexo estadístico del Informe anual de Asocaña 2014- 2015. Obtenido de: <http://www.asocana.org/modules/documentos/11929.aspx>
- bASOCAÑA. (2016). Aspectos Generales del Sector Azucarero Colombiano 2015-2016: Informe Anual, 94.
- Bayrock, D. P., & Ingledew, W. M. (2004). Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: Nutrient depletion and/or acid toxicity? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 362–368.
- Bernal R., M., & Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 4(3-4), 112.
- Bott, T. R. (1998). Techniques for reducing the amount of biocide necessary to counteract the effects of biofilm growth in cooling water systems. *Applied Thermal Engineering*, 18(11), 1059–1066.
- CENICAÑA. (2004). Proceso de obtención de azúcar. Obtenido de Centro de Investigación de la Caña de Azúcar en Colombia: http://www.cenicana.org/pop_up/fabrica/diagrama_obtencion.php
- CENICAÑA. (2008). Proceso de obtención de etanol. Obtenido de http://www.cenicana.org/pop_up/fabrica/diagrama_etanol.php
- Chelossi, E., & Faimali, M. (2006). Comparative assessment of antimicrobial efficacy of new potential biocides for treatment of cooling and ballast waters. *Science of the Total Environment*, 356(1-3), 1–10.
- ChemiCoaching (2016). *Quienes Somos: ChemiCoaching*. Obtenido de ChemiCoaching Web site.

- Chen, B.-J., Jamaludin, N. S., Khoo, C.-H., See, T.-H., Sim, J.-H., Cheah, Y.-K., Tiekink, E. R. T. (2016). In vitro antibacterial and time kill evaluation of mononuclear phosphane-gold(I) dithiocarbamates. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 163, 68–80.
- Covarrubias, Y., Cantoral-Uriza, E. A., Casas-Flores, J. S., & García-Meza, J. V. (2016). Thermophile mats of microalgae growing on the woody structure of a cooling tower of a thermoelectric power plant in Central Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(2), 277–287.
- Eggleston, G. (2002). Deterioration of cane juice—sources and indicators. *Food Chemistry*, 78(1), 95–103.
- FAO. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo*.
- Finnegan, M., Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons, C., & Maillard, J. Y. (2010). Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: Differences between liquid and gas forms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(10), 2108–2115.
- Gardner, L. R., & Stewart, P. S. (2002). Action of glutaraldehyde and nitrite against sulfate-reducing bacterial biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 29(6), 354–360.
- Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703–715.
- Gracia, C. (2004). Bioetanol, 77–103. Obtenido de: http://www.ub.edu/ecologia/carlos.gracia/PublicacionesPDF/Capítulo_4_Bioetanol.pdf
- Gray, K. A., Zhao, L., & Emptage, M. (2006). Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(2), 141–146.
- Guiamet, P. S., & Gaylarde, C. (1996). Activity of an isothiazolone biocide against *Hormoconis resiniae* in pure and mixed biofilms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 395–397.
- Hauer, T., Čapek, P., & Böhmová, P. (2016). Main photoautotrophic components of biofilms in natural draft cooling towers. *Folia Microbiologica*, 61(3), 255–260.
- Joao, N. de V. (2015). Ethanol Fermentation. In S. Fernando, B. Aluizio, & C. Celso (Eds.), *Sugarcane, Agricultural Production, Bioenergy and Ethanol* (Vol. XXVII, pp. 308–315). Elsevier Inc.

