Rev. Cienc. Tecnol.
Año 11 / Nº 12 / 2009 / 4–8

Optimización de la amplificación mediante PCR de la región promotora 1 del gen *shp-1* luego de su tratamiento con bisulfito

E. Martín Giorgio, Bárbara J. Chaneton, Pedro D. Zapata

Amplification optimization through PCR for region 1 promoter of gen *shp-1* in bisulfite treated region

ABSTRACT

Changes in methylation patterns may contribute to cancer development. Recent studies have shown that *shp-1* expression is diminished in prostate cancer. Accordingly, it is relevant to evaluate the methylation pattern of its promoters. Bisulfite sequencing is the reference technique for these studies. The aim of this paper was the standardization of the conditions for *shp-1* gene Promoter 1 amplification before bisulfite treatment.

Two tissues with differential expression of *shp-1* were investigated: buccal epithelial cells and blood. We analyzed different combinations of PCR component with primers that hybridized in CpG island free zones. The application of 3 segments of decreased hybridization temperature allowed us to obtain 500pb predicted amplicons for this fragment of promoter 1.

KEY WORDS: epygenome, bisulfite treatment, PCR, *shp-1*

RESUMEN

Las alteraciones en los patrones de metilación de algunos genes pueden contribuir al desarrollo del cáncer. Existen evidencias de cambios en los niveles de expresión de SHP-1 en próstata tumoral, siendo fundamental evaluar el estado de metilación de sus promotores. La secuenciación bisulfito es la técnica de elección para establecer el patrón de metilación.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar las condiciones para la amplificación del Promotor 1 para el gen *shp-1* luego del tratamiento con bisulfito.

Se trabajó con 2 tejidos de expresión diferencial para SHP-1: mucosa yugal y tejido sanguíneo. A partir de cebadores que hibridan en sitios libres de islas CpG del promotor 1 del gen *shp-1* tratado con bisulfito de sodio se analizaron distintas combinaciones de los componentes de PCR aplicándose distintas estrategias de ciclado. Un esquema de ciclado con 3 bloques de temperatura de hibridación decreciente permitió la obtención del amplicón de 500pb coincidente con el esperado para el fragmento del promotor analizado.

PALABRAS CLAVE: epigenoma, tratamiento con bisulfito, PCR, *shp-1*.

INTRODUCCIÓN

La regulación epigenética incluye una serie de procesos que modifican la expresión génica pero que no conllevan modificaciones de la secuencia de DNA [1]. Estos cambios son heredables en el patrón de expresión de un gen de una célula a otra, aunque no de un individuo a otro [2]. Estas modificaciones topológicas del DNA incluyen adición covalente de grupos funcionales como metilos, acetilos y fosfatos, unión de proteínas al DNA y modificación de proteínas asociadas al DNA.

Los cambios epigenéticos tienen repercusiones en la regulación transcripcional modificando la expresión de genes, pudiendo contribuir al desarrollo de patologías como el cáncer, la esquizofrenia y el asma [1]. Muchos de estos cambios incluyen la metilación del DNA en regiones promotoras de genes, siendo una consecuencia importante la inactivación de genes supresores de tumores [2, 3].

La metilación es uno de los parámetros que regula la transcripción, estando asociada la hipermetilación del promotor con la ausencia de transcripción. Sin embargo, es uno de entre varios eventos reguladores que influyen en la expresión génica y es aplicable a ambas copias alélicas de un gen, aunque en ocasiones puede distinguir alelos maternos y paternos lo que daría diferencias en su expresión. [4]

La metilación suele ocurrir en el carbono 5 de las C precedidas por una G (islas CpG) y es catalizada por DNA metiltransferasas utilizando S–adenosil–metionina como dador de grupos metilos [2, 5]. Esta distribución de dinucleótidos CpG en el genoma es particular y el proceso de metilación podría ser necesario, pero no suficiente, para regular la trascripción de un gen [4].

En la actualidad existen pruebas que demuestran la importancia del control epigenético en el desarrollo del cáncer, observándose alteraciones en los patrones de metilación de

genes relacionados con procesos de diferenciación, control del ciclo celular y adhesión [6–10].

Existen varias estrategias experimentales para evaluar la metilación de distintas zonas del genoma, siendo de especial interés las regiones promotoras [5]. Dos de las técnicas más utilizadas son la digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación y la PCR metilación específica (MS–PCR). Sin embargo, en algunos casos el perfil de hipermetilación de las regiones promotoras es característico para cada tipo de cáncer, mientras que en otros se han observado perfiles similares o asociados a algún tipo de tejido [9]. En este sentido, las metodologías citadas permiten tener una visión parcial del estado de metilación, siendo conveniente la secuenciación del genoma tratado con bisulfito de sodio la técnica más sensible y específica para establecer el patrón de metilación de determinadas regiones génicas.

Nephew y Huang [10] proponen un modelo que intenta explicar la influencia de la metilación en la iniciación y progresión del cáncer. Normalmente existen algunas islas CpG que se encuentran protegidas contra la metilación aberrante, este modelo propone la pérdida de esta protección y la metilación *de novo* ocurriría progresivamente en los sitios flanqueantes a estas islas, lo que resultaría en el silenciamiento del gen correspondiente. Esta metilación se expandiría luego a otros *loci* importantes en estados más avanzados de un cáncer aumentando la densidad de metilación. De esta manera se plantea un progresivo cambio en el patrón de metilación durante el avance del tumor que tendría, como consecuencia, una alteración en el patrón de expresión génico. Por esta razón es importante establecer el patrón completo de metilación de una región génica.

A pesar de la relevancia del estudio de las regiones metiladas en muchos procesos patológicos, tales como el cáncer, en la literatura no existen muchas publicaciones que reparen en las cuestiones metodológicas implicadas en la puesta a punto del proceso de metilación, de manera que permita su posterior replicación. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue estandarizar las condiciones metodológicas para la amplificación de una región del Promotor1 del gen *shp–1* luego de su tratamiento con bisulfito para posteriormente iniciar el proceso de clonación de la misma y su secuenciación con fines de caracterizar su estado de metilación en diferentes tejidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Dado que el objetivo del trabajo es la estandarización del método de amplificación de una porción del Promotor 1 para SHP–1 se trabajó con 2 tejidos de expresión diferencial para esta proteína: mucosa yugal y tejido sanguíneo.

Extracción de DNA

Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizó la modificación de la técnica de *salting out* descripta por Miller *et al* [11] agregando un paso adicional de purificación con acetato de potasio. El DNA obtenido fue resuspendido en agua estéril libre de nucleasas y posteriormente fue almacenado a –20 ºC hasta su utilización.

Modificación química de citosinas

El tratamiento del DNA con bisulfito de sodio provoca la desaminación de las citosinas no metiladas, generando uracilo. Esto se realizó según el protocolo descripto por Herman et al [5] con una modificación en la metodología de purificación, que en este caso se realizó con el sistema DNA PURIFICATION KIT #K0513 (Fermentas). Para detener la desulfonación se adicionó NaOH 3 M. El DNA fue precipitado con 0,5 mL de isopropanol durante toda la noche a 4 ºC, se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, se lavó con etanol 70 % v/v y se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas, almacenándoselo a –20 ºC hasta el momento de su utilización.

Diseño bioinformático de cebadores

Para el diseño de los cebadores se utilizó la secuencia de GeneBank AB079851. Los cebadores fueron diseñados manualmente utilizando las secuencias modificadas en todas las citosinas y posteriormente analizados mediante los programas para diseño y análisis de cebadores Vector NTI 10.3.0 de Invitrogen Corporation y FastPCR 3.6.68 (Ruslan Kalendar, Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland).

Amplificación por PCR

Las amplificaciones mediante PCR se realizaron utilizando buffer de PCR 1X conteniendo KCl o $(NH_4)_2SO_4$, 200 µM dNTPs, y cantidades variables de cada cebador (OPERON Biotechnologies), $MgCl_2$ y Taq polimerasa (Fermentas). En todos los casos se utilizaron 50 ng de DNA. Para cada una de las combinaciones resultantes se aplicaron distintas estrategias de ciclado consistentes en amplificaciones de T decreciente tipo *touch down* (Sambrook & Russell, 2001). (Tabla 1)

Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 2 % p/v, teñidos con bromuro de etidio 10 mg/ml, visualizados bajo luz ultravioleta y fotografiados con cámara digital Acer CS–5531.

En los casos en los que se logró el perfil de amplificación deseado se realizaron geles desnaturalizantes de polia-

Tabla 1: Combinaciones analizadas en la mezcla de PCR para la amplificación del promotor metilado

Tratamiento	A1 B1	A2 B2	A3 B3	A4 B4	C1 D1	C2 D2	C3 D3	C4 D4	E1 F1	E2 F2	E3 F3	E4 F4
Buffer	KCl o (NH4)2SO4											
Mg_2Cl	1,5 mM				3 mM				6 mM			
Cebadores	10 pmol		20 pmol		10 pmol		20 pmol		10 pmol		20 pmol	
Taq pol	0,5 U	1 U	0,5 U	1 U	0,5 U	1 U	0,5 U	1 U	0,5 U	1 U	0,5 U	1 U
dNTP's	En todos los casos se usaron 200 µM											
DNA	En todos los casos se usaron 50 ng											

Nota: Los tratamientos A, C y E corresponden al buffer con KCl; los tratamientos B, D y F corresponden al buffer $(NH_4)_2SO_4$.

crilamida al 12 %. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata y digitalizados mediante HP Desjekt F380. De estos geles se recortaron las bandas de tamaño adecuado y se resuspendieron en agua libre de DNasas para su posterior clonación y secuenciación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuenciación bisulfito es el método de referencia para verificar la presencia de cambios puntuales en el patrón de metilación, sin embargo un punto crucial de esta metodología es la estandarización de la amplificación del promotor tratado con bisulfito. Habitualmente el tratamiento produce una gran cantidad de fragmentos de DNA por la agresividad química del mismo. Simultáneamente se produce un desequilibrio en el contenido de GC lo que genera regiones ricas en A y T, con la consecuente disminución de la especificidad de las secuencias. Todos estos inconvenientes repercuten en problemas de amplificación, siendo necesaria una adecuada estandarización de las condiciones de PCR. Esto implica el análisis pormenorizado del proceso paso a paso, detallándose a continuación los resultados para cada uno:

Diseño de cebadores

Con el fin de amplificar todo el promotor de manera independiente de su metilación se diseñaron 4 cebadores, 2 sentidos y 2 antisentidos que hibridarían en el promotor luego del tratamiento con bisulfito abarcándose un total de 36 sitios CG que hipotéticamente podrían presentar cambios en su estado de metilación. El par denominado SP1 amplificaría la secuencia más alejada del punto de origen de la replicación entre -847 y -351, mientras que el par denominado SP2 amplificaría la secuencia más próxima incluyendo el nucleótido +1 (-403 a +214). En ambos casos se eligieron zonas libres de islas CpG (Figura 1) y se analizaron las características termodinámicas de los cebadores a fin de evitar la formación de dímeros y la autocomplementariedad (Tabla 2). El análisis bioinformático no evidenció problemas de autocomplementariedad del los cebadores ni formación de dímeros.

Tabla 2: Características de los cebadores diseñados

Nombre	Secuencia	Ta	Tamaño del amplicón
SP1–S	5′ GGT TTT TAG GAG AAG GGT TGA T	50,3	496 pb
SP1–AS	5′ ATA CAA ACC CAC CCA CCC A	52,1	
SP2–S	5′ GGT TGA GAG GTT GGA GTG GGT	54,3	617 pb
SP2–AS	5′ TCC CTC CAA AAC TAA CAA AAA ACT	52,6	

Estandarización de la PCR

Todos los componentes de la mezcla de amplificación representan variables a ser consideradas al estandarizar una PCR. Sin embargo, algunas de las variables pueden mantenerse constantes dado su menor influencia. En este trabajo se planificaron cambios en el tipo de tampón utilizado y en las concentraciones de Mg_2Cl, cebadores y polimerasa, diseñándose una combinatoria de reacciones (Tabla 1) obteniéndose los mejores resultados con el tratamiento C3. El esquema de ciclado fue otro de los parámetros evaluados, analizándose distintas estrategias, resumidas en la Tabla 3.

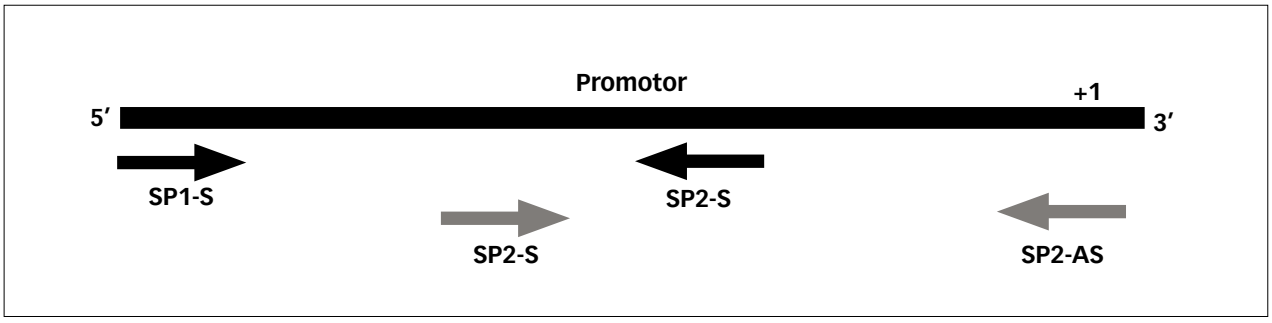


FIGURA 1. Estrategia utilizada para el diseño de cebadores. Referencias: SP1-S: cebador sentido para el fragmento SP1; SP1-AS: cebador antisentido para el fragmento SP1; SP2-S: cebador sentido para el fragmento SP2; SP2-AS: cebador antisentido para el fragmento SP2.

Tabla 3: Estrategias de ciclado utilizadas

Estrategia	Ciclado	Nº de ciclos	Resultado
1	94 ºC 20 s; 58 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	6	NO
	94 ºC 20 s; 56 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	6	
	94 ºC 20 s; 54 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	6	
	94 ºC 20 s; 52 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	6	
	94 ºC 20 s; 50 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	20	
2	94 ºC 20 s; 62 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	6	NO
	94 ºC 20 s; 60 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	6	
	94 ºC 20 s; 58 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	6	
	94 ºC 20 s; 56 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	6	
	94 ºC 20 s; 54 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	20	
3	94 ºC 20 s; 54 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	12	NO
	94 ºC 20 s; 52 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	12	
	94 ºC 20 s; 50 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	20	
4	94 ºC 20 s; 58 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	10	SI
	94 ºC 20 s; 56 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	15	
	94 ºC 20 s; 54 ºC 20 s; 72 ºC 20 s	20	

Únicamente se logró obtener el amplicón buscado de 500 pb para SP1 con esquemas de ciclado consistentes en 3 segmentos de distintas temperaturas de *anneling*: 58 ºC, 56 ºC y 54 ºC, habiéndose realizado diferentes variaciones en el número de ciclos de cada segmento (Figura 2).

Como puede observarse, en ningún caso se obtuvo un único amplicón, pudiendo ser esto consecuencia de la inespecificidad de las regiones de hibridación luego del tratamiento con bisulfito. Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó el ciclado que permitió obtener el amplicón de 500 pb con la menor cantidad de otros amplicones inespecíficos, es decir segmentos de temperatura de hibridación decreciente con 12 ciclos a 58 ºC, 12 ciclos a 56 ºC y 20 ciclos a 54 ºC.

Considerando que este protocolo de amplificación será utilizado para obtener amplicones para luego purificarlos, clonarlos y secuenciarlos, se separaron 10 muestras tratadas con bisulfito y amplificadas en geles de poliacrilamida (Figura 3), se recortaron las bandas y se reamplificó el producto obtenido para certificar la única presencia del amplicón deseado (Figura 4). Los resultados positivos obtenidos con estos dos últimos experimentos demuestran la utilidad de la estrategia planteada al poner a punto la amplificación.

CONCLUSIONES

Se diseñaron dos pares de cebadores (SP1 y SP2) que hibridan en sitios libres de islas CpG del promotor 1 del

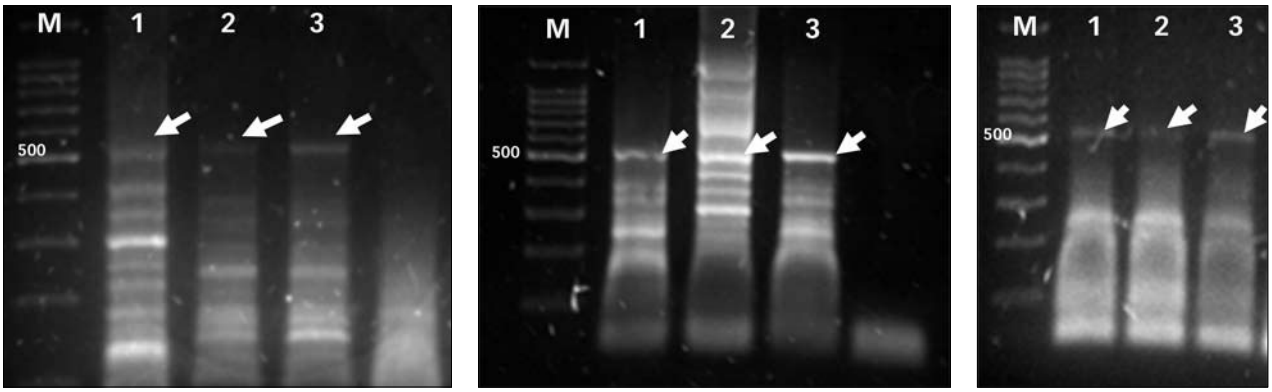


FIGURA 2. Amplificación mediante el tratamiento C3 del fragmento SP1 con un esquema de ciclado consistente en 94 ºC por 20 s, Ta (temperatura de anneling) variable por 20 s, 72 ºC por 20 s; siendo la Ta en cada caso de: A) 58 ºC (10 ciclos), 56 ºC (15 ciclos) y 54 ºC (20 ciclos). B) 58 ºC (20 ciclos), 56 ºC (12 ciclos) y 54 ºC (12 ciclos). C) 58 ºC (12 ciclos), 56 ºC (12 ciclos) y 54 ºC (20 ciclos). M: marcador de peso molecular; 1 y 2: sangre; 3: mucosa. C: control negativo.

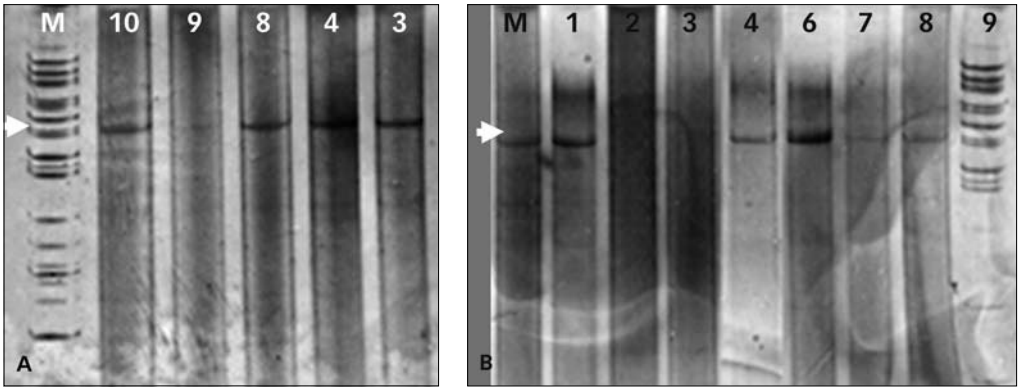


FIGURA 3. Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12%. Las muestras de DNA extraído a partir de sangre fueron amplificadas mediante el tratamiento C3 del fragmento SP1 con un esquema de ciclado de 58ºC (12 ciclos), 56ºC (12 ciclos) y 54ºC (20 ciclos). Se indica el marcador de peso molecular (M) y los números correspondientes a cada una de las muestras. A y B corresponden a dos experimentos distintos.

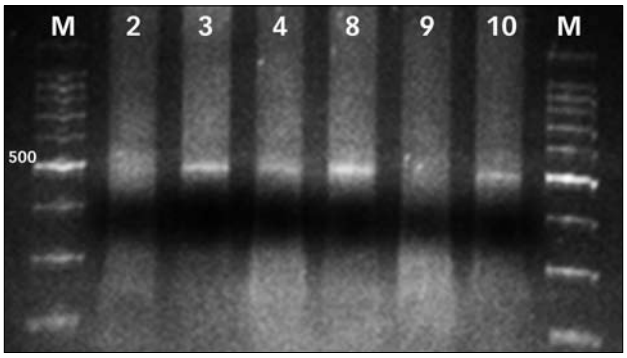


FIGURA 4. Reamplificación mediante tratamiento C3 de los amplicones obtenidos a partir del PAGE (Figura 5).

gen *shp–1* tratado con bisulfito de sodio.

La utilización de un esquema de ciclado con 3 bloques de temperatura de hibridación decreciente con la mezcla de PCR C3 permitió la obtención de un amplicón de 500 pb coincidente con el esperado para el fragmento SP1 del promotor metilado y permitió su aislamiento a partir de geles de poliacrilamida y posterior reamplificación.

BIBLIOGRAFÍA

1. NEISSA J., GUERRERO C. *Actualización del Código Genético al Código Epigenético: nuevas estrategias terapéuticas.* Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Coloma, 52(4): p. 287–230. 2004.

2. HERMAN G., BAYLIN M. *Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation.* N. Engl. Med., 349: p. 2042–2054. 2003.

3. BAYLIN S. *Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencin in cancer*. Cancer Biology, 12: p. 331–337. 2002.

4. HSIEH CH. *Dynamics of AND methylation pattern.* Genetics & Development, 10: p. 224–228. 2000.

HERMAN J., GRAFF J., MYOHANEN S., NELKIN B., BAYLIN S. *Methylation–Specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: p. 9821–9826. 1996.

5. MELKI J., CLARK S. *DNA methylation changes in leukemia*. Cancer Biology. 12: p. 347–357. 2002.

6. YANG Y., TAKEUCHI S., HOFMAN W., IKEZOE T., VAN DONGEN J., SZSZEPAMSKI T., BARTRAM C., YOSHINO N., TAGUCHI H., KOEFFLER P. *Aberrant Methylation in promoter–assocaited CpG islands of multiples genes in acute lymphoblastic leukemia*. Leuk Res. 30(1): p. 98–102. 2006.

7. TAKAHASHI T., SHIVAPURKA N., RIQUELME E., SHIGEMATSU H., REDDY J., ZHOU X., BEKELE N., GAZDAR A., WISTUBA I. *Aberrat promoter Hypermethylation of múltiple genes in Gallbladder Carcinoma and Chronic Cholecystitis*. Clinical Cancer Res. 10: p. 6126–6133. 2004.

8. ESTELLER M., CORN P., BAYLIN S., HERMAN J. *A gene hypermethylation profile of human Cancer.* Cancer Res. 61: p. 3225–3229. 2001.

9. NEPHEW K., HUANG T. *Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression.* Cancer Letters, 190: p. 125–133. 2003.

10. MILLER S.A., DYKES D.D. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* Nuc. Ac. Res. 16: p. 1215. 1988.

Recibido: 19/10/07.
Aprobado: 04/08/08.

- Martín E. Giorgio
Es alumno avanzado de la Licenciatura en Genética. Se desempeña actualmente como Investigador Auxiliar en el proyecto acreditado 16Q361. Ha participado en calidad de tesista del desarrollo del proyecto subsidio de la ANPCyT (PICT 05–15058) y participa también de otros proyectos relacionados con desarrollos biotecnológicos. Es Auxiliar de Segunda en las Cátedras de Biología Celular y Molecular (Bioquímica) y Biotecnología Molecular (Ingeniería Química, Bioquímica y Farmacia). Posee 4 publicaciones en revistas indexadas.

- Bárbara J. Chaneton
Es alumno de 4º año de la Licenciatura en Genética. Se desempeña actualmente como Auxiliar en el proyecto acreditado 16Q361. En el marco de este proyecto posee 1 publicacion en la revista BAG y ha presentado trabajos en las Jornadas de Ciencia y Tecnología de la FCEQyN.

- Pedro D. Zapata
Es Doctor por la Universidad de Alcalá de Henares, en el programa Biomedicina. Se desempeña actualmente como Profesor Regular Adjunto en las Cátedras de Biología Celular y Molecular (Bioquímica), Genética Molecular (Lic. en Genética), Biología Celular (Lic. en Genética) y Biotecnología Molecular (Ingeniería Química, Bioquímica y Farmacia). Posee actualmente la Categoría III en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes–Investigadores. En el área de Biomedicina ha sido beneficiario de un subsidio de la ANPCyT (PICT 05–15058) y actualmente dirige proyectos acreditados en el CIDET. Posee 37 publicaciones en revistas indexadas y 25 presentaciones a congresos.

Cátedra de Biología Celular y Molecular (Bioquímica), Módulo de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. Posadas, Misiones, Argentina. Av. Mariano Moreno 1375. Posadas, Misiones, Argentina (3300). bcmb@fceqyn.unam.edu.ar.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 11 / Nº 12 / 2009 / 9–16

Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (sw.: Fr.) Kreisel

César A. Preussler, Ernesto Shimizu; Laura L. Villalba; Pedro D. Zapata.

Copper laccase induction in white rot fungi *Trametes villosa* (Sw.: Fr.) Kreisel

ABSTRACT

White rot fungi hold great interest for biotechnological applications being at the same time able to produce extracellular enzymes like laccase. Laccase is a phenoloxidase with molecular weight between 60 and 80 kDa, with gene inducible expression probably reflecting the different physiological functions of the enzyme. The present work was focused on the dye oxidizing capacity of *T. villosa* BAFC 2755 in solid media (discoloration tests) and the effect of $CuSO_4$ as inductor on the enzyme secretion capacity and genetic expression in liquid media.

Discoloration tests in solid media showed good degrading capacity against bromophenol blue, malachite green and black liquor at low pH. Enzyme activity tests from liquid media confirmed extracellular laccase production induced with $CuSO_4$. Total secreted proteins showed a significant increase in the presence of $CuSO_4$. SDS–PAGE showed an increase in the protein fraction between 60 and 70 kDa. mRNA levels showed a clear increase in the presence of the inducer.

The results showed that the Cu_2+ produced an increase on laccase activity in Trametes villosa. This rise could be due to an increase in the protein and mRNA

KEY WORDS: white rot fungi, *Trametes villosa*, laccase, enzyme induction, copper.

RESUMEN

Los hongos de pudrición blanca presentan interés en aplicaciones biotecnológicas y son capaces de producir enzimas extracelulares como lacasa. La lacasa es una fenoloxidasa, con peso molecular entre 60 y 80 kDa, cuya expresión génica puede ser inducible, reflejando probablemente las diferentes funciones fisiológicas de esta enzima. Este trabajo se enfoca en la capacidad oxidativa de colorantes en medio sólido de *T. villosa* (ensayos de decoloración) y en el efecto del $CuSO_4$ como inductor sobre la capacidad de secreción enzimática y la expresión génica de lacasa en *Trametes villosa* BAFC 2755 en medio líquido.

Los ensayos de decoloración en medio sólido mostraron una excelente capacidad degradativa frente a azul de bromofenol, verde de malaquita y licor negro a pH ácido. Los ensayos de actividad enzimática confirmaron la producción de lacasa extracelular inducible con $CuSO_4$. Las proteínas totales secretadas mostraron un incremento significativo en presencia de $CuSO_4$, observándose en SDS–PAGE un aumento de la fracción proteica entre 60 y 70 kDa. Los niveles de mRNA mostraron un claro incremento en presencia del inductor.

Estos resultados demuestran que el Cu^{2+} produce un incremento de la actividad lacasa en *Trametes villosa,* y que este aumento podría deberse a un aumento en la cantidad de proteína y mRNA.

PALABRAS CLAVE: Hongos de pudrición blanca, *Trametes villosa*, lacasa, inducción enzimática, cobre.

INTRODUCCIÓN

La contaminación es la introducción en un medio cualquiera de una sustancia o forma de energía con potencial para provocar daños, irreversibles o no, en el medio inicial. [1].

Recientemente han surgido aplicaciones biotecnológicos con potencial aplicación contra las fuentes de contaminación de una manera ecoeficiente, e incluyen el uso de bacterias u hongos, a menudo en combinación con procesos fisicoquímicos [2–6].

Los hongos son reconocidos por sus aptitudes superiores para producir una gran variedad de proteínas extracelulares, ácidos orgánicos y otros metabolitos, y por su capacidad para adaptarse a medios ambientes severos, sin restricciones [7]. Más allá de la producción de tales metabolitos, los hongos han llamado la atención con creciente interés por el biotratamiento (eliminación o destrucción) de ingredientes de aguas contaminadas tales como metales, nutrientes inorgánicos y componentes orgánicos [8–11].

La lignina, un polímero heterogéneo de los tejidos vasculares de las plantas superiores, es el más recalcitrante de todos los químicos orgánicos producidos naturalmente [12, 13]. Cualquier enzima o grupo de enzimas capaces de atacar inicialmente la lignina, deben ser además de extracelulares, inespecíficas. Los hongos degradadores de

lignina son buenos productores de estas enzimas y pueden ser clasificados dentro de tres categorías basadas en el tipo de descomposición de la madera que producen: hongos de pudrición blanca, hongos de pudrición marrón y hongos de pudrición blanda [14].

Los hongos de pudrición blanca son los que presentan el principal interés para ser usados en varios procesos utilizando lignocelulosa, pero la mayoría degradan también a la celulosa y a la hemicelulosa [15–17]. Esta propiedad está basada en la capacidad de producir enzimas extracelulares con baja especificidad de sustrato capaces de degradar un amplio rango de componentes xenobióticos [18]. Las enzimas más importantes son lacasa (Lac), manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) [15].

Algunos de los hongos de pudrición blanca producen todas estas enzimas, mientras que otros hongos producen únicamente algunas de ellas [15].

La lacasa es una fenoloxidasa, enzima que cataliza la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando el oxígeno molecular como aceptor de electrones, reduciéndolo a agua [19]. A través de la utilización de ciertos compuestos rédox puede ser capaz de ampliar su espectro de sustratos, logrando así la oxidación de porciones no fenólicas de la lignina [20]. Contienen átomos de cobre y se encuentra ampliamente distribuida en las plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias [21]. La actividad de estas enzimas puede ser incrementada por el uso de mediadores como el ABTS (2,2'–azino–bis[3–etilbenztiazolina–6–ácido sulfónico]), e intermediarios de la degradación de la lignina entre los que se encuentra el alcohol veratrílico [22–23], así como iones metálicos como Mn^{+2} para la enzima MnP y Cu^{+2} para la enzima Lac [21].

Todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares con pesos moleculares entre 60 y 80 kDa, de los cuales entre el 15 al 20% de su peso molecular está dado por carbohidratos [24]. La lacasa fúngica (bencendiol–oxígeno oxidorreductasa) es una fenoloxidasa extracelular producida por el micelio de los hongos ligninolíticos [25].

La utilización de sistemas lacasa–mediador es una alternativa promisoria para procesos biotecnológicos con aplicaciones ambientales. Entre ellos, los de blanqueo de la pulpa de papel [25], la decoloración de colorantes textiles [26] y la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos [27, 28].

La regulación de la expresión de genes de la lacasa difiere de un organismo a otro, reflejando probablemente las diferentes funciones fisiológicas de estas enzimas en los hongos. La expresión de genes de lacasa en algunos hongos puede ser estimulada por inductores, mientras que en otros, la expresión es sensible a las condiciones del medio de cultivo y es afectada por las concentraciones de nitrógeno, fuentes de carbono o presencia de oligoelementos. [29–35].

El objetivo del presente trabajo es analizar el efecto del cobre como inductor en la producción de la enzima Lacasa del hongo *Trametes villosa* (Sw.: Fr.) Kreisel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

En este estudio se utilizó el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* BAFC 2755 proveniente del cepario del Laboratorio de Biotecnología Molecular (previamente cedidos gentilmente por el Departamento de Micología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires).

Preparación de los tacos

Para la preparación de tacos se utilizaron cultivos primarios en medio agar/extracto de malta (MEA), en placas de Petri de 100 mm de diámetro, las cuales fueron inoculadas por punción con ansa aguja en el centro de la placa, con el microorganismo en estudio. Se dejó incubar durante 5–7 días a 29 ± 1 ºC en estufa. Este tiempo fue suficiente para obtener la colonia destinada a la generación de tacos para la siembra de todos los experimentos.

