



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## **CAMPUS PUEBLA**

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**DESARROLLO DE UN LACTOFERMENTO (LF-MB) CON PROPIEDADES  
AGRÍCOLAS MULTIFUNCIONALES EN CHIPILO, PUEBLA**

**JOSÉ ALFONSO BENÍTEZ DE LA TORRE**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PUEBLA, PUEBLA

2018



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

SUBDIRECCIÓN DE EDUCACIÓN  
CAMPUS PUEBLA

CAMPUE- 43-2-03

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR  
Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **José Alfonso Benítez de la Torre**, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Efraín Pérez Ramírez**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Desarrollo de un lactofermento (LF-MB) con propiedades agrícolas multifuncionales en Chipilo, Puebla**", y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, 12 de noviembre del 2018.

---

José Alfonso Benítez de la Torre

---

Vo. Bo. Profesor Consejero  
Dr. Efraín Pérez Ramírez

La presente tesis, titulada **Desarrollo de un lactofermento (LF-MB) con propiedades agrícolas multifuncionales en Chipilo, Puebla** realizada por el alumno **José Alfonso Benítez de la Torre**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN  
ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



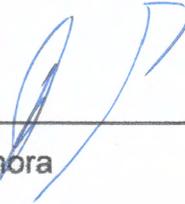
Dr. Efraín Pérez Ramírez

ASESOR:



Dr. Ramón Díaz Ruiz

ASESOR:



Dr. Porfirio Morales Almora

ASESORA:



Dra. Yolanda Elizabeth Morales García

ASESOR:



Dr. Jesús Muñoz Rojas

Puebla, Puebla, noviembre de 2018

# DESARROLLO DE UN LACTOFERMENTO (LF-MB) CON PROPIEDADES AGRÍCOLAS MULTIFUNCIONALES EN CHIPILO, PUEBLA

José Alfonso Benítez de la Torre

Colegio de Postgraduados, 2018

El lactosuero, subproducto generado durante la producción de queso, es uno de los residuos más contaminantes de la industria agroalimentaria. Su manejo inadecuado ocasiona un problema económico, social y ambiental, no obstante de ser un recurso con alto potencial biotecnológico considerando su contenido de nutrientes. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un biofertilizante para uso agrícola a base de lactosuero y cepas lácticas como una estrategia para su aprovechamiento. Se hizo un diagnóstico para evaluar el problema de contaminación por lactosuero en la región de estudio; se caracterizaron lactofermentos de 5 y 30 días de maduración obtenidos en fermentaciones aerobias, anaerobias con y sin agitación evaluando la efectividad de cepas lácticas certificadas y comerciales, individuales y en consorcio para utilizar lactosuero. Se estudió la capacidad de adhesión y colonización, producción de ácidos orgánicos e inhibición de plagas fungosas; y finalmente se hicieron pruebas de invernadero para evaluar su efecto en la promoción de crecimiento en maíz y alfalfa. Los principales resultados indican que el 70% de lactosuero que se vierte en acequias y drenajes tiene una fitotoxicidad del 37% y efectos subletales del 12% en maíz y alfalfa. Se desarrolló una tecnología para producir un lactofermento (LF-MB) y se evaluaron sus propiedades en la promoción de la germinación y desarrollo de maíz y alfalfa, solubilización de fósforo, e inhibición de plagas fungosas en comparación al suero sin inocular. Las características de los lactofermentos de 5 y 30 días de maduración presentaron diferencias significativas en cuanto a contenido de ácidos orgánicos y microorganismos viables ( $p < 0.05$ ), observándose diferencias en la germinación y promoción de crecimiento con el uso de cepas comerciales ( $p < 0.05$ ). No se demostró la reducción del tiempo para su elaboración con el uso de cepas certificadas. Con este trabajo se pretende contribuir al aprovechamiento de subproductos agroindustriales, al cuidado ambiental y al cambio a prácticas agrícolas más sustentables.

*Palabras clave: Alfalfa, aprovechamiento subproductos agroindustriales, maíz, microorganismos lácticos.*

## DEVELOPMENT OF A LACTOFERMENT (LF-MB) WITH MULTIFUNCTIONAL AGRICULTURAL PROPERTIES IN CHIPILO, PUEBLA

José Alfonso Benítez de la Torre

Colegio de Postgraduados, 2018

Cheese whey, a by-product generated during the production of cheese, is one of the most polluting residues in the agro-food industry. Its inadequate management causes an economic, social and environmental problem, despite being a resource with high biotechnological potential considering its nutrient content. The objective of this work was to develop a bio-fertilizer for agricultural use based on cheese whey and lactic acid strains as a strategy for its use. A diagnosis was made to evaluate the problem of whey contamination in the study region; lacto-ferments of 5 and 30 maturation days obtained in aerobic, anaerobic fermentations with and without agitation were characterized evaluating the effectiveness of certified and commercial lactic strains, alone and in consortium to use cheese whey. The adhesion and colonization capacity, the production of organic acids and the inhibition of fungal pests were studied, and finally greenhouse tests were carried out to evaluate their effect on the promotion of growth in corn and alfalfa. The main results indicate that 70% of cheese whey that is poured into irrigation ditches and drainages has a phytotoxicity of 37% and sub-lethal effects at 12% in corn and alfalfa. A simple and safe technology was developed to produce a lacto-ferment (LF-MB) and its properties were evaluated in the promotion of the germination and development of corn and alfalfa, phosphorus solubilization, and fungal pest inhibition in comparison to un-inoculated cheese whey. The characteristics of lacto-ferments of 5 and 30 days of maturation showed significant differences in content of organic acids and viable microorganisms ( $p < 0.05$ ). Differences were observed in germination and promotion of growth with the use of commercial strains ( $p < 0.05$ ). The reduction of the time for its elaboration with the use of certified strains was not demonstrated. This work is intended to contribute to the use of agro-industrial by-products, environmental care and change to more sustainable agricultural practices.

*Keywords: Alfalfa, utilization of agro-industrial by-products, lactic acid bacteria, maize.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se hizo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), mis asesores y al Colegio de Postgraduados

Dedicado a:

A mis hijos, padres y hermanos.

A quien ya sabe quién...

A mis maestros del Colegio de Postgraduados, principalmente a los doctores Miguel Sánchez, Pedro López, Francisco Calderón, Nestor Estrella, Adrián Argumedo.

A quienes forjaron en mí el interés por la investigación: Felipe Correa, Salvador Schiavón e Iván Lénin Montejo

A Yaneisy Álvarez, Pablo Beretelvide, Lourdes Rivas y Alma Chavero por su apoyo en el trabajo de campo, laboratorio, biblioteca y administración.

## CONTENIDO

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1.1 Planteamiento del problema .....	4
1.2 Objetivos .....	5
1.3 Hipótesis .....	6
1.4 Revisión de literatura .....	7
1.4.1 El aprovechamiento de residuos agroindustriales en el contexto agrícola .....	7
1.4.2 La otra biotecnología .....	10
1.4.3 Lactosuero: residuo con potencial biotecnológico .....	10
1.4.4 Contaminación por lactosuero .....	12
1.4.5 Aprovechamiento de lactosuero .....	14
1.4.6 Aprovechamiento agrícola del lactosuero .....	20
1.4.7 Preguntas de investigación .....	26
1.4.8 Literatura citada .....	26
CAPÍTULO II. ESTUDIO DE DIAGNÓSTICO: SITUACIÓN ACTUAL DE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES ECONÓMICAS Y PROBLEMAS AMBIENTALES OCASIONADOS POR LA ACTIVIDAD QUESERA .....	36
2.1 Resumen .....	36
2.2 Introducción .....	37
2.3 Metodología .....	38
2.3.1 Área de estudio .....	38
2.3.2 Etapas de la investigación .....	40
2.3.3 Muestreo .....	43
2.3.4 Análisis estadístico de resultados .....	43
2.4 Resultados y discusiones .....	44
2.4.1 Precisión de la problemática .....	44
2.4.2 Identificación del problema y propuesta de solución .....	44
2.4.3 Análisis de las alternativas de solución .....	47
2.4.4 Objetivo para la producción de lactofermentos .....	48
2.4.5 Resultados esperados .....	48

2.4.6 Conciencia ambiental de los actores relacionados con la actividad quesera	48
2.4.7 Contaminación por lactosuero	50
2.4.8 Tipos de unidades de producción (talleres de queso) y contaminación ambiental	52
2.5 Conclusiones	54
2.6 Literatura citada	55
<b>CAPÍTULO III. FITOTOXICIDAD DE LACTOSUEROS GENERADOS POR LA INDUSTRIA QUESERA DE LA REGIÓN DE CHIPILO, PUEBLA</b>	<b>58</b>
3.1 Resumen	58
3.2 Introducción	58
3.3 Materiales y métodos	60
3.3.1 Condiciones experimentales	60
3.3.2 Diseño experimental	63
3.3.3 Análisis estadístico de resultados	63
3.4 Resultados y discusión	63
3.5 Conclusiones	69
3.6 Literatura citada	69
<b>CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA Y FITOTÓXICA DE LACTOFERMENTOS ELABORADOS EN FERMENTACIONES AERÓBICAS, ANAERÓBICAS, CON AGITACIÓN Y SIN AGITACIÓN</b>	<b>71</b>
4.1 Resumen	71
4.2 Introducción	71
4.3 Materiales y métodos	72
4.3.1 Condiciones experimentales	72
4.3.2 Diseño experimental	75
4.3.3 Análisis estadístico de resultados	75
4.4 Resultados y discusión	75
4.5 Conclusiones	83
4.6 Literatura citada	83
<b>CAPÍTULO V. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LACTOFERMENTOS DE 5 Y 30 DÍAS DE MADURACIÓN ELABORADOS CON CEPAS COMERCIALES Y CERTIFICADAS, INDEPENDIENTES Y EN CONSORCIO</b>	<b>85</b>

5.1 Resumen.....	85
5.2 Introducción .....	85
5.3 Materiales y métodos .....	87
5.3.1 Condiciones experimentales.....	87
5.4 Resultados y discusión .....	90
5.4.1 Composición de ácidos orgánicos de lactofermentos de 5 y 20 días .....	90
5.4.2 Análisis fisicoquímico y microbiológico comparando lactofermentos de 5 y 30 días.....	93
5.5 Conclusiones .....	96
5.6 Literatura citada .....	97
CAPÍTULO VI. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS BENÉFICOS DEL LACTO-FERMENTO (LF-MB) EN ALFALFA ( <i>Medicago sativa</i> L.) Y MAÍZ ( <i>Zea mays</i> L.).....	
6.1 Resumen.....	99
6.2 Introducción .....	99
6.3 Materiales y métodos .....	101
6.3.1 Condiciones experimentales.....	101
6.3.2 Diseño experimental .....	103
6.3.3 Análisis estadístico de resultados.....	103
6.4 Resultados y discusión .....	103
6.5 Conclusiones .....	107
6.6 Literatura citada .....	107
CAPÍTULO VII. EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO CON EL LACTOFERMENTO (LF-MB) Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE MAÍZ ( <i>Zea mays</i> L.) .....	
7.1 Resumen.....	110
7.2 Introducción .....	110
7.3 Materiales y métodos .....	112
7.3.1 Condiciones experimentales.....	112
7.3.2 Diseño experimental .....	115
7.3.3 Análisis estadístico de resultados.....	115
7.4 Resultados y discusiones.....	116

7.4.1 Comparación del efecto de ácidos orgánicos y LF-MB en el desarrollo de maíz (etapa 1) .....	116
7.4.2 Solubilización de roca fosfórica <i>in vitro</i> (etapa 2).....	117
7.4.3 Determinación de la concentración óptima de roca fosfórica (etapa 3) .....	118
7.5 Conclusiones .....	124
7.6 Literatura citada .....	124
CAPÍTULO VIII. INHIBICIÓN IN VITRO DE <i>Fusarium sp.</i> , <i>Penicilium sp.</i> Y <i>Aspergillum sp.</i> POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) Y <i>K. marxianus</i> . .....	126
8.1 Resumen.....	126
8.2 Introducción .....	126
8.3 Materiales y métodos.....	128
8.3.1 Condiciones experimentales.....	128
8.3.2 Diseño experimental.....	130
8.3.3 Análisis estadístico de resultados.....	131
8.4 Resultados y discusión .....	131
8.5 Conclusiones .....	136
8.6 Literatura citada .....	137
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES GENERALES .....	139
PROPUESTA DE PLAN ESTRATÉGICO DE DESARROLLO LOCAL .....	140
ANEXOS .....	144

### LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de la composición proximal de la leche y del lactosuero.....	11
Cuadro 2. Principales formas de aprovechamiento de lactosuero: ponderación económica, aplicabilidad y contribución a la solución del problema.....	18
Cuadro 3. Criterios de puntuación utilizados para tipificar los talleres de queso en Chipilo, Puebla .....	42

Cuadro 4. Criterios de puntuación utilizados para estimar la contaminación ambiental por la actividad quesera en Chipilo, Puebla.....	42
Cuadro 5. Análisis de Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas (FODA) de la actividad quesera artesanal en la Región de Chipilo-Acatepec, Puebla.....	46
Cuadro 6. Propuestas de líneas de acción estratégica derivadas del análisis FODA de la actividad quesera artesanal en la Región de Chipilo-Acatepec, Puebla.....	47
Cuadro 7. Puntuación resultante en la tipificación de talleres queseros de Chipilo.....	52
Cuadro 8. Puntuación resultante en la estimación de contaminación ambiental ocasionada por las queserías de Chipilo.....	53
Cuadro 9. Tratamientos evaluados para determinar la concentración letal (CL <sub>50</sub> ) de lactosuero ácido y dulce en alfalfa.....	61
Cuadro 10. Tratamientos evaluados para determinar la concentración letal (CL <sub>50</sub> ) de lactosueros dulce en plántulas de alfalfa y maíz.....	62
Cuadro 11. Tratamientos realizados para evaluar efectividad de cepas y condiciones en la fermentación de lactosuero.....	74
Cuadro 12. Acidificación (pH) de lactofermentos inoculados con cepas individuales y en consorcio en 36 horas en fermentación anaeróbica estática.....	76
Cuadro 13. Producción de ácidos orgánicos en lactofermentos inoculados con cepas individuales y en consorcio durante 36 horas en fermentación anaeróbica estática.....	77
Cuadro 14. Producción de compuestos con capacidad amortiguadora en lactofermentos inoculados con cepas individuales y en consorcio durante 36 horas en fermentación anaeróbica estática.....	78
Cuadro 15. Efecto de la aplicación de diferentes tipos de lactofermentos en el desarrollo de alfalfa.....	81
Cuadro 16. Tratamientos para evaluar fermentaciones de lactosuero en 5 y 30 días con cepas lácticas individuales y en consorcio.....	89

Cuadro 17. Características fisicoquímicas y microbiológicas de lactofermentos de 5 días de maduración.....	94
Cuadro 18. Características fisicoquímicas y microbiológicas de lactofermentos de 30 días de maduración.....	95
Cuadro 19. Fitotoxicidad en alfalfa de lactofermentos inoculados con cepas certificadas y comerciales de 5 y 30 días de maduración.....	95
Cuadro 20. Tratamientos utilizados en la evaluación de adhesión (germinados) y colonización (plántulas) en alfalfa y maíz.....	102
Cuadro 21. Tratamientos para evaluar solubilización de roca fosfórica con ácidos orgánicos y lactofermentos.....	112
Cuadro 22. Tratamientos para evaluar solubilización de fosfatos con cepas lácticas <i>in vitro</i> .....	113
Cuadro 23 Tratamientos para determinar concentración efectiva del LF-MB en la solubilización de roca fosfórica.....	114
Cuadro 24. Efecto agrobiológico de la aplicación de ácidos orgánicos y lactofermentos en el desarrollo de plántulas de maíz de 45 días.....	116
Cuadro 25. Porcentaje de plantas que alcanzaron la etapa fenológica sometidas a diferentes tratamientos de roca fosfórica con y sin lactofermento (LF-MB).....	119
Cuadro 26. Número de hojas en plántulas de maíz tratadas con solución de roca fosfórica con y sin lactofermento.....	120
Cuadro 27. Longitud de vástago (centímetros) de plántulas de maíz tratadas con solución de roca fosfórica con y sin lactofermento.....	121
Cuadro 28. Respuesta fenológica de plántulas de maíz tratadas con roca fosfórica con y sin lactofermento a 45 días posteriores a la inoculación.....	123
Cuadro 29. Tratamientos para evaluar inhibición de plagas fungosas <i>in vitro</i> .....	129
Cuadro 30. Tratamientos para evaluar inhibición plagas fungosas en hidroponía.....	130

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localización del área de estudio: Chipilo de Francisco Javier Mina en el Estado de Puebla.....	39
Figura 2. Esquema de la problemática socio ambiental en la región de Chipilo-Acatepec, Puebla.....	45
Figura 3. Componentes de la evaluación de conciencia ambiental de los actores relacionados con la contaminación ambiental en Chipilo, Puebla.....	49
Figura 4. Evaluación de la conciencia ambiental de los actores relacionados con la contaminación ambiental de Chipilo Pue.....	50
Figura 5. Correlación entre el grado de tecnificación y el nivel de contaminación de los talleres queseros.....	54
Figura 6. Toxicidad de lactosueros dulce y ácido en la germinación de semillas de alfalfa.....	64
Figura 7. Efecto subletal de lactosuero dulce en la longitud total y longitud del hipocótilo de germinados de alfalfa de 10 días.....	66
Figura 8. Efecto subletal de lactosuero dulce en la biomasa total de germinados de alfalfa de 10 días.....	66
Figura 9. Toxicidad de lactosuero dulce en la emergencia de plántulas de maíz y alfalfa.....	67
Figura 10. Efecto subletal de lactosuero dulce la longitud y biomasa de plántulas de maíz de 45 días.....	68
Figura 11. Efecto subletal de lactosuero dulce en la longitud y biomasa de plántulas de alfalfa de 60 días.....	68
Figura 12. Efecto de lactofermentos anaerobios estáticos con cepas lácticas individuales y en consorcio en el desarrollo de germinados de alfalfa de 10 días..	78
Figura 13. Efecto de lactofermentos anaerobios estáticos con cepas lácticas individules y en consorcio en la germinación y producción de materia seca de germinados de alfalfa de 10 días.....	89

Figura 14. Cinéticas de pH, acidificación, capacidad amortiguadora y crecimiento microbiano en lactosuero inoculado con cepas lácticas individuales y en consorcio.....	80
Figura 15. Efecto de lactofermentos inoculados con cepas lácticas individuales y en consorcio en el desarrollo de germinados de alfalfa de 10 días.....	82
Figura 16. Composición de ácidos orgánicos en lactosuero separados por cromatografía de gases.....	91
Figura 17. Composición de ácidos orgánicos en lactofermento de 5 días separados por cromatografía de gases.....	91
Figura 18. Composición de ácidos orgánicos en lactofermento de 20 días separados por cromatografía de gases.....	92
Figura 19. Análisis comparativo de la composición de ácidos orgánicos de lactosuero y lactofermentos de 5 y 20 días.....	93
Figura 20. Curvas de titulación de suero y lactofermentos de 5 y 20 días.....	93
Figura 21. Adhesión y colonización de microorganismos lácticos (MB-LB) e inoculante multiespecies BUAP en radículas de maíz y alfalfa.....	104
Figura 22. Adhesión y colonización de microorganismos lácticos (MB-LB) e inoculante multiespecies BUAP en radículas de maíz y alfalfa.....	106
Figura 23. Solubilización de fosfato de calcio y roca fosfórica con LF.MB.....	118
Figura 24. Aparición de hojas con respecto al tiempo en plántulas de maíz tratadas con solución de roca fosfórica con y sin lactofermento.....	120
Figura 25. Longitud de vástago de plántulas de maíz tratadas con roca fosfórica con y sin lactofermento.....	122
Figura 26. Variables fenométricas de plántulas de maíz tratadas con lactofermentos y roca fosfórica.....	124
Figura 27. Inhibición <i>in vitro</i> de crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. por el consorcio BAL- <i>K. marxianus</i> en comparación al control negativo.....	132
Figura 28. Maíz inoculado con IME-BUAP expuesto a patógenos (control +) y Maíz inoculado con MB expuesto a patógenos.....	132
Figura 29. Efecto del consorcio BAL- <i>K. marxianus</i> en la mortalidad y daño en plántulas de maíz de 30 días infestadas con <i>Penicillium</i> sp.....	133

Figura 30. Efecto del consorcio BAL- <i>K. marxianus</i> en la mortalidad y daño en plántulas de maíz de 30 días infestadas con <i>Aspergillus</i> sp.....	133
Figura 31. Efecto del consorcio BAL- <i>K. marxianus</i> en la mortalidad y daño en plántulas de maíz (b) de 30 días infestadas con <i>Fusarium</i> sp.....	134
Figura 32. Efecto del lactofermento LF-MB en la mortalidad y daño en plántulas de maíz de 30 días infestadas con <i>Penicillium</i> sp.....	134
Figura 33. Efecto del lactofermento LF-MB en a) mortalidad y b) daño en plántulas de maíz de 30 días infestadas con <i>Aspergillus</i> sp.....	135
Figura 34. Efecto del lactofermento LF-MB en a) mortalidad y b) daño en plántulas de maíz de 30 días infestadas con <i>Fusarium</i> sp.....	135

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México como en el resto del mundo, el lactosuero, que es el subproducto que se genera durante la producción de queso, ocasiona un grave impacto cuando se vierte sin control al ambiente, además de que se desaprovecha una rica fuente de nutrientes considerando su contenido en azúcares, proteínas, vitaminas y minerales, los cuales son poco valorados en la actualidad (Londoño *et al.*, 2010; Palmieri *et al.*, 2017; Canellada *et al.*, 2018). La mayoría de las veces y en la mayoría de las regiones suburbanas, al no haber una opción técnica económica para su aprovechamiento, el lactosuero se tira sin ningún tratamiento ocasionando un problema económico, social y ambiental a pesar de ser un recurso con alto potencial (Miranda *et al.*, 2007; Palmieri *et al.*, 2017). El lactosuero contiene lactosa, proteínas de alto valor biológico comparadas a las del huevo, minerales como potasio, calcio, fósforo, sodio y magnesio, vitaminas del grupo B como tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico y cobalamina. Se estima que, en términos de su composición y de aporte energético, los sólidos del lactosuero son comparables a la harina de trigo (357 Kcal/100 g) (Inda, 2000). Investigaciones recientes han demostrado la diversidad de su uso, concluyéndose que sería más redituable utilizarlo que tirarlo (Wayne, 1994; Singh-Yaday *et al.*, 2015; Brandelli *et al.*, 2015; De Giorgi *et al.*, 2018).

El lactosuero es uno de los materiales orgánicos más contaminantes que existen en la industria alimenticia. Cada año entre 110 y 115 millones de toneladas métricas de suero de leche y 6 millones de toneladas de lactosa se generan en todo el mundo (Londoño, 2006). El porcentaje restante es tratado y transformado en varios productos alimenticios, de los cuales cerca del 45% es usado directamente en forma líquida, 30% en polvo, 15% como lactosa y el resto como concentrados de proteína de lactosuero (Panesar *et al.*, 2010). Además, otros usos se están proponiendo para explotar este recurso y evitar contaminación (Brandelli *et al.*, 2015; Singh-Yadal *et al.*, 2015; Prazeres *et al.*, 2016; De Giorgi *et al.*, 2018).

Desde hace más de 50 años la mitad del lactosuero generado se tira directamente a los hábitats acuáticos, lo que ha ocasionado un deterioro ambiental severo, por lo que es

necesario investigar opciones técnica social y ambientalmente viables para su manejo y tratamiento.

A Chipilo se le considera como una región próspera y de características particulares. Es una comunidad quesera de inmigrantes italianos con predominio de mano de obra familiar. Esta actividad, que se realiza desde hace más de 50 años, abastece principalmente al mercado de las ciudades de Puebla, Oaxaca y México, ha sufrido un retroceso constante que se ha agudizado de manera alarmante en los últimos años ocasionando una marcada tasa anual de cierre de unidades de producción (Cervantes *et al.*, 2007). Esta crisis comenzó entre 1994 y 1997, cuando el 78% de los productores de leche optaron por dedicarse a la fabricación de muebles rústicos, industria que tuvo éxito a nivel mundial pero que tuvo un súbito colapso económico cuando la principal empresa que comercializaba y exportaba la producción se declaró en quiebra.

Por otra parte la crisis económica de 1994-1995 afectó fuertemente en la disminución del poder adquisitivo familiar e impactó negativamente a la actividad agrícola lechera debido al incremento de los costos de producción y la disminución de la demanda de productos lácteos (Cervantes *et al.*, 2007). Esta situación prevalece en la actualidad con un lento retorno a la actividad lechera. No obstante, durante la última década se ha modificado la configuración espacial de la actividad lechera, lo que ha generado un avance de la especialización regional atribuible al avance del modelo tecnológico Holstein (Camacho-Vera *et al.*, 2017).

La actividad productiva en Chipilo está organizada en una cadena que comprende desde la producción de forraje, la cría de ganado lechero estabulado hasta la producción artesanal de derivados lácteos. La venta diaria de estos productos les permite tener un ingreso constante aunque muy fluctuante, caracterizado por un desequilibrio de las ganancias que pone en ventaja a quienes se dedican a la comercialización con respecto a quienes se dedican a la producción.

En Chipilo prevalece un mercado informal, tradicional y marginal poco tecnificado y sin regulaciones sanitarias, fiscales o administrativas, donde la lógica operativa productiva de los pastizales, establos y queserías son diferentes a la lógica industrial (Camacho-

Vera, 2017). La mayoría de los productores no entregan su producción a las plantas industrializadoras por diferentes causas, y son conocidos como el “sector informal de lácteos” caracterizados por el manejo y comercialización de leche en “bote” y por el establecimiento de industrias familiares con tecnología y equipo básico. La calidad de la materia prima, sanidad de proceso y nivel tecnológico, determina el tipo de productos que se comercializan, los cuales varían desde productos de muy baja calidad hasta aquellos de tipo “gourmet”.

Como parte de la cadena forrajes-derivados lácteos, además de los productores de pastos y leche, están involucrados los vendedores de materias primas, las descremadoras, las fábricas de hielo así como centros de distribución (abastecedores, supermercados, tiendas de queso, camionetas de reparto) con cobertura local y urbana, muchas veces organizados en empresas familiares. Los productores tienen la opción de vender su leche a empresas de lácteos, pero en general se destina a pequeñas queserías artesanales, las cuales son menos estrictas en cuanto a parámetros de calidad pero cuyo precio de compra no es tan estable como en el caso de las industrias formales.

En la región de Chipilo-Acatepec Puebla, las prácticas agrícolas intensivas, principalmente el sobre uso de agroquímicos (fertilizantes y pesticidas) ocasionan un considerable daño ambiental (contaminación de suelos y agua), riesgo de intoxicación a los trabajadores del campo, disminución de la productividad y empobrecimiento de la fertilidad de la tierra. Hay una fuerte disminución de los rendimientos productivos y de la calidad de los forrajes, escasez y contaminación del agua utilizada para riego y el crecimiento de la mancha urbana e industrial (Reyes *et al.*, 2010).

La baja calidad de los forrajes propicia una baja calidad en la leche (Kennedy *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016), y en consecuencia ocasiona pérdidas económicas para los agricultores y productores de quesos. No es costoso hacer un tratamiento de los residuos generados (principalmente lactosuero), por lo que se disponen de manera inadecuada aumentando el problema de la contaminación de suelos y agua (Singh-Yaday *et al.*, 2015). El nivel de aprovechamiento es bajo, y el problema de las cantidades que se genera se agrava por el uso de sales y aditivos químicos. No existen estudios sobre la cantidad, tipos y efectos de los lactosueros que se generan en la región, mucho

menos sobre quiénes lo generan y si lo aprovechan. No existen estudios particulares sobre la problemática y mucho menos sobre tecnologías apropiadas para su uso en el contexto del nivel socioeconómico de la región, por lo que el objetivo de este trabajo fue desarrollar un lactofermento con diferentes funciones agrícolas, con menor tiempo de fermentación para aprovechar en mayor cantidad el lactosuero, demostrar su efecto promotor de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.) en condiciones controladas de laboratorio-invernadero.

### **1.1 Planteamiento del problema**

La producción lechera y las actividades relacionadas como la elaboración de queso son actividades de importancia económica y social, debido al gran número de personas que participan, al tipo de producto y subproductos que se generan y consumen, y por su aporte a la economía regional en cuanto a ingresos, valor agregado y mano de obra. La producción artesanal de queso representa el sustento para muchos productores de comunidades rurales del mundo y un bien cultural alimentario de importancia económica que puede contribuir al desarrollo regional y a mejorar la seguridad alimentaria y nutricional (Gerrini y Prost, 2003; Agudelo y Cesín, 2013).

El problema de la contaminación ocasionado por la disposición de lactosuero en países desarrollados ha sido atacado mediante su aprovechamiento utilizando diferentes tecnologías y desarrollando productos con diferentes aplicaciones, lo que no sucede en México.

El problema del manejo y aprovechamiento de suero en México inicia con el desconocimiento de la cantidad que se genera, la forma como se aprovecha y/o desecha, su toxicidad y daño ambiental, y quién y dónde lo genera. Se estima que en el país existen alrededor de 10,921 unidades económicas de producción de derivados lácteos (INEGI, 2014). Tan sólo en Chipilo, Puebla, hay más de 30 queserías de diferente capacidad productiva, y cada una genera en promedio 1,000 L de suero al día. Las unidades de producción (talleres), generalmente de características artesanales y poco tecnificadas, se ubican en las afueras de la zona urbana pero también dispersas en lugares apartados, aislados y de difícil acceso, lo que dificulta el manejo adecuado de los residuos e impacta negativamente en la calidad del ambiente y de la salud de quienes

viven cerca (Valencia y Ramírez, 2009). Se aprovecha una proporción muy baja del suero que se genera, principalmente para alimentación animal y elaboración de requesón. El resto se tira ocasionando un efecto adverso en los cuerpos de agua donde se dispone, y en los campos de cultivo regados con sus aguas, por lo que es necesario desarrollar una tecnología apropiada a productores de subsistencia, que no les represente un esfuerzo extra ni un gasto económico significativo, y que tenga un beneficio ambiental y económico.

El aprovechamiento de lactosuero en el medio rural dependerá en gran medida del desarrollo y validación científica de tecnologías sencillas y de bajo costo, así como del desarrollo de productos enfocados a resolver necesidades puntuales.

Considerando los problemas ambientales derivados de la disposición inadecuada de lactosuero, sumado al sobre uso de fertilizantes en los campos agrícolas, es necesario estudiar el uso potencial del suero tratado por procesos biotecnológicos con el objetivo de darle un aprovechamiento integral a sus componentes: agua, lactosa, proteína, sales, vitaminas, microbiota y los metabolitos que se producen durante su fermentación.

En este trabajo consideramos que el problema no es la alta cantidad de lactosuero que se genera, sino su bajo aprovechamiento, por lo que planteamos la posibilidad de elaborar un biofertilizante vivo, con cepas microbianas seguras, eficientes en la degradación de lactosa, y que se elabore de manera sencilla con materias primas locales disponibles aprovechando un residuo agroindustrial.

La importancia económica, ambiental y social de la propuesta de este trabajo reside en la posibilidad de utilizar un residuo agroindustrial altamente contaminante pero con potencial biotecnológico.

## **1.2 Objetivos**

### **General**

Desarrollar un lactofermento con diferentes funciones agrícolas, con menor tiempo de fermentación para aprovechar en mayor cantidad el lactosuero, demostrar su efecto promotor de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.) en condiciones controladas de laboratorio-invernadero.

## **Particulares**

Estimar la cantidad, fuentes puntuales más importantes, tipos y toxicidad de los lactosueros que se generan en la región de Chipilo, Puebla.

Evaluar la factibilidad de iniciar un proyecto de aprovechamiento de lactosuero como parte de una estrategia de desarrollo local considerando la actitud ambiental, apoyo y recursos de los actores involucrados.

Elaborar un lactofermento (LF-MB) a partir de lactosuero, sacarosa y cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* y *Kluyveromyces marxianus*, y hacer su caracterización fisicoquímica, microbiológica y toxicológica.

Evaluar la efectividad de *L. acidophilus*, *S. thermophilus* y *K. marxianus* de manera individual y en consorcio para fermentar lactosuero así como para adherirse y colonizar maíz (*Z. maíz* L) y alfalfa (*M. sativa* L).

Evaluar diferentes tiempos de fermentación para encontrar aquel con menor tiempo y mayor efectividad.

Evaluar la capacidad del LF-MB como inoculante y como biofertilizante en la promoción de crecimiento de maíz (*Z. maíz* L) y alfalfa (*M. sativa* L).

## **1.3 Hipótesis**

### **General**

Es factible aprovechar el lactosuero que se genera en las queserías artesanales de Chipilo para elaborar un lactofermento funcional para aplicaciones agrícolas, con recursos locales y reduciendo el tiempo efectivo de elaboración a partir de cepas lácticas eficientes.

### **Específicas**

No existen opciones técnicas para aprovechar la cantidad y tipo de lactosueros que se generan en Chipilo, Puebla, por lo que se tira de manera inadecuada

Las autoridades, productores de queso y agricultores locales no están suficientemente concientes (sensibilizados, e informados) sobre el manejo de lactosuero y no cuentan con apoyo institucional ni los recursos económicos necesarios para implementar una estrategia de desarrollo local con el componente de aprovechamiento de lactosuero.

Es factible elaborar un lactofermento de manera sencilla y segura, disminuyendo el tiempo de elaboración a 5 días, con cepas lácticas eficientes en la degradación de lactosa y producción de ácidos orgánicos.

El lactofermento (LF-MB) es efectivo como promotor de crecimiento en maíz y alfalfa. Los microorganismos que contiene interactúan de manera benéfica y suministran compuestos bioactivos como ácidos orgánicos que nutren a la planta coadyuvando en la asimilación de fósforo y en el control de plagas.

## **1.4 Revisión de literatura**

### **1.4.1 El aprovechamiento de residuos agroindustriales en el contexto agrícola**

La agricultura es la fuente no puntual más grande de contaminación del agua, como lo demuestra la presencia de pesticidas y agroquímicos en el agua subterránea y alimentos, la eutrofización de los lagos y las mareas rojas en las costas, la salinización y la erosión del suelo. Por otra parte, el aumento de la resistencia de las plagas y malezas ocasionado por el uso extensivo e indiscriminado de fertilizantes y pesticidas químicos sintéticos ha contribuido a agravar los problemas ambientales y de salud (Pazos-Rojas *et al.*, 2016).

Para contribuir a revertir esta situación, se ha impulsado el desarrollo de sistemas agropecuarios sostenibles, los cuales son modelos definidos a nivel territorial con identidad cultural que procuran utilizar los recursos de forma eficiente en todas las etapas de producción. Su objetivo es obtener la mayor cantidad y calidad posible de productos agropecuarios, principalmente alimentos, aprovechando cada gota de agua, parcela de tierra, partícula de fertilizante y minuto de trabajo con el fin ahorrar recursos, detonar el desarrollo de la región y hacer sostenibles los sistemas productivos a largo plazo. Estos sistemas precisan, además del aprovechamiento de los recursos naturales y de las ventajas competitivas de cada región, la utilización de los residuos orgánicos disponibles tanto subproductos, mermas, estiércol y los desperdicios del consumo alimentario para

reintegrarlos al suelo y utilizarlos como fertilizantes, o bien, para producir bioenergía. También requieren de la adopción generalizada de prácticas que conserven la calidad del suelo y agua, por lo que se da prioridad a labores de cultivo sustentables y prácticas de control biológico que reduzcan los riesgos de plagas y enfermedades sin contaminar o exponer a los espacios, trabajadores o a los bienes agroalimentarios producidos (Garibaldi *et al.*, 2017). En este sentido, el aprovechamiento de subproductos es preponderante en la implementación de dicha estrategia (CRAF, 1989).

La contaminación es el resultado de la ineficiencia de los procesos desarrollados por el hombre durante la extracción de materias primas, la fabricación de productos, el uso de la energía necesaria para la fabricación, y hasta el producto mismo cuando ya no es útil y se desecha sin control (Wagner, 1996). Son muchas las industrias que generan residuos orgánicos altamente contaminantes que pueden tener un uso biotecnológico potencial, entre ellas se encuentran los beneficios de café, destiladoras, rastros, productoras de harinas de hueso, la tecnología agrícola y la industria láctea, entre otras (Chaudhari and Dhoble, 2010; ChangRong *et al.*, 2014; Obruca *et al.*, 2014).

En la década de los 70 una parte importante de los biotecnólogos del mundo enfocaron sus investigaciones hacia la utilización y aprovechamiento de los residuos agroindustriales para la producción de compuestos útiles como insumos de otros procesos industriales. Inicialmente la prioridad se centró en la generación de productos con valor agregado. Actualmente se sumó la prioridad de aprovechar los residuos para reducir el impacto ambiental que ocasionaba su inadecuada disposición (Bota, 2003).

Costa *et al.* (1991) definen residuo como la materia que se genera en las actividades de producción y consumo que no han alcanzado, en el contexto en que se producen, ningún valor económico por la falta de tecnología adecuada para su aprovechamiento o por falta de mercado para los productos que se pudieran obtener de él después de su tratamiento. Su manejo, habitualmente poco adecuado, puede ocasionar serios problemas de contaminación ambiental, por lo que para resolver este problema es necesario estudiarlos y aprovecharlos.

Los residuos o subproductos agro industriales (RAI) son sólidos o líquidos que se generan durante el procesado y/o consumo de productos agropecuarios, susceptibles de ser aprovechados o transformados para generar otro producto de valor económico, social o ambiental (Mejías-Brizuela *et al.*, 2016). En general los RAI son poco valorados, “no existe una clara conciencia ambiental de su manejo”, tecnologías ni recursos para aprovecharlos o en su caso darles una adecuada disposición. Tampoco hay leyes adecuadas o incentivos fiscales para gestionar un adecuado manejo y aprovechamiento desde el momento en que se generan hasta que finalmente se desechan (de la cuna a la tumba), situación que prevalece desde la revolución industrial hasta nuestros días en todo el mundo (Saval, 2012).

Si los RAI se desechan en la intemperie sin ningún tratamiento, su descomposición los puede convertir en residuos peligrosos en función de sus características físicas, químicas y biológicas (corrosividad, toxicidad y presencia de agentes biológico infecciosos) causando daño potencial a humanos, animales y recursos naturales.

Saval (2012) establece algunos criterios de selección de RAI para ser aprovechados en procesos biotecnológicos:

- Que el principal constituyente del RAI puede utilizarse como sustrato para la producción fermentativa de insumos de procesos industriales o que pueda someterse a extracciones para recuperar algunos de sus componentes.
- Que el producto obtenido del proceso tenga un mercado demandante.
- Que el RAI esté disponible localmente en cantidad suficiente para asegurar la fabricación de un producto de interés.
- Que no tenga otras aplicaciones o usos que compitan con el proceso que se promueve.
- Que no requiera pre tratamiento, o en su caso, que éste sea sencillo y económico.
- Que no se descomponga fácilmente bajo las condiciones ambientales donde se genera.

En este contexto, los procesos biotecnológicos son claves en el aprovechamiento de los residuos agroindustriales.

### **1.4.2 La otra biotecnología**

El desarrollo de la biotecnología ha revolucionado la forma de producir alimentos, medicamentos, textiles y muchos bienes de consumo causando un impacto significativo en el desarrollo económico a nivel mundial. La ingeniería genética se puede definir como “el conjunto de técnicas de manipulación de organismos vivos o de sus constituyentes con el objetivo de producir nuevos productos de utilidad económica y social” (Perera *et al.*, 2002), lo que ofrece esperanzas en la disminución de problemas como el hambre, la contaminación y la enfermedad (Bota, 2003). No obstante, existen muchos autores que dudan de su contribución al desarrollo y algunos afirman que profundizará dependencia tecnológica y económica hacia los países desarrollados y las empresas monopólicas. El debate actual se centra en las dudas sobre su impacto y particularmente en los efectos de los productos transgénicos en la salud y el equilibrio ecológico.

Existen otras opciones biotecnológicas que pueden ayudar a mejorar la actual crisis de la actividad agropecuaria, además de contribuir a la conservación del medio ambiente y al desarrollo socioeconómico, como la selección de especies mejoradas, la producción de biopesticidas, controles biológicos de plagas, la rehabilitación de la microfauna de la tierra el uso de biofertilizantes, la nanotecnología y la reincorporación o aprovechamiento de residuos agroindustriales (Wezel *et al.*, 2014; Moueden *et al.*, 2017; Prazad *et al.*, 2017; Embadi *et al.*, 2017).

### **1.4.3 Lactosuero: residuo con potencial biotecnológico**

El lactosuero o suero de leche es el líquido residual de la transformación de la leche en queso, caseína y derivados caseínicos. Es un líquido translúcido obtenido por separación del coágulo de caseína durante la elaboración de queso (Jelen, 2002). Según el método utilizado para elaborar queso, de 100 L de leche procesada se obtienen entre 85 y 90 L de suero, de los cuales 5 Kg son de lactosa, 0.9 de proteína no coagulable de alto valor biológico y 0.3 de grasa de leche equivalentes a los requerimientos proteicos diarios de 13 personas, y a los requerimientos calóricos diarios de 10 personas (Inda, 2000). Además contiene sales minerales como potasio, calcio, fósforo, sodio y magnesio, ácidos orgánicos, tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico,

cobalamina, ácido ascórbico (Londoño *et al.*, 2010), urea y sus derivados (Meyrath y Bayer, 1979). Las proteínas del lactosuero tienen excelentes propiedades funcionales y un valor nutritivo muy alto debido a su contenido en lisina, triptófano y aminoácidos azufrados (Singh-Yaday *et al.*, 2015). El lactosuero contiene el 55% de los nutrientes de la leche, como se puede apreciar en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Comparación de la composición proximal de la leche y del lactosuero.**

	Leche	Lactosuero
Agua	87.99 g	93.12 g
Proteínas (N x 6.38)	3.29 g	0.85g
Grasa	3.34 g	0.36 g
Carbohidratos	4.66 g	5.14 g
Cenizas	0.72 g	0.53 g
Calcio	119 mg	47 mg
Hierro	0.05 mg	0.06 mg
Magnesio	13 mg	8 mg
Fósforo	93 mg	46 mg
Potasio	152 mg	161 mg
Sodio	49 mg	54 mg
Zinc	0.38 mg	0.13 mg
Ácido ascórbico	0.94 mg	0.10 mg
Tiamina	0.038 mg	0.036 mg
Riboflavina	0.162 mg	0.158 mg
Niacina	0.084 mg	0.074 mg
Ac. Pantoténico	0.314 mg	0.383 mg
Vitamina B6	0.042 mg	0.031 mg
Folacina	5 micro g	1 micro g
Vitamina B12	0.357 micro g	0.277micro g
Vitamina A	126 UI	16 UI
Colesterol	14 mg	2 mg

Adaptada de: "Composition of foods, dairys & egg products" Agricultural Research Service, 1976

Existen varios tipos de lactosuero dependiendo del tipo de queso que se elabore y de la forma como se precipite la caseína. El primero, denominado dulce, se obtiene por coagulación con renina a pH 6.5. El segundo llamado ácido, resulta del proceso de fermentación (inducida o natural) o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína (Jelen, 2002).

#### 1.4.4 Contaminación por lactosuero

A nivel mundial se generan al año entre 110-115 millones de toneladas métricas de lactosuero durante la elaboración de queso (Londoño, 2010; Guerrero *et al.*, 2012), del cual, aproximadamente el 50% es procesado y transformado en varios productos alimenticios, farmacéuticos y agropecuarios: el 45% es usado directamente en forma líquida, 30% en polvo, 15% como lactosa. El resto se procesa para obtener concentrados de proteína de lactosuero (Panesar *et al.*, 2010), y una pequeña fracción se emplea para alimentar cerdos o terneros (Ramírez, 2011). El otro 50% se desecha en ríos, lagos y acopios de aguas residuales, o en el suelo (Kacprzak *et al.*, 2010).

Carvalho *et al.* (2013) definen al lactosuero o aguas residuales de quesería como “un efluente orgánico-salino cuya caracterización y tratamiento no se ha estudiado suficientemente”. Para Rajeshwari *et al.* (2000), el lactosuero es el residuo más contaminante generado en la producción de queso, y considerado por Sánchez *et al.* (2004) como uno de los contaminantes más severos que existen a nivel ambiental. Para Callejas *et al.* (2012) el lactosuero se ha considerado por años como un desecho que se prefiere verter sin tratamiento provocando la contaminación de mantos freáticos y suelos. Tanto la composición y volumen de generación de lactosuero, que anualmente se incrementa en un 3%, sumado a la incapacidad de las pequeñas y medianas empresas lácteas para aprovecharlo de una manera rentable, ocasionan que gran parte de su producción sea desechada como efluente sin ningún tratamiento, lo que ubica a esta práctica como una amenaza considerable para el medio ambiente (Berruga *et al.*, 1997).

Según Krzystek y Ledakowicz (2000) el lactosuero genera cerca de 35 gL<sup>-1</sup> de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 de demanda química (DQO), valor que concuerda con el reportado por Muñi *et al.* (2005) y el de Ramírez (2011) para la DBO que varía entre 20 y 50 gL<sup>-1</sup>. Por su parte Guerrero *et al.* (2012) reportan de 40 a 60 gL<sup>-1</sup> de DBO y entre 50 y 80 gL<sup>-1</sup> de DQO. Ávila *et al.* (2000) reportan una DBO entre 30 y 50 gL<sup>-1</sup> y una DQO entre 60 y 80 gL<sup>-1</sup>. Prazeres *et al.* (2012) reportan un DBO y DQO en el rango de 0.1 a 100 gL<sup>-1</sup> con un índice de biodegradabilidad (DBO<sub>5</sub>/COD) en el intervalo de 0.4 a 0.8.

Una industria quesera media que produce diariamente 40 mil L de suero sin depurar genera una contaminación diaria similar a una población de mil habitantes (Perea *et al.*, 1993). Jelen (2002) equipara la fuerza contaminante de un litro de lactosuero a la de las aguas negras producidas en un día por 0.45 personas mientras que Ramírez (2011) estima el mismo parámetro de 2.5 a 3 L de suero sin depurar.

Diversos autores concuerdan en que la lactosa es el principal componente de sólidos que contribuye a la carga orgánica de los efluentes de quesería (Ghaly y Kamal, 2004; Koutinas *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2009), pero el contenido de proteínas como la caseína, grasas como la butírica, sólidos suspendidos y nutrientes como N y P también contribuyen a los niveles de contaminación (Prazeres *et al.*, 2012).

No obstante que el lactosuero es 99% biodegradable (Ergüder *et al.*, 2001), la lactosa posee un tipo de enlace entre sus azúcares que hace que muchos microorganismos no sean capaces de utilizarla (Berruga *et al.*, 1997). La composición de los efluentes de queso en términos de la relación carbono fósforo y nitrógeno C:P:N es de 200:3.5:1 que en aplicaciones agrícolas se considera como no balanceada.