- Leite, I. R., Faria, J. R., Marquez, L. D. S., Reis, M. H. M., De Resende, M. M., Ribeiro, E. J., & Cardoso, V. L. (2013). Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. *Fuel Processing Technology*, *106*, 611–618.
- Lucena, B. T. L., dos Santos, B. M., Moreira, J. L., Moreira, A. P. B., Nunes, A. C., Azevedo, V., ... de Moraes, M. A. (2010). Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology*, *10*(1), 298.
- Ludensky, M. (2005). Microbiological control in cooling water systems. In *Directory of Microbicides for the Protection of Materials* (pp. 121–139).
- Martori, A. (2005). Aplicación de biocidas y mantenimiento de una torre de refrigeración.
- Meneghin, S. P., Reis, F. C., Almeida, P. G. De, Ceccato-antonini, S. R., Paulista, U. E., Aplicada, M., & Claro, R. (2008). CHLORINE DIOXIDE AGAINST BACTERIA AND YEASTS FROM THE ALCOHOLIC FERMENTATION. *Brazilian Journal of Microbiology*, *337–343*.
- Merck Millipore. (2013). RQFlex plus 10. Reflectoquant® Lactic Acid, Catalog No. 16127/1.
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2014). Biocides. In *Encyclopedia of Toxicology* (Vol. 1, pp. 461–463).
- Milintawisamai, N., Weerathaworn, P., Niamsanit, S., Ngasan, C., Maungmontri, R., Buttapeng, W., Pliansinchai, A. (2009). Efficacy of dimethyl benzyl ammonium chloride and microbial contamination studies in a modern sugarcane milling unit in Thailand, *11*, 208–212.
- Mouchtouri, V. A., Goutziana, G., Kremastinou, J., & Hadjichristodoulou, C. (2010). Legionella species colonization in cooling towers: Risk factors and assessment of control measures. *American Journal of Infection Control*, *38*(1), 50–55.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (Junio de 2016). Legionelosis. Nota descriptiva. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs285/es>
- Ortega Morente, E., Fernández-Fuentes, M. A., Grande Burgos, M. J., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., & Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *162*(1), 13–25.

- Ortiz, J. F. (2015). Medida del crecimiento microbiano: cámaras de recuento microbiológico.
- Ortiz, J. F. (2015). Patrón de turbidez : Patrón McFarland.
- Ortiz, J. F. (2015). Mantenimiento y conservación de microorganismos industriales pruebas de viabilidad.
- Osbel, N., Fabian, C., & Rodolfo, E. (2014). Identificación y resistencia a biocidas de especies bacterianas predominantes en jugos mezclados de seis ingenios guatemaltecos. Universidad del Valle de Guatemala.
- Parra, J., Parrado, D., Martinez, M., Tello, M., Moreno, A., & Rivera, I. (2011). Acondicionamiento de la materia prima utilizada en la producción de etanol anhidro en el Ingenio Providencia. *Revista Técnicaña*, 27(Septiembre), 11–20.
- Pinos Rodríguez, J. M., & González Muñoz, S. S. (2000). Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia*, 25(8), 379–385.
- Rahmani, K., Jadidian, R., & Haghtalab, S. (2015). Evaluation of inhibitors and biocides on the corrosion, scaling and biofouling control of carbon steel and copper–nickel alloys in a power plant cooling water system. *Desalination*, 393, 174–185.
- Robert, H., Laurance, M., Gray, S., Marc, P., & David, R. (2012). Principles of Biochemistry (Fourth). PEARSON Prentice Hall.
- Safety, S. C. on C. (2012). Opinion on Nitrosamines and Secondary Amines in Cosmetic Products, *SCCS/1458*(March).
- Sanchez, J. F. (2002). Empleo de bactericidas para controlar la inversión de la sacarosa en el jugo de caña. Universidad Nacional.
- Sánchez-Saldaña, L., & Anduaga, E. S. (2005). Antisépticos Y Desinfectantes. *Antisépticos Y Desinfectantes Dermatología Peruana*, 15(2), 82–103.
- Santos, F., & Diola, V. (2015). *Physiology. Sugarcane*. Elsevier Inc.
- Skinner-Nemec, K. A., Nichols, N. N., & Leathers, T. D. (2007). Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Biotechnology Letters*, 29(3), 379–383.
- Singh, P., Arya, N., Tiwari, P., Suman, A., Rai, R. K., Shrivastava, A. K., & Solomon, S. (2008). Use of glutaraldehyde and benzalkonium chloride for minimizing post-

harvest physio-chemical and microbial changes responsible for sucrose losses in sugar cane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7176–7183.