Los tacos de agar con micelio se extrajeron a partir de los márgenes de la colonia en crecimiento con la ayuda de un sacabocados de metal, de forma cuadrangular de 36 mm^2 de diámetro. Los tacos obtenidos de este modo fueron utilizados para la inoculación de los medios de cultivo sólidos así como también para los medios de cultivo líquidos.

Medios de cultivo sólido

Los medios de cultivo sólidos utilizados para los ensayos fueron agar malta glucosado (AMG: extracto de malta 12,7 g/L; agar 20 g/L y glucosa 10 g/L) y agar licor negro glucosado (LN: agar 20 g/L; glucosa 10 g/L; licor negro 6,7 % v/v; pH 11 y pH 4,7). El licor negro fue obtenido en la planta piloto de la FCEQyN (UNaM) a partir de la cocción kraft de maderas de eucalipto. Los colorantes utilizados para los ensayos en los medios sólidos fueron el verde de malaquita y el azul de bromofenol a 50 µM. [36, 37]

Los ensayos en medio de cultivo líquido se llevaron a cabo en erlenmeyers de 250 mL de capacidad a los cuales se les adicionó 50 mL de medio compuesto por 12,7 g/L de extracto de malta, 0,5% de concentrado soluble de maíz y agua destilada. Estos medios fueron inoculados e incubados a 29 ± 1 ºC en estufa de manera estática durante un período de tiempo comprendido entre 5, 7, 10 y 14

días, en todos los casos por duplicado. En cada uno de los días antes mencionados se procedió a la separación del micelio del medio de cultivo líquido por medio de filtración mediante Büchner, con filtros de fibra de vidrio (GF/C) previamente secados en estufa a 80 ºC durante 30 minutos, en cada filtración se utilizaron 5 mL de agua destilada para enjuagar. Los sobrenadantes fueron congelados y posteriormente utilizados para la determinación de la actividad enzimática. Los micelios resultantes de la filtración fueron congelados para luego proceder a la extracción de ADN de los mismos.

Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática para lacasa se realizó a partir de los sobrenadantes congelados obtenidos por filtración. La determinación se basó en el cambio de absorbancia del sustrato DMP (2,6–dimetoxifenol) adicionado a cada muestra, evidenciado mediante la utilización de un espectrofotómetro *8500 II Techcomp* siguiendo técnicas descriptas por Mouse *et al* [38]. La actividad enzimática se expresa en Unidades Internacionales (UI): µmoles/min x mL. Una UI es equivalente a 1 µmol de producto formado o sustrato degradado, por minuto.

Medición de proteínas totales

Para la medición de las proteínas totales de las muestras se utilizó la técnica de Bradford (Bio–Rad Protein Assay) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Electroforesis en poliacrilamida

Las proteínas procedentes de los filtrados fueron separadas por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS–PAGE) a 150 V por 45 min en geles con una concentración del 10 % en poliacrilamida utilizando el sistema MiniProtean 3D de Biorad. Los resultados se visualizaron mediante tinción con plata y se registraron mediante Scanner HP Deskjet F300 All–in–One series.

Extracción de ADN

Para proceder a la extracción del DNA se utilizaron los micelios congelados que fueron obtenidos anteriormente por medio del filtrado de los medios líquidos. Estos micelios fueron trozados y macerados con nitrógeno líquido hasta obtener un fino polvo. Luego se procedió a la digestión durante 45 a 60 minutos a 65º C en buffer conteniendo TrisHCl 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, SDS 1 %, CTAB 1 % y proteinasa K 0,1 mg /mL. Se purificó con cloroformo–isoamílico 24:1 y acetato de potasio 3 M frío, para posteriormente precipitarlo con isopropanol y etanol al 70 %. Luego de redisolverlo en agua destilada estéril, se lo conservó a –20º C hasta el momento de su utilización.

Para corroborar la calidad, el material genético fue evaluado mediante espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

Aislamiento de RNA total

Para el aislamiento de RNA total el micelio filtrado se lavó 2 veces con Tris 0,1 M, EDTA 0,02 M en frío y posteriormente se digirió 20 min con buffer de lisis (GuSNC 4 M, Tris 0,1 M, EDTA 0,02 M Tritón X 100 1 %) disgregando el micelio con varilla estéril en frío. Posteriormente se purificó con fenol saturado en TE y cloroformo. Las proteínas se precipitaron con acetato de potasio 3 M y el RNA fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol absoluto, secado y resuspendido en agua estéril libre de RNasas. Para corroborar la calidad del RNA aislado se realizaron geles de agarosa al 0,8 %.

RT

La retrotranscripción se realizó en un volumen de 20 µl utilizando 1 µl de Oligo (dT), dNTP´s 5 mM, 40u/ µl de RNAsin y 1000 U de la enzima MMLV (Fermentas SRL) siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo durante 60 min a 42 ºC. Todas las muestras fueron previamente digeridas con RQ1 DNAsa 1µl por µg de RNA.

Amplificación de un fragmento génico por medio de la técnica PCR

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR) se utilizaron 10 *p*moles de cada cebador (sentido y antisentido), 10 mM de dNTPs, 1,5 mM de Cl_2Mg y 1 U de Taq Polimerasa en buffer al 1 x, además de agua deionizada para llevar a volumen de reacción deseado. El programa de ciclado utilizado fue el siguiente: un ciclo a 94 ºC por 2 min; 35 ciclos de 15 s a 94 ºC, 56 ºC y 72 ºC respectivamente, y finalmente 2 min a 72 ºC como paso de finalización de la reacción. Los resultados de la amplificación fueron corroborados por electroforesis en geles de agarosa a una concentración del 2 % utilizando una cuba electroforética (Sub System 70 de Labnet International Inc.), teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) y fotografiados con cámara digital marca ACER.

Los cebadores utilizados en esta técnica fueron los publicados por D´Souza *et al*., 1996, para las lacasas de otros basidiomicetes [39]:

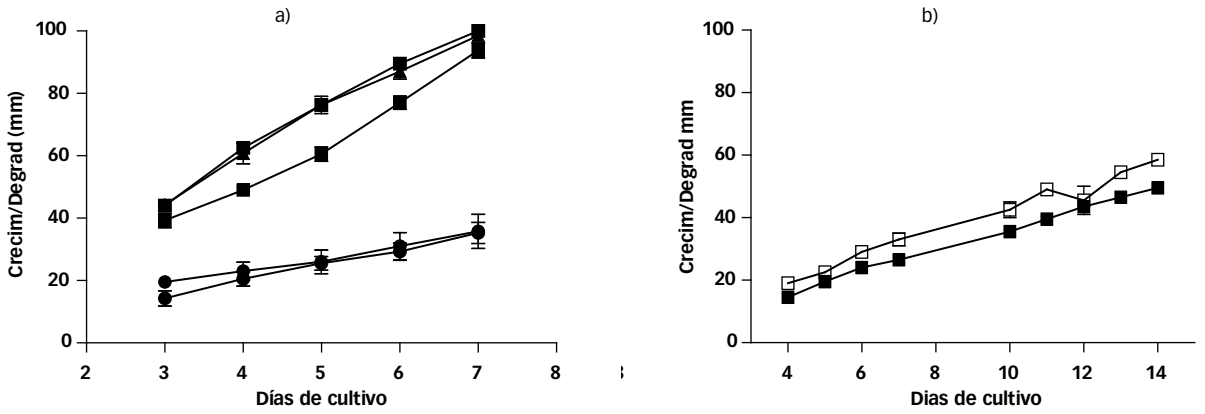


FIGURA 1: Referencias: a) Curva de crecimiento-decoloración en medio agar malta glucosado, (-■-) decoloración en presencia de azul de bromofenol, (-□-) crecimiento en presencia de azul de bromofenol, (-●-) decoloración en presencia de verde de malaquita, (-○-) crecimiento en presencia de verde de malaquita, (-▲-) crecimiento en ausencia de colorantes. b) Curva de crecimiento (-■-) y decoloración (-□-) en medio sólido con licor negro a pH ácido. En todos los casos las mediciones fueron tomadas entre los días 3 y 14. Se grafica el promedio de dos experimentos similares realizados por duplicado.

LacA – sentido 5`– CAYTGGCAYGGNTTYTTYCA
LacA – antisentido 5`– RTGRCTRTGRTACCARAANGT

Las bandas amplificadas con los cebadores degenerados fueron purificadas, secuenciadas y analizadas mediante el programa BLASTn.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para verificar la capacidad oxidativa del hongo *Trametes villosa,* se realizaron primeramente ensayos de decoloración en medio sólido. Estos experimentos mostraron una excelente capacidad degradativa de *Trametes villosa* frente a azul de bromofenol, verde de malaquita (Figura 1 A) y licor negro a pH ácido (Figura 1 B).

El crecimiento en presencia de azul de bromofenol fue similar al del control sin colorante, mientras que en el caso del verde de malaquita se observó una notable inhibición del crecimiento respecto al control desde el 3º día de crecimiento ($p<0,001$). Sin embargo, solo el azul de bromofenol permitió distinguir diferencias significativas entre crecimiento y degradación a los primeros días de cultivo ($p<0,01$), desapareciendo estas diferencias al 7º día, probablemente debido a la confluencia de placa.

En el ensayo realizado con el efluente licor negro tanto el crecimiento como la degradación mostraron diferencias significativas respecto al control ($p<0,1$).

Estos resultados son comparables a los mencionados en trabajos anteriores por nuestro grupo de investigación utilizando otras especies de hongos de pudrición blanca, *Ganoderma applanatum* [36] y *Peniophora* spp [37] como así también en trabajos llevados a cabo por Haglund *et al.*, 2002 [40].

Los resultados de decoloración en medio sólido conteniendo licor negro solo mostraron decoloración en condiciones ácidas indicando que el pH es uno de los parámetros a considerase en el escalado al aplicar este hongo a desechos industriales.

Los ensayos de actividad enzimática para lacasa confirmaron que *T. villosa* produce lacasa de manera extracelular con un máximo de 81 U/L a los 10 días de cultivo sin estimulación en medio líquido malta glucosado. Al suplementar el medio con 1 mM de $CuSO_4$ se produjo un incremento de la actividad enzimática, alcanzando valores 10 veces superiores en comparación con el obtenido en condiciones sin inductor a iguales tiempos de cultivo (Figura 2).

Otros hongos también muestran inducción de la actividad lacasa en presencia de cobre. Mouso *et al.,* 2003 [38], observaron un incremento de la actividad lacasa en el hongo de pudrición blanca *Stereum hirsutum,* utilizando $CuSO_4$. Otros resultados concordantes en cuanto al aumento de la actividad enzimática de lacasa también han sido descriptos por Haglund *et al.*, 2002 [40], con el hongo

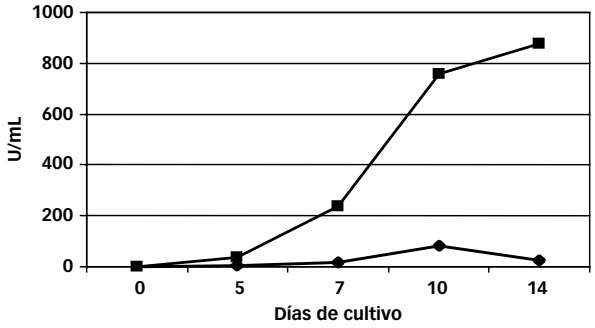


FIGURA 2: Niveles de actividad enzimática de Lacasa en función del tiempo en presencia (-■-) y ausencia (-●-) del 1 mM de $CuSO_4$.

Trametes trogii. En contraposición a nuestros resultados, trabajos llevados a cabo por Gómez Dorado *et al.,* 2005 [41], no han podido correlacionar el efecto del $CuSO_4$ como inductor de la actividad enzimática de lacasa en el hongo *Trametes versicolor*, atribuyendo dicha observación a la naturaleza del efluente utilizado en su trabajo además de la presencia de otras enzimas con actividad oxidativa como manganeso peroxidasa (MnP).

Existe evidencia de la presencia de promotores sensibles a metales en genes de enzimas ligninolíticas [31, 33]. Sin embargo, los metales también pueden actuar estabilizando el mensajero o activando el procesamiento, tráfico y plegamiento proteico [42]. Algunos trabajos sugieren la presencia de isoenzimas de lacasa de respuesta diferencial ante iones metálicos. Yaver *et al.,* 1995, han reportado dos isoenzimas correspondientes a lacasa, de unos 63 kDa, una de expresión constitutiva y la otra de expresión inducible [33]; mientras que Han *et al.,* 2005, en *Trametes versicolor*, solo han podido aislar una lacasa constitutiva de un tamaño aproximado a los 97 kDa [43].

Para determinar el comportamiento de los hongos estudiados, se evaluó el efecto del agregado de $CuSO_4$ sobre las proteínas secretadas y sobre el mRNA.

Los niveles de proteínas totales secretadas mostraron un incremento significativo en presencia de $CuSO_4$ (Figura 3A). Al visualizarse este incremento en geles de SDS–PAGE se observa un aumento de la fracción proteica comprendida entre 60 kDa y 70 kDa aproximadamente, rango de peso dentro del cual se encuentran las isoenzimas de lacasa publicadas en la literatura (Figura 3 B).

Para evaluar los niveles de mRNA producidos se utilizaron cebadores degenerados para lacasa y se ajustaron las condiciones de la RT–PCR utilizando diferentes cantidades de RNA total de partida de modo que permita diferenciar un cambio de expresión del mensajero buscado. Para verificar si el producto de amplificación correspondía efectivamente a un fragmento del gen de lacasa se aisló DNA, se amplificó, secuenció y analizó mediante el programa BLASTn, comprobándose una homología del 80 % con la secuencia génica L49376 publicada para lacasa de *Trametes villosa* (clon LCC1).

Secuencia obtenida:

TCGTGACCAGTGCCCGATCTCGCTCGGGNA-ATTCGTTCCTGTCACAATTTCCCGGTTCCT-GACCAGGCNGGTAAGNGCGCCTCGTA

El análisis de los productos de amplificación obtenidos partiendo de DNA y RNA mediante el uso de estos cebadores degenerados también permitió visualizar el intrón de 50 pb publicado por Yaver *et al.,* 1995 (datos no mostrados). [33].

Una vez comprobada la identidad del amplicón hallado, para la técnica de RT–PCR se utilizaron las muestras de RNA total extraídas correspondientes a los días 5, 7, 10 y 14 de cultivo con y sin tratamiento con $CuSO_4$ 1mM visualizándose un claro incremento en la producción de mensajeros ante la presencia del inductor desde el día 5, e intensificándose a días posteriores de cultivo. (Figura 4)

CONCLUSIONES

Los ensayos de decoloración en medio sólido demostraron ser un método eficiente para develar la capacidad degradativa del hongo estudiado.

Los ensayos de actividad enzimática confirmaron que el hongo *Trametes villosa* BAFC 2755 produce una enzima lacasa extracelular inducible con $CuSO_4$. Las proteínas totales secretadas mostraron un incremento significativo en presencia de $CuSO_4$, observándose en SDS–PAGE un aumento de la fracción proteica entre 60 y 70 kDa. Los niveles de mRNA mostraron un claro incremento en presencia del inductor.

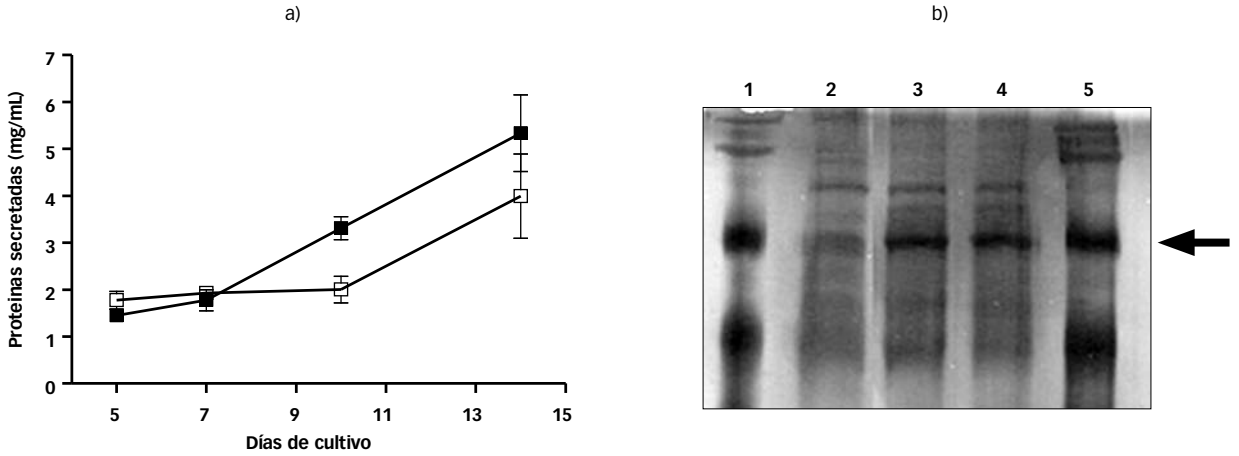


FIGURA 3: Referencias: a) proteínas totales en función del tiempo en presencia (-■-) y ausencia (-□-) de 1 mM de $CuSO_4$; b) SDS–PAGE. Carril 1 y 5: marcador de peso molecular; carril 2 sin $CuSO_4$; carril 3 y 4 con 1 mM de $CuSO_4$. La flecha indica la banda correspondiente a 78 kDa aproximadamente. En todos los carriles se colocaron 20 µg de proteínas.

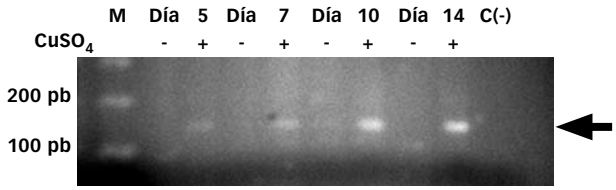


FIGURA 4: RT–PCR para un fragmento del gen lacasa. Las reacciones fueron llevadas a cabo con 3 ug de RNA total de partida aislado de cultivos de 5, 7, 10 ó 14 días con (+) o sin (–) tratamiento de 1 mM de $CuSO_4$. Referencias: M: marcador de peso molecular, C(–):control negativo (sin RNA). La flecha indica el amplicón de 150 pb esperado.

Estos resultados promisorios son un punto de partida para iniciar estudios que contemplen las aplicaciones de producción de la enzima lacasa a partir de hongos de pudrición blanca utilizando el cobre como inductor de su producción.

BIBLIOGRAFÍA

1. **NEVEL B., WRIGTH R.** Ciencias Ambientales. Banco Mundial. *La Contaminación Ambiental en la Argentina: Temas y Opciones para su Gestión.* Editorial Prentice Hall, 1999.
2. **MCMULLAN G., MEEHAN C., CONNELY A., KIRBY N., ROBINSON T., NIGAM P., *ET AL.*** *Mini–review: microbial decolourisation and degradation of textile dyes.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: p81–87, 2001.
3. **ROBINSON T., MCMULLAN R., NIGAM P.** *Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative.* Bioresour Technol 77: p247–255, 2001.
4. **BORCHERT M., LIBRA J.A.** *Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus Trametes versicolor in sequencing batch reactors.* Biotechnol. Bioeng. 75: p. 313–321, 2001.
5. **BEYDILLI M.I., PAVLOSTATHIS S.G., TINCHER W.C.** *Decolorization and toxicity screening of selected reactive azo dyes under methanogenic conditions.* Water Sci. Technol.; 38: p. 225–232, 1998.
6. **ZISSI U., LYBERATOS G.** *Partial degradation of p–aminobenzene by a defined mixed culture of Bacillus subtilis and Stenotrophomonas maltophilia.* Biotechnol. Bioeng. 72: p. 49–54, 2001.
7. **BOOMINATHAN K., REDDY C.A.** *Fungal degradation of lignin: biotechnological apllications. In.* Handbook of applied mycology. Vol. 4, p. 763–822. Ed. Arora D.K., Elander R.P., Mukerji K.G. Marcel Dekker, New York, 1992.
8. **MURUGESAN K.** *Bioremediation of paper and pulp mill effluents.* Indian J. Exp. Biol. 41: p. 1239–48, 2003.
9. **MACHADO K.M.G., MATHEUS D.R., BONONI B.L.R.** *Ligninolytic enzymes production and Remazol brilliant blue R decolorization by tropical brazilian basidiomycetes fungi.* Braz. J. Microbiol. 36: p. 246–252, 2005.
10. **PALMA C., MOREIRA M.T., MIELGO I., FEIJOO G., LEMA J.M.** *Use of a fungal bioreactor as a post treatment step for continuous decolorisation of dyes.* Wat. Sci. Technol. 40: p. 131–136, 1999.
11. **COULIBALY L., NAVEAU H., AGATHOS S.N.** *A tanks–in–series bioreactor to simulate macromolecule–laden wastewater pretreatment under sewer conditions by Aspergillus niger.* Wat. Res. 36: p. 3941–3948, 2002.
12. **HÜTTERMANN A., MAI C., KHARAZIPOUR A.** *Modification of lignin for the production of new compounded materials.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: p. 387–94, 2001.
13. **ERIKSSON K.E, BLANCHETTE R.A, ANDER P.** *Microbial and enzimatic degradation of wood and wood components.* Springer. Berlín. New York, p. 20, 1990.
14. **LEONOWICZ A., MATUSZEWSKA A., LUTEREK J., ZIEGENHAGEN D., WOJTA WASILEWSKA M., CHO N.S., HOFRICHTER M., ROGALSKI J.** *Biodegradation of lignin by white rot fungi.* Fungal Genet. Biol. 27: p. 175–85, 1999.
15. **WESENBERG D., KYRIAKIDES I., AGATHOS N.S.** *White–rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents.* Biotechonol. Adv. 22: p. 161, 2003.
16. **MARTÍNEZ A.T., SPERANZA M., RUIZ DUEÑAS F.J., FERREIRA P., CAMARERO S., GUILLÉN F., MARTÍNEZ M.J., GUTIÉRREZ A., DEL RÍO J.C.** *Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin.* Int. Microbiol. 8: p. 195–204, 2005.
17. **SHAH V., NERUD F.** *Lignin degrading system of white–rot fungi and its explotation for dye decolorization.* Can. J. Microbiol. 48: p. 857–870, 2002.
18. **LUND M., RAGAUSKAS A.J.** *Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water–soluble phenols.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: p. 699–703, 2001.
19. **GIANFREDA L., XU F., BOLLAG J.M.** *Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes.* Biorem. J. 3: p. 1–25, 1999.
20. **CAMBRIA M.T., MINNITI Z., LIBRANDO V., CAMBRIA A.** *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Rigidoporus lignosus and its laccase in the presence of redox mediators.* Appl. Biochem. Biotechnol. 149: p. 1–8, 2008.
21. **GALHAUP C., HALTRICH D.** *Enhanced formation of laccase activity by the white–rot fungus Trametes pubescens in the presence of copper.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: p. 225–232, 2001.
22. **HAN M.J., CHOI H.T., SONG H.G.** *Degradation of phenanthrene by Trametes versicolor and its laccase.* J. Microbiol. 42: p. 94–98, 2004.
23. **MAJCHERCZYK A., JOHANNES C., HÜTTERMANN A.** *Oxidation of aromatic alcohols by laccase from Trametes versicolor mediated by the 2,2'–azino–bis– (3–ethylbenzothiazoline–6 –sulphonic acid) cation radical and dication.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: p. 267–276, 1999.
24. **LEONOWICZ A., CHO N.S., LUTEREK J., WILKOLAZKA A., WOJTAS WASILEWSKA M., MATUSZEWSKA A., HOFRICHTER M., WESENBERG D., ROGALSKI J.** *Fungal laccase: properties and activity on lignin.* J. Basic. Microbiol. 41: p. 185–227, 2001.
25. **MAYER A.M., STAPLES R.C.** *Laccase: new functions for an old enzyme.* Phytochemistry 60: p. 551–65, 2002.

26. REYES P., PICKARD M.A., VAZQUEZ DUHALT R. *Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dye decolorization by immobilized laccase.* Biotechnol. Lett. 21: p. 875–880, 1999.

27. RODRÍGUEZ E., PICKARD M.A., VAZQUEZ DUHALT R. *Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi.* Curr. Microbiol. 38: p. 27–32, 1999.

28. BOHMER S., MESSNER K., SREBOTNIK E. *Oxidation of phenantrene by fungal laccase in the presence of 1–hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 244: p. 233–238, 1998.

29. BALDRIAN P. *Fungal laccases – occurrence and properties.* FEMS Microbiol. Rev. 30: p. 215–242, 2005.

30. VANDERTOL VANIER H.A., VAZQUEZ DUHALT R., TINOCO R., PICKARD M.A. *Enhanced activity by poly (ethylene glycol) modification of Coriolopsis gallica laccase.* J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 29: p. 214–220, 2002.

31. ZHENG Z., OBBARD J.P. *Regulation of laccase gene transcription in Trametes versicolor.* Enzyme Microb. Technol. 31, p. 3–9, 2002.

32. MANSUR M., SUÁREZ T., GONZÁLEZ A.E. *Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I–62 (CECT 20197).* Appl. Environ. Microbiol. 64: p. 771–774, 1998.

33. YAVER D.S., XU F., GOLIGHTLY E.J., BROWN K.M., BROWN S.H., REY M.W., SCHNEIDER P., HALKIER T., MONDORF K., DALBOGE H. *Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete Trametes villosa.* Appl Environ Microbiol 62: 834–841, 1996.

34. SMITH M., SHNYREVA A., WOOD D.A., THURSTON C.F. *Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes lcc1 and lcc2 in the cultivated mushroom Agaricus bisporus.* Microbiology 144: p. 1063–1069, 1998.

35. WOLFAARDT F., TALJAARD J.L., JACOBS A., MALE J.R., RABIE C.J. *Assessment of wood–inhabiting Basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips.* Bios Technol 95: p25–30, 2004.

36. SHIMIZU E. *Biodegradación de contaminantes de la industria papelera por el hongo Ganoderma applanatum.* Tesina de grado para optar al título de Licenciado en Genética. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM, 2006.

37. VELEZ RUEDA J.O. *Caracterización bioquímica de la enzima lacasa de la cepa Peniophora sp. BAFC 633 para su potencial aplicación en procesos de biorremediación.* Tesina de grado para optar al título de Licenciado en Genética. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM, 2007.

38. MOUSO N., PAPINUTTI L., FORCHIASSIN F. *Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por Stereum hirsutum (Willd) Pers.* Rev. Iberoam. Micol. 20: p. 176–178, 2003.

39. D´SOUZA T.M., BOOMINATHAN K., REDDY C.A. *Isolation of lacasse gene–specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR.* Appl. Environ. Microbiol. 62: p. 3739–3744, 1996.

40. HAGLUND C., LEVÍN L., FORCHIASSIN F., LÓPEZ M., VIALE A. *Degradation of environmental pollutants by Trametes trogii.* Rev. Argent. Microbiol. 34: p. 157–62, 2002.

41. GÓMEZ DORADO C., MARTÍNEZ SALGADO M., NIETO MOSQUERA D., PEDROSA RODRÍGUEZ A., RODRÍGUEZ VÁZQUEZ R., ROSAS ACOSTA J. *Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn–Peroxidasa y Lacasa producidas por Trametes versicolor y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera.* Universitas Scientarium. Revista de la Facultad de Ciencias 10: p. 37–45, 2005.

42. LODISH, BERK, ZIPURSKY, MATSUDAIRA, BALTIMORE, DARNELL. Biología Celular y Molecular 4º edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, 2001.

43. HAN M.J., CHOI H.T., SONG H.G. *Purification and characterization of laccase from the white rot fungus Trametes versicolor.* J. Microbiol. 43: p. 555–60, 2005.

Recibido: 13/02/08,
Aprobado: 17/07/09

- Cesar Adrian Preussler.
  Licenciado en Genética graduado en la Universidad Nacional de Misiones. Es becario del CEDIT. Posee presentaciones a congresos nacionales e internacionales.

- Ernesto Shimizu.
  Licenciado en Genética graduado en la Universidad Nacional de Misiones. Es ex–becario del CEDIT y de la FCEQyN. Actualmente realiza estudios de doctorado mediante una beca. Agencia en el INTA EEA Balcarce. Posee presentaciones a congresos nacionales e internacionales.

- Pedro Darío Zapata.
  Doctor por la Universidad de Alcalá de Henares, en el programa Biomedicina. Profesor Regular Adjunto en las Cátedras de Biología Celular y Molecular (Bioquímica), Genética Molecular (Lic. en Genética), Biología Celular (Lic. en Genética) y Biotecnología Molecular (Ingeniería Química, Bioquímica y Farmacia). Posee actualmente la Categoría III en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes–Investigadores. Se desempeña además como Director y Co-Director de proyectos Incentivados y Subsidiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.

- Laura L. Villalba.
  PhD de la State University of New York, College of Environmental Science and Forestry. Profesor adjunto de los cursos Pulpados Químicos y Operaciones Fundamentales en la fabri-

cación de la Pulpa y el Papel (Maestría en Ciencias de la Madera, Pulpa y Papel), Cátedras de Coloquio I, II, Organización Industrial y relaciones laborales (Tecnicatura Universitaria en Celulosa y Papel), Transferencia de masa (Ingeniería en Alimentos), Operaciones de Transferencia de masa (Ingeniería Química). Categoría III en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes-Investigadores. Se desempeña además como Directora y Co-Directora de proyectos Incentivados y Subsidiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.

Laboratorio de Biotecnología Molecular (BIOTECMOL), Módulo de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM. Posadas, Misiones, Argentina. Av. Mariano Moreno 1375 (3300). bcmb@fceqyn.unam.edu.ar.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 11 / Nº 12 / 2009 / 17–22

Aislamiento, clonado y expresión de la proteína recombinante para el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF-8) de *Rhinella* (= Bufo) *arenarum*

Enrique V. Paravani, María G. Acosta, Javier E. Diaz Zamboni, Víctor H. Casco.

Isolation, cloning and expression of the recombinant protein for the fibroblast growth factor 8 (FGF-8) of *Rhinella* (=Bufo) *arenarum*

ABSTRACT

Embryological studies have demonstrated that the origin of organs in vertebrates involves complex cellular interactions in different tissues. Biochemical and molecular evidence suggests that endogenous signal in the apical ectodermical ridge (AER) are exerted by Fibroblastic Growth Factor 8 (FGF-8). This Factor is essencial in the initiation of the limb development processes in vertebrates. The main objective of the present work was to use molecular techniques to obtain a recombinant protein to FGF-8, from the isolation of the *Rhinella arenarum* toad gene, and to analyze their nucleotidic sequence using bioinformatic tools. It was possible to express the recombinant FGF-8 in a soluble form and also to study the evolutionary relationship with different vertebrate species. The results reflect a near evolutionary relation with other homologous vertebrates genes, especially with the amphibians. The obtencion of the recombinant protein gave us the possibility of carrying out structural and physiologycal studies about the role of FGF-8 during the limb development in our experimental animal model (*R. arenarum*). A secondary objective was to produce specific polyclonal antibodies which allowed for the search of other possible locations and roles of this factor during vertebrate development.

KEY WORDS: Fibroblast Growth Factor 8 (FGF-8), Recombinant protein production, bioinformatics tools.

RESUMEN

Los estudios embriológicos han demostrado que el origen de los órganos de vertebrados involucra complejas interacciones celulares de diferentes tejidos. Las investigaciones bioquímicas y moleculares, sugieren que las señales endógenas en la cresta ectodérmica apical (AER) ejercidas por el Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 (FGF-8), son claves en los procesos de iniciación del desarrollo de los apéndices pares en vertebrados. El objetivo del presente trabajo fue obtener una proteína recombinante para el FGF-8 empleando técnicas moleculares, a partir del aislamiento del gen de *Rhinella arenarum* y analizar la secuencia nucleotídica con herramientas bioinformáticas. Los resultados reflejaron una estrecha relación evolutiva con genes homólogos de otros anfíbios. La obtención de la proteína recombinante, nos brinda la posibilidad de llevar a cabo estudios estructurales y fisiológicos del FGF-8 durante el desarrollo de los miembros en nuestro modelo animal *(R. arenarum)*. Un objetivo secundario fue producir anticuerpos policlonales para buscar otras posibles localizaciones y roles de este factor durante el desarrollo.

PALABRAS CLAVE: Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 (FGF-8) – Producción de una proteína recombinante – Herramientas de bioinformática.