Además de su alto contenido orgánico, los efluentes de queso representan un residuo con impacto ambiental significativo debido a su alto contenido en sales minerales, consecuencia de la adición de NaCl como parte del proceso tradicional en la elaboración de queso (entre 0.46 y 10%) principalmente NaCl y KCl y sales de calcio (principalmente cloruros y fosfatos) (Venetsaneas *et al.*, 2009). Los residuos de quesería también varían en cuanto a su contenido en sólidos suspendidos totales (entre 0.1 y 22 kg m<sup>3</sup>) y pH (entre 3.3 y 9.0).

La enorme variabilidad de la composición y poder contaminante de los efluentes de quesería determina la complejidad tecnológica para su aprovechamiento. Al respecto, Parra (2009) reporta que dicha variabilidad depende del tipo de leche, tipo de queso elaborado y el proceso de tecnología empleado. Carvalho *et al.* (2013) la atribuyen a la calidad de la materia prima utilizada y la cantidad de agua de limpieza utilizada. Para Ramírez (2011) la variabilidad está determinada por el tipo de queso que se elabora (para el queso fresco se utiliza cloruro de sodio y de calcio, para quesos madurados se

utilizan adicionalmente fosfatos y nitratos), el tratamiento térmico de la cuajada que determina el porcentaje de proteína del suero resultante, la forma de coagulación (ácida o enzimática) y por el tipo de cuajo empleado (microbiano, quimosina o mezclas quimosina/pepsina). La variabilidad también puede deberse a la calidad de la leche utilizada (cabra, vaca, oveja y búfala), raza, alimentación, la salud y la etapa de lactancia (De Wit, 2001). Sumado a los factores mencionados, la composición del suero depende del manejo veterinario de los animales, prácticas de los fabricantes de queso, y de la mezcla con otros efluentes.

Los residuos de quesería pueden ocasionar daño al ambiente si se descargan en sistemas acuáticos o terrestres; sin embargo es poco lo que se conoce con respecto a su efecto a la atmósfera en el caso de que los residuos se sequen por efecto solar y sean arrastrados por el viento, pero se deduce que, cuando su carga en coliformes es alta, es similar a la del fecalismo al aire libre. Con respecto a la contaminación de sistemas acuáticos, Prazeres *et al.* (2012) afirman que la descarga de los efluentes de queso plantean un riesgo considerable de eutrofización atribuible principalmente a los contenidos de materia orgánica y fósforo que reducen la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto debido a la acción microbiana que transforma la materia orgánica en compuestos que disminuyen el pH del agua, la producción de malos olores y la muerte de los organismos acuáticos que allí se encuentren (Londoño *et al.*, 2010).

No obstante que la mayoría de los talleres de queso eliminan sus efluentes por descarga directa a aguas receptoras o al campo sin ningún tratamiento previo, existe la opción de utilizar tanques o lagunas de almacenamiento, descargarlos al sistema municipal de alcantarillado donde se diluye y mezcla con aguas residuales menos contaminadas como las domésticas (Minhalma *et al.*, 2007), o incluso utilizarlos en alimentación animal (Carvalho *et al.*, 2013), siendo el uso de efluentes lácteos en prácticas agrícolas poco significativo (Malaspina *et al.*, 1996).

#### **1.4.5 Aprovechamiento de lactosuero**

El problema del aprovechamiento de lactosuero reside en su alto contenido de agua (93-95%) que aumenta los costos de transporte y los procesos de secado o concentración.

Para Cury *et al.* (2014) y Parra, (2009), la problemática del manejo de lactosuero reside en los altos volúmenes producidos y su vertimiento sin haber sido sometido a tratamiento. Cury *et al.* (2014) alertan sobre el riesgo de utilizar el suero que proviene de la acidificación espontánea de la leche, como el que se hace en algunos talleres para la producción de queso, en donde la materia prima se fermenta de manera natural por la acción de microorganismos que provienen de la leche cruda o del ambiente. Esta reacción es favorecida por los sustratos que contiene el lactosuero y la temperatura ambiental, pero estas fermentaciones se producen de manera no controlada de modo que en algunos casos podrían representar un riesgo para la salud humana y el ambiente considerando que es un medio propicio para el desarrollo de enteropatógenos, por lo que es conveniente realizar fermentaciones controladas empleando microorganismos y condiciones adecuadas antes de ser vertido.

Araujo *et al.* (2013) destacan su potencial para ser utilizado como fuentes de energía en procesos biotecnológicos con microorganismos seleccionados, con lo que además se contribuiría a solucionar un problema ambiental. Recientemente se ha tomado conciencia de su importancia por su elevado valor nutricional, tanto para el hombre como para el ganado (Abaigar, 2009). Callejas *et al.* (2012) concluyen que el lactosuero se ha considerado por años como un desecho debido a que no se ha valorizado adecuadamente, por lo que el lactosuero debería considerarse no como un subproducto de desecho sino como una alternativa de desarrollo alimentario. Parra (2009) y Ramírez (2011) proponen el cambio de clasificación del lactosuero de “desecho” a “co-producto”, y generar un portafolio de aplicaciones industriales para contribuir a evitar la contaminación medio ambiental y recuperar el valor monetario de este producto. Si al lactosuero se le diera un mejor aprovechamiento generaría ingresos adicionales a las empresas y se lograría disminuir su impacto contaminante de manera más eficaz, contribuyendo al desarrollo de nuevos procesos productivos generando así mayores beneficios para la empresa y el ambiente (Araujo *et al.*, 2013).

La contaminación ambiental producida por la disposición del lactosuero motiva a la continua búsqueda de tecnologías efectivas que permitan el aprovechamiento de este subproducto (Sánchez *et al.*, 2004). El lactosuero es una excelente materia prima para

obtener diferentes productos a nivel tecnológico o como medio de formulación en procesos fermentativos (Parra, 2009). Según Allen *et al.* (1995), la elaboración de productos a base de efluentes de quesería representa un área en crecimiento dentro de la industria láctea. Baró *et al.* (2001) concluyen que el lactosuero representa una rica y variada mezcla de proteínas que poseen un amplio rango de propiedades químicas, físicas y funcionales con potencial para producir determinados efectos biológicos y fisiológicos *in vivo*.

El mercado de los productos a base de lactosuero ha tenido un incremento del 12% desde 1995, sin embargo su demanda es baja. A nivel mundial, el lactosuero es tratado y/o transformado en productos de aplicación en la industria alimenticia, farmacéutica, química y agropecuaria, principalmente por procesos industriales y por métodos biotecnológicos. Según Posada *et al.* (2011), entre los principales productos que se obtienen a partir de lactosuero destacan algunos obtenidos de procesos diferentes:

#### **1.4.5.1 En procesos artesanales**

Requesón: Aunque es un producto de alta calidad nutrimental, es poco valorado y utilizado en nuestro país, además de que tiene la desventaja de que se genera un segundo suero, más contaminante que el primero por su pH y contenido en sales neutralizantes como el bicarbonato de sodio.

#### **1.4.5.2 En procesos industriales**

Suero en polvo. Tiene la ventaja de que la contaminación se reduce al 100%, sin embargo se requiere equipo que eleva los costos de producción y el producto no ha tenido la aplicación ni aceptabilidad necesaria, por lo que su venta apenas cubre los costos de procesamiento y transporte. Entre los usos reportados destacan su utilización como fertilizante, alimento para becerros, cabras y cerdos, así como en la elaboración de bebidas refrescantes, panadería y quesos tipo “mysot” (Inda, 2000).

Los concentrados proteicos de suero de leche (WPC por sus siglas en inglés) (Gazi and Huppertz, 2015) se obtienen por sistemas de ultrafiltración. Estos productos obtenidos pueden ser utilizados en elaboración de alimentos especiales para deportistas y para

augmentar el valor nutricional de productos de panadería, pastas, embutidos, fórmulas infantiles y otros, sin embargo, la fortificación no es una práctica común en nuestro país dado el costo que representa. Por otra parte, la inversión en el equipo requerido es muy alta como para ser aplicada a las necesidades y situación del país, además de que la competencia con WPC's importados disminuye la posibilidad de inversión en este tipo de industria. Es importante hacer mención que la obtención de WPC's no resuelve el problema de la contaminación al mantenerse la cantidad de lactosa que permanece en el permeato (González, 1996).

#### **1.4.5.3 En procesos biotecnológicos**

Considerando que la lactosa es el mayor componente de los sólidos del suero (40-50 g/L), en los últimos años se han estudiado diversos procesos biotecnológicos para su aprovechamiento (Rayan and Walsh, 2016), incluyendo la posibilidad de utilizarlo como sustrato en la producción de proteína unicelular, principalmente levaduras y microalgas (Moulin y Galzy, 1984), bebidas alcohólicas (Delaney, 1981), producción de ácido láctico (Oliveira *et al.*, 1996), polihidroxibutirato (Nath *et al.*, 2008) y polihidroxialcanoato (Bosco y Chiampo, 2010) los cuales se utilizan en la producción de plástico biodegradable y elastómeros; la producción de alimentos para rumiantes, así como alimento para peces (Smithers, 2008).

Idealmente se debería hacer un uso integral del lactosuero con la combinación de procesos: aprovecharlo en procesos artesanales para obtener las lactoalbúminas (requesón), posteriormente aprovecharlo vía biotecnológica y de ser posible hacer un proceso industrial para obtener metabolitos de mayor valor económico. En el Cuadro 2 se resumen las principales formas de aprovechamiento de lactosuero, así como su ponderación económica, aplicación y contribución a la solución del problema de contaminación.

**Cuadro 2. Principales formas de aprovechamiento de lactosuero: ponderación económica, aplicabilidad y contribución a la solución del problema.**

	Costo	Aplicable	Contribuye a la solución
Proceso industrial			
Suero polvo	+++	++	+++
Concentrado proteico	+++	+++	+
Lactoferrina	+++	+++	+
Procesos biotecnológico			
Proteína unicelular	+	+++	+++
Bioenergía(metano-etanol)	++	+++	+++
Biofertilizante	+	+++	+++
Proceso mixto			
Enzimas (lactosidasas)	++	+++	+++
Vitaminas	++	+++	+++
Ácidos, Aminoácidos	++	+++	+++

Donde +: poco; ++: medio; +++: alto.

Según Prazeres *et al.* (2012) se pueden considerar dos opciones o estrategias diferentes para el aprovechamiento de efluentes de quesería. La primera se basa en la aplicación de procesos industriales para recuperar directamente del lactosuero sus proteínas y lactosa, considerando su valor económico, nutricional y funcional (Domínguez *et al.*, 1999) en diferente grado de pureza: cruda, comestible o grado farmacéutico según sea su aplicación (Bund y Pandit, 2007). En este sentido, se están desarrollando nuevos tratamientos fisicoquímicos como la ultrafiltración, coagulación, floculación, ozonación, precipitación térmica e isoelectrónica, precipitación termocálcica, precipitación ácida-alcalina y oxidación electroquímica que permiten obtener productos de mejor calidad generando un subproducto menos contaminante, tecnologías que por ahora no se han aplicado totalmente a nivel industrial debido a su costo.

La segunda opción utiliza procesos biotecnológicos considerando su contenido en macro y micronutrientes, y elementos traza que los microorganismos necesitan para desarrollarse adecuadamente. Los estudios más relevantes sobre el aprovechamiento del lactosuero corresponden a procesos fermentativos, los cuales permiten comprobar que las transformaciones biotecnológicas son las más recomendadas para alcanzar el mayor potencial de esta materia prima (Castillo *et al.*, 1996; González, 1996; Valencia, 2008; Panesar *et al.*, 2010, Ramírez, 2011). Entre las principales aplicaciones destacan la producción de proteína unicelular, biogás y biofertilizantes.

La tercera opción se basa en la combinación de proceso biotecnológicos e industriales para obtener metabolitos de alto valor económico de manera purificada como la producción de glucosa, galactosa, péptidos y aminoácidos; derivados de la lactosa como la lactulosa; enzimas como la galactosidasa; antibióticos como las bacteriocinas; vitaminas como la tiamina. También se puede obtener ácido láctico y sus derivados, así como ácido butírico, butanol, ácido acético, glicerol, acetona, etanol e hidrógeno. Una nueva vertiente ha surgido en torno a la producción de proteínas monocelulares a través de procesos fermentativos controlados y posteriormente en procesos industriales para su purificación (González, 1996).

Alternativamente, se pueden obtener productos a base de lactosuero con procesos más sencillos y económicos que han tenido amplia aplicación en la industria alimenticia. Entre los productos de exitosa aceptación debido a sus bajos costos de producción, grado de calidad alimenticia y aceptable sabor, se encuentran las bebidas refrescantes (Londoño *et al.*, 2010, Miranda, 2007), bebidas fermentadas, y alcohólicas, proteína unicelular, biopelículas (Almeida *et al.*, 2009), levadura de panadería, probióticos, galletas, bizcochos, endulzantes, espesantes para sopas, espesantes para salsas y aderezos, (Castillo *et al.*, 1996; González, 1996; Kosikowski, 1979), lista que seguramente se incrementará con los avances en manipulación genética enfocada a aumentar la capacidad de producción microbiana.

Jelen (2002) afirma que es necesario adaptar los procesos para convertir la lactosa proveniente del lactosuero en un sustrato útil con el fin de optimizar la fermentación

microbiana. En este sentido, Yang y Silva (1995) realizaron varios trabajos con el objetivo de acondicionar el lactosuero para optimizar procesos fermentativos, entre los que destacan la hidrólisis de sus proteínas y disacáridos, logrando obtener una fuente de nitrógeno adecuado para promover el crecimiento, y eliminar o reducir la necesidad de suplementar, desmineralizar o hidrolizar la lactosa.

El uso de microorganismos específicos correctamente suplementados permite incrementar el rendimiento de la producción de productos de fermentación (Ramírez, 2011) por lo que estudios más recientes se han enfocado al uso de cepas microbianas con capacidad de aprovechar la lactosa. Al respecto, Siso (1996) considera que el número de microorganismos comercialmente disponibles capaces de metabolizar la glucosa y la galactosa es significativamente mayor que el número de microorganismos capaces de utilizar directamente la lactosa. Por su parte Berruga *et al.* (1997) describen la hidrólisis de lactosa como un pre tratamiento necesario para el aprovechamiento del suero de queso. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo por medio de la enzima lactasa (que se encuentra en animales, plantas, bacterias, hongos y levaduras) que convierte el disacárido de lactosa en sus componentes monosacáridos, glucosa y galactosa. Las principales cepas utilizadas en este proceso son *Aspergillus* sp. y *Kluyveromyces* sp. (Siso, 1996). Pero otros microorganismos como las bacterias tienen la capacidad de hidrolizar lactosa, como *Bacillus* strain B-2 (Kamran *et al.*, 2016), *Paenibacillus barengoltzii* (Liu *et al.*, 2017) y *Pediococcus acidilactici* (Chanalia *et al.*, 2018).

Sin embargo, y no obstante de que en la actualidad existe una amplia gama de tecnologías para el aprovechamiento del lactosuero, es necesario buscar opciones más sencillas y económicas que puedan ser aplicadas y adaptadas considerando las condiciones que prevalecen en el medio rural, como la producción de biofertilizantes o la producción de biogás.

#### **1.4.6 Aprovechamiento agrícola del lactosuero**

¿Es posible utilizar el lactosuero directamente en aplicaciones agrícolas? Diversos estudios muestran dos posturas radicalmente opuestas:

El primer grupo presenta en sus trabajos evidencias negativas. Cuando se vierte en tierra, el lactosuero afecta física y químicamente la estructura del suelo (Saddoud *et al.*, 2007; Dragone *et al.*, 2009), ya que los sólidos suspendidos y sales que contiene quedan atrapados al actuar el suelo como un filtro, lo que concuerda con las investigaciones realizadas por Carvalho *et al.* (2013), sumados a los problemas de impermeabilización e intercambio de gases que resultan en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas como ha sido reportado por Aider *et al.* (2009), Parra (2009) y Araujo *et al.* (2013). El contenido de sales disminuye la disponibilidad de agua para las plantas, afectando su crecimiento y productividad. Por otra parte, algunos estudios reportan daños en los cultivos debido al rápido consumo de oxígeno en el suelo y la rápida caída del potencial redox (350 mV) (Sharratt *et al.*, 1959).

Una de las razones de mayor peso para no utilizar directamente el suero de queserías en aplicaciones agrícolas es el riesgo de introducir vectores ecológicos y sanitarios nocivos, ya que los gérmenes patógenos encontrados en el suero de leche se pueden propagar y difundir en la cadena agroalimentaria. Dentro de los gérmenes patógenos detectados en leche que provienen de ambientes insalubres, utensilios, estiércol, piel y pelos del animal destacan: *Microbacterium lactium*, *Micrococo luteos*, *M. varians*, *Clostridium* sp., levaduras como *Torulopsis holmii*, *T. sphaerica*, *T. globosa*, aerobios como *Pseudomonas putrefaciens*, *P. fluorecens*, *Streptococos liquefaciens*, *Achromobacter lipoliticum*; levaduras como *Candida lipolitica* que producen rancidez. *Bacillus cyanogenes*, *Cianoflavium prodigiosum*, *Serratia marcescens*, *Sacarina roseae*, *Bacterium lacticus níger* y *Torula nigra*. *Bacillus lactis*, *B. amori*, *Micrococcus lactis* y *M. amori* producen alergias (hinchazón). *Micrococcus fragariore*, *M. fragi*, *Flaurecens liquefaciens*, *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp. y *Yersinia* sp. (FAO-OMS, 2009).

Por otra parte, los investigadores que están a favor del uso de lactosuero afirman que como la mayoría de los sólidos presentes en el lactosuero son azúcares y proteínas susceptibles de biodegradación, los efluentes de quesería contribuyen a mejorar la agregación del suelo (Kelling y Peterson, 1981) y su fertilidad (Jones *et al.*, 1993; Robbins y Lehrs, 1992; Sharratt *et al.*, 1962; Watson *et al.*, 1977), fundamentando esta práctica

en el contenido de materia orgánica, vitaminas, hormonas y nutrientes tales como fósforo, calcio, sodio, potasio, magnesio y cloruro. Robbins y Lehrs (1998) reportan la aplicación exitosa de los efluentes de quesería en la recuperación de suelos sódicos (cuando el porcentaje de sodio supera el 15%) disminuyendo el pH, y modificando la relación de adsorción de sodio, la capacidad de intercambio catiónico (Jones *et al.*, 1993) y el aumento de su capacidad de floculación. Las propiedades fertilizantes de los efluentes de quesería se han demostrado en suelos ácidos en áreas de precipitación alta a moderada y también en suelos calcáreos con propiedades alcalinas neutras (pH entre 7.6 y 8.8) bajo riego en un clima árido (Robbins y Lehrs, 1998). Lehrs *et al.* (2008) obtuvieron una mayor estabilidad de la agregación entre 14 y 25% y una reducción del 75% de las pérdidas de sedimentos del suelo calcáreo degradado en los surcos de riego en pruebas con lactosuero. Estos autores afirman que los residuos de quesería pueden mejorar la estructura de los suelos erosionados o no sódicos y concluyen que la materia orgánica presente en el lactosuero se biodegrada a CO<sub>2</sub>, ácidos orgánicos y nitratos y que los polisacáridos pueden ayudar a estabilizar los agregados formados (Allison, 1968).

Diversos autores recomiendan el uso de lactosuero para aplicaciones agrícolas en condiciones específicas y sólo de manera controlada. Robbins y Lehrs (1998) recomiendan el uso de efluentes de quesería siempre y cuando se diluyan a una proporción igual o mayor a 1:20 con agua limpia para obtener una calidad de agua de riego aceptable (de 40 a 60 kg ha<sup>-1</sup> de sal total). Otros alertan que una aplicación excesiva puede conducir a una disminución del rendimiento (Sharratt *et al.*, 1962).

#### **1.4.6.1 Biofertilizantes con lactosuero: los lactofermentos**

Los lactofermentos son biofermentos elaborados a partir de lactosuero, melaza y microorganismos eficientes también conocidos como microorganismos de montaña (Pacheco, 2003). Como otros productos similares, constituyen una herramienta agrícola que puede sustituir a los abonos químicos de alta solubilidad, pero con la característica de que no se elaboran con excrementos animales, es decir, están libres de coliformes, además de que contribuyen al aprovechamiento de un subproducto agroindustrial altamente contaminante. Los lactofermentos son el resultado de un proceso fermentativo

de la actividad de microorganismos saprófagos, donde la lactosa del suero de leche es transformada principalmente en ácidos orgánicos y vitaminas. Estos abonos líquidos, además de nutrir a las plantas al aumentar la biodisponibilidad de minerales, funcionan como inóculos microbianos que coadyuvan a restaurar el equilibrio microbiano de los agrosistemas. Por otra parte, los microorganismos presentes en los lactofermentos, al colonizar la superficie de las plantas, presentan relaciones antagónicas y de competencia con diferentes microorganismos fitopatógenos, como en el caso de *Fusarium* sp. que se inhibe en presencia de ácido láctico (Chávez y Mac Donald, 2005) contribuyendo a la prevención y combate de enfermedades agrícolas.

#### **1.4.6.2 Inoculantes con lactosuero: microorganismos promotores de crecimiento vegetal**

Los lactofermentos, además de contener microorganismos de montaña, se adicionan con bacterias ácido lácticas (BAL) las cuales tienen en el suero de leche las condiciones óptimas para su desarrollo y contribuyen a solubilizar el fósforo y otros nutrientes en el suelo (Pacheco, 2003). Por otra parte es poco lo que se ha reportado respecto al uso de lactosuero como medio nutritivo en la propagación de microorganismos reconocidos como promotores del crecimiento vegetal, o la producción industrial de metabolitos de interés agrícola en fermentaciones controladas, como la producción de fitohormonas (ácido glucónico o ácido indol acético entre otros).

La actividad promotora del crecimiento está relacionada con mecanismos tales como la fijación biológica del nitrógeno y la capacidad de sintetizar fitohormonas o promover la nutrición mediante la solubilización de fosfatos, pero también pueden estimular el crecimiento indirectamente, protegiendo las plantas contra hongos y bacterias patógenas del suelo.

#### **1.4.6.3 Solubilización de fosfatos con ácidos orgánicos de lactofermentos**

Se pueden obtener diferentes ácidos orgánicos a través de la fermentación de lactosuero, como el butírico, propiónico y acético (Alam *et al.*, 1988). González (1996) reporta, además de los anteriores, al cítrico, glucónico, itacónico y lactobiónico. El ácido láctico se utiliza en las industrias alimenticia, farmacéutica, textil y curtiente debido a sus

propiedades como conservante y como acidulante (Pauli y Fitzpatrick, 2002; Roukas y Kotzekidou, 1998; Tango y Ghaly, 1999). Se han utilizado efluentes de suero de queso en procesos de fermentación para producir ácido láctico (Mostafa, 1996; Pescuma *et al.*, 2008; Plessas *et al.*, 2008; Roukas y Kotzekidou, 1998; Silva y Yang, 1995; Tango y Ghaly, 1999), pero no existen reportes de su aplicación en agricultura. Los microorganismos principalmente utilizados para la producción de ácido láctico son *Lactobacillus casei* (Mostafa, 1996; Pauli y Fitzpatrick, 2002; Roukas y Kotzekidou, 1998), *Lactobacillus helveticus* (González *et al.*, 2007; Kulozik y Wilde, 1999; Plessas *et al.*, 2008; Silva y Yang, 1995; Tango y Ghaly, 1999); *Lactobacillus delbrueckii* (Pescuma *et al.*, 2008; Plessas *et al.*, 2008); *Lactococcus lactis* (Roukas y Kotzekidou, 1998); *Lactobacillus salivarius*, *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp. (Panesar *et al.*, 2010). *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* (Pescuma *et al.*, 2008); *K. marxianus* (Plessas *et al.*, 2008) y algunos trabajos se han enfocado a la producción de ácidos orgánicos con consorcios (Plessas *et al.*, 2008; Roukas y Kotzekidou, 1998) reportándose efectos sinérgicos.

Se han adjudicado a los ácidos orgánicos muchas funciones en el suelo: adquisición de nutrientes por la raíz, solubilización de minerales, quimiotaxis microbiana y la detoxificación de metales pero aún se desconocen diversos procesos por la falta de evidencias experimentales que expliquen las reacciones de los ácidos orgánicos en el suelo (Jones *et al.*, 1993).

Los ácidos orgánicos son constituyentes normales de la mayoría de los suelos agrícolas, y aunque su función no ha sido bien definida, existen evidencias que indican su efecto fisiológico en el crecimiento de las plantas (Illmer y Shinner, 1995; Igual *et al.*, 2001). Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular incrementan la biodisponibilidad de formas insolubles de varios nutrimentos de las plantas como P y Ca (Goldstein, 1986), no obstante de que la concentración de ácidos orgánicos en el suelo normalmente es baja (de 1 a 50  $\mu\text{M}$ ) (Strobel, 2001).

Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular poseen uno o dos grupos carboxilo lo que determina sus propiedades de disociación y la capacidad de formar complejos con cationes metálicos en solución y el desplazamiento de aniones de la solución del suelo

(Stevenson, 1967). La acción de los ácidos orgánicos en la solubilización de minerales se debe a su pH y a su capacidad para formar complejos estables con Calcio, Magnesio, Hierro y Aluminio, reacciones similares ocurren al prevenir la fijación de fosfatos añadidos al suelo como fertilizantes reduciendo su precipitación (Illmer *et al.*, 1995). Struthers y Sieling (1959) observaron que la efectividad de los ácidos orgánicos para prevenir la precipitación de fosfatos por Hierro y Aluminio se incrementa progresivamente con el número de grupos hidroxilos debido a la formación de complejos más estables.

Durante los últimos 10 años el conocimiento de los microorganismos solubilizadores de fosfatos ha aumentado significativamente. Se consideran PGPRs a aquellos organismos que pueden vivir en el suelo de manera asociada, y son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta para favorecer su crecimiento y desarrollo (Bashan, 1998; Lugtemberg and Kamilova, 2009; Glick, 2014; Molina-Romero *et al.*, 2015; Ahmad *et al.*, 2018).

La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por microorganismos es uno de los mecanismos más ampliamente conocidos de la solubilización de fósforo que lo hace más disponible para la nutrición de las plantas. Se han reportado varios tipos de bacterias capaces de solubilizar fosfatos: *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Achromobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Aerobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Erwinia* sp., *Paenibacillus* sp. y *Bacillus subtilis* entre otros (Goldstein, 1986; Ahmad *et al.*, 2018) y al ácido glucónico y 2 ceto glucónicos como los principales agentes solubilizadores (Mukhopadhyaya *et al.*, 2005).

A pesar de la diversidad de tecnologías propuestas para el aprovechamiento de lactosuero, no se ha desarrollado un proceso rentable a nivel rural para el aprovechamiento de los grandes volúmenes de suero producidos cada año. La variabilidad en las características fisicoquímicas y microbiológicas de los efluentes de quesería, así como su poder contaminante en suelos agrícolas y cuerpos de agua dificulta la posibilidad técnica para su aprovechamiento.

#### 1.4.7 Preguntas de investigación

¿Cuánto lactosuero se genera y cómo se dispone en Chipilo, Puebla? ¿Qué actores sociales podrían contribuir al aprovechamiento de lactosuero? ¿Cómo es su actitud ante el problema del manejo de lactosuero? ¿Es factible aprovechar el lactosuero que se genera en las queserías artesanales de Chipilo para elaborar de manera sencilla y segura un lactofermento que pudiese tener aplicaciones agrícolas utilizando recursos locales? El lactofermento (LF-MB) propuesto ¿Produce un efecto benéfico en el desarrollo de maíz y alfalfa? ¿Se puede mejorar la formulación de los lactofermentos con cepas certificadas? ¿Se puede reducir su tiempo de elaboración?

#### 1.4.8 Literatura citada

- Abaigar, A. (2009) El lactosuero en la alimentación del ganado porcino. ITG Ganadero pp. 13-17.
- Agudelo L. y Cesín Vargas, A. (2013) Evaluación socioeconómica de los productores de queso Bola de Ocosingo, Chiapas1 ICAR, Universidad Autónoma del Estado de México; UAER, Coordinación de Humanidades, UNAM.
- Ahmad, L., Hilger, T. H., Nadeem, S.M., Akhtar, M.F., Jamil, M., Hussain, A y Zahir, Z.A. (2018). Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. PeerJ 6:e5122; DOI 10.7717/peerj.5122.
- Aider M; Halleux, D. y Melnikova, I. (2009) Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. Innovative Food Science and Emerging Technologies 10(3): 334-341.
- Alam S, Stevens D. y Bajpai, R. (1988) Production of butyric acid by batch fermentation of cheese whey with *Clostridium beijerinckii*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2(6): 359-364.
- Allen G. J., Jones, R.G. y Leigh R.A. (1995) Sodium transport measured in plasma membrane vesicles isolated from wheat genotypes with different K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> discrimination traits. Plant Cell Environ. (18): 105-115.
- Allison, F. E. (1968) Soil aggregation-some facts and fallacies as seen by a microbiologist. Soil Sci. 106 (2): 136-143.
- Almeida K. E., Tamime, A.Y. y Oliveira M.N. (2009) Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. LWT - Food Science and Technology 42(2): 672–678.

- Araujo, G., Monsalve L.M. y Quintero, A.L. (2013) Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de la contaminación ambiental. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 4 (2):55-65.
- Ávila, R., Cárdenas, A. y Medina, A. (2000) Tratamiento del lactosuero utilizando la técnica de hemodiálisis. *Interciencia* 25 (2): 80-84.
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Ferez, A. y Bouza, J. (2001) Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España.
- Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* (16): 729–770.
- Berruga, M. I., Jaspe, A. y San Jose, C. (1997) Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 40(2):119-123.
- Bosco, F. y Chiampo, F. (2010) Production of polyhydroxyalcanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge. Production of bioplastics using dairy residues. *J. Biosci. Bioeng.* 109(4): 418-421.
- Bota, A. (2003) El impacto de la biotecnología en américa latina. Espacios de participación social. *Acta Bioethica*; 9(1).
- Brandelli A., Joner-Daroit, D. y Folmer-Corrêa, A. (2015) Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res. Int.* 73:149–161.
- Bund, R. y Pandit, A. (2007) Rapid lactose recovery from buffalo whey by use of “anti-solvent, ethanol”. *Journal of Food Engineering* 82(3): 333-341.
- Callejas, J., Prieto, F., Reyes, V., Marmolejo, Y y Méndez, M. (2012) Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencial de recuperación de fósforo. *Acta Universitaria. Universidad de Guanajuato* 22(1):23-31.
- Camacho-Vera, J. H., Cervantes, F., Palacios, M.I., Cesín, A.y Ocampo, J. (2017) Especialización de los sistemas productivos lecheros en México: la difusión del modelo tecnológico Holstein. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 8(3):259-268.
- Canellada, F., Laca, A. y Díaz, M (2018) Environmental impact of cheese production: A case study of a small-scale factory in southern Europe and global overview of carbon footprint. *Science of the Total Environment.* 635:167–177.
- Carvalho, F., Prazeres, A. y Rivas, J. (2013) Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the total environment* 445-446.
- Castillo, M; Jordán, M., Abellán, A., Laencina, J. y López, M (1996) Tecnología de aprovechamiento de lactosuero. *Revista española de lechería* (74):24-30.

- Cervantes, E. F., Cesín Vargas, A. y Pérez Sánchez, S.L. (2007) El abandono de la ganadería lechera y reconversión productiva en Chipilo, Puebla. *Técnica Pecuaria en México*. 45 (mayo-agosto). Fecha de consulta agosto de 2015.
- Chaudhari D. H. y Dhoble, R.M. (2010) Performance evaluation of effluent treatment plant of dairy industry. *Current World Environment*. 5(2):373-378.
- Chanalia P; Gandhi, D., Attri, P. y Dhanda, S. (2018) Purification and characterization of b-galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioorganic Chemistry* 77: 176–189.
- ChangRong, Y., Enke, L., Fan S., Qin, L., Shuang, L y WenQing, H. (2014) Review of Agricultural Plastic Mulching and Its Residual Pollution and Prevention Measures In China. *J. Agric. Res. and Env.* 31(2):95-102.
- Chávez, C. y Mac Donald, F. (2005) *Uso Práctico de Microorganismos Eficientes*. ACCS, Extensión Agropecuaria. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica. Organización de Estudios Tropicales, Instituto Nacional de Aprendizaje. Costa Rica 2005.
- CRAF (1989) Committee on the Role of Alternative Farming. *Methods in Modern Production Agriculture*, Board on Agriculture. National Research Council. National Academy of Sciences.
- Costa, F., García, C., Hernández, T. y Polo, A. (1991) *Residuos Orgánicos Urbanos. Manejo y Utilización*. CEBAS-CSIC, España.
- Cury, K. C., Arteaga, M.M., Martínez, F.G., Luján, R.D. y Durango, VA. (2014) Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteinizado) utilizando *Lactobacillus casei*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* XVI(1):137-145.
- De Giorgi, S., Raddadi, N., Fabbri, A., Gallina Toschi, T. y Fava, F. (2018) Potential use of ricotta cheese whey for the production of lactobionic acid by *Pseudomonas taetrolens* strains. *New Biotechnology* 42:71–76.
- De Wit, J. N. (2001) *Lecturer's Handbook on Whey and Whey Products*, 1º ed. European Whey Products Association, Brussels: Belgium.
- Delaney, R. A. (1981) Recent developments in the utilization of whey. *Cultured Dairy Products Journal* 16(2):11-22.
- Domínguez, L., Lima, N. y Teixeira, J.A. (1999) Novas Metodologias para a Fermentação Alcoólica do Soro de Queijo. In: *Actas da 6.a Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente*, (3):271-280.
- Dragone, G., Mussatto, S.I., Oliveira, J.M. y Teixeira, J.A. (2009) Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem.* 112 (4):929-935.

- Embadi, Z., Asim, N., Amin, M.H., Yarmo, M.A., Maleki, A., Azizi, M., y Sopian, K. (2017) Development of Green Geopolymer Using Agricultural and Industrial Waste Materials with High Water Absorbency. *Appl. Sci.*7, 514.
- Ergüder, T. H., Tezel, U., Güven E. y Demirer, G. (2001) Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste Manage* 21(7):643–650.
- FAO-OMS (2009) Producción de alimentos de origen animal. Consultado en línea, agosto 2018. <http://www.fao.org/docrep/012/i11111s/i11111s.pdf>
- Garibaldi, L. A., Gemmill-Herren, B., D'Annolfo, R., Graeub, B.E., Cunningham, S.A. y Breeze, T.D. (2017) Farming Approaches for Greater Biodiversity, Livelihoods, and Food Security. *Trends in Ecology & Evolution*, January 32(1):68.80.
- Gazi, I. y Huppertz, T. (2015) Influence of protein content and storage conditions on the solubility of caseins and whey proteins in milk protein concentrates. *International Dairy Journal* 46: 22-30.
- Gerrini, P. y Prost, A. (2003) Conjuguer l' Elaboration, Techniques, et Enjeux Socioeconomiques. Construction de L' AO Broccio Corse. En Seminaire INRA- INAO. Systemes d' Elevage et Tipicité des Produits Laitieres.
- Ghaly, A. y Kamal, M. (2004) Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research* 38(3):631-644.
- Glick, B. R. (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Research* 169:30–39.
- Goldstein, A. H. (1986) Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. *Am. J. Altern. Agricult.* (1):57–65.
- González, M. I. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* (57):35-45.
- Guerrero, W., Castilla, P., Cárdenas, K., Gómez, C. y Castro, J. (2012) Degradación anaerobia de dos tipos de lactosuero en reactores UASB. *Tecnología Química.* 33(1):99-106.
- Igual, J. M., Valverde, A., Cervantes, E. y Velazquez, E. (2001) Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie;* (21):561-568.
- Illmer, P., Barbato, A. y Schinner, F. (1995) Solubilization of hardlysoluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem;* (27):265-270.
- Inda, A. (2000) Queso. México: Organización de los Estados Americanos, OEA.
- INEGI (2014) El sector alimentario en México 2014. Serie estadísticas sectoriales. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México.

- Jelen, P. (2002). Whey processing—Utilization and products. En H. Roginski (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*.pp. 2739-2745. Oxford: Elsevier.
- Jones, S. B., Robbins, C.W. y Hansen, C.L. (1993) Sodic soil reclamation using cottage cheese (acid) whey. *Arid Soil Res. Rehab.* 7(1):51-61.
- Kacprzak, A., Krzystek, L. y Ledakowicz, S. (2010) Co-digestion of agricultural and industrial wastes. *Chemical Papers* 64 (2) 127–131.
- Kamran, A; Bibi, Z., Aman, A., Ali, S.y Qader, U.I. (2016) Lactose hydrolysis approach: Isolation and production of  $\beta$ -galactosidase from newly isolated *Bacillus* strain B-2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 5:99–103.
- Kelling, K. A. y Peterson, A.E. (1981) Using Whey on Agricultural Land: a Disposal Alternative. Cooperative Extension Programs, Univ. of Wisconsin, Madison, Wisconsin.
- Kennedy, V.C.; Mordhorst, B.R., Gaspers, J.J., Stokka, G.L., Bauer, M.L., Swanson, K.C. y Vonnahme, K.A. (2015) Late gestation supplementation of corn dried distiller's grains plus solubles to beef cows fed a low-quality forage: impacts on mammary gland blood flow, colostrum and milk production, and calf weights. *Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science.* 66:14-17.
- Kosikowski, F. V. (1979). Whey utilization and whey products. *J. Dairy Sci.* (62):1149-1160.
- Koutinas, A., Papapostolou, H., Dimitrellou, D., Kopsahelis, N., Katechaki, E., Bekatorou, A. y Bosnea, L. (2009) Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology*; 100(15):3734-3739.
- Krzystek, L. y Ledakowicz S. (2000). Stoichiometric analysis of *Kluyveromyces fragilis* growth on lactose. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 75: 1110 - 1118.
- Kulozik, U. y Wilde, J. (1999) Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme Microb. Technol.* 24(56):297-302.
- Lehrsch, G. A., Robbins, C.W. y Melvin, J.B. (2008) Whey utilization in furrow irrigation: Effects on aggregate stability and erosion. *Bioresource Technology* (99):8458–8463.
- Liu, Y., Chenb, Z., Jianga, Z., Yanb, Q. y Yang, S. (2017) Biochemical characterization of a novel  $\beta$ -galactosidase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. *Int. J. of Biological Macromolecules* 104:1055–1063.

- Londoño, M. M. (2006) Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. *Perspectivas en nutrición humana. Rev. Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética.* 16:11-20.
- Londoño, M. M., Sepúlveda, J.U. y Hernández, A. (2010) Utilización del suero de queso fresco en la elaboración de bebida fermentada con cultivos probióticos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos;* 20(2):53-57.
- Lugtemberg, B. y Kamilova, F. (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541–560.
- Malaspina, F., Cellaniare, C.M., Stante, L. y Tilche, A. (1996) Anaerobic treatment of cheese whey with a downflow-upflow hybrid reactor. *Bioresource Technol;* (55):131-139.
- Mejías-Brizuela, N., Orozco-Guillen, E. y Galán-Hernández, N. (2016) Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales;* 2(6):27-41.
- Meyrath, J. y Bayer, K. (1979) Biomass from whey. In *Economic Microbiology;* (4):207-269.
- Minhalma, M., Magueijo, V., Queiroz, D.P. y Pinho, M.N. (2007) Optimization of “Serpa” cheese whey nanofiltration for effluent minimization and by-products recovery. *J. Environ. Manage;* 82(2):200-206.
- Miranda, M. O., Fonseca, P.L., Ponce, I., Cedeño, C., Sam, R.L. y Martí, V.L. (2007) Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso: Características distintivas y control de calidad. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 17(2):103-108.
- Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M. del R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y.E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M. y Muñoz-Rojas, J. (2015) Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas;* 17(2): 24–34.
- Mostafa, N. A. (1996) Production of lactic acid from whey with agar immobilized cells in a continuous packed tubular reactor. *Energy Convers. Manage;* 37(3):253-260.
- Moueden, S., Klinkhamer, P.G., Hae, Y. y Leiss, K.A. (2017) Towards eco-friendly crop protection: natural deep eutectic solvents and defensive secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 16:935–951.
- Moulin, G. y Galzy, P. (1984) Whey, a potential substrate for biotechnology. *Biotechnol. Genet. Engng Rev.* (1):347-374.
- Mukhopadhyaya, R. S., Chatterjee, B.P., Chatterjee, P.C. y Banerjee, Guha, A.K. (2005) Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal;* (15):299–303.

- Muñi, A., Paez, G., Faría, J., Ferrer, J. y Ramones, E. (2005) Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/ nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica* 15(4):361–367.
- Nath, A., Dixit, M., Bandiya, A. y Desai, A. (2008) Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. Zp24, *Bioresour. Technol.*; (99):5749-5755.
- Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, L. y Marova, I. (2014) Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:5883–5890.
- Oliveira, A. S., Gomez, R.J. y Haully, M.C. (1996) Lactic acid production by biodegradation of agroindustrial residues. *Int. Biodeter. Biodeg.* 37(1– 2):113-123.
- Pacheco, F. (2003) Lactofermentos: Una alternativa en la producción de abonos orgánicos líquidos fermentados. Costa Rica. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica. Organización de Estudios Tropicales, Instituto Nacional de Aprendizaje (AVINA).
- Palmieri, N., Bonaventura-Forleo, M. y Salimei, E. (2017) Environmental impacts of a dairy cheese chain including whey feeding: An Italian case study. *J. Cleaner Prod.* 140:881-889.
- Panesar, P., Kennedy, F., Knill, C y Kosseva, M. (2010) Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53(1):43-54.
- Parra, H. R. (2009) Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista de la Facultad Nacional Agrícola de Medellín* 62(1):4967-4982.
- Pauli, T. y Fitzpatrick, J. J. (2002) Malt combining nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. *Process Biochem.* 38(1):1-6.
- Pazos-Rojas, L. A., Marín-Cevada, V., Morales-García, Y.E., Baez, A., Villalobos-López, M.A., Pérez-Santos, M. y Muñoz-Rojas, J. (2016) Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 3(7): 72-85.
- Perera, J., Tormo, A. y García, J.L. (2002) *Ingeniería Genética*. Editorial Síntesis S.A. Madrid.
- Pescuma, M. H., Mozzi, F. y Font, G. (2008) Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*; 25(3): pp 442-451.
- Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Marchant, R. y Banat, M. (2008) Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus*

- delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresource Technology*; (99):5951-5955.
- Posada, K., Terán, D. y Ramírez-Navas, J. (2011) Empleo de lactosuero y sus componentes en la elaboración de postres y productos de confitería. Buenos Aires, Argentina: *La Alimentación Latinoamericana*; (292):66-75.
- Prazad, R., Bhattacharyya, A. y Nguyen, Q. (2017) Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. *Front. Microbiol.* 8(1014):1-13
- Prazeres, A. R., Carvalho, F. y Rivas, F.J. (2012) Cheese whey management: a review. *J Environ Manage*; (110):48–68.
- Prazeres, A. R., Rivas, J., Paulo, U., Ruas, F. y Carvalho, F. (2016) Sustainable treatment of different high-strength cheese whey wastewaters: an innovative approach for atmospheric CO<sub>2</sub> mitigation and fertilizer production. *Env. Sci. Pollut. Res.* 23:13062–13075.
- Rajeshwari, K. V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., y Kishore, V.V. (2000) State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable Sustainable Energy Rev*; 4(2):135-156.
- Ramírez, N. J. S. (2011) Aprovechamiento Industrial de Lactosuero Mediante Procesos Fermentativos. *Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, 69-83.
- Rayan, M. P. y Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. *Rev. in Environmental Sci. and Bio/Technol.* 15(3): 479–498.
- Reyes, G., Chaparro-Giraldo, A. y Ávila, K. (2010) Efecto ambiental de agroquímicos y maquinaria agrícola en cultivos transgénicos y convencionales de algodón. Efecto ambiental en cultivos transgénicos de algodón *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XII No. 2 151-162.
- Robbins, C. W. y Lehrs, G.A. (1992) Effects of acidic cottage cheese whey on chemical and physical properties of a sodic soil. *Arid Soil Res. Rehab.* (6):127-134.
- Robbins C. W. y Lehrs, G.A. (1998) Cheese whey as a soil conditioner. In: Wallace, A., Terry, R.E. (Eds.), *Handbook of Soil Conditioners: Substances that Enhance the Physical Properties of Soil*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 167-186.
- Roukas T. y Kotzekidou, P. (1998) Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme Microb. Technol*; 22 (3):199-204.

- Saddoud, A., Hassaïri, I. y Sayadi, S. (2007) Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey. *Bioresour. Technol*; 98 (11): 2102-2108.
- Sánchez, O., Ortiz, M. y Betancourt, A. (2004) Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus* spp. Colombia: *Revista Colombiana de Biotecnología*; VI (1), 43-54.
- Saval, S. (2012) Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*; 16(2):14-18.
- Sharratt, W. J., Peterson, A.E. y Calbert, H.E. (1962) Effect of whey on soil and plant growth. *Agron. J.* 54(4):359-361.
- Sharratt, W. J., Peterson, A.E y Calbert, H.E. (1959) Research-article: whey as a source of plant nutrients and its effect on the soil. *J. Dairy Sci.* 42(7):1126-1131.
- Smithers, G. (2008) Whey and whey proteins: From 'gutter togold'. *International Dairy Journal*; 18(7):695-704.
- Singh Yadav, S.J., Sridhar, S., Kumar, L., Tyagi, R.D. y Surampalli, R.Y. (2015) Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances* 33:756–774.
- Siso, M. I. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresour. Technol.* 57(1):1-11.
- Stevenson, F. J. (1967) Organic acids in soil. pp. 119–146. En: A. D. McLaren and G. H. Peterson eds. *Soil biochemistry*. Marcel Dekker. New York, NY, USA.
- Strobel, B. W. (2001) Influence of vegetation on low–molecular–weight carboxylic acids in soil solution: A review. *Geoderma*; (99):169-198.
- Struthers, P. H. y Sieling, D.H. (1995) Effects of organic anions on phosphate precipitation by iron and aluminum as influenced by pH. *Soil Sci.* (69):205-213.
- Tango, M. S. y Ghaly, A.E. (1999) Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. *Biomass Bioenerg.* 16 (1):61-78.
- Valencia, D. E. y Ramírez, M. L. (2009) La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos*; 73(16):27-29.
- Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M. y Lyberatos, G. (2009) Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresour. Technol.* 100(15):3713-3717.
- Wang, D., Liang, G., Wang, B., Sun, H., Liu, J. y LuoGuan, L. (2016) Systematic microRNAome profiling reveals the roles of microRNAs in milk protein metabolism

and quality: insights on low-quality forage utilization. *Scientific Reports* 6:21194. DOI: 10.1038.

Watson, K. S., Peterson, A.E. y Powell. R.D. (1977) Benefits of spreading whey on agricultural land. *J. Water Pollut. Control Fed.* 49(1):24-34.

Wayne, H. (1994) Aprovechamiento de los sueros en la industria láctea. *Memorias del V Congreso Panamericano de la leche.* Medellín: COLANTA pp. 147-163.

Wezel, A., Casagrande, M., Celette, F., Vian, J.F., Ferrer, A. y Peigné, J. (2014) Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 34:1–20.