Solomon, S. (2009). Post-harvest deterioration of sugarcane. *Sugar Tech*, 11(2), 109–123.

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (Novena ed.). Buenos Aires: Medica Panamericana.

Vardanyan, R., & Hruby, V. (2016). *Antibiotics. Synthesis of Best-Seller Drugs*.

10. ANEXOS

10.1 ANEXO 1. Concentraciones empleadas para evaluar la efectividad de los biocidas.

Tabla 1. Concentraciones empleadas para la evaluación de la efectividad de biocidas en el proceso de molienda de la caña de azúcar del I1.

Muestra	Biocida												Control
	B00			B01			B14			B30			
	10 ppm	25 ppm	50 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	
Jugo claro de báscula (BA). Volumen final 55ml	1.1 ml	2.75 ml	5.5 ml	1.1 ml	2.75 ml	5.5 ml	1.1 ml	2.75 ml	5.5 ml	1.1 ml	2.75 ml	5.5 ml	x
Jugo claro de molinos 1 y 2 (MO). Volumen final 160 ml	3.2 ml	8 ml	16 ml	3.2 ml	8 ml	16 ml	3.2 ml	8 ml	15 ml	3.2 ml	8 ml	16 ml	x
Jugo claro de filtración (FI). Volumen final 160ml	3.2 ml	8 ml	16 ml	3.2 ml	8 ml	16 ml	3.2 ml	8 ml	15 ml	3.2 ml	8 ml	16 ml	x

Fuente: Autor.

Tabla 2. Concentraciones empleadas para la evaluación de la efectividad de biocidas sobre BAL presentes en las destilerías de los ingenios 2, 3 4 y 5.

INGENIO	ENSAYO	BIOCIDA		
		B	C (ppm)	
Ingenio 2	1	B12	100 150 200	
		B22	50 75 100	
		B80	5	
	2	B12	175 250	
		B22	50 80 150	
		B80	5 8	
	3	B12	250	
		B22	150	
		B80	5 8	
		B97	5 10 15 30	
	Ingenio 3	1	B80	6 8
			B81	6 8
B97			15 30	
2		B80	2.5 5 7.5	
		B97	10 15 30	
Ingenio 4	1	B59	150 300 450	
		B80	4 6 8	
		B97	15 30 45	
Ingenio 5	1	B03	30	

			40
			50
		B81	6
			8
			10
			12
	2	B81	4
			6
			8
			10
		B90	4
			6
		8	
		10	
3	B03	15	
		30	
		45	
	B33	30	
		40	
	B81	8	
		10	
		12	
	B97	15	
		30	
		45	

Fuente: Autor.

Tabla 3. Concentraciones empleadas para la evaluación de la efectividad de biocidas sobre AM en las torres de enfriamiento 1, 2, 3, 4.

	Ensayo	BIOCIDA			
		B	C (ppm)		
TE1	1	B06	100 150		
		B08	175 200		
		B10	200		
		B50	150 200 300		
		2	B06	70 95	
			B08	175 200	
	B10		120		
	B50		100 200 250		
	3	B00	100 200 300		
		B01	100 200 300		
		4	B00	40	
			B01	80	
	5	B92	40 80 120		
			6	B10	15 30 40
				B92	40 80 120
	1	B10		140 160	
			B50	50 75 100	
				B59	30 45 60
		1			B00
			B01		

		B10	100 200 300
		B30	100 200 300
		B50	100 200 300
	1	B01	100 200 300
		B10	100 200 300
		B50	100 200 300
		B92	100 200 300
TE 4			

Fuente: Autor

10.2 ANEXO 2. Resultados de la determinación de la efectividad de los biocidas.

Tabla 4. Carga microbiana encontrada en I1.