INTRODUCCIÓN

La iniciación en el desarrollo de los miembros de vertebrados es uno de los mejores modelos para estudiar interacciones celulares durante los procesos de morfogénesis. Los estudios embriológicos han demostrado que el origen de los miembros involucra complejas interacciones celulares entre varios tejidos. Los estímulos iniciales para el desarrollo de los miembros aún no han sido identificados. Se ha propuesto que la posición de las células en el primordio del miembro es la responsable de especificar los tres ejes principales: próximo–distal, antero–posterior y dorso–ventral, como en un sistema de ejes cartesianos. El primordio del miembro emerge como resultado de un engrosamiento de la capa somática de la lámina mesodérmica lateral, como consecuencia de la disminución selectiva de la proliferación en esta región [1]. Así, el crecimiento y la diferenciación dependerían de las interacciones inductivas que se dan entre la cresta ectodérmica apical (AER) y las células mesenquimáticas de las regiones presuntivas. La AER sería así la responsable de mantener a las células mesenquimáticas en un estado indiferenciado y proliferativo y como consecuencia de esto, se produciría la elongación del miembro [2, 3]. La AER expresa diferentes genes que parecen jugar un rol importante en el crecimiento; entre éstos se destacan algunos de los miembros de la familia de

los Factores de Crecimiento Fibroblásticos (FGFs) [4]. La aplicación exógena de FGF–8, FGF–4, o FGF–2 pueden rescatar el desarrollo del primordio del miembro cuando la AER ha sido removida experimentalmente [5]. A pesar de estas evidencias, los mecanismos de señalización de los FGFs en la cresta y su relación con la función de la zona de progreso (ZP) aún no han sido caracterizados en detalle. La inhibición de la expresión continua de FGF–8 durante la embriogénesis por infecciones virales, causa alteraciones en el desarrollo del esqueleto de los miembros anteriores y posteriores [6]. Estos resultados sugieren que el FGF–8 no sólo está involucrado en la iniciación, crecimiento y modelado del miembro, sino también en la formación del eje antero–posterior del organismo.

El objetivo del presente trabajo ha sido emplear técnicas moleculares para obtener una proteína recombinante para el FGF–8, aislando el gen de *Rhinella arenarum* y posteriormente analizar por medio de herramientas bioinformáticas su relación con otros miembros de esta familia de moléculas en vertebrados. Con este estudio se sientan las bases moleculares para llevar a cabo estudios estructurales y fisiológicos para comprender mejor el rol que cumpliría este factor en el desarrollo de los apéndices pares de vertebrados. Además nos brinda la posibilidad de obtener un anticuerpo policlonal heterólogo para emplear como herramienta de estudio en el desarrollo de los apéndices pares en la especie *Rhinella arenarum.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los embriones de *Rhinella arenarum* fueron obtenidos por fertilización in vitro según los métodos descriptos por Casco y col. (1992) [7]. Los distintos estadios se obtuvieron manteniéndolos en solución Holtfreter, en acuarios apropiados a 20 ± 2 ºC, fotoperiodo de 12 hs. luz: 12 hs. oscuridad. La clasificación de los estadios embrionarios y larvales fue realizada conforme a la clasificación de Gosner (1960) [8].

Aislamiento y purificación de ARN total

El aislamiento de ARN total fue realizado tomando como base los protocolos de Sive y col. [9]. La concentración y calidad de la solución fue determinada midiendo la relación densidad óptica (DO) 260/280. El ARN fue almacenado como una solución acuosa a -80 °C hasta el momento de uso.

Obtención del ADN copia

La reacción fue llevada a cabo colocando simultáneamente 1 µl de las enzimas transcriptasa inversa y ADN polimerasa, junto con 1 µl de cada uno de los cebadores (*Ra*FGF–8*fo:* gAA TTC ATg AAC TAC ATC ACC TCC AT y *Ra*FGF–8*re:* AAg CTT CAT CCg AgA ACT TgA ATA TC; Biodynamics®); 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido; 1,5 mM de $MgCl_2$; solución *buffer* 10X; agua estéril y aceite mineral. Para el diseño de los cebadores, fue tomada la secuencia del ARN mensajero que codifica para el FGF8b de *Xenopus laevis* de la base de datos *Medline. Acc*. Nº NM 001090435, a los que se les adicionaron en sus extremos 5' sitios de restricción *Eco R*I y *Hind* III respectivamente. (Biodynamics®). La reacción de síntesis de las primeras hebras del ADN copia a partir del ARN mensajero fue realizada durante 45 minutos a 48 ºC; a continuación se realizó la *PCR* durante 32 ciclos. El programa seleccionado en el termociclador fue el siguiente: 1 minuto a 90 ºC, 90 segundos a 65 ºC y 2 minutos a 72 ºC. Finalizada la reacción de amplificación, se realizó la separación electroforética en geles de agarosa al 1% para confirmar la presencia y calidad del producto amplificado. Una vez amplificado, el producto fue identificado, purificado y guardado a -20 ºC hasta el momento de su uso.

Plásmidos empleados

Para el clonado del fragmento amplificado por *PCR* se utilizó el vector pCR–2.1 TOPO (Invitrogen®) y para la expresión de la proteína recombinante el vector pMAL–c2 (Biolabs®).

Transformación de las bacterias competentes

El proceso de transformación de las células competentes fue realizado según lo descripto por Chung y col. [10]. Las distintas transformaciones se hicieron realizando todos los controles correspondientes.

Clonado del fragmento de PCR en el vector pCR 2.1–TOPO

El fragmento de ADN amplificado por *PCR*, fue ligado al vector pCR 2.1–TOPO (Invitrogen®) para obtener la construcción [pCR 2.1–TOPO/*Ra*FGF–8]. Las construcciones fueron sembradas en una placa conteniendo LB–agar más ampicilina, X–Gal e IPTG. Las colonias blancas obtenidas fueron replicadas en una nueva placa numerada para identificar cada colonia transformada. Fueron elegidas 5 colonias blancas al azar y purificados los ADN plasmídicos correspondientes.

Construcción [pMal–c2/RaFGF–8]

Los plásmidos con la construcción [pCR 2.1–TOPO/*Ra*FGF–8] fueron digeridos con las enzimas de restricción *Eco R*I y *Hind* III (Biodynamics®). Los productos de la mezcla de digestión fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%. El fragmento liberado de la colonia 6 fue purificado del gel de agarosa y ligado al vector pMal–c2 (Biolabs®) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

Expresión de la proteína recombinante

Bacterias *BL 21* (DE3) transformadas con la construcción [pMAL–c2/*Ra*FGF–8] fueron cultivadas en medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche a 37 ºC en agitación a 180 g. El cultivo fue diluido a una concentración 1/100 e incubado en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO= 0,5 - 0,6. La expresión de la proteína fue inducida mediante el agregado de IPTG (concentración final 1mM), seguida de la incubación por 5 horas a 37 ºC. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos. El pellet fue resuspendido en solución de sonicado (Tris–HCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM, EDTA 1mM). La ruptura celular fue llevada a cabo usando un procesador ultrasónico de TM alta intensidad Vibra–cell VCX–600 (Sonics & Materials Inc.) con pulsos de 2,5 - 10 segundos durante 1 minuto. Posteriormente fue centrifugada a 4 ºC y 5000 g durante 15 minutos. Tanto el sobrenadante como los pellets fueron recolectados y almacenados a -20 ºC hasta el momento de ser utilizados. La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS–PAGE) fue realizada según el método descrito por Laemmli U. K. [11], utilizando como soporte geles discontinuos de poliacrilamida al 15%.

Secuenciación del ADN y análisis Bioinformático

La secuenciación del ADN de la construcción [pCR 2.1 TOPO/*Ra*FGF–8] colonia 6 fue realizada siguiendo el método de extensión de cebadores simples, empleando un Termociclador BigDyeTM, y el producto purificado por medio de etanol, fue secuenciado usando el equipo Secuenciador Automático 3730xl. [12] Para el análisis bioinformático de los resultados de la secuenciación del ADN se empleó un alineamiento heurístico simple con la herramienta *BLAST* (*Basic Local Aligment Search Tool*) del *NCBI*. Adicionalmente se realizó un análisis de alineamiento múltiple con el programa *ClustalX 2.0.11*, enfrentando la secuencia del gen traducida para el FGF–8 de *Rhinella arenarum* con proteínas para el mismo factor de otras especies de vertebrados cuyas secuencias se encuentran en la base de datos del *NCBI*. Para realizar el análisis filogenético primero se realizó una búsqueda en la base de datos *GenBank* de secuencias proteicas para FGF–8 pertenecientes a diferentes especies (*Xenopus laevis, Xenopus tropicalis, Danio rerio, Gallus gallus, Homo sapiens, Mus musculus*). Con estas secuencias se armó un único archivo FASTA que sirvió como entrada para el programa. En primer lugar, el programa realizó un alineamiento múltiple de las secuencias con el programa MUSCLE. Este alineamiento múltiple fue depurado mediante el programa Gblocks para preservar solamente los bloques conservados entre las secuencias, los que representaron las regiones con información útil para el análisis filogenético. Posteriormente fue construido el árbol filogenético. Para ello fue utilizado el programa PhyML que emplea el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood), usando cálculos probabilísticos para encontrar el árbol que mejor se ajusta a la variación observada de las secuencias. Como último paso, el árbol generado fue visualizado mediante el programa TreeDyn.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación del fragmento que codifica el FGF–8 *Rhinella arenarum*

El gen que codifica para el Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 de *Rhinella arenarum* (*Ra*FGF–8) fue amplificado por PCR usando como cebadores *Ra*FGF–8*fo*/*Ra*FGF–8*re* (Biodynamics®) a partir de ADN copia de *Rhinella arenarum*. En la Figura 1 se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1% donde puede observarse el fragmento de ADN amplificado de 636 pb.

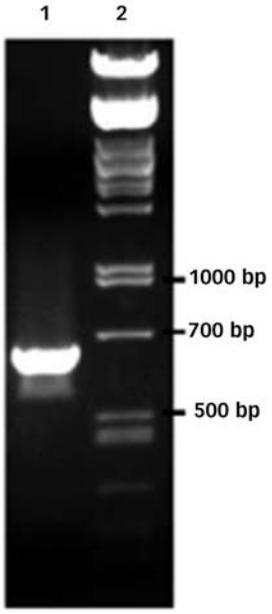


FIGURA 1: Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. 1- Calle 1, producto de *PCR* utilizando los cebadores *FGF8fo/ FGF8re.* 2- Calle 2, Marcador de Peso Molecular (DNA Ladder 1Kb Plus, Invitrogen®).

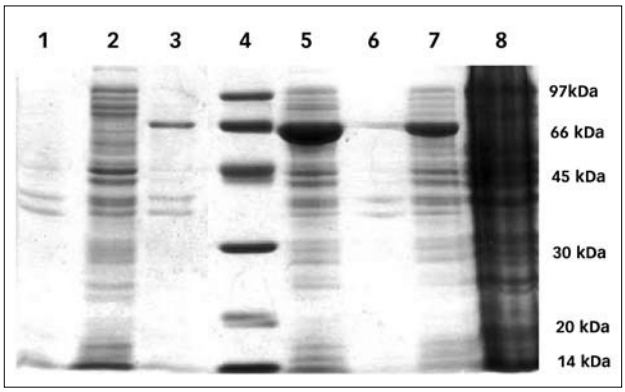


FIGURA 2: SDS-PAGE al 15 %: productos proteicos obtenidos en el sobrenadante y pellet de diferentes cultivos de bacterias *E. coli* Top 10 [pMal-c2/*Ba*FGF-8] inducidas. 1: Calle 1, pellet colonia 6. 1: Calle 2, sobrenadante colonia 6. 3: Calle 3, pellet colonia 8. 4: Calle 4, marcador de masa molecular (Pharmacia®). 5: Calle 5, sobrenadante colonia 8. 6: Calle 6, pellet colonia 4. 7: Calle 7, sobrenadante colonia 4. 8: Calle 8, lisado de células Top 10.

Expresión de FGF–8 a partir de *E. coli* BL21 (DE3) [pMal–c2/RaFGF–8]

Para la expresión del FGF–8 se seleccionaron tres colonias transformantes al azar. (Figura 2) La masa molecular de la proteína de fusión fue estimada en 66 kDa, como era de esperar (43 kDa corresponden a la proteína de unión a la Maltosa (MBP) y 23 kDa a la FGF–8 de *Rhinella arenarum*). La colonia 8 expresó la proteína recombinante en forma soluble, por lo que fue la escogida para continuar con los estudios de purificación.

Secuenciación del ADN y análisis Bioinformático

La secuenciación del ADN de la construcción [pCR 2.1 TOPO/*Ra*FGF–8] colonia 6, confirma la identidad del gen FGF–8, el cual se publicó en la base de datos del *PubMed* cuyo número de acceso es FJ 225795. Del análisis del alineamiento realizado con la secuencia correspondiente a *Xenopus laevis* (Figura 3) se observó una identidad del 98%, esto implica que 625 nucleótidos se encuentran conservados y en la misma posición relativa con respecto a los 636 nucleótidos totales. El porcentaje de *gaps* a lo largo del alineamiento fue nulo y por tanto, el valor E fue de 0.0. Puede concluirse que el gen FGF–8 obtenido a partir de *Rhinella arenarum* posee un altísimo grado de identidad con el publicado por Fletcher y col. (2006) para *Xenopus laevis* [13].

Como muestra la Figura 4, fue posible observar que la secuencia de aminoácidos para el FGF–8 de *Rhinella arenarum* posee un alto grado de homología con secuencias de aminoácidos para el mismo factor de otras especies analizadas, demostrando que existe una relación evolutiva muy próxima con los genes analizados. El empleo de esta herramienta fue útil para construir un árbol filogenético (Figura 5).

El resultado obtenido fue un dendrograma que muestra la relación evolutiva entre las especies analizadas y una cierta probabilidad asociada a esa relación. Como se puede observar en la Figura 5, el gen de FGF–8 perteneciente a la especie analizada en este trabajo (*Rhinella arenarum*) mostró una estrecha relación con sus homólogos de *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*.

La actividad de FGF–8 está regulada por empalme alternativo y éste proceso se ha verificado en humanos, ratones, pollos y Xenopus (Fletcher y col., 2006 [13]; Crossley & Martin, 1995 [14]; Gemel y col., 1996 [15]; Ghosh y col., 1996 [16]; Haworth y col., 2005 [17]; MacArthur y col., 1995 [18]). El ARNm alternativamente empalmado, da origen a isoformas proteicas que difieren en la longitud

FIGURA 3: Análisis Bioinformático empleando el programa Nucleotide BLAST 2. Alineamiento entre el gen del FGF-8 de *Rhinella arenarum* obtenido en el presente trabajo y el gen FGF-8b de *Xenopus laevis* publicado por Fletcher y col., 2006.

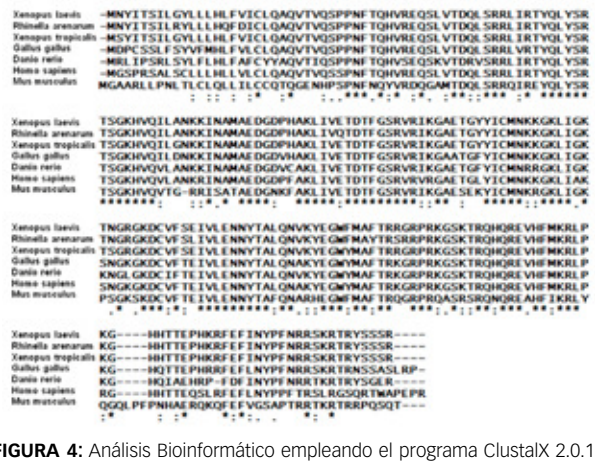


FIGURA 4: Análisis Bioinformático empleando el programa ClustalX 2.0.11. Alineamiento múltiple para los productos del gen FGF-8 de *Rhinella arenarum* (FJ225795) y distintos organismos cuyas secuencias de aminoácidos han sido publicadas previamente en el *NCBI*. *Xenopus laevis* (NM_001090435.1); *Xenopus tropicalis* (NM_001008162.1); *Gallus gallus* (NM_001012767.1); *Danio rerio* (NM_131281.2); *Homo sapiens* (NM_006119.3); *Mus musculus* (NM_008004.4). Referencias: (*) Indica residuos de aminoácidos idénticos completamente conservados; (:) Indica que existe una fuerte identidad entre grupos; (.) Indica que existe una débil identidad entre grupos.

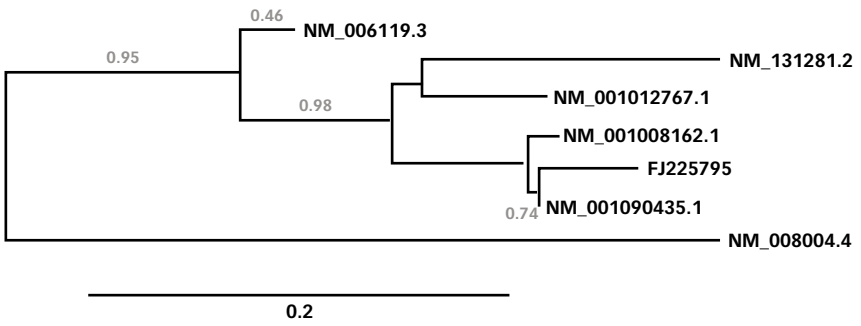


FIGURA 5: Dendrograma del árbol filogenético construido con el programa Phylogeny. Se pueden observar las estrechas relaciones evolutivas entre las diferentes especies analizadas y la probabilidad asociada a dicha relación. *Rhinella arenarum* (FJ225795); *Xenopus laevis* (NM_001090435.1); *Xenopus tropicalis* (NM_001008162.1); *Gallus gallus* (NM_001012767.1); *Danio rerio* (NM_131281.2); *Homo sapiens* (NM_006119.3); *Mus musculus* (NM_008004.4).

y/o secuencia del extremo N, algunos de los cuales *in vivo,* poseen actividades diferentes (Fletcher y col., 2006 [13]; MacArthur y col., 1995 [18]; Blunt y col., 1997 [19]; Olsen y col., 2006 [20]; Song y col., 2000 [21]). El uso de un pequeño número de modelos animales tradicionales es insuficiente para comprender la evolución de la diversidad morfológica por lo que resulta de sumo interés ampliar el uso de modelos alternativos, morfológicamente divergentes para dilucidar los mecanismos moleculares que subrayan las diferencias morfológicas entre las especies (Cretekos y col. 2007 [22]).

El alto grado de homología exhibida entre el gen que codifica para FGF–8 de *Xenopus laevis* y *Rhinella arenarum* permite sugerir que los mecanismos de regulación de su expresión serían muy semejantes, soportando la hipótesis que se trata de un gen altamente conservado en vertebrados y, de este modo, permitirá continuar nuestras investigaciones tendientes a dilucidar su rol específico durante el desarrollo de los miembros de vertebrados.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se ha logrado obtener, empleando herramientas clásicas de biología molecular, la proteína recombinante para el Factor de Crecimiento Fibroblástico 8 de una especie de anfibios autóctonos (*Rhinella arenarum*) ampliamente usada en estudios de biología del desarrollo de vertebrados en nuestro país. La expresión de la proteína se obtuvo en forma soluble, lo que permite su purificación a partir de una columna de amilosa. Se pudo comprobar que dicho gen posee un alto grado de similitud de secuencia con los otros Factores de Crecimiento Fibroblástico publicados por diferentes autores en otras especies. Del análisis del dendrograma, se puede concluir que el gen codificante para el FGF–8 obtenido de *Rhinella arenarum* mostró una estrecha cercanía con sus homólogos de *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis*, a pesar de que las relaciones evolutivas entre estos anfibios aparece muy distante. Con estos resultados, se pudo depositar la secuencia para el FGF–8 de *Rhinella arenarum* en la base de datos NCBI, cuyo número de acceso es: FJ225795. Desde un punto tecnológico, resulta muy importante contar con esta proteína recombinante, ya que brinda la posibilidad de llevar a cabo estudios estructurales y fisiológicos tendientes a comprender mejor el rol que cumpliría el FGF–8 en el desarrollo de los apéndices pares de vertebrados. Adicionalmente a partir de ésta proteína recombinante, se intentará la obtención de anticuerpos policlonales heterólogos generados a partir de una secuencia génica de *Xenopus laevis* en una especie de interés biológico ecológico de amplia distribución en la región y que constituye uno de los principales modelos experimentales de vertebrados en nuestro país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **SEARLS R. L. & JANNERS M. Y.** (1971). *The initiation of limb bud outgrowth in the embryonic chick.* Dev. Biol. 24: 198–213.

2. **GLOBUS & VETHAMANY GLOBUS** (1976). *An in vitro analogue of early chick limb bud outgrowth.* Differentiation 3: 91–96.

3. **REITER & SOLURSH** (1982). *Mitogenic property of the apical ectodermal ridge.* Dev Biol. 93: 28–35.

4. **TICKLE C. & EICHELE G.** (1994). *Vertebrate limb development.* Ann. Rev. Cell Biol.: 10. 121–152.

5. **NISWANDER L., TICKLE C., VOGEL A., BOOTH I., MARTIN G.R.** (1993). *FGF–4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb.* Cell 5: 579–587.

6. **VOGEL A., RODRÍGUEZ C., IZPISÚA BELMONTE J.** (1996). *Involvement of FGF–8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb.* Development 122: 1737–1750

7. **CASCO V. H., PAZ D., RUIZ G., MALDONADO C., PISANO A. & AOKI, A.** (1992). *Differentiation of endocrine myocardiocytes in the developing heart of the toad* (*Bufo arenarum,* Hensel). Int. J. Dev. Biol. 36: 537–542.

8. **GOSNER K. L.** (1960). *A simplified table for staging anuran embryos and larvae, with notes on identification.* Herpetologica 16: 183–190.

9. SIVE H. L., GRAINGER R. M., HARLAND R. M. (2000). *Early development of Xenopus laevis.* A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 338 pp.

10. CHUNG C.T., NIEMELA S. L., MILLER R. H. (1989). *One–step preparation of competent Escherichia coli: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 2172–2175.

11. LAEMMLI U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.* Nature 74: 680–685.

12. SANGER, F. & COULSON, A. R. (1975). *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.* J. Mol. Biol. 94: 441–448.

13. FLETCHER R.B., BAKER, J.C., HARLAND, R.M. (2006) *FGF–8 spliceforms mediate early mesoderm and posterior neural tissue formation in Xenopus.* Journal Development 133: 1703–1714.

14. CROSSLEY P.H. & MARTIN G.R. (1995). *The mouse fgf8 gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo.* Development 121: 439–451.

15. GEMEL J., GORRY, M., EHRLICH, G.D., MACARTHUR, C.A. (1996). *Structure and sequence of human fgf8.* Genomics 35: 253–257.

16. GHOSH A.K., SHANKAR D.B., SHACKLEFORD G.M., WU K., T'ANG A., MILLER G.J., ZHENG J., ROY BURMAN P. (1996). *Molecular cloning and characterization of human fgf8 alternative messenger RNA forms.* Cell Growth & Differentiation 7: 1425–1434.

17. HAWORTH K.E., HEALY C., SHARPE P.T. (2005). *Characterization of the genomic structure of chick fgf8.* DNA Sequence 16: 180–186.

18. MACARTHUR C.A., LAWSHE A., XU J., SANTOS OCAMPO S., HEIKINHEIMO M., CHELLAIAH A.T. ORNITZ D.M. (1995). *Fgf–8 isoforms activate receptor splice forms that are expressed in mesenchymal regions of mouse development.* Development 121: 3603–3613.

19. BLUNT A.G., LAWSHE A., CUNNINGHAM M.L., SETO M.L., ORNITZ D.M., MACARTHUR C.A. (1997). *Overlapping expression and redundant activation of mesenchymal fibroblast growth factor (fgf) receptors by alternatively spliced fgf–8 ligands.* J. Biol. Chem. 272: 3733–3738.

20. OLSEN S.K., LI J.Y., BROMLEIGH C., ELISEENKOVA A.V., IBRAHIMI O.A., LAO Z., ZHANG F., LINHARDT R.J., JOYNER A.L., MOHAMMADI M. (2006). *Structural basis by which alternative splicing modulates the organizer activity of fgf8 in the brain.* Genes Dev. 20: 185–198.

21. SONG Z., POWELL W.C., KASAHARA N., VAN BOKHOVEN A., MILLER G.J., ROY BURMAN P. (2000). *The effect of fibroblast growth factor 8, isoform b, on the biology of prostate carcinoma cells and their interaction with stromal cells.* Cancer Res. 60: 6730–6736.

22. CRETEKOS C.J., DENG J., GREEN E.D., NISC COMPARATIVE SEQUENCING PROGRAM, RASWEILER J.J. & BEHRINGER, R.R. (2007). *Isolation, genomic structure and developmental expression of Fgf8 in the short–tailed fruit bat, Carollia perspicillata.* Int. J. Dev. Biol. 51: 333–338.

Recibido: 17/03/09.
Aprobado: 05/08/09.

- Enrique V. Paravani[1,2]
  Licenciado en Biotecnología (UNL). Antecedentes laborales y/o en docencia: Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Biología Molecular y Celular (Depto. Biología) Facultad de Ingeniería (Bioingeniería-Bioinformática). Antecedentes en investigación: miembro del laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares.

- María G. Acosta[2]
  Licenciada en Biotecnología (UNR). Antecedentes laborales y/o en docencia: Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Química General e Inorgánica (Depto. Físico-Química) Facultad de Ingeniería (Bioingeniería-Bioinformática). Antecedentes en investigación: becaria de CONICET tipo II. Miembro del Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares.

- Javier E. Diaz Zamboni[2]
  Bioingeniero (UNER). Antecedentes Laborales y/o en Docencia: Prof. Adjunto Programación Avanzada (Depto. Informática) Facultad de Ingeniería (Bioingeniería-Bioinformática). Antecedentes en Investigación: miembro del Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares.

- Víctor H. Casco[1,2]
  Dr. en Cs. Biológicas (UNCor.). Antecedentes Laborales y/o en Docencia: Prof. Titular de la Cátedra de Biología Molecular y Celular (Depto. Biología) Facultad de Ingeniería (Bioingeniería-Bioinformática). Antecedentes en investigación: miembro del Laboratorio de Microscopia Aplicada a Estudios Moleculares y Celulares.

1. Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ingeniería. UNER. Ruta 11, Km 10.5, Oro Verde, Entre Ríos, (3101), Argentina. evparavani@bioingenieria.edu.ar.
2. Laboratorio de Microscopía. Facultad de Ingeniería. UNER. Ruta 11, Km 10.5, Oro Verde, Entre Ríos, (3101), Argentina. vcasco@bioingenieria.edu.ar.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 11 / Nº 12 / 2009 / 23–26

Ensayos preliminares *in vitro* de la capacidad aflatoxigénica de *Aspergillus flavus* aislados de maní

María E. Schapovaloff, Isabel A. Señuk, María C. Vedoya, Martha G. Medvedeff.

In vitro preliminary assessment of aflatoxin ability of *Aspergillus flavus* from peanuts

ABSTRACT

In the present peanut study fungi level contamination, morphological characterisation of *Aspergillus flavus* populations and their aflatoxins production in a medium with an indicator were determined. A thousand postharvest peanuts were placed in groups of five in Petri dishes for fungi development. Fungi were isolated in Czapeck agar for *Aspergillus* species identication.

To determine aflatoxins presence in *Aspergillus* populations, a coconut agar medium was used. A 52% of the seeds showed fungi contamination, from which 57 *A. flavus* were isolated. Aflatoxin–producing colonies were detected under long–wave UV light (365 nm) by blue fluorescence around the colonies, 12 % of A. flavus strains showed to be aflatoxin producers.

KEY WORDS: *Aspergillus flavus,* aflatoxins, peanut.

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó, en semillas de maní el nivel de contaminación fúngica, caracterización morfológica de poblaciones de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas en un medio indicador. Se ensayaron mil semillas de maní poscosecha distribuidas en grupos de cinco por placa de Petri, para la exteriorización de los hongos. Las especies de *Aspergillus* se aislaron en agar Czapek para su identificación. La producción de aflatoxinas de las poblaciones de *A. flavus,* se evaluó con el medio de agar coco. El 52% de las semillas presentó contaminación fúngica y se obtuvieron 57 aislamientos de *A. flavus*. Mediante visualización de un halo azul fluorescente bajo luz UV, un 12% de las cepas de *A. flavus* manifestaron ser productoras de aflatoxinas.

PALABRAS CLAVE: *Aspergillus flavus*, aflatoxinas, maní.

INTRODUCCIÓN

El maní (*Arachis hypogaea L.)* es uno de los cultivos leguminosos más importante del mundo. Su origen está en Sudamérica, donde el género *Arachis* está ampliamente distribuido en Brasil, Paraguay, Bolivia, Argentina y Uruguay [1].

El maní tiene importancia como alimento por su valor energético y nutricional. Es una fuente rica en proteínas (25 % de la masa de los granos) y vitamina E (antioxidante), además de contener vitaminas del complejo B, ácido fólico, y minerales como calcio, fósforo, potasio y zinc [2].

Participa con 10 % de la producción mundial de aceite comestible, siendo los principales productores: India, China, Estados Unidos, Nigeria, Indonesia y Senegal [3]. La Argentina es el segundo exportador de maní después de EE.UU., principalmente para consumo humano directo [4].

El maní está expuesto a contaminación por hongos. La contaminación o la invasión por estos microorganismos pueden ocurrir en el suelo, durante el proceso de formación de las semillas, en la colecta y también en las fases de secado y almacenamiento [5, 6, 7, 8, 9]. Los mohos responsables más frecuentes pertenecen a los géneros *Aspergillus, Penicillum* y *Rhizopus* [10].

En condiciones favorables, varias especies fúngicas pueden producir micotoxinas que son metabolitos secundarios con potencial para causar toxicosis en el hombre y en los animales; cuando las semillas contaminadas son destinadas a la alimentación. En el grupo de estas sustancias, las más encontradas en los granos de maní y en sus derivados son las aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 (AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2) [11, 12]. Estas micotoxinas son producidas, principalmente, por cepas toxigénicas de *Aspergillus flavus* Link y por *Aspergillus parasiticus* Speare [13].

La presencia de aflatoxinas es mayor en maní respecto a otras especies, debido a la alta afinidad del género *Aspergillus* por el cultivo, principalmente en condiciones de estrés hídrico hacia fines del ciclo [14], o elevada humedad durante la cosecha [15].

La presencia de micotoxinas en los alimentos conlleva a efectos tóxicos agudos o crónicos en la salud humana y animal, lo que ha determinado la regulación de sus niveles tanto nacional como internacionalmente. El control sanitario

es factor condicionante de la comercialización de los granos [16].

Los objetivos que motivaron este estudio consistieron en la determinación del nivel de contaminación fúngica, caracterización morfológica de poblaciones de *Aspergillus flavus* en semillas de maní destinadas a consumo humano, así como también la producción de aflatoxinas, *in vitro*, en un medio indicador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron mil semillas de maní producidas y comercializadas en diferentes zonas de la provincia de Misiones.

Áreas de estudio

Las muestras estudiadas fueron obtenidas de seis municipios productores de maní de la provincia de Misiones: Dos de Mayo, Leandro N. Alem, Apóstoles, Montecarlo, San José y Posadas.

El clima de estas áreas es subtropical sin estación seca, con abundantes precipitaciones de una media anual de 1700 mm (Tabla 1).

Tabla 1. Coordenadas geográficas, altitud, temperatura y precipitaciones de los sitios de origen de las muestras procesadas.

Localidad	Coordenadas geográficas	Altitud	Temperaturas medias		Precipitaciones
			Estival	Invernal	
Posadas	27° 23″ 0′ S 55° 53″ 0′ W	124 m	27°C	16°C	2000 mm
San José	27° 46″ 12′ S 55° 46″ 49′ W	172 m	25° C	15°C	1650 mm
Apóstoles	27° 54″ 51′ S 55° 45″ 18′ W	151 m	24°C	14°C	1600 mm
Leandro N. Alem	27° 36″ 0′ S 55° 19″ 0′ W	290 m	21°C	14°C	1788 mm
Dos de Mayo	27° 1″ 12′ S 54° 41″ 4′ W	555 m	25°C	16°C	1700 mm
Montecarlo	26° 33″ 0′ S 54° 44″ 0′ W	175 m	28°C	15°C	1750 mm

Método de incubación en papel de filtro

Para detectar los hongos asociados a las semillas de maní, se utilizó la técnica de Neergaard [17]. Se seleccionaron 50 semillas, aparentemente sanas, de cada una de las veinte muestras obtenidas y estas fueron transferidas, asépticamente, en grupos de cinco a placas de Petri. En la base de cada placa se dispuso papel de filtro esterilizado y embebido en agua destilada estéril. Las semillas, convenientemente distribuidas en las placas, fueron incubadas en estufa a temperatura de 25 °C ± 2 ºC por un período de 7 a 14 días para la exteriorización y desarrollo de los hongos [18].