Yang, S. y Silva, E. (1995) Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *Journal of Dairy Science*; 78(11):2541-2562.

## **CAPÍTULO II. ESTUDIO DE DIAGNÓSTICO: SITUACIÓN ACTUAL DE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES ECONÓMICAS Y PROBLEMAS AMBIENTALES OCASIONADOS POR LA ACTIVIDAD QUESERA**

### **2.1 Resumen**

La actividad agropecuaria es una de las mayores fuentes de contaminación, por lo que es necesario dedicarle mayor atención para lograr cambios a prácticas productivas más eficientes y sustentables, lo que contribuirá a mejorar el entorno, la producción agrícola y la salud de la población. En este trabajo se hizo un diagnóstico para conocer la situación ambiental y determinar cuáles son las principales fuentes de contaminación en la región de Chipilo-Acatepec, Puebla. Se hicieron 10 recorridos de campo y se aplicaron 62 entrevistas y encuestas: 11 a autoridades locales y funcionarios de instituciones agropecuarias y autoridades locales (funcionarios de gobierno del sector agropecuario de la SDR, SAGARPA, INIFAP y FIRCO), 32 a productores agropecuarios y 19 a productores de queso (Anexo C y D). Se hizo un análisis cualitativo para describir la problemática que prevalece en la región y se proponen estrategias de solución. Se estimó la cantidad y tipos de residuos que se generan en las queserías y se evaluó la conciencia ambiental de los actores involucrados con un instrumento tipo ecobarómetro (Berenguer *et al.*, 2003) modificado a la problemática de contaminación regional. Finalmente se identificaron las fuentes puntuales de contaminación aplicando correlaciones de Spearman y Goodman-Kruskal para estimar el nivel de contaminación por tipo de taller. Se constató que las principales actividades económicas de la región son la producción y procesado de lácteos asociada a la agricultura de temporal para la producción de forrajes, actividades que tienen un impacto ambiental significativo por la falta de prácticas adecuadas en la disposición y aprovechamiento de residuos. Se estimó que se generan 35,000 L de lactosuero dulce y ácido. Los talleres tecnificados son los que más contaminan debido al uso de productos químicos ( $\sigma=0.74$ ) así como de los altos volúmenes de agua que utilizan para procesos de limpieza ( $\sigma=0.79$ ). Se propone como estrategia de solución el aprovechamiento del lactosuero en usos agrícolas, sin embargo, será necesario mejorar la actitud de los actores sociales involucrados, principalmente los agricultores de la región.

## 2.2 Introducción

El aprovechamiento de los recursos locales es un aspecto básico al considerar la sustentabilidad de la actividad agropecuaria y determinante en la solución de los problemas de contaminación, disponibilidad de agua, pérdida de biodiversidad y desertificación entre otros, y motivo para impulsar trabajos tendientes a lograr un desarrollo diferente, sin afectar al medio ambiente, mejorando la calidad de vida de quienes los cuidan y se benefician de ellos (Bernal-Mendoza *et al.*, 2010).

La producción lechera, así como la industria de productos lácteos, son actividades de importancia socioeconómica debido al gran número de personas que participan, al tipo de producto y subproductos que se generan y consumen, y por último por su aporte a la economía regional en cuanto a ingresos, valor agregado y mano de obra.

La producción artesanal de queso fresco representa el sustento para muchos productores de comunidades del mundo y un bien cultural alimentario de importancia económica que puede contribuir al desarrollo regional (Gerrini y Prost, 2003). Oficialmente en México existen alrededor de 1,500 queserías que dan empleo a más de 20 mil personas (INEGI, 2009). Según información del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2016) la producción de queso en México alcanzó las 150,000 toneladas, principalmente de queso fresco, cifra que según Castro *et al.* (2001) puede ser similar a la producida informalmente.

El lactosuero es el subproducto que se genera durante la producción de queso. Su manejo ocasiona un problema económico, social y ambiental no obstante de ser un recurso con alto potencial. Cuando se vierte sin control al ambiente impacta negativamente, además de que se desaprovecha una rica fuente de nutrientes dado su contenido en azúcares, proteínas, vitaminas y minerales, los cuales son poco valorados y aprovechados en la actualidad (Londoño *et al.*, 2010). La mayoría de las veces y en la mayoría de las regiones suburbanas, al no haber una opción técnica y económica para su aprovechamiento se tira afectando la calidad del suelo y cuando se desecha en los cuerpos de agua, ocasiona un crecimiento excesivo de algas (Aider *et al.*, 2009) que

acelera su envejecimiento y muerte, proceso conocido como eutrofización (Wagner, 1996; Chislock *et al.*, 2013).

En Chipilo Puebla, el mercado de quesos frescos elaborados con leche no pasteurizada se ha mantenido debido a la demanda de este tipo de productos, por lo que es necesario revalorizar esta actividad considerando la cantidad de personas que trabajan y viven de ella, y apuntarla como un vector de desarrollo regional.

Existe poca información sobre la cantidad de leche que se procesa, los tipos de sueros que se generan, la forma como se disponen y/o aprovechan y si la producción regional de queso representa un riesgo para el ambiente, por lo que el objetivo de este trabajo fue hacer un diagnóstico para conocer las principales actividades económicas de la región y el deterioro ambiental que causan, establecer líneas estratégicas de solución identificando aliados, estimar la cantidad y tipos de lactosueros que se generan.

## **2.3 Metodología**

### **2.3.1 Área de estudio**

El trabajo se hizo en la localidad de Francisco Javier Mina, también conocida como Chipilo, la cual se ubica en el Municipio de San Gregorio Atzompa del distrito de Cholula de Rivadavia entre los paralelos 19° 03' y 19° 20' de latitud Norte; los meridianos 98° 19' y 98° 22' de longitud Oeste a una altitud entre 2,100 y 2,300 metros. (INEGI, 2009) Colinda con las localidades de Santa María Tonanzintla, San Pedro y San Francisco Acatepec, Santa Isabel Cholula, San Pablo Ahuatempa, Chalchihuapan, San Bernabé Temoxtitla y San Gregorio Atzompa, a 12 km de la ciudad de Puebla sobre la Carretera Panamericana a Oaxaca (Carretera Federal a Atlixco) y a 130 km de la ciudad de México (Figura 1). Cuenta con un área total de 600 hectáreas con un clima predominantemente templado semiseco. Aunque se ubica en la porción sur de la cuenca alta del río Atoyac, una de las cuencas más importantes del Estado, no es cruzado por ninguna corriente permanente importante, pero sí por arroyos intermitentes que se han utilizado como drenajes municipales que atraviesan y circundan la zona urbana (INAFED, s/f). Tiene un grado de marginación bajo a nivel municipal pero alto a nivel localidad (SEDESOL, 2010).

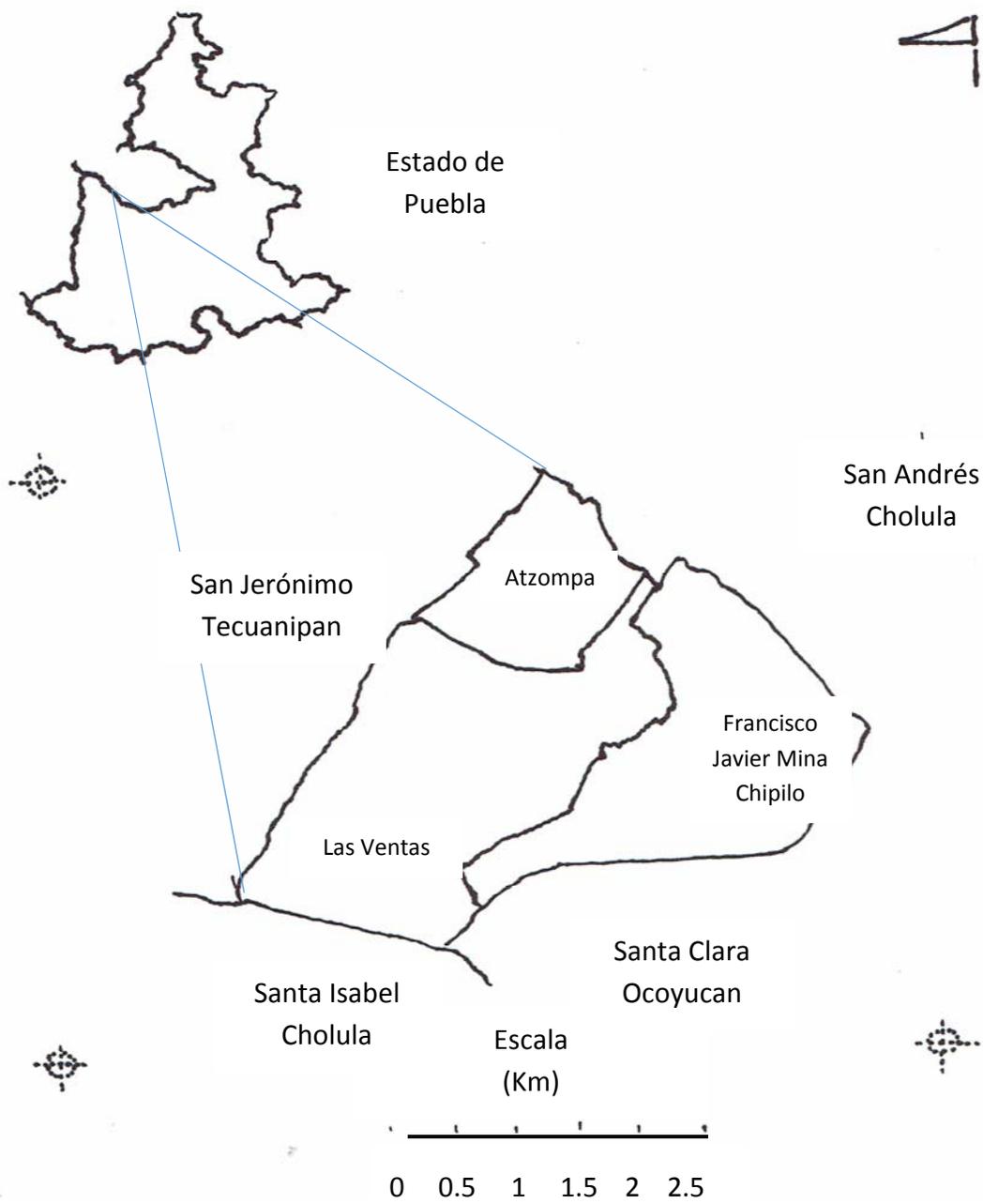


Figura 1. Localización del área de estudio: Chipilo de Francisco Javier Mina en el Estado de Puebla.

### 2.3.2 Etapas de la investigación

Análisis de las principales actividades productivas y contaminación ambiental. Se hicieron 10 recorridos de campo en el periodo enero a diciembre del 2014 para conocer tanto la zona urbana como las periferias de la localidad, hablar con sus habitantes, ver las áreas de siembra, establos ganaderos, talleres queseros, canales de desagüe y drenajes. Se hicieron 10 recorridos de campo y se aplicaron 62 entrevistas y encuestas: 11 a autoridades locales y funcionarios de instituciones agropecuarias y autoridades locales (funcionarios de gobierno del sector agropecuario de la SDR, SAGARPA, INIFAP y FIRCO), 32 a productores agropecuarios y 19 a productores de queso (Anexo C y D).. La información obtenida se esquematizó y se analizó cualitativamente mediante árboles de problema-solución y una matriz de Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas (FODA), para identificar las principales actividades económicas, evaluar nivel de contaminación y proponer líneas estratégicas de solución.

Evaluación de la conciencia ambiental de actores relacionados. Se hizo por la necesidad de conocer el grado de involucramiento y afectación que autoridades-funcionarios, responsables de talleres queseros y agricultores de la localidad tiene ante el problema de contaminación en Chipilo, así como para estimar la actitud y recursos que disponen para solucionarlo, para lo cual se diseñó un instrumento basado en el Ecobarómetro propuesto por Berenguer *et al.* (2003) cuya finalidad es evaluar actitudes ambientales a través de tres grupos de variables: los conocimientos (información), las preocupaciones, creencias o sentimientos morales (valores) y las condiciones externas que facilitan o inhiben la acción o el comportamiento para mejorar cierta situación. En su trabajo, los autores hacen alusión a 10 temas representativos de la crisis ambiental actual: escasez de agua, basura, pérdida de biodiversidad, uso de transporte privado, contaminación atmosférica, uso irracional de energía, degradación de espacios naturales, uso de productos químicos, falta de reciclaje y exceso de ruido. El instrumento, que cuenta con 50 preguntas estructuradas en una escala de respuestas tipo Likert de 4 puntos, pretende reflejar el nivel de información que tiene una persona sobre el medio ambiente (si está enterada o no de los problemas ambientales), la estimación personal (positiva o negativa) y percepción sobre la gravedad de la situación del medio ambiente así como si poseen

información suficiente sobre estrategias para actuar. Para el caso particular de la evaluación realizada en este trabajo, el tema central del instrumento fue la contaminación ambiental (suelo y agua) ocasionada por la actividad agropecuaria y de la industria quesera. Las variables a medir fueron el nivel de conocimiento e información sobre el problema de la contaminación local (qué sabe) así como los recursos y actitud que tiene para actuar (qué haría). A diferencia del instrumento propuesto Berenguer *et al.* (2003) quienes reconocen que es necesario incorporar variables que reflejen la sensibilidad de las personas a temas ambientales específicos, en este trabajo se incorporó la variable: nivel de sensibilización ante el problema (Qué opina de...) y se valoró de manera cualitativa por parte de los entrevistadores su nivel de preocupación. Al final de cada entrevista se asignó una calificación para cada variable y se analizaron estadísticamente para determinar diferencias entre grupos conforme se describe en el apartado de manejo estadístico de datos.

Estimación de la cantidad y tipos de lactosuero generado e identificación de fuentes puntuales de contaminación. Con la información obtenida de las encuestas a productores de queso se estimó la cantidad de leche que se procesa y tipos de queso que se elaboran, y de esta manera se estimó la cantidad y tipo de sueros que se generan. Para identificar los talleres que mayoritariamente contribuyen a la contaminación ambiental, se tipificaron y se estimó su nivel de contaminación. La tipificación se hizo conforme a la metodología propuesta por Cervantes *et al.* (2007), tomando como referencia la caracterización de unidades de producción lechera (establos) propuesta por Villegas (2004) con base en el volumen de leche que procesan diariamente, pero revalorando la cantidad de leche como criterio de clasificación tomando en cuenta valores establecidos por los mismos entrevistados y los volúmenes máximos procesados en la región. A diferencia de la metodología propuesta por Cervantes *et al.* (2007), y con la finalidad de mejorar la tipificación, se incorporaron las siguientes variables: número de empleados, equipamiento del taller, tipo y cantidad de pruebas de control de calidad de la materia prima y manejo o conservación de la leche antes de su procesado, lo que permitió hacer un análisis multicriterio de la información (Grajales-Quintero *et al.*, 2013) asignando un puntaje a cada rango establecido como se describe en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Criterios de puntuación utilizados para tipificar los talleres de queso en Chipilo, Puebla.**

Variable	Rango	Puntos	Rango	Puntos	Rango	Puntos
Leche procesada (L/día)	<1000	0	1000 a 4000	1	>4000	2
Número empleados	≤2	0	3 a 5	1	>6	2
Equipamiento <sup>1</sup>	<3	0	4 a 5	1	>6	2
Control calidad leche <sup>2</sup>	no hace	0	1 análisis	1	2 o + análisis	2
Manejo leche <sup>3</sup>	no hace	0	1 técnica	1	2 o + técnicas	2

<sup>1</sup>La escala de equipamiento varía de 1 a 7 puntos considerando el equipo que utiliza para procesar y conservar la producción: equipo de acero inoxidable, marmita, caldera, tanque de enfriamiento, refrigerador, y empacadora al vacío entre otros.

<sup>2</sup>Análisis de laboratorio para controlar la calidad de la leche: acidez, densidad, microbiológicos o escaneo.

<sup>3</sup>Enfriamiento, uso de químicos o pasteurización.

La información obtenida se analizó mediante una escala aditiva de tal manera que si el taller quesero acumuló entre 0 y 4 puntos, se tipificó como artesanal, de 5 a 9 puntos en transición y más de 10 puntos como tecnificado.

Para estimar el nivel de contaminación que ocasionan los talleres queseros visitados se hizo un análisis multicriterio (Grajales-Quintero *et al.*, 2013) considerando la información disponible proporcionada de manera voluntaria por los productores relacionada al tipo de productos químicos utilizados (leche en polvo, manteca vegetal, sales neutralizantes, sales fundentes, acidificantes y nitratos), la cantidad de suero generado no aprovechado (estimada en base a la cantidad de leche procesada y destino del lactosuero) y la cantidad de agua utilizada, para lo cual se asignó un puntaje a cada rango establecido conforme se describe el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Criterios de puntuación utilizados para estimar la contaminación ambiental por la actividad quesera en Chipilo, Puebla.**

Variable	Rango	Puntos	Rango	Puntos	Rango	Puntos
Usa productos químicos	No utiliza	0	Pocos	1	Muchos	2
Cantidad de suero (L/día)	≤1000	0	1000 a 4000	1	>4000	2
Aprovecha suero	Alto	0	Medio	1	Nulo	2
Cantidad de agua (L/día)	≤1000	0	1000 a 4000	1	>4000	2

Se consideró poco uso de productos químicos si utilizaba leche en polvo y/o grasa vegetal, y muchos cuando utilizaba, además, sales de curación, sales fundentes, neutralizantes y acidulantes.

La información obtenida se analizó mediante una escala aditiva y se determinó como grado de contaminación ambiental bajo, cuando el taller quesero acumuló entre 0 y 4 puntos, contaminación media cuando sumó entre 5 a 9 puntos y alta cuando sumó más de 10 puntos.

Con la información obtenida se analizó el grado de correlación que existe entre el tipo de taller (artesanal, transición o tecnificado) y la contaminación que ocasiona (baja, media o alta) y de esta manera se identificaron las principales fuentes de contaminación.

### **2.3.3 Muestreo**

Las encuestas a productores agrícolas y ganaderos se aplicaron bajo un muestreo no probabilístico con la técnica de “bola de nieve” (Merriam, 2009). Las encuestas a productores de queso se realizaron con un muestreo probabilístico (Gómez, 1979) tomando como marco de muestreo un listado simple de 23 queserías registradas en la Presidencia Auxiliar, para esto se hizo un muestreo aleatorio simple y se generó un listado del 80% de ellas, es decir, de 19. Sólo se entrevistaron a las empresas que aceptaron por voluntad propia participar, y las que no, fueron reemplazadas aleatoriamente. Las entrevistas a autoridades y funcionarios se hicieron con un muestreo no probabilístico por conveniencia según la accesibilidad de los entrevistados (Bello, 2014)

### **2.3.4 Análisis estadístico de resultados**

Las diferencias entre los niveles de conciencia de los tres grupos de actores relacionados con el problema de contaminación se evaluaron a través de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney a un nivel de significancia del 95% utilizando Excel y el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para Windows.

Para identificar las principales fuentes de contaminación en la localidad se hizo una correlación no paramétrica entre la contaminación ambiental ocasionado según el tipo de taller (nivel de tecnificación) utilizando la prueba no paramétrica de Spearman y Goodman-Kruskal a un nivel de significancia del 95% utilizando Excel y el paquete estadístico SPSS versión 11.5 para Windows.

## **2.4 Resultados y discusiones**

### **2.4.1 Precisión de la problemática**

En los recorridos realizados se pudo constatar que la principal actividad de la localidad es la producción y procesado de leche, así como la agricultura relacionada para la producción de alimento en verde para ganado, lo que ha caracterizado a Chipilo desde hace más de 50 años (Cervantes *et al.*, 2007) y que concuerda con la información reportada por INEGI (2009). No obstante que hace 10 años hubo un auge por la fabricación de muebles rústicos, empresa que no prosperó, actualmente se observa una lenta reconversión a la actividad agropecuaria: establos que se adecuaron como carpinterías y que nuevamente empiezan a utilizarse para estabular ganado.

Igualmente se observó que tanto las prácticas agrícolas como pecuarias y agroindustriales adolecen de capitalización y adopción tecnológica principalmente en cuanto a la aplicación de agroquímicos, disposición de residuos y aprovechamiento de subproductos. Esto ha ocasionado la contaminación y deterioro de los campos agrícolas así como la contaminación de los arroyos que atraviesan la localidad, y por lo tanto en la calidad de la producción agropecuaria, principalmente forrajes y leche que se obtiene en la región, situación semejante a la que prevalece en la región vecina de Atlixco reportada por Silva, *et al.* (2002).

La agricultura que se realiza en la región básicamente es de temporal, y prácticamente no se utiliza agua de pozo, aunque algunas parcelas aprovechan las aguas grises de las acequias sin tratamiento, lo que representa un riesgo sanitario-ambiental.

### **2.4.2 Identificación del problema y propuesta de solución**

Se detectan dos problemas principales derivados de la actividad productiva de la región: por un lado prácticas inadecuadas en la actividad agrícola debido al sobre uso de agroquímicos y poco uso de técnicas sustentables como el aprovechamiento de subproductos pecuarios y agroindustriales para reintegrarlos al ciclo productivo. Por otra parte se identifican prácticas inadecuadas en la preparación de queso, como el uso de aditivos químicos y la inadecuada disposición del lactosuero. Ambos problemas están relacionados a diversas causas y tienen un efecto directo en la calidad del ambiente, la

calidad de vida y la seguridad alimentaria de la región. Esquemáticamente la relación del problema identificado con sus causas y consecuencias se presenta de manera simplificada en la Figura 2.

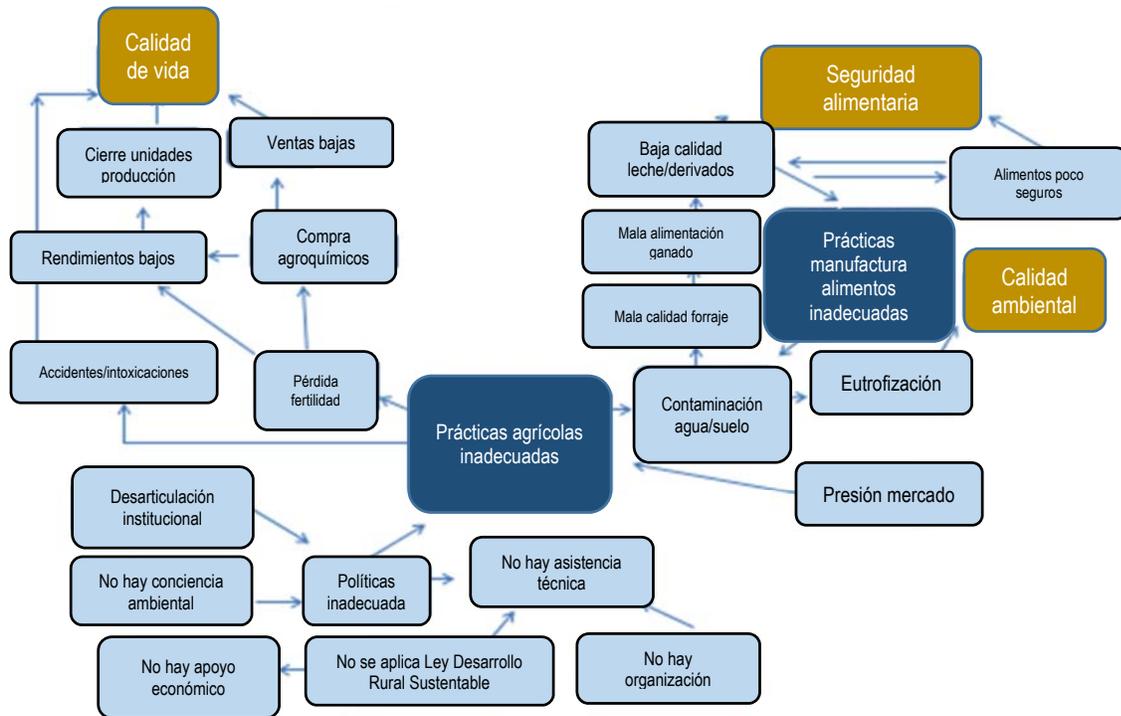


Figura 2. Esquema de la problemática socio ambiental en la región de Chipilo-Acatepec, Puebla.

Como alternativa de solución se plantea el aprovechamiento de lactosuero y su procesado por vía biotecnológica para obtener biofertilizantes como estrategia enfocada a reducir los niveles de contaminación ocasionada por el mismo residuo, y por la sustitución de fertilizantes químicos en los sistemas de producción agrícola.

El reto, además de demostrar con argumentos científicos las ventajas del uso de biofertilizantes, es el convencer tanto a las autoridades en materia agropecuaria responsables del diseño de políticas agrícolas, como de los mismos productores que podrían en un momento dado optar por su uso, por lo que se plantean de manera general algunas propuestas que ligadas al diagnóstico sobre las problemáticas que prevalecen en la región, podrían contribuir a que la propuesta técnica que se expone en este trabajo, se pudiera implementar en la región como parte de un plan integral de desarrollo agrícola

sustentable que contribuya a la reducción de los costos de producción, obtención de alimentos más sanos y seguros y al cuidado de del suelo y el agua.

Durante las visitas de campo y con información obtenida en las entrevistas se precisaron algunas fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas relacionadas con las problemáticas descritas en el árbol de problemas, las cuales se muestran en el Cuadro 5.

Con el cuadro 5, se realizó un análisis cruzado entre fortalezas y debilidades contra oportunidades y amenazas, se generaron las líneas de acción estratégica presentadas en el Cuadro 6.

**Cuadro 5. Análisis de Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas (FODA) de la actividad quesera artesanal en la Región de Chipilo-Acatepec, Puebla.**

<p>Fortalezas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Cuenca lechera con recursos: clima, agua.</li> <li>-Empresas familiares con prestigio y tradición que se han sostenido exitosamente en el tiempo.</li> <li>-Fama y prestigio.</li> </ul>	<p>Debilidades:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Falta de interés en la actividad por los jóvenes.</li> <li>No hay disposición para adoptar buenas prácticas de manejo.</li> <li>-Baja utilidad.</li> <li>-Trabajo esclavizante.</li> <li>-Precio insumos a la alta. Precio de queso a la baja.</li> <li>-Mala calidad materia prima.</li> <li>-Prácticas desleales (adulterado).</li> <li>-Poco interés por la certificación orgánica</li> </ul>
<p>Oportunidades:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Susceptible a marca colectiva o denominación de origen.</li> <li>-Aprovechamiento de subproductos para dar valor agregado.</li> <li>-Revalorización derivados lácteos naturales.</li> </ul>	<p>Amenazas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Poca disposición a organizarse.</li> <li>-Pérdida del “saber hacer”.</li> <li>-Imposición pasteurización.</li> <li>-Acopiadoras que compiten por materia prima.</li> <li>-Poco interés de agentes de soporte (centros de investigación, gobierno, etc.).</li> </ul>

Del presente análisis (Cuadro 6) se desprende la importancia de implementar una estrategia ambiental donde uno de los componentes básicos sería disminuir la disposición inadecuada de lactosuero aprovechándolo para hacer biofertilizantes y probióticos para uso agropecuario. Esta acción tendría un efecto directo en la calidad de los forrajes que se producen en la región al emplearse productos orgánicos y por

consiguiente, disminuir el uso de productos químicos, lo que mejoraría la calidad de la leche que actualmente se produce. Sin embargo, un aspecto básico para implementar la presente propuesta es lograr el apoyo de los sectores sociales involucrados, por lo que una parte de la presente investigación se enfocó a evaluar la actitud ambiental de productores de queso, agricultores y autoridades.

**Cuadro 6. Propuestas de líneas de acción estratégica derivadas del análisis FODA de la actividad quesera artesanal en la Región de Chipilo-Acatepec, Puebla.**

	Fortalezas	Debilidades
Oportunidades	F2, O3 Mantener y mejorar el ingreso de los productores → promoción (revalorización) de la producción.	D1, O2 Mejorar calidad de pastos, forrajes y leche aprovechando subproductos agropecuarios → biofertilizantes y probióticos
Amenazas	F1, A5 y 6 Mejorar la calidad de la producción → ganar la confianza del consumidor y recuperar prestigio	D1, A3 Lograr el apoyo de actores sociales para mejorar la calidad de materias primas y del ambiente

### 2.4.3 Análisis de las alternativas de solución

La certificación orgánica es una oportunidad para dar valor agregado a los productos orgánicos, y el uso de biofertilizantes libres de coliformes representa un área de oportunidad y una alternativa de solución ante la problemática derivada del sobre uso de fertilizantes químicos. El lactosuero es un material que se puede utilizar como medio de cultivo de cepas de interés agropecuario. Existen varias rutas científicas tendientes a este fin: la primera es utilizar el lactosuero para la producción de microorganismos benéficos reconocidos en la literatura científica como promotores de crecimiento vegetal, como es el caso de rhizobia (Ben Rebah *et al.*, 2007). Una opción más directa es el uso de los microorganismos presentes de manera natural en las fermentaciones lácticas, principalmente aquellos inoculados de manera intencionada como parte de los procesos industriales para la producción de yogurt y quesos madurados (Bacterias ácido lácticas y levaduras como *Saccharomyces* sp. y *Kluyveromyces* sp). La segunda opción es técnicamente más viable si se piensa implementar con productores locales considerando

que son cepas que ellos ya manejan y conocen, además de que plantea la posibilidad de ser utilizados en el área ganadera como probióticos veterinarios, por lo que es necesario demostrar la inocuidad y beneficio que tendría el uso de dichas cepas.

#### **2.4.4 Objetivo para la producción de lactofermentos**

El objetivo central de este trabajo es el desarrollo tecnológico para el aprovechamiento de lactosuero y la producción de un biofertilizante aprovechando la flora microbiana que crece de manera facultativa en la lactosa. Se busca que los lactofermentos se utilicen en la producción de forrajes para ganado con el incentivo de reducir el consumo de fertilizantes químicos y gestionar una certificación orgánica. El uso de biofertilizantes elaborados localmente garantizaría la reducción de costos de producción mejorando la productividad agrícola. Derivado del objetivo central, se pretende fomentar el desarrollo de una agricultura sostenible y mejorar la calidad ambiental del suelo y agua de la región, transferir una tecnología apropiada, segura y rentable considerando la agricultura de temporal y productores de subsistencia que prevalecen en la región de estudio.

#### **2.4.5 Resultados esperados**

- Obtener un biofertilizante de calidad, de bajo costo y eficiencia comprobada, reducir los costos y mejorar los rendimientos de producción.
- Facilitar el conocimiento y habilidades para la elaboración y aplicación de biofertilizantes a productores de subsistencia.
- Lograr la aceptación del paquete tecnológico propuesto en la región.

#### **2.4.6 Conciencia ambiental de los actores relacionados con la actividad quesera.**

Al evaluar el grado de sensibilización, conocimiento y actitud al cambio entre los actores entrevistados, relacionados con el problema de contaminación, se observó que los agricultores de la región son los menos sensibilizados e informados al presentar 2.3 y 1.4 puntos menos en la calificación promedio sobre la situación y las repercusiones de la contaminación por el abuso de agroquímicos y la disposición inadecuada del lactosuero en comparación con autoridades y queseros que presentaron promedios similares. (Mann-Whitney  $p < 0.05$ ) (Figura 3).

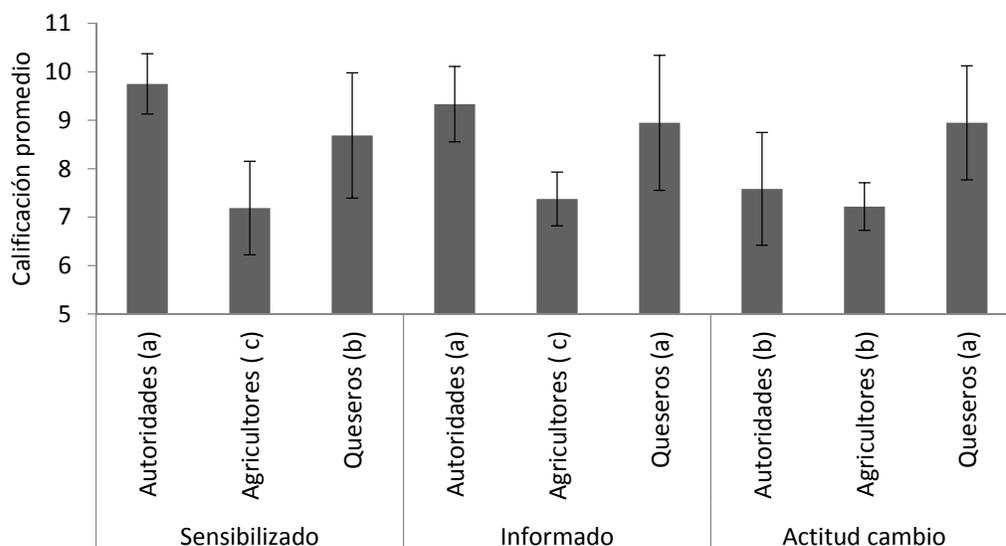


Figura 3. Componentes de la evaluación de conciencia ambiental de los actores relacionados con la contaminación ambiental en Chipilo, Puebla.

La calificación va de 5 a 10, donde 5 es muy baja y 10 deseable.

Dentro de las posibles explicaciones se puede atribuir, aunado al desconocimiento sobre las causas y efectos de la contaminación con respecto a otros actores sociales, que un alto porcentaje de agricultores no es dueño de la tierra que trabaja (83%) y al no ser suya, no tiene ninguna preocupación por su afectación en el futuro, lo que representa una desventaja si se quiere implementar un programa de aprovechamiento y aplicación de biofertilizantes.

Las autoridades locales y funcionarios fueron los más sensibilizados ante la problemática (9.8 contra 8.7 y 7.2 de queseros y agricultores) (Mann-Whitney  $p < 0.05$ ) y demostraron suficientes conocimientos (9.3), al igual que los productores de queso (9.0), sobre la problemática, pero con la actitud media para actuar (7.6) (Figura 3.3 y Anexo E). Los productores de queso, aunque no mostraron una alta sensibilización al problema (8.7), demostraron suficiente conocimiento y la mayor actitud al cambio (9.0 contra 7.6 de las autoridades) (Mann-Whitney  $p < 0.05$ ) (Figura 3.3).

Al hacer un análisis global, promediando los criterios de sensibilización, conocimiento y actitud, se observó que mientras las autoridades y productores queseros tienen un nivel de conciencia ante la problemática medio a alto (8.9), los agricultores lo tienen bajo (7.3)

(Figura 4), por lo que un proyecto de elaboración y aplicación de biofertilizantes tendría que iniciar por genera conciencia y motivación en ellos.

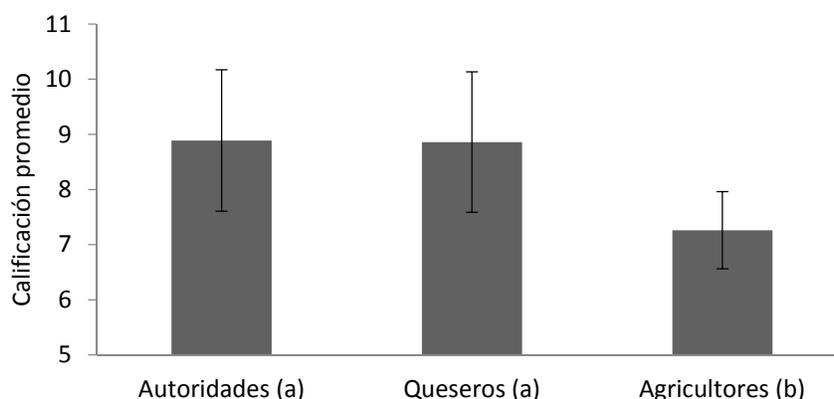


Figura 4. Evaluación de la conciencia ambiental de los actores relacionados con la contaminación ambiental de Chipilo Pue.

La calificación va de de 5 a 10, donde 5 es muy baja y 10 deseable.

#### 2.4.7 Contaminación por lactosuero

En Puebla, al igual que en las principales regiones queseras del país como Chihuahua, Jalisco, Tlaxcala, Chiapas o Zacatecas, los registros oficiales sobre la producción quesera es limitado (Agudelo y Cesín, 2013). No hay información sobre el número, tipo de talleres que procesan leche, destino de la producción, cantidad de residuos que se generan, la forma como se desechan o su daño potencial, por lo que es difícil estimar el beneficio económico y social contra el impacto ambiental de esta actividad (Poméon y Cervantes, 2010).

Los resultados obtenidos muestran que se procesan 57,000 L de leche al día y que se generan cerca de 35,000 de lactosuero, de los cuales sólo se aprovecha alrededor del 30% para la alimentación de becerros, vacas y cerdos (23%) y para la elaboración de requesón (7%), proceso que produce un segundo subproducto aún más contaminante por su contenido en sales (Córdova y Gonaldi, 2017). Si se considera que a nivel mundial se aprovecha el 55% del suero que se produce (Parra, 2009), entonces podemos considerar que el nivel de aprovechamiento en la región es bajo.

Por cada litro de suero generado se utilizan en promedio 4 de agua para el proceso de limpieza de equipo y utensilios, valor semejante al reportado por Valencia y Ramírez (2009) para el procesado de queso en España y superior al reportado por Córdova y Gonaldi (2017) para los productores artesanales de queso de la región del Tandil en Argentina. Además de la generación de aguas jabonosas, se produce suero con sales neutralizantes y cloruro de sodio, lo que agrava el problema de contaminación.

De los talleres visitados, ninguno cuenta con sistema de tratamiento de aguas residuales, y se observó que además se desperdician pequeños trozos de queso que no alcanzan a ser moldeados, crema disuelta en suero, leche diluida en agua del lavado de los tambos de leche, bolsas de plástico con crema, cajas de cartón y agua jabonosa.

Dependiendo del tipo de queso que se fabrica se generan diferentes tipos de lactosueros (LS). En Chipilo, el 96% de los productores elabora queso fresco como el panela y botanero (que produce suero dulce), quesillo ranchero y requesón (que produce suero ácido). El resto de los productores se dedica exclusivamente a la producción de yogurt o postres a base de leche, por lo que no generan contaminación por lactosuero. El suero ácido salado, ha ocasionado deterioro a los drenajes y cañerías por su efecto corrosivo (Barroeta, 2014 comunicación personal), lo que muy probablemente permita su filtración en el subsuelo y mantos freáticos. Finalmente el lactosuero llega hasta los arroyos y campos abiertos contribuyendo a su deterioro.

El 7% de los talleres queseros utiliza el lactosuero para elaborar requesón y queso ranchero, lo que genera un segundo suero de leche (SSL), el cual contiene una alta cantidad de cloruro de sodio y sales neutralizantes que resultan ambientalmente perjudiciales. Si estos sueros se mezclan con el agua de lavado, entonces se generan aguas residuales de suero de leche (ARSL) (Carvalho *et al.*, 2013).

Si en Chipilo se generan 35,000 L de lactosuero al día, y se utilizan 4 L de agua en procesos de limpieza, entonces los efluentes reales que genera la industria quesera son del orden de 140,000 L, los cuales actualmente se descargan sin ningún tratamiento. Si 1,000 L de lactosuero equivalen a la contaminación de las descargas municipales producidas en un día por 650 personas (Sienkiewicz y Riedel, 1990), entonces la cantidad de suero que se genera en Chipilo al día rebasa en 3.6 veces la contaminación de aguas negras generada por su población (INEGI, 2009).

#### 2.4.8 Tipos de unidades de producción (talleres de queso) y contaminación ambiental

La tipificación de los talleres de producción de queso indica que el 42% de las queserías de Chipilo son artesanales: procesan menos de 1,000 L de leche al día, cuentan con menos de tres empleados, tienen un nivel de equipamiento bajo y no aplican técnicas de conservación ni control de calidad de materia prima. El 21% son empresas en transición: procesan entre 1,000 y 4,000 L de leche al día, emplean de 3 a 5 personas, el nivel de equipamiento es medio, aplican por lo menos una técnica de conservación y dos de control de calidad de materia prima. Finalmente, el 37% de los talleres se tipificó como tecnificados: procesan más de 4,000 L de leche al día, emplean más de 6 personas, el nivel de equipamiento es bueno (generalmente de acero inoxidable), aplican técnicas de conservación y control de calidad de materia prima (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Puntuación resultante en la tipificación de talleres queseros de Chipilo.**

Productor	Cantidad leche procesa	Número empleados	Nivel equipamiento	Control calidad leche	Manejo leche	Total puntos	Tipo Taller
1	1	2	2	2	2	9	Tecnificado
2	0	0	0	1	0	1	Artesanal
3	0	0	0	0	0	0	Artesanal
4	2	2	2	2	0	8	Tecnificado
5	0	0	1	1	1	3	Artesanal
6	0	0	0	0	0	0	Artesanal
7	0	0	0	2	0	2	Artesanal
8	1	0	2	2	1	6	Tecnificado
9	0	0	1	2	2	5	Transición
10	1	1	1	0	1	4	Transición
11	1	0	1	2	1	5	Transición
12	1	0	1	2	1	5	Tecnificado
13	0	0	0	0	0	0	Artesanal
14	2	2	2	2	1	9	Tecnificado
15	1	1	2	2	1	7	Tecnificado
16	1	1	1	2	1	6	Tecnificado
17	0	0	0	1	1	2	Artesanal
18	0	1	0	0	0	1	Artesanal
19	1	0	0	1	1	3	Transición

El análisis de la contaminación ambiental ocasionada por los talleres indica que más de la mitad genera un nivel medio y alto: utilizan aditivos alimentarios como leche en polvo, manteca vegetal, sales neutralizantes, sales fundentes, conservadores y saborizantes,

por lo que se puede afirmar que la producción local está perdiendo el carácter artesanal. Sólo el 26% de los talleres visitados mantiene un proceso rústico que genera un suero dulce neutro poco contaminante, pero que no es aprovechado (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Puntuación resultante en la estimación de contaminación ambiental ocasionada por las queserías de Chipilo.**

Productor	Uso productos químicos	Cantidad Suero	Aprovecha suero	Cantidad agua utiliza	Total puntos	Contaminación Ambiental
1	2	1	3	2	8	Alta
2	0	0	2	1	3	Baja
3	2	0	3	1	6	Media
4	2	2	3	2	9	Alta
5	0	0	1	1	2	Baja
6	0	0	2	0	2	Baja
7	0	0	1	2	3	Baja
8	2	1	1	2	6	Media
9	1	0	1	1	3	Baja
10	2	0	2	2	6	Media
11	2	0	1	2	5	Media
12	2	1	3	2	8	Alta
13	0	0	3	0	3	Baja
14	2	2	3	2	9	Alta
15	2	2	2	2	8	Alta
16	2	1	1	2	6	Media
17	1	0	2	1	4	Baja
18	0	0	3	0	3	Baja
19	2	1	2	2	7	Alta

Al correlacionar ambas variables se observó que el nivel de tecnificación tiene una correlación positiva con el nivel de contaminación ( $r=0.74$ ), siendo los talleres tecnificados los que presentan un nivel más alto de contaminación (Figura 5) debido al uso de productos químicos ( $\sigma=0.74$ ) así como de altos volúmenes de agua para procesos de limpieza ( $\sigma=0.79$ ). La cantidad de suero generado y el aprovechamiento de suero resultaron poco significativas  $\sigma=0.53$  y  $0.42$  respectivamente.

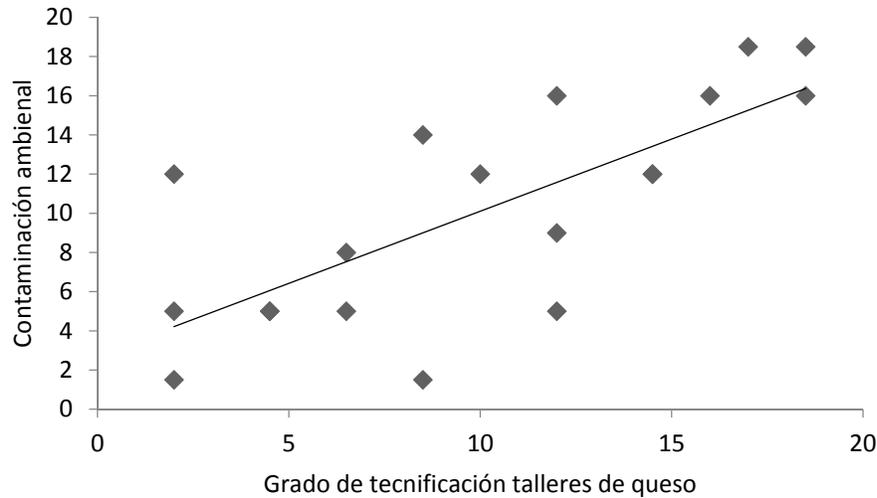


Figura 5. Correlación entre el grado de tecnificación y el nivel de contaminación de los talleres queseros.

## 2.5 Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo indican que la producción de queso ocasiona un nivel de contaminación ambiental importante, por lo que es necesario fomentar el desarrollo de este sector y en la medida de lo posible adaptar modelos exitosos y estrategias integrales que contemplen, además de la valorización y aprovechamiento de los subproductos de queserías, el fortalecimiento institucional, la calidad, el desarrollo comercial, y la certificación de origen (Córdova y Gonaldi, 2017).

La industria quesera de Chipilo, como en muchas regiones rurales del país, atraviesa por una situación desfavorable debido a la contaminación ambiental que ocasiona, por lo que se requiere estimular la producción orgánica-artesanal sin uso de aditivos aprovechando el lactosuero, el cual es una fuente subvalorada con potencial biotecnológico.

Considerando la cantidad y tipo de lactosuero que se genera y vierte, se puede concluir que la industria quesera, al dejar su característica artesanal, ocasiona un daño ambiental considerable, por lo que es necesario atender el problema apoyando la actividad quesera como un centro potencial de desarrollo regional pero ofreciendo alternativas técnicas para el aprovechamiento de los subproductos que genera.

Las fuentes puntuales de contaminación se localizan en los talleres tecnificados, por lo que es donde prioritariamente se debe atender el problema llamando la atención de las autoridades locales y dueños de los talleres ofreciéndoles información, asesoría, capacitación y opciones técnicas.