Muestra	Tiempo (min)	Concentración bacteriana (unidades logarítmicas)												
		B00			B01			B14			B30			Control
		10 ppm	25 ppm	50 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	10 ppm	25 ppm	50 ppm	
Báscula (BA)	0	9.34	9.17	8.36	8.38	8.62	8.41	9.62	9.28	8.50	8.45	8.32	8.54	9.79
	20	9.21	8.23	8.50	8.68	8.53	8.08	8.88	8.45	8.36	8.55	8.39	8.59	9.87
Molinos (MO)	0	8.30	8.64	8.56	8.66	8.30	8.58	8.76	8.66	8.62	8.60	8.68	8.58	8.86
	20	8.70	8.77	8.20	8.77	8.73	8.30	8.56	8.47	8.55	8.64	8.41	8.34	8.89
Filtración (FI)	0	8.38	8.47	8.57	8.04	8.23	7.68	8.34	8.20	8.25	8.36	8.56	8.08	8.68
	20	8.30	8.39	8.54	8.17	8.16	8.14	8.39	8.23	8.17	8.30	8.36	8.62	8.59

Fuente: Autor.

Tabla 5. Concentración de BAL y ácido láctico, y porcentaje de viabilidad de levaduras en I2.

Ensayo	Biocida		Concentración BAL (log)			Ácido láctico (ppm)		Viabilidad levaduras (%)					
	B	ppm	0 h	4 h	6 h	0 h	6h	0 h	6 h				
1	B12	100	6.14	5.79	6.43	6200	7700	80	87				
		150		5.92	6.42		6100		-				
		200		5.99	6.39		7200		-				
	B22	50		6.13	6.27		8900		92				
		75		6.09	6.44		7800		-				
		100		6.12	6.49		8300		-				
	B80	5		6.18	6.35		7300		85				
	Control			6.04	6.55		6900		90				
	2	B12		175	5.13		5.02		5.20	5200	5800	83.7	-
				250			5.21		5.20		7000		94.4
B22		50	5.05	5.21		7100	-						
		80	5.15	5.10		10500	-						
		150	5.14	5.16		10000	79.7						
B80		5	5.08	4.88		14800	-						
		8	4.85	3.65		5900	82.9						
Control		5.15	5.19	8500		86.4							
3		B12	250	5.75		5.20	5.43	2620	2530		87.6		75.4
		B22	150			5.72	5.76		2530				80.1
	B80	5	5.76		5.47	2700	84.4						
		8	4.72		4.76	2700	70						
	B97	5	5.77		5.85	2680	81.2						
		10	5.71		5.77	2650	80						
		15	5.65		5.90	2650	74						
		30	5.92		5.80	2700	85.9						
	Control		5.67		5.63	2420	85.5						

Fuente: Autor.

Tabla 6. Concentraciones de BAL y ácido láctico encontrados en el I3.

Ensayo	Biocida		Concentración BAL (log)				Ácido láctico (ppm)	
	B	ppm	0 h	4 h	6 h	24 h	0 h	24h
1	B80	6	4.37	4.15	4.53	4.64	2310	2410
		8		4.05	4.97	4.64		2190
	B81	6		4.10	4.27	4.02		2590
		8		4.20	4.39	4.07		2290
	B97	15		4.61	4.18	4.01		2320
		30		3.97	3.36	3.98		2350
	Control			4	4.89	4.81		2700
2	B80	2.5	6.65	6.32	6.44	6.55	3680	4420
		5		6.56	6.41	6.55		4580
		7.5		6.30	6.33	6.40		3700
	B97	10		6.47	6.44	5.15		4010
		15		6.12	6.21	5.08		3790
		30		6.22	4.97	5.74		4090
	Control			6.51	6.59	6 .70		3970

Fuente: Autor

Tabla 7. Concentraciones de BAL y ácido láctico encontrado en el I4.