Identificación de los hongos

Tras la visualización del desarrollo fúngico en las semillas de maní, se procedió al aislamiento de las diferentes especies para la posterior identificación en base a las característica macro y microculturales [19].

Determinación de las especies *Aspergillus*

Se aislaron los *Aspergillus* de color verde oliva amarillento, típico del grupo *A. flavus*. Para la identificación presuntiva de *A. flavus* se utilizó el medio diferencial *A. flavus* y *A. parasiticus* agar (AFPA) [20]. En este medio, esta especie produce una coloración naranja–amarillenta característica en el reverso de la colonia luego de 48 h de incubación a 30 °C. La mayoría de las características fueron observadas a los 7 días de incubación. La identificación definitiva de las cepas se realizó de acuerdo con la clave de Klich y Pitt (1988) [21] y Pitt y Hocking (1997) [20].

Presencia de aflatoxinas

Para determinar la presencia de aflatoxinas en las poblaciones de *A. flavus*, las cepas se sembraron en medio rápido de detección agar coco (AC) y se incubaron durante 5 días a 25 °C. Tras el desarrollo fúngico las placas de AC se observaron bajo luz ultra violeta (365 nm). La presencia de un halo fluorescente azul alrededor de la colonia indica producción *in vitro* de la toxina [22].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras de semillas de maní analizadas, el 52 % presentó contaminación fúngica y fueron identificados los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Sclerotium*. Dentro de los géneros encontrados, se aislaron hongos de almacenamiento como de suelo [23].

El análisis sanitario de las semillas contaminadas acusó una ocurrencia simultánea de más de una especie fúngica en la misma semilla. Asociaciones de *A. flavus*, *R. stolonifer* y *A. niger* fueron frecuentes. Se debe tener en cuenta que la humedad relativa, la presencia de agua y las variaciones de temperatura, durante el proceso de formación y desarrollo de las semillas, son factores determinantes en la intensidad de la infección y contaminación por estos microorganismos [24].

Del 52 % de las semillas de maní procesadas, que presentaron contaminación fúngica, se aislaron 57 cepas de *A. flavus*. Especies de *Aspergillus* son consideradas iniciadoras del deterioro de las semillas y granos, causando daño, decoloración y alteraciones nutricionales [6].

Es importante destacar que las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de los hongos no son las mismas que favorecen la formación de aflatoxinas. La temperatura óptima de crecimiento, especialmente para *A. flavus*, está entre los 36 °C y 38 °C, con registros de actividad entre los 8 °C y 44 °C, con humedad relativa superior al 80 %. Mientras que la producción máxima de aflatoxinas se registra en el intervalo de 25 °C a 28 °C [25]. En Misiones, estas condiciones climáticas son habituales, no sólo en temporada estival sino incluso durante período invernal.

De las 57 cepas de *A. flavus* analizadas, el 88 % (50/57) no produjeron halo azul fluorescente bajo luz UV en agar coco a los 5 días de incubación, el 12 % (7/57) fue fuertemente fluorescente. La incubación de *A. flavus* en agar coco y su posterior exposición bajo luz UV, ha sido una prueba rápida y efectiva en la detección de cepas aflatoxicogénicas [26]. Davis *et al.* (1987) confirmaron por análisis químico la producción de aflatoxinas de las cepas que producen halo azul fluorescente en este medio de cultivo. Las que producen halo intenso son potentes productoras de aflatoxinas [22]. Inquieta la frecuencia de aislamiento de *A. flavus*, los cuales frente a factores ambientales específicos pueden producir las AFB_1 y AFB_2, potentes metabolitos teratogénicos y carcinogénicos [21, 27, 28, 29, 30].

CONCLUSIONES

Se constató la presencia de los siguientes hongos asociados a las semillas de maní: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhyzopus* spp. y *Sclerotium* spp.

Del 52 % de las semillas que presentaron contaminación fúngica, se obtuvieron 57 aislamientos de *Aspergillus flavus*.

El estudio de la capacidad aflatoxigénica *in vitro*, de las cepas de *A. flavus* fue de un 12 %.

Los cuidados en el almacenamiento, en especial en el control de humedad y temperatura, ayudarían a la prevención de la contaminación fúngica en las semillas de maní, tanto para el consumo "in natura" como para productos industrializados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KRAPOVICKAS A. Y GREGORY W.C. *Taxonomy of the genus Arachis (Leguminosae).* Bonplandia 8: p. 1–186. 1994.
2. CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). *Conjunturas agropecuárias–especiais 2005. Amendoim análise perspectiva do mercado 2004–2005*. Março/2004. Disponible en http://www.conab.gov.br/centro.asp. Consultada el: 10 de Septiembre 2007.
3. BELTRÃO N.E.M. *A cultura do amendoim na agricultura familiar brasileira, 2001*. Disponible en http://www.21.sede.embrapa.gov.br/noticias. Consultada el: 18 de Diciembre 2007.
4. CASINI C.; MARTÍNEZ M.J. Y DARDANELLI J. *Maní. Características del maní argentino, 2007*; 168–171. Disponible en http://www.inta.gov.ar. Consultada el: 05 de Mayo 2008.
5. ROSSETTO C.A.V., CARVALHO V.N. Y MORAES L.T. *Contaminação fúngica do amendoim em função das doses de calcário e das épocas de amostragem.* Bragantia, Campinas 62: p. 437–445. 2003.
6. PITT J.I., DYER S.K. Y MCCAMMON, S. *Systemic invasion of developing peanut plants by Aspergillus flavus*. Let Appl Microbiol. 13: p. 16–20. 1991.
7. FERNANDEZ E., ROSOLEM C.A., MARINGONI A.C. Y OLIVEIRA D.M.T. *Fungus incidence on peanut grains as affected by drying method and Ca nutrition.* Field Crops Res. 52: p. 9–15. 1997.
8. ALMEIDA F., MORAES J. Y SANTOS R. *Influência do beneficiamento, da embalagem e do ambiente de armazenamento na qualidade sanitária de sementes de amendoim.* Rev. Bras Ol. Fibros. 2: p. 97–102. 1998.
9. BRUNO R.L.A., AZEREDO G.A., QUEIROGA V.P., ARAÚJO E. Y DINIZ E. *Qualidade fisiológica e microflora de sementes de amendoim cv. Br–1 durante o armazenamento.* Rev. Bras. Ol. Fibros. 4: p. 141–152. 2000.
10. MORAES S.A., MARIOTTO P.R. *Diagnóstico da patologia de sementes de amendoim no Brasil.* Rev. Bras. Sementes 7: p. 41–43. 1985.
11. HILL R.A., BLANKENSHIP P.D., COLE R.J. Y SANDER T.H. *Effect of soil moisture and temperature on preharvest invasion of peanuts by the Aspergillus flavus group and subsequent aflatoxin development*. Appl. Environ. Microbiol. 45: p. 628–633. 1983.
12. KUMEDA Y. Y ASSAO T. *Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of Aspergillus Section Flavi strains.* Appl. Environ. Microbiol. 67: p. 4084–4090. 2001.
13. ANGLE J.S., DUNN K.A. Y WAGNER G.H. *Effect of cultural practices on the soil populations of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus.* Soil Sc. Soc. Am. J. 46: p. 301–303. 1982.
14. MELOUK H.A. Y SHOKES F.M. *Management of soilborne fungal pathogens. Peanut health management.* Ed. The American Phytopathological Society. Minnesota USA p. 75–82. 1995.
15. FONSECA, H. *Sistema de amostragem para análise de aflatoxinas en grãos.* Rev. Microbiol. 21: p. 66–70. 1991.
16. VAN EGMONT H.P., JONKER M.A. En: Magan, N.; Olsen, M. *Mycotoxins in food. Detection and control*. Editorial Woodhead Publishing Limited. Capítulo 3: p. 49–68. 2004.
17. NEERGAARD P. *Seed Pathology*. The Mac Millan Press LTDA, London. Capítulo 2: p. 839. 1979.
18. FARIAS A.X. *Contaminacão endógena por Aspergillus spp. e seus telomorfos com potencial toxígeno em milho pós–colheita do estado do Paraná.* Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. p. 52. Tese de Mestrado. 1996.

19. BARNETT H.L. Y HUNTER B.B. *lustrated genera of imperfect fungi.* 3ra. Edição. Burgess Publishing Company, Minesota p. 209. 1972.

20. PITT J.I. Y HOCKING A.D. *Fungi and Food Spoilage*. 2da. Edición. Gaithersburg, MD, Blackie Academic & Professional p. 592. 1997.

21. KLICH M.A. Y PITT J.I. *Differentiation of Aspergillus flavus from A. parasiticus and other closely related species*. Transactions of the British Mycological Society 91: p. 99–108. 1988.

22. DAVIS N.D., IYER S.K. Y DIENER U.L. *Improved method of screening for afaltoxin with a coconut agar medium.* Appl. Environ. Microbiol. 53: p. 1593–1595. 1987.

23. DINIZ S.P. *Micotoxinas.* Livraria e Editora Rural. 1ra. Edición p. 181. 2002.

24. MERONUCK R.A. *The significance of fungi in cereal grains.* Plant Dis 71: p. 287–291. 1987.

25. SOAVE J. Y WETZEL M.M.V. (EDS). *Patologia de Sementes***.** 5ta. Edición. Fundação Cargil. Campinas p. 347–357. 1987.

26. LIN M.T. Y DIANESE J.C. *A coconut–agar medium for rapid detection of aflatoxin production by Aspergillus spp.* Phytopatol. 66: p. 1466–1469. 1976

27. WICKLOW D.T. *The mycology of stored grain: An ecology perspective.* Stored grain ecosystems 7: p. 197–249. 1995.

28. DHINGRA O.D. Y NETTO R.A.C. *Micotoxinas em grãos*. RAPP 6: p. 49–101. 1998.

29. GURJÃO, K.C.O. *Qualidade fisiológica, nutricional e sanitária de sementes armazenadas de amendoim (Arachis hypogaea L.), produzidas no semi–árido nordestino*. Dissertação de mestrado, UFPB–CCT–Campus II, Curso de pós–graduação em engenharia agrícola p. 88. 1995.

30. GUZMÁN DE PEÑA D. *La exposición a la aflatoxina B_1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública.* Salud Pública Mex. 49: p. 227–235. 2007.

Recibido: 11/03/09.
Aprobado: 04/09/09.

- Martha Gladys Medvedeff
  Bioquímica. Doctor en Ciencias Técnicas. Cargo: Profesor Adjunto. Categoría Sistema de Incentivos: III.

- María Celina Vedoya
  Bioquímica. Maestría en Tecnología en Alimentos con tesis en desarrollo. Cargo: Jefe de Trabajos Prácticos. Categoría Sistema de Incentivos: III.

- María Elena Schapovaloff
  Licenciatura en Genética. Carrera de Doctorado en desarrollo. Cargo: sin cargo. Categoría Sistema de Incentivos: sin categoría.

- Isabel Any Señuk
  Estudiante de Licenciatura en Genética. Cargo: sin cargo. Categoría Sistema de Incentivos: sin categoría.

1. Cátedra de Micología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. UNaM. Avenida Mariano Moreno 1375. Posadas (3300). Misiones. Argentina. E-mail: micologia@fceqyn.unam.edu.ar

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 11 / Nº 12 / 2009 / 27–33

Aeromonas spp. involucradas en infecciones extraintestinales diagnosticadas en centros de salud de Posadas, Misiones

Marina, Quiroga; María Teresa Lezcano; Bibiana Martín Talavera

Aeromonas spp. involved in extraintestinal infections diagnosed in health centers of Posadas, Misiones

ABSTRACT

We studied 21 *Aeromonas* strains involved in extraintestinal infections diagnosed in health centers of Posadas in the period 2002-2006. A 90.5 % of the isolations were coming from skin, wounds and bone infections. The average age of the patients was 53 years old, with predominance of males. The susceptibility to different antimicrobial agents was determined. Hydrolysis on ß-lactams and the presence of ß-lactameses were investigated by the iodometric method on agar and by phenotypic methods, respectively.

All of the strains showed hydrolytic activity in front of two or more ß-lactams. By phenotypic methods, the production of inducible ß-lactamases was detected but no ßLEE and metallo-ß-lactamases were detected.

Our results support the hypotheses that it would be possible that the resistance acquired in *Aeromonas* spp. is associated to the use of antimicrobial agents and mediated by enzymatic mechanisms and selective pressure caused by excess of prescriptions.

KEY WORDS: *Aeromonas*, extraintestinal infections, susceptibility, antimicrobial agents.

RESUMEN

Estudiamos 21 cepas de *Aeromonas* involucradas en infecciones extraintestinales diagnosticadas en centros de salud de Posadas en el período 2002-2006. El 90,5 % de los aislamientos provenían de infecciones de piel, partes blandas y hueso. La edad promedio de los pacientes fue de 53 años, con predominio del sexo masculino.

Se determinó la sensibilidad a diferentes antimicrobianos. La hidrólisis de ß-lactámicos y la presencia de ß-lactamasas se investigaron por el método iodométrico en agar y por métodos fenotípicos, respectivamente.

Todas las cepas mostraron actividad hidrolítica frente a dos o más ß-lactámicos. Se detectó fenotípicamente la producción de ß-lactamasas inducibles no así la de ßLEE ni de metalo-ß-lactamasas.

Nuestros resultados apoyan las hipótesis de que sería posible que la resistencia adquirida en *Aeromonas* spp. esté asociada al uso de antimicrobianos y mediada por mecanismos enzimáticos y presión selectiva causada por exceso de prescripciones.

PALABRAS CLAVE: *Aeromonas*, infecciones extraintestinales, susceptibilidad, antimicrobianos.

INTRODUCCIÓN

Los miembros de la familia *Aeromonadaceae* han sido reconocidos hace más de 100 años. Durante muchos años, el mayor foco de atención respecto a esta familia se centró en su rol como patógenos de reptiles, anfibios y en especial, peces.

En 1968, una publicación de Von Graevenitz y Mensch [1] hizo que el estudio de estos microorganismos derivara hacia su rol como potenciales patógenos humanos.

Actualmente, la participación de estos microorganismos en gran variedad de infecciones humanas ha sido documentado mundialmente [2, 3], sugiriendo una etiología compleja en que las cepas poseen una variedad de factores de virulencia en diferentes asociaciones [4].

De entre los síndromes clínicos documentados destacan: bacteriemias y septicemias en pacientes inmunodeprimidos [5, 6, 7]; meningitis tanto en niños como en adultos [8]; peritonitis [9]; infecciones de tejidos blandos y huesos [6]; infecciones del tracto respiratorio en inmunocompetentes [10] e inmunocomprometidos [11,12]; raras infecciones oculares [13, 14]; y síndrome urémico hemolítico [15].

En los últimos años, ha sido informado su aislamiento en prostatitis y shock séptico [16]; fascitis necrotizante [17]; traqueobronquitis [18]; cistitis [19], entre otras infecciones humanas.

Respecto a su resistencia a antimicrobianos, diversos autores han propuesto que las especies de *Aeromonas* son capaces de adaptarse rápidamente a las drogas usadas comúnmente en medicina, representando un riesgo a la salud pública [20].

Por otra parte, ya ha sido informado [21, 22] que en estos microorganismos el inóculo bacteriano y la producción de múltiples ß–lactamasas, que se caracterizan por ser

inducibles, es crítica para la manifestación de un fenotipo de resistencia.

En la última década, han aumentado los informes acerca de una alta mortalidad relacionada a infecciones extraintestinales causadas por *Aeromonas* spp., en especial en pacientes inmunocomprometidos [17, 23, 24].

Algunos microbiólogos [25] opinan que esto podría ser debido al poco conocimiento existente acerca de los patrones de resistencia que exhiben estas cepas extraintestinales, lo que impediría establecer un tratamiento empírico exitoso.

Por lo antes expuesto, hemos desarrollado este trabajo con el objetivo de conocer algunos rasgos epidemiológicos, estudiar la sensibilidad a antimicrobianos y detectar la presencia de enzimas ß–lactamasas en cepas de *Aeromonas* involucradas en infecciones extraintestinales diagnosticadas en pacientes internados en distintos centros de salud de la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se incluyeron en el estudio 21 cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de infecciones extraintestinales en el período 2002–2007, en pacientes internados en el Hospital Central "Dr. Ramón Madariaga" y sanatorios privados de la ciudad de Posadas, Misiones.

Las cepas, conservadas en agar blando (caldo tripticasa soya, CTS + 7 0/00 agar–agar) a temperatura ambiente y en la oscuridad, fueron transferidas a placas de agar sangre, con técnica para aislamiento, a fin de corroborar su viabilidad y pureza.

La identificación bioquímica se realizó según metodología convencional [26].

Estudio de sensibilidad a antimicrobianos

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el método de dilución en medio líquido según normas y puntos de corte definidos por el CLSI [27].

Se ensayaron los siguientes antimicrobianos (droga pura de potencia conocida): ampicilina (AMN), gentamicina (GEN), trimetoprima–sulfametoxazol (TMS) y ciprofloxacina (CIP) de laboratorios Bagó, sulbactama (en asociación con ampicilina) (AMS) y cloranfenicol (CMP) de laboratorios Pfizer, cefalotina (CTN) y ceftazidima (CAZ) de Glaxo, cefotaxima (CTX) de Hoechst Marion Roussel, cefepima (FEP) y amicacina (AKN) de Bristol–Myers Squibb e imipenem (IMP) de Merck–Sharp and Dohme, todos ellos de Argentina.

Como controles se utilizaron cepas patrones: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Estudio de la actividad hidrolítica frente a ß–lactámicos

Los ensayos de hidrólisis de ß–lactámicos de las cepas en estudio se realizaron por el método iodométrico en agar [28] trabajando con extractos enzimáticos crudos.

Para la obtención del extracto enzimático, una ansada de un cultivo de 24 hs de cada microorganismo fue transferida a un tubo estéril conteniendo 5 ml de caldo tripticasa soya (CTS) el que se incubó en incubador Shaker a 120 r.p.m, 35 ºC durante 6 hs. Luego del período de incubación, 1 ml del CTS fue transferido a un tubo cónico estéril conteniendo 9 ml de CTS fresco que se incubó a 120 r.p.m, 35º C durante 18 hs adicionales.

Cumplidos estos pasos se procedió a centrifugar los tubos a 5000 r.p.m. durante 20 minutos, con enfriamiento a 4 ºC cada 5 minutos.

El sobrenadante fue descartado y el sedimento se resuspendió en 5 ml de buffer fosfato 20 mM, pH 7 y se reiteró el proceso de centrifugación descrito.

Se descartó el sobrenadante y los pellets fueron resuspendidos en 3 ml de buffer fosfato 20 mM, pH 7 y sometidos a agitación con vórtex.

La ruptura celular se realizó por un proceso de congelación (-20 ºC)/descongelación (temperatura ambiente), 10 veces.

Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12000 r.p.m. a 4 ºC durante 15 minutos.

Los extractos enzimáticos crudos fueron alicuotizados y conservados a –20º C hasta su utilización.

Para realizar el método iodométrico en agar [28], a 20 ml de medio de agar–almidón (0,5 gr de almidón soluble + 1,5 gr de agar–agar en 100 ml de buffer fosfato 0,1 M pH 7,0), fundido y termostatizado a 45 ºC, se adicionó el substrato en concentración adecuada y 320 µl de una solución de I_2 / I^- (2 % I_2, 55 % IK). La mezcla se homogeneizó y se volcó en placas de vidrio de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado, se sembraron en cada placa 20 µl de los extractos enzimáticos crudos. Las placas fueron incubadas a 4 ºC, al abrigo de la luz durante 18 hs. Las lecturas se realizaron cada 4 hs.

Se ensayaron los siguientes substratos (concentración final): ampicilina (AMN, 500 µg/ml), cefalotina (CTN, 500 µg/ml), oxacilina (OXA, 500 µg/ml), cefoxitina (FOX, 1000 µg/ml) e imipenem (IMP, 1000 µg/ml).

La formación de un punto de decoloración en el sitio de depósito de la gota, debida a la reducción del iodo en presencia de los productos originados por la hidrólisis enzimática de los distintos antibióticos, fue considerada indicativo de la presencia de enzimas ß–lactamasas en los extractos (reacción positiva).

Los ensayos se realizaron por duplicado.

Búsqueda de ß–lactamasas

La búsqueda de la presencia de ß–lactamasas se realizó por métodos fenotípicos.

Los discos de antimicrobianos utilizados CTN (30 µg), FOX (30 µg), CAZ (30 µg), CTX (30 µg), cefotaxima –clavulánico (CTX–clav, 30/10 µg) y ceftazidima–clavulánico (CAZ–clav, 30/10 µg) así como los discos con los inhibidores ácido etilendiaminotetracético (EDTA, 372 µg) y ácido borónico (BOR, 300 µg) fueron provistos por Laboratorios Britania, Argentina. Los discos de IMP fueron provistos por OXOID, Argentina y los de amoxicilina–clavulánico (AMC, 20/10 µg) por BBL, Argentina.

Como control positivo se utilizó la cepa *Aeromonas hydrophila* AE036.

La producción de ß–lactamasas inducibles tipo AmpC se investigó con la técnica propuesta por Sanders [29] con discos de IMP y FOX, y el ensayo de sinergia con ácido borónico [30] con discos de CTN y FOX.

Para la búsqueda de ß–lactamasas de espectro extendido (ßLEE) se utilizaron: la metodología descripta por Jarlier [31] con discos de CAZ, CTX y AMC; y la propuesta por el CLSI con discos de CTX, CAZ, CTX–clav y CAZ–clav [32].

La búsqueda de metalo–ß–lactamasas se realizó utilizando el ensayo de Hodge modificado [33] con discos de IMP; el método descripto por Yong con discos de IMP e IMP/EDTA [34] y el ensayo de sinergia con discos de IMP y EDTA [33].

RESULTADOS

Durante el Período 2002–2006 se recuperaron, de muestras clínicas extraintestinales, 21 cepas de *Aeromonas* spp. En el 76,2 % de dichas muestras, *Aeromonas* spp. fue el único microorganismo recuperado.

Diecinueve aislamientos (90,5 %) provenían de infecciones de piel, partes blandas y hueso: 6 de heridas cortantes, 6 de traumatismos óseos, 3 de úlceras infectadas, 2 de heridas quirúrgicas y 1 de pie diabético. En 1 caso sólo se informó herida sin mayor especificación. Las cepas restantes fueron recuperadas, 1 de líquido abdominal y 1 de absceso pulmonar.

La edad promedio de los pacientes involucrados fue de 53 años (rango 11–71 años), predominando los de sexo masculino (81 %).

Se identificaron: 19 *A. hydrophila* (90,4 %), 1 *A. jandaei* (4,8 %) y 1 *A. schubertii* (4,8 %).

Los resultados obtenidos en los estudios de sensibilidad (CIM_{90}) se muestran en la Tabla 1.

Todos los extractos enzimáticos de las cepas en estudio mostraron actividad hidrolítica frente a dos o más ß–lactámicos. AMN, IMP, OXA y FOX fueron los antimicrobianos más afectados.

El 100 % de los extractos hidrolizaron a AMN e IMP simultáneamente. De ellos, 11 (52,4 %) hidrolizaban también OXA y FOX, 3 (14,3 %) CTN, OXA y FOX, 2 (9,5 %) CTN y OXA, 1 (4,8 %) FOX y 1 (4,8 %) CTN (Tabla 2).

Tabla 1. CIM_{90} a distintos antimicrobianos de 21 cepas extraintestinales de *Aeromonas* spp.

Antimicrobiano	CIM90 (µg/ml)	Rango (µg/ml)
AMN	128	32–256
AMS	64/32	4/2–128/64
CEF	256	8–512
CTX	0,25	0,015–0,5
CAZ	0,5	0.015–2
FEP	0,125	0,03–0,5
IMP	1	0,06–4
CIP	0,5	0,004–1
CMP	2	0,25–2
TMS	0,5/9,5	0,008/0,15– 8/152
GEN	1	0,125–1
AKN	1	0,06–1

AMN: ampicilina, AMS: ampicilina–sulbactama, CEF: cefalotina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepima, IMP: imipenem, CIP: ciprofloxacina, CMP: cloramfenicol, TMS: trimetoprima–sulfametoxazol, GEN: gentamicina, AKN: amicacina.

Tabla 2. Hidrólisis de ß–lactámicos por el método iodométrico de extractos crudos de 21 cepas extraintestinales de *Aeromonas* spp.

Nº de cepas que hidrolizaron*	% de cepas que hidrolizaron*	Antimicrobianos				
		AMN	CTN	OXA	FOX	IMP
n=11	52,4	+	-	+	+	+
n=3	14,3	+	+	+	+	+
n=3	14,3	+	-	-	-	+
n=2	9,5	+	+	+	-	+
n=1	4,8	+	-	-	+	+
n=1	4,8	+	+	-	-	+
Total (%)		21 (100)	6 (28,6)	16 (76,2)	15 (71,4)	21 (100)

*método iodométrico, AMN: ampicilina, CTN: cefalotina, OXA: oxacilina, FOX: cefoxitina, IMP: imipenem, +: positivo, -: negativo.

Utilizando FOX e IMP como inductores, en 12/21 (57,1 %) de los aislamientos se detectó la presencia de ß–lactamasas inducibles, comportándose FOX (10/12; 83,3 %) como mejor inductor que IMP (6/12; 50 %). Cuatro (4) aislamientos dieron resultado positivo con ambos antimicrobianos.

La sinergia con ácido borónico y cefalotina (11/21, 52,4 %) fue mejor indicador de la presencia de ß–lactamasas inducibles que dicha sinergia con cefoxitina (6/21, 28,6 %). Cinco (5) de estos aislamientos dieron un resultado positivo con ambos antimicrobianos.

Ninguna de las cepas de *Aeromonas* estudiadas mostraron fenotípicamente la producción de ßLEE ni de metalo–ß–lactamasas.

DISCUSIÓN

Aeromonas spp., microorganismos ubicuos de medios acuáticos, presentan una distribución mundial.

Son agentes etiológicos de enfermedades en peces, reptiles y anfibios, siendo recuperados frecuentemente de agua, suelos y alimentos [2, 35].

El rol de estos microorganismos en gran variedad de infecciones humanas ha sido documentado mundialmente

[2, 36, 37], siendo poco frecuente su aislamiento en infecciones extraintestinales tanto adquiridas en la comunidad como hospitalarias.

A pesar de las dificultades que implica su caracterización fenotípica [38], la diferenciación de cepas individuales de *Aeromonas* a nivel de especie es de importancia clínica y epidemiológica dada la variabilidad inter–especie en sus factores de virulencia, en los perfiles de susceptibilidad a antimicrobianos y en la distribución geográfica [39].

La identificación de los aislamientos incluidos en este estudio coincide con lo referido en la literatura, donde se informa que sólo cinco especies: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii* biotipo *sobria* y biotipo *veronii*, *Aeromonas jandaei* y *Aeromonas schubertii*, han sido incuestionablemente establecidas como patógenos humanos, en virtud a su aislamiento (en cultivo puro) de infecciones extraintestinales. De ellas *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* y *Aeromonas veronii* biotipo *sobria* representan más del 85 % de los aislamientos clínicos [2].

Analizando los resultados, observamos que la edad promedio de nuestros pacientes (53 años, rango 11–71 años) coincide con lo referido por otros autores [40, 41]. Por otro lado, el predominio de las infecciones en hombres en nuestro trabajo (81 %), también es coincidente con lo relatado en la literatura [40, 41, 42, 43].

Esta relación de infecciones extraintestinales por *Aeromonas*, edad adulta y sexo masculino, podría deberse a la mayor posibilidad, en dicha franja etaria y género, de sufrir enfermedades malignas y enfermedades de base asociadas como enfermedades crónicas del hígado y cirrosis [44].

El mayor porcentaje (90,5 %) de nuestros aislamientos provenían de infecciones de piel, partes blandas y hueso. Probablemente, los principales factores de riesgo pueden haber sido las lesiones en contacto con agua contaminada, el suelo o cuerpos extraños. Hallazgos que han sido ampliamente descriptos en la literatura [45, 46].

En nuestro estudio, sólo en el 23,8 % de los casos, *Aeromonas* spp. se encontraban asociadas a otros microorganismos. Dicho porcentaje es menor a otros informes de la literatura [40, 45, 47].

La sensibilidad a antimicrobianos tanto de aislamientos clínicos, particularmente de origen intestinal, como ambientales de *Aeromonas* spp. ha sido ampliamente estudiada [35, 48, 49] presentándose como intrínsecamente susceptible a todos los antimicrobianos activos frente a bacilos Gram negativos no fastidiosos, con excepción de los ß–lactámicos.

En este estudio, la sensibilidad de los aislamientos extraintestinales refleja lo informado por otros autores [2, 49, 50]. Los hallazgos mostraron ser uniformemente resistentes a ampicilina y susceptibles a las cefalosporinas de 3º y 4º generación, carbapenemes, aminoglucósidos, cloranfenicol y ciprofloxacina, presentando un bajo nivel de resistencia a trimetoprima–sulfametoxazol y alta resistencia a cefalotina y al inhibidor sulbactama.

En cepas de *Aeromonas* ha sido descripta la presencia de múltiples ß–lactamasas (cefaloporinasas de clase molecular C, oxacilinasas de clase molecular D, metalo–ß–lactamasas de clase molecular B) [51, 52, 53], cada una de las cuales muestra selectividad frente a distintos sustratos, pero que al expresarse en conjunto se superponen.

La presencia de mecanismos enzimáticos participantes en la resistencia a ß–lactámicos de nuestras cepas, también fue observada en este estudio.

Se demostró la presencia de ß–lactamasas inducibles, por métodos fenotípicos, en más del 50 % de las cepas.

Ya ha sido descrito [54, 55] que muchas especies bacterianas, entre ellas *Aeromonas* spp., poseen ß–lactamasas cromosómicas inducibles que normalmente se expresan a muy bajos niveles. Sin embargo, en presencia de un inductor dicha producción enzimática se incrementa.

Los antibióticos ß–lactámicos difieren en su poder inductor, siendo cefoxitina e imipenem los más potentes. En este estudio, cefoxitina se comportó como mejor inductor que imipenem.

El aspecto clínico más importante de este fenómeno, es la emergencia de cepas resistentes que se asocian a fallas terapéuticas, ya que, por presión antibiótica, podrían emerger mutantes resistentes con síntesis de ß–lactamasas genéticamente desreprimida [56].

Respecto a la producción de ßLEE en cepas de *Aeromonas*, no es un evento frecuente. En la Argentina, recién en el año 2007, se realizó el primer informe de aislamiento de *Aeromonas* spp. portadora de ßLEE [57], hecho que no hemos detectado en este estudio.

Los extractos celulares mostraron actividad hidrolítica frente a penicilinas, cefalosporinas e imipenem, lo que indicaría la presencia de al menos dos enzimas diferentes, entre ellas una capaz de hidrolizar imipenem.

Esta conclusión se basa en el hecho de que en *Aeromonas* spp., las enzimas capaces de hidrolizar imipenem son consideradas verdaderas carbapenemasas, ya que poseen escasa actividad hidrolítica frente a sustratos diferentes a los carbapenemes [21].

La ausencia de su detección fenotípica podría deberse a que la expresión de metalo–ß–lactamasas en *Aeromonas* tiene niveles basales, siendo necesaria su inducción ó desrepresión para detectarlas fenotípicamente, aspecto que hemos observado en nuestras cepas [58] y que fuera ya descrito por otros autores [59].

CONCLUSIONES

Nuestros resultados apoyan las hipótesis de otros autores quienes refieren que sería posible que la resistencia adquirida en *Aeromonas* spp. esté asociada al uso de antimicrobianos [60] y mediada por mecanismos enzimáticos y presión selectiva causada por un exceso de prescripciones [20].

Si bien las infecciones extraintestinales por *Aeromonas* spp. no son frecuentes y las enzimas que producen, al ser de origen cromosómico, no resultan particularmente preocupantes todavía, la amplia difusión de estos microorganismos en el medio ambiente los transforma en excelentes reservorios.