## 2.6 Literatura citada

- Agudelo, L. y Cesín Vargas, A. (2013) Evaluación socioeconómica de los productores de queso Bola de Ocosingo, Chiapas1 ICAR, Universidad Autónoma del Estado de México; UAER, Coordinación de Humanidades, UNAM.
- Aider, M., Halleux, D. y Melnikova, I. (2009) Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(3): 334-341.
- Bello, L. D. (2014) Muestreo en Estudio Descriptivos. Universidad de Antioquia – Facultad Nacional de Salud Pública. [aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?](http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?) Fecha de consulta 13 de noviembre de 2016.
- Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A y Tyagi, D. (2007) Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology* 98: 3535–3546.
- Berenguer, J., Corraliza, J.A., Moreno, M.M. y Rodriguez, L. (2003) La medida de las actitudes ambientales. Propuesta de una escala de conciencia ambiental (ecobarómetro). *Intervención psicosocial*; (11); 349-358.
- Bernal-Mendoza, H., Ramírez-Juárez, J., Estrella-Chulím, N., Pérez-Avilés, R. y Morett-Sánchez, J. (2010) Importancia de los territorios rurales en el proceso de reestructuración territorial: el caso de la región metropolitana de la ciudad de Puebla. *Economía, Sociedad y Territorio*, X (34):115-120.
- Carvalho, F., Prazeres, A. y Rivas, J. (2013) Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the total environment* 445-446.
- Castro, C., Sánchez, R., Iruegas, L. y Saucedo, G. (2001) Tendencias y oportunidades de desarrollo de la red leche en México. *FIRA Boletín Informativo*. Vol. XXXIII. No. 317.
- Cervantes, E. F., Cesín Vargas, V. y Pérez Sánchez, S.L. (2007) El abandono de la ganadería lechera y reconversión productiva en Chipilo, Puebla. *Técnica Pecuaria en México*. 45 (mayo-agosto). Fecha de consulta agosto de 2015.
- Chislock, M. F., Doster E., Zitomer, R.A. y Wilson, A.E. (2013) Eutrophication: Causes, Consequences, and Controls in Aquatic Ecosystems. *Nature Education Knowledge* 4(4):10-14.

- Córdova, J. A. y Gonaldi, G. (2017) Tratamiento de efluentes en el cluster quesero de Tandil. <https://concienciaambiental.org/2017/04/12/tratamiento-de-efluentes-en-el-cluster-quesero-de-tandil/>. Fecha de consulta abril de 2017.
- Gerrini P. y Prost, A. (2003) Conjuguer l' Elaboration, Techniques, et Enjeux Socioeconomiques. Construction de L' AO Broccio Corse. En Seminaire INRA- INAO. Systemes d' Elevage et Tipicité des Produits Laitieres.
- Gómez, A. R. (1979) Introducción al muestreo. Centro de Estadística y Cálculo. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Grajales-Quintero, A., Serrano Moya, E.D., Christine, M. y Von-H, H. (2013) Los métodos y procesos multicriterio para la evaluación. Revista Luna azul; (36):285-306.
- INEGI (2009) Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos: San Gregorio Atzompa, Puebla. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México.
- Londoño, M. M., Sepúlveda, J. U. y Hernández, A. (2010) Utilización del suero de queso fresco en la elaboración de bebida fermentada con cultivos probióticos. Ciencia y Tecnología de Alimentos; 20(2):53-57.
- Merriam, S. (2009).Qualitative research. A guide to design and implementation.San Francisco: Jossey-Bass.
- Parra, H. R. (2009) Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. Revista de la Facultad Nacional Agrícola de Medellín 62(1):4967-4982.
- Poméon, T. y Cervantes, F. (2010) El sector lechero y quesero en México de 1990 a 2009: entre lo global y local. Reporte de Investigación. CIESTAAM, Universidad Autónoma de Chapingo, México; (89):1-47.
- SEDESOL (2010) Catálogo de comunidades. Consultado en línea febrero 2016. <http://www.microrregiones.gob.mx/catloc/contenido.aspx?refnac=211250001>.
- SIAP (2016) Boletín de leche. México, octubre-diciembre, SIAP-SAGARPA. Consultado en febrero de 2017. [http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche\\_Septiembre2016.pdf](http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure%20leche_Septiembre2016.pdf).
- Sienkiewicz, T. y Riedel, C. L. (1990) Whey and whey utilization. Gelsenkircher-Baer, Germany: Verlag Th. Mann.
- Silva, G. S; Muñoz, O. A. De la Isla, L.y Said, I.G. (2002) Contaminación ambiental en la región de Atlixco: 1. Agua. Terra; 20(3):15-18.
- Valencia, D. E. y Ramírez, M. L. (2009) La industria de la leche y la contaminación del agua. Elementos; 73(16):27-29.

Villegas, A. (2004) La Denominación de Origen y la Marca Colectiva. En: Quesos artesanales mexicanos: una estrategia para contribuir al desarrollo regional. México, CARNILAC Industrial.

Wagner, T (1996) Contaminación, causas y efectos. Ed. Gernika, México.

## **CAPÍTULO III. FITOTOXICIDAD DE LACTOSUEROS GENERADOS POR LA INDUSTRIA QUESERA DE LA LOCALIDAD DE CHIPILO, PUEBLA**

### **3.1 Resumen**

El propósito de este trabajo fue evaluar la fitotoxicidad de los principales lactosueros que se generan en las queserías de la localidad de Chipilo, Puebla. Se midió la concentración letal (CL<sub>50</sub>) por inhibición de la germinación, y el efecto subletal (ESL) por disminución del desarrollo midiendo longitud y biomasa de plántulas de alfalfa. El experimento se repitió en sistemas hidropónicos utilizando vermiculita estéril como sustrato evaluando la concentración a la que se inhibe la emergencia de la planta (CL<sub>50</sub>), y el efecto subletal (ESL) por disminución del desarrollo midiendo longitud y biomasa de plántulas de maíz de 20 días y alfalfa de 60 días. Se estudió el efecto de la concentración de lactosuero al 20, 40, 60 y 80% contra un control de agua potable. Los resultados indican que el lactosuero ácido salado es más tóxico que el dulce presentando una CL<sub>50</sub> de 37 y 55% respectivamente y un ESL significativo al 12% ( $p < 0.05$ ) en semillas de alfalfa. El suero dulce resultó fitotóxico a una concentración del 40% para plántulas de maíz, pero no para alfalfa, observándose un efecto promotor de crecimiento a concentraciones entre el 4 y 6% en la longitud de plántulas de alfalfa y maíz ( $p < 0.05$ ), lo que indica que es posible utilizar el lactosuero en aplicaciones agrícolas.

### **3.2 Introducción**

La contaminación ambiental es el resultado negativo, tanto en la salud humana como en el equilibrio ecológico, de la actividad productiva debida al consumo y transformación de la materia prima. El desarrollo económico y el modelo de consumo de la sociedad humana ha llegado a niveles insostenibles, por lo que es necesario evaluar el daño que ciertas actividades económicas causan, actuar y en lo posible revertirlas (Navarro *et al.*, 2006).

Los bioensayos son pruebas diseñadas para complementar la información que ofrecen las pruebas químicas tradicionales como la demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO) en los estudio de toxicidad, cuyo objetivo es estimar el impacto biológico potencial (toxicidad) que tiene la exposición de los efluentes

industriales, sean sólidos, líquidos o gaseosos, en la función fisiológica de organismos vivos (Schultz *et al.*, 2002).

Para este fin, se han desarrollado metodologías que utilizan organismos acuáticos (bacterias, copépodos, algas y peces), invertebrados (lombrices) y plantas. Las pruebas de toxicidad con plantas superiores permiten estimar de manera rápida, sencilla y económica, el riesgo potencial de los residuos industriales. Las variables más comúnmente reportadas en este tipo de estudios incluyen el porcentaje de germinación, mediciones biométricas como la disminución de la elongación de la raíz y pruebas químicas como alteraciones en el contenido de celulosa y almidón (Tiquia y Tam, 2000).

Los bioensayos de toxicidad con semillas son pruebas estáticas de toxicidad aguda que se realiza en 5 días (Sobrero y Ronco, 2004). Son evidencias útiles para evaluar los efectos del daño ambiental que ocasionan los efluentes cuando son vertidos directamente a los campos de cultivo o en comunidades vegetales cercanas. En estas pruebas se determina la concentración que inhibe la germinación del 50% de las semillas expuestas lo que se considera como la concentración letal ( $CL_{50}$ ) así como la concentración a la que se produce un efecto significativo en el retraso del crecimiento de la plántula (ESL).

Además de las pruebas realizadas *in vitro*, Teaca y Bodirlau (2005) proponen bioensayos de fitotoxicidad en sistemas hidropónicos con sustrato con el objetivo de evaluar efluentes que posiblemente tienen un efecto negativo en la aeración de la raíz, ampliando de esta manera la posibilidad de conocer el potencial fitotóxico de diversos efluentes y su efecto en especies vegetales de interés comercial.

El objetivo del presente trabajo fue estimar la toxicidad y daño potencial de los lactosueros que se generan de manera predominante en la región de Chipilo, Puebla durante la producción de queso, como base para proponer estrategias para su aprovechamiento.

### 3.3 Materiales y métodos

#### 3.3.1 Condiciones experimentales

El presente trabajo se hizo en condiciones de laboratorio controlando temperatura (28 °C) y fotoperiodo (12-12) y se hizo en el periodo julio a diciembre 2015 en las instalaciones facilitadas por el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP-BUAP).

Preparación de sueros: Se evaluaron sueros ácidos salados, de la elaboración de quesoillo, y suero dulce, de la elaboración de queso panela, que son los que predominan en la región de Chipilo, Puebla. Se recolectaron justo antes de hacer la descarga al drenaje en el taller “Lacteos Galeazi”. Se almacenaron en frascos Schott de 1 L y se conservaron a 4 °C en un tiempo no mayor a 24 horas. Los sueros se calentaron a 20 °C, y para caracterizarlos se determinó su pH y acidez (AOAC, 1995) por triplicado, utilizando un potenciómetro Hanna 2010. Posteriormente, se diluyeron al 20, 40, 60, 80 y 100% con agua destilada estéril y se almacenaron en tubos Falcon de 50 mL.

Preparación de material biológico: Por su nivel y homogeneidad de respuesta, en los estudios de fitotoxicidad se utiliza como especie biológica a la lechuga (*Lactuca sativa*) (Sobrero y Ronco, 2004). Sin embargo, en este trabajo se utilizaron semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.) considerando que son las principales especies que se utilizan en la producción de forrajes para alimentación de ganado lechero en la región de estudio. Las semillas se compraron con abastecedores locales, se seleccionaron por su forma y tamaño y se almacenaron en ambiente seco, obscuridad y temperatura ambiente utilizando frascos herméticos. Para este experimento se utilizaron semillas sin esterilizar, y se evaluó la germinación en comparación a un control de semillas regadas con agua.

Primera etapa: Determinación de la concentración letal de lactosuero ácido y dulce en semillas de alfalfa. Los tratamientos a evaluar para determinar la concentración letal fueron diluciones de lactosuero dulce y ácido en el rango 20-80% (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Tratamientos evaluados para determinar la concentración de lactosuero ácido y dulce en semillas de alfalfa.**

Tratamiento	Abreviatura	Descripción	cajas	semillas/caja
T1	Control 0%	Control agua potable	3	10
T2	D 20%	Lactosuero dulce al 20%	3	10
T3	D 40%	Lactosuero dulce al 40%	3	10
T4	D 60%	Lactosuero dulce al 60%	3	10
T5	D 80%	Lactosuero dulce al 80%	3	10
T6	A 20%	Lactosuero ácido salado al 20%	3	10
T7	A 40%	Lactosuero ácido salado al 40%	3	10
T8	A 60%	Lactosuero ácido salado al 60%	3	10
T9	A 80%	Lactosuero ácido salado al 80%	3	10

Una vez preparadas las diluciones de los lactosueros a evaluar y el control con agua potable estéril, se colocó en cada caja Petri un disco de papel filtro Whatman No.3 y se saturó con 5 mL de cada dilución. Con una pinza esterilizada se colocaron 10 semillas de alfalfa por caja y por dilución (3 cajas por dilución), separándolas para permitir su desarrollo. Las cajas se envolvieron en plástico negro y se incubaron a  $20\pm 2$  °C durante 120 horas (Wang, 1987; Navarro *et al.*, 2006). Para cada caja se contabilizó el número de semillas germinadas y se graficó el porcentaje de éstas contra la concentración de cada suero, y se interpoló el valor que produce la inhibición de la germinación en el 50% de la población. El experimento se hizo 2 veces, con sueros de diferente lote y en fechas diferentes.

Segunda etapa: Determinación de la concentración subletal de lactosuero dulce en semillas de alfalfa. El experimento se hizo modificando la concentración de lactosuero en diluciones menores al 20% por comparación de la disminución de biomasa, expresada en peso seco, longitud total y longitud de la radícula con respecto al control de agua potable para determinar la concentración a la cual se produce un efecto subletal significativo conforme al método descrito por Tiquia y Tam (2000). Se consideró que había un efecto subletal significativo cuando la comparación de medias entre cada tratamiento contra el control resultó estadísticamente significativa según la prueba *t*-Student ( $p < 0.05$ ).

Tercera etapa: Determinación de la concentración letal de lactosuero dulce en plántulas de maíz y alfalfa. Se determinó la concentración a la cual hay una inhibición del 50% en

la emergencia de plántulas de alfalfa (60 días) y maíz (20 días). Los tratamientos evaluados se muestran en el Cuadro 10.

**Cuadro 10. Tratamientos evaluados para determinar la concentración letal de lactosueros dulce en plántulas de alfalfa y maíz.**

Tratamiento	Descripción	Plántulas
T1	Control agua potable en alfalfa	50
T2	Lactosuero al 20% en alfalfa	50
T3	Lactosuero al 40% en alfalfa	50
T4	Lactosuero al 60% en alfalfa	50
T5	Lactosuero al 80% en alfalfa	50
T6	Control agua potable en maíz	10
T7	Lactosuero al 20% en maíz	10
T8	Lactosuero al 40% en maíz	10
T9	Lactosuero al 60% en maíz	10
T10	Lactosuero al 80% en maíz	10

Una vez preparadas las diluciones de los lactosueros a evaluar y el control con agua potable estéril, se preparó un germinador de unicel con vermiculita estéril como sustrato en el cual se sembraron 10 semillas de alfalfa por pozo asignando 5 pozos para cada tratamiento. Paralelamente se prepararon tubos Falcon de 50 mL con 30 mL de vermiculita estéril y se sembró una semilla de maíz por tubo con 10 repeticiones por tratamiento. El material se puso en condiciones de invernadero ( $20\pm 4$  °C con fotoperiodo 12-12) y se regó con 5 mL de cada uno de los tratamientos por unidad experimental durante 20 días para el caso de maíz, y 60 para la alfalfa. Se contabilizó el número de plántulas emergidas, se graficó el porcentaje de éstas contra la concentración de cada suero, y se interpoló el valor que produce la inhibición de la emergencia en el 50% de la población.

Cuarta etapa: Determinación de la concentración subletal de lactosuero dulce en plántulas de alfalfa y maíz. El experimento se hizo modificando la concentración de lactosuero en diluciones menores al 20% por comparación de la disminución de biomasa, expresada en peso seco, longitud total y longitud de la raíz con respecto al control de agua potable para determinar la concentración a la cual se produce un efecto subletal significativo conforme al método descrito por Tiquia y Tam (2000). Se consideró que había un efecto subletal significativo cuando la comparación de medias entre cada

tratamiento contra el control resultó estadísticamente significativa según la prueba *t*-Student ( $p < 0.05$ ).

### **3.3.2 Diseño experimental**

En los cuatro experimentos realizados se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DECA) evaluando en la primera etapa el  $LC_{50}$  en semillas de alfalfa del lactosuero dulce y ácido en diluciones entre el 0 y 100%. Cada dilución (tratamiento) se evaluó por triplicado resultando un total de 36 cajas o unidades experimentales de medición. En la segunda etapa se determinó el efecto subletal del lactosuero dulce en semillas de alfalfa en diluciones entre el 0 y 20%. Cada tratamiento se evaluó por triplicado (18 unidades de medición). En la tercera etapa se determinó el  $LC_{50}$  en plántulas de maíz y alfalfa del lactosuero dulce en diluciones entre el 0 y 100% (10 plántulas de maíz y 30 de alfalfa por dilución), y en la cuarta etapa el efecto subletal de lactosuero dulce en plántulas de alfalfa y maíz en diluciones entre el 0 y 10% (10 plántulas de maíz y 30 de alfalfa por dilución). Las unidades técnicas de medición fueron las semillas germinadas (porcentaje), y el crecimiento (peso seco, longitud total y longitud de radícula).

### **3.3.3 Análisis estadístico de resultados**

Los resultados de germinación y emergencia para determinar la concentración letal se analizaron gráficamente obteniendo la concentración a la cual el 50% de la población no germinó o no emergió. Se consideró que había efecto subletal cuando la diferencia de biomasa (peso seco o longitud) fue estadísticamente menor que el control aplicando la prueba de comparación de medias de *t*-Student a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ). Para lograr que el coeficiente de variación se mantuviera por debajo del 30% se eliminó, cuando fue necesario un par de datos (máximo y mínimo). Se emplearon los paquetes estadísticos de Excel y SAS (2004).

## **3.4 Resultados y discusión**

Caracterización de lactosueros. El análisis químico realizado a los sueros utilizados en el experimento resultó similar a los reportados por Guerrero *et al.* (2012) para el lactosuero ácido, y por Panesar *et al.* (2010) para el dulce. El primero presenta una mayor

acidez por la fermentación que ocurre antes de ser procesado. Este suero ácido con sales, cuyo pH fue de  $5.41 \pm 0.3$  y acidez de  $38 \pm 0.6$  °Dornic, proviene de la elaboración de quesillo, requesón y queso ranchero. Contiene cloruro de sodio y calcio dependiendo del tipo de producto que se elabora y que se añade para mejorar la consistencia del cuajado, como saborizante y como conservador. También contiene ácidos producidos por actividad microbiana natural, sales alcalinas neutralizantes y ácido acético utilizado para precipitar las lactoalbúminas. El segundo suero, que se genera como subproducto de la elaboración de queso fresco (aro y panela) el cual se le conoce como dulce por no tener sales añadidas y bajas concentraciones de cloruro de calcio, tuvo un pH cercano al neutro ( $6.8 \pm 0.3$ ) y baja acidez ( $19 \pm 0.5$  °Dornic).

Primera etapa: Determinación de la concentración letal de lactosuero ácido y dulce. La germinación de las semillas en el T1 fue de 83.5%, por lo que se restó 16.5% a cada uno de los valores obtenidos para los demás tratamientos. El suero ácido salado presentó un efecto letal significativo (muerte de más del 50% de las semillas) en la dilución del 37% que indica una toxicidad alta si se compara con el valor del suero dulce sin sal, que fue del 55% (Figura 6).

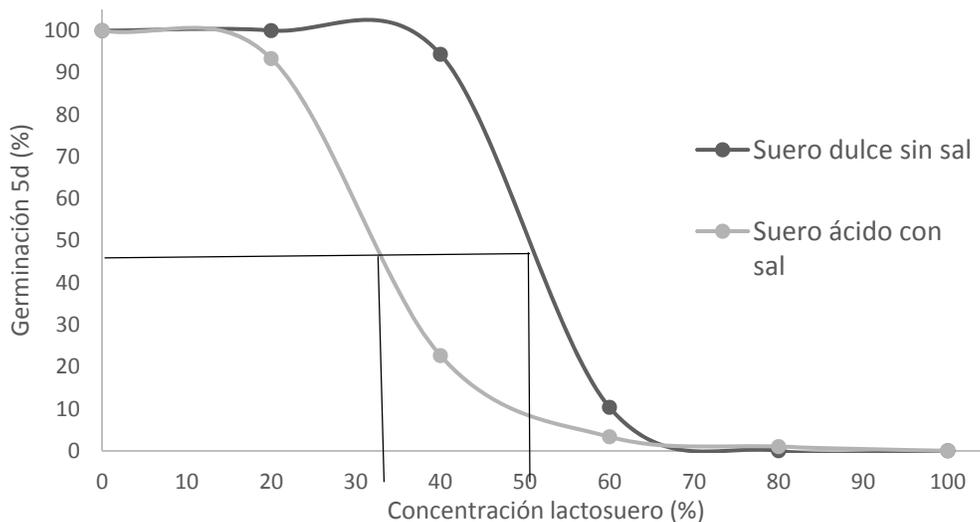


Figura 6. Toxicidad de lactosueros dulce y ácido en la germinación de semillas de alfalfa. Valores corregidos considerando que el control presentó 83.5 % de germinación. ( $n > 30$ ).

La toxicidad del suero ácido salado puede explicarse, además del bajo pH, por la presencia de cloruro de sodio. Dantas *et al.* (2005) demostraron un efecto fisiológico

adverso en semillas de alfalfa expuestas a estrés salino. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por Laynez-Garsaball, *et al.* (2008), quienes observaron una disminución de la germinación por efecto del aumento del potencial osmótico ejercido por el NaCl y la inhibición total de la germinación en altas concentraciones de sal (Porta *et al.*, 1999). Dantas *et al.* (2005) estudiaron el efecto del cloruro en la absorción y germinación de semillas, encontrando que además de la acumulación de cloruro, hay una disminución de la absorción de agua, afectando la tasa de emergencia. Los autores concluyeron que la concentración de sal reduce el número de semillas germinadas y retarda el proceso fisiológico de la germinación, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

No se encontraron trabajos similares sobre la evaluación de efluentes de quesería, sin embargo, en trabajos realizados por Laynez-Garsaball *et al.* (2008) con diversos tipos de sales en alfalfa y maíz, encontraron que hay un efecto fitotóxico, por lo que se deduce que la toxicidad del lactosuero es debida principalmente al contenido de sales, lo que explica la diferencia observada entre la fitotoxicidad del suero dulce y ácido salado. En un trabajo publicado por Laynez-Garsaball *et al.* (2008) se demuestra el efecto fitotóxico de diversas sales en el desarrollo de plantas de alfalfa y maíz. Por otra parte se puede asumir que la lactosa y el ácido láctico, al reaccionar con el sodio y potasio presentes en el suero ocasionan un efecto similar al producido por diversos iones como NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> evaluados por Llanes *et al.* (2005), por lo tanto se puede asumir que la toxicidad se debe a la alteración de las membranas plasmáticas al permitir la entrada de iones externos y la salida de los solutos internos de las células de las plantas (Allen *et al.*, 1995). Los iones presentes en el suero de leche también pueden causar endurecimiento de las paredes celulares, afectando el crecimiento de la plántula (Mahdavi y Modarres, 2007).

Segunda etapa: Determinación de la concentración subletal de lactosuero dulce en semillas de alfalfa. Además de presentar toxicidad a una concentración del 55%, el suero dulce presentó un efecto subletal a concentraciones del 12 %, diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la longitud total de los germinado y de los hipocótilos de 10 días tratados

con lactosuero a esta concentración en comparación al control (Figura 7a y 7b), aunque no se observaron efectos en la biomasa total.

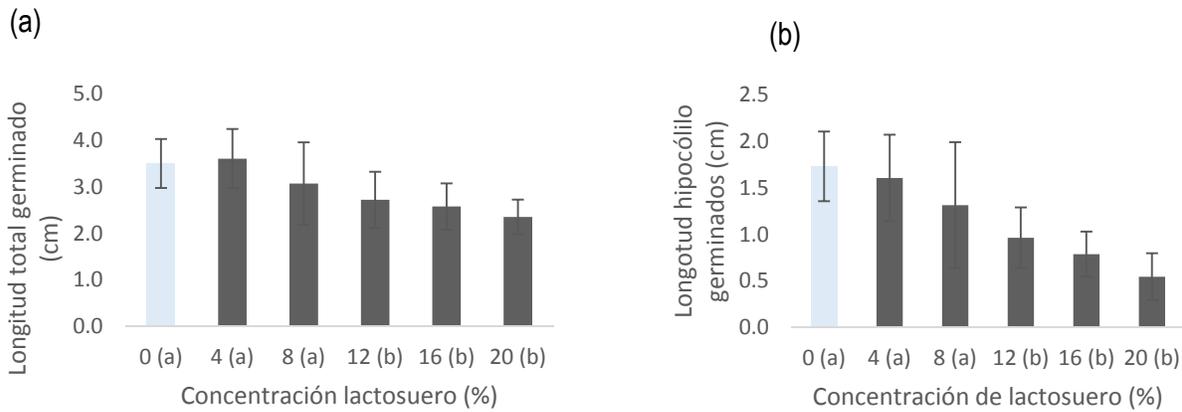


Figura 7: Efecto subletal de lactosuero dulce en la longitud total (a) y longitud del hipocótilo (b) de germinados de alfalfa de 10 días (n=30). Letras diferentes en paréntesis indican diferencia significativa entre control (0) y tratamientos ( $t$ -Student  $p < 0.05$ ).

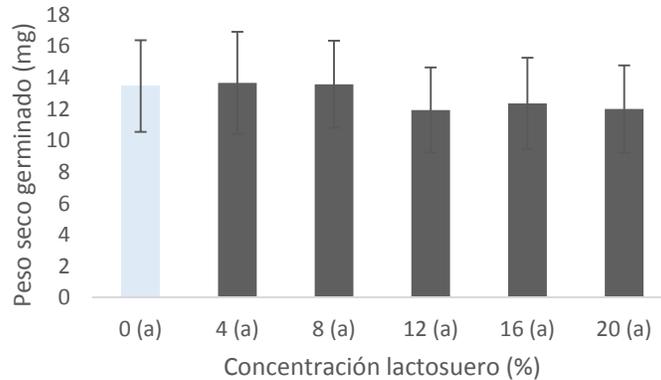


Figura 8. Efecto subletal de lactosuero dulce en la biomasa total de germinados de alfalfa de 10 días (n=30). Letras diferentes en paréntesis indican diferencia significativa entre control (0) y tratamientos ( $t$ -Student  $p < 0.05$ ).

Navarro *et al.* (2006) reportan la inhibición en el crecimiento de hipocótilos de semillas de achicoria, lechuga y escarola expuestas a efluentes neutralizados de industrias cítricas y vitivinícolas diluidos al  $10^3$ . Si comparamos este valor con el obtenido en la etapa 2 del presente experimento, en el cual se observó inhibición del desarrollo del hipocótilo a una concentración del 12% ( $10^1$ ), entonces podemos afirmar que el lactosuero dulce tiene una toxicidad baja.

Tercera etapa: Determinación de la concentración letal de lactosuero dulce en plántulas de maíz y alfalfa (Figura 9). La concentración letal para maíz se obtuvo a una concentración del 40% y no se obtuvo letalidad en alfalfa (Figura 8), lo que indica que esta especie es más tolerante al lactosuero dulce que el maíz, por lo que se deduce que el uso de lactosuero dulce puede ser utilizado con seguridad para el riego de alfalfa. Al respecto, diversos autores como Wang (1987) y Navarro *et al.* (2006) reportan diferencias de tolerancia a la toxicidad de diferentes sustancias, siendo la lechuga una de las especies más utilizadas en este tipo de estudio por su alta sensibilidad. La tolerancia de la alfalfa se puede explicar por ser una semilla más resistente a pH bajo, como ha sido reportado por Marini *et al.* (2011) quienes encontraron que la alfalfa puede crecer de manera óptima entre pH 5 y 6, pero que puede tolerar valores de pH aún más bajos, mientras que el pH óptimo de crecimiento de maíz es de 6 a 7.2 y presenta inhibición de crecimiento en valores de pH menores a 5 (Aldrich y Long 1994).

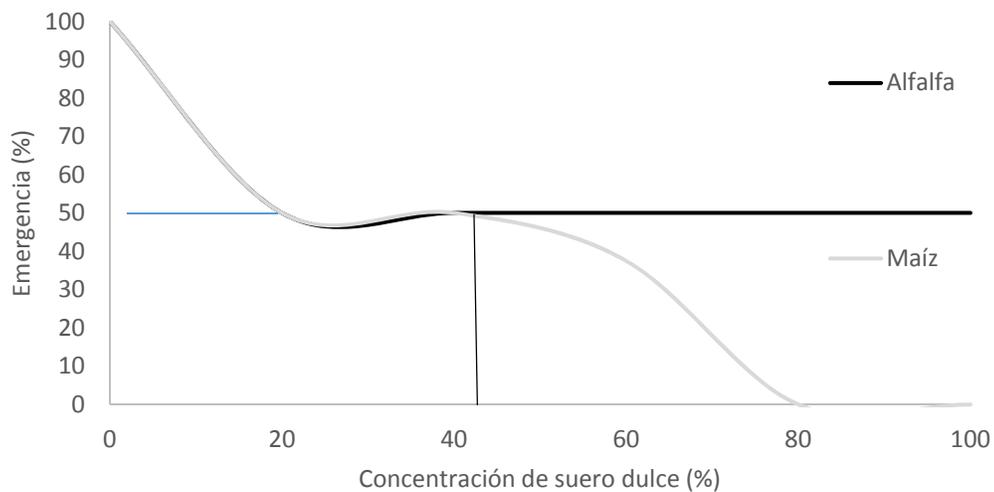


Figura 9. Toxicidad de lactosuero dulce en la emergencia de plántulas de maíz (n=10) y alfalfa (n=30).

Cuarta etapa: Determinación de la concentración subletal de lactosuero dulce en plántulas de alfalfa y maíz. El suero dulce no presentó efecto subletal a una concentración menor al 10%, ni en plántulas de maíz ni en alfalfa, como se muestra en las Figuras 3.9 y 3.10 y se observó un efecto benéfico a una concentración del 4 y 6% para maíz (Figura 10a), y entre el 2 y 8% para alfalfa (Figura 11a) observándose un

incremento significativo de la longitud del vástago (parte aérea) de la plántula con respecto al control ( $p < 0.05$ ).

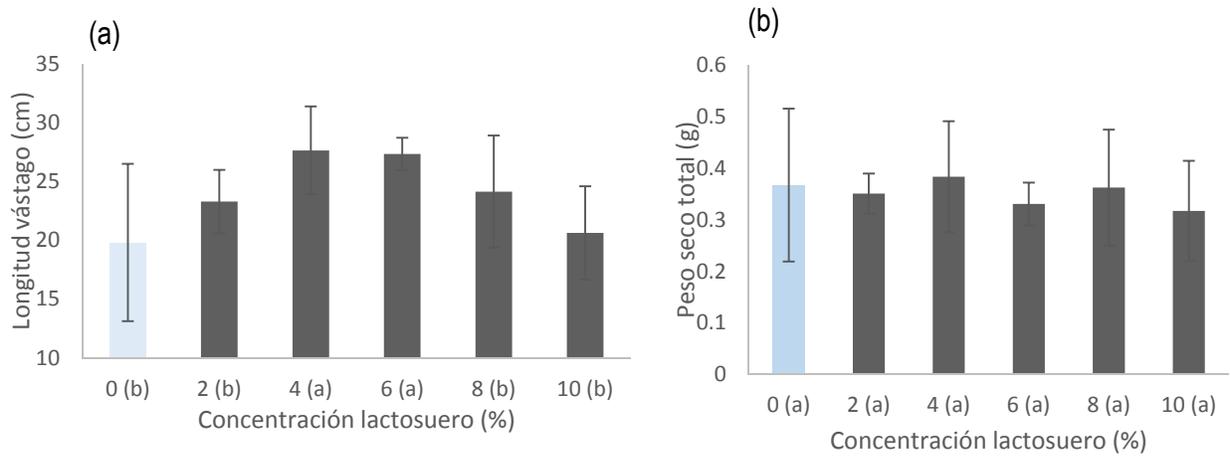


Figura 10. Efecto subletal de lactosuero dulce en la longitud (a) y biomasa (b) de plántulas de maíz de 45 días ( $n=10$ ). Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa ( $t$ -Student  $p < 0.05$ ).

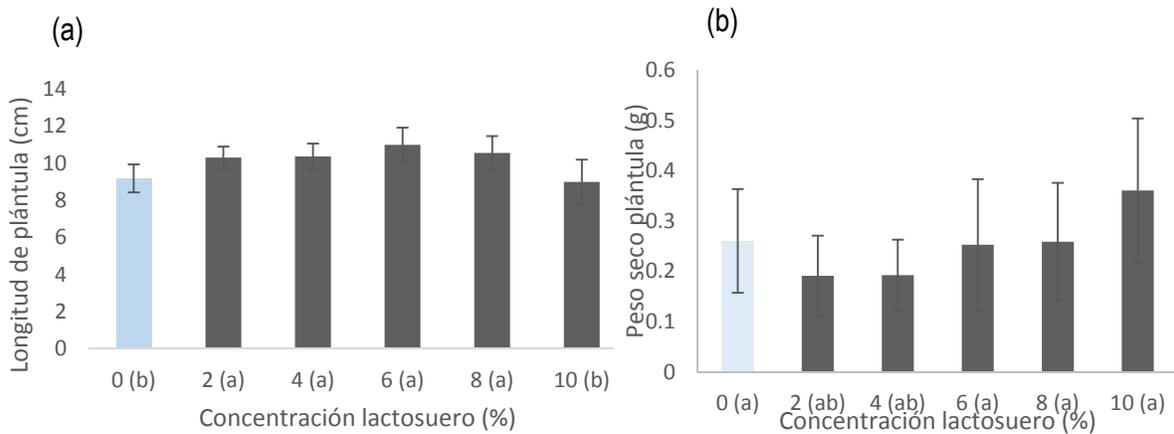


Figura 11. Efecto subletal de lactosuero dulce en la longitud (a) y biomasa (b) de plántulas de alfalfa de 60 días ( $n=30$ ).

Letras diferentes entre columnas indican diferencia significativa ( $t$ -Student  $p < 0.05$ ).

Las diferencias observadas entre los experimentos *in vitro* e hidropónicos, demuestran que es menor la fitotoxicidad para la alfalfa que para el maíz, y que en ambas especies el lactosuero es más tóxico en las etapas tempranas del desarrollo, por lo que no sería recomendable aplicar lactosuero en esa etapa de desarrollo.

### 3.5 Conclusiones

De acuerdo a la caracterización química realizada, se encontró que los principales sueros que se generan en Chipilo Puebla son dulce y ácido-salado. El primero es el que mayor potencial de uso biotecnológico presenta, ya que tiene una toxicidad baja ( $CL_{50}$  de 55%) aunque se determinó que a una concentración del 12% presenta un efecto negativo en el crecimiento de germinados de alfalfa de 10 días, por lo que sólo se podría recomendar su uso diluido al 10% o menos, a esa concentración no se observaron efectos de inhibición de crecimiento, por lo que es seguro utilizarlo en aplicaciones agrícolas, aunque no se recomienda utilizarlo en etapas tempranas de desarrollo ni en maíz ni alfalfa.

Por su parte, el suero ácido salado presentó una fitotoxicidad alta (37%) lo que lo hace menos apto para aprovecharlo vía biotecnológica y no recomendable para utilizarlo en aplicaciones agrícolas.

### 3.6 Literatura citada

- Aldrich, S. R. y Long, M.E. (1994) Producción Moderna del Maíz. Agencia para el Desarrollo Internacional (A I D). México.
- Allen, G. J., Jones, R. G. y Leigh, R. A. (1995) Sodium transport measured in plasma membrane vesicles isolated from wheat genotypes with different  $K^+/Na^+$  discrimination traits. *Plant Cell Environ.* (18): 105-115.
- AOAC (1995). Association of Official Analytical Chemists. Manual of Official Methods of Analysis 15th Edition. Washington, USA.
- Dantas, B. F; Ribeiro, L. y Arago, C. A. (2005) Physiological response of cowpea seeds to salinity stress. *Revista Brasileira de Sementes* 27(1):144-148.
- Guerrero, W., Castilla, P., Cárdenas, K., Gómez, C. y Castro, J. (2012) Degradación anaerobia de dos tipos de lactosuero en reactores UASB. *Tecnología Química.* 33(1):99-106.
- Layne-Garsaball, J., Méndez-Natera, J. R. y Mayz-Figueroa, J. (2008) Efecto de la salinidad y del tamaño de la semilla sobre la germinación y crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de laboratorio. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas;* 11(1):17-25.

- Llanes, A., Reinoso, H. y Luna, V. (2005) Germination and early growth of *Prosopis strombulifera* seedlings in different saline solutions. *World Journal of Agricultural Sciences* 1(2):120-128.
- Mahdavi, B. y Modarres Sanavy, S. A. (2007) Germination and seedling growth in grasspea (*Lathyrus sativus*) cultivars under salinity conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*; 10(2):273-279.
- Marini Köpp, M., Paixão Passos, L., da Silva Verneue R., da Silva Lédo, F. J., Meirelles Coimbra, J. L. y Costa de Oliveira, A. (2011) Effects of nutrient solution pH on growth parameters of alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes. *Comunicata Scientiae*; 2(3):135-141.
- Navarro, A. R., Arrueta, R. G. y Maldonado, M. C. (2006) Determinación del efecto de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria. *Rev. Toxicol*; (23):125-129.
- Panesar, P., Kennedy, F., Knill, C. y Kosseva, M. (2010) Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Braz. arch. biol. technol.* 53(1):43-54.
- Porta, C. J., López-Acevedo, R. M. y Roquero De, L. C. (1999) *Edafología*. Editorial Mundi-Prensa, España.
- Schultz, E., Vaajasaari, K., Joutti, A. y Ahtiainen, J. (2002) Toxicity of industrial wastes and waste leaching test eluates containing organic compounds. *Ecotoxicology and Environment safety-Environmental Research.* 248-255.
- Sobrero, M.C. y Ronco, A. (2004) Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). p: 71-79. En: *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*, G. Castillo, Ed., Ottawa, Canadá.
- Statistical Analysis System Institute Inc. (2004). *SAS/STAT 9.0 User guide*. Cary, NC: SAS.
- Teaca, C. A. y Bodirlau, R. (2005) Assessment of toxicity of industrial wastes using crop plant assays. *BioResources* 3(4):1130-1145.
- Tiquia, S. M. y Tam, N. F. (2000) Co-composting of spent pig litter and sludge with forced aeration. *Biores. Technol.* 72(1):1-7.
- Wang, W. (1987) Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*; (6):409-414.

## **CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, MICROBIOLÓGICA Y FITOTÓXICA DE LACTOFERMENTOS ELABORADOS EN FERMENTACIONES AERÓBICAS, ANAERÓBICAS, CON AGITACIÓN Y SIN AGITACIÓN.**

### **4.1 Resumen**

Con la finalidad de aprovechar subproductos agroindustriales en la elaboración de biopreparados e inoculantes para uso agrícola, en este trabajo se probó la eficiencia de bacterias ácido lácticas (BAL) comerciales liofilizadas y la levadura *Kluyveromyces marxianus*, de manera individual y en consorcio, para fermentar lactosuero. Se evaluaron procesos fermentativos en condiciones aeróbicas, anaeróbicas, con y sin agitación, evaluando la disminución de pH, acidez titulable, capacidad amortiguadora y contenido de microorganismos viables a las 12, 24 y 36 horas de fermentación. Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado (DECA) con tres repeticiones por tratamiento. Posteriormente, se evaluó el efecto de cada lactofermento en la germinación de 30 semillas axénicas de alfalfa (*Medicago sativa*). Los mejores resultados se obtuvieron con el lactofermento elaborado con el consorcio BAL-*K. marxianus* en fermentación estática anaeróbica con una disminución de pH de 6.80 a 5.32, producción de ácidos orgánicos de 4.15 gL<sup>-1</sup>, aumento en la capacidad amortiguadora de 0.6 a 0.83 meq NaOH y contenido de microorganismos viables de 6.93 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> a las 36 horas de fermentación. La germinación de la semilla de alfalfa inoculada con el lactofermento BAL-*K. marxianus* fue de 81.4%, presentó un incremento del 29% en peso seco y 41% de longitud con respecto al control de suero sin inocular ( $p < 0.05$ ). Estos resultados son de interés en el diseño de biofertilizantes e inoculantes de bajo costo aprovechando subproductos agroindustriales y para establecer las mejores condiciones fermentativas para su producción.

### **4.2 Introducción**

En México, como en el resto del mundo, el lactosuero, subproducto que se genera durante la producción de queso, ocasiona un considerable impacto cuando se vierte sin control al ambiente, además de que se desaprovecha una rica fuente de nutrientes dado su contenido en azúcares, proteínas, vitaminas y minerales (Londoño *et al.*, 2010). El lactosuero requiere de una alta cantidad de oxígeno para ser degradado por lo que se le

considera como un residuo no peligroso pero de riesgo ambiental (Miranda *et al.*, 2007; Araujo *et al.*, 2013), por lo que es necesario buscar opciones para su aprovechamiento.

Diversos autores proponen su fermentación con microorganismos eficientes y su uso como biofertilizante. Se les conoce como lactofermentos y se han reportado beneficios en nutrición vegetal y control biológico (Obregón, 2000; Pacheco, 2003). Con estos lactofermentos, se aprovecha, además de los nutrientes del lactosuero, los metabolitos que se producen durante su fermentación, principalmente ácidos orgánicos y vitaminas que contribuyen a la promoción del desarrollo de las plantas. La técnica descrita propone el uso de bacterias ácido lácticas con o sin levaduras de panificación, sin embargo no se considera el uso de cepas especializadas en la degradación de lactosa, como es el caso de *K. marxianus* (Llerena y Díaz, 2017).

Estudios previos demuestran la efectividad del uso de consorcios de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras de la leche en comparación con cepas individuales para la fermentación de lactosuero (Plessas *et al.*, 2008) pero no hay estudios sobre el aprovechamiento de dicha sinergia en aplicaciones agrícolas, por lo que el objetivo de este trabajo fue seleccionar lactofermentos y procesos fermentativos con base en caracterización fisicoquímica- microbiológica y fitotoxicidad. Por otra parte se evaluaron diferentes tipos de fermentación así como la eficiencia de bacterias lácticas de manera individual o en consorcio con levaduras, para aprovechar el lactosuero en la elaboración de biopreparados e inoculantes y su efecto en la germinación de alfalfa (*M. sativa* L.).

## **4.3 Materiales y métodos**

### **4.3.1 Condiciones experimentales**

El presente trabajo se hizo en condiciones de laboratorio controlando la composición del lactosuero así como la ausencia de antibióticos. Se hizo en el periodo enero a marzo 2015 en las instalaciones facilitadas por el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del CICM, ICUAP.

Suero: Se obtuvieron 2 L de suero a partir de la elaboración de queso fresco con leche en polvo Dairy Gold® al 13 % en agua destilada con Cuajo Cuamex®.y se ajustó la

concentración de lactosa al 4% con un analizador automático Lactoscan SLP 60. Al suero se le adicionó 2% de sacarosa (p/v) como fuente adicional de carbono.

Cepas microbianas: Se utilizaron cepas comerciales liofilizadas de bacterias ácido lácticas (Choozit<sup>®</sup>) y la levadura *Kluyveromyces marxianus* (CDBB-L-836) suministrada por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV. Las BAL y *K. marxianus* se activaron en 50 ml de medio MRS (de Man Rogosa Sharpe) Difco<sup>®</sup> y LB (Luria Bertani), respectivamente a 37 °C durante 24 horas en matraz Erlenmeyer de 250 mL en condiciones estériles. Los medios fueron inoculados con ayuda de un asa de siembra, a partir de colonias frescas crecidas de cultivos gelificados (Panesar *et al.*, 2010). Las células microbianas crecidas hasta fase estacionaria en el medio líquido fueron centrifugadas a 3,500 rpm durante 10 minutos y su densidad óptica se ajustó con agua destilada estéril, usando un espectrofotómetro, a  $0.5 \pm 0.2$  y a una longitud de onda de 600 nm. Las cepas se refrigeraron a 4 °C y antes de ser inoculadas se activaron en 50 mL de lactosuero contenidos en un matraz de 125 mL en agitación orbital durante 4 horas.

Fermentaciones. El lactosuero se dividió en cuatro lotes, el primero se inoculó al 5% (v/v) con las BAL, el segundo con *K. marxianus* al 5% (v/v), el tercero con la mezcla de ambos en partes iguales al 5% (v/v) y el cuarto se utilizó como control sin inocular. Cada lote se subdividió para realizar fermentaciones en condiciones aeróbicas y anaeróbicas con y sin agitación, conforme se describe en el Cuadro 11.

Todas las fermentaciones se incubaron a 30 °C. Las fermentaciones agitadas se colocaron en un agitador orbital Shaker Thermo Scientific MAX Q 4000 a 200 rpm. Las fermentaciones aeróbicas estáticas se realizaron en tubos Falcon de 15 mL con tapón de algodón y 13 mL de lactosuero. Las fermentaciones aeróbicas con agitación, se realizaron en tubos Falcon de 50 mL con tapón de algodón y 13 mL de lactosuero y las fermentaciones anaeróbicas, estáticas y agitadas, en tubos Falcon de 15 mL con tapón rosca con 13 mL de lactosuero. A todos los tratamientos se les realizaron mediciones al inicio, 12, 24 y 36 horas de pH y acidez por titulación potenciométrica expresada como ácido láctico (AOAC, 1995), intercambio catiónico expresada como capacidad amortiguadora (CA) en mEq de NaOH mL<sup>-1</sup> a partir de las curvas de titulación (Levic *et*

al., 2005), para lo cual se utilizó un potenciómetro PH120 Conductronic. Se analizó el contenido de microorganismos viables, expresado en Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>) por el método de sellado masivo en placa por diluciones seriadas (Corral-Lugo *et al.*, 2012). Se utilizó el medio nutritivo LB y se incubó a 20 °C por 24 horas.

**Cuadro 11. Tratamientos realizados para evaluar efectividad de cepas y condiciones en la fermentación de lactosuero.**

Tratamiento	Abreviatura	Descripción
T1	Contr-An-Ag	Sin inóculo anaerobio agitado
T2	Contr-An Est	Sin inóculo anaerobio estático
T3	Contr-Aer-Est	Sin inóculo aerobio estático
T4	Contr-Aer-Ag	Sin inóculo aerobio agitado
T5	Bal-Kluy-An-Ag	BAL- <i>K. marxianus</i> anaerobio agitado
T6	Bal-Kluy-An Est	BAL- <i>K. marxianus</i> anaerobio estático
T7	Bal-Kluy-Aer-Est	BAL- <i>K. marxianus</i> aerobio estático
T8	Bal-Kluy-Aer-Ag	BAL- <i>K. marxianus</i> aerobio agitado
T9	Kluy-An-Ag	<i>K. marxianus</i> anaerobio agitado
T10	Kluy-An Est	<i>K. marxianus</i> anaerobio estático
T11	Kluy-Aer-Est	<i>K. marxianus</i> aerobio estático
T12	Kluy-Aer-Ag	<i>K. marxianus</i> aerobio agitado
T13	Bal-An-Ag	BAL anaerobio agitado
T14	Bal-An Est	BAL anaerobio estático
T15	Bal-Aer-Est	BAL aerobio estático
T16	Bal-Aer-Ag	BAL aerobio agitado

BAL: Bacterias ácido lácticas

En una segunda etapa del experimento se evaluó la fitotoxicidad de los lactofermentos obtenidos conforme al método descrito por Tiquia y Tam (2000) en semillas de alfalfa expuestas una hora a cada tratamiento diluido en agua destilada estéril en proporción 1:4, en comparación con un control de lactosuero sin fermentar. Por duplicado se colocaron 10 semillas por caja Petri en disco de papel filtro Watman 30 humedecido. Las cajas se sellaron con papel parafilm para mantener una humedad constante y se incubaron a 30 °C durante 5 días para evaluar porcentaje de germinación, longitud del germinado y peso seco por tratamiento.