Ensayo	Biocida		Concentración BAL (log)			Ácido láctico (ppm)	
	B	ppm	0 h	4 h	6 h	0 h	6h
1	B59	150	6.22	5.91	5.95	2650	3350
		300		5.17	5.31		2380
		450		5.20	5.44		2210
	B80	4		5.67	5.62		2710
		6		5.69	5.49		2520
		8		5.34	4.32		2610
	B97	15		5.70	5.47		2870
		30		5.36	5.25		3350
		45		5.42	5.41		3050
	Control			5.94	6.17		3120

Fuente: Autor.

Tabla 8. Concentración de BAL y ácido láctico, y porcentaje de viabilidad de levaduras encontrados en I5.

Ensayo	Biocida		Concentración BAL (log)			Ácido láctico (ppm)		Viabilidad levaduras (%)					
	B	ppm	0 h	6 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h				
1	B03	30	5.84	4.66	3.87	2790	2840	58.9	59				
		40		4.54	3.82		2800		57.5				
		50		4.84	3.13		2800		50.1				
	B81	6		5.30	4.97		3270		71				
		8		5.08	4.15		2980		52				
		10		5.32	4.15		3230		56				
		12		5.32	4.04		3370		69				
	Control				5.90		5.87			3150		63.2	
	2	B81		4	5.57		5.54		4.08	5310	-	78.1	40
				6			5.62		4.60		5650		37.2
8			5.46	4.04		-	57						
10			4.60	4.88		5200	60.1						
B90		4	5.41	5.34		-	41						
		6	5.53	5.48		5650	52.2						
		8	5.47	5.14		-	57.6						
		10	5.38	4.69		5690	48.5						
Control			5.65	5.08			6750		45.7				
3		B03	15	4.18		3.90	3.44	4080	4030		66.1		68.5
	30		3.78		2.95	3900	70.0						
	45		3.60		2.95	3400	65.0						
	B33	30	3.45		3.93	3460	68.0						
		40	2.30		3.41	3120	72.0						
	B81	8	4.95		3.30	3770	67.7						
		10	4.20		3	3540	83.7						
		12	4.11		3.47	3590	77.7						
	B97	15	3.08		3.25	3600	78.5						
		30	3.30		2	3210	69.5						
		45	2.66		2.30	3290	70.5						
	Control				4.18	4.95			5690			65.8	

-No datos. Fuente: Autor.

Tabla 9. Concentración de AM encontrada en TE1.

Ensayo	Biocida		Concentración AM (log)		
	B	ppm	0 h	6 h	24 h
1	B06	100	5.21	2.3	3.38
		150		1	2.69
	B08	175		2	5.60
		200		1	6.98
	B10	200		2.47	3.33
	B50	150		1	3.90
		200		1	3.43
		300		1	3.84
	Control			5.64	5.39
2	B06	70	5.10	2.60	3.74
		95		2.30	3.99
	B08	175		2.30	4.87
		200		2	4.12
	B10	120		2.30	3.71
	B50	100		2	4.17
		200		1	3.98
		250		1	3.99
	Control			6.15	6.07
3	B00	100	5.79	2	5
		200		2.3	4.62
		300		1	1.47
	B01	100		1	4.11
		200		1	3.47
		300		1	1
	Control			6.03	6.20
4	B00	40	5.97	3.66	5.38
		80		3.34	5.20
	B01	40		2	4.81
		80		2	2
	Control			6.14	5.38
5	B92	40	5.08	3.17	5.08
		80		2.84	2.84
		120		2.3	2
	Control			5.54	5.54
6	B10	15	5.73	3	4.83
		30		2.3	3.90
		40		2.3	3.60
	B92	40		2.9	6.04
		80		2	5.65
		120		2	4.51
		Control		6.11	6.08

Fuente: Autor.

Tabla 10. Concentración de AM encontrada en TE2.

Ensayo	Biocida		Concentración AM (log)		
	B	ppm	0 h	6 h	24 h
1	B10	140	4.77	3.47	3.07
		160		3.39	3.16
	B50	50		2.60	2.47
		75		2.47	2.30
		100		2.30	2
	B59	30		4.59	5.89
		45		4.59	5.85
		60		4.77	5.13
	Control			5.15	5.89

Fuente: Autor.