Por otra parte, el uso de antibióticos no ha disminuido, menos aún en áreas en desarrollo, por lo que no sería descabellado imaginar un futuro donde la presión selectiva nos enfrente a aislamientos multirresistentes, con el consecuente problema terapéutico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **VON GRAEVENITZ A., MENSCH A.** *The genus Aeromonas in human bacteriology: report of 30 cases and review of the literature.* N. Engl. J. Med. 1968; 278:245–9.
2. **JANDA J., ABBOTT S.** *Evolving concepts regarding the genus Aeromonas: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions.* Clin. Infect. Dis. 1998; 27:332–44.
3. **JONES B., WILCOX M.** *Aeromonas infections and their treatment.* J. Antimicrob. Chemother. 1995; 35:453–61.
4. **MOYER N.** Clinical significance *of Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. J. Clin. Microbiol. 1987; 25:2044–8.
5. **BARILLO D., MCMANUS A., CIOFFI W., MCMANUS W., KIM S., PRUITT B. JR.** *Aeromonas bacteriemia in burn patients.* Burns. 1996; 22:48–52.
6. **JANDA J., ABBOTT S.** Human pathogens. En: *The genus Aeromonas.* Austin B., Altwegg M., Gosling P., Joseph S., eds. John Wiley & Sons. Chichester, England. 1996; pp.151–173.
7. **PURDUE G, HUNT J.** *Aeromonas hydrophila infection in burn patients.* Burns. 1988; 14:220–1.
8. **PARRAS F., DÍAZ M., REINA J., MORENO S., GUERRERO C., BOUZA E.** *Meningitis due to Aeromonas species: case report and review.* 1993; Clin. Infect. Dis. 17:1058–60.
9. **MUÑOZ P., FERNÁNDEZ BACA V., PELÁEZ T., SÁNCHEZ R., RODRÍGUEZ CRÉIXEMS, M., BOUZA E.** *Aeromonas peritonitis.* Clin. Infect. Dis. 1994; 18:32–7.
10. **BADDOUR L, BASELSKI B.** *Pneumonia due to Aeromonas hydrophila complex: epidemiologic, clinical, and microbiologic features.* South Med. J. 1988; 81:461–3.
11. **STECIW A., COLODNY S.** *Empyema due to Aeromonas hydrophila.* Clin. Infect. Dis. 1994; 18:474–5.
12. **TAKANO Y., ASAO Y., KOHRI Y., OIDA K., IMANAKA T.** *Fulminant pneumonia and sepsis due to Aeromonas hydrophila in an alcohol abuser.* Intern. Med. 1996; 35:410–2.
13. **FRIELING J., ROSENBERG R., EDELSTEIN M., COLBY S., KOPELOTWIZ N.** *Endogenous Aeromonas hydrophila endophthalmitis.* Ann. Ophthalmol. 1989; 21:117–8.
14. **SIRE J., ROPERT P., DONNIO P.** *Aeromonas hydrophila blepharoconjunctivitis.* Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1990; 9:904–5.
15. **BOGDANOVIC R., COBELJIC M., MARKOVIC V., NIKOLOVIC V., OGNJANOVIC M., SARJANOVIC L., MAKIC D.** *Haemolytic–uraemic syndrome associated with Aeromonas hydrophila enterocolitis.* Pediatr. Nephrol. 1991; 6:221–2.
16. **HUANG H.C. , YU W.L., HUAN K.H., CHENG K.C., CHUANG Y.C.** *Aeromonas sobria prostatitis and septic shock in a healthy man with chronic alcoholic consumption.* Jpn. J. Infect. Dis. 2007; 60(6):400–1.
17. **CUI H., HAO S., AROUS E.** *A distinct cause of necrotizing fascitis: Aeromonas veronii biovar sobria.* Surg. Infect. (Larchmt). 2007; 8(5):523–8.
18. **BOSSI–KÜPFER M., GENINI A., PEDUZZI R., DEMARTA A.** *Tracheobronchitis caused by Aeromonas veronii biovar sobria after near–drowning.* J. Med. Microbiol. 2007; 56 (Pt 11):1563–4.
19. **AL–BENWAN K., ABBOTT S., JANDA J.M., HUYS G., ALBERT M.J.** *Cystitis caused by Aeromonas caviae.* J. Clin. Microbiol. 2007; 45(7):2348–50.
20. **BIZANI D., BRANDELLI A.** *Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among Aeromonas spp. isolated from water of a bovine abattoir.* Braz. J. Microbiol. 2001; 32:334–9.
21. **ROSSOLINI G., WALSH T., AMICOSANTE G.** *The Aeromonas metallo–ß–lactamases: genetic, enzymology, and contribution to drug resistance.* Microb. Drug. Res. 1996; 2:245–52.
22. **ROSSOLINI G., ZANCHI A., CHIESURIN A., AMICOSANTE G., SATTA G., GUGLIELMETTI P.** *Distribution of cphA or related carbapenemase–encoding genes and production of carbapenemase activity in members of the genus Aeromonas.* Antimicrob. Agents Chemother. 1995; 39:346–9
23. **STANO F., BRINDICCI G., MONNO R., RIZZO C., GHEZZANI F., CARBONARA S., GUAGLIANONE E., DONELLI G., MONNO L.** *Aeromonas sobria sepsis complicated by rhabdomyolysis in an HIV–positive patient: case report and evaluation of traits associated with bacterial virulence.* Int. J. Infect. Dis. 2009; 13(3):e113–8.
24. **CLARK N.M., CHENOWETH C.E.** *Aeromonas infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature.* Clin. Infect. Dis. 2003; 37(4):506–13.
25. **BALOTESCU C., ISRAIL A., RADU R., ALEXANDRU I., DOBRE G. ROUM.** *Aspects of constitutive and acquired antibioresistance in Aeromonas hydrophila strains isolated from water sources.* Arch. Microbiol. Immunol. 2003; 62(3–4): 179–89.
26. **ABBOT S., CHEUNG W., JANDA J.M.** *The genus Aeromonas: biochemical characteristics, atypical reactions and phenotypic identification schemes.* J. Clin. Microbiol. 2003; 41:2348–57.
27. Clinical Laboratory Standards Institute. *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria.* 2006; M45–A. Vol. 26 No. 19, Wayne, Pa, USA.

28. QUINTEROS M., CORSO A., GALAS M., GUTKIND G., ROSSI A. *Clave orientadora para la detección de ß–lactamasas. C10 Libro de Resúmenes.* II Congreso Internacional de SADEBAC. 1990. Argentina

29. SANDERS C., SANDERS W. *Emergence of resistance to cefamandole: possible role of cefoxitin–inducible ß–lactamases.* Antimicrob. Agents Chemother. 1979; 15:792–7.

30. SONG W., BAE I.K., LEE Y.N., LEE C.H., LEE S.H., JEONG S.H. *Detection of extended–spectrum beta–lactamases by using boronic acid as an AmpC beta–lactamase inhibitor in clinical isolates of Klebsiella spp. and Escherichia coli.* J. Clin. Microbiol. 2007; 45(4):1180–4.

31. JARLIER V., NICOLÁS M., FOURNIER G., PHILLIPON A. *Extended broad–spectrum ß–lactamases conferring transferable resistance to newer ß–lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns.* Rev. Infect. Dis. 1988; 10:867–78.

32. Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement.* 2007; M100–S17. Vol. 27 No. 1, Wayne, Pa, USA.

33. LEE K., CHONG Y., SHIN H.B., KIM Y.A., YONG D., YUM J.H. *Modified Hodge and EDTA–disk synergy tests to screen metallo–ß–lactamase–producing strains of Pseudomonas and Acinetobacter species.* Clin. Microbiol. Infect. 2001; 7(2):88–102.

34. YONG D., LEE K., YUM J.H., SHIN H.B., ROSSOLINI G.M., CHONG Y. *Imipenem–EDTA disk method for differentiation of metallo–ß–lactamases–producing clinical isolates of Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp.* J. Clin. Microbiol. 2002; 40(10):3798–3801.

35. BENASSI F., VERGARA M., VON SPECHT M., GARCÍA M., QUIROGA M., PUCCIARELLI A., ZUBRESKI E., LACZESKI M., MARTIN B., LEARDINI N., GUTKIND G. *Estudio de susceptibilidad a antibióticos ß-lactámicos en Aeromonas spp. de origen clínico, animal y ambiental.* Rev. Arg. Microbiol. 2001; 33(1):47–51.

36. LECLERC H., SCHWARTZBROD L., DEI–CAS E. *Microbial agents associated with waterborne diseases.* Crit. Rev. Microbiol. 2002; 28(4):371–409.

37. VON GRAEVENITZ A. *The role of Aeromonas in diarrhea: a review. Infection.* 2007; 35(2):59–64.

38. CARNAHAN A., BEHRAM S., JOSEPH S. *Aerokey II: a flexible key for identifying clinical Aeromonas species.* J. Clin. Microbiol.1991; 29:2843–49.

39. HSUEH P., TENG L., LEE L., YANG P., CHEN Y., HO S., LUH K. *Indwelling device–related and recurrent infections due to Aeromonas species.* Clin. Infect. Dis. 1998; 26:651–8.

40. TENA D., GONZÁLEZ–PRAETORIUS A., GIMENO C., PÉREZ–POMATA M T., BISQUERT J. *Infección extraintestinal por Aeromonas spp.: revisión de 38 casos.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2007; 25(4):235–41.

41. LLOPIS F., GRAU I., TUBAU F., CISNAL M., PALLARES R. *Epidemiological and clinical characteristics of bacteriemia caused by Aeromonas spp. as compared with Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa.* Scand. J. Infect. Dis. 2004; 36(5):335–41.

42. LAU S.M., PENG M.Y., CHANG F.Y. *Outcomes of Aeromonas bacteriemia in patients with different types of underlying disease.* J. Microbiol. Immunol. Infect. 2000; 33(4):241–7.

43. KO W.C., CHUANG Y.C. *Aeromonas bacteriemia: review of 59 episodes.* Clin. Infect. Dis. 1995; 20(5):1298–304.

44. Secretaria de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias. Subsecretaria de Relaciones Sanitarias e Investigación en Salud. Dirección de Estadísticas e Información de Salud. Sistema Estadístico de Salud. Estadísticas Vitales. Información Básica – 2005. 2005; Serie 5–Número 49.

45. GOLD W.L., SALIT I.E. *Aeromonas hydrophila infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review.* Clin. Infect. Dis. 1993; 16(1):69–74.

46. RAMOS J.M., CUENCA–ESTRELLA M., ESTEBAN J., SORIANO F. *Infección de partes blandas por Aeromonas hydrophila.* Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 1995; 13:469–72.

47. SEMEL J.D., TRENHOLME G. *Aeromonas hydrophila water–associated traumatic wound infections: a review.* J. Trauma. 1990; 30(3):324–7.

48. FRAISSE T., LECHICHE C., SOTTO A., LAVIGNE J.P. *Aeromonas spp. infections: retrospective study in Nîmes University Hospital,* 1997–2004. Pathol. Biol. (Paris). 2008; 56(2):70–6.

49. SADER H.S., JONES R.N. *Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non–enteric Gram–negative bacilli. Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25(2):95–109.

50. KO W.C., YU K.W., LIU C.Y., HUANG C.T., LEU H.S., CHUANG Y.C. *Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of Aeromonas strains in Taiwan.* Antimicrob. Agents Chemother. 1996; 40(5):1260–2.

51. HAYES M., THOMSON C., AMYES S. *The hidden carbapenemase of Aeromonas hydrophila.* J. Antimicrob. Chemother. 1996; 37:33–44.

52. WALSH T., PAYNE D., MACGOWAN A., BENNETT P. *A clinical isolate of Aeromonas sobria with three chromosomally mediated inducible ß–lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity.* J. Antimicrob. Chemother. 1995; 35:271–9.

53. WALSH T., STUNT R., NABI J., MACGOWAN A., BENNETT P. *Distribution and expression of ß–lactamase genes among Aeromonas spp.* J. Antimicrob. Chemother. 1997; 40:171–8.

54. BEDENITT B., ZAGAR Z. *Clinical and laboratory significance of inducible beta–lactamases.* Lijec Vjesn. 1995; 117(9–10):249–53.

55. SHANNON K., PHILLIPS I. *The effects on beta–lactam susceptibility of phenotypic induction and genotypic derepression of beta–lactamase synthesis.* J. Antimicrob. Chemother. 1986; 18 Suppl. E: 15–22.

56. PHILLIPS I., SHANNON K. *Importance of beta–lactamase induction.* Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1993; 12 Suppl. 1:S19–26.

57. FERREIRO M., MACHAIN M., GAZENEZZO M., FONTANAZZA A., RAPAPORT M., GALAS M., PASTERAN F. *Primer aislamiento de Aeromonas portadora de ß–lactamasa de espectro extendido (BLEE) en Argentina.* Rev. Arg. Microbiol. 2007; 39(Supl.1):78.

58. QUIROGA M., LEZCANO M.T., MARTIN TALAVERA B., CÁCERES M.G, VERGARA M. *Behavior against ß–lactams in resistant variants of Aeromonas spp. selected in vitro under antibiotic pressure.* J. Chemother. *En prensa.*

59. FOSSE T., GIRAUD MORIN C., MADINIER I. *Phenotypes of beta–lactam resistance in the genus Aeromonas.* Pathol. Biol. (Paris). 2003; 51(5):290–6.

60. MALUPING R.P., LAVILLA PITOGO C.R., DEPAOLA A., JANDA J.M., KROVACEK K., GREKO C. *Antimicrobial susceptibility of Aeromonas spp., Vibrio spp. and Plesiomonas shigelloides isolated in the Philippines and Thailand.* Int. J. Antimicrob. Agents. 2005; 25:345–53.

Recibido: 28/08/09.
Aprobado: 26/09/09.

- Marina Quiroga
  Bioquímica. Especialista en Microbiología Clínica. Doctor de la Universidad de Buenos Aires, área microbiología. Profesor Adjunto. Cátedra Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN. UNaM. Categoría III. marinaquiroga@fceqyn.unam.edu.ar.

- María Teresa Lezcano
  Bioquímica. Becaria Investigación CEDIT. Cátedra Bacteriología, Carrera de Bioquímica, FCEQyN. UNaM. Sin Categoría. terelezmaciel@yahoo.com.ar.

- Bibiana Martín Talavera
  Bioquímica. JTP. Cátedra Microbiología General, Carrera Ingeniería Química, FCEQyN. UNaM. Categoría IV. bmartin@fceqyn.unam.edu.ar.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Av. Mariano Moreno 1375. (3300) Posadas, Misiones.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 11 / Nº 12 / 2009 / 34–40

Enfermedad Invasiva Neumocócica (EISPn) en Pediatría: cinco años de vigilancia de la resistencia a β–lactámicos en Misiones, Argentina

Sandra L. Grenon, Gladis Z. Ayala, Lorena B. Leguizamón, Marcelo C. Salvi, Martha H. von Specht

Invasive Pneumococcal Disease (IPD) in children: five years of surveillance of resistance to penicillin in Misiones, Argentina

ABSTRACT

This work presents the results of the surveillance (2004–2008) for b-lactam resistant *Streptococcus pneumoniae* (Spn) in children with IPD (1 month to 14 years old) admitted at the Paediatric Hospital "Dr. Fernando Barreyro". One isolation for patient was considered. Minimal inhibitory concentration for penicillin (MICpen) and cefotaxime (MICctx) was performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute 2009.

The number of cases diagnosed amounted 129, with peaks in Winter and Spring. By 2008 a significant decrease (6,5 cases/year, r2 = 0,85) was observed. Fifty two percent were younger than 2 years old, 57.4 % being males. The isolates were from blood (79, 58.1 %), pleural (32, 23.9 %), cerebrospinal (13, 9.7 %), articular (4, 3.1 %) and others fluids (4, 3.1 %). Pneumonias were the most frequent (88 cases, 65 %, 34 of whom had empyema and 52 bacteraemia), followed bymeningitis (23, 18 %), sepsis (9, 7 %) and others.

Ninety–five strains (73 %) had CIMpen ≤ 0.06 mg/ml, 21 (16,3 %) between 0.12 – 1 mg/ml and 11 (8.5 %) of 2 mg/ml. The highest levels were detected in youngest children, no isolation had MICpen > 2 mg/ml or MICctx > 0,5 mg/ml. A decrease in levels of resistance to penicillin by 2008 was observed.

To maintain an active surveillance in the region is a clear need, so as to guide therapeutic policy and to control the spread of b-lactam resistant Spn.

KEY WORDS: *Streptococcus pneumoniae,* b-lactam resistance, surveillance.

RESUMEN

Este trabajo presenta los resultados de la vigilancia de *Streptococcus pneumoniae* (Spn) resistente a β–lactámicos en niños internados en el Hospital Pediátrico "Dr. Fernando Barreyro" entre enero de 2004 a diciembre de 2008. Fueron incluidos niños de 1 mes a 14 años con EISPn. Se consideró un aislamiento por paciente. Se realizó Concentración Inhibitoria Mínima a penicilina (CIMpen) y cefotaxima (CIMctx) de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009. Fueron diagnosticados 129 casos, con picos en invierno y primavera. Se observó un descenso de 6,5 casos por año (r2 = 0,85) hacia 2008. Cincuenta y dos por ciento eran menores de 2 años, 57,4 % eran varones. Los aislamientos fueron de sangre (79, 58,1 %), líquidos pleurales (32, 23,9 %), cefalorraquídeos (13, 9,7 %), articulares (4, 3,1 %) y otros (4, 3,1 %). Predominaron las Neumonías (88 casos, 65 %, 34 con empiema y 52 con bacteriemia), seguidos de meningitis (23, 18 %), sepsis (9, 7 %) y otros. Noventa y cinco asilamientos (73 %) presentaron CIMpen ≤ 0.06 µg/ml, 21 (16,3 %) entre 0.12–1 µg/ml y 11 (8,5 %) de 2 µg/ml, detectándose los mayores niveles entre los más pequeños. Ningún aislamiento tuvo CIM>/= 4µg/ml, ni CIMctx > 0.5µg/ml.

Se observó una disminución en los niveles de resistencia a penicilina hacia 2008.

Se evidencia la necesidad de mantener una vigilancia activa en la región para orientar conductas terapéuticas y controlar la diseminación de Spn resistente a β–lactámicos.

PALABRAS CLAVE: *Streptococcus pneumoniae,* resistencia a β–lactámicos, vigilancia.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad invasiva por *Streptococcus pneumoniae* (Spn) constituye un serio problema de Salud Pública por las tasas elevadas de morbi–mortalidad, particularmente en países en desarrollo. [1, 2, 3, 4, 5].

Aunque afecta a personas de todas las edades, su mayor incidencia se registra en niños menores de dos años y causa más de 1 millón de muertes en menores de 5 años en todo el mundo. Son frecuentes los casos de neumonía adquirida en la comunidad y es un importante agente etiológico de meningitis aguda en pediatría. [6, 7, 8, 9].

Se estima que más del 80 % de los niños con infecciones respiratorias agudas que fallecen tienen neumonía y

aproximadamente la mitad corresponden a *Streptococcus pneumoniae*. El mayor número de muertes se concentran en los países en desarrollo, donde las tasas son de 4 a 100 veces más elevadas que en países desarrollados, como Canadá o los Estados Unidos. [4, 10, 11, 12, 13] La colonización nasofaríngea precede tanto a la enfermedad no invasora como a la invasora. Generalmente, la infección se produce poco después de la colonización por un nuevo serotipo. El estado de portador constituye el único reservorio de la enfermedad, y contribuye a la selección de resistencias bacterianas cuando las cepas resistentes que colonizan la nasofaringe, son sometidas a tratamientos antibióticos (casi siempre injustificados) durante las infecciones de vías respiratorias altas de los niños. [14, 12, 13, 15].

Desde el advenimiento de la era antibiótica, Spn ha tenido un bajo nivel de resistencia a penicilina, siendo la terapéutica de elección por su inocuidad y bajo costo. [12].

En la década del 60 se iniciaron reportes internacionales acerca de la emergencia de cepas resistentes a penicilina, hecho que tuvo una amplia diseminación en las dos décadas siguientes [11, 16, 17].

Este dramático incremento de la resistencia antibiótica, se extendió a otras drogas, complicando el manejo de la infección neumocócica y diseminándose a todos los países del mundo, se convirtió en un problema grave de salud pública. [11].

El mecanismo de resistencia a los beta–lactámicos es cromosómico y se expresa con múltiples cambios en las proteínas de unión a penicilina (penicillin-binding proteins, PBP), permaneciendo como uno de los pocos patógenos a los que nunca se ha descripto producción de beta–lactamasas. [18, 19, 20, 21, 22].

Se acepta que la presión selectiva incrementada por el uso imprudente de antibióticos, particularmente entre los niños, ha afectado en forma preocupante a cefalosporinas de tercera generación. Modificar esta situación, sólo podría lograrse mediante la implementación de políticas de restricción del uso de antimicrobianos. [23, 11, 24, 25, 26, 27].

Si bien *Streptococcus pneumoniae* ha sido bastante sensible a otros antibióticos, en las últimas décadas se han reportado en forma progresiva cepas resistentes, incluso multirresistentes expresando diferencias regionales en la diseminación de las mismas. En nuestra provincia se reportó para el período 1998–2001 un 39 % de sensibilidad disminuida a penicilina (SDP), como también resistencia a cefotaxime (25 %), eritromicina (6,8 %), cloranfenicol (11 %) trimetoprima–sulfametoxazol (48 %) y tetraciclina (22 %), no detectándose resistencia a vancomicina, rifampicina ni ofloxacina. [28]

Ante los múltiples llamados lanzados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la importancia de promover y adoptar estrategias en la prevención y el control de las infecciones por este microorganismo [5, 9, 12, 11, 29] y con el objetivo de conocer los niveles de resistencia a betalactámicos en nuestra zona llevamos a cabo este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de la población y criterios de inclusión

Se presentan los resultados de la vigilancia de la resistencia a penicilina y cefotaxima desde enero de 2004 hasta diciembre de 2008.

Pacientes

Los criterios básicos de inclusión y exclusión fueron estandarizados para el grupo de estudio como niños de 1 mes a 14 años de edad con infección invasiva por *S. pneumoniae* (EISPn) internados en el hospital. Se ha considerado "enfermedad neumocócica invasiva" a todo aislamiento de *S. pneumoniae* en sangre, líquido cefalorraquídeo y otros lugares normalmente estériles de pacientes con la clínica correspondiente. [30, 28, 30].

Los casos se detectaron mediante la revisión diaria de los resultados de cultivos del laboratorio de Bacteriología, considerándose un asilamiento por paciente. Una vez identificado el paciente, se obtuvieron datos epidemiológicos y clínicos que se volcaron en una ficha confeccionada para tal fin. Se recabaron en cada caso datos de edad, sexo, y diagnóstico de egreso.

Se conformaron los siguientes grupos etarios: lactantes (</ = 2 años), pre escolares (> 2-4 años) y escolares (5-14 años). [28].

Aislamiento e Identificación de *S. pneumoniae*

Todos los neumococos fueron recuperados mediante aislamiento en agar sangre al 5 % (Base Britania, Argentina). Los microorganismos se caracterizaron por la morfología directa (coloración de Gram) y de las colonias, hemólisis alfa, reacción catalasa, susceptibilidad a Optoquina y solubilidad en sales biliares. La conservación de las cepas se realizó en hisopo seco a -20 ºC. [28].

Sensibilidad a penicilina y cefotaxima

Se evaluó la resistencia a penicilina y cefotaxima mediante Concentración Inhibitoria Mínima (CIMpen, CIMctx respectivamente). El test fue llevado a cabo e interpretado en base a las recomendaciones de macro dilución en caldo Mueller Hinton (Britania, Argentina) del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Los aislamientos

fueron clasificados en base a su resistencia e interpretados según CLSI 2009 (Tabla 1). [31, 32, 33].

Tabla 1. *Streptococcus pneumoniae.* Puntos de corte considerando infección meníngea y no meníngea según CLSI 2009.

	Sensible µg/ml	Intermedio µg/ml	Resistente µg/ml
Penicilina (infección no meníngea)	≤ 2	4	≥ 8
Penicilina (infección meníngea)	≤ 0,06	-	≥ 0,1
Cefotaxima/Ceftriaxona (infección no meningitis)	≤ 1	2	≥ 4
Cefotaxima/Ceftriaxona (meningitis)	≤ 0,5	1	≥ 2

Control de calidad

Se trabajó con la cepa *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 como microorganismo patrón. Los aislamientos fueron enviados al centro Nacional de Referencia INEI ANLIS Dr. Carlos Malbrán para confirmación de especies y de resistencia a penicilina y cefotaxima.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron ingresados y verificados mediante el programa Epi–Info 6.0. Los gráficos fueron construidos en el programa Excel 06 con el cual se realizó la evaluación de tendencias mediante análisis de correlación.

RESULTADOS

Número de aislamientos por año

Durante el período de estudio se diagnosticaron y documentaron el laboratorio 129 casos de EISPn, con variaciones anuales que oscilaron entre 39 y 14 casos. La tasa para todo el período fue de 871/100000 egresos en el hospital.

Estos casos confirmados, se produjeron durante todos los meses del año con picos definidos entre ellos. La mayor recuperación se produjo en invierno y primavera para los años 2004/2005. En 2006 se observó un descenso significativo que persistió durante los años siguientes de 6,5 casos por año con un r2 de 0,85 (Figura 2).

Pacientes, origen de los aislamientos y diagnóstico clínico

El 57,4 % de los niños era de sexo masculino, siendo de 1,34:1 la relación varón mujer. La edad media fue de 3 años y 8 meses y la mediana de 2 años (intervalo 1 mes a 14 años). El mayor porcentaje de casos correspondió a niños de 1 año o menores, 34 %, con una edad media de presentación de 6 meses (desviación estándar [DE]: 3; mediana: 7 meses). Al considerar a los menores de 2 años, este porcentaje ascendió al 52 % y a los menores de 5 años alcanzó el 70,5 %.

Además, los aislamientos se recuperaron de sangre (79 casos; 58,1 %), líquidos de punción pleural (32 casos; 23,9 %), líquidos cefalorraquídeos (13 casos; 9,7 %), líquidos articulares (4 casos; 3,1 %), y otras muestras (4 casos; 3,1 %).

Las manifestaciones clínicas más comunes fueron las neumonías (88 casos, 65 %, 34 de ellos con empiema y 52 con bacteriemia), seguidas de meningitis (23 casos; 18 %), sepsis (9 casos; 7 %) y otros. Las neumonías predominaron en todos los grupos etarios (Tabla 2).

Tabla 2. *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasivas, Hospital de Pediatría de Misiones. Distribución de los principales diagnósticos entre grupos etarios. Periodo (2004-2008) (N=129).

Grupos etarios	Neumonía	Meningitis	Sepsis	Otros (*)
Lactantes (N= 66)	42	13	7	5
Preescolares (N= 25)	18	4	1	2
Escolares (N= 38)	28	6	2	2
Totales	88	23	10	9

Referencias: (*) Otros diagnósticos: peritonitis (2 lactantes), fiebre sin foco: 3 lactantes y artritis: 3 lactantes y 1 pre escolar.

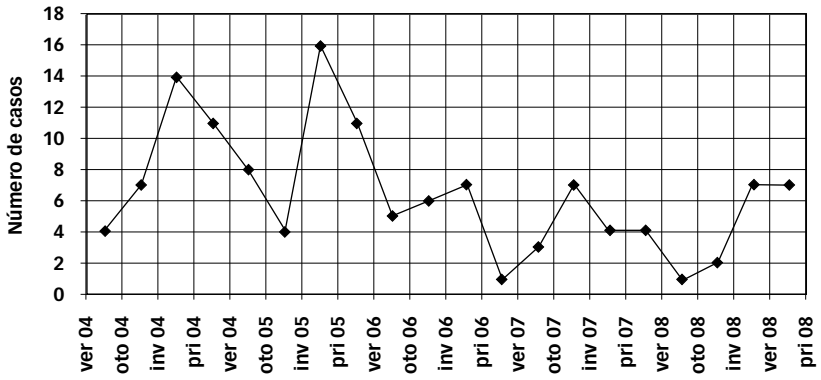


FIGURA 1: Distribución estacional de las infecciones invasivas neumocóccicas en el Hospital de Pediatría de Misiones. Período 2004-2008, (N=129). Referencias: ver: verano, oto: otoño, inv: invierno, pri: primavera. 04: Año 2004.

Sensibilidad a penicilina y cefotaxima

Los neumococos sensibles predominaron en todo el período de estudio. De los 129 aislamientos, 95 (73 %) fueron sensibles a Penicilina, presentando CIMpen ≤ 0,06 µg/ml, 21 (16,3 %) tuvieron CIMpen entre 0,12–1 µg/ml y 11 (8,5 %) CIMpen = 2 µg/ml. Ningún aislamiento tuvo CIMpen mayor o igual a 4 µg/ml. Tres aislamientos no pudieron ser evaluados por pérdida de viabilidad al momento del ensayo.

Todos los aislamientos tuvieron CIMctx menores o iguales a 0,5 µg/ml, por lo que fueron interpretados como sensibles.

Durante los años de estudio se observó un descenso en el nivel de resistencia a penicilina hacia 2008 (Tabla 3).

Tabla 3. *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasivas, Hospital de Pediatría de Misiones. Distribución anual de la resistencia a penicilina. (N=126).

Año	CIM a penicilina				Totales
	</= 0,06 µg/ml	0,12-1 µg/ml	>/=2 µg/ml	>/=4 µg/ml	
2004	28	3	5	0	36
2005	25	11	3	0	39
2006	16	5	1	0	19
2007	12	5	1	0	18
2008	13	1	0	0	14
Total	94	21	11	0	126

Los mayores niveles de resistencia se observaron entre los más pequeños, y en los aislamientos provenientes de meningitis (Tablas 4 y 5 respectivamente)

Tabla 4. *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasivas, Hospital de Pediatría de Misiones. Distribución resistencia a penicilina entre grupos etarios. (N=126).

Grupo etáreo	CIM a penicilina		
	</= 0,06 µg/ml	0,12-1 µg/ml	>/=2 µg/ml
Lactantes	39	15	11
Pre escolares	34	1	0
Escolares	21	5	0
Totales	94	21	11

Tabla 5. *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasivas, Hospital de Pediatría de Misiones. Distribución de la resistencia a penicilina entre los principales cuadros clínicos. Periodo (2004-2008). (N=126).

Diagnóstico	Concentración inhibitoria mínima		
	</= 0,06 µg/ml	0,1-1 µg/ml	>/=2 µg/ml
Neumonía	65	10	11
Meningitis	16	6	-
Sepsis	8	2	-
Otros (*)	6	3	-

Referencias: (*) Otros: 4 casos de Artritis (CIMpen </= 0,06 µg/ml), 2 casos de peritonitis (uno con CIMpen</= 0,06 µg/ml y otro CIMpen=1 µg/ml), 3 casos de Fiebre sin foco (1 con CIMpen </= 0,06 µg/ml y 2 de 0,125 µg/ml).

DISCUSIÓN

El Hospital provincial de pediatría, "Dr. Fernando Barreyro" de la provincia de Misiones, es un hospital monoclínico de 105 camas, con un nivel de complejidad III. Atiende en promedio: 76.000 consultas ambulatorias y genera 4.500 egresos por año. Recibe derivaciones del departamento capital y la red provincial siendo el único hospital pediátrico de la región y el de mayor complejidad. [34].

El laboratorio de bacteriología de este nosocomio, integra desde 1994 el Programa de Vigilancia de Infecciones Invasivas por *Streptococcus pneumoniae* en niños menores de cinco años, que constituye el primer estudio colaborativo implementado a nivel nacional en la Argentina. Se aportaron datos que fueron presentados a eventos internacionales y publicados en diversas oportunidades. [13, 10, 6, 14].

Teniendo en cuenta las diferencias regionales señaladas por numerosos autores y ya citadas en una publicación anterior [28], encaramos este nuevo análisis de la realidad provincial.

La vigilancia en este período presentó un promedio de 26 casos de EISpn/año, inferior a los 34 casos por año detectado durante 1998–2001. [28].

Numerosos reportes internacionales, dan cuenta de la disminución del número de casos de EISpn, tras la introducción de la vacuna heptavalente en sus calendarios [35, 15, 24, 25, 20, 36]; sin embargo, esto no podría explicar dicho fenómeno en Misiones, ni en otras provincias del país [37] donde es casi nula la inmunización con vacunas conjugadas debido a sus altos costos. Una explicación que debería continuar siendo estudiada podría ser la implementación, por parte del Ministerio de Salud Provincial, del programa IRA (Infecciones Respiratorias Agudas) en el sistema de atención primaria de la salud, cuyo objetivo es educar al personal sanitario sobre la sospecha, diagnóstico y conducta de tratamiento de las infecciones respiratorias en niños menores de 6 años, implementada desde el año 2003 [40].

Como fuera descripto, la EISPn se declara a lo largo de todo el año, aunque muestra una estacionalidad con mayor frecuencia en los meses de invierno (Figura 1) [11, 38]. El hacinamiento en el hogar o en las escuelas y la polución ambiental que se dan en esos meses del año podrían contribuir a esa distribución.