### **4.3.2 Diseño experimental**

Tanto para la caracterización fisicoquímica de los lactofermentos como para las pruebas de fitotoxicidad se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DECA). En la caracterización se consideró como tratamiento a cada una de las combinaciones de tipo de fermentación (aerobio o anaerobio), (agitado o estático) y la combinación de cepas (individuales y en consorcio), resultando un total de 16 tratamientos, Como unidad experimental se consideró cada tubo con lactosuero con y sin inóculo. Las pruebas se hicieron por triplicado en 4 tiempos resultando un total de 192 unidades experimentales. Las variables de respuesta fueron el pH, acidez, capacidad de amortiguamiento y contenido de microorganismos viables. La evaluación de fitotoxicidad de los lactofermentos se hizo sólo con los tratamientos que destacaron por sus propiedades fisicoquímicas. Se utilizaron 2 cajas Petri por tratamiento y un control de agua potable con 10 semillas de alfalfa. La unidad experimental de medición fue cada caja Petri, y se seleccionaron sólo los tratamientos que presentaron un efecto superior al control (suero sin inocular).

### **4.3.3 Análisis estadístico de resultados**

Se hicieron comparaciones de medias con la prueba de *t*-Student a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) después de comprobar que por lo menos uno de los tratamientos resultó diferente en la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar las mejores condiciones fermentativas así como los tratamientos que no resultaron fitotóxicos. Se utilizó Excel y el paquete estadístico SAS (2004).

## **4.4 Resultados y discusión**

Análisis fisicoquímicos del lactosuero. Una vez ajustada la concentración de lactosa del suero a 4% con el Lactoscan, los valores de sólidos no grasos, grasa y proteína final fueron 0.32%, 0 y 2.63% respectivamente. Además se obtuvo un pH de  $6.76 \pm 0.01$ , acidez de  $0.354 \pm 0.07$  y una capacidad de amortiguamiento de  $1.401 \pm 0.12$  que corresponden a un suero dulce bajo en acidez (Miranda *et al.*, 2009).

En este trabajo se consideró como eficiencia fermentativa a la disminución de pH en el menor tiempo asociada a la máxima producción de ácidos orgánicos y aumento en la capacidad de amortiguamiento.

Se observó que la inoculación de lactosuero con BAL y BAL -*K. marxianus* produce un efecto benéfico en las primeras 12 horas de fermentación en comparación con el lactosuero sin inocular ( $p<0.05$ ) reduciendo el pH hasta en 0.8 unidades, es decir, de 6.37 en suero sin inocular, hasta 5.55 en suero inoculado en condiciones anaeróbicas estáticas (Cuadro 12).

**Cuadro 12. Acidificación (pH) de lactofermentos inoculados con cepas individuales y en consorcio en 36 horas en fermentación anaeróbica estática.**

Inoculante\Tiempo(h)	Unidades de pH			
	0	12	24	36
Suero sin inocular	6.83±0.06	6.37±0.06 <sup>c</sup>	5.74±0.20 <sup>b</sup>	5.15±0.10 <sup>a</sup>
BAL	6.83±0.06	5.65±0.03 <sup>a</sup>	5.66±0.10 <sup>ab</sup>	5.21±0.17 <sup>a</sup>
BAL- <i>K. marxianus</i>	6.83±0.06	5.55±0.05 <sup>a</sup>	5.40±0.002 <sup>a</sup>	5.32±0.03 <sup>a</sup>
<i>K. marxianus</i>	6.83±0.06	6.02±0.03 <sup>b</sup>	5.59±0.09 <sup>ab</sup>	5.06±0.07 <sup>a</sup>

Letras distintas en misma columna indican diferencia significativa  $n=3$  (*t*-Student  $p<0.05$ ).

BAL: Bacterias ácido lácticas.

La disminución del pH es una respuesta deseada en la fermentación de lactosuero (Cury *et al.*, 2014). En este trabajo se obtuvo una disminución significativa del pH a las 12 y 24 horas, utilizando los consorcios BAL-*K. marxianus* en comparación con el suero sin inocular, suero inoculado con *K. marxianus* o con BAL ( $p<0.05$ ), lo que puede contribuir a la inhibición de patógenos y solubilización de fosfatos. Los valores obtenidos a las 36 horas no fueron mejores al control ni tan bajos como los reportados por Miranda *et al.* (2009) de 4.37 o por Londoño, *et al.* (2010) de 3.51 a los 20 días, lo que puede ser explicado por el poco tiempo de fermentación, mientras que la similitud de pH entre el suero sin inocular y los inoculados a las 36 horas puede ser explicado por la descomposición natural del lactosuero (cambios fisicoquímicos y enzimáticos).

A las 12 horas se observó eficiencia en la producción de ácidos orgánicos con la inoculación de BAL en condiciones anaeróbicas estáticas con un incremento superior al 50% con respecto al control (4.44 gL<sup>-1</sup> de ácidos orgánicos contra 2.56 del suero sin

inocular) ( $p < 0.05$ ). A las 24 horas se observó eficiencia en la producción de ácidos orgánicos cuando *K. marxianus* trabajó de manera aislada con un incremento del 19% con respecto al control (4.37 gL<sup>-1</sup> de ácidos orgánicos contra 3.66 del suero sin inocular) ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 13), pero a las 36 horas ya no se observaron diferencias contra el suero sin inocular.

**Cuadro 13. Producción de ácidos orgánicos en lactofermentos inoculados con cepas individuales y en consorcio durante 36 horas en fermentación anaeróbica estática.**

Inoculante\Tiempo(hrs)	Acidez (gL <sup>-1</sup> Ácido láctico)			
	0	12	24	36
Suero sin inocular	2.16±0.15	2.56±0.27 <sup>b</sup>	3.66±0.16 <sup>b</sup>	4.81±0.11 <sup>ab</sup>
BAL	2.16±0.15	4.44±0.24 <sup>a</sup>	3.85±0.47 <sup>ab</sup>	3.91±0.48 <sup>c</sup>
BAL- <i>K.marxianus</i>	2.16±0.15	4.05±0.24 <sup>a</sup>	4.11±0.00 <sup>ab</sup>	4.14±0.20 <sup>bc</sup>
<i>K. marxianus</i>	2.16±0.15	2.94±0.06 <sup>b</sup>	4.37±0.17 <sup>a</sup>	5.49±0.27 <sup>a</sup>

Letras distintas en misma columna indican diferencia significativa  $n=3$  (*t*-Student  $p < 0.05$ ).

BAL: Bacterias ácido lácticas.

La producción de ácido láctico es de particular interés en este trabajo considerando que además de servir como nutriente vegetal, participa en el aprovechamiento de fosfatos, ya sea solubilizándolos o atrapando al calcio y aluminio que interfieren con su asimilación (Rashid *et al.*, 2004). En este sentido se esperaría que el aumento en la producción de compuestos orgánicos con capacidad amortiguadora a mayor tiempo de fermentación genere compuestos útiles en la quelación de cationes, y por lo tanto en la nutrición de las plantas. La máxima acidez obtenida en este trabajo (5.45 gL<sup>-1</sup>) es aceptable considerando el poco tiempo de fermentación (36 horas) en comparación con el reportado por Londoño *et al.* (2010) que fue de 7 gL<sup>-1</sup> y por Plessas *et al.* (2008) de 8.75 gL<sup>-1</sup>, para fermentación de suero en 120 horas.

La máxima producción de compuestos amortiguantes se observó en lactosuero inoculado con *K. marxianus* a las 12, 24 y 36 horas lográndose incrementos hasta del 25% con respecto al suero sin inocular en condiciones anaeróbicas estáticas (de 1.09 meq en comparación a 0.93 del suero sin inocular) ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 14).

**Cuadro 14. Producción de compuestos con capacidad amortiguadora en lactofermentos inoculados con cepas individuales y en consorcio durante 36 horas en fermentación anaeróbica estática.**

Inoculante\Tiempo(hrs)	Capacidad amortiguadora (Meq NaOHmL <sup>-1</sup> )			
	0	12	24	36
Suero sin inocular	0.60±0.03	0.61±0.05 <sup>c</sup>	0.82±0.04 <sup>b</sup>	0.93±0.01 <sup>b</sup>
BAL	0.60±0.03	1.07±0.10 <sup>a</sup>	0.84±0.14 <sup>ab</sup>	0.74±0.07 <sup>c</sup>
BAL- <i>K.marxianus</i>	0.60±0.03	0.81±0.03 <sup>b</sup>	0.86±0.00 <sup>ab</sup>	0.83±0.05 <sup>bc</sup>
<i>K. marxianus</i>	0.60±0.03	0.70±0.00 <sup>b</sup>	1.03±0.02 <sup>a</sup>	1.09±0.08 <sup>a</sup>

Letras distintas en misma columna indican diferencia significativa n=3 (*t*-Student  $p<0.05$ ).  
BAL: Bacterias ácido lácticas.

La inoculación de semillas de alfalfa con lactofermentos de 36 horas presentó un efecto benéfico en el desarrollo de los germinados con incrementos del 40% en biomasa (peso seco y longitud) en comparación al suero sin inocular (0.88 g contra 0.60 y 1.98 cm contra 1.13 respectivamente), pero no se observaron mejorías con la adición de la levadura *K. marxianus* en la preparación del lactofermento ( $p<0.05$ ) (Figuras 12 y 13).

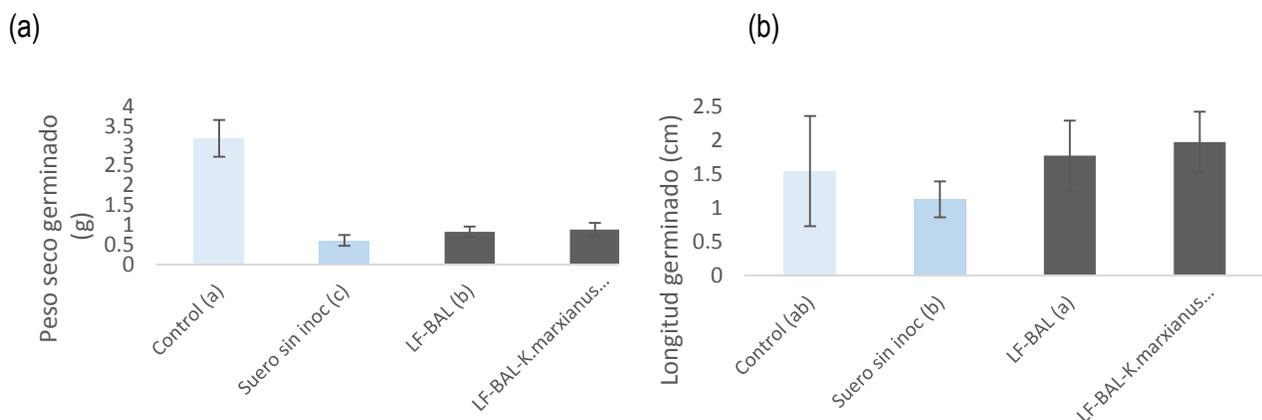


Figura 12. Efecto de lactofermentos anaerobisiso estáticos con cepas lácticas individuales y en consorcio en el desarrollo de germinados de alfalfa de 10 días. (a) peso seco y (b) longitud total (n=20).  
Inoc: inocular. Letras distintas entre columnas indican diferencia significativa (*t*-Student  $p<0.05$ ). BAL: Bacterias ácido lácticas.

Diversos investigadores demuestran en sus trabajos la importancia y ventajas de utilizar consorcios microbianos para aumentar los rendimientos en la fermentación de lactosa así como para la obtención de metabolitos que no se podrían obtener con cepas puras (Botes *et al.*, 2007; Paramithioti *et al.*, 2006; Plessas *et al.*, 2008). Por su parte, Matsui

(2009) observó que las BAL en consorcio con levaduras como *Saccharomyces* sp. y *Schizosacharomyces* sp. son más eficientes en condiciones anaeróbicas para la descomposición de residuos orgánicos ricos en carbohidratos, como es el caso del lactosuero. En general se observaron mejoras con la inoculación de microorganismos benéficos para la fermentación de lactosuero y la promoción del desarrollo de germinados de alfalfa, pero no se observaron ventajas de inocular el consorcio BAL-*K. marxianus* en comparación con las BAL solas. Estos resultados difieren con aquellos reportados por los autores citados, por lo que se sugiere realizar nuevas investigaciones en fermentación más prolongadas.

No obstante que no se observaron diferencias entre lactofermentos elaborados con o sin *K. marxianus*, sí se observaron mejorías en cuanto al porcentaje de germinación (la germinación se incrementó del 67 al 81% con el uso de lactofermentos inoculados Figura 14), así como una respuesta más homogénea en la producción de biomasa, disminuyéndose de manera deseable el coeficiente de variación del 22 al 15% ( $p < 0.05$ ) (Figura 15). Es importante mencionar que todos los tratamientos mostraron un efecto subletal significativo en peso seco (biomasa) ( $p < 0.001$ ) con respecto al control de agua potable por lo que será necesario hacer más estudios sobre su efecto en planta y las concentraciones óptimas de su aplicación.

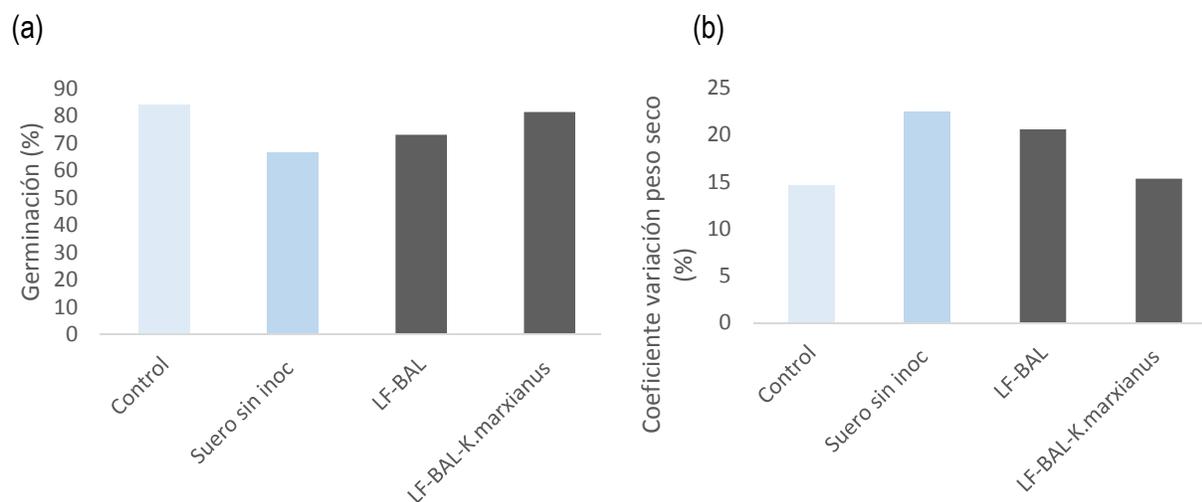


Figura 13. Efecto de lactofermentos anaerobios estáticos con cepas lácticas individuales y en consorcio en la germinación (a) y producción de materia seca (b) de germinados de alfalfa de 10 días (n=20).

Inoc: inoculados; BAL: Bacterias ácido lácticas.

Al analizar el comportamiento cinético de disminución de pH, producción de ácidos orgánicos y capacidad amortiguadora de las fermentaciones con BAL y BAL-K. *marxianus* en condiciones anaeróbicas estáticas, se observó una optimización del proceso en las primeras 12 horas en comparación con lactosuero sin inocular en las mismas condiciones ( $p < 0.05$ ) (Figuras 4.3 a, b y c).

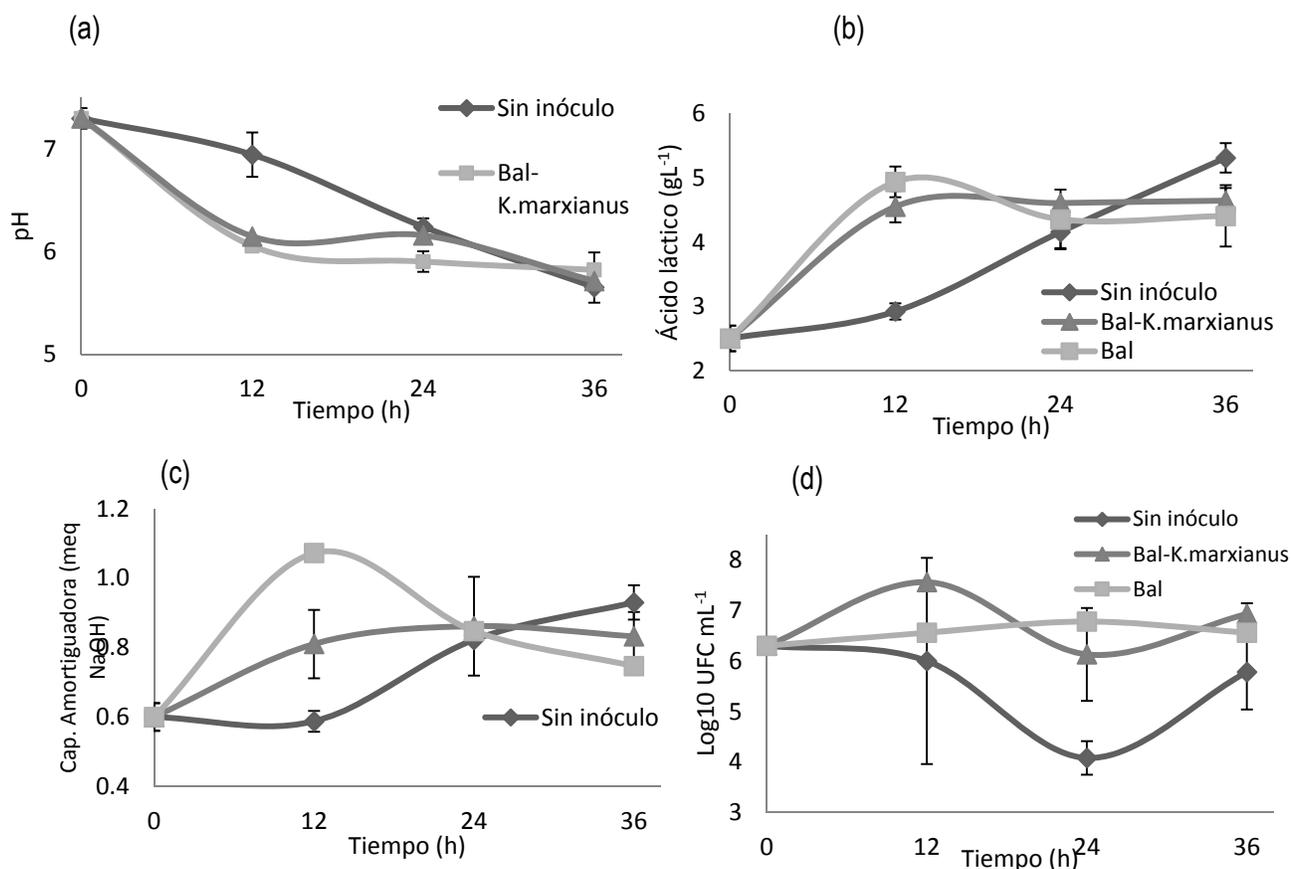


Figura 14. Cinética de pH (a), acidificación (b), capacidad amortiguadora (c) y crecimiento microbiano (d) en lactosuero anaeróbico estático inoculado con cepas lácticas individuales y en consorcio (n=4). BAL: Bacterias ácido lácticas.

El contenido de microorganismos viables reportados por Londoño *et al.*, 2010 y Miranda *et al.*, 2007, para la elaboración de productos fermentados a base de lactosuero fue similar a los obtenidos en este trabajo (del orden de 6 a 7 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>). Con respecto a las curvas de crecimiento microbiano se pudo observar que cuando la inoculación del suero se hizo sólo con BAL hay una tendencia más clara al crecimiento que cuando se

utiliza el consorcio BAL-*K. marxianus*, cinética que presenta fluctuaciones que pueden ser explicadas por la relación de inhibición y sinergia que se da entre ambas cepas (Figura 14d).

La inoculación de semillas de alfalfa con lactofermentos obtenidos a las 36 horas, bajo diferentes condiciones (aerobiosis, anaerobiosis, con y sin agitación), presentó efectos positivos en el desarrollo de semillas de alfalfa. Sobresalieron de manera significativa aquellos que se prepararon con BAL, la levadura *K. marxianus* y la combinación de ambas cepas, en comparación con lactosuero sin inocular en fermentaciones anaerobias, aerobias con y sin agitación ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 15).

**Cuadro 15. Efecto de la aplicación de diferentes tipos de lactofermentos en el desarrollo de alfalfa.**

Tratamiento	Peso seco (g)	Longitud (cm)	Germinación (%)
Fermentación: Anaeróbica agitada			
T1 Sin inóculo	0.55±0.06 <sup>a</sup>	1.44±0.36 <sup>a</sup>	78.63
T2 BAL- <i>K.marxianus</i>	0.64±0.13 <sup>a</sup>	1.37±0.29 <sup>a</sup>	68.75
T3 <i>K.marxianus</i>	0.64±0.15 <sup>a</sup>	0.90±0.01 <sup>a</sup>	10.26
T4 BAL	0.79±0.11 <sup>b</sup>	1.63±0.41 <sup>a</sup>	82.00
Fermentación: Anaeróbica estática			
T5 Sin inóculo	0.63±0.14 <sup>a</sup>	1.13±0.27 <sup>a</sup>	76.67
T6 BAL- <i>K.marxianus</i>	0.80±0.29 <sup>b</sup>	1.93±0.54 <sup>b</sup>	81.40
T7 <i>K.marxianus</i>	0.72±0.17 <sup>a</sup>	1.43±0.37 <sup>a</sup>	25.00
T8 BAL	0.60±0.46 <sup>a</sup>	1.81±0.43 <sup>b</sup>	73.08
Fermentación: Aeróbica estática			
T9 Sin inóculo	0.90±0.20 <sup>a</sup>	1.22±0.23 <sup>a</sup>	78.57
T10 BAL- <i>K.marxianus</i>	0.72±0.25 <sup>a</sup>	1.49±0.37 <sup>a</sup>	83.33
T11 <i>K.marxianus</i>	0.78±0.18 <sup>a</sup>	1.48±0.31 <sup>a</sup>	81.25
T12 BAL	0.86±0.33 <sup>a</sup>	1.66±0.47 <sup>b</sup>	83.33
Fermentación: Aeróbica agitada			
T13 Sin inóculo	0.64±0.13 <sup>a</sup>	1.03±0.15 <sup>a</sup>	80.00
T14 BAL- <i>K.marxianus</i>	0.66±0.11 <sup>a</sup>	1.89±0.53 <sup>a</sup>	81.82
T15 <i>K.marxianus</i>	0.73±0.17 <sup>a</sup>	1.57±0.29 <sup>a</sup>	83.33
T16 BAL	0.66±0.14 <sup>a</sup>	1.11±0.17 <sup>a</sup>	71.43

Letras distintas en misma columna y bloque, indican diferencia significativa (*t* Student  $p < 0.05$ ) comparando cada tratamiento con su control respectivo. Columna de % de germinación no se hizo prueba estadística. n=30. BAL: Bacterias ácido lácticas.

Se observó que el lactosuero obtenido en fermentaciones anaeróbicas estáticas inoculadas con el consorcio BAL-*K.marxianus*, (T6) fue significativamente mejor ( $p < 0.05$ )

al presentar un incremento de hasta en 27% en peso seco (0.8 contra 0.63 g), 70% en longitud (1.93 cm contra 1.13), y 6% más semillas germinadas en comparación con el control (T5) probado bajo las mismas condiciones (Figura 14).

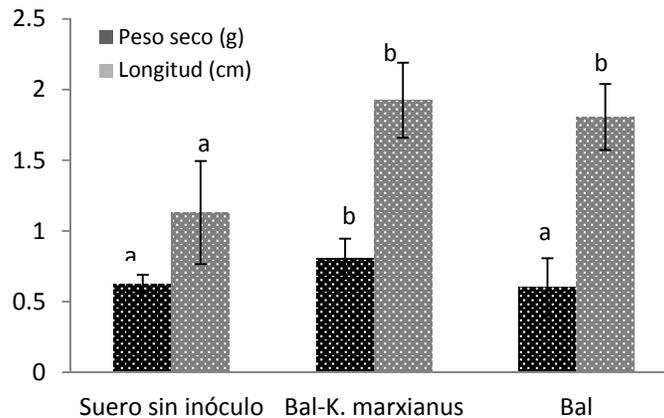


Figura 15. Efecto de lactofermentos anaeróbicos estáticos inoculados con cepas lácticas individuales y en consorcio en el desarrollo de germinados de alfalfa de 10 días (n=30). Letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencia estadísticamente significativa (M-W  $p < 0.05$ ). BAL: Bacterias ácido lácticas.

Se seleccionó al lactofermento obtenido con la inoculación de BAL-*K. marxianus* en fermentaciones anaeróbicas estáticas (T6) principalmente por su efecto positivo en la germinación de alfalfa en el aumento de peso seco (27%), longitud de germinados (41%) ( $p < 0.05$ ) y aumento en el porcentaje de germinación de un 6% con respecto al suero sin inocular. También por su capacidad para disminuir el pH, producir ácido láctico y aumentar la capacidad amortiguadora en las primeras horas de fermentación ( $p < 0.05$ ). Con los demás tratamiento se obtuvieron resultados menos sobresalientes como las BAL donde se obtuvieron buenos parámetros fermentativos en las mismas condiciones fermentativas (T8), sin embargo sólo en el aumento en la longitud del germinado. El lactosuero inoculado con *K. marxianus* en fermentación anaerobia estática (T7) también presentó la producción más alta de ácido láctico, capacidad amortiguadora y biomasa ( $p < 0.05$ ) pero no presentó mejoras en la germinación de alfalfa, por lo que se puede deducir que el efecto benéfico está más asociado al tipo de microorganismos presentes en los lactofermentos que a sus características fisicoquímicas.

## 4.5 Conclusiones

La inoculación con microorganismos benéficos mejoró la fermentación de lactosuero en condiciones anaeróbicas estáticas, y presentó un efecto benéfico en la promoción del desarrollo de germinados de alfalfa. La adición de la levadura *K. marxianus* al inóculo de BAL no mejora significativamente la capacidad para disminuir el pH, producir ácidos orgánicos o aumentar la capacidad amortiguadora en las primeras horas de fermentación, ni en el desarrollo de germinados de alfalfa, pero presentó una mejoría en el porcentaje de germinación y una mayor homogeneidad en la respuesta al incremento del peso seco, por lo que se concluye que su uso tiene potencial considerando su capacidad para el aprovechamiento de la lactosa y la producción de metabolitos con aplicación en la preparación de biofertilizantes a base de lactosuero para uso en agricultura orgánica.

## 4.6 Literatura citada

- Araujo, G., Monsalve, L. M. y Quintero, A. L. (2013) Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de la contaminación ambiental. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 4 (2):55-65.
- Botes, A., Svetoslav, D., Johan, W., Mollendorff, V., Botha, A. y Dicks, L. (2007) Identification of lactic acid bacteria and yeast from Boza. *Process. Biochem.* (42):267-270.
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D. y Muñoz-Rojas, J. (2012) Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología*. XIV (2):147-156.
- Levic, J., Prodanovic, O., y Sredanovic, S. (2005) Understanding the buffering capacity in feedstuffs. *Biotech. Anim.Husb.* 21(5-6):309-313.
- Llerena Ramírez, C. y Díaz Torres, R. (2017) Comparación del poder de hidrolisis de lactosa de dos betagalactosidas en leche estandarizada de cabra. *Revista Caribeña de Ciencias Sociales*. Consultado en línea ago 2017:<http://www.eumed.net/rev/caribe/2017/06/leche-cabra.html>
- Londoño, M. M., Sepúlveda, J. U. y Hernández, A. (2010) Utilización del suero de queso fresco en la elaboración de bebida fermentada con cultivos probióticos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*; 20(2):53-57.
- Matsui, S. (2009) Probiotics principle that can help organic farming. *Jour. Envir. Sanit. Eng. Res.* 23(3): 81-87.

- Miranda, M. O., Fonseca, P. L., Ponce, I., Cedeño, C., Sam, R. L. y Martí, V. L. (2007) Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso: Características distintivas y control de calidad. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 17(2):103-108.
- Miranda, M. O., Ponce, I., Fonseca, P. L., Cutido, M., Díaz, R. M. y Cedeño, C. (2009) Características físico-químicas de sueros de queso dulce y ácido producidos en el combinado de quesos de Bayamo. *Rev Cub Aliment Nutr;* 19(1):21-25.
- Obregón M. (2000). Estudios preliminares para evaluar las posibles aplicaciones del lactosuero en la agricultura. *Revista Técnica vol. 1 Instituto Nacional de Aprendizaje (INA). Costa Rica.*
- Pacheco, F. (2003) Lactofermentos: Una alternativa en la producción de abonos orgánicos líquidos fermentados. Costa Rica. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica. Organización de Estudios Tropicales, Instituto Nacional de Aprendizaje (AVINA).
- Panesar, P., Kennedy, F., Knill, C. y Kosseva, M. (2010) Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Braz. arch. biol. technol.* 53(1):43-54.
- Paramithiotis, S., Gioulato, S., Tsakalidou, E. y Kalantzopoulos, G. (2006) Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process. Biochem.* (41):2429-2433.
- Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A. A., Marchant, R. y Banat, M (2008) Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresource Technology;* (99):5951-5955.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. y Latif, F. (2004) Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(2):187-196.
- Statistical Analysis System Institute Inc. (2004). SAS/STAT 9.0 User guide. Cary, NC: SAS.
- Tiquia, S. M. y Tam, N.F. (2000) Co-composting of spent pig litter and sludge with forced aeration. *Biores. Technol.* 72(1):1-7.

## **CAPÍTULO V. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LACTOFERMENTOS DE 5 Y 30 DÍAS DE MADURACIÓN ELABORADOS CON CEPAS COMERCIALES Y CERTIFICADAS, INDEPENDIENTES Y EN CONSORCIO**

### **5.1 Resumen**

El lactosuero ocasiona un considerable impacto cuando es vertido sin control al ambiente, además de que se desaprovecha una rica fuente de nutrientes dado su contenido en azúcares, proteínas, vitaminas y minerales. Una opción para su aprovechamiento es la elaboración de inoculantes y biofertilizantes, sin embargo una limitante es el tiempo requerido para su elaboración, por lo que el objetivo de este trabajo fue comparar el contenido y tipo de ácidos orgánicos, microorganismos viables y fitotoxicidad de lactofermentos elaborados con cepas comerciales (individuales y en consorcio) de lactofermentos elaborados en 5 y 20-30 días de maduración. La fermentación del lactosuero con BAL y levaduras modificó la composición de ácidos orgánicos del lactofermento así como sus características fisicoquímicas a los 5 días de maduración, con pH entre 4 y 4.3, producción de ácidos orgánicos hasta  $2.85 \text{ g L}^{-1}$  y capacidad amortiguadora de hasta  $7.83 \text{ meq NaOH mL}^{-1}$ . Se observó una disminución de fitotoxicidad del 18% asociada a la fermentación del lactosuero. No se observaron diferencias significativas en el efecto agrobiológico. El mejor fermento se obtuvo con cepas comerciales de bacterias ácido lácticas y *Saccharomyces cerevisiae* tanto a los 5 como a los 30 días, lo que demuestra que es posible elaborar lactofermentos con cepas comerciales en fermentaciones de pocos días. Estos resultados son de interés en el diseño de biofertilizantes e inoculantes de bajo costo aprovechando subproductos agroindustriales y para establecer las mejores condiciones fermentativas para su producción.

### **5.2 Introducción**

En el diseño de biopreparados e inoculantes es fundamental la selección de aquellos microorganismos con capacidad y eficiencia para utilizar el sustrato orgánico a utilizar, sus propiedades para interactuar y promover el crecimiento de plantas y su aporte para mejorar la diversidad microbiana del suelo (Matsui, 2009). Las bacterias ácido lácticas (BAL) se utilizan en la elaboración de biofertilizantes a base o con suero de leche no

obstante que sólo tienen capacidad para fermentar el 20% de la lactosa del suero de leche (Vénica *et al.*, 2011), por lo que es necesario utilizar otros microorganismos, que en consorcio con las BAL, permitan la máxima transformación de lactosa en ácidos orgánicos.

Se ha planteado por diversos investigadores que la elaboración de biofertilizantes e inoculantes resulta una opción viable y factible para el aprovechamiento del lactosuero generado por la industria quesera, y el uso de consorcios de bacterias ácido lácticas (BAL) con levaduras de la leche (Plessas *et al.*, 2008), pero no hay estudios previos sobre el aprovechamiento de dicha sinergia con posible aplicación en la elaboración de biopreparados e inoculantes para uso agrícola.

Los lactofermentos son el resultado de un proceso fermentativo de la actividad de microorganismos saprófagos, donde la lactosa del suero de leche es transformada principalmente en ácidos orgánicos (Chávez y Mac Donald, 2005), por lo que el análisis de la transformación de su contenido durante la elaboración de lactofermentos, es fundamental para entender su importancia en aplicaciones agrícolas.

Se pueden obtener diferentes ácidos orgánicos a través de la fermentación de lactosuero, como el láctico, butírico, propiónico y acético (Alam *et al.*, 1988). González (1996) reporta, además de los anteriores, al cítrico, glucónico, itacónico y lactobiónico.

El efecto fisiológico de los ácidos orgánicos en el crecimiento de las plantas ha sido reportado por varios autores (Illmer y Shinner, 1995; Igual *et al.*, 2001). Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular poseen uno o dos grupos carboxilo lo que determina sus propiedades de disociación y la capacidad de formar complejos con cationes metálicos en solución y el desplazamiento de aniones de la solución del suelo (Stevenson, 1967) e incrementan la biodisponibilidad de formas insolubles de varios nutrimentos de las plantas como P y Ca (Goldstein, 1986).

De manera específica se puede deducir que la calidad de los lactofermentos depende de la cantidad y tipo de ácidos orgánicos que contiene, siendo mejor cuando tiene un contenido considerable de ácidos orgánicos de cadena corta. En este trabajo se utilizaron

2 métodos para analizarlos: por cromatografía (Alonso *et al.*, 1999) y por titulación potenciométrica (AOAC, 1995).

Considerando que el método tradicional para producir lactofermentos especifica que el suero de leche se debe fermentar por 30 días (Pacheco, 2003) resulta poco práctico en condiciones de campo considerando la cantidad de suero que se produce diariamente, por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar el contenido y tipo de ácidos orgánicos comparando el método tradicional para la elaboración de lactofermentos utilizando cepas comerciales (de manera individual y en consorcio) en fermentaciones de 30 días contra lactofermentos elaborados con cepas certificadas (de manera individual y en consorcio) de 5 días de maduración, evaluando sus características fisicoquímicas, microbiológicas y toxicológicas con la hipótesis de que en 5 días se puede obtener un contenido de ácidos orgánicos suficiente para producir un efecto positivo en el crecimiento y desarrollo de maíz y alfalfa, y de que la fermentación se favorece con el uso de cepas certificadas.

### **5.3 Materiales y métodos**

#### **5.3.1 Condiciones experimentales**

El presente trabajo se hizo en el periodo enero 2015 a junio 2016 en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del CICM ICUAP. Se evaluó el tipo de microorganismo inoculante, el tiempo y tipo de fermentación.

##### **5.3.1.1 Composición de ácidos orgánicos de lactofermentos de 5 y 20 días**

Por cuestiones de disponibilidad del cromatógrafo se analizaron lactofermentos de 5 y 20 días de maduración.

Preparación de muestras: 10 mL de muestras de lactosuero y lactofermentos se centrifugaron a 3,500 rpm por 20 minutos para obtener el sobrenadante y se acidificaron con ácido sulfúrico hasta pH  $2\pm 0.5$ . Posteriormente se agregaron 2 mL de metanol alcalinizado en viales de vidrio y se calentaron a 90 °C por una hora con agitación ocasional. Se dejaron enfriar y se extrajo la fracción polar con Hexano en un embudo de separación. El producto se filtró con sulfato de sodio para eliminar restos de agua (Hara y Radin, 1978). Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Química Orgánica del

ICBUAP en Cromatografía de Gases de Alta Eficacia (HPGC). El análisis cromatográfico de ácidos grasos se hizo con un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500 con columna capilar Supelcowax™ 10 (Supelco) de 30 metros, 0.20 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor. Se utilizó Helio como gas de acarreo. La identificación de ácidos grasos se hizo en computadora comparando tiempos de retención de estándares individuales de ácidos grasos con el programa Sigma-Aldrich, St Louis, USA.

### **5.3.1.2 Análisis fisicoquímico y microbiológico comparando lactofermentos de 5 y 20 días**

Preparación de muestras: Se utilizaron 2 L de suero natural salado obtenidos de la quesería “Lacteos Galeazzi” de Chipilo ajustando la concentración de lactosa al 4% por dilución con agua destilada estéril con un equipo Lactoscan SLP60. Ambos sueros se adicionaron con 2% de sacarosa (p/v) y se refrigeraron a 4 °C hasta su uso. Se trabajó con tres cepas certificadas: *Lactobacillus acidophilus* (CDBB-B-1026), *Streptococcus thermophilus* (CDBB-B-1931) y *Kluyveromyces marxianus* (CDBB-L-836), así como cepas comerciales de bacterias ácido lácticas liofilizadas (Choozit®) y Levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae* (Tradipan®). Las combinaciones de cepas y tiempos de fermentación resultaron en los tratamientos descritos en el Cuadro 16.

Las fermentaciones se hicieron por triplicado en tubos Pyrex con tapón rosca y empaque de teflón con 45 mL de suero, y 1 mL de inoculante ajustando su concentración a una densidad óptica de 0.5 a 600 nanómetros.

Experimento: Se evaluó el cambio de pH y acidez titulable expresada como ácido láctico (AOAC, 1995) y capacidad de intercambio catiónico expresada como capacidad amortiguadora en mEq de NaOH mL<sup>-1</sup> (Jasaitis *et al.*, 1989). También se evaluó el contenido de microorganismos viables expresado en el valor de la magnitud de la dilución con presencia de UFCs restando el valor inicial. Se utilizó el método de goteo en placa por diluciones seriadas (Morales-García *et al.*, 2012) de cada tubo de fermentación. Para evaluar la fitotoxicidad de los lactofermentos se hizo un bioensayo con semillas de alfalfa conforme al método propuesto por Sobrero y Ronco (2004).

**Cuadro 16. Tratamientos para evaluar fermentaciones de lactosuero en 5 y 30 días con cepas lácticas individuales y en consorcio.**

Tratamiento	Abreviatura	Descripción
T1	Control 5	Sin inóculo fermentado 5 días
T2	<i>S. thermophilus</i> 5	<i>S. thermophilus</i> fermentado 5 días
T2	<i>L. acidophilus</i> 5	<i>L. acidophilus</i> fermentado 5 días
T2	<i>K. marxianus</i> 5	<i>K. marxianus</i> fermentado 5 días
T3	Str-Lact 5	<i>S. thermophilus</i> y <i>L. acidophilus</i> fermentado 5 días
T3	Str-Kluy 5	<i>S. thermophilus</i> y <i>K. marxianus</i> fermentado 5 días
T3	Lac-Kluy 5	<i>L. acidophilus</i> y <i>K. marxianus</i> fermentado 5 días
T3	Str-Lac-Kluy 5	<i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> y <i>K. marxianus</i> fermentado 5 días
T4	BAL 5	Bacterias ácido lácticas fermentado 5 días
T4	<i>S. cerevisiae</i> 5	<i>S. cerevisiae</i> fermentado 5 días
T5	BAL-Sac 5	Bacterias ácido lácticas y <i>S. cerevisiae</i> fermentado 5 días
T6	Control 30	Sin inóculo fermentado 30 días
T7	<i>S. thermophilus</i> 30	<i>S. thermophilus</i> fermentado 30 días
T7	<i>L. acidophilus</i> 30	<i>L. acidophilus</i> fermentado 30 días
T7	<i>K. marxianus</i> 30	<i>K. marxianus</i> fermentado 30 días
T8	Str-Lact 30	<i>S. thermophilus</i> y <i>L. acidophilus</i> fermentado 30 días
T8	Str-Kluy 30	<i>S. thermophilus</i> y <i>K. marxianus</i> fermentado 30 días
T8	Lac-Kluy 30	<i>L. acidophilus</i> y <i>K. marxianus</i> fermentado 30 días
T8	Str-Lac-Kluy 30	<i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i> y <i>K. marxianus</i> ferm. 30 días
T9	BAL 30	Bacterias ácido lácticas fermentado 30 días
T9	<i>S. cerevisiae</i> 30	<i>S. cerevisiae</i> fermentado 30 días
T10	BAL-Sac 30	Bacterias ácido lácticas y <i>S. cerevisiae</i> fermentado 30 días

### 5.3.1.3 Diseño experimental

Para el análisis fisicoquímico y microbiológico de los lactofermentos de 5 y 30 días se hizo un diseño experimental completamente al azar (DECA) con 3 réplicas por tratamiento, considerando cada tubo Falcon como unidad experimental. Las variables de respuesta fueron el pH, acidez, capacidad de amortiguamiento y contenido de microorganismos viables.

### 5.3.1.4 Análisis estadístico de resultados

En una primera etapa se analizó la composición de ácidos orgánicos de lactofermentos de 5 y 20 días. Los cromatogramas obtenidos de los 3 tratamientos: suero sin fermentar, suero fermentado (lactofermento) por 5 días y lactofermento de 20 días, se analizaron

considerando el tipo y cantidad de ácidos orgánicos registrados según su tiempo de retención.

En la segunda etapa se hizo un análisis fisicoquímico y microbiológico comparando lactofermentos de 5 y 30 días, con cepas certificadas en comparación a cepas certificadas, y cepas individuales en comparación a consorcios microbianos. Los resultados fueron evaluados por comparación de medias utilizando la prueba *t*-Student a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) después de comprobar que por lo menos uno de los tratamientos resultó diferente en la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). Se utilizó Excel y el paquete estadístico SAS (2004).

## **5.4 Resultados y discusión**

### **5.4.1 Composición de ácidos orgánicos de lactofermentos de 5 y 20 días**

La cromatografía es una técnica analítica que permite separar los compuestos específicos de una sustancia, en este caso los ácidos orgánicos de suero de leche y lactofermentos a diferentes tiempos de maduración. Dependiendo de la longitud de su cadena (tamaño), los ácidos orgánicos tienen un determinado tiempo de retención en la columna del cromatógrafo, mientras más larga la cadena tendrá un mayor tiempo de retención. Los cromatogramas obtenidos no permiten una interpretación directa debido a que la escala de abundancia relativa no es la misma para el suero que para los fermentos (Figuras 16 a 18), por lo que se hizo una transformación de valores para poder comparar los 3 tratamientos (Figura 19).

Abundance

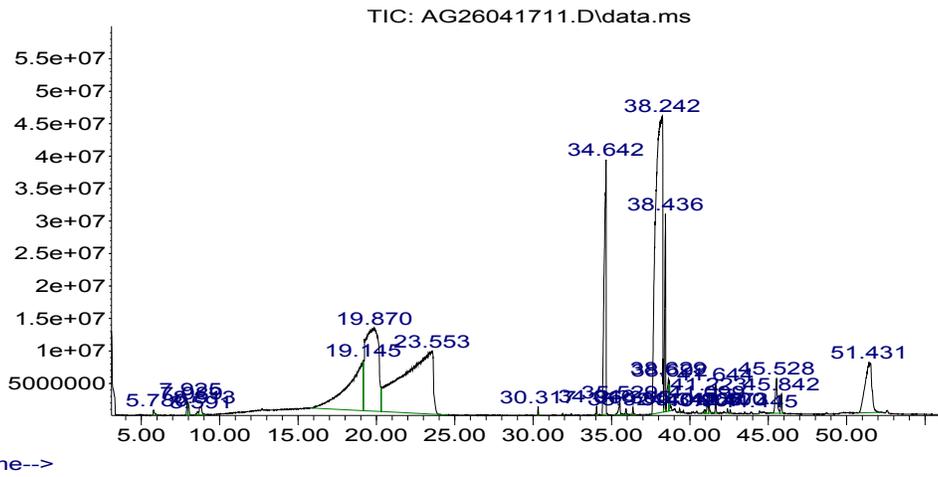


Figura 16. Composición de ácidos orgánicos en lactoserum separados por cromatografía de gases.

Abundance

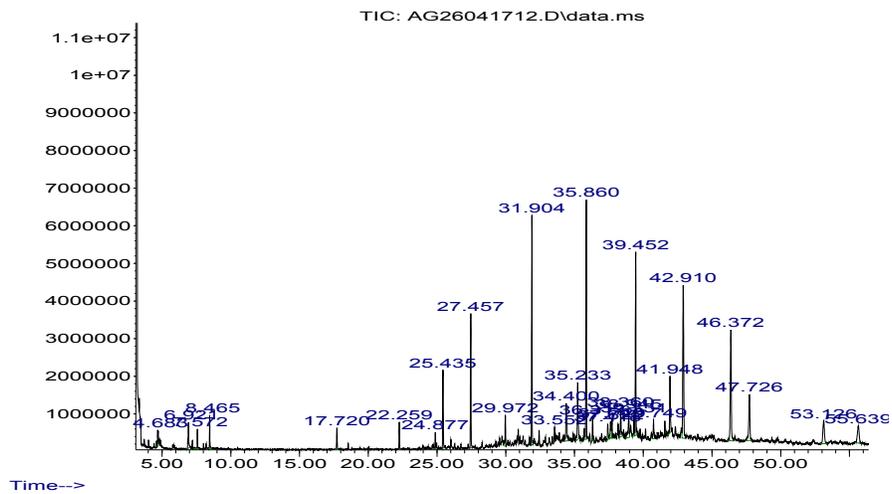


Figura 17. Composición de ácidos orgánicos en lactofermentación de 5 días separados por cromatografía de gases.



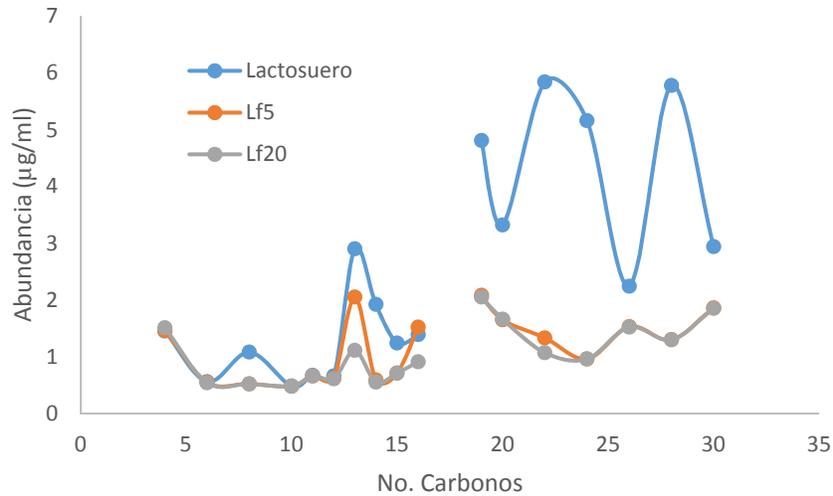


Figura 19. Análisis comparativo de la composición de ácidos orgánicos de lactosuero y lactofermentos de 5 y 20 días.

Con el análisis de ácidos orgánicos, por el método de titulación, se corroboraron las diferencias observadas por cromatografía entre el lactosuero y los lactofermentos (Figura 20). Además fue más sensible en la cuantificación de ácidos orgánicos, posiblemente de cadena corta, diferencia que aumentó con la maduración del lactofermento (de 0.8 meq para el LF<sub>20</sub> contra 0.6 del LF<sub>5</sub>).