Tabla 11. Concentración de AM encontrada en TE3.

Ensayo	Biocida		Concentración AM (log)		
	B	ppm	0 h	6 h	24 h
1	B00	100	5.25	2	2
		200		2	2
		300		2	2
	B01	100		2	2
		200		2	2
		300		2	2
	B10	100		4.56	3.02
		200		4.46	3
		300		3.95	3.93
	B30	100		5.25	5.20
		200		5	5.30
		300		5.14	5.36
	B50	100		2	2
		200		2	2
		300		2	2
	Control			5	5.98

Fuente: Autor

Tabla 12. Concentración de AM encontrada en TE4.

Ensayo	Biocida		Concentración AM (log)		
	B	ppm	0 h	4 h	6 h
1	B01	100	4.32	2	2
		200		2	2
		300		2	2
	B10	100		5.60	5.25
		200		5.47	4.81
		300		5.87	4.60
	B50	100		3	3.60
		200		3.30	3.30
		300		2	3
	B92	100		2	3.60
		200		2	2
		300		2	2
	Control			5.88	5.85

Fuente: Autor

10. 3 ANEXO 3. Imágenes tomadas durante el procesamiento de las muestras.

Figura 1. Sistema de fermentación.



Fuente: Autor.

Figura 2. Dilución para medición de concentración de ácido láctico.



Fuente: Autor.

Figura 3. Medición de ácido láctico con Reflectómetro Reflectoquant RQflex plus 10.



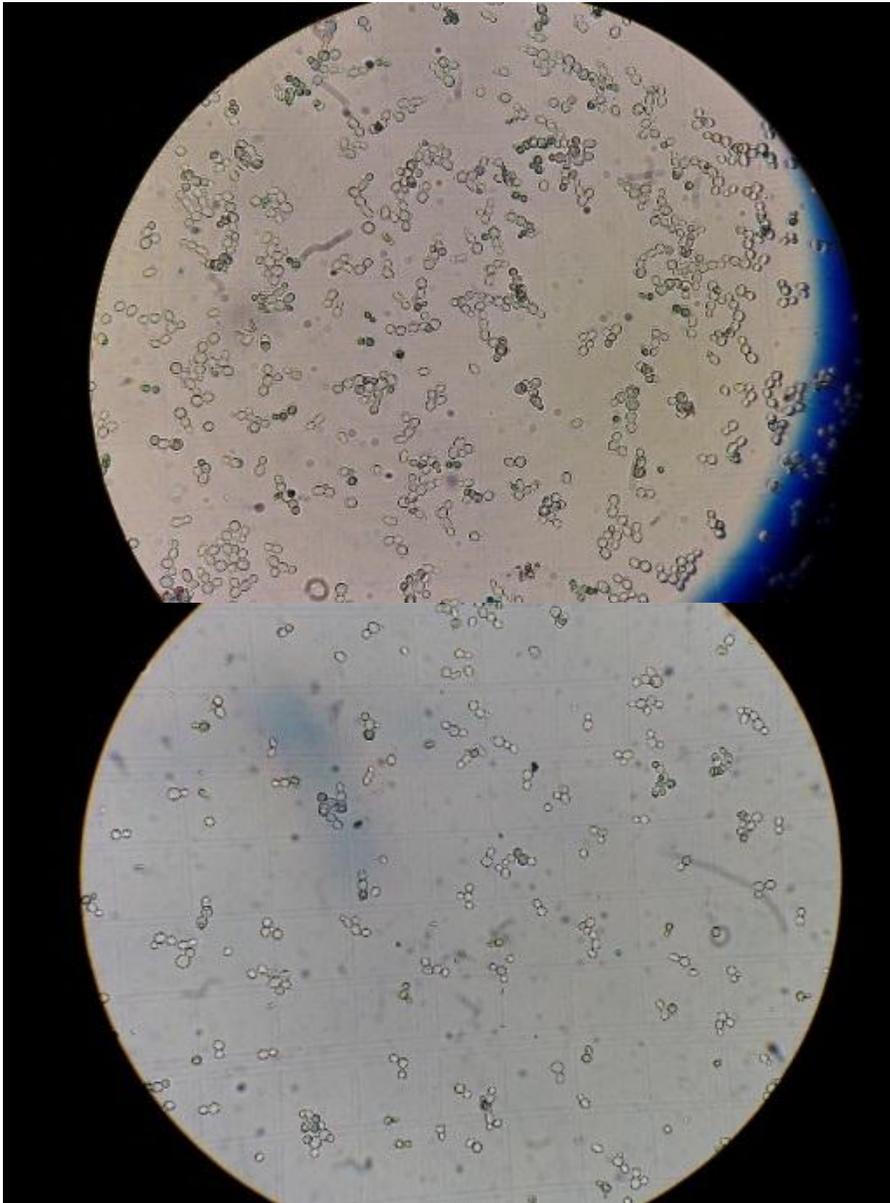
Fuente: Autor.