El predominio masculino en este trabajo, es también reportado por otros investigadores [7, 13, 10, 11].

La enfermedad invasiva por este germen puede darse en cualquier edad, sin embargo, las mayores tasas de ataque se detectan entre los menores de 5 años. Se ha propuesto que la mayor susceptibilidad de los lactantes menores de 2 años a estas infecciones se debe a la inmadurez de su sistema inmune, que es incapaz de responder de forma efectiva a los antígenos polisacáridos. Esto, reportado por numerosos autores coincide con lo que hemos descripto, ya que los niños menores de 2 años fueron los más afectados por todas las formas cínicas constituyendo el grupo de mayor preocupación, dado que concentran las mayores tasas de letalidad por EISPn [10, 11].

A pesar de que la documentación bacteriológica por hemocultivos se logra en bajo porcentaje [10], estas muestras en nuestros estudios y otros similares, son las que más aportan a la recuperación de Spn [30, 39, 6, 28].

La localización pulmonar (neumonías) presentó el mayor porcentaje de casos en todos los grupos etarios (Tabla 2). En países en desarrollo, las IRA en especial neumonías, son causa reconocida de morbi–mortalidad, particularmente entre los menores de 5 años. [13].

Reportes nacionales e internacionales dan cuenta del aumento de cepas de Spn resistentes a penicilina y otros β–lactámicos [3, 5, 7, 8, 10, 11], hecho que no refleja la realidad local. La disminución en el porcentaje global y la distribución anual de los aislamientos con declinación de la resistencia hacia el año 2008 nunca antes fue observada en nuestro Hospital. [28].

La sensibilidad disminuida a Cefotaxima, que había aumentado en forma progresiva en todo el mundo a partir de los 90, incluso en nuestro nosocomio [28, 13, 11] no fue detectada en el presente.

Creemos que estos hallazgos podrían reflejar el impacto de programa de IRA provincial, en cuanto al uso racional de antibióticos en cuadros respiratorios pediátricos [40].

Los mayores niveles de CIMpen entre los más pequeños, también fueron confirmados por otros investigadores (Tabla 4). [23, 10, 12, 41].

Como expresan Lynn *et al* [42], el impacto clínico del aumento de la resistencia en neumococo es difícil de evaluar. Fallas terapéuticas fueron publicadas para meningitis, otitis media e infecciones respiratorias agudas baja causadas por cepas resistentes. Sin embargo, la relación entre nivel de resistencia y falla en la terapia empírica no han sido convincentemente establecidas [42, 43, 44].

De acuerdo a los nuevos valores de corte propuestos por CLSI 2009, los aislamientos provenientes de cuadros no meníngeos, anteriormente con diferentes grados de resistencia ante CIMpen > 0.06 μg/ml, se categorizan como sensibles a penicilina, lo que avala la elección de estos antibióticos como terapias empíricas iniciales en nuestro hospital. [13, 45, 42].

Entre las meningitis, sin embargo, resulta alarmante el aumento de la resistencia al aplicar los mismos, correspondiendo en este estudio a un 37.5 %. De modo similar, rangos considerablemente mayores son reportados en las evaluaciones de vigilancia de otros autores para esta patología. [42]. La concentración que alcanza la penicilina en el LCR es muy inferior a las concentraciones séricas, y los fracaso terapéuticos con penicilina se producen cuando la CIM es ≥ 0,125 μg/ml, el uso de esta droga en estos cuadros no estaría avalado en nuestro nosocomio. [27].

A pesar de esto, cefotaxima y ceftriaxona, continúan siendo los tratamientos de elección para las meningitis adquiridas en la comunidad en las que se sospeche etiología neumococcica.

Los resultados de este estudio indican la necesidad de mantener una vigilancia activa de los patrones de susceptibilidad locales, que permitan orientar conductas terapéuticas, el uso prudente de antibióticos y el control de la diseminación de *Spn* resistente a β–lactámicos.

CONCLUSIONES

El nivel de resistencia a penicilina disminuyó en forma progresiva y significativa hacia 2008.

Los nuevos valores de corte propuestos por CLSI categorizan como sensibles a penicilina a la totalidad de aislamientos provenientes de neumonías y otros cuadros no meníngeos, siendo esta la droga de elección, cuyo nivel de resistencia en cuadros de meningitis, sin embargo, resulta alarmante. Para estos, las cefalosporinas de tercera generación constituyen el tratamiento antibiótico adecuado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa revisión de la Profesora Dra. Clotilde Ubeda (Instituto Nacional de Epidemiología "Dr. Juan H. Jara", Mar del Plata, Argentina) en los conceptos estadísticos, el apoyo recibido del equipo técnico del laboratorio de bacteriología del Hospital "Dr. Fernando Barreyro": Ramón B. Castillo, Gustavo Maciel, Delia I. Villalba y Yolanda B. Alcaráz en el trabajo de mesada y administrativo y a los Médicos que han contribuido a completar las fichas de datos: Paulina Tagliaferri y Oscar López.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ALONSO DE VELASCO E, VERHOEF J., SNIPPE H.** *Streptococcus pneumoniae: Factors, Pathogenesis and Vaccines*. Microbiol. Rev. 59: p. 591–603. 1995.

2. **APPELBAUM P. C.** *Antimicrobial resistance in Streptococcus pneumoniae: an overview.* Clin. Infect. Dis.15 (1): p. 77–83. 1992.

3. **BATUWANTHUDAWE R., KARUNARATHNE K., DASSANAYAKE M., DE SILVA S., LALITHA M. K., THOMAS, K., STEINHOFF M., ABEYSINGHE N.** *Surveillance of invasive pneumococcal disease in Colombo, Sri Lanka.* Clin. Infect. Dis. 1; 48 Suppl. 2: 136–40. 2009.

4. **BENGUIGUI, Y.** *Current health conditions and perspectives on the millennium developments goals related to childhood mortality in the Region of the Americas.* Technical Advisory Group (TAG), 3th meeting, PAHO, Texas Children Hospital, 18–19, p. 15–23. 2004.

5. Boletín Epidemiológico Nacional, Ministerio de Salud y Medio Ambiente. Enfermedades de transmisión respiratoria 12: p. 11. 2005.

6. **DEEKS S. L., PALACIOS R., RUVISKY R., KERTESZ D.A., HORTAL M., ROSSI A. *ET AL*** *Risk Factors and Course of Illness among children with invasive penicilin–resistant Streptococcus pneumoniae.* Pediatrics. 103: p. 409–13. 1999.

7. **DI FABIO J. L., CASTAÑEDA E., SAGUDELO C. *ET AL*** *Evolution of Streptococcus pneumoniae serotypes and penicillin susceptibility in Latin America,* SIREVA–VIGIA Group, 1993 to 1999 Pediatr. Infect. Dis. J. 20: p. 959–67. 2001.

8. ESPIN M.I., SANDOVAL A., RUIZ J. *ET AL* *Invasive pneumococcal disease in children in the region of Murcia (Spain).* Gacet Sanit 16(5): p. 385–391. 2002.

9. Boletín Epidemiológico de la OPS: Infecciones respiratorias agudas en las Américas,16(4): p. 1–5. 1995.

10. RUVINSKY R., REGUEIRA M., GENTILE A., CORSO A., PACE J., BAKIR J., *ET AL* *Infecciones invasivas por Streptococcus pneumoniae en niños menores de 5 años en Argentina: estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia.* Arch Argent Pediatr 100 (1): p. 31-43. 2002.

11. RUVINSKY R.O. *Las infecciones invasivas por Streptococcus pneumoniae: una problemática del siglo XXI.* En: www.slipe.org/Documentos/RUVINSKY_SlipeSpn.doc.

12. RUVINSKY R. *Streptococcus pneumoniae. Un antiguo patógeno generando la emergencia de nuevos problemas epidemiológicos en el campo pediátrico* Arch. Argent. Pediatr. 99: p. 101–4. 2001.

13. RUVINSKY R. Epidemiología de las infecciones invasoras por *Streptococcus pneumoniae* en la Argentina: Un sistema de vigilancia, 1993-2004. Rev. Hospital Niños Bs. As. Vol. 47 Nº 214 (SIREVA). 2005.

14. BOGAERT D., DE GROOT R., HERMANS P.W.M. *Streptococcus pneumoniae colonization*: *the key of pneumococcal disease.* Lancet Infect. Dis. 4: p. 144–154. 2004.

15. RUIZ SOPEÑA C., ALLÚE TANGO M. *Enfermedad Invasora por Streptococcus pneumoniae.* Servicio de Vigilancia Epidemiológica y Enfermedades Transmisibles. Boletin Epidemiologico de Sevilla, España. 2007.

16. LIÑARES J., TUBAU F., DOMÍNGUEZ M.A. *Antibiotic Resistance in Streptococcus pnemoniae in Spain: An overview of the 1990s* En: *Steptococcus pneumoniae*: Molecular Biology & Mechanisms of Disease, Ed. Tomasz A., Liebert M.A. Inc., New York: p. 399–407. 2000.

17. REINERT R.R. *The antimicrobial resistance profile of Streptococcus pneumoniae.* Clin. Microbiol. Infect. 15 Suppl. 3: p. 7–11.

18. RUOFF K.L., WHILEY R.A., BEIGHTON D. Streptococcus. En: Murray, R.R., Baron, E.J., Pfaller, M. A., Tenover, F.C.;,Yolken, R.H. Manual of Clinical Microbiology. 7ª. Ed. Washington, D.C.: ASM Press: p. 283–296. 1999.

19. MUSHER D.M. *Streptococcus pneumoniae.* En: Mandel G L., Douglas, G., Bennett, J. Agentes Etiologicos de Enfermedades Infecciosas. 6ª Ed, Parte III, Ed. Méd. Panamericana, Cap. 197: p. 2392–2411. 2006.

20. SMAOUI H., AMRI J., HAJJI N., KECHRID A. *Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of Streptococcus pneumoniae isolates in children in Tunis.* Arch. Pediatr. 16(3): p. 220–6.

21. TYRRELL G.J., LOVGREN M., CHUI N., MINION J., GARG S., KELLNER J.D., MARRIE T. J. *Serotypes and antimicrobial susceptibilities of invasive Streptococcus pneumoniae pre– and post–seven valent pneumococcal conjugate vaccine introduction in Alberta, Canada, 2000–2006.* Vaccine; 27(27): p. 3553–60.

22. KAPLAN S.H., MASON E. (JR.) *Management of Infections due to antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae.* Clin. Microbiol. Rev. 11: p. 628-644. 1998.

23. SAHA S.K., NAHEED A., EL ARIFEEN S., ISLAM M., AL EMRAN H., AMIN R., FATIMA K., BROOKS W.A., BREIMAN R.F., SACK D.A., LUBY S.P., AND PNEUMOCOCCAL STUDY GROUP. *Surveillance for invasive Streptococcus pneumoniae disease among hospitalized children in Bangladesh: antimicrobial susceptibility and serotype distribution.* Clin. Infect. Dis. 1;48 Suppl. 2: p. 75–81.

24. SHAH A. S., KNOLL M.D., SHARMA P.R., MOISI J.C., KULKARNI P., LALITHA M.K., STEINHOFF, M., THOMAS K. *Invasive pneumococcal disease in Kanti Children's Hospital, Nepal, as observed by the South Asian Pneumococcal Alliance network.* Clin. Infect. Dis. 1;48 Suppl. 2: p. 123–8. 2009.

25. SIIRA L., RANTALA M., JALAVA J., HAKANEN A.J., HUOVINEN P., KAIJALAINEN T., LYYTIKÄINEN O., VIROLAINEN A. *Temporal trends of antimicrobial resistance and clonality of invasive Streptococcus pneumoniae isolates in Finland, 2002 to 2006.* Antimicrob. Agents Chemother. 53(5): p. 2066–73.

26. VALENZUELA M. T., DE QUADROS C. *Antibiotic resistance in Latin America: A cause for alarm*. Vaccine. 2009. disponible en En: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540634.

27. HEFFELFINGER J., DOWELL S. F., JORGENES J. H., KLUGMAN K. P., MABRY L. R., MUSHER D. M. AND DRUG-RESISTANT STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE THERAPEUTIC WORKING GROUP. *Management of community–acquired pneumonua in the era of pneumococcal resistance*. Arch. Intem. Med. 60 p.:1399-1408. 2002.

28. GRENON S., VON SPECHT M., CORSO A., PACE J., REGUEIRA M. *Distribución de serotipos y perfiles de sensibilidad a los antimicrobianos de cepas de Streptococcus pneumoniae aisladas en niños en Misiones, Argentina*. Revista española de Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 23(1): p. 10–14. 2005.

29. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* ;49 (RR–9): p. 1–35. 2000.

30. FENOLL A., GRANIZO J.J., AGUILAR L., GIMÉNEZ M. J., ARAGONESES FENOLL L., HANQUET G., CASAL J., TARRAGÓ D. *Temporal trends of invasive Streptococcus pneumoniae serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007.* J Clin Microbiol. 47(4): p. 1012–20. 2009.

31. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement. M7–A6 Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: Approved Standard.* 6th ed. Wayne, Pennsylvania: CLSI; 2005.

32. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement. M7–A7 Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: Approved standard.* 7th ed. Wayne, PA. CLSI; 2006.

33. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing:*

Nineteenth Informational Supplement. M7–A7 Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: Approved standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved Standard. 9th ed. M7–A8. Wayne, PA. CLSI; 2009.

34. Registros y bases de datos del servicio de Estadisticas del Hospital Público Provincial de Pediatría de Autogestión "Dr. Fernando Barreyro".

35. KAPLAN S., MASON E. JR, WALD E., SCHUTZE G., BRADLEY J., TAN T *ET AL*. *Decrease of invasive pneumococcal Infections in children among 8 children's hospitals in the United States after the introduction of the 7–valent pneumococcal conjugate vaccine.* Pediatrics 113: p. 617–8. 2004.

36. WHITNEY C. G., FARLEY M. M., HADLER J., HARRISON L.H., BENNETT N.M., LYNFIELD R. *ET AL*. *Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein–polysaccharide conjugate vaccine.* N. Engl. J. Med.; 348: p. 1737–1746. 2003.

37. TREGNAGHI M., CEBALLOS A., RUTTIMANN R. *ET AL*. *Vigilancia epidemiológica activa de la enfermedad neumocócica en lactantes, en el ámbito ambulatorio y en la internación.* Arch. Argent. Pediatr. 104 (1): p. 3–9. 2006.

38. BAKIR J., GENTILE A., HOLTMANN A., PROCOPIO A., VÁZQUEZ M. *Perfil epidemiológico de las infecciones invasivas por Streptococcus pneumoniae.* Arch. Pediatr., Urug. 74 (1): p. 43–50. 2003.

39. CULASSO C., CARVAJAL L., PAOLUCCI R., CEBALLOS A., PAREDES M. *Streptococcus pneumoniae, evolución de la resistencia a los antimicrobianos en un hospital de niños de Córdoba, Argentina.* Revista argentina de Microbiología. 33: p. 149-54. 2001.

40. Ministerio de Salud Publica de la Provincia de Misiones. http://www.misiones.gov.ar/salud/index.php.

41. BALAJI V., THOMAS K., JOSHI H.H., BEALL B. *Increasing invasive disease due to penicillin resistant S. pneumoniae in India.* Indian J. Med. Sci. 62(12): p. 492–5. 2008.

42. LYNCH J.P. 3R., ZHANEL G.G. *Streptococcus pneumoniae: does antimicrobial resistance matter?* Semin. Respir. Crit. Care Med. 30(2): p. 210–38. 2009.

43. BISHAI W. *The in vivo-in vitro paradox in pneumococcal respiratory trat infections.* J. Antimicrobial Chemother. 49: p. 433-436. 2002.

44. FRIEDLAND I.R. *Comparison of the response to antimicrobial therapy of penicillin–resistant and penicillin susceptible pneumococcal disease.* Pediatr. infec. Dis. J. 14: p. 885-890. 1995.

45. IMÖHL M., REINERT R.R., VAN DER LINDEN M. *New penicillin susceptibility breakpoints for Streptococcus pneumoniae and their effects on susceptibility categorisation in Germany (1992–2008).* Int. J. Antimicrob. Agents. May 4. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19419844. 2009.

Recibido: 22/07/09.
Aprobado: 26/09/09

- Sandra Liliana Grenon[1,2].
  Bioquímica, Especialista en Microbiología Clínica (Universidad Nacional de Misiones), Profesora Adjunta Cátedra de Inmunología (carrera Bioquímica, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, UNAM). Investigadora Categoría II (Programa Nacional de Incentivos). Bacterióloga del centro de referencia: Hospital de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro" de Posadas, Misiones.

- Gladis Zunilda Ayala[2].
  Bioquímica (Universidad Nacional de Misiones). Becaria del Centro de desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT).

- Lorena Leguizamón[1].
  Bioquímica (Universidad Nacional de Misiones), Bacterióloga del centro de referencia: Hospital de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro" de Posadas, Misiones.

- Marcelo Salvi[1,2].
  Bioquímico, Especialista en Microbiología Clínica (Universidad Nacional de Misiones), Jefe de Trabajos Prácticos Cátedras de Inmunología y Microbiología (Carrera de Bioquímica, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM). Jefe del laboratorio de Bacteriología del centro de referencia: Hospital de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro" de Posadas, Misiones.

- Martha Helena von Specht[1,2].
  Bioquímica, Especialista en Microbiología Clínica (Universidad Nacional de Misiones), Jefe de Trabajos Prácticos Cátedras de Práctica Hospitalaria (carrera de Bioquímica) y Microbiología (carrera de Farmacia) de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM). Investigadora Categoría III (Programa Nacional de Incentivos). Bacterióloga del centro de referencia: Hospital de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro" de Posadas, Misiones.

1. Laboratorio de Bacteriología, Hospital público Provincial de Pediatría de Autogestión "Dr. Fernando Barreyro".
2. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 11 / Nº 12 / 2009 / 41–45

Evaluación de géneros micotoxigénicos en yerba mate elaborada

Gladis Jerke, Marta A. Horianski, Karina A. Salvatierra

Evaluation of mycological genera in manufactured yerba maté

ABSTRACT

The quality and care of the processing of yerba mate is crucial to maintain the product organoleptic and microbiological qualities unchanged.The objective of this work was the study the mycological contamination of manifactured yerba maté, evaluating the presence of micotoxigenic genera. Thirty six samples of manifactured yerba maté commercialized in Posadas, Misiones, were processed during 2005. Both the fungal count and the characterization of genera present were carried out. The fungal count was of 6.1 x 103 UFC/g, in average, with a higher incidence of moulds (89 %) than of yeasts. We isolated 24 genera of fungi with a predominance of *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* and *Emericella* among others. Six yeasts genera were characterized by a predominance of *Rhodotorula* and *Candida.* The incidence of mycotoxigenic genera was 83 % for *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp 26 % and 15 % for *Fusarium* spp. The results are consistent with previous studies on the same substrate and similar ones as black tea.

KEY WORDS: Elaborated yerba mate, fungal count, moulds, yeast, mycotoxigenic genera.

RESUMEN

La calidad y el cuidado del procesamiento de yerba mate, es decisivo para que el producto mantenga inalterables sus cualidades organolépticas y microbiológicas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la contaminación micológica de yerba mate elaborada, evaluando la presencia de géneros micotoxigénicos. Se procesaron 36 muestras de yerba mate elaborada comercializadas en Posadas, Misiones durante el año 2005. Se realizaron recuentos fúngicos y caracterización de géneros presentes. El recuento fúngico fue de 6,1 x 10^3UFC/g, en promedio con mayor incidencia de mohos (89 %) que levaduras. Se aislaron 24 géneros de mohos con predominio de *Aspergillus, Penicillium, Fusarium* y *Emericella* entre otros. Se caracterizaron 6 géneros de levaduras con predominio de *Rhodotorula* y *Candida.* La incidencia de géneros micotoxigénicos fue de 83 % para *Aspergillus* spp, 26 % para *Penicillium* spp y 15 % para *Fusarium* spp. Los resultados obtenidos son coincidentes con estudios previos sobre el mismo sustrato y similares como té negro.

PALABRAS CLAVE: Yerba mate elaborada, recuento fúngico, mohos, levaduras, géneros micotoxigénicos.

INTRODUCCIÓN

La Yerba mate, *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire, es una planta que crece en forma silvestre en el norte de Misiones y Paraguay, a partir de la cual se obtiene la yerba mate elaborada. Con este producto se prepara el mate que es una bebida popular en América del Sur y ampliamente consumida en Europa y Estados Unidos [3]. Su consumo puede llevarse a cabo de acuerdo a diversas modalidades: el más tradicional en Argentina es en un recipiente específico al que se le agrega la yerba mate y agua caliente para succionar la infusión mediante una bombilla. En épocas de altas temperaturas el agua agregada puede ser fría. También puede beberse en taza, preparándose en este caso la infusión de forma similar al té, con producto en saquitos o bien con yerba mate molida [3, 17].

A nivel global, la yerba mate se produce con importancia económica sólo en tres países: Argentina, Brasil y Paraguay. Argentina es el país que más superficie cultivada aporta con alrededor de 180.000 ha (60 %), mientras que Brasil aporta 85.000 ha (28 %) y Paraguay 35.000 ha (12 %). La producción Argentina se desarrolla en dos provincias: Misiones con el 85 % de superficie cultivada y nordeste de Corrientes con el 15 % [3, 16, 17].

La yerba mate es una planta rica en vitaminas, produce una sensación de bienestar, vigor y lucidez intelectual, basado en la presencia del alcaloide mateína (xantina similar a la cafeína) [14, 22]. Es diurética, digestiva y optimiza la absorción nutricional del organismo regulando en general todas sus funciones de asimilación. También posee propiedades laxantes debido a su contenido en colina [14, 22].

Tradicionalmente fue utilizada por los indígenas que habitaban las regiones de Paraguay, nordeste de Argentina y norte de Uruguay. Hoy en día su uso se ha difundido ampliamente y es utilizada por millones de personas en varios países sudamericanos, Europa y Estados Unidos [3, 16, 17]. El consumo de yerba mate forma parte de la cultura popular, siendo consumida diariamente por la población adulta e infantil en sus variadas formas: como mate caliente, mate cocido sólo o con leche o mate frío (tereré).

Actualmente se observa un empleo de yerba mate elaborada muy diverso, como ser en la elaboración de cosméticos, por sus propiedades antioxidantes [2, 4] o como ingrediente en bebidas energizantes [21].

Hasta el presente se han realizado pocos estudios de la microflora natural presente en yerba mate elaborada. Países del MERCOSUR tales como Paraguay y Brasil poseen normas que reglamentan el contenido microbiano en yerba mate elaborada [5, 19, 20], mientras que en Argentina se propone el perfil de control microbiológico mínimo para el producto en el año 2004, a los fines de su control higiénico y sanitario, publicado como Norma IRAM 20517:2004 [6] y revisada en el año 2007 [7]. La calidad y el cuidado del procesamiento de la yerba mate son decisivos para que el producto mantenga inalterables sus cualidades organolépticas y microbiológicas. La elaboración de la yerba mate, comprende seis etapas fundamentales: sapecado, secado, canchado, estacionamiento, molienda y envasado. En el Sapecado las hojas de yerba mate son expuestas a la acción directa del fuego vivo durante unos segundos para detener los procesos enzimáticos, preservando así su característico color verde. En el Secado se realiza la eliminación de la humedad a través de calor seco hasta obtener un contenido de humedad del 3 % que garantiza la buena conservación por un lado y la transformación por el otro de la yerba mate para su estacionamiento. El Canchado es la trituración gruesa de la yerba mate seca en hoja. El Estacionamiento es una de las etapas más importantes en la cual la yerba mate adquiere su sabor, aroma y color característico. Dura entre 6 a 24 meses lo cual uniforma y evita variaciones en su calidad final. El estacionamiento se realiza a granel en depósitos especialmente acondicionados. En la Molienda diferentes lotes de yerba estacionada son mezclados en distintas proporciones con el objeto de determinar y mantener constante las características de los productos terminados. El envasado es de fundamental importancia, ya que un envase más hermético conserva mejor las propiedades del producto. Se emplean envases de papel o papel encerado [14, 16].

Dadas las características del proceso de elaboración de la yerba mate que involucra una etapa de sapecado, en contacto con el fuego directo pero por un tiempo muy breve, otra etapa de secado con temperaturas no muy elevadas (entre 80–100 °C) pero por un tiempo más prolongado; es lógico pensar que la bacterioflora sea prácticamente eliminada, mientras que la micoflora que, por una parte puede resistir estas condiciones y por otra, puede llegar al producto durante su estacionamiento, es con mucho, el parámetro microbiológico más importante a evaluar en yerba mate. Además es importante conocer, no sólo el recuento micológico del producto sino también el tipo de hongos que lo contaminan, por la potencial presencia de micotoxinas en el mismo. Mas aún considerando que el consumo del mate, es una cultura muy arraigada en los países Sudamericanos en todos los estratos sociales y que llega a todas las edades incluso a los más pequeños con el tereré (mate frío) [3].

El objetivo del presente trabajo fue realizar la evaluación micológica de yerba mate elaborada, mediante el recuento fúngico total (mohos y levaduras) y la caracterización de géneros fúngicos contaminantes, destacando la presencia de géneros micotoxigénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron 36 muestras de yerba mate elaborada correspondientes a diferentes marcas comerciales provenientes de establecimientos yerbateros Argentinos de las Provincias de Misiones, Corrientes y Buenos Aires. El muestreo se realizó al azar, durante el año 2005, a partir de góndolas en diversos comercios céntricos y periféricos de la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina.

Se realizó el recuento fúngico total empleando el método de diseminación en superficie en agar–cloranfenicol de acuerdo con la metodología propuesta en la Norma IRAM 20517:2004 [6, 7]. El método consiste en pesar 10 gr de la muestra y diluirla en 90 ml de solución fisiológica peptonada (SFP) obteniéndose así la dilución 1/10, a partir de la cual, se realizaron sucesivas diluciones decimales. Se inoculó 0.1 ml de cada una de las diluciones, en placas de Petri conteniendo medio de cultivo agar–cloranfenicol y se diseminó el inóculo empleando una espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron en estufa de cultivo a 25 ± 1 ºC, durante 5 a 7 días y se evaluaron realizando el recuento de mohos y levaduras y caracterización de géneros fúngicos. Los resultados de los recuentos fueron sometidos a análisis estadísticos, estableciendo su valor promedio, máximo, mínimo y mediana.

La identificación genérica de las cepas de hongos filamentosos se realizó sobre la base de la macro–micromorfología de las colonias de acuerdo a claves taxonómicas [10, 12, 18]. Las cepas de levaduras aisladas se analizaron observando las características de crecimiento en diversos medios de cultivo acorde a las claves publicadas por Pitt y Hocking [18].

Se evaluó el porcentaje de incidencia genérico (PIG) de las cepas fúngicas caracterizadas, resaltando la contaminación con hongos de los tres géneros de mayor importancia micotoxigénica: *Aspergillus, Penicillium* y *Fusarium.* El PIG se calculó empleando la siguiente fórmula (1):

$$PIG = \frac{\text{N° de muestras infectadas con el género evaluado}}{\text{N° total de muestras evaluadas}} \times 100 \qquad (1)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del recuento fúngico total y de los géneros fúngicos caracterizados en las muestras de yerba mate elaborada, se muestran en la Tabla 1.

El recuento fúngico total presentó un promedio de 6,1 x 10^3 UFC/g, con un máximo de 6,1 x 10^4 UFC/g, mínimo de 1,8 x 10^2 UFC/g y mediana 1,2 x 10^3 UFC/g.

Hasta el presente no se hallan reglamentados a nivel nacional los límites microbiológicos para el producto, si bien se halla en estudio un valor límite de 2,5 x 10^3 UFC/g [8]. En Paraguay el límite superior permitido es de 1,5 x 10^3 UFC/g [5], mientras que Brasil establece un valor de 5 x 10^3 UFC/g [19,20]. Teniendo en cuenta estas reglamentaciones 44 % de las muestras superan el valor de la reglamentación paraguaya [5], 22 % superan el valor de la reglamentación brasilera [19, 20] y el 33 % superaría el valor máximo propuesto en Argentina [8].

En un estudio comunicado por Marucci [13] en el año 2003, trabajando con 51 muestras de yerba mate elaborada en Misiones, Argentina, se refieren valores inferiores pero del mismo orden de magnitud, en el recuento fúngico total con una media de 2 x 10^3 UFC/g, máximo de 8,3 x 10^3 UFC/g, mínimo de 2 x 10^2 UFC/g y mediana de 1,35 x 10^3 UFC/g. En un estudio comunicado por Lang en el año 2005 [11] trabajando con 14 muestras de yerba mate elaborada en Santa Catarina, Brasil; el recuento fúngico total presentó una media de 1 x 10^5 UFC/g, máximo de 9,4 x 10^5 UFC/g, mínimo de 4 x 10^1 UFC/g y mediana 2,5 x 10^2 UFC/g. El promedio del recuento fúngico total supera en dos ordenes de magnitud al obtenido por investigadores argentinos. No obstante, el autor aclara que dicho valor se debe a 2 muestras muy contaminadas con recuentos del orden de 10^5 y del total de muestras analizadas sólo un 28,57 % superan la reglamentación brasileña. Además, si comparamos las medianas obtenidas por los investigadores, podemos observar que en todos los casos el valor de las mismas no supera el valor límite de las reglamentaciones vigentes. Podemos apreciar que la mediana refleja mejor que el promedio, el grado de contaminación microbiana de una serie de muestras analizadas en un producto alimenticio, tal como lo sugieren diversos autores [1, 15].

En todas las muestras procesadas hubo desarrollo fúngico observándose que el desarrollo de hongos filamentosos fue cuantitativamente más importante con un 89 % de mohos y 11,9 % de levaduras en promedio. Las 36 muestras (100 %) presentaron contaminación con mohos, mientras que en sólo 17 muestras (47 %) desarrollaron levaduras.

Tabla 1. Cuantificación y caracterización de mohos y levaduras de yerba mate elaborada.

N°	RFT	% M	% L	Porcentaje relativo géneros de mohos	Porcentaje relativo de levaduras
1	5,9 x 10^3	75	25	74 % *Aspergillus*, 1 % *Penicillium*	18 % *Rhodotorula*, 7 % *Sacharomyces*
2	5 x 10^3	93	7	88 % *Aspergillus*, 2 % sin identificar, 3 % *Mucor*	6 % *Rhodotorula*, 1 % *Trichosporon*
3	3,5 x 10^2	100		97 % *Aspergillus*, 3 % *Mucor*	
4	2 x 10^2	100		100 % *Aspergillus*	
5	1,2 x 10^4	100		80 % *Aspergillus*, 8 % *Penicillium*, 4 % *Cladosporium*, 4 % *Fusarium*, 4 % *Micelia esterila*	
6	3,2 x 10^4	96	4	93 % *Aspergillus*, 1 % *Mucor*, 1 % *Syncephalastrum*, 1 % *Micellia esterila*	4 % *Candida*
7	4,5 x 10^2	90	10	80 % *Aspergillus*, 10 % *Rhyzomucor*	10 % *Streptomyces*
8	1,1 x 10^4	100		99 % *Aspergillus*, 1 % *Syncephalastrum*	
9	1,7 x 10^3	30	70	22 % *Aspergillus*, 5 % *Trichophytum*, 3 % *Epidermophyton*	70 % *Rhodotorula*
10	4,9 x 10^3	24	76	7 % *Aspergillus*, 17 % *Emericella*	10 % *Candida*, 66 % *Rhodotorula*
11	3,0 x 10^4	100		100 % *Aspergillus*	
12	2 x 10^3	100		82 % *Aspergillus*, 9 % *Penicillium* 9 %, *Cunninghamella*,	
13	7,3 x 10^2	94	6	76 % *Aspergillus*, 6 % *Emericella*, 6 % *Fusarium*, 6 % *Pseudollescheria*.	6 % *Rhodotorula*
14	6,1 x 10^4	100		81 % *Aspergillus*, 19 % *Penicillium*.	
15	4,8 x 10^3	100		98 % *Aspergillus*, 2 % *Cunninghamella*	
16	2,6 x 10^4	99	1	93 % *Aspergillus*, 2 % *Emericella*, 2 % *Cunninghamella*, 2 % *Basidiobolus*.	2 % *Rhodotorula*
17	2 x 10^2	100		50 % *Fusarium*, 50 % *Chrysosporium*	
18	1,8 x 10^2	100		100 % *Fusarium*	
19	6 x 10^2	100		100 % *Aspergillus*	
20	2 x 10^3	100		50 % *Fusarium*, 50 % *Micellia esterila*	
21	8 x 10^2	100		63 % *Aspergillus*, 25 % *Periconia*, 12 % *Emericella*	
22	3 x 10^3	100		100 % *Aspergillus*.	
23	1,6 x 10^3	100		91 % *Aspergillus*, 9 % *Penicillium*	
24	1,2 x 10^3	100		98 % *Aspergillus*, 2 % *Micelia esterila*	
25	5,3 x 10^3			99 % *Aspergillus*; 1 % *Micellia esterila*	
26	2,7 x 10^2	93	17	42 % *Aspergillus*, 25 % *Pestalotia*, 16 % *Periconia*	17 % *Rhodotorula*
27	2,3 x 10^2	80	20	20 % *Paecilomyces*, 20 % *Sporotrichum*, 20 % *Aureobasidium*, 20 % *Cladosporium*,	20 % *Rhodotorula*
28	5 x 10^2	82	18	37 % *Aspergillus*, 9 % *Penicillium*, 9 % *Fonsecae pedrosoi*, 9 %, *Aureobasidium* , 9 % *Trichophytum*, 9 % *Streptomyces*	18 % *Rhodotorula*
29	1,8 x 10^2	80	20	40 % *Aspergillus*, 20 % *Emericella*, 20 % *Pestalotia*	20 % *Kloeckera*
30	3,6 x 10^2	100		61 % *Cladosporium*, 13 % *Penicillium*, 13 % *Scopulariopsis*, 13 % *Epicoccum*	
31	1,3 x 10^3	89	12	85 % *Aspergillus*, 4 % *micelio esteril*	4 % *Candida*, 4 % *Rhodotorula*, 4 % *Kloeckera*
32	1,2 x 10^3	100		50 %. *Aspergillus*, 15 % *Monilia*, 10 % *Pestalotia*, 15 % *Scopulariopsis*, 10 % *Micellia esterila*	
33	2,5 x 10^2	60	40	20 % *Trichophytum*, 20 % *Epicoccum*, 20 % *Cladosporium*	40 % *Rhodotorula*
34	2,5 x 10^2	100		40 % *Penicillium*, 20 % *Aureobasidium*, 20 % *Trichophytum*, 20 % sin identif.	
35	8,6 x 10^2	42	58	32 % *Aspergillus*, 5 % *Mucor*, 5 % *Penicillium*	48 % *Rhodotorula*, 10 % *Candida*
36	2,3 x 10^2	80	20	20 % *Paecilomyces*, 20 % *Aspergillus*, 20 %, *Cladosporium*, 20 % *Aureobasidium*	20 % *Rhodotorula*

Nota: RFT: Recuento fúngico total, % M: porcentaje de mohos, % L: porcentaje de levaduras.

Resultados similares fueron comunicados por Marucci, 2003 [13] con la totalidad de las muestras presentando contaminación con mohos, y 26 muestras (51 %) con levaduras. En cambio en muestras analizadas por Lang se observó que la contaminación por levaduras fue superior a la de los hongos filamentosos [11].

Todos los géneros fúngicos caracterizados en las muestras de yerba mate elaborada con sus respectivos porcentajes de incidencia genérico se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de incidencia de los géneros fúngicos que contaminan la yerba mate elaborada.

Mohos		Levaduras	
Género	Porcentaje de incidencia genérico	Género	Porcentaje de incidencia genérico
Aspergillus	83	*Rhodotorula*	34
Penicillium	26	*Candida*	11
Fusarium	15	*Kloeckera*	5
Emericella	14	*Sacharomyces*	3
Cladosporium	12	*Streptomyces*	3
Trichophyton	12	*Trichosporon*	3
Mucor	11		
Aureobasidium	11		
Cunningamella	8		
Pestalotia	8		
Zyncephalastrum	5		
Epicoccum	5		
Periconia	5		
Rhyzomucor	3		
Pseudoallescheria	3		
Chrysosporium	3		
Epidermophiton	3		
Basidiobolus	3		
Paecilomyces	3		
Sporotrichum	3		
Streptomyces	3		
Fonsecae pedrosoi	3		
Scopulariopsis	3		
Monillia	3		
Micelia esterila	16		

Los géneros de levaduras con un PIG superior al 5 % correspondieron a tres de los seis géneros caracterizados, Figura 1, siendo *Rhodotorula* el de mayor incidencia encontrándose en el 75 % de las muestras en las que se aislaron levaduras. Resultados similares fueron comunicados por Marucci y col (13).

Fueron aislados 24 géneros diferentes de hongos filamentosos contaminantes en yerba mate elaborada, Tabla 2. En la Figura 2 se grafican los PIG de los géneros fúngicos de mohos que se aislaron en más del 10 % de las muestras de yerba mate elaborada.

Dentro de los géneros de mohos micotoxigénicos el mayor porcentaje de incidencia le correspondió al género *Aspergillus* spp (86 %), seguido de *Penicillium* spp (26 %) y *Fusarium* spp (15 %). Los resultados son coincidentes con estudios anteriores en sustratos similares, tales como té negro (9).

En base a los resultados obtenidos podemos apreciar que la yerba mate es un sustrato favorable para la contaminación fúngica resaltando la importancia de la realización de controles microbiológicos periódicos en el producto, considerando que un porcentaje importante de las muestras analizadas, superaron los valores permitidos por la reglamentación de países vecinos y la de nuestro país que está en fase de aprobación e implementación.

La presencia de géneros micotoxigénicos, debe alertarnos ante la posibilidad de hallar micotoxinas en yerba mate con el consiguiente riesgo para la población, perteneciente a todos los grupos etarios, que habitualmente la consume.

La elevada incidencia de mohos del género *Aspergillus* nos alerta de la necesidad de estudiar su capacidad micotoxigénica y la búsqueda de la presencia de aflatoxinas y ocratoxinas en yerba mate elaborada.

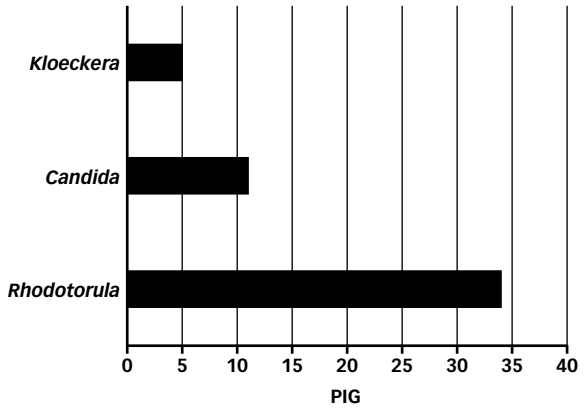


FIGURA 1. Géneros fúngicos de levaduras con PIG mayor al 5 % en yerba mate elaborada.

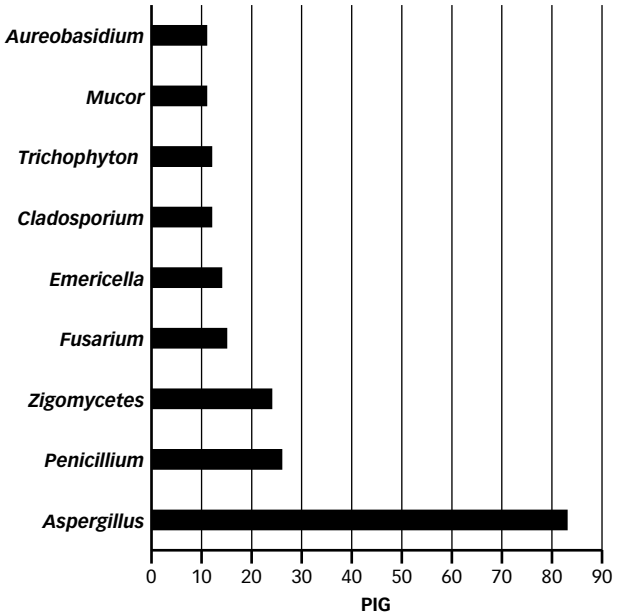


FIGURA 2. Géneros fúngicos de mohos de mayor incidencia en yerba mate elaborada. (Los géneros de *Zygomicetes* corresponden a *Cunningamella*, *Zyncephalastrum* y *Rhyzomucor*).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ADAMS M.R., MOSS M.O.** *Microbiologia de los alimentos,* T.R.S.o. Chemistry, Editor, ACRIBIA S.A. 1997.

2. **AZZOLINI M. Y MACCARI J.A.** Erva–Mate e seu uso medicinal. Productos alternativos e desenvolvimento da tecnología industrial na cadeia produtivo da Erva–Mate. Proyecto plataforma tecnológica da Erva–Mate do Paraná. Curitiva–Paraná, Brasil, 2000: 92–104.

3. **DE BERNARDI L.A. Y PRAT KRIKUN S.D.** Cadena alimentaria de la Yerba Mate. Diagnóstico de la región yerbatera. En www.sagpya.mecon.gov.ar /0–3/in Fusion/diagnóstico/diagnost_YM.htm, 2001.

4. **DE PAULA M.L., CHOCIAI J.G.** Uso e aplicacao industrial da Erva–Mate em cosméticos. Productos alternativos e desenvolvimento da tecnología industrial na cadeia produtivo da Erva–Mate. Proyecto plataforma tecnológica da Erva–Mate do Paraná, Curitiva, Brasil, 2000: 77–91.

5. **INTN INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA Y NORMALIZACIÓN.** Norma Paraguaya 3500193. Yerba Mate. Especificaciones. 2º Edición, Asunción, Paraguay, 1995.

6. **IRAM 20517:2004.** Yerba mate canchada y yerba mate elaborada: Análisis microbiológicos. Instituto Argentino de Normalización y certificación, 2004.

7. **IRAM 20517:2007.** Yerba mate canchada y yerba mate elaborada: Análisis microbiológicos. Instituto Argentino de Normalización y certificación, 2007.

8. **IRAM 20530.** Yerba mate elaborada. Instituto Argentino de Normalización y certificación. Documento en estudio.

9. **JERKE G.** Microbiota del té (*Camellia sinensis* (L). O. Kuntze) en las distintas etapas e su procesamiento y expendio, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Misiones. Misiones, Argentina, 2005.

10. **KONEMAN E.W., ROBERTS G.D.** Micología. Práctica de Laboratorio. 3º ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S. A. 1987

11. **LANG R.M.** Ocurrencia de fongus toxigénicos e micotoxinas em erva–mate (*Ilex araguariensis* St Hil. var. paraguariensis) comercializada em Santa Catarina. Tesis de Mestre em Ciência dos Alimentos. Florianópolis, Brasil. 2005.

12. **LARONE D.H.** Medically Important Fungi: A guide to identification. 3º ed. New York: Elsevier, 1995.

13. **MARUCCI R., KNASS P.** Flora fúngica en yerba mate envasada comercializada en Posadas.La Alimentación Latinoamericana Nº 247. 2003: 54–58.

14. **MEDIN R., MEDIN S.** Yerba mate en Alimentos. Introducción, Técnica y Seguridad. 3ª Edición. Ediciones Turísticas. Pág 161. 2007.

15. **MOSSEL D.A.A., MORENO GARCIA B., STRUIJK C. B.** *Microbiologia de los alimentos.* Editorial ACRIBIA, Editor. 2003.

16. **PARRA PATRICIA** Té y Yerba mate: Perfiles productivos. Dirección Nacional de Alimentos. En http://www.alimentosargentinos.gov.ar. Julio 2008

17. **PARRA PATRICIA** Infusiones en Argentina. Desempeño 2000–2007 y perspectivas. Dirección Nacional de Alimentos. En http://www.alimentosargentinos.gov.ar. Febrero 2008

18. **PITT J.L., HOCKING A.D.** Fungi and Food spoilage. 2º London, Wienheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Blackie Academic&Professional. 1997

19. Resolução RDC ANVISA/MS Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção I. 2001.

20. Resolução RDC ANVISA/MS n.º 302, de 07 de novembro de 2002. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de erva–mate. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 08 nov 2002. Seção I. 2002.

21. **SCHMALKO M.E.** Estudio y Modelado del procesamiento primario de la yerba mate. Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 2005.

22. Wikipedia. Artículos publicados en la web: Mate http://es.wikipedia.org/wiki/Mate y Cafeína http://es.wikipedia.org/wiki/Cafe. Fecha de consulta: 07/10/09.

Recibido: 04/09/09.
Aprobado: 1/12/09.

- Gladis Jerke.
  Bioquímica. Magister en Tecnología de los Alimentos. Jefe de trabajos prácticos de Microbiología e Inmunología (Lic. en Genética) y Microbiología General (Farmacia). Profesor Adjunto de Higiene y Sanidad (Farmacia). Categoría del Incentivo: IV.

- Marta Aurelia Horianski.
  Bioquímica. Magister en Tecnología de los Alimentos. Auxiliar de primera de Microbiología e Inmunología (Lic. en Genetica). Aux primera Química y Bioquímica de los alimentos (ing en Alimentos). Categoría del Incentivo: V.

- Karina Alejandra Salvatierra.
  Bioquímica. Master en Medicina y cirugía tropical. Universidad de Valencia-España (en curso). Auxiliar de Investigación – Auxiliar docente de primera, Cátedras de Microbiología e Inmunología y Virología. Categoría del Incentivo: no posee.

. Laboratorio de Microbiología. Módulo de Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de Misiones. Mariano Moreno 1375 (3300). Posadas, Misiones. E–mail: diskega@yahoo.com.ar.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 11 / Nº 12 / 2009 / 46–51

Relación entre degradación de colorantes y oxidación de lignina residual causados por *Ganoderma applanatum* y *Pycnoporus sanguineus* en el licor negro kraft

Ernesto Shimizu, Jorge O. Velez Rueda, Pedro D. Zapata, Laura L. Villalba

Dye degradation and residual lignin oxidation relationship caused by *Ganoderma applanatum* and *Pycnoporus sanguineus* in kraft black liquor

ABSTRACT

Kraft pulping for paper production has a significant impact on the environment with the generation of highly colored and toxic effluents. Because white rot fungi (WRF) have a distinctive capacity for efficiently degrading wood lignin by the extracellular enzymes action, they are considered as a growing alternative in biotechnology.
The growing and degrading ability of two WRF, Ganoderma applanatum and Pycnoporus sanguineus from Misiones (Argentina) in dyes and kraft black liquor was analyzed as a prospective application on bioremediation processes. Black liquor is a kraft pulping process effluent containing solubilized lignin, the primary organic by–product from the chemical digestion of lignocellulosic raw materials. Dye decolorization experiments (solid culture) and black liquor degrading studies (solid and liquid cultures) were conducted. Decolorization experiments in solid culture were conducted with bromophenol blue, malacchite green and black liquor at acid and alkaline pH. Liquid culture studies were quantified by UV spectrometric measurements. Residual lignin degradation was confirmed as a result of the change in absorbance by spectral scanning over the wavelength range from 200 to 400 nm Decolorization and degrading experiments validated the dye and lignin degrading ability of both fungi in solid and liquid cultures.

KEY WORDS: Dye decolorization, white rot fungi, lignin, degradation.

RESUMEN

El pulpado kraft para la obtención de pulpa para papel es un proceso de gran impacto ambiental, generando efluentes, tóxicos y altamente coloreados. Los hongos de pudrición blanca (WRF) son capaces de degradar eficientemente la lignina contenida en la madera mediante la acción de enzimas extracelulares, razón por la cual son considerados como una alternativa creciente en biotecnología. En este trabajo se analizó la capacidad de crecimiento y decoloración de dos WRF autóctonos de la Provincia de Misiones (*Pycnoporus sanguineus* cepa 1226 y *Ganoderma applanatum* cepa F) sobre colorantes y licor negro para evaluar la posibilidad de aplicación en procesos de biorremediación. El licor negro es un efluente del proceso kraft que contiene lignina solubilizada, el principal subproducto de la digestión de material lignocelulósico.
Se llevaron a cabo ensayos de degradación de colorantes (medios sólidos) y ensayos de degradación de licor negro (medios sólido y líquido). Los ensayos de decoloración en medio sólido se realizaron en presencia de azul de bromofenol, verde de malaquita y licor negro a pH ácido y alcalino. Los estudios en medio líquido se realizaron mediante barridos espectrofotométricos desde 200 hasta 400 nm de medios conteniendo licor negro a pH ácido tratados con el hongo. Los ensayos de crecimiento y decoloración demuestran que ambos hongos utilizados poseen una buena capacidad degradativa que podría ser aprovechada en aplicaciones biotecnológicas para la industria de la celulosa y el papel.

PALABRAS CLAVE: Decoloración de colorantes, hongos de pudrición blanca, lignina, degradación.

INTRODUCCIÓN

Para la fabricación de pulpa para papel es necesario separar la celulosa y la hemicelulosa de la lignina, y producir la pasta o pulpa, siendo necesario la utilización de métodos químicos, mecánicos y/o una combinación de ambos [1]. La aplicación de estos procesos hace que la industria papelera contribuya a la polución ambiental, generando efluentes, tóxicos y altamente coloreados, con alto contenido de materia orgánica, los cuales presentan una alta demanda bioquímica y química de oxígeno (DBQ y DQO) [2]. Mientras que algunos de estos compuestos contaminantes se encuentran naturalmente en la madera, otros xenobióticos (ligninas cloradas, fenoles, dioxinas, furanos) se generan durante los procesos industriales, siendo en su mayoría recalcitrantes a la degradación y persistentes

en la naturaleza [2]. Para eliminar estos agentes contaminantes, los efluentes son tratados por oxidación biológica en lagunas o sistemas de lecho fluido, reduciendo el DBQ y el DQO pero no el color. Esto hace evidente la necesidad de nuevas tecnologías que disminuyan la demanda de energía y sean eficientes en la detoxificación de efluentes, con los consiguientes beneficios para el ambiente.

La utilización de hongos que degradan la madera para la solución de problemas ambientales es una alternativa de creciente expansión en biotecnología. Los hongos de pudrición blanca (*white rot fungi* o WRF) son capaces de degradar eficientemente la lignina contenida en la madera mediante la acción de enzimas extracelulares [3, 4]. Los primeros estudios acerca de la capacidad degradativa de estos hongos fueron realizados por Kirk y Yang en 1979 sobre el basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium* [5]. El interés acerca de este grupo de hongos y especialmente en sus enzimas ligninolíticas aumentó cuando Bumpus *et al.*, [6], demostraron que *P. chrysosporium* era capaz de oxidar compuestos xenobióticos recalcitrantes como los compuestos aromáticos policíclicos, cloroaromáticos y tinturas poliméricas. Los estudios actuales demuestran que el tratamiento de efluentes con hongos ligninolíticos no sólo produce decoloración (hasta el 80 %) sino también detoxificación [7], razón por la cual los WRF ofrecen una opción innovadora para minimizar el impacto ambiental de los procesos contaminantes.

La aplicación de WRF y otros organismos en procesos biotecnológicos requiere previamente demostrar su potencial poder degradativo y su adaptación para el crecimiento en presencia de agentes tóxicos [8, 9]. Trabajos previos de nuestro grupo demuestran que algunos hongos xilófagos autóctonos de la Provincia de Misiones podrían ser aplicados a procesos de biorremediación porque producen una cantidad razonable de enzimas oxidativas [10, 11]. En este trabajo se analiza la capacidad de crecimiento y decoloración de dos WRF autóctonos de la Provincia de Misiones (*Pycnoporus sanguineus* y *Ganoderma applanatum*) sobre colorantes y licor negro para evaluar la posibilidad de aplicación en procesos de biorremediación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos utilizados

Se utilizó la cepa 2126 del hongo *Pycnoporus sanguineus*, provista por la Cátedra de Micología Experimental de la Universidad de Buenos Aires, y la cepa F de *Ganoderma applanatum*, provista por el cepario de la Facultad de Ciencias Forestales de Eldorado, Universidad Nacional de Misiones. Ambos hongos se sometieron a los mismos tratamientos para comparar sus respectivas actividades enzimáticas, realizándose todos los ensayos por duplicado.

Medios de cultivo y método de inoculación

Para el cultivo primario se utilizó agar–malta (agar 20 g/L, extracto de malta 12,7 g/L) a partir del cual se extrajeron tacos de agar con micelio para la inoculación de cada experimento. Los tacos fueron extraídos de placas con hongos de 5–7 días de incubación, mediante sacabocados metálico, cuadrangular, de 36 mm^2, incubándose en todos los casos en estufa a 29 ± 1 ºC.

Ensayos de decoloración

Los ensayos de decoloración fueron realizados en agar–malta glucosado (AMG: agar 20 g/L, extracto de malta 12,7 g/L y glucosa 10 g/L) y en agar–papa glucosado (PGA: agar 20 g/L, glucosa 10 g/L y papa rayada 300 g/L). Los colorantes utilizados fueron rojo fenol 50^µM, verde de malaquita 50^µM (VM) y azul de bromofenol 50^µM (AB). Los controles negativos de degradación fueron los medios de cultivo con el colorante sin inóculo. Todos los ensayos se realizaron por duplicado sobre placas de Petri de 9 mm de diámetro.

Ensayos de decoloración de licor negro

Para estos ensayos se utilizó el licor negro (subproducto viscoso de color oscuro del proceso kraft, compuesto principalmente por residuos de lignina, agua y químicos inorgánicos utilizados en el proceso) obtenido en la Planta Piloto de la FCEQyN–UNaM a partir la cocción alcalina de chips de madera (cocción Kraft).

Los ensayos de decoloración de licor negro en medio sólido se realizaron en agar glucosado (agar 20 g/L y glucosa 10 g/L) a diferentes diluciones del licor negro, 1:1, 1:2, 1:4, 1:15 y 1:30 (v/v) a pH^11 (habitual del licor negro) y pH^4,7 (por adición de H_2SO_4 4N). Todos los ensayos se realizaron por duplicado sobre placas de Petri de 9 mm de diámetro.

El medio utilizado para los ensayos de decoloración de licor negro en medio líquido contenía 1 % glucosa y licor negro a una dilución de 1:15 v/v pH^4.7 ajustado con H_2SO_4 4N. Se realizó el filtrado del total del medio de cultivo y se realizó un barrido espectral entre 200 y 400 nm mediante espectrofotómetro Techcomp 8500 II, comparando el medio inoculado con un control sin inóculo y determinando el cambio de absorbancia.

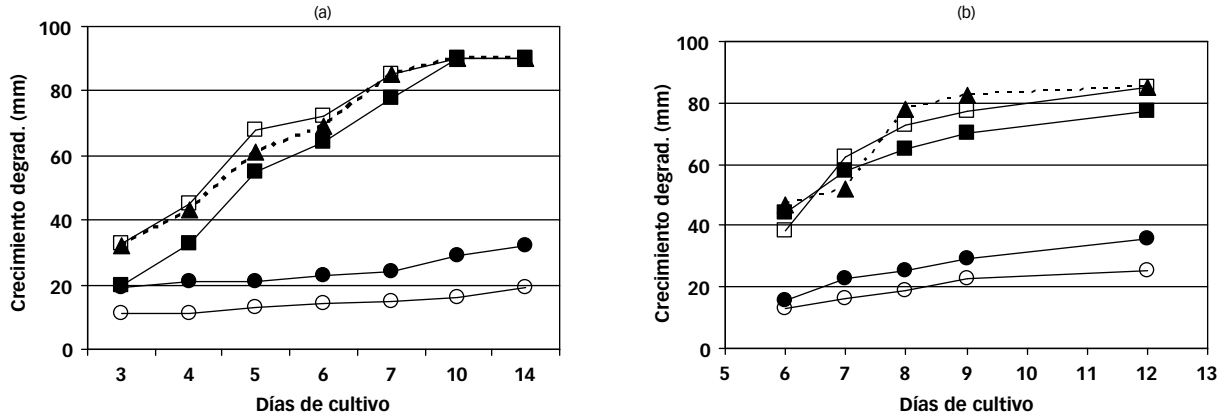


FIGURA 1. a) curva de crecimiento–decoloración de *P. sanguineus* en medio agar malta glucosado (AMG). b) curva de crecimiento–decoloración de *P. sanguineus* en medio agar papa glucosado (PGA). Referencias: ■ decoloración en AB, □ crecimiento en AB, ● decoloración en VM, ○ crecimiento en VM, ▲ crecimiento sin colorantes. Se grafica la media de 2 experimentos similares.

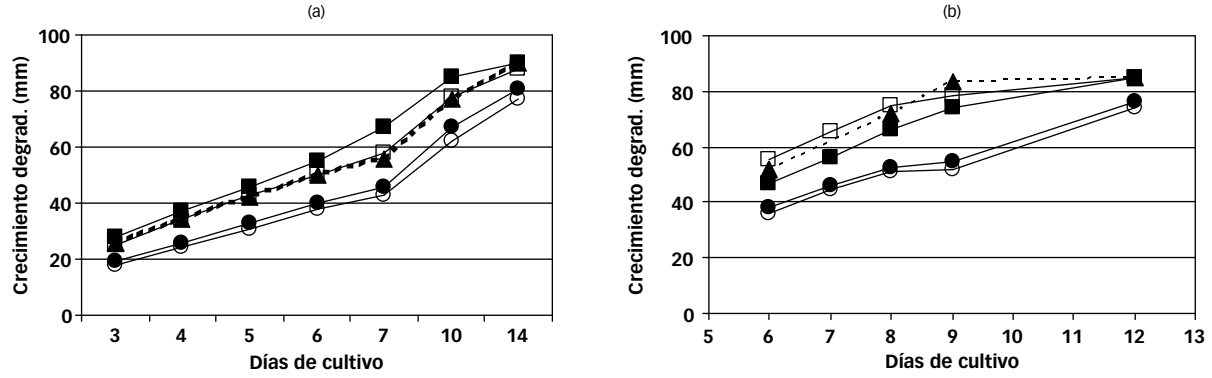


FIGURA 2. a) curva de crecimiento–decoloración de *G. applanatum* en medio agar malta glucosado (AMG). b) curva de crecimiento–decoloración de *G. applanatum* en medio agar papa glucosado (PGA). Referencias: ■ decoloración en AB, □ crecimiento en AB, ● decoloración en VM, ○ crecimiento en VM, ▲ crecimiento sin colorantes. Se grafica la media de 2 experimentos similares.

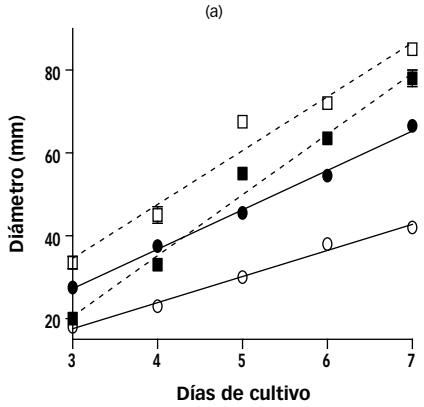
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primeramente se realizó un ensayo de capacidad oxidativa utilizando medios con colorantes y posteriormente se relacionó esto con la deslignificación evaluando la capacidad de ambos hongos para decolorar el efluente industrial licor negro.

Pycnoporus sanguineus mostró un comportamiento similar en ambos medios utilizados (AMG y PGA), no observándose diferencias significativas entre el crecimiento sin colorante con el crecimiento en presencia de AB, sin embargo el colorante VM produjo una considerable inhibición para el desarrollo del hongo en ambos medios. En todos los casos no se observaron diferencias significativas entre el halo de decoloración observado y el diámetro de crecimiento del hongo. (Figura 1)

Ganoderma applanatum también mostró similar comportamiento en ambos medios de cultivo, no encontrándose diferencias significativas entre el crecimiento sin colorante y en presencia de colorantes, tanto para AB como para VM. Para este hongo tampoco se observaron diferencias significativas entre el halo de decoloración y el diámetro de crecimiento. (Figura 2)

Al comparar la tasa diaria de crecimiento y degradación de ambos hongos en presencia de azul de bromofenol (representados por las pendientes de la curva lineal en ambos casos) se puede observar que *G. applanatum* crece más lentamente que *P. sanguineus* (Figura 3), mientras que en presencia de verde de malaquita *P. sanguineus* casi no produce desarrollo (Figura 1).



(b)

	Pendiente	Pendiente 95 % Int. Conf.	r²
P. sanguineus Crecim.	13.00 ± 1.422	8.474 - 17.53	0,965
P. sanguineus Degrad.	14.65 ± 1.064	11.26 - 18.04	0,984
G. applanatum Crecim	6.300 ± 0.3606	5.153 - 7.447	0,990
G. applanatum Degrad	9.500 ± 0.3786	8.295 - 10.70	0,995

FIGURA 3. a) Curva de crecimiento–decoloración en presencia de AB. b) Análisis mediante regresión lineal. Referencias: ■ *P. sanguineus* curva de decoloración; □ *P. sanguineus* curva de crecimiento; ● *G. applanatum* curva de decoloración; ○ *G. applanatum* curva de crecimiento.

Ensayos sobre licor negro

Los ensayos en medios sólidos con licor negro mostraron desarrollo de los hongos únicamente con diluciones de 1:15 a pH^4,7 (Figura 4) y 1:30 a ambos pH analizados (Figura 5).

Como se observa, ambos hongos mostraron un comportamiento similar en presencia de azul de bromofenol, así como en presencia de licor negro en medio ácido, mostrado por los resultados obtenidos en ensayos con licor negro en medio sólido que se correlacionan con los resultados en cultivos en medio líquido conteniendo el efluente a una dilución de 1:15 a pH^4,7. Sin embargo, al evaluar la decoloración sobre verde de malaquita y sobre licor negro a un pH alcalino únicamente *G. applanatum* fue capaz de desarrollarse y decolorar, lo que podría indicar la mejor adaptabilidad de este hongo frente a los contaminantes xenobióticos.

Otras cepas de *Pycnoporus sanguineus* ya han sido ensayadas con anterioridad por otros autores, estando demostrado su potencial biotecnológico [12, 13, 14], razón por la cual se lo tomó como especie de referencia para comparar el comportamiento de otras especies no descriptas como potencialmente útiles en biotecnología, como es el caso de *G. applanatum*. Por otro lado los ensayos de *screening* realizados por nuestro grupo con anterioridad sobre estas cepas indican su posible utilidad teórica deducida de las enzimas producidas por estos hongos y su acción sobre Poly R475 [15] corroborada ahora a través de este trabajo mediante el uso directo sobre el efluente principal de este tipo de procesamiento industrial. Los resultados de la barrida espectral realizados en medios líquidos luego de 10 días de cultivo del hongo sobre el medio con licor negro (Figura 6) muestran una disminución significativa de la absorbancia del medio tratado respecto del control al cual no se realizó la inoculación con el hongo. Ambos espectrogramas muestran la misma forma típica de la lignina, con un primer máximo a los 220–230 nm y un segundo a los 270–280 nm originados por grupos fenólicos no–condensados de la lignina [16].

La forma conservada del espectro del licor negro inoculado respecto a la de control indica que la estructura básica del polímero de lignina está conservada y específicamente la reducción del pico de 280 nm indica actividad ligninolítica del hongo.

Se puede observar también que la intensidad de la absorbancia está relacionada con la concentración de lignina, siendo menor en el caso de las muestras biotratadas.

Estos resultados permiten vislumbrar la posibilidad de realizar los ajustes a escala piloto e industrial que permitan iniciar experimentos de cara a una aplicación biotecnológica de esta propiedad en el tratamiento de efluentes. En el caso de plantas de pequeña escala esta alternativa se torna interesante ya que los costos de instalación y operación

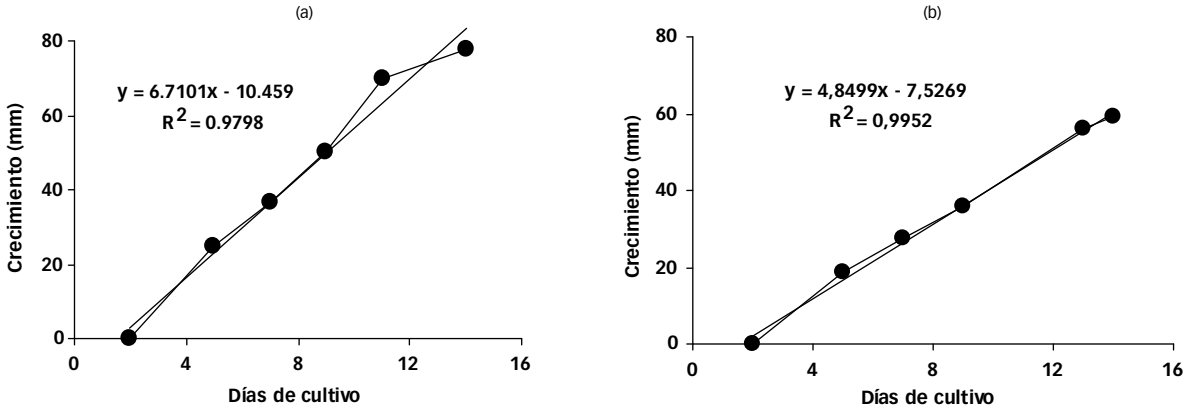


FIGURA 4. Curva de crecimiento en licor negro diluido 1:15 a pH 4,7. Referencias: a) *P. sanguineus,* b) *G. applanatum.*

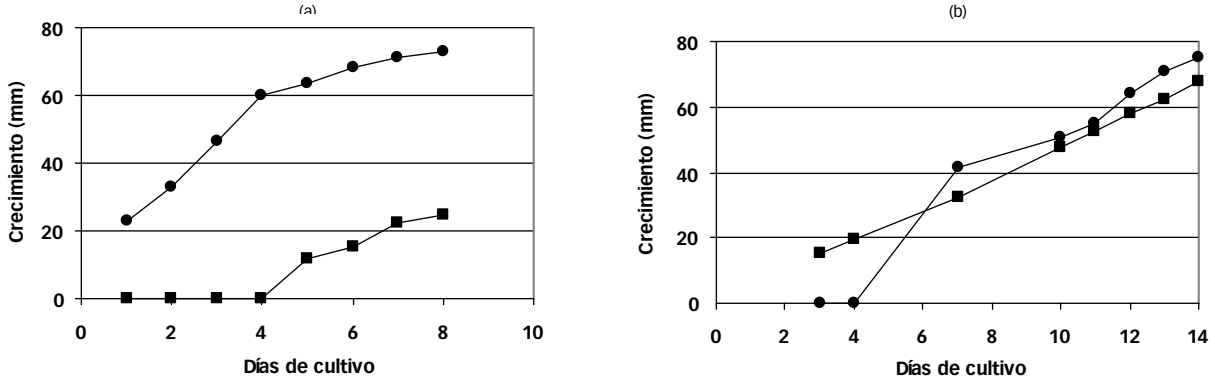


Figura 5. Curva de crecimiento en licor negro diluido 1:30 a pH 4,7 ● y pH 11, ■ para a) *P. sanguineus* y b) *G. applanatum*.

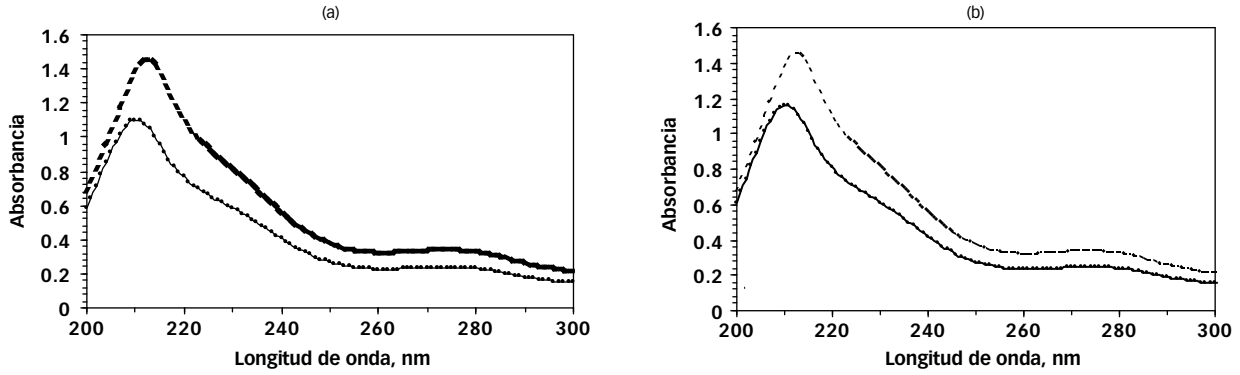


FIGURA 6. Curva de absorbancia para medio conteniendo licor negro tratado: a) *P. sanguineus,* b) *G. applanatum.* Referencias: — Medio tratado, – – Medio de control. Se muestra la media de dos experimentos similares.

asociados a unidades convencionales de recuperación química son muy elevados.

CONCLUSIONES

Tanto la cepa F de *Ganoderma applanatum* como la cepa 2126 de *Pycnoporus sanguineus* poseen la capacidad de crecimiento y decoloración sobre los colorantes azul de bromofenol y verde de malaquita, así como sobre el efluente de la industria papelera licor negro.

Estos estudios demuestran que ambos hongos poseen una buena capacidad degradativa que podría ser aprovechada en aplicaciones biotecnológicas para la industria de la celulosa y el papel.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer a la Cátedra de Micología Experimental de la Universidad de Buenos Aires y al cepario de la Facultad de Ciencias Forestales de Eldorado de la Universidad Nacional de Misiones por la cesión gentil de las cepas fúngicas.

Parte de este proyecto fue financiado por la Fundación Banco Río, mediante el otorgamiento del 1º premio al Trabajo Científico Innovador.

Ernesto Shimizu ha realizado este trabajo mediante una beca concedida por el Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Productiva (CEDIT) de la Provincia de Misiones, Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **SMOOK G.A.** *Manual para técnicos de pulpa y papel.* TAPPI Canadian Cataloguin in Publication Data 1990, 1:1–17.

2. **ALI M., SREEKRISHNAN T.R.** *Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review.* Adv. Environ. Res. 2001; 5: 175–196.

3. **CALL H.P., MÜCKE I.** *Minireview. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase–mediator–systems (Lignozym®–process).* J. Biotechnol. 1997, 53: 163–202.

4. **POPPIUS LEVLIN K., WANG W., RANUA M., NIKU PAAVOLA M.L., VIIKARI L.** *Biobleaching of chemical pulps by laccase/mediator systems.* Tappi Biological Science Symposium, Atlanta, USA, 1997, 329–333.

5. **KIRK T.K., YANG H.H.** *Partial delignification of unbleached kraft pulp with lignolytic fungi.* Biotechnol. Lett. 1979, 1: 347–352.

6. **BUMPUS J.A., TIEN M., WRIGHT D.S., AUST A.D.** *Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot fungus.* Science 1985; 228: 1434–1436.

7. **WESENBERG D., KYRIAKIDES I., AGATHOS S.N.** *White–rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents.* Biotech. Adv. 2003, 22: 161–187.

8. **AGGELIS G., EHALIOTIS C., NERUD F., STOYCHEV I., LYBERATOS G., ZERVAKIS G.I.** *Evaluation of white–rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002, 59: 353–360.

9. **LARA M.A., RODRÍGUEZ MALAVER A.J., ROJAS O.J., HOLMQUIST O., GONZÁLEZ A.M., BULLÓN J., PEÑALOZA N., ARAUJO E.** *Black liquor lignin biodegradation by Trametes elegans* Intl. Biodet. Biodeg. 2003, 52: 167–173.

10. **VILLALBA L., LEVIN L., PAPINUTTI V.L., FORCHIASSIN F.** *Relevamiento de hongos lignolíticos de Misiones para su aplicación en procesos biotecnológicos en la industria celulósico–papelera.* XXX Jornadas Argentina de Botánica. Rosario 2005.

11. **VILLALBA L., LEVIN L., PAPINUTTI V.L., DA RE V., FORCHIASSIN F.** *Selección de cepas de hongos de pudrición blanca de la provincia de Misiones aptas para su utilización en procesos de biopulpado.* III Jornadas Científico Tecnológicas UNAM. Posadas, Misiones 2005.

12. **SAPARRAT M.C., MARTÍNEZ M.J., CABELLO M.N., ARAMBARRI A.M.** Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. Rev. Iberoam. Micol. 2002, 19: 181–185.

13. LUNA M.J., MURACE M.A., KEIL J.D., OTAÑO, M.E. *Patterns of decay caused by Pycnoporus sanguineus and Ganoderma lucidum (Aphyllophorales) in poplar wood.* IAWA J. 2004, 25: 425–433.

14. BAR, M. *Kinetics and physico–chemical properties of white–rot fungal laccases.* Thesis Magister Scientiae. Faculty of Natural and Agricultural Science, Department of Microbiology and Biochemistry, University of the Free State, Bloemfontein, Dec. 2001.

15. LEVIN L., VILLALBA L., DA RE V., FORCHIASSIN F., PAPINUTTI L. *Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes.* Proc. Biochem. 2007, 42: 995–1002.

16. SCALBERT, A., MONTIES, B., GUITTET, E. & LALLEMAND, J. Y. *Comparison of wheat straw lignin preparation.* I Chemical and spectroscopic characterization. Holzforschung 1986, 40:119–127.

Recibido: 16/12/08.
Aprobado: 17/02/10.

- Ernesto Shimizu
  Licenciado en Genética graduado en la Universidad de Misiones. Es ex–becario del CEDIT y de la FCEQyN. Actualmente realiza estudios de doctorado mediante una beca Agencia en el INTA EEA Balcarce. Posee presentaciones a congresos nacionales e internacionales.

- Jorge Omar Velez Rueda
  Es Licenciado en Genética graduado en la Universidad de Misiones. Es ex–becario del CEDIT y de la FCEQyN. Posee presentaciones a congresos nacionales e internacionales.

- Pedro Darío Zapata
  Doctor por la Universidad de Alcalá de Henares, en el programa Biomedicina. Profesor Regular Adjunto en las Cátedras de Biología Celular y Molecular (Bioquímica), Genética Molecular (Lic. en Genética), Biología Celular (Lic. en Genética) y Biotecnología Molecular (Ingeniería Química, Bioquímica y Farmacia). Posee actualmente la Categoría III en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes–Investigadores. Se desempeña además como Director y Co–Director de proyectos Incentivados y Subsidiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.

- Laura L. Villalba
  Es PhD de la State University of New York, College of Environmental Science and Forestry. Profesor adjunto de los cursos Pulpados Químicos y Operaciones Fundamentales en la fabricación de la Pulpa y el Papel (Maestría en Ciencias de la Madera, Pulpa y Papel), Cátedras de Coloquio I, II, Organización Industrial y relaciones laborales (Tecnicatura Universitaria en Celulosa y Papel), Transferencia de masa (Ingeniería en Alimentos), Operaciones de Transferencia de masa (Ingeniería Química). Categoría III en el Sistema Nacional de Incentivos a los Docentes–Investigadores. Se desempeña además como Directora y Co–Directora de proyectos Incentivados y Subsidiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.

Programa de Celulosa y Papel. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, UNaM. Laboratorio de Biotecnología Molecular. Módulo de Bioquímcia y Farmacia, FCEQyN, UNaM. Felix de Azara 1553, (N3300LQH) Posadas, Misiones, Argentina. laura@fceqyn.unam.edu.ar.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 11 / Nº 12 / 2009 / 52–57

Calidad microbiológica de té negro en dos formas comerciales: en hebras y en saquitos

Gladis Jerke, Severino Bargardi, Martha G. Medvedeff, Erenio Gonzales Suarez

Microbiological quality of black tea in two commercial forms: in strands and in teabags

ABSTRACT

The aim of our study was to determine the microbiological quality of black tea sold in strands (BTS) and in teabags (BTB) in Posadas, Misiones. A hundred samples were studied: 25 of BTS and 75 of BTB. The presence of fungi and yeasts (RHL), total mesophilic aerobic bacteria (BAMT), total coliforms (RCT), fecal coliforms (RCF) and *Escherichia coli* was evaluated. Results of medians and averages in BTS were: RHL 400/738 UFC/g; BAMT 550/763 UFC/g, RCT 23/376 MPN/g, RCF <3/<3 MPN/g respectively and absence of *Escherichia coli* were found. For BTB, values were: RHL 885/2149 UFC/g, BAMT 1300/4044 UFC/g, RCT 93/317 MPN/g, RCF <3/22 MPN/g, respectively and absence of *Escherichia coli* were found. The counts of RHL, BAMT and RCT were higher for BTB. *Escherichia coli* was not detected in any of the samples analyzed. Some samples exceeded the levels allowed, marking the importance of periodic microbiological monitoring for black tea.

KEY WORDS: Microbiological quality, black tea, tea bags, tea threads.

RESUMEN

El objetivo de nuestro estudio fue determinar la calidad microbiológica de té negro comercializado en hebras (TNH) y en saquitos (TNS) en Posadas, Misiones. Se estudiaron 100 muestras: 25 de TNH y 75 de TNS. Se evaluaron hongos y levaduras (RHL), bacterias aerobias mesófilas totales (BAMT), coliformes totales (RCT), coliformes fecales (RCF) y presencia de *Escherichia coli.* Los resultados de las medianas y promedios fueron. TNH: RHL 400/738 UFC/g; BAMT 550/763 UFC/g, RCT 23/376 NMP/g, RCF <3/<3 NMP/g, respectivamente y ausencia de *Escherichia coli.* TNS RHL 885/2149 UFC/g, BAMT 1300/4044 UFC/g, RCT 93/317 NMP/g, RCF <3/22 NMP/g respectivamente y ausencia de *Escherichia coli.* Los recuentos RHL, BAMT y RCT fueron superiores para TNS. No se detectó *Escherichia coli* en ninguna de las muestras analizadas. Algunas muestras superaron los niveles permitidos resaltando la importancia de un control microbiológico periódico para té negro.

PALABRAS CLAVE: Calidad microbiológica, té negro, té en saquitos, té en hebras.

INTRODUCCIÓN

Té negro es el producto obtenido por medio de diversos tratamientos, especialmente por fermentación y secado, únicamente a partir de las hojas, brotes y tallos tiernos de las variedades de la especie *Camellia sinensis* (Linnaeus) O. Kuntze, reconocidas como aptas para la preparación del té destinado al consumo humano como infusión [1, 2].

En Argentina el cultivo de *Camellia sinensis* se realiza unicamente en las provincias de Misiones y Corrientes. La provincia de Misiones, concentra el 95,2 % de la superficie plantada del país. El cultivo y procesamiento del té es una de las actividades agroindustriales importantes para la economía de la provincia [1, 2]. El 95 % del té cosechado y elaborado en la provincia de Misiones es destinado a la comercialización nacional e Internacional [3], representando el 80 % del comercio del té en Sudamérica y el 3,5 % del comercio mundial. Argentina se ubica en el 9º puesto como productor y en el 7º como país exportador [3, 4].

Los cuatro tipos principales de té (negro, verde, rojo y blanco) y las múltiples variedades de infusiones existentes dentro de cada categoría, que suman más de tres mil infusiones de tés de todo el mundo, se preparan a partir de la misma materia prima: brotes y hojas de la especie *Camellia sinensis* y son el resultado de los diferentes métodos de industrialización de la planta [5]. Tres son los tipos de té de mayor producción y consumo mundial: el 78 % es té negro consumido por paises occidentales, 20 % es té verde que es comúnmente consumido en países asiáticos como China y Japón y 2 % es té Oolong que se produce principalmente en el sur de China [3, 6].

El té es la bebida que más se toma en el mundo después del agua. Se consume frío, caliente, en bolsitas (saquitos) o en hebras [3, 5]. Sus diversas presentaciones comerciales son:

- Té en saquitos: es la presentación preferida en Occidente. Este modo de comercialización representa el 86,2 % del mercado mundial occidental total [3].
- Té en hebras: representa, aproximadamente, el 10 % del total del consumo mundial occidental. Es el tipo de

presentación preferido en Oriente [3].

- Té instantáneo: representa el 2–4 % de la producción total. Esta forma de consumo cuenta con una mínima proporción del mercado mundial. Se consume principalmente en Estados Unidos como polvo soluble en el agua fría, y en menor medida en el Reino Unido en forma de polvo soluble en agua caliente [3].
- Refrescos: el té frío nació en Estados Unidos en 1904, donde representa el 80 % del total del consumo de este producto. Representa hoy en día, un mercado de 11 mil millones de litros [3].

Entre los constituyentes químicos que posee la infusión del té, en cualquiera de sus tipos, destaca la presencia de flavonoides conocidas genéricamente como catequinas que ejercen un importante papel antioxidante y son las responsables de los numerosos efectos beneficiosos que se han asociado al consumo del té [7–2]. Las catequinas contenidas en el té presentan la acción bactericida que permitiría disminuir la acción de las bacterias del género *Streptococcus* en la formación de la placa dental y de las caries [13–15]. El elevado contenido en fluor del té se ha asociado a la prevención de caries y al fortalecimiento del esmalte dental [15, 16]. El consumo del té verde o negro, según estudios recientes, reduce los riesgos de cáncer [6, 18–21], previene enfermedades cardiovasculares [22, 23], retrasa el envejecimiento [6], previene la hipertensión arterial [24, 25], la obesidad [25, 26] y la arterioesclerosis [27]. Estas propiedades saludables, ampliamente estudiadas, favorecieron la extensión del consumo de té desde 2337 AC [28] hasta nuestros días y en todo el mundo, siendo considerada la segunda bebida de consumo mundial, después del agua.

En la actualidad existe una tendencia creciente, en los consumidores, a exigir calidad en los productos que consumen tanto en relación a las características organolépticas del producto como en relación a su contenido microbiano.

El control microbiológico rutinario de alimentos destinados al consumo humano está tomando cada vez más relevancia para productos destinados a la exportación. Con el objeto de brindar un producto más seguro para la salud del consumidor, es preciso realizar controles microbiológicos en el producto. ya sea antes, durante o después de su elaboración. Para poder establecer la inocuidad y seguridad del producto es necesario disponer de límites microbiológicos. Es habitual que los países establezcan límites para los productos que producen, consumen y/o exportan. Hasta el presente pocos países cuentan con la reglamentación de controles microbiológicos para té. En nuestro país, al momento de iniciar el presente estudio, no se disponen de métodos ni límites para el control microbiológico en té. Por tal motivo y dado que el 95 % del volúmen de la producción local es destinado a la exportación, nos hemos propuesto:

1. realizar el relevamiento de la microflora de interés en el control higiénico–sanitario para determinar la calidad microbiológica en té negro, en hebras y en saquitos, comercializado en Posadas, Misiones;
2. participar en la propuesta de un perfil microbiológico y los métodos para el control microbiológico de té negro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron en total 100 muestras: 25 muestras de té negro en hebras y 75 en saquitos, correspondientes a 12 marcas comerciales de mayor consumo en la provincia de Misiones, Argentina. El muestreo se realizó al azar con cinco repeticiones para cada marca comercial. El esquema de muestreo se estableció considerando la diversidad de marcas y preferencia de consumo de las dos formas comerciales del té negro en nuestra provincia [3]. Existe una preferencia marcada al consumo de té negro en saquitos en relación al té negro en hebras.

Se realizó el siguiente perfil microbiológico: el recuento de hongos y levaduras (RHL), recuento de bacterias aerobias mesófilas totales (BAMT), recuento de coliformes totales (RCT), recuento de coliformes fecales (RCF) y presencia de *Escherichia coli.*

El perfil microbiológico evaluado se realizó acorde a la norma IRAM 20517:2004 que establece el perfil microbiológico y los métodos a emplear para el control microbiano en muestras de yerba mate canchada y elaborada (28). Este mismo perfil microbiológico actualmente se está proponiendo para el té mediante la confección del Esquema 1 de la Norma IRAM 20617:2007 [29].

Cada muestra se procesó por duplicado en la fase experimental. Se prepararon diluciones decimales y se sembraron por duplicado. Los métodos y medios de cultivo empleados fueron:

a. para el RHL empleando el método de diseminación en superficie con espátula de Driglasky en medio Oxytetraciclina Glucosa extracto de levaduras (OGYE), incubando a 25° C durante 5 a 7 dias;
b. el BAMT se determinó con el método de recuento en placas de PCA, incubando a 37° C durante 48 a 72 horas;
c. la cuantificación de los coliformes totales en caldo Lauril Sulfato Triptona (LST), Método del NMP, empleando 9 tubos por muestra a 37° C.
d. Los tubos positivos del RCT se repicaron a caldo Verde brillante rojo bilis (VBBL) para el conteo de coliformes fecales (en baño termostatizado a 44,5° C) y para el ensayo confirmatorio a 37° C.
e. La presencia de *E.coli* se determinó repicando los tubos positivos del RCF a placas de EMB (Eosina Azul de metileno) y las cepas aisladas se identificaron mediante pruebas bioquímicas.

Tabla 1. Resultado de los recuentos microbianos en té en saquitos.

N° Muestra	BAMT	BCT	BCF	Eco	HyL	N° Muestra	BAMT	BCT	BCF	Eco	HyL
1	32000	93	< 3	–	8900	40	550	9,1	< 3	–	590
2	270	< 3	< 3	–	450	41	2500	< 3	< 3	–	140
3	270	< 3	< 3	–	100	42	820	43	< 3	–	140
4	11000	23	< 3	–	1550	43	1500	3,6	< 3	–	140
5	2000	3	< 3	–	820	44	1400	7,3	< 3	–	140
6	4640	460	< 3	–	3370	45	820	< 3	< 3	–	90
7	3360	1100	< 3	–	910	46	370	< 3	< 3	–	140
8	4910	1100	< 3	–	2280	47	200	< 3	< 3	–	90
9	910	< 3	< 3	–	1450	48	270	< 3	< 3	–	140
10	640	< 3	< 3	–	400	49	180	< 3	< 3	–	140
11	16410	1100	< 3	–	10550	50	8700	< 3	< 3	–	350
12	3450	< 3	< 3	–	1000	51	450	< 3	< 3	–	140
13	2640	460	28	–	760	52	2900	< 3	< 3	–	500
14	6450	240	43	–	3340	53	1100	< 3	< 3	–	3000
15	5640	460	43	–	800	54	200	< 3	< 3	–	860
16	3270	< 3	< 3	–	700	55	180	< 3	< 3	–	360
17	820	150	11	–	1810	56	550	3	< 3	–	360
18	5820	1100	150	–	2760	57	200	< 3	0	–	500
19	9550	460	21	–	640	58	1600	3	3	–	600
20	16270	1100	28	–	640	59	730	< 3	0	–	400
21	1000	93	21	–	2640	60	15000	9.1	9,1	–	3400
22	730	15	< 3	–	200	61	3700	3,6	0	–	1400
23	640	< 3	< 3	–	570	62	250	< 3	0	–	1000
24	25550	1100	210	–	3860	63	360	< 3	0	–	1000
25	270	< 3	< 3	–	100	64	40	< 3	0	–	360
26	1700	23	< 3	–	1800	65	100	< 3	0	–	21000
27	1300	< 3	< 3	–	910	66	30	< 3	0	–	1700
28	5300	93	36	–	3300	67	200	< 3	0	–	2000
29	3600	39	< 3	–	4300	68	3600	43	0	–	7500
30	1300	15	< 3	–	3800	69	13000	> 1100	0	–	2000
31	12000	240	< 3	–	5100	70	24000	< 3	0	–	4300
32	2100	< 3	< 3	–	1500	71	1200	< 3	0	–	1500
33	7500	460	< 3	–	6900	72	2700	< 3	0	–	5300
34	16400	93	< 3	–	14000	73	1100	< 3	0	–	1200
35	1500	< 3	< 3	–	2000	74	3500	< 3	0	–	4800
36	750	< 3	< 3	–	570	75	600	< 3	0	–	550
37	200	< 3	< 3	–	410	**Mediana**	**1300**	**93**	**0**	**0**	**885**
38	200	< 3	< 3	–	250	**Promedio**	**4044**	**317**	**22**	**0**	**2149**
39	360	< 3	< 3	–	90	**Máximo**	**32000**	**1100**	**210**	**0**	**21000**
						Mínimo	**30**	**3**	**0**	**0**	**90**

Las celdas sombreadas indican recuentos microbiológicos que superan los valores límites actualmente propuestos en la norma IRAM 20617:2007, nacional (en estudio).

Tabla 2. Resultado de los recuentos microbianos en té negro en hebras.

N° Muestra	BAMT	BCT	BCF	Eco	HyL	N° Muestra	BAMT	BCT	BCF	Eco	HyL
1	270	< 3	< 3	–	1700	16	820	< 3	< 3	0	1670
2	550	23	< 3	–	550	17	4360	< 3	< 3	–	200
3	450	3,6	< 3	–	640	18	180	< 3	< 3	–	640
4	640	< 3	< 3	–	1000	19	1500	< 3	< 3	–	250
5	450	< 3	< 3	–	800	20	270	< 3	< 3	–	250
6	180	< 3	< 3	–	100	21	640	< 3	< 3	–	200
7	270	< 3	< 3	–	400	22	1100	< 3	< 3	–	90
8	820	< 3	< 3	–	600	23	180	< 3	< 3	–	100
9	550	< 3	< 3	–	400	24	200	< 3	< 3	–	50
10	450	< 3	< 3	–	300	25	100	< 3	< 3	–	270
11	1920	1100	< 3	–	1370	**Mediana**	**550**	**23**	**< 3**	**0**	**400**
12	730	< 3	< 3	–	550	**Promedio**	**763**	**376**	**< 3**	**0**	**738**
13	270	< 3	< 3	–	100	**Máximo**	**4360**	**1100**	**0**	**0**	**3550**
14	910	< 3	< 3	–	3550	**Mínimo**	**100**	**4**	**0**	**0**	**50**
15	1270	< 3	< 3	–	2670						

Las celdas sombreadas indican recuentos microbiológicos que superan los valores límites actualmente propuestos en la norma IRAM 20617:2007, nacional (en estudio).

El conteo de los parámetros microbiológicos se realizó respetando los tiempos para cada ensayo, se promediaron los duplicados y se registraron los datos en una tabla.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos de cada uno de los recuentos se registraron tomando el promedio de los duplicados de la fase experimental y el conjunto de datos fue sometido a un análisis estadístico para determinar su mediana, el promedio, valor máximo y valor mínimo. El promedio de los duplicados se presentan en la Tabla 1 para las muestras de té en saquitos y en la Tabla 2 para té en hebras.

Para el té en saquitos, tanto la mediana como el valor promedio del BAMT, está en el orden de 10^3, y el RHL presentó un una mediana del orden de 10^2 y un promedio del orden de 10^3. Para té en hebras las medianas y promedios de BAMT y RHL están en el orden de 10^2. Estos resultados son ligeramente inferiores a los comunicados

anteriormente en estudios similares locales con un orden de magnitud superior (30). Cuando observamos el BAMT podemos notar que el 13 % de las muestras de té en saquitos superan el orden de 10^4 y el 56 % el orden de 10^3. Ninguna de las muestras de té en hebras supera el orden de 10^4 y solo el 20 % de las muestras supera el orden de 10^3. Para el RHL ninguna de las muestras analizadas en el presente trabajo supera el orden de 10^4, mientras que el 20 % de los datos supera el orden de 10^3. Los datos para los recuentos de coliformes totales y fecales arrojan resultados bajos en general. Del RCT el 18 % de las muestras de té en saquitos y 1 sola muestra de té en hebras superan del orden de 10^2 y del RCF sólo 2 muestras de té en saquitos superan este orden de magnitud. En general los promedios de los recuentos fueron de un orden de magnitud superiores para el té negro en saquitos con respecto al té en hebras. Esto nos habla de un mayor manipuleo que incluye un mayor contenido de polvo en la preparación del té en saquitos, responsable de la mayor magnitud de su contaminación bacteriana y fúngica. El RCF fue poco significativo en ambos casos, y todas las cepas desarrolladas fueron clasificadas como *Klebsiella spp* no hallándose *E. coli* en ninguna de las muestras analizadas.

Los resultados del presente trabajo y otros relacionados, han aportado los datos experimentales y la experiencia en el tema, participando activamente en el Subcomité de Yerba mate y té, proponiendo el perfil microbiológico, los métodos y los límites para control microbiano en té elaborado mediante la confección de la norma IRAM 20617:2007 [29].

En la norma IRAM 20617:2007 se han propuesto las mismas determinaciones y métodos para el control microbiológico en té que el ya propuesto para Yerba Mate (28), teniendo en cuenta la similitud del té elaborado con la Yerba Mate elaborada en varios aspectos: a) Ambos productos son sometidos a temperaturas elevadas, de entre 80–100 °C, durante una o varias etapas de su procesamiento, b) El producto final posee muy baja actividad acuosa, razón por la cual no habrá proliferación microbiana a menos que se produzcan acumulaciones locales de humedad, c) Toma mayor importancia la contaminación fúngica que la bacteriana en el producto elaborado [33, 34].

Para la propuesta de límites microbiológicos es habitual emplear el valor que arroja la mediana antes que el del promedio, dado que refleja mejor la media de la población de datos [33]. Nuestros datos estarían sugiriendo límites similares a los que actualmente se propone en el Esquema 1 de la norma IRAM 20617:2007 [29] que son: Bacterias aerobias mesófilas totales, 8 x 10^3 UFC/g; Hongos y levaduras, 2 x 10^3 UFC/g; Bacterias coliformes totales, 10^3 NMP/g, bacterias coliformes fecales, 15 NMP/g, y *Escherichia coli*, ausencia en 1 g.

Cuando comparamos nuestros datos con los actualmente propuestos en Argentina, podemos observar que un importante número de muestras (Tabla 3) superaron los niveles permitidos para los diversos recuentos.

Tabla 3. Evaluación de la aptitud de las muestras analizadas de acuerdo al Esquema 1 de la Norma IRAM 20617:2007.

Parámetros microbiológicos	Muestras de té en saquitos		Muestras de té en hebras	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
BAMT	12	16	0	0
RHL	21	28	2	8
RCT	7	9	1	4
RCF	9	12	0	0
E. coli	0	0	0	0

Teniendo en cuenta los diversos parámetros microbiológicos analizados y comparando con los límites propuestos por la Norma IRAM 20617:2007, 29 de las 75 muestras de té en saquitos, y 3 de las 25 muestras de té en hebras, lo que representa el 37 % y el 12 % respectivamente de las muestras, no serían aptas para su comercialización. En las Tablas 1 y 2 se han sombreado los recuentos microbianos que superan los valores límites propuestos en la Norma Argentina.

En ambas formas comerciales el parámetro crítico más frecuente fue RHL: 28 % de las muestras de té negro en saquitos y 8 % de las de té en hebras. Esto era de esperarse en un producto con baja actividad acuosa y que ha sido sometido a un tratamiento térmico durante su elaboración. Por otra parte 12 % de las muestras de té negro en saquitos presentó RCF superiores a 15 NMP/gr, sugerido por la norma Argentina. Este parámetro no se vio alterado en muestras de té negro en hebras. Dado que éste parámetro se relaciona con la calidad higiénico–sanitaria del producto, cabe resaltar la importancia de su determinación periódica, en vistas de mejorar las buenas prácticas de manufactura en la elaboración del producto.

La Unión Europea según la reglamentación vigente, RD 1354/83 [31], propone el siguiente perfil microbiológico y fija los siguientes valores límites para té y derivados: Aerobios mesófilos, 10^6 UFC/g; Mohos y levaduras 10^4 UFC/g, *Escherichia coli*, 10 en 1 g; *Salmonella* y *Shigella*, ausencia en 25 g; *Bacillus cereus*, 10^3 UFC/g, Teniendo en cuenta los valores sugeridos por la Unión Europea ninguna de las muestras superó los límites establecidos en la R.D. 1354/83 de vigencia actual en Europa para los recuentos microbianos realizados.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. La calidad del té negro comercializado en Misiones, Argentina, en sus dos *formas comerciales*, se encuentra dentro de los parámetros microbiológicos exigidos por normas internacionales y es de excelente calidad.
2. La realización de controles microbiológicos en té negro se traduce en mejor precio para el té en manos del productor y exportador con más divisas para el país, revalorizando la calidad del producto.

3. El perfil microbiológico y los métodos de recuento microbiano empleados, por extensión al propuesto para control higiénico–sanitario de Yerba Mate, es apropiado para el control microbiológico rutinario del té negro elaborado.
4. En ambas formas comerciales el parámetro crítico, según los límites propuestos por la Norma IRAM 20617:2007 fue el RHL: 28 % de las muestras de té negro en saquitos y 8 % de las de té en hebras.

RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos marcan la importancia de la implementación de un control microbiológico periódico, mediante el perfil propuesto por la Norma IRAM 20617:2007, para té negro elaborado, previo a su comercialización, para asegurar un producto inocuo para el consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ISO 6078:1982. *Black tea vocabulary.* International Organization for Standarization. 1982.

2. ISO 3720:1986. *Black tea. Definition and Basic requirements*. International Organization for Standarization. 1986.

3. PARRA, A.P. *Té "Camellia sinensis" Análisis de Cadena Alimentaria*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Dirección Nac de Alimentación. www.alimentosargentinos.gov.ar 2006.

4. PARRA, A.P. *Infusiones en Argentina: desempeño 2000–2007 y perspectivas*. Secretaría de Agricultura, Ganaderia, Pesca y Alimentos