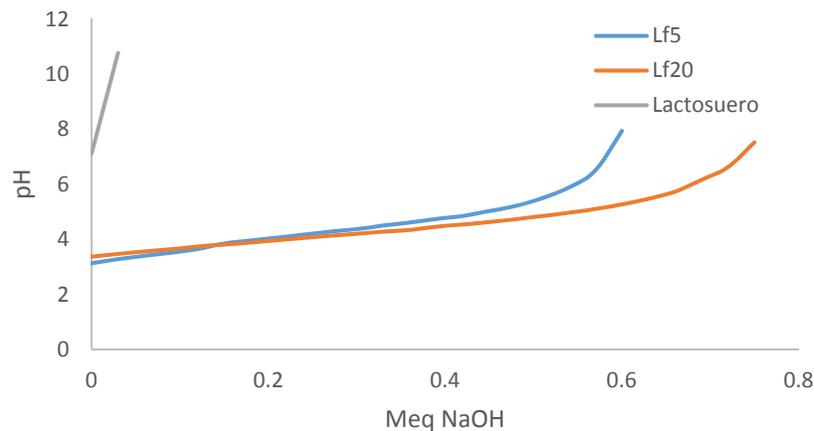


Figura 20. Curvas de titulación de suero y lactofermentos de 5 y 20 días.

#### 5.4.2 Análisis fisicoquímico y microbiológico comparando lactofermentos de 5 y 30 días

En general no se observaron mejoras significativas con el uso de cepas certificadas en las fermentaciones de 5 y 30 días. Sólo en las fermentaciones de 5 días se observó una

ligera ventaja en la producción de ácidos orgánicos y capacidad de amortiguamiento con la inoculación de *S. thermophilus* (Cuadro 17) Esto tiene importancia práctica en el sentido de que productores rurales podrían utilizar cepas comerciales y obtenerlos mismos resultados. Esta observación se fortalece al observar los diferentes tratamientos evaluados para las fermentaciones de 30 días, donde tampoco se observaron diferencias, lo que indica que independientemente del tipo de cepa utilizado, se llega al mismo resultado.

Por otra parte, al comparar estadísticamente las características fisicoquímicas y microbiológicas de los lactofermentos de 5 (Cuadro 17) y 30 días (Cuadro 18), se observa que no hay diferencia para pH (4.2 para ambos), pero los lactofermentos más maduros contienen una cantidad mayor de ácidos orgánicos (2.6 g L<sup>-1</sup> a los 30 días en comparación a 1.9 a los 5 días) y capacidad de amortiguamiento (7.5 meq. a los 30 días en comparación con 5.3 a los 5 días) ( $p=0.001$  y  $0.002$  respectivamente), pero un menor contenido de microorganismos viables ( $1 \times 10^4$  a los 5 días y  $1 \times 10^2$  a los 30 días) ( $p<0.001$ ), por lo que se puede deducir que se trata de dos productos con características, y por lo tanto propiedades, diferentes.

**Cuadro 17. Características fisicoquímicas y microbiológicas de lactofermentos de 5 días de maduración.**

Inoculante	pH	Ácido Láctico (g/L)	Ca (Meq NaOH/mL)	Log <sub>10</sub> UFC/mL)
T1 Suero sin inocular	4.33±0.02	4.51±0.12 <sup>c</sup>	2.63±0.06 <sup>c</sup>	2
T2 <i>S. thermophilus</i>	4.32±0.01	5.28±0.20 <sup>ab</sup>	3.08±0.13 <sup>ab</sup>	5
T3 <i>L. acidophilus</i>	4.31±0.05	4.61±0.19 <sup>c</sup>	2.65±0.11 <sup>c</sup>	5
T4 <i>K. marxianus</i>	4.31±0.01	4.50±0.13 <sup>c</sup>	2.58±0.07 <sup>c</sup>	5
T5 S.t-L.a	4.32±0.03	4.75±0.17 <sup>bc</sup>	2.75±0.08 <sup>bc</sup>	5
T6 S.t-K.m	4.34±0.01	4.59±0.11 <sup>c</sup>	2.66±0.07 <sup>c</sup>	4
T7 L.a-K.m	4.29±0.00	4.95±0.31 <sup>bc</sup>	2.85±0.19 <sup>bc</sup>	4
T8 S.t-L.a-K.m	4.31±0.03	4.86±0.31 <sup>bc</sup>	2.81±0.19 <sup>bc</sup>	4
T9 BAL	4.31±0.01	4.94±0.29 <sup>bc</sup>	2.86±0.19 <sup>bc</sup>	5
T10 <i>S. cerevisiae</i>	4.32±0.02	4.98±0.08 <sup>bc</sup>	2.89±0.07 <sup>bc</sup>	4
T11BAL- <i>S.cerevisiae</i>	4.31±0.01	4.84±0.13 <sup>bc</sup>	2.81±0.08 <sup>bc</sup>	5

S.t= *S. thermophilus*, L.a = *L. acidophilus*, K.m= *K. marxianus*, BAL=Bacterias ácido lácticas. n=3  
 Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ( $t$ -Student  $p<0.5$ )

**Cuadro 18. Características fisicoquímicas y microbiológicas de lactofermentos de 30 días de maduración.**

Inoculante	pH	Ácido Láctico (g/L)	Ca (Meq NaOH/mL)	Log <sub>10</sub> (UFC/mL)
T12 Suero sin inocular	4.43±0.03	5.21±0.25	3.17±0.13	3
T13 <i>S. thermophilus</i>	4.59±0.26	5.26±0.17	3.40±0.22	3
T14 <i>L. acidophilus</i>	4.63±0.28	5.29±0.21	3.46±0.22	3
T15 <i>K. marxianus</i>	4.97±0.02	5.17±0.07	3.81±0.10	3
T16 S.t-L.a	4.64±0.31	5.57±0.34	3.70±0.60	3
T17 S.t-K.m	4.78±0.27	4.92±0.52	3.39±0.64	2
T18 L.a-K.m	4.46±0.02	5.03±0.62	3.10±0.37	3
T19 S.t-L.a-K.m	4.46±0.04	4.66±0.33	2.87±0.20	2
T20 BAL	4.41±0.04	5.78±0.64	3.47±0.35	3
T21 <i>S. cerevisiae</i>	4.82±0.32	5.81±0.52	4.15±0.65	2
T22 BAL- <i>S. cerevisiae</i>	4.80±0.29	5.62±0.72	3.94±0.75	3

S.t= *S. thermophilus*, L.a= *L. acidophilus*, K. m= *K. marxianus*, BAL=Bacterias ácido lácticas. n=3  
No se observaron diferencias estadísticamente significativas (*t*-Student  $p>0.5$ )

Las pruebas en germinados de alfalfa de 10 días indican que la inoculación con lactofermentos de 30 días con cepas lácticas certificadas (T8 y 19) disminuye la fitotoxicidad con respecto al suero sin inocular al obtenerse germinados de mayor longitud (9.05 cm contra 8.30 del suero sin inocular) ( $p<0.05$ ), sin embargo, el uso de cepas comerciales (T11 y 22) resultó menos fitotóxico ya que mejoró de manera significativa tanto la longitud (9.90cm contra 8.30 del control) como peso seco(0.38 g contra 0.22) de los germinados ( $p<0.05$ ) (Cuadro 19).

**Cuadro 19. Fitotoxicidad en alfalfa de lactofermentos inoculados con cepas certificadas y comerciales de 5 y 30 días de maduración.**

Inoculante/tiempo	peso seco (g)		longitud (cm)	
	5 días	30 días	5 días	30 días
T1 y 12 Suero sin inocular	0.24±0.03 <sup>a</sup>	0.22±0.03 <sup>b</sup>	9.20±0.92 <sup>a</sup>	8.30±1.77 <sup>c</sup>
T8 y 19 <i>S.t-La-K.m</i>	0.27±0.05 <sup>a</sup>	0.26±0.06 <sup>b</sup>	9.40±0.74 <sup>a</sup>	9.05±0.37 <sup>b</sup>
T11 y 22 BAL- <i>S. cerevisiae</i>	0.25±0.10 <sup>a</sup>	0.38±0.07 <sup>a</sup>	9.40±1.26 <sup>a</sup>	9.90±0.47 <sup>a</sup>

S.t= *S. thermophilus*, L.a = *L. acidophilus*, K.m= *K. marxianus*, BAL=Bacterias ácido lácticas. n=10  
Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa (*t*-Student  $p<0.5$ ).

Se observó que la toxicidad del suero sin inocular aumenta ligeramente con el tiempo al afectarse la longitud (de 9.20 a 8.30 cm) aunque no el peso seco de los germinados (0.24 a 0.22 g), mientras que la fitotoxicidad disminuye con la inoculación de cepas certificadas (9.40 cm lactosuero inoculado en comparación a 9.05 con respecto al suero sin inocular) y de cepas comerciales (9.90 cm contra 9.05 y 0.38 g contra 0.22) a los 30 días pero no a los 5 ( $p < 0.05$ ), por lo que se deduce que la maduración, aunque desfavorable considerando la cantidad de suero que se puede tratar, es deseable para disminuir la fitotoxicidad de los lactosueros. Los resultados anteriores concuerdan con los observados para los análisis fisicoquímicos, indicando que a mayor tiempo de maduración, hay mayor producción de ácidos orgánicos, siendo las cepas comerciales las que presentaron mayor capacidad para producirlos, de tal manera que es a este tipo de compuestos a los que se les puede atribuir el efecto de promoción de crecimiento vegetal.

## **5.5 Conclusiones**

Se obtuvieron lactofermentos con características fisicoquímicas y microbiológicas diferentes a diferentes tiempos de fermentación. El lactofermento de 5 días se caracteriza por su mayor contenido en microorganismos viables lo que le da características de inoculante, mientras que el de 30 días contiene más ácidos orgánicos y capacidad amortiguadora que le confiere propiedades de biofertilizante.

El uso de cepas certificadas no mejoró las características fisicoquímicas de lactofermentos en comparación al uso de cepas comerciales ni a los 5 ni a los 30 días, por lo que se concluye que el lactosuero generado durante la producción de queso puede ser aprovechado utilizando cepas comerciales, de fácil acceso a productores locales, en la elaboración de biopreparados para uso en agricultura orgánica. No se pudo demostrar que los lactofermentos de 5 días tuvieran menor o por lo menos la misma fitotoxicidad que los lactofermentos madurados por 30 días, por lo que se rechaza la hipótesis de que es posible reducir el tiempo de obtención de lactofermentos.

## 5.6 Literatura citada

- Alam, S., Stevens, D. y Bajpai, R. (1988) Production of butyric acid by batch fermentation of cheese whey with *Clostridium beijerinckii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2(6): 359-364.
- Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M. J. y Juárez, M. (1999) Fatty acid composition of caprine milk: major, branched chain, and trans fatty acids. *Journal of Dairy Science*.
- AOAC (1995). Association of Official Analytical Chemists. Manual of Official Methods of Analysis 15th Edition. Washington, USA.
- Chávez, C. y Mac Donald, F. (2005) *Uso Práctico de Microorganismos Eficientes*. ACCS, Extensión Agropecuaria. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica. Organización de Estudios Tropicales, Instituto Nacional de Aprendizaje. Costa Rica 2005.
- Goldstein, A. H. (1986) Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. *Am. J. Altern. Agricult.* (1):57–65.
- González, M. I. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology* (57):35-45.
- Igual, J. M., Valverde, A., Cervantes, E. y Velazquez, E. (2001) Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*; (21):561-568.
- Illmer, P., Barbato, A. y Schinner, F. (1995) Solubilization of hardlysoluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem*; (27):265-270.
- Jasaitis, D., Wohlt, J. y Evans, J. (1989) Influence of feed ion content in buffering capacity of ruminant feedstuffs in vitro. *Cook college Rutgers*. N.J.
- Matsui, S. (2009) Probiotics principle that can help organic farming. *Jour. Envir. Sanit. Eng. Res.* 23(3): 81-87.
- Morales-García, Y. E., Pazos Rojas, L. A., Bustillos Cristales, M. R., Krell, T. y Muñoz-Rojas, J. (2010) Método rápido para la obtención de maíz axénico a partir de semillas. *Elementos*; (80): 35-38.
- Pacheco, F. (2003) *Lactofermentos: Una alternativa en la producción de abonos orgánicos líquidos fermentados*. Costa Rica. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica. Organización de Estudios Tropicales, Instituto Nacional de Aprendizaje (AVINA).
- Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Marchant, R. y Banat, M. (2008) Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresource Technology*; (99):5951-5955.

Sobrero M.C. y Ronco, A. (2004) Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). p: 71-79. En: Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas, G. Castillo, Ed., Ottawa, Canadá.

Statistical Analysis System Institute Inc. (2004). SAS/STAT 9.0 User guide. Cary, NC: SAS.

Stevenson, F. J. (1967) Organic acids in soil. pp. 119–146. En: A. D. McLaren and G. H. Peterson eds. Soil biochemistry. Marcel Dekker. New York, NY, USA.

Vénica, C. I., Perotti, M. C., Wolf, I. V., Bergamini, C. V. y Zalazar, C. A. (2011) Intolerancia a la lactosa. Productos lácteos modificados. Tecnología Láctea Latinoamericana; (65):50-55.

## **CAPÍTULO VI. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN Y COLONIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS BENÉFICOS DEL LACTO-FERMENTO (LF-MB) EN ALFALFA (*Medicago sativa* L.) Y MAÍZ (*Zea mays* L.).**

### **6.1 Resumen**

Este experimento se realizó con el objetivo de demostrar la capacidad de adherencia y colonización de las cepas lácticas empleadas en la elaboración del lactofermento (LF-MB) en semillas de maíz y alfalfa tanto en condiciones de esterilidad como en condiciones no estériles. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DECA) en dos especies (maíz y alfalfa). Se observó una adecuada capacidad de adherencia del consorcio Bal-*K. marxianus* en germinados de maíz en comparación al observado en las radículas sin inocular (7.2 contra 5 Log UFC/ g material biológico del control) en semillas no axénicas y superiores en semillas axénicas de maíz (8.1 contra 0 Log UFC/ g material biológico) y alfalfa (7.9 contra 1.2 UFC/ g material biológico del control). Los resultados de colonización en alfalfa y maíz, es decir el incremento de la biomasa inoculada a los 10 días, no mostraron diferencias significativas con respecto al control lo que indican que, aunque no hay condiciones favorables para su desarrollo, sí son suficientes para mantenerse en número suficiente para interactuar con su hospedero, por lo que se demuestra que el consorcio BAL-*K. marxianus* tiene potencial como promotor de crecimiento vegetal en la producción de biofertilizantes.

### **6.2 Introducción**

Recientemente se ha generalizado el empleo de microorganismos aislados de la rizosfera de cultivos comerciales como inoculantes con un efecto positivo en la germinación de las semillas, el desarrollo de la raíz, la asimilación de nutrientes o el desarrollo del sistema inmune entre otros (Beneduzi *et al.*, 2012). Estos microorganismos ofrecen una opción al deterioro ambiental causado por el sobre uso de fertilizantes químicos, sin embargo es limitada la información con respecto al aprovechamiento y uso de cepas comerciales para el mismo fin.

Bajo condiciones controladas es posible favorecer el crecimiento de microorganismos reportados como benéficos, principalmente bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus* sp. y levaduras de los géneros *Kluyveromyces* sp. y *Saccharomyces* sp. Estos microorganismos se utilizan en la elaboración de derivados lácteos (Romano *et al.*, 2001) y permanecen en los residuos que se generan como subproductos de dichos procesos. Poco se ha estudiado sobre la manera de aprovechar, tanto los residuos, como a dichos microorganismos y su posible efecto en la asociación con cultivos de interés comercial (Wayne, 1994), lo que podría derivar en nuevas investigaciones para su uso como inoculantes promotores de crecimiento vegetal o como biofertilizantes (Obregón 2000; Pacheco, 2003).

Diversos autores coinciden en que el primer requisito para considerar que un microorganismo es promotor de crecimiento, es que tenga capacidad para adherirse y colonizar a su hospedero (Beneduzi *et al.*, 2012; Molina-Romero *et al.*, 2015). Las interacciones que se establecen entre planta y microorganismos a través de los exudados de la raíz, o rizointeracción, puede tener un efecto positivo para el crecimiento de las plantas mediante la exudación de azúcares que favorece la colonización microbiana en el suelo (Phillips *et al.*, 2011) y mediante un aumento en la fijación de nitrógeno atmosférico, dependiendo de la especie que se trate. Por otra parte, la exudación de ácidos orgánicos contribuye a la solubilización de fosfatos y a la quelación de metales (Strom *et al.*, 2002). Además, estos exudados contribuyen al incremento de la tolerancia al estrés tanto biótico como abiótico, a la inhibición de patógenos, así como a la biodegradación de compuestos alelopáticos auto tóxicos (Oliveros-Bastidas, 2009).

Por su parte, las comunidades microbianas aportan a la planta fitohormonas, compuestos volátiles, compuestos antimicrobianos (producción de enzimas líticas, sideróforos), contribuyen en la fijación biológica de nitrógeno así como en la solubilización de fosfato entre otros. Estos mecanismos dependen en gran medida de la correcta adherencia de los microorganismos a las raíces de las plantas y la colonización eficaz de la rizosfera (Molina-Romero, *et al.*, 2015), por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de adhesión y colonización de bacterias y levaduras lácticas utilizadas en la

elaboración de lactofermentos, las cuales no han sido estudiadas en aplicaciones agrícolas.

## **6.3 Materiales y métodos**

### **6.3.1 Condiciones experimentales**

El presente trabajo se hizo en condiciones de laboratorio, en una cámara de germinación con temperatura y humedad controladas. Se llevó a cabo en el periodo enero 2015 a diciembre 2016 en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del CICM, ICUAP.

Material vegetal: Se emplearon semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) variedad atlisquense y maíz amarillo criollo (*Zea mays* L.), adquiridas en casas comerciales de la región de Francisco Javier Mina (Chipilo), Puebla, México y esterilizadas conforme al método descrito por Morales-García *et al.* (2010).

Cepas microbianas: Se utilizaron las cepas *Lactobacillus acidophilus* (CDBB-B-1026), *Streptococcus thermophilus* (CDBB-B-1931) y *Kluyveromyces marxianus* (CDBB-L-836) suministradas y certificadas por la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Cinvestav. Como control positivo se utilizó el inoculante multiespecies BUAP ®, que contiene bacterias promotoras de crecimiento reconocidas por su alta capacidad de adherencia y colonización (Muñoz *et al.*, 2015). Las cepas se cultivaron en cajas Petri con medio sólido Luria Bertani (LB). Se aislaron las colonias y se cultivaron en medio líquido LB, incubado a 30 °C por 24 horas en agitación. Se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 3,500 rpm durante 10 minutos y se ajustó la concentración a  $0.5 \pm 0.1$  a 600 nanómetros en espectrofotómetro y se refrigeró a 4 °C hasta la inoculación de los germinados.

Inoculación de germinados axénicos: Conforme a la metodología descrita por Morales-García *et al.* (2010), 80 semillas de maíz y 80 de alfalfa se lavaron con agua corriente. Posteriormente se lavaron con etanol al 70% en condiciones de esterilidad durante 10 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril. Luego se embebieron con hipoclorito

de sodio al 50% por 10 minutos. Finalmente fueron lavadas con agua destilada estéril hasta la desaparición del olor.

Experimentos: Se hicieron dos experimentos, en el primero se colocaron las semillas en cajas Petri con papel absorbente humedecido con agua destilada estéril. En el segundo experimento se obtuvieron los germinados en cajas Petri con agar y agua, seleccionando aquellos germinados que no presentaron evidencias de crecimiento microbiano. En ambos casos las semillas se incubaron a 30 °C en obscuridad hasta su germinación. Los germinados de ambos experimentos se expusieron a los tratamientos (inoculantes) sumergiéndolas por 1 hora conforme al arreglo presentado en el Cuadro 20.

**Cuadro 20. Tratamientos utilizados en la evaluación de adhesión (germinados) y colonización (plántulas) en alfalfa y maíz.**

Tratamiento	Abreviatura	Descripción	Aplicado en:
T1	MB-LB	Microorganismos lácticos del lactofermento	Maíz
T2	Multi Buap	Multi inoculante BUAP (control positivo)	Maíz
T3	Sin inóculo	control agua negativo	Maíz
T4	MB-LB	Microorganismos lácticos del lactofermento	Alfalfa
T5	Multi Buap	Multi inoculante BUAP (control positivo)	Alfalfa
T6	Sin inóculo	control agua negativo	Alfalfa

Evaluación de capacidad de adherencia y colonización. Para evaluar la adherencia en cada tratamiento, se dejaron crecer en su caja Petri 10 semillas y el germinado obtenido se inoculó por inmersión directa durante 12 horas. El resto de los germinados se colocó en tubos Falcon de 50 mL con vermiculita y tapón de algodón estériles y se regaron con 5 mL de agua destilada estéril cada tercer día durante 20 días para evaluar la colonización. La adherencia se evaluó en los germinados lavándolos en agua destilada estéril para eliminar los microorganismos no adheridos. Posteriormente se colocaron en tubos Falcon de 15 mL con 3 mL de agua destilada estéril y se agitó vigorosamente con un vórtex durante 40 segundos. Se hizo un conteo de UFC del sobrenadante por sellado masivo en placa (Corral-Lugo *et al.*, 2012). Los germinados se dejaron unos minutos sobre papel secante y se registró su peso húmedo. El material se puso a secar a 70 °C hasta peso constante para estimar su peso seco y calcular las UFC por gramo de material biológico en peso seco. Para evaluar la colonización se utilizaron los germinados

sembrados en tubos Falcon a los 20 días posteriores a la inoculación (d.p.i). Se eliminó la vermiculita sumergiendo y agitando la raíz en agua. Se cortó una porción de la raíz y se colocó en tubos Falcon de 15 mL con 3 mL de agua destilada estéril. Se agitó vigorosamente en vórtex 40 segundos y se determinó el número de UFC por el método de sellado masivo en placa (Corral-Lugo *et al.*, 2012). La raíz se dejó unos minutos sobre papel secante y se registró su peso húmedo. El material se secó a 70 °C hasta peso constante para estimar su peso seco y calcular las UFC por gramo de material biológico en peso seco.

### **6.3.2 Diseño experimental**

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DECA) en dos especies (maíz y alfalfa) y tres tratamientos: a) suspensión de microorganismos benéficos lácticos cultivados en medio LB (MB-LB), b) el inoculante multiespecies-BUAP® como control positivo y c) un control de agua destilada estéril (control negativo, sin inóculo). Cada tratamiento se subdividió para evaluar adherencia y colonización por triplicado, y el experimento se repitió con y sin selección de semillas contaminadas por microflora interna, resultando un total de 12 tratamientos.

### **6.3.3 Análisis estadístico de resultados**

La efectividad de adherencia y colonización del consorcio MB se comparó contra los controles y se contabilizó el contenido de UFC por gramo de material biológico (peso seco). Se consideró que había diferencia significativa en adherencia cuando la resta de los promedios obtenidos fue mayor a una unidad logarítmica y dos unidades para el caso de colonización.

## **6.4 Resultados y discusión**

Adherencia (experimento 1). En el primer experimento se pudo observar que el contenido de microorganismos viables adheridos en germinados de maíz, expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias (Log UFC g material biológico<sup>-1</sup>) por gramo de material vegetal del consorcio láctico (BAL-*K. marxianus*), es significativamente mayor que el observado en las radículas sin inocular (7.2 contra 5), e igual al observado en las

radículas de maíz inoculadas con el Multibuap, (7.2 contra 6.4) lo que indica que hay una adecuada capacidad de adherencia. En el caso de alfalfa la diferencia entre la capacidad de adherencia del consorcio (BAL-*K. marxianus*), el inoculante multi especies-BUAP® y el control no fue significativo (8.8, 7.9 y 7.9 respectivamente) (Figura 21).

Colonización (experimento 1). En maíz, el contenido de microorganismos viables a los 20 días fue similar al del control positivo (7 y 6.3 respectivamente) pero no mayor al de los germinados sin inocular (6.3 contra 5.2 respectivamente). Para alfalfa la diferencia no fue significativa entre el consorcio BAL-*K. marxianus*, el inoculante multi especies-BUAP® y el control (3.1, 4.2 y 2.8 respectivamente) lo que indica que los microorganismos lácticos, aunque se mantienen en un número aceptable, no colonizan efectivamente a la alfalfa. Al comparar el contenido de microorganismos viables a las 12 horas (adherencia) y 20 días (colonización) posteriores a la inoculación en maíz, se pudo observar que se mantienen en el orden de  $10^6$  y  $10^7$  UFC/g de material biológico, lo que indica que hay una buena interacción entre la planta y el consorcio láctico. Sin embargo en alfalfa sólo  $10^3$  UFC/g de planta están colonizados, lo cual es un número bajo comparado con otros modelos como el maíz o caña de azúcar (Rodríguez-Andrade *et al.*, 2015; Molina-Romero *et al.*, 2017), lo que a su vez indica que no hay una buena colonización (Figura 21)

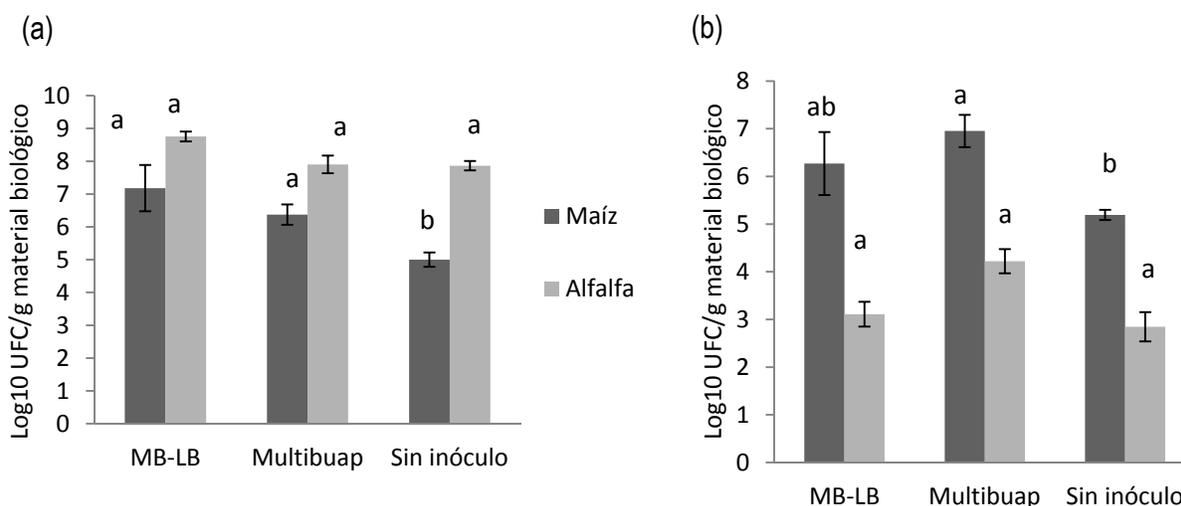


Figura 21. Adhesión (12 horas) (a) y colonización (10 días) (b) de microorganismos lácticos (MB-LB) e inoculante Multiespecies-BUAP (IME) en radículas de maíz y alfalfa (experimento 1) (n=3). Letras diferentes en columnas del mismo color indican diferencia significativa (Diferencia de 1 unidad logarítmica para adherencia y 2 para colonización). Material biológico en peso seco.

Esto puede explicarse por el tipo y cantidad compuestos presente en los exudados de la raíz de maíz, los cuales parecen favorecer el desarrollo y crecimiento de las bacterias ácido lácticas y a la levadura *K. marxianus*, y que probablemente no se encuentran presentes o en cantidad suficiente en la raíz de la alfalfa. Al respecto Bais (2012) afirma que los exudados radiculares están constituidos principalmente por compuestos orgánicos de bajo peso molecular que, además de participar en varios procesos del desarrollo de la planta, determinan la composición de las comunidades microbianas de suelos al controlar la mortalidad y niveles poblacionales de las colonias formadas.

La diferencia de la composición y cantidad de los exudados depende de diversos factores, principalmente de la especie de la planta, etapa fenológica y presencia de otros microorganismos (Oliveros-Bastidas, 2009). En maíz, por ejemplo, la cantidad total de compuestos liberados por gramo de peso seco de raíz disminuye con el desarrollo de la planta como consecuencia de alteraciones en el balance de carbohidratos, aminoácidos y aminos (Grensee y Wittmayer, 2000; Oliveros-Bastidas, 2009). Shi *et al.* (2011) observaron cambios en la composición de la microbiota rizosférica debido a combinaciones de ácidos orgánicos, y Goldfarb *et al.* (2011) encontraron cambios determinados por la concentración de glicina y sacarosa que favorece el desarrollo de bacterias pero afecta al de los hongos (Hanson *et al.*, 2008).

Otra posible explicación, en el caso de que los nutrientes exudados por la raíz de alfalfa no fueran suficientes, es que las BAL y *K. marxianus* compiten por los recursos limitantes, eliminándose mutuamente, como lo explican (Oyekanmi *et al.*, 2007). La tercera explicación es que los exudados de las raíces de las plantas son selectivos (Brown, 2010), es decir, que si la alfalfa no tiene necesidad de asociarse con otros organismos en esa etapa de su desarrollo, no producirá los nutrientes necesarios para atraer a su rizosfera a los microorganismos, y por lo tanto estos no se podrán adherir ni colonizar. En los exudados de las semillas y de las raíces de las leguminosas ha sido reportada la presencia de flavonoides, ácido aldónico y betaínas, los cuales pueden inhibir la germinación de esporas de ciertos hongos (Dakora, 2003).

Adherencia (segundo experimento). En este caso se seleccionaron semillas que no presentaban contaminación endógena. Se hizo más evidente la capacidad de adherencia

del consorcio Bal-*K. marxianus* al presentar valores similares al control positivo y muy superiores a los germinados sin inocular tanto en maíz (8.1, 8.7 y 0 respectivamente) como en alfalfa (7, 9 y 1.2 respectivamente), observándose valores similares de microorganismos adheridos que en el primer experimento ( $10^7$  UFC/g de material biológico). Para el caso de la colonización, el contenido de microorganismos contabilizados resultó similar a los encontrados a las 12 horas (alrededor de  $10^8$  UFC/g), lo que indica una supervivencia adecuada en ese lapso de tiempo (Figura 22).

Colonización (segundo experimento). En concordancia con el primer experimento, no se observaron diferencias significativas entre la población del consorcio y las de las raíces de las plántulas sin inocular (9.3 contra 8.7 para maíz y 9.7 contra 8.6 en alfalfa) indicando que las poblaciones de microorganismos benéficos se mantienen de manera adecuado con respecto al tiempo.

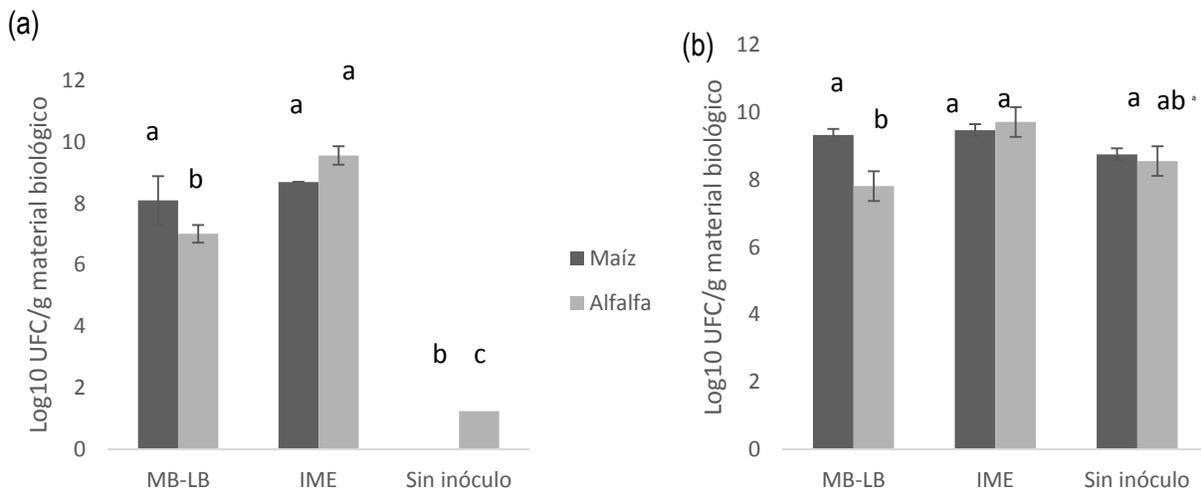


Figura 22. Adhesión (12 horas) (a) y colonización (10 días) (b) de microorganismos lácticos (MB-LB) e inoculante Multispecies-BUAP (IME) en radículas de maíz y alfalfa (experimento 2) (n=3). Letras diferentes en columnas del mismo color indican diferencia significativa ( $t$ -Student  $p < 0.05$ ). Material biológico en peso seco.

La diferencia entre el contenido de microorganismos benéficos del lactofermento en alfalfa, entre el experimento 1 y 2, puede explicarse por procesos de competencia e inhibición por parte de la microflora autóctona propia de la semilla que al momento de emerger regulan la presencia de otros microorganismos, pero que de alguna manera indican, de manera más precisa, los procesos de adherencia y colonización bajo condiciones de campo. También es importante mencionar que la capacidad de colonización en condiciones de laboratorio podría variar con respecto a experimentos de campo, ya que la producción de los exudados por la planta se ve directamente influenciada por su estado nutricional, disponibilidad de agua y oxígeno, estrés, otras condiciones de crecimiento (Oliveros-Bastidas, 2009), composición del substrato y la presencia de otros microorganismos (benéficos y patógenos).

Cano (2011) menciona que la interacción planta-inoculante es compleja y difícil de describir debido a que hay factores internos y externos que determinan la colonización efectiva. Es decir, por una parte la planta puede producir exudados que estimulen el crecimiento de los inoculantes, pero por otro, entre ellos puede haber una inhibición competitiva cuando los nutrientes son limitantes. El efecto contrario también se puede presentar, es decir, que la co-inoculación de diversas especies favorezca la producción de metabolitos que ayuden a su supervivencia no obstante que la planta hospedera no produzca exudados.

## **6.5 Conclusiones**

Aunque ha sido descrito el potencial de las bacterias ácido-lácticas en aplicaciones agrícolas, es poco lo que se conoce sobre su uso como inoculante, y más aún cuando se produce en consorcio con levaduras lácticas. En este trabajo se ha demostrado la capacidad de adherencia y colonización del consorcio láctico en maíz como primer paso para determinar su potencial como promotor de crecimiento vegetal en la producción de biofertilizantes.

## **6.6 Literatura citada**

Bais, H. P. (2012) Shoot themessages not themes sengers. *Plant Soil* (358): 6–9.

- Beneduzi, A., Ambrosini, A. y Passaglia, L. (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 4 (suppl): 1044-1051 .
- Brown, D. (2010) A mathematical model of the Gac/Rsm quorum sensing network in *Pseudomonas fluorescens*. *Biosystems*. 101:200-212
- Cano, M. A. (2011) Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 14(2):15-31.
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D. y Muñoz-Rojas, J. (2012) Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo”. *Revista Colombiana de. Biotecnología*. XIV (2):147-156.
- Dakora, F. (2003) Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytologist* 158(39): 231-235.
- Goldfarb, K. C., Karaoz, U., Hanson C. A., Santee, C. A., Bradford, M. A., Treseder, K. K. (2011). Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. *Front. Microbiol.* (2):94-1003.
- Grensee, A. y Wittmayer, L. (2000) Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *J. Plant Nut. Soil Sci.* (163):381-386.
- Hanson, C. A., Allison, S. D., Bradford, M. A., Wallenstein, M. D. y Treseder, K. K. (2008) Fungal taxa target different carbon sources in forest soil. *Ecosystems* (11):1157–1167.
- Molina-Romero D., Bustillos-Cristales, M. del R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y.E., Santiago-Saenz, Y., Castañeda-Lucio, M. y Muñoz-Rojas, J. (2015) Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*; 17(2): 24–34
- Morales-García, Y. E., Pazos Rojas, L. A., Bustillos Cristales, M. R., Krell, T. y Muñoz-Rojas, J. (2010) Método rápido para la obtención de maíz axénico a partir de semillas. *Elementos*; (80): 35-38.
- Muñoz, J., Morales, Y. E., Hernández, D., Ramírez, L. E. y Hernández, J. A. (2015) Formulation of a multispecies inoculant for enhancing the growth of plants. Patente. MX2013007978 (A) — 2015-01-08. Consultado en línea sept 2018. [https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20150108&DB=&locale=en\\_EP&CC=MX&NR=2013007978A&KC=A&ND=4](https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20150108&DB=&locale=en_EP&CC=MX&NR=2013007978A&KC=A&ND=4)

- Obregón, M. (2000). Estudios preliminares para evaluar las posibles aplicaciones del lactosuero en la agricultura. Revista Técnica vol. 1 Instituto Nacional de Aprendizaje (INA). Costa Rica.
- Oliveros-Bastidas, A. J. (2009) Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. Quim. Nova; 32 (1):198-213.
- Oyekanmi, E. O., Coyne, D. L., Fagade, O. E. y Osonubi, O. (2007) Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. Crop Prot. (26):1006-1012.
- Pacheco, F. (2003) Lactofermentos: Una alternativa en la producción de abonos orgánicos líquidos fermentados. Costa Rica. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica. Organización de Estudios Tropicales, Instituto Nacional de Aprendizaje (AVINA).
- Phillips, R. P; Finzi, A. C. y Bernhardt, E. S. (2011).Enhanced root exudation induces microbial feedback term CO<sub>2</sub> fumigation. Ecol.Lett. (14):187-194.
- Rodríguez-Andrade, O., Fuentes-Ramírez, L.E., Morales-García, Y.E., Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M.R., Martínez-Contreras, R.D. y Muñoz-Rojas, J. (2015) The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in split root experiments. Rev Argent Microbiol. 47(4):335-43.
- Romano, P., Ricciardi, A., Salzano, G. y Suzzi, G. (2001) Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. International Journal of Food Microbiology. (69):45-51.
- Shi, S., Richardson, A. E., O'callaghan, M., DeAngelis, K.M., Jones, E. E., Stewart, A., Fireston, M.K. y Condrón L.M. (2011) Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. FEMS Microbiol. Ecol. (77):178-187.
- Strom, L., Owen, A. G., Godbold, D. L. y Jones, D. L. (2002) Organic acid mediated immobilization in the rhizosphere and uptake by maize roots. Soil Biol. Biochem. (34):703-710.
- Wayne, H. (1994) Aprovechamiento de los sueros en la industria láctea. Memorias del V Congreso Panamericano de la leche. Medellín: COLANTA pp. 147-163.

## **CAPÍTULO VII. EVALUACIÓN DE LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO CON EL LACTOFERMENTO (LF-MB) Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE MAÍZ (*Zea mays* L.).**

### **7.1 Resumen**

La solubilización del fósforo es uno de los principales mecanismos asociados a las ventajas del uso de biopreparados e inoculantes elaborados con microorganismos benéficos al reducir el impacto ambiental, económico y social asociado al sobre uso de fertilizantes químicos (Restrepo-Rivera, 2006). Este trabajo se hizo con la finalidad de demostrar la capacidad del consorcio BAL-*K. marxianus* en la solubilización, y por lo tanto asimilación, de fósforo en sistemas vegetales. Se hicieron experimentos *in vitro* y con plántulas para demostrar solubilización y promoción de crecimiento, para lo cual se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DECA). Al comparar el efecto que producen los lactofermentos con ácidos orgánicos en el desarrollo de maíz, se observó que ambos compuestos promueven el engrosamiento del tallo (34, 34.4 y 27 mm para ácidos, lactofermentos y control respectivamente) así como el desarrollo de la raíz de plantas de maíz (0.41, 0.38 y 0.31 g para ácidos, lactofermentos y control respectivamente) de manera significativa ( $p < 0.05$ ). En las pruebas *in vitro* se observaron halos de solubilización para el consorcio BAL- *K. marxianus* en roca fosfórica y fosfato de calcio disueltos en lactosuero. Los lactofermentos con roca fosfórica a concentraciones mayores al 2% resultaron estadísticamente superiores al control en cuanto a peso seco y longitud del vástago así como en el número de hojas, y el mejor efecto en desarrollo del vástago con un incremento del 60% con respecto a la longitud del vástago del control y del 24% para el peso seco del vástago a una concentración del 2% ( $p < 0.05$ ), por lo que se puede concluir que el lactofermento ayuda a la solubilización y asimilación de fósforo.

### **7.2 Introducción**

El fósforo es uno de los macronutrientes considerados como esenciales para el crecimiento de las plantas. Para suplir su deficiencia en la agricultura moderna se utilizan fertilizantes fosfatados, sin embargo durante su aplicación, una proporción considerable se convierte en una forma no asimilable por la planta debido a reacciones químicas que

varían por la presencia de iones y el pH de los suelos. Además, una porción considerable se pierde por lavado dependiendo de las condiciones de textura y pendiente del suelo, lo que determina que mucho de ese fósforo no sea aprovechado por la planta (Goldstein, 1986) y ocasione un severo daño ambiental en los cuerpos de agua donde finalmente se deposita (Wagner, 1996). Diversos estudios han demostrado que los microorganismos de la rizosfera participan en los procesos de mineralización que permiten a las plantas absorber el fósforo, sin embargo las prácticas agrícolas actuales, así como el sobreuso de agroquímicos tienen un efecto negativo en el desarrollo y supervivencia de la microbiota (Hilda y Fraga, 1999).

Actualmente se realizan diversos estudios con el objetivo de suministrar fuentes más asimilables de fósforo. Los microorganismos solubilizadores han llamado la atención de la comunidad científica. Se han utilizado como inoculantes demostrando mejor desarrollo de la raíz, asimilación de fósforo y por lo tanto aumento en los incrementos de producción de cultivos agrícolas de interés comercial (Young, 1994; Fasim *et al.*, 2002). La solubilización del fósforo es uno de los principales mecanismos asociados a las ventajas del uso de biopreparados e inoculantes elaborados con microorganismos benéficos al reducir el impacto ambiental, económico y social asociado al sobre uso de fertilizantes químicos (Restrepo-Rivera, 2006).

Se ha reconocido la importancia de las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en biopreparados orgánicos por diversos autores (Higa, 1997; Pacheco, 2003) como la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (láctico, acético y butírico) (Goldstein, 1986; Kim *et al.*, 1997) y los compuestos quelantes de fósforo para convertirlo en una forma soluble y asimilable. Por otra parte, las BAL producen metabolitos secundarios que estimulan el crecimiento y desarrollo de la raíz de la planta, por lo que ésta absorbe de manera más eficiente los nutrientes presentes en el suelo. El objetivo de este trabajo fue demostrar que el consorcio BAL-*K. marxianus* con el cual se elabora el lactofermento (LF-MB), produce ácidos orgánicos capaces de solubilizar fósforo, lo que favorece la promoción y crecimiento tanto en la emergencia como en las primeras etapas de desarrollo (45 días posteriores a la emergencia) de plántulas de maíz (*Zea mays* L.).

## 7.3 Materiales y métodos

### 7.3.1 Condiciones experimentales

El experimento se llevó al cabo en tres etapas. En la primera se comparó el efecto agrobiológico en invernadero de los lactofermentos y el ácido láctico-acético en la solubilización de roca fosfórica para la fertilización de maíz. En la segunda se evaluó *in vitro* la capacidad de las cepas puras de BAL-*K. marxianus* para solubilizar dos fuentes de fósforo inorgánico. Y en la tercera, en condiciones de invernadero, se determinó la cantidad mínima de roca fosfórica que se puede agregar al lactofermento como parte de su formulación, para lograr un efecto benéfico en el desarrollo de maíz. Las variables que se controlaron en el experimento fueron la concentración de ácidos orgánicos y roca fosfórica (diluciones de 2 a 8%), temperatura (20±4 °C) y fotoperiodo (12-12) para el crecimiento de las plántulas de maíz. El experimento se hizo durante julio diciembre 2016 en los laboratorios e invernaderos facilitados por el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, CICM, ICUAP.

Etapa 1. Para demostrar la capacidad de solubilización de roca fosfórica por los ácidos orgánicos presentes en el lactofermento, se hizo una comparación con ácidos orgánicos químicamente puros. 60 semillas de maíz amarillo se lavaron con agua potable y se dejaron germinar en cajas Petri con papel filtro y 5 mL de agua potable durante 5 días a 20 °C colocadas en bolsas de plástico negro. Los germinados se pusieron en vaso de 250 mL de unicel perforados en el fondo con 50 g de vermiculita estéril y 3 g de roca fosfórica. (10 germinados por tratamiento) y se distribuyeron por tamaños de manera equitativa por tratamiento. Cada planta se regó cada tercer día durante 45 días con 50 mL de cada uno de los tratamientos descritos en el Cuadro 21.

**Cuadro 21. Tratamientos para evaluar solubilización de roca fosfórica con ácidos orgánicos y lactofermentos.**

Tratamiento	Abreviatura	Contenido	Plantas
T1	Control	Agua	10
T2	Ácidos	Mezcla ácido acético y láctico 4%	10
T3	LF MB 30	Lactofermento madurado 30 días	10
T4	LF MB 5	Lactofermento madurado 5 días	10

Etapa 2. Para evaluar la capacidad de solubilización de fósforo del consorcio BAL-K. *marxianus* se colocaron 100 mL del consorcio en medio LB en matraz Erlenmeyer de 200 mL con tapón de algodón hasta fase exponencial. Como control positivo se hizo el mismo procedimiento para desarrollar una cepa de *Pseudomonas putida* proporcionada por el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana de la BUAP, la cual está reconocida como solubilizadora de fosfatos. Por otra parte se prepararon cajas Petri con medio agar-Pikovskaya modificado (Nopparat *et al.*, 2009), el cual contiene un indicador de pH. Se utilizaron roca fosfórica y fosfato de calcio (al 1%) como fuentes de fósforo, y lactosuero y sacarosa (al 4%) como fuentes de carbono. Cada Caja Petri se inoculó por duplicado con 1 mL del consorcio, y por duplicado con el control positivo. Al centro de la caja se colocó 1 mL de agua esterilizada como control negativo, de tal manera que los tratamientos a evaluar fueron los que se describen en el Cuadro 22.

**Cuadro 22. Tratamientos para evaluar solubilización de fosfatos con cepas lácticas *in vitro*.**

Tratamiento	Abreviatura	Cepa utilizada	Fuente de fósforo y carbono
T1	MB-Pi-Lac	BAL- <i>S. marxianus</i>	Roca fosfórica-Lactosuero
T2	Ctrl+Pi-Lac	<i>P. putida</i>	Roca fosfórica-Lactosuero
T3	Ctrl-Pi-Lac	Agua estéril	Roca fosfórica-Lactosuero
T4	MB-Pi-Sac	BAL- <i>S. marxianus</i>	Roca fosfórica-Sacarosa
T5	Ctrl+Pi-Sac	<i>P. putida</i>	Roca fosfórica-Sacarosa
T6	Ctrl-Pi-Sac	Agua estéril	Roca fosfórica-Sacarosa
T7	MB-CaPO <sub>4</sub> -Lac	BAL- <i>S. marxianus</i>	Fosfato de calcio-Lactosuero
T8	Ctrl+CaPO <sub>4</sub> -Lac	<i>P. putida</i>	Fosfato de calcio-Lactosuero
T9	Ctrl-CaPO <sub>4</sub> -Lac	Agua estéril	Fosfato de calcio-Lactosuero
T10	MB-CaPO <sub>4</sub> -Sac	BAL- <i>S. marxianus</i>	Fosfato de calcio-Sacarosa
T11	Ctrl+CaPO <sub>4</sub> -Sac	<i>P. putida</i>	Fosfato de calcio-Sacarosa
T12	Ctrl-CaPO <sub>4</sub> -Sac	Agua estéril	Fosfato de calcio-Sacarosa

MB: Microorganismos benéficos; Pi: roca fosfórica; Ctrl: Control; BAL: Bacterias ácido lácticas; Lac: Lactosa; Sac: sacarosa.

Cada tratamiento se evaluó por cuadruplicado (2 colonias por caja, 2 cajas por cepa) y duplicado para el control negativo. Las cajas se inocularon a 30 °C durante 8 días y se observó el halo de solubilización así como la variación de color del agar. Se consideró como solubilización positiva cuando el halo fue mayor a 1 cm, y estuvo presente en todas las réplicas.

Etapa 3. Para determinar la concentración óptima de roca fosfórica (concentración mínima que produce un efecto benéfico significativo en el desarrollo de maíz) se procedió de la siguiente manera:

Lactofermento: Se preparó conforme al método propuesto por Pacheco (2003) utilizando lactosuero estándar obtenido de la elaboración de queso fresco a partir de leche en polvo. Como inóculo de microorganismos benéficos se utilizó una mezcla de las bacterias ácido lácticas (BAL) *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* y la levadura *Kluyveromyces marxianus* en una proporción 4:1. El lactofermento se obtuvo por fermentación anaeróbica estática a 30 °C en seis botellas plásticas de 600 mL variando la concentración de roca fosfórica desde 0 hasta 8% (p/v). Las fermentaciones se realizaron a 20 °C en obscuridad y agitación ocasional durante 30 días.

Soluciones de roca fosfórica: Se prepararon 4 botellas plásticas de 1 L con soluciones al 2, 4, 6 y 8% de roca fosfórica y se almacenaron en obscuridad hasta su aplicación.

Efecto agrobiológico: 150 semillas de maíz amarillo se lavaron con agua potable y se dejaron hidratar por 12 horas a 20 °C en obscuridad. Se prepararon vasos de 250 mL de unícel perforados en el fondo con 50 g de vermiculita. Se sembraron 2 semillas por vaso. Se evaluó la emergencia y se desechó una plántula por vaso para que finalmente quedaran 76 plantas, 6 para cada tratamiento y 9 para control conforme al diseño presentado en el Cuadro 23.

**Cuadro 23. Tratamientos para determinar concentración efectiva del LF-MB en la solubilización de roca fosfórica.**

Tratamiento	Abreviatura	Roca fosfórica	Solvente	Plantas
T1	Control	0	Agua	9
T2	Pi 2%	2g/100 mL	Agua	6
T3	Pi 4%	4g/100 mL	Agua	6
T4	Pi 6%	6g/100 mL	Agua	6
T5	Pi 8%	8g/100 mL	Agua	6
T6	LF-MB	0	Lactofermento	9
T7	LF-2%Pi	2g/100 mL	Lactofermento	6
T8	LF-4%Pi	4g/100 mL	Lactofermento	6
T9	LF-6%Pi	6g/100 mL	Lactofermento	6
T10	LF-8%Pi	8g/100 mL	Lactofermento	6

Pi: Roca fosfórica; LF-MB: lactofermento

Las plántulas se regaron con su tratamiento correspondiente cada 3 o 4 días (50 mL del producto diluido al 5% por planta en condiciones de invernadero, con temperaturas de 18 a 23 °C y fotoperiodo 12:12 durante 45 días a partir de la emergencia, la longitud del vástago (base del tallo a altura máxima de hoja) utilizando un flexómetro y se contó el número de hojas para obtenerse los porcentajes de plantas según su etapa fenológica conforme a los criterios descritos por Fassio *et al.* (1998). A los 45 días se determinaron las siguientes variables: Peso seco de raíz y peso seco de vástago expresados en gramos, para lo cual se secaron las plántulas hasta peso constante en horno de convección a 30 °C y se obtuvieron los pesos en una balanza analítica Ohaus. A partir de estos datos se evaluó el efecto de los tratamientos considerando mejoras en tiempo de emergencia, así como mejoras en desarrollo fenológico: número de hojas/planta promedio, altura y ganancia de biomasa de vástago y raíz expresada en peso seco.

### **7.3.2 Diseño experimental**

En todos los experimentos se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DECA). Para evaluar el efecto de los ácidos orgánicos y cepas lácticas en la solubilización de fosfatos se utilizaron 10 plantas por tratamiento (3 tratamientos y un control). Para evaluar la capacidad de las cepas microbianas para solubilizar fosfatos se utilizaron, por triplicado, cajas Petri con dos fuentes de carbono, y dos fuentes de fosfatos (6 cajas) probando por duplicado las cepas lácticas y el control positivo. Para la determinación de la concentración óptima de roca fosfórica se utilizaron 6 plantas de maíz por tratamiento (5 diluciones entre el 0 y 8% de roca fosfórica, 5 de lactofermento con roca fosfórica y 9 para el control negativo).

### **7.3.3 Análisis estadístico de resultados**

Para el experimento de solubilización con ácidos orgánicos se hicieron comparaciones de medias con la prueba de *t*-Student a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos después de comprobar que por lo menos uno de ellos era diferente en la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). Las pruebas *in vitro* se analizaron cualitativamente por la presencia de halos de solubilización y vire de color del medio. Para la determinación de la concentración óptima de roca fosfórica (etapa 3), los

resultados fueron evaluados por comparación de medias después de comprobar que por lo menos uno de los tratamientos resultó diferente en la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA). Se calculó el coeficiente de variación a cada uno de los tratamientos y cuando el valor fue mayor al 30% se eliminó el dato máximo y mínimo. Debido a que no todos los resultados cumplieron con el supuesto de normalidad y homogeneidad de Varianza (Levene), se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ). Se utilizó Excel y el paquete estadístico SAS (2004).

## 7.4 Resultados y discusiones

### 7.4.1 Comparación del efecto de ácidos orgánicos y LF-MB en el desarrollo de maíz (etapa 1)

Al comparar el efecto que producen los lactofermentos con ácidos orgánicos en el desarrollo de maíz, se observó que ambos compuestos promueven el engrosamiento del tallo (34, 34.4 y 27 mm para ácidos, lactofermentos y control respectivamente) así como el desarrollo de la raíz de plantas de maíz (0.41, 0.38 y 0.31 g para ácidos, lactofermentos y control respectivamente) de manera significativa ( $p < 0.05$ ). Se observaron mejores efectos en la ganancia de altura con el uso de lactofermentos que con los ácidos orgánicos (44.6 contra 36 centímetros del control) (Cuadro 24), aunque no se observó ningún efecto en la longitud total, peso seco de tallo ni volumen de raíz (datos no presentados) por lo que se puede deducir que este tipo de compuestos permite la solubilización de roca fosfórica y por lo tanto mayor asimilación por parte de la planta con efecto principalmente en el desarrollo de la raíz.

**Cuadro 24. Efecto agrobiológico de la aplicación de ácidos orgánicos y lactofermentos en el desarrollo de plántulas de maíz de 45 días.**

Tratamiento	Diámetro tallo (mm)	Altura vástago (cm)	Volúmen raíz (cm <sup>3</sup> )	Peso seco vástago (g)	Peso seco raíz (g)	Peso seco total (g)
1 Control	27.1 ± 3.9 b	36.0 ± 4.2 bc	2.3 ± 0.75 ab	0.58 ± 0.17 a	0.31 ± 0.05 bc	0.90 ± 0.20 a
2 Ácidos	34.0 ± 6.6 a	42.8 ± 6.4 ab	2.6 ± 0.99 ab	0.57 ± 0.13 a	0.41 ± 0.04 a	0.98 ± 0.12 a
3 LFMB30	34.4 ± 4.2 a	43.3 ± 5.4 a	2.8 ± 0.92 a	0.62 ± 0.15 a	0.39 ± 0.10 a	0.98 ± 0.29 a
4 LFMB5	28.8 ± 6.9 ab	44.6 ± 4.8 a	2.6 ± 0.51 ab	0.55 ± 0.11 ab	0.38 ± 0.07 ab	0.95 ± 0.22 a

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

LF MB 5: Lactofermento madurado 5 días; LF MB 30: Lactofermento madurado 30 días.

Los resultados observados concuerdan con los reportados por Vyas y Gulati (2009), quienes evaluaron el efecto de la inoculación de varias cepas de *Pseudomonas* junto con la fertilización NPK en el desarrollo de maíz, encontrando diferencias significativas en altura, peso seco y longitud de la raíz. Aunque los incrementos obtenidos en este trabajo no son tan altos como los reportados por estos autores, se puede deducir que el efecto en la solubilización de fósforo por las cepas lácticas evaluadas, es similar al de cepas reportadas como solubilizadoras. Illmer y Schiner (1992) mencionan como principal ácido asociado a la solubilización de fosfatos al ácido glucónico, el cual no se analizó de manera específica en este experimento. Se sugiere en futuros trabajos investigar la presencia y concentración de este ácido en los lactofermentos, además de la inducción de la ruta metabólica modificando sustrato y/o utilizando cepas más eficientes para su producción para fines agrícolas.

Illmer y Schiner (1992) reportaron un incremento en el desarrollo de maíz asociado a la solubilización de fósforo con el uso de inoculantes con *Pseudomonas* sp. y demostró experimentalmente que no hay correlación entre producción microbiana de ácidos orgánicos y desarrollo de la planta debido a diversos factores externos asociados a la solubilización de fósforo, como la capacidad para aprovechar los exudados de las raíces y la producción de fitohormonas.

#### **7.4.2 Solubilización de roca fosfórica *in vitro* (etapa 2)**

Además de la evidencia de la solubilización y aprovechamiento de fósforo presentada en el experimento anterior, las pruebas realizadas *in vitro* confirman la capacidad de solubilización de fósforo inorgánico por el consorcio BAL-K. *marxianus* ya que se pudieron observar halos de solubilización y cambio de color tanto para el control positivo (*P. putida*) como para el consorcio propuesto en todas las réplicas realizadas (Figura 23). Estos resultados fueron consistentes en el medio de roca fosfórica y fosfato de calcio disueltos en lactosuero, pero no fueron contundentes (no fueron positivas las cuatro réplicas) cuando el fósforo se disolvió en sacarosa, lo que indica la necesidad del consorcio por fuentes de carbono específicas.

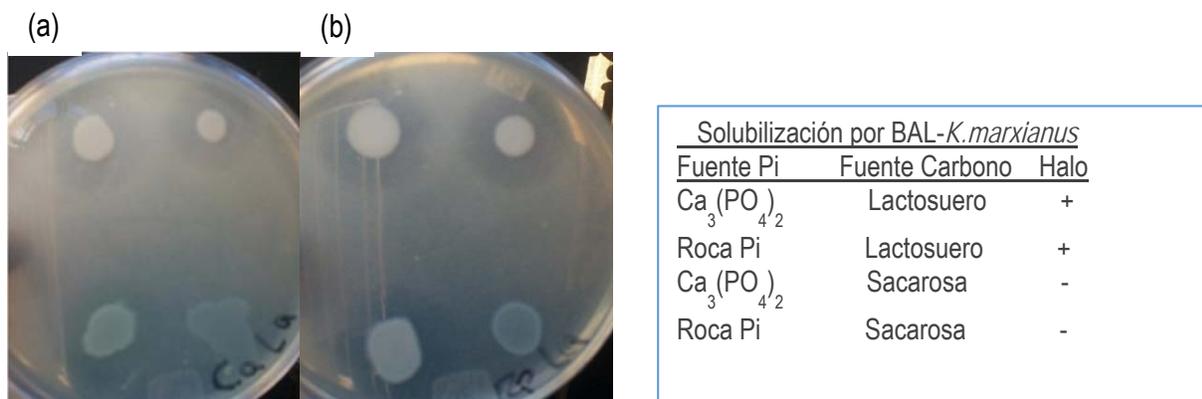


Figura 23. Solubilización de fosfato de calcio (a) y roca fosfórica (b) con LF.MB. Colonias superiores: *P. putida*. Colonias inferiores: Consorcio BAL-*K. marxianus*. Al centro: control negativo. Roca Pi: Roca fosfórica. BAL: Bacterias ácido lácticas.

Resultados similares se reportan para la solubilización de fósforo con el uso de rizobacterias (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010) entre las que destacan *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Achromobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Aereobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Yarrowia* sp., *Streptosporangium* sp. y *Erwinia* sp. Sin embargo, es interesante que no se reporte ninguna bacteria ácido láctica, que también se encuentran de manera natural en la rizósfera (Wassie y Wassie, 2016; Husain *et al.*, 2017).

### 7.4.3 Determinación de la concentración óptima de roca fosfórica (etapa 3)

Emergencia de plántulas de maíz. El tratamiento que presentó el mejor efecto para estimular la emergencia fue el lactofermento con 4% de roca fosfórica (T8). Presentó 100% de emergencia en el segundo día después de la siembra, un día menos con respecto al control. En el tercer día se logró la emergencia del 100% de plántulas regadas con agua potable (T1) y las regadas con lactofermento y lactofermento con 6% de roca fosfórica (T9). Los tratamientos con roca fosfórica presentaron un retraso de 1 y 2 días con respecto al control (Cuadro 25).

**Cuadro 25. Porcentaje de plantas de maíz que alcanzaron la etapa fenológica sometidas a diferentes tratamientos de roca fosfórica con y sin lactofermento (LF-MB).**

Etapa fenológica Tratamiento/día	Emergencia					v2		v3			v4					v5				
	1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	13	15	17	18	19	20	22	30	35	38
T1 Control	6	78	100	100	100	92	100	78	89	100	0	33	89	89	100	100	100	33	56	100
T2 Pi 2%	8	67	92	100	100	67	100	67	100	100	17	50	67	67	83	100	100	33	67	100
T3 Pi 4%	0	75	100	100	100	83	100	67	100	100	17	33	67	100	100	100	100	50	50	100
T4 Pi 6%	8	83	92	92	100	83	100	67	100	100	17	50	83	83	83	100	100	50	100	100
T5 Pi 8%	8	92	100	100	100	83	100	83	100	100	67	67	100	100	100	100	100	17	100	100
T6 LF-MB	0	72	100	100	100	92	100	56	100	100	22	33	56	56	56	67	100	78	100	100
T7 LF-2%Pi	8	92	92	92	100	67	100	33	100	100	0	0	17	17	67	67	100	100	100	100
T8 LF-4%Pi	0	100	100	100	100	92	100	50	100	100	33	33	67	67	83	100	100	100	100	100
T9 LF-6%Pi	0	92	100	100	100	92	100	67	100	100	17	33	67	67	67	83	100	100	100	100
T10 LF-8%Pi	0	50	83	83	100	92	100	50	100	100	0	17	17	17	50	50	100	100	100	100

Pi= roca fosfórica; LF-MB=lactofermento. n=6 y 9. V2: aparición segunda hoja verdadera; V3: tercera hoja verdadera y V4: cuarta hoja verdadera.

En la etapa v2 y v3 no se observaron diferencias entre los tratamientos con y sin lactofermento. La etapa v4 fue alcanzada más rápidamente con los tratamientos de roca fosfórica sin lactofermento (T1 a T5), pero la etapa v5 fue favorecida con la aplicación de lactofermento (Cuadro 26). A partir de este experimento se puede deducir que los lactofermentos contribuyeron a acelerar la emergencia ganándose hasta 2 días con respecto al tratamiento de roca fosfórica sin lactofermento y al control, siendo la concentración más efectiva el 4%, aunque no se observaron mejoras con respecto al desarrollo vegetativo a ninguna concentración.

Número de hojas. Al evaluar el puntaje de aparición de hojas con respecto al tiempo de las plántulas de maíz regadas con roca fosfórica con y sin lactofermento, no se observaron diferencias significativas durante los primeros 30 días (1.5 hojas en promedio en el día 3, 1.6 en el 6, 2.6 en el 9, 3.1 en el 12, 3.3 en el 15, 3.7 en el 18, 3.9 en el 21 y 4.1 en el día 30) pero a partir del día 35 se observaron mejores resultados para las plántulas regadas con lactofermento-roca fosfórica (T6-T10) en comparación al control (T1) ( $p < 0.05$ ).

A los 45 días se observaron mejoras significativas ( $p < 0.05$ ) de los tratamientos con lactofermento con roca fosfórica al 4-8% (T8-T10) (de 5.94 hojas contra 4.56 del control) y roca fosfórica sin lactofermento al 2-6% (T2-T4) (contra 4.72) (Cuadro 26), lo que demuestra que hay mejor asimilación de fósforo en presencia de los lactofermentos.

**Cuadro 26. Número de hojas en plántulas de maíz tratadas con solución de roca fosfórica con y sin lactofermento.**

Tratamiento/día	3	6	9	12	15	18	21	30	35	45
T1 Ctrl	1.33	1.56	2.78	3.22	3.33	3.89	4.11	4.11	4.33 <sup>bc</sup>	4.56 <sup>d</sup>
T2 Pi 2%	1.00	1.33	2.67	3.00	3.33	4.00	4.00	4.17	4.33 <sup>bc</sup>	4.67 <sup>cd</sup>
T3 Pi 4%	1.17	1.33	2.83	3.67	3.67	4.00	4.00	4.33	4.50 <sup>abc</sup>	4.50 <sup>d</sup>
T4 Pi 6%	1.50	1.67	2.33	2.67	3.00	3.17	3.67	4.00	4.50 <sup>abc</sup>	5.00 <sup>bcd</sup>
T5 Pi 8%	1.67	1.67	2.67	2.83	3.33	3.67	3.83	4.00	4.17 <sup>c</sup>	6.00 <sup>a</sup>
T6 LF-MB	1.78	1.89	2.44	3.00	3.33	3.44	3.67	4.00	4.89 <sup>abc</sup>	5.33 <sup>abc</sup>
T7 LF-2%Pi	1.83	1.83	2.67	3.00	3.33	3.83	4.00	4.00	5.33 <sup>a</sup>	5.67 <sup>ab</sup>
T8 LF-4%Pi	1.83	1.83	2.83	3.33	3.50	3.83	4.00	4.00	5.17 <sup>ab</sup>	5.83 <sup>a</sup>
T9 LF-6%Pi	1.67	1.83	2.50	3.17	3.33	3.67	4.00	4.00	5.33 <sup>a</sup>	6.00 <sup>a</sup>
T10 LF-8%Pi	1.17	1.33	2.50	3.00	3.17	3.17	3.50	4.00	5.33 <sup>a</sup>	6.00 <sup>a</sup>
EE±	0.52	0.26	0.25	0.31	0.27	0.16	0.12	0.06	0.27	0.17

Columnas sin letra indican que no hay diferencia estadística. Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa (M-W  $p < 0.05$ ); Pi: roca fosfórica; LF-MB lactofermento. n=6-9

Para esta variable, la mejor concentración mínima de fósforo en lactofermento fue al 6% manifestándose efectos positivos significativos después del día 35 posteriores a la siembra, presentando 6 hojas verdaderas en comparación a 4.56 del control (Figura 24).

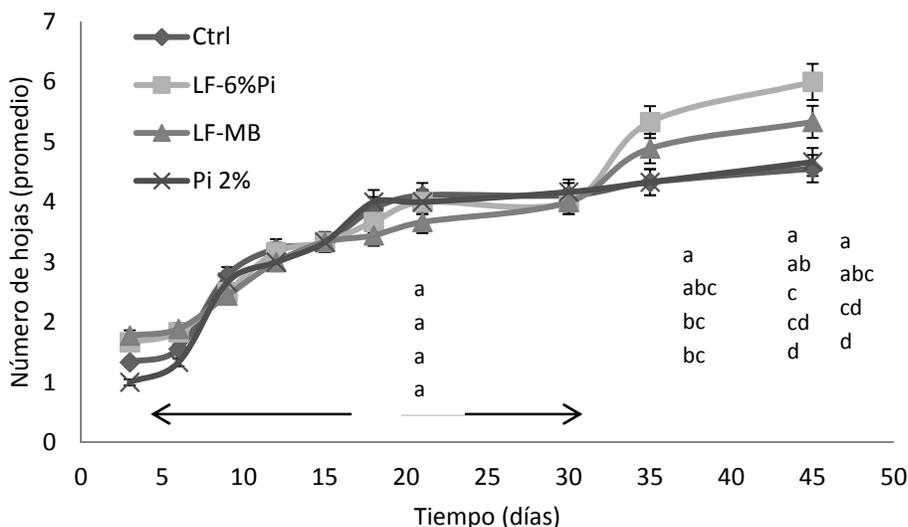


Figura 24. Aparición de hojas con respecto al tiempo en plántulas de maíz tratadas con solución de roca fosfórica con y sin lactofermento (n=6-9).

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa (M-W  $p < 0.05$ ). Ctrl: Control; LF-6%: Lactofermento con Roca fosfórica al 6%; LF-MB Lactofermento; Pi 2% Roca fosfórica al 2%.

Longitud vástago. Los mejores resultados con respecto al desarrollo del vástago se obtuvieron cuando se aplicó el lactofermento adicionado con roca fosfórica en todas las concentraciones (T6-T10), resultados estadísticamente significativos en comparación al control a partir del día 30 (69 centímetros contra 51.7 del control) ( $p<0.05$ ) (Cuadro 27), lo que concuerda con los resultados obtenidos en aparición de hojas.

Aunque no se observaron diferencias significativas en los primeros 30 días, a partir del día 35 se obtuvieron resultados estadísticamente significativos con el uso de lactofermento con roca fosfórica al 2% (T7) (91.8 cm contra 54.6 del control) ( $p<0.05$ ) para favorecer el desarrollo del tallo, determinándose que esa es la concentración mínima a la que se obtiene una respuesta favorable (Figura 25).

**Cuadro 27. Longitud de vástago (cm) de plántulas de maíz tratadas con solución de roca fosfórica con y sin lactofermento.**

Tratamiento\día	6	9	12	20	30	35	45
T1 CTRL	11.00 <sup>abc</sup>	19.78 <sup>ab</sup>	25.44 <sup>ab</sup>	43.33 <sup>ab</sup>	51.67 <sup>bc</sup>	52.30 <sup>c</sup>	54.56 <sup>d</sup>
T2 Pi 2%	8.33 <sup>c</sup>	15.00 <sup>b</sup>	21.17 <sup>b</sup>	39.67 <sup>b</sup>	49.87 <sup>c</sup>	51.00 <sup>c</sup>	58.33 <sup>d</sup>
T3 Pi 4%	10.33 <sup>abc</sup>	18.67 <sup>ab</sup>	25.00 <sup>ab</sup>	42.50 <sup>ab</sup>	53.17 <sup>bc</sup>	54.78 <sup>bc</sup>	61.00 <sup>cd</sup>
T4 Pi 6%	10.33 <sup>abc</sup>	18.67 <sup>ab</sup>	23.33 <sup>ab</sup>	39.33 <sup>b</sup>	52.28 <sup>bc</sup>	53.33 <sup>bc</sup>	59.50 <sup>cd</sup>
T5 Pi 8%	11.00 <sup>abc</sup>	19.33 <sup>ab</sup>	24.83 <sup>ab</sup>	40.83 <sup>ab</sup>	48.26 <sup>c</sup>	54.33 <sup>c</sup>	54.67 <sup>d</sup>
T6 LF-MB	11.44 <sup>abc</sup>	22.11 <sup>a</sup>	28.44 <sup>a</sup>	46.67 <sup>ab</sup>	62.78 <sup>ab</sup>	66.33 <sup>ab</sup>	74.67 <sup>bc</sup>
T7 LF 2%	12.33 <sup>a</sup>	22.17 <sup>a</sup>	28.67 <sup>a</sup>	51.33 <sup>a</sup>	73.00 <sup>a</sup>	74.30 <sup>a</sup>	91.83 <sup>a</sup>
T8 LF 4%	11.50 <sup>ab</sup>	22.00 <sup>a</sup>	29.00 <sup>a</sup>	49.33 <sup>ab</sup>	68.67 <sup>a</sup>	73.33 <sup>a</sup>	89.00 <sup>ab</sup>
T9 LF 6%	11.50 <sup>ab</sup>	20.67 <sup>ab</sup>	26.50 <sup>ab</sup>	46.17 <sup>ab</sup>	67.07 <sup>a</sup>	75.17 <sup>a</sup>	89.17 <sup>ab</sup>
T10 LF 8%	9.00 <sup>bc</sup>	17.00 <sup>ab</sup>	24.83 <sup>ab</sup>	45.17 <sup>ab</sup>	63.09 <sup>ab</sup>	77.17 <sup>a</sup>	82.67 <sup>ab</sup>
EE±	0.52	0.26	0.25	0.31	0.27	0.12	0.27

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa (M-W  $p<0.05$ ); Pi: roca fosfórica; LF-MB lactofermento. (n=6-9)

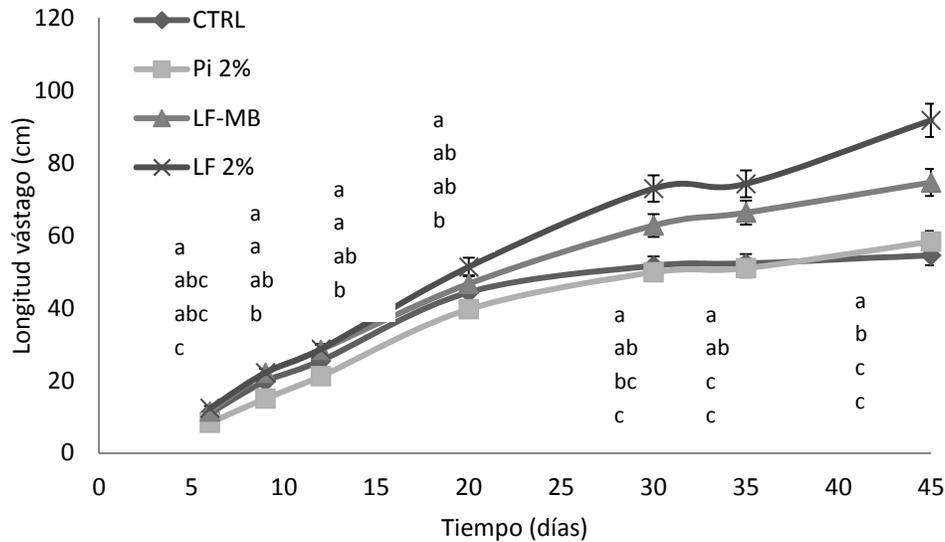


Figura 25. Longitud de vástago de plántulas de maíz tratadas con roca fosfórica con y sin lactofermento (n=6-9). Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa (M-W  $p < 0.05$ ).

Ctrl: Control; LF-2%: Lactofermento con roca fosfórica al 2%; LF-MB Lactofermento; Pi 2% Roca fosfórica al 2%.

Variables fenométricas. En general se observó un efecto positivo con la aplicación de lactofermento adicionado con roca fosfórica (T6-T10) en comparación a los tratamientos sin lactofermento (T1-T5) en la ganancia de biomasa (1.45 g con lactofermento y 0.46 sin lactofermento para el peso seco del vástago, 1.73 g con lactofermento y 0.82 sin lactofermento, 90 cm de la longitud del vástago con lactofermento contra 60 sin lactofermento y 6 hojas con lactofermento contra 5 sin lactofermento) en plántulas de maíz a 45 días de emergencia (Figura 26).

Los lactofermentos con roca fosfórica a concentraciones mayores al 2% resultaron estadísticamente superiores al control en cuanto a peso seco y longitud del vástago así como en el número de hojas, sin embargo, al 2% presentó el mejor efecto en desarrollo del vástago con un incremento del 60% con respecto a la longitud del vástago del control y del 24% para el peso seco del vástago. Los lactofermentos con roca fosfórica al 4-8% incrementaron en un 7% la aparición de hojas, por lo que se puede sugerir 4% como la concentración mínima a la cual se obtiene una respuesta significativa favorable y con la cual se puede formular el lactofermento para asegurar una máxima asimilación de fósforo (Cuadro 28).

A los 45 días posteriores a la emergencia, el maíz tratado con lactofermento con 2% de roca fosfórica en comparación con la solución de roca fosfórica 2% sin lactofermento, se puede observar que hay una diferencia significativa tanto en peso seco de raíz (1.69 g con lactofermento contra 0.81 sin lactofermento), peso seco del vástago (1.50 gramos con lactofermento contra 0.32 sin lactofermento) y la longitud del vástago (92 cm con lactofermento contra 58 sin lactofermento) ( $p < 0.05$ ), lo que demuestra el efecto que tiene la solubilización de fósforo por la acidez de los lactofermentos, y por consiguiente su efecto en el desarrollo del maíz (Figura 26).

**Cuadro 28. Respuesta fenológica de plántulas de maíz tratadas con roca fosfórica con y sin lactofermento a 45 días posteriores a la inoculación.**

Tratamiento	Peso seco vástago (g)	Peso seco raíz (g)	Longitud vástago (cm)	Número hojas promedio
T1 Ctrl	0.36±0.30 <sup>f</sup>	1.02±0.19 <sup>c</sup>	54.56±9.08 <sup>d</sup>	4.56±0.53 <sup>d</sup>
T2 Pi 2%	0.32±0.05 <sup>f</sup>	0.81±0.17 <sup>c</sup>	58.33±19.07 <sup>d</sup>	4.67±0.52 <sup>cd</sup>
T3 Pi 4%	0.41±0.07 <sup>ef</sup>	0.71±0.27 <sup>c</sup>	61.00±17.08 <sup>cd</sup>	4.50±0.55 <sup>d</sup>
T4 Pi 6%	0.39±0.05 <sup>f</sup>	0.75±0.22 <sup>c</sup>	59.50±14.46 <sup>cd</sup>	5.00±0 <sup>bcd</sup>
T5 Pi 8%	0.35±0.05 <sup>f</sup>	0.80±0.26 <sup>c</sup>	54.67±14.21 <sup>d</sup>	6.00±0 <sup>a</sup>
T6 LF-MB	0.68±0.13 <sup>de</sup>	1.15±0.25 <sup>bc</sup>	74.67±2.5 <sup>bc</sup>	5.33±0.5 <sup>abc</sup>
T7 LF-2%Pi	1.50±0.29 <sup>a</sup>	1.69±0.48 <sup>ab</sup>	91.83±19.65 <sup>a</sup>	5.67±0.52 <sup>ab</sup>
T8 LF-4%Pi	1.07±0.15 <sup>bc</sup>	1.29±0.28 <sup>abc</sup>	89.00±16.54 <sup>ab</sup>	5.83±0.41 <sup>a</sup>
T9 LF-6%Pi	1.31±0.31 <sup>ab</sup>	1.83±0.43 <sup>a</sup>	89.17±19.38 <sup>ab</sup>	6.00±0 <sup>a</sup>
T10 LF8%Pi	0.97±0.10 <sup>cd</sup>	1.27±0.24 <sup>abc</sup>	82.67±7.31 <sup>ab</sup>	6.00±0 <sup>a</sup>

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa ( $n=6-9$ ) (M-W  $p < 0.05$ ); Pi: roca fosfórica; LF-MB lactofermento.

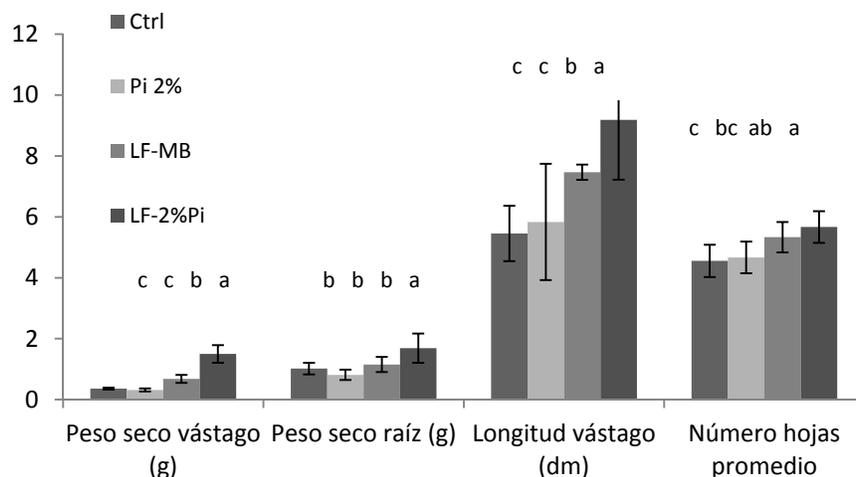


Figura 26. Variables fenométricas de plántulas de maíz tratadas con lactofermentos y roca fosfórica (n=6). Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencia significativa (M-W  $p < 0.05$ ). Ctrl: Control; LF-2%: Lactofermento con roca fosfórica al 2%; LF-MB Lactofermento; Pi 2% Roca fosfórica al 2%.

## 7.5 Conclusiones

Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular producen un efecto positivo en la promoción del crecimiento de maíz, principalmente en el desarrollo de la raíz. La mínima concentración de roca fosfórica que presentó un efecto estadísticamente significativo fue el lactofermento con roca fosfórica al 4%, por lo que se puede deducir que el lactofermento ayuda a la solubilización de fósforo y lo hace más asimilable al maíz.

## 7.6 Literatura citada

- Fassio, A., Carriquiry, A., Tojo, C. y Romero, R. (1998) Maíz: aspectos sobre fenología. Consultado en internet julio 2018. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2844/1/111219240807135855.pdf>
- Fasim, F., Ahmed, N., Parson, R. y Gadd, G. M. (2002) Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from air environment of a tannery. *FEMS Microbiol. Lett.* (213):1–6.
- Goldstein, A. H. (1986) Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. *Am. J. Altern. Agricult.* (1):57–65.
- Higa, T. (1997) Making a world of difference trough the technology of effective microorganisms (EM). EM Technology Inc.

- Husain, A., Hassan, Z., Huda-Faujan, N. y Nizam, M. (2017) A. Sci. Res. J. Eng. Tech.Sci. 29(1):182-202.
- Illmer, P. y Schinner, F. (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. Soil Biol. Biochem; (24):389-395.
- Kim, K. Y., Jordan, D. y Krishnan, H. B. (1997) *Rahnella aqualitis*, a bacterim isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. FEMS Microbiol. Lett. (153):273–277.
- Nopparat, C., Jatupornpipat, M. y Rittiboon, A. (2009) Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicas* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. Kasetsart J. Nat. Sci. 43: 172-181.
- Pacheco, F. (2003) Lactofermentos: Una alternativa en la producción de abonos orgánicos líquidos fermentados. Costa Rica. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica. Organización de Estudios Tropicales, Instituto Nacional de Aprendizaje (AVINA).
- Paredes-Mendoza, M. y Espinosa-Victoria, D. (2010) Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. Terra Latinoam 28 (1):213-221. Chapingo. Mex.
- Restrepo-Rivera, J. (2006) El ABC de la Agricultura Orgánica y Harina de Rocas. Fundación PRODUCE Jalisco. México.
- Statistical Analysis System Institute Inc. (2004). SAS/STAT 9.0 User guide. Cary, NC: SAS.
- Vyas, P. y Gulati, A. (2009) Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. BMC Microbiol. (9):174-189.
- Wagner, T. (1996) Contaminación, causas y efectos. Ed. Gernika, México.
- Wassie, M. y Wassie, T. (2016) Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. 3(8):44-49.
- Young, C.C. (1994) Selection and application of biofertilizers in Taiwan. Food and Fertilizer Technology Center. Tech. Bull. (141):1-9.

## **CAPÍTULO VIII. INHIBICIÓN IN VITRO DE *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.* Y *Aspergillum sp.* POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) Y *K. marxianus*.**

### **8.1 Resumen**

En este trabajo se evaluó tanto la capacidad del consorcio BAL-*K.marxianus* como del lactofermento LF-MB para inhibir *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.* las cuales son consideradas como plagas fungosas que afectan el desarrollo de maíz. Se hicieron experimentos *in vitro*, en sistemas hidropónicos con plantas y con plantas sembradas en vermiculita. En caja Petri se observó inhibición de *Fusarium sp* por el consorcio BAL-*K.marxianus*. No se observó efecto inhibitorio del consorcio BAL-*K. marxianus*, pero al utilizarlo integralmente como lactofermento, se observó inhibición contra *Penicillium sp* al disminuir al 100% la mortalidad aunque no daño subletal. El mayor efecto inhibitorio se observó con el lactofermento LF-MB tanto en la reducción de mortalidad como en daño subletal en *Fusarium sp.* ( $p<0.05$ ) y un efecto positivo en la supervivencia (plantas que sobrevivieron a las condiciones experimentales), y desarrollo de biomasa, lo que demuestra el potencial del lactofermento LF-MB como biofertilizante.

### **8.2 Introducción**

Ante la necesidad de producir alimentos más sanos, sin residuos de plaguicidas, con tecnologías compatibles con el medio ambiente, seguras para quienes las practican y económicamente rentables, el uso de microorganismos, inoculantes y biofertilizantes abre la posibilidad de una agricultura sustentable (Restrepo-Rivera, 2006), principalmente en el combate de plagas y enfermedades, ya que éstas han desarrollado resistencia a los productos químicos (Ibarra *et al.*, 2006).

Se conoce como agentes de control biológico a aquellos microorganismos que reducen la incidencia o gravedad de las enfermedades de las plantas, y antagonistas a aquellos que presentan actividad hacia un patógeno (Vázquez-Ramírez *et al.*, 2015). Los principales mecanismos de acción relacionada con esta actividad se deben a la capacidad para sintetizar enzimas hidrolíticas que pueden eliminar células patógenas (Maksimov *et al.*, 2011), modificando la disponibilidad de nutrientes y una adecuada

colonización de nichos en la superficie de la raíz (Stephen y Jisha, 2009), modificando la regulación de los niveles de etileno en las plantas (Van Loon *et al.*, 2007), mediante la producción de sideróforos, antibióticos (bacteriocinas) o induciendo resistencia sistémica a enfermedades (Van Loon *et al.*, 1998).

Muchas enfermedades de cultivos de interés comercial son causadas por hongos que infestan diversas partes de la planta afectando desde aspectos de calidad hasta la pérdida total de los cultivos. Ante esta situación los productores tienen la opción de aplicar productos químicos, pero su sobre uso, que es muchas veces por falta de asesoría técnica adecuada e interés comercial, ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental (Ibarra *et al.*, 2006).

Ibarra *et al.* (2006) estiman que las pérdidas agrícolas por ataques de hongos fitopatógenos alcanzan cerca del 50% de la producción nacional, además que los controles sanitarios para la exportación de productos agropecuarios cada vez son más exigentes, por lo que es necesario desarrollar nuevas líneas de investigación que resuelvan esta problemática (Serrano y Galindo, 2006).

*Fusarium verticillioides* es un hongo patógeno que ataca al maíz causando pérdidas económicas considerables en todo el mundo. Infecta a la planta por distintas rutas produciendo una toxina que afecta los tejidos y granos de maíz disminuyendo su calidad (De la Torre-Hernández *et al.*, 2006). Está clasificado como agente necrótrofo por causar muerte de tejido, pero también sobrevive como saprófito en el rastrojo. Puede sobrevivir como endófito en la semilla y tallo sin causar daño visible, pero cuando las condiciones son favorables provoca pudrición de raíz, tallo y mazorca. El nivel de daño depende de la virulencia de la cepa, genotipo y la etapa de desarrollo del maíz y acceso de las hifas a las células del pericarpio, daño mecánico y ataque de insectos (Duncan y Howard, 2010), así como condiciones climáticas (Torres *et al.*, 2003).

Diversos investigadores han reportado el efecto preservante de las bacterias ácido lácticas (BAL) en la conservación de alimentos, el cual se asocia a la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Yang *et al.*, 2007) pero no hay estudios sobre el uso de las BAL en el combate de hongos patógenos del maíz, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de bacterias ácido lácticas y

*Kluyveromyces marxianus* para reducir el daño ocasionado por *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., y *Aspergillum* sp. aislados de maíz.

## 8.3 Materiales y métodos

### 8.3.1 Condiciones experimentales

El presente trabajo se hizo en condiciones de laboratorio, a una temperatura de 30 °C, 70% de humedad y fotoperiodo 12-12 en incubadora de plantas. También se realizó en invernadero, utilizando como substrato vermiculita estéril a una temperatura de 25 °C y fotoperiodo de 12-12. Se llevó a cabo de mayo a diciembre 2017 en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, CICM ICUAP.

Material biológico. Se utilizaron 3 cepas de hongos filamentosos patógenos de maíz aislados en el CICM-ICUAP, los cuales se identificaron como *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., y *Aspergillum* sp. Se conservaron y propagaron en un medio de Luria Bertani líquido (LB). Como microorganismos antagónicos (MB) se probaron las cepas *Lactobacillus acidophilus* (CDBB-B-1026), *Streptococcus thermophilus* (CDBB-B-1931) y *Kluyveromyces marxianus* (CDBB-L-836) en consorcio, obtenidas de la producción de un biofertilizante elaborado a base de lactosuero.

Experimentación. Se realizó un experimento en tres etapas para demostrar antagonismo entre el consorcio BAL-*K. marxianus*, el lactofermento LF-MB y los patógenos *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp. La primera etapa se hizo *in vitro* en cajas Petri, la segunda con plantas en sistemas hidropónicos y la tercera con plantas sembradas en vermiculita. En todos los casos se utilizó un control negativo de agua destilada estéril así como el Inoculante multi especies-BUAP® como control positivo.

Para las pruebas de inhibición en cajas Petri (etapa 1) se propagaron los patógenos en un medio sólido LB con un asa bacteriológica en dos líneas paralelas y una línea central con el consorcio BAL-*K. marxianus* el Inoculante multi especies-BUAP®, dejando incubar por 4 días y observando la inhibición de crecimiento. Las pruebas se hicieron por triplicado y se consideró como inhibición positiva en el caso en el que las tres réplicas presentaran inhibición en el crecimiento del patógeno. Por separado se hicieron pruebas de inhibición por el método de doble capa descrito por Muñoz-Rojas (2005). Los

tratamientos evaluados para la etapa 1, que se nombraron por la coloración predominante de su micelio, se presentan en el Cuadro 29.

**Cuadro 29. Tratamientos para evaluar inhibición de plagas fungosas *in vitro*.**

Tratamiento	Abreviatura	Descripción
T1	BALK-Blanco	BAL- <i>K.marxianus</i> vs <i>Penicillium</i> sp.
T2	BALK-Negro	BAL- <i>K.marxianus</i> vs <i>Aspergillus</i> sp.
T3	BALK-Rojo	BAL- <i>K.marxianus</i> vs <i>Fusarium</i> sp.
T4	IME-Blanco	IME-BUAP vs <i>penicillium</i> sp.
T5	IME-Negro	IME-BUAP vs <i>aspergillus</i> sp.
T6	IME-Rojo	IME-BUAP vs <i>fusarium</i> sp.
T7	0-Blanco	Sin inóculo vs <i>Penicillium</i> sp.
T8	0-Negro	Sin inóculo vs <i>Aspergillus</i> sp.
T9	0-Rojo	Sin inóculo vs <i>Fusarium</i> sp.

BAL: Bacterias ácido lácticas; IME: inoculante multiespecies BUAP

Las pruebas en el sistema hidropónico (etapa 2) se hicieron en frascos de vidrio de 250 mL con 50 mL de medio salino inoculado con los agentes patógenos, que se puso en contacto con germinados de maíz inoculados con los microorganismos antagónicos (MB e IME-BUAP como control positivo y sin inocular como control negativo). Se evaluó el desarrollo de la planta durante 20 días en una cámara de incubación con fotoperiodo 12-12 a 20 °C. Las pruebas se hicieron por cuadruplicado. Los tratamientos evaluados fueron los mismos que en el experimento de la etapa 1.

Para las pruebas de inhibición con plántulas sembradas en vermiculita estéril (etapa 3) se obtuvieron germinados de maíz a partir de semillas inoculadas con el consorcio BAL-*K. marxianus*, con el Inoculante IME-BUAP® y germinados sin inocular como control negativo. Se sembraron en tubos Falcon de 50 mL con 20 cm<sup>3</sup> de vermiculita estéril. Los tubos se regaron con agua estéril cada 3-6 días. En el día 8 y 16, las plantas fueron inoculadas con 1 mL de cada uno de los patógenos y tratadas con una suspensión del consorcio BAL-*K. marxianus*, IME-BUAP® y Lactofermento (LF-MB) cada tercer día. Se monitoreó el desarrollo de las plántulas durante 30 días evaluando la supervivencia de las plantas a la exposición de los patógenos. Se observó y registró el daño físico en las hojas, el cual se consideró como leve en el caso de que el marchitamiento en la hoja fuera sólo en la punta (no se consideró en la contabilidad), severo cuando afectaba la mayor parte de la hoja y/o tallo y muerte total cuando el marchitamiento fue general. Además se consideró como muertas a aquellas plantas que al sacarlas del tubo Falcon

se desprendía la raíz con facilidad (pudrición de la raíz). Por otra parte se evaluó el daño subletal, considerado como enfermedad, analizando las diferencias de biomasa del total de la planta con respecto a los controles respectivos de las plantas sanas. Se evaluaron 8 plántulas para cada uno tratamientos (Cuadro 30).

**Cuadro 30. Tratamientos para evaluar inhibición plagas fungosas en hidroponia**

Tratamiento	Abreviatura	Descripción
T0	Control	Plantas sin inóculo y sin patógeno
T1	BAL-K	Plantas inoculadas con BAL-K. <i>marxianus</i>
T2	IME	Plantas inoculadas con IME BUAP (Control +)
T3	MB-Blanco	Plantas con <i>Penicillium</i> sp. Tratadas con BAL-K. <i>marxianus</i>
T4	LF-Blanco	Plantas con <i>Penicillium</i> sp. Tratadas con Lactofermento LF-Mb
T5	IME-Blanco	Plantas con <i>Penicillium</i> sp. Tratadas con IME
T6	Blanco	Plantas con <i>Penicillium</i> sp.
T7	MB-Negro	Plantas con <i>Aspergillus</i> sp. Tratadas con BAL-K. <i>marxianus</i>
T8	LF-Negro	Plantas con <i>Aspergillus</i> sp. Tratadas con Lactofermento LF-Mb
T9	IME-Negro	Plantas con <i>Aspergillus</i> sp. Tratadas con IME
T10	Negro	Plantas con <i>Aspergillus</i> sp.
T11	MB-Rojo	Plantas con <i>Fusarium</i> sp. Tratadas con BAL-K. <i>marxianus</i>
T12	LF-Rojo	Plantas con <i>Fusarium</i> sp. Tratadas con Lactofermento LF-Mb
T13	IME-Rojo	Plantas con <i>Fusarium</i> sp. Tratadas con IME
T14	Rojo	Plantas con <i>Fusarium</i> sp.

IME: inoculante multiespecies BUAP

### 8.3.2 Diseño experimental

Para todos los experimentos se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DECA) con tres especies patógenas (*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp.) y dos inoculantes microbianos con posible actividad antimicrobiana así como un control negativo de agua estéril para comprobar el crecimiento micelial y daño de las cepas patógenas. El experimento en hidroponia tuvo el mismo diseño experimental con la única variante de que el experimento se hizo con plántulas de maíz (unidades experimentales) crecidas en botella de vidrio. La etapa 1 y 2 se evaluaron por triplicado, resultando un total de 9 tratamientos, y 27 unidades experimentales (cajas Petri/botellas hidropónicas). El experimento en invernadero (etapa 3) se hizo en tubos Falcon con 8 réplicas por tratamiento con la variante de probar el efecto del lactofermento y de las cepas lácticas por separado en la inhibición de patógenos, por lo que el número de tratamientos se elevó a 14 (112 unidades experimentales).

### 8.3.3 Análisis estadístico de resultados

La mortalidad y disminución en el desarrollo se comparó contra los controles. Debido a que los datos no cumplieron con las premisas de homogeneidad de varianza y/o normalidad, se hizo un análisis no paramétrico con la prueba U de Mann Whitney a un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ), usando Excel y el paquete estadístico SAS (2004).

### 8.4 Resultados y discusión

Pruebas de inhibición en cajas Petri (etapa 1). Los resultados de inhibición de patógenos del consorcio BAL-*K. marxianus* contra *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. (tratamientos T1 y T2) resultaron negativas al no presentar inhibición en ninguna de las tres réplicas o máximo en una, en comparación al IME-BUAP (T4-T6), donde el crecimiento micelar de los patógenos fue inhibido en las 3 cajas (no hubo crecimiento micelar salvo en 2 cajas que presentaron indicios de inhibición).

Sólo se observó una ligera inhibición del consorcio BAL-*K. marxianus* contra *Fusarium* sp. (Figura 27.) al resultar positivas 2 de 3 cajas, lo que indica que posiblemente, bajo ciertas condiciones, el consorcio tiene potencial de inhibición.

Pruebas en sistema hidropónico (etapa 2). Se observó daño total (muerte) en las plántulas expuestas a los hongos patógenos sin inocular (T8-T9), mientras que para las inoculadas con el IME-BUAP se observaron efectos positivos para el T5, T9 y T13 (Inhibición de todos los patógenos), sin embargo en todas las pruebas realizadas con el consorcio BAL-*K. marxianus* se observó muerte de la plántula, por lo que se deduce que en este ambiente el consorcio no tiene capacidad inhibitoria para los patógenos evaluados. Esto puede deberse principalmente a que el pH casi neutro de la solución acuosa no favorece el desarrollo del consorcio (Figura 28).

Pruebas en vermiculita (etapa 3). En todos los experimentos realizados se observó un daño estadísticamente significativo entre las plantas con *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp. (T6, T10 y T14) y el control de las plantas sanas (T0) ( $p < 0.05$ ). Tanto el tratamiento correspondiente al consorcio BAL-*K. marxianus* e IME-BUAP (T1 y T2) no

mostraron diferencia significativa con el control de plantas sanas (T0). Se observó un efecto benéfico para reducir la mortalidad y el daño subletal al utilizar el IME-BUAP (T5, T9 y T13) en las especies patógenas evaluadas (datos no mostrados), lo que da validez a los resultados obtenidos.

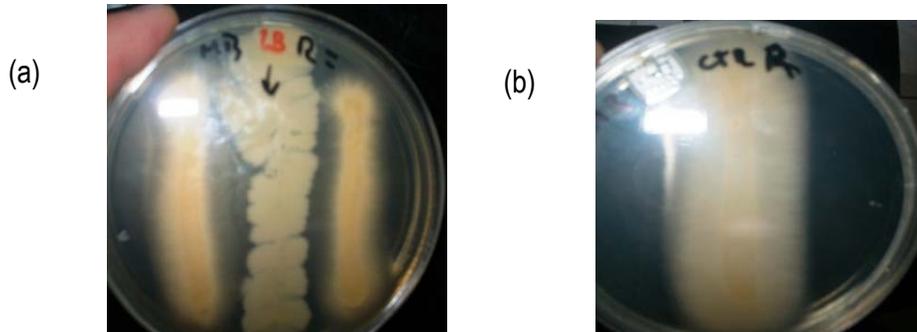


Figura 27 (a) Inhibición *in vitro* de crecimiento de *Fusarium* sp. por el consorcio BAL-*K.marxianus*. (b) Prueba de inhibición de *Fusarium* sp. con el control negativo.

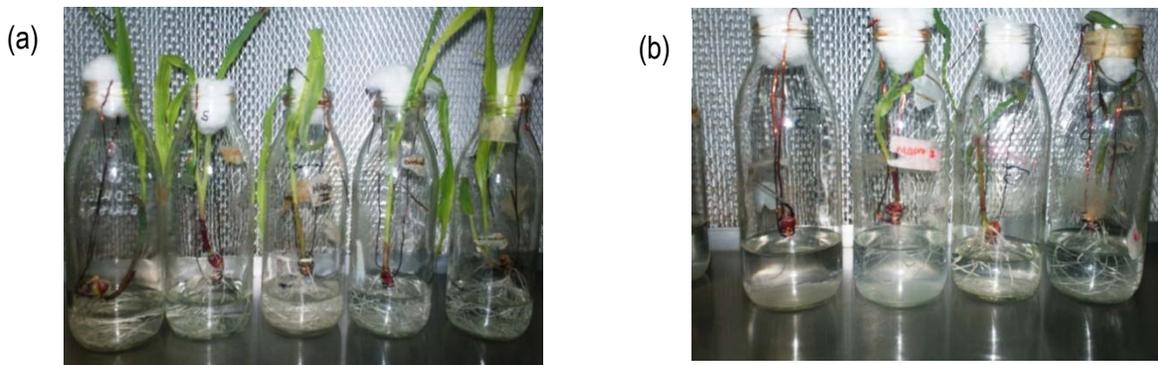


Figura 28 (a) Maíz inoculado con IME-BUAP expuesto a patógenos (control +). (b) Maíz inoculado con MB expuesto a patógenos.

El consorcio BAL-*K. marxianus* no redujo la mortalidad ni el daño subletal (disminución del desarrollo) ocasionada por *Penicillium* sp. (Figura 29).

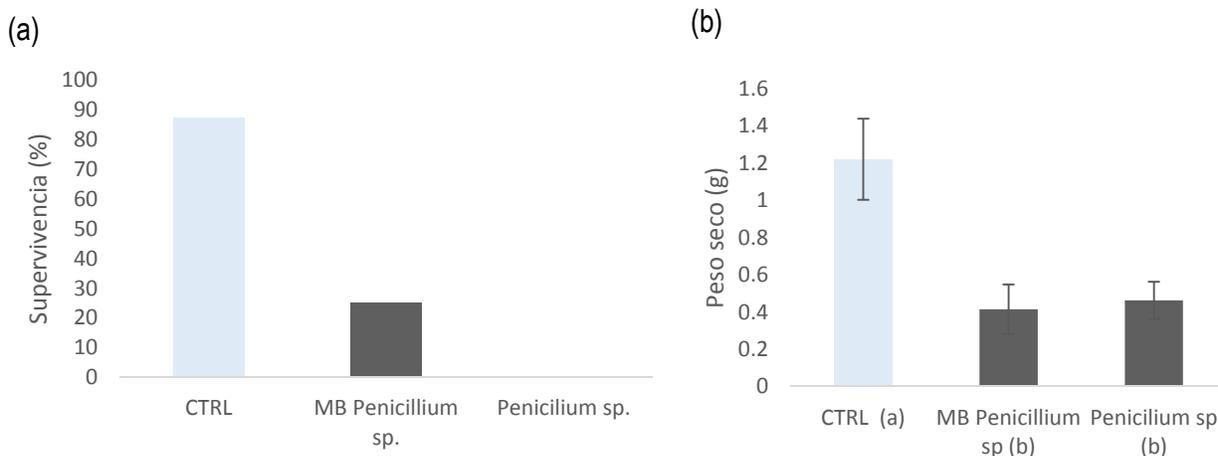


Figura 29. Efecto del consorcio BAL-*K. marxianus* en (a) mortalidad y (b) daño subletal en plántulas de maíz de 30 días infestadas con *Penicillium* sp. (n=8).

Letras diferentes entre paréntesis indican diferencia significativa (M-W  $p < 0.05$ ). BAL: Bacterias ácido lácticas

Tampoco disminuyó ni la mortalidad ni el daño subletal ocasionado por *Aspergillus* sp., ni *Fusarium* sp. (Figuras 30 y 31).

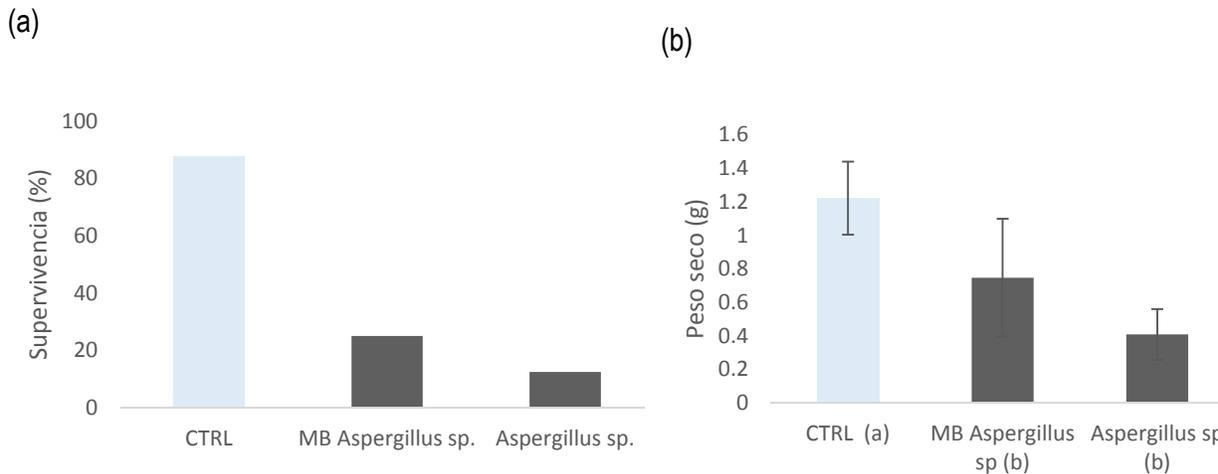


Figura 30. Efecto del consorcio BAL-*K. marxianus* en (a) mortalidad y (b) daño subletal en plántulas de maíz de 30 días infestadas con *Aspergillus* sp. (n=8).

Letras diferentes entre paréntesis indican diferencia significativa (M-W  $p < 0.05$ ). BAL: Bacterias ácido lácticas

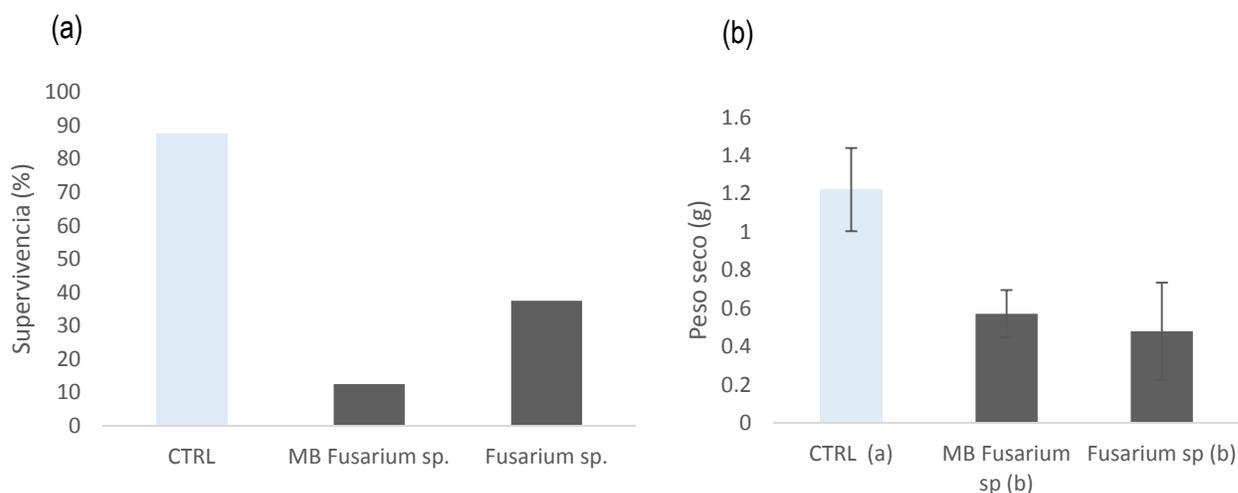


Figura 31. Efecto del consorcio BAL-*K. marxianus* en a) mortalidad (a) y daño subletal en plántulas de maíz (b) de 30 días infestadas con *Fusarium* sp. (n=8).

Letras diferentes entre paréntesis indican diferencia significativa (M-W  $p < 0.05$ ). BAL: Bacterias ácido lácticas

A diferencia de la respuesta observada al utilizar el consorcio BAL-*K. marxianus*, el lactofermento Lf-Mb sí presentó cierta capacidad de inhibición al disminuir al 100% la mortalidad ocasionada por *Penicillium* sp. y aunque no de manera significativa, también el daño subletal (Figura 32).

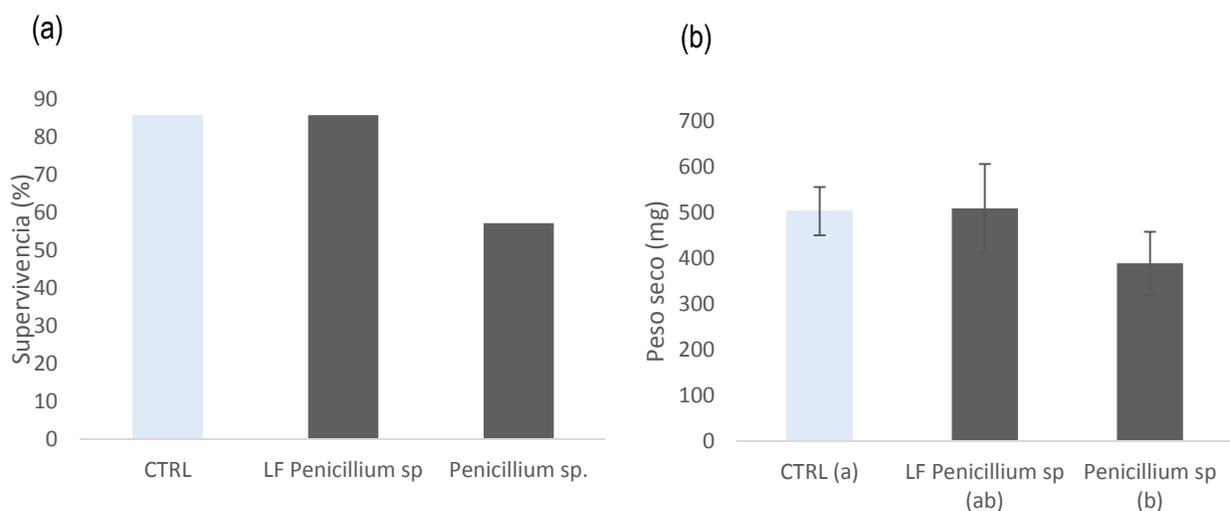


Figura 32. Efecto del lactofermento LF-MB en: (a) mortalidad y (b) daño subletal en plántulas de maíz de 30 días infestadas con *Penicillium* sp. (n=8).

Letras diferentes entre paréntesis indican diferencia significativa (M-W  $p < 0.05$ ). BAL: Bacterias ácido lácticas

En el caso de *Aspergillus* sp. no se observó efecto inhibitorio por parte del lactofermento LF-MB (Figura 33).

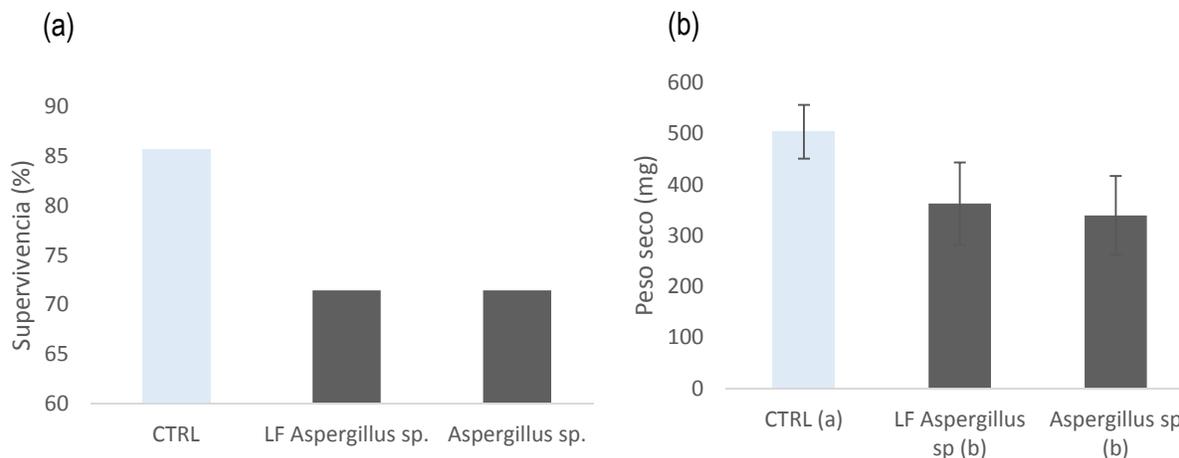


Figura 33. Efecto del lactofermento LF-MB en (a) mortalidad y (b) daño subletal en plántulas de maíz de 30 días infestadas con *Aspergillus* sp. (n=8).

Letras diferentes entre paréntesis indican diferencia significativa (M-W  $p < 0.05$ ). BAL: Bacterias ácido lácticas

El mayor efecto inhibitorio se observó con el lactofermento LF-MB tanto en la reducción de mortalidad como en daño subletal en *Fusarium* sp. ( $p < 0.05$ ) como se puede observar en la Figura 34. También se observó un efecto positivo en la supervivencia (plantas que sobrevivieron a las condiciones experimentales), y desarrollo de biomasa.

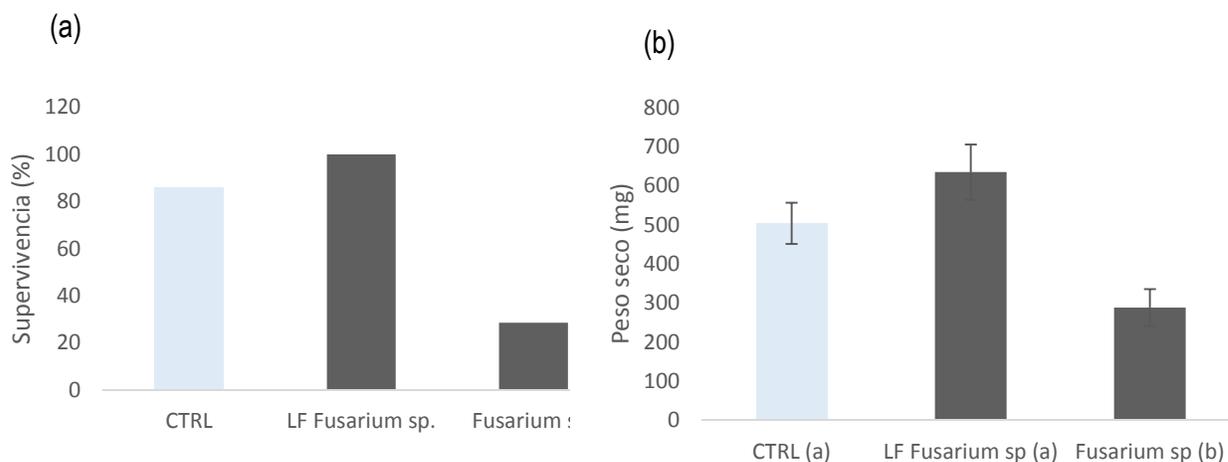


Figura 34. Efecto del lactofermento LF-MB en (a) mortalidad y (b) daño subletal en plántulas de maíz de 30 días infestadas con *Fusarium* sp. (n=8).

Letras diferentes entre paréntesis indican diferencia significativa (M-W  $p < 0.05$ ). BAL: Bacterias ácido lácticas

La capacidad de inhibición observada para *Fusarium* sp. utilizando el lactofermento (LF-MB) se pueden explicar debido al contenido de metabolitos con capacidad inhibitoria que

se encuentran tanto en el lactosuero como los que se producen por actividad microbiana durante su fermentación, además de que la leche y sus derivados son medios efectivos para el cultivo de cepas probióticas con capacidad inhibitoria de patógenos (Arqués *et al.*, 2005).

La capacidad inhibitoria de ciertas cepas probióticas se explica por 3 mecanismos principales: producción de compuestos antimicrobianos, principalmente bacteriocinas de naturaleza proteica, la exclusión competitiva y la estimulación del sistema inmunológico (Arqués *et al.* (2005).

Diversos autores han demostrado la capacidad antipatógena y particularmente antifúngica de las BAL (Arqués *et al.*, 2005), y considerando que son fáciles de aislar y producir aún en medios obtenidos a partir de residuos agroindustriales y excremento de animales de granja (Soundharrajan *et al.*, 2015), por lo que se deduce que es posible utilizarlas como agentes antimicrobianos naturales en aplicaciones agrícolas.

Soundharrajan *et al.* (2015) demostraron actividad antifúngica de 4 variedades de BAL, principalmente *Lactobacillus plantarum* L., contra *Aspergillus fumigatus* L., *Penicillium chrysogenum* L., *Penicillium roqueforti* L., *Botrytis elliptica* L. y *Fusarium oxysporum* L., algunos de ellos reportados como patógenos del maíz (CIMMYT, 2004).

Las evidencias de inhibición de plagas fungosas en maíz obtenidas en este trabajo se pueden explicar por los metabolitos fermentativos con capacidad antifúngica como es el caso de los ácidos orgánicos (láctico, acético y succínico) que se producen durante la fermentación del lactosuero. Sin embargo es importante considerar que la capacidad antifúngica, además de estar determinada por la composición de la comunidad microbiana también depende de sus condiciones ambientales y de crecimiento (Soundharrajan *et al.*, 2015). Además de que varía cuando las cepas actúan en consorcio (Arqués *et al.*, 2005).

## **8.5 Conclusiones**

Los experimentos realizados demostraron que el consorcio BAL-*K. marxianus* no tiene propiedades inhibitorias contra *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. o *Fusarium* sp. Tampoco

se observó capacidad de inhibición por parte del lactofermento LF-MB para *Penicillium* sp, y *Aspergillus* sp. Sí se pudo demostrar que el lactofermento LF-MB inhibe el daño de *Fusarium* sp. en pruebas *in vitro* y cuando es aplicado durante el riego en plantas de maíz como se demostró en experimentos de invernadero, lo que demuestra que son los metabolitos producidos por fermentación del lactosuero, como los ácidos orgánicos determinados en capítulos anteriores, los que inhiben a *Fusarium* sp.

## 8.6 Literatura citada

- Arqués, J. L., Rodríguez E., Gaya, P., Medina, M. y Nuñez, M. (2005) Effect of combinations of highpressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *Int. Dairy J.* (15): 893-900.
- CIMMYT (2004) Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Programa de Maíz del CIMMYT. 4a ed.
- De la Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E. y Plasencia-de la Parra, J. (2006) Fumonisin-síntesis y Función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1):77-91.
- Duncan, K.E. y Howard, R. J. (2010) Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* (23):6-16.
- Ibarra, J., Del Rincón Castro, M. C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Carrillo, J. A., Pereyra-Alfárez, B. (2006) Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Rev Latinoam Microbiol*; 48(2):113-120.
- Maksimov, I. V., Abizgil'Dina, R. R. y Pusenkova, L. I. (2011) Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Applied Bio-chemistry and Microbiology* (47):333-345.
- Muñoz-Rojas, J., Fuentes-Ramírez, L. E. y Caballero-Mellado, J. (2005) Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiology Ecology*; (34):57-66.
- Restrepo-Rivera, J. (2006) El ABC de la Agricultura Orgánica y Harina de Rocas. Fundación PRODUCE Jalisco. México.
- Serrano, L. y Galindo, E. (2006) Desarrollo tecnológico para el control biológico de fitopatógenos: un reto multidisciplinario.
- Soundharrajan, I., Hyung Soo, P., Mayakrishnan, V., Mariadhas Valan, A., Da Hye, K, Sivanesan, R. y Ki Choon, C. H. (2015) Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains

with Antifungal Activity Isolated from Animal Manure. Hindawi Publishing Corporation. Scientific World Journal Volume Article ID 802570, 10 pp

Statistical Analysis System Institute Inc. (2004). SAS/STAT 9.0 User guide. Cary, NC: SAS.

Stephen, J. y Jisha, M. S. (2009) Buffering reduces phosphate solubilizing ability of selected strains of bacteria. *World J. Agric. Sci.* (5):135-137.

Torres, M. R., Ramos, A. J., Soler, J., Sanchis., V y Marín, S. (2003) Study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternate* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* (81):185-193.

Van Loon, L. C., Bakker, P. A. y Pieterse, C.M. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review Phytopathology*; (36):453- 483.

Vázquez-Ramírez, M. F., Rangel-Núñez, J. C., Ibarra, J. E., Jorge, E. y Del Rincón-Castro, M. C. (2015) Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) *Interciencia.* 40(6):397-402.

Yang, P., Zhang, R., McGarvey, J. A. y Benemann, J. R. (2007) Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities. *Int. J. Hydrogen Energy* 32(18):4761-4771.

## CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES GENERALES

Con base en los objetivos e hipótesis planteados al inicio de la presente investigación se estimó la magnitud del problema de contaminación en la localidad de Chipilo calculando la cantidad y tipos de suero que se generan y el daño que ocasionan cuando son vertidos a campos de cultivo, por lo que se puede concluir que el problema de la contaminación ambiental es grave siendo las queserías tecnificadas las principales fuentes de contaminación en la región. Se demostró que se puede contribuir a disminuir el impacto de la actividad quesera artesanal aprovechando el lactosuero elaborando biofertilizantes por procesos biotecnológicos.

Para implementar una estrategia de desarrollo local que contemple el aprovechamiento de los subproductos generados y no utilizados, es necesario empezar por concientizar a los campesinos de la región, quienes serían los responsables de aplicar el biofertilizante propuesto en este trabajo, sobre la situación y las repercusiones de la contaminación por el abuso de agroquímicos y la disposición inadecuada del lactosuero

Se desarrolló una tecnología sencilla, segura y con recursos locales con la finalidad de aprovechar subproductos agropecuarios elaborando un lactofermento (LF-MB) a partir de lactosuero, sacarosa y cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* y *Kluyveromyces marxianus* de origen comercial. Se demostró que el consorcio BAL-K. *marxianus*, además de tener la capacidad para fermentar eficientemente lactosuero, interactúa de manera benéfica con maíz (*Z. maíz* L) y alfalfa (*M. sativa* L) observándose mejoras en su germinación y desarrollo asociados al suministro de ácidos orgánicos, solubilización de fósforo y en la inhibición de *Fusarium* sp. por lo que se valida con argumentos científicos la eficacia del lactofermento como biofertilizante promotor de crecimiento vegetal.

Se demuestra que es factible aprovechar el lactosuero que se genera en las queserías artesanales de Chipilo para elaborar un lactofermento funcional para aplicaciones agrícolas al demostrarse su inocuidad y sus propiedades como solubilizador de fosfatos,

promotor del crecimiento vegetal e inhibidor de plagas fungosas en alfalfa y maíz, y que es posible aprovecharlo utilizando cepas microbianas disponibles en comercios de la región. Queda en manos de las autoridades locales de Chipilo, del Colegio de Postgraduados, centros de investigación, Organizaciones no gubernamentales, Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural y Pesca así como la Secretaría de Desarrollo Rural la posibilidad de dar continuidad e implementar los conocimientos aquí generados.

### PROPUESTA DE PLAN ESTRATÉGICO DE DESARROLLO LOCAL

De manera sintética se presenta la estrategia propuesta resultado del diagnóstico expuesto en el capítulo 3 en la siguiente Matriz de Marco Lógico considerando que es un método analítico que permite presentar en forma resumida y estructurada una estrategia (Schiavón, 2010).

	Lógica de intervención	Indicadores de productos	Medios de verificación	Supuestos
Fin	Contribuir a mejorar la sustentabilidad de los procesos agropecuarios	$((\text{Valor de la producción en el año } t / \text{valor de la producción en el año } t-1) - 1) * 100$	Valor de la producción (SAGARPA)	Acceso a financiamiento de Programas de Gobierno.  Interés de los involucrados para mejorar su ambiente y calidad de vida a través de la organización.
Propósito	Implementación de tecnologías para producción agrícola sustentable.	Productores (queseros y agricultores) que aplican el paquete tecnológico satisfechos / Productores	Porcentaje de productores (queseros y agricultores) que aplican el paquete tecnológico	Apoyo institucional para informar, capacitar, organizar y asesorar a grupos de productores.

		(queseros y agricultores) que aplican el paquete tecnológico insatisfechos.	propuesto después de 2 años.	
<b>Componente</b>	<p>C1: Biofertilizante a base de lactosuero y cepas lácticas validado en laboratorio.</p> <p>C2: Productores con capacidades para aprovechar subproductos agroindustriales, disminuir su disposición inadecuada y aprovecharlos de manera eficiente.</p>	<p>Cumple con los parámetros de control de calidad fisicoquímicos y microbiológicos preestablecidos.</p> <p>Lactosuero aprovechado.</p>	<p>pH&lt;6, 4% de ácidos orgánicos, capacidad amortiguadora de 0.83 meq NaOH Más de 1 x 10<sup>8</sup> ufc/mL.</p> <p>Litros de lactofermento producido y utilizado/año.</p>	<p>Disposición de los productores de queso para donar y utilizar el lactosuero.</p> <p>Apoyo financiero para gastos operativos.</p>
<b>Actividades</b>	<p>A1: Contratación de un prestador de servicios profesionales (Agencia de Desarrollo Rural) para la atención y ejecución de la estrategia.</p> <p>A2: Convocatoria a productores y autoridades locales.</p> <p>A3:</p>	<p>Evaluación de desempeño por parte del Centro Estatal de Evaluación (SAGARPA).</p> <p>Reuniones informativas organizadas por</p>	<p>Según normativa vigente y acta de satisfacción de productores.</p> <p>Por lo menos 3 por año.</p>	<p>PSP sensibilizado sobre la problemática a resolver.</p> <p>Apoyo de instituciones e instancias de gobierno.</p>

	<p>Reuniones de planificación participativa.</p> <p>A4: Establecer un convenio entre instituciones y productores cooperantes (familias de Chipilo) para producción y comercialización de queso con certificación orgánica.</p> <p>A5: Establecer un centro demostrativo de producción de biofertilizantes (acopio y fermentación de lactosuero). Establecer una parcela demostrativa para producción de forrajes (alfalfa y maíz).</p> <p>A6: Reuniones de seguimiento a productores.</p>	<p>autoridades locales.</p> <p>Reuniones con productores locales.</p> <p>Cumplimiento del contenido del convenio: aprovechamiento de lactosuero-capacitación y apoyo financiero (pago por servicio ambiental).</p> <p>Producción constante de lactofermento.</p> <p>Parcela demostrativa de alfalfa maíz regada con lactofermento visitada por productores locales.</p> <p>Promover el uso de biofertilizantes como sustituto o complemento de agroquímicos.</p> <p>Reuniones con participación de instituciones de</p>	<p>Por lo menos 3 al año.</p> <p>Cumplimiento de convenio y financiamiento por dos años consecutivos.</p> <p>Producción de 200 L/día de lactofermento.</p> <p>Transferencia tecnológica de al menos 5 productores al año.</p> <p>Por lo menos 3 al año.</p>	<p>Productores informados participativos.</p> <p>Continuidad y compromiso por parte de instancias gubernamentales y productores.</p> <p>Productores no usan antibióticos ni productos químicos.</p> <p>Apoio institucional para hacer campañas de capacitación, información y divulgación.</p> <p>Interés por parte de instituciones y productores.</p>
--	---	---	---	---

		investigación (Colpos, INIFAP).		
--	--	------------------------------------	--	--

## ANEXOS

### Anexo A: ENCUESTA PARA TALLERES DE QUESO

#### a) Sobre la unidad de producción y nivel tecnológico

Cuánta leche procesan al día? \_\_\_\_\_ (Litros)  LA COMPRA O LA PRODUCE  USTED O  ALGÚN FAMILIAR

Si la compra, ¿desde dónde y cómo la transporta? \_\_\_\_\_ a cómo la paga? \$/L \_\_\_\_\_

Si la produce: cuántas vacas tiene? \_\_\_\_\_ Siembra forraje?  SI  NO Qué?  ALFALFA  AVENA  MAÍZ  OTRO \_\_\_\_\_ extensión? \_\_\_\_\_ (hectáreas)

El local de su taller es  PROPIO O  LO RENTA \_\_\_\_\_

Cuántos empleados tiene? \_\_\_\_\_ cuántos son familiares? \_\_\_\_\_ Qué estudios (máximos) tienen sus empleados? \_\_\_\_\_

Su taller cuenta con:  TANQUE DE ENFRIAMIENTO,  MARMITA,  QUEMADOR DE GAS,  REFRIGERADOR,  CÁMARA ENFRIAMIENTO,  CALDERA,  MESAS DE ACERO INOXIDABLE,  TRAMPA DE GRASAS,  PLANTA DE TRATAMIENTO,  COMPUTADORA,  CAJA REGISTRADORA.

Realiza pruebas de control de calidad de la leche?  SI  NO  
Describe \_\_\_\_\_

#### b) Sobre la actividad regional

Qué tipos de queso produce?  FRESCO  PROCESADO  MADURADO

Sabe preparar  PROCESADOS  MADURADOS

Cuáles son los que tienen mayor demanda? \_\_\_\_\_

Cómo comercializa su producción?  VENTA DIRECTA,  INTERMEDIARIOS,  COMERCIALIZADORA

Su producto tiene marca?  SI  NO

Cuáles son los problemas principales en su actividad?  MATERIA PRIMA,  MANEJO DE RESIDUOS,  MERMAS,  PAGO DE PROVEEDORES,  MERCADO  OTROS

\_\_\_\_\_

c) Sobre prácticas de manejo y conciencia ambiental

Cómo maneja la leche antes de su procesado?  ENFRÍA,  PONE QUÍMICOS,  PASTEURIZA  OTROS

\_\_\_\_\_

Utiliza aditivos químicos para producción?  SAL,  ÁCIDO ACÉTICO,  LECHE POLVO,  GRASA VEGETAL,  SUPROX,  HUMO LÍQUIDO,  OTROS

Cuánto tiempo transcurre desde la recolección al procesado? \_\_\_\_\_

¿Qué residuos se generan en mayor cantidad?  PLÁSTICOS  SUERO  QUESO PODRIDO  OTROS

¿Qué cantidad de suero genera al día? \_\_\_\_\_ (Litros) ¿Qué hace con ellos?  TIRA DRENAJE  TIRA CAMPO REGALA DA ANIMALES  REQUESÓN  OTRO

¿Qué cantidad de suero utiliza? \_\_\_\_\_ ¿Qué cantidad de suero utiliza? \_\_\_\_\_ (limpieza proceso)

¿Qué sabe del problema de contaminación por suero de queserías en Chipilo?

¿Sabe qué problemas, riesgos o peligros presentan esos residuos?

SALUD HUMANA,  CONTAMINACIÓN CAMPO  CONTAMINACIÓN AGUA

¿Qué hace para controlar la situación? ¿Qué sugiere que se haga? ¿Cómo se siente al respecto?

Calificación

Conocimientos

Sensibilización

Actitud

d) Sobre apoyo gubernamental

¿Ha recibido ayuda (subsidio) del gobierno en los últimos 3 años?  SI  NO

¿Qué tipo de ayuda?  FINANCIAMIENTO  COMPRA EQUIPO  CAPACITACIÓN  COMERCIALIZACIÓN  OTRO

e) Sobre organización

¿Pertenece a alguna organización?  SI  NO  CUÁL?

¿En caso de que no, le gustaría pertenecer?  SI  NO

(si la respuesta es sí) ¿Qué ventajas vería en organizarse?

## Anexo B: ENCUESTA PARA AGRICULTORES

a) Sobre la unidad de producción y nivel de marginación

Cuántas personas componen la unidad de producción? (viven de la actividad) \_\_\_\_\_ Cuántos son contratados? \_\_\_\_\_

Su casa tiene piso de cemento  SI  NO Cuantos cuartos tiene su casa \_\_\_\_\_ Tiene  BAÑO  LETRINA

Tiene refrigerador  SI  NO Calentador de  GAS  LEÑA

b) Sobre actividad agrícola de la región y nivel tecnológico

¿Qué especie siembra? Y qué extensión(hectáreas)?  ALFALFA  AVENA  TRIGO  MAÍZ  OTRA \_\_\_\_\_

Realiza algún procesado?  Si  No  SECADO  ENSILADO  PACAS

Lo utiliza para:  COMPLEMENTO  ALIMENTICIO (CORTE)  PASTOREO

Destino de la producción  AUTOCONSUMO  VENTA

¿Qué tamaño tiene su tierra?  MENOS DE UNA HA  ENTRE 1 Y 3 HA  MÁS DE 3 HA

¿El terreno es:  PROPIO  PRESTDO  RENTADO

Cuenta con:  TRACTOR  MOTOCULTOR  ANIMALES DE ARREO

c) Sobre prácticas agrícolas de la región

¿Problemas principales en su actividad:  PLAGAS  ENFERMEDADES  RENDIMIENTO  COMERCIALIZACIÓN

¿Qué hace para controlar/mejorar la producción de su cultivo? (Si utiliza producto, cuál, cuánto y cómo).

Insumo	Descripción	Cuánto	Forma aplicación
Fertilizante			

Plaguicida			
Herbicida			

¿Cómo determina las cantidades a utilizar?

EXPERIENCIA RECOMENDACIÓN VECINOS ASESORÍA VENDEDOR ASESORÍA TÉCNICO ESPECIALIZADO

¿Recibe capacitación para aplicar los agroquímicos?  SI  NO

¿De quién? \_\_\_\_\_

¿Cuáles son las plagas que más afectan sus cultivos? \_\_\_\_\_

¿Utiliza composta o algún fertilizante orgánico?  SI  No

¿Cuál? \_\_\_\_\_ ¿Usted lo prepara?  SI  NO      Cómo lo prepara?

¿Cómo lo aplica?

d) Sobre apoyo gubernamental

¿Recibe ayuda (subsido) del gobierno?  SI  NO      ¿Qué tipo de ayuda?

\_\_\_\_\_

¿Recibe apoyo para compra de fertilizantes y químicos (plaguicidas)?  SI  NO

¿Recibe asesoría y capacitación?  SI  NO      En qué temas?

\_\_\_\_\_

e) Conciencia ambiental

¿Qué sabe del problema de contaminación de agua y suelo en Chipilo?

¿Sabe qué problemas, riesgos o peligros presentan los residuos de quiería y agroquímicos?

SALUD HUMANA,      CONTAMINACIÓN CAMPO      CONTAMINACIÓN AGUA

¿Qué hace para controlar la situación? ¿Qué sugiere que se haga? ¿Cómo se siente al respecto?

Calificación

Conocimientos

Sensibilización

Actitud

f) Sobre organización

¿Pertenece a alguna organización?  SI  NO  CUÁL?

\_\_\_\_\_

¿En caso de que no, le gustaría pertenecer?  SI  NO

(si la respuesta es sí) ¿Qué ventajas vería en organizarse?

g) Sobre información e interés en capacitación

¿Estaría dispuesto a recibir capacitación para mejorar su actividad?  SI  NO

¿En \_\_\_\_\_ qué \_\_\_\_\_ temas \_\_\_\_\_ le \_\_\_\_\_ gustaría capacitarse? \_\_\_\_\_

¿Conoce qué es la fertilización orgánica?  SI  NO ¿Conoce que es el control biológico de plagas?  SI  NO

¿Le interesaría recibir asesoría o capacitación en fertilización orgánica y/o control biológico de plagas?  SI  NO

¿Estaría dispuesto a utilizar parte de su terreno para hacer un experimento demostrativo de fertilización orgánica?  SI  NO

## Anexo C: GUÍA ENTREVISTA A FUNCIONARIOS Y AUTORIDADES

Las siguientes son las preguntas guía utilizadas en las entrevistas a funcionarios de la SAGARPA, las preguntas fueron direccionándose según la dinámica generada con el entrevistado.

¿Qué programas hay para el suministro de fertilizantes a productores de Chipilo?

¿Cómo funcionan el o los programas?

¿Qué avances se tienen?

¿Con qué tipo de fertilizante se apoya?

¿A cuántas unidades de producción se beneficia? \_\_\_\_\_

¿Qué problemas o riesgos ve?

Desde su punto de vista, ¿Qué tan grave es el problema de erosión, pérdida de fertilidad y contaminación de agua-suelo agrícola por la actividad industrial (queso) en la región de Chipilo?

¿A qué lo atribuye?

¿Cómo afectan estos problemas a la actividad agrícola y a la población en general?

Considerando que el uso indiscriminado de fertilizantes está asociado a problemas de erosión, pérdida de fertilidad y contaminación de agua (entre otros problemas),

¿Qué acciones programas o planes se realizan o se tienen proyectos a futuro para mitigarlos?

¿Qué avances se tienen al respecto?

¿Cómo se estimula el uso de subproductos agroindustriales y biofertilizantes?

¿Hay programas y financiamiento que contemplen la investigación, el desarrollo de capacidades y el estímulo para su elaboración y uso?

SI \_\_\_ No \_\_\_ ¿Cuáles?

Desde su punto de vista ¿Qué se requiere para solucionar el problema de contaminación por subproductos industriales (lactosuero) y abuso de agroquímicos en el Puebla y en Chipilo?

Anexo D: RELACIÓN DE ENTREVISTAS REALIZADAS A AUTORIDADES LOCALES Y FUNCIONARIOS

Instituciones	Cargo
INIFAP	Investigador
INIFAP	Ayudante de investigadores
INIFAP	Investigador de difusión y transferencia tecnológica
SAGARPA	Coordinador del componente
FIRCO	Jefe de proyectos
SAGARPA	Jefe de Programa del Desarrollo Rural
SAGARPA – PESA-FAO	Coordinadora del Programa PESA FAO
SAGARPA	Coordinador Programa de agricultura familiar periurbana y de traspatio
Secretaría de Desarrollo Rural	Director de Agro negocios

Anexo E: RESUMEN DE PUNTOS IMPORTANTES OBTENIDOS EN LAS ENTREVISTAS A AUTORIDADES LOCALES Y FUNCIONARIOS.

Entrevistado	Cuál es la causa	Cómo y a quién afecta	Qué se requiere para solucionar	Qué está haciendo para solucionar
Presidencia Chipilo	Disposición inadecuada de descargas de empresas, sobre uso de agroquímicos	Enfermedades, disminución de las cosechas. Abandono de la actividad agropecuaria	Apoyo del gobierno.	
Presidencia Chipilo	Crecimiento poblacional.	Contaminación al medio ambiente		
INIFAP	Mal uso de agroquímicos  No hay programas eficientes de agricultura sustentable o alternativa.  Poca gente capacitada (prestadores de servicios profesionales).	Elevan los costos de producción.  Problemas ecológicos y ambientales como gases (efecto invernadero) y contaminación de agua.	Tomar en cuenta a las ONG's que están trabajando con proyectos agroecológicos. Diseño de una política clara.	
INIFAP	Mal uso de herbicidas.  En fertilizantes orgánicos y MIP no hay continuidad y son de largo plazo, la renta de tierras hace que no haya interés por el cuidado del suelo y del agua.	Disminuye la fertilidad del suelo,		
INIFAP	Las casas de agroquímicos dan malas recomendaciones con la finalidad de vender (interés económico).  La desaparición de extensionistas de la SAGARPA dejó sin asistencia técnica efectiva.		Apoyarse de las ONG's que tienen, casos exitosos en biofertilización y MIP.  Interés del gobierno.	

Entrevistado	Cuál es la causa	Cómo y a quién afecta	Qué se requiere para solucionar	Qué está haciendo para solucionar
SAGARPA	Inadecuado manejo de fertilizantes. Falta de capacitación. Gobierno solo apoya con adquisición de fertilizantes químicos y de semilla mejorada pero no con asesoría para el uso de estos.	Deterioro de la tierra, intoxicaciones trabajadores agrícolas.  Deforestación,	Reactivar los programas de extensionismo.  Elevar número de invernaderos. Planificar el cambio de uso de suelo.	Impulsar proyectos de Agricultura sustentable a través de Fundación PRODUCE y FIRCO.
FIRCO		Suelos salitrosos.	Entregar fertilizantes con asesoría técnica  Programas firmes de agricultura orgánica (fertilización y control biológico) bien establecida.	
SAGARPA	Fuerte uso de agroquímicos.  Las casas comercializadoras dan la asistencia técnica y no los técnicos del gobierno e instituciones de investigación.  SAGARPA apoya con fertilizantes fomentando el sobreuso de agroquímicos.  No hay apoyos que fomenten la agricultura orgánica.	Deterioro del suelo, eutrofización, disminución de microorganismos que favorezcan la nutrición del suelo agrícola.  Abandono del campo (flujo migratorio del campo a la ciudad).	Capitalización efectiva a los campesinos.	
SAGARPA - PESA-FAO	Mal uso de agroquímicos y pesticidas. Programas mal estructurados. No hay aplicación de la ley.	Poca agua disponible para riego.		

Entrevistado	Cuál es la causa	Cómo y a quién afecta	Qué se requiere para solucionar	Qué está haciendo para solucionar
SAGARPA	<p>Sobre uso de agroquímicos.</p> <p>No hay programas establecidos que fomenten la agricultura orgánica.</p> <p>Falta de extensionismo rural: no hay asistencia técnica y capacitación. No hay conocimiento sobre densidad de siembra, resguardo de materiales genéticos, uso y tipos de fertilizantes.</p> <p>No hay coordinación entre instituciones. Las políticas públicas no promueven el uso de biofertilizantes. Hay tecnología desarrollada, pero no políticas que lleven estos resultados a los campesinos.</p>	<p>Suelos muy erosionados, degradados y contaminados.</p>		
Secretaría de Desarrollo Rural	<p>Uso intensivo de agroquímicos.</p> <p>No hay un programa de análisis de suelos, y como no se sabe las deficiencias no se abona correctamente. Tampoco se piensa en tecnologías adecuadas como la rehabilitación microbiana del suelo.</p> <p>Gobierno entrega a los productores fertilizantes químicos sin asesoría, fomentando el sobre uso.</p>	<p>Poca eficiencia en la producción de cultivos.</p> <p>Cambio climático y disponibilidad de agua para el riego.</p>	Fomentar la organización campesina.	Seguir con las parcelas demostrativas, porque son una estrategia para el cambio.