Figura 4. Dilución de muestra de mosto con adición de azul de metileno para recuento de levaduras.



Fuente: Autor.

Figura 5. Recuento de levaduras al microscopio, las células teñidas son contadas como muertas. Microscopio óptico 40x.



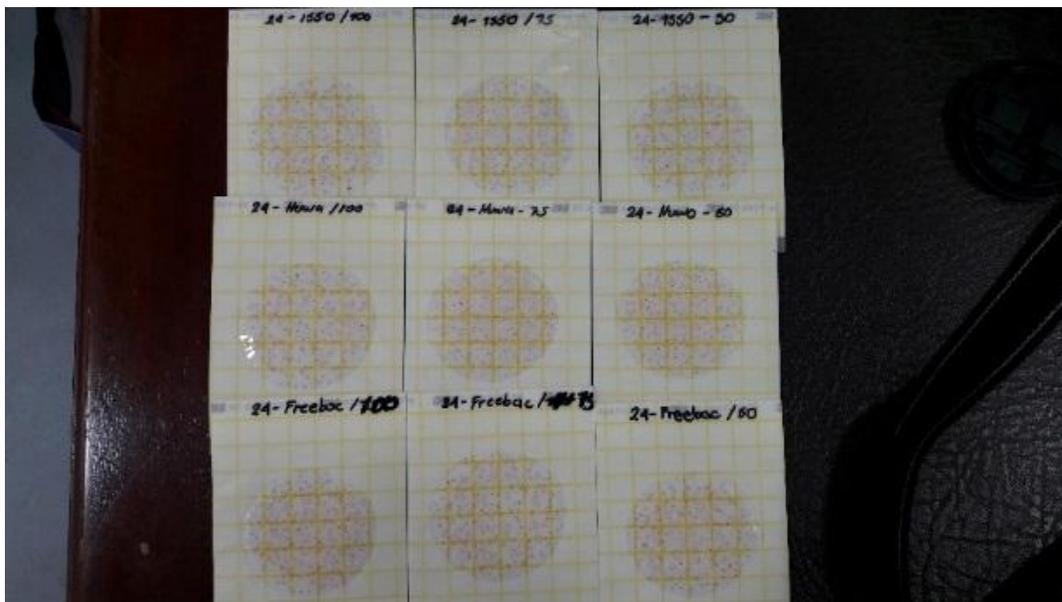
Fuente: Autor.

Figura 6. Cultivo de BAL provenientes de mosto, en cajas con agar MRS que contenía 5 % (v/v) de azul de anilina preparada al 0.1 % (p/v), y 5 % (v/v) de cicloheximida preparada al 1 % (p/v).



Fuente: Autor.

Figura 7. Cultivo de microorganismos AM provenientes de agua de una torre de enfriamiento en placas de recuento para bacterias aerobias Petrifilm.



Fuente: Autor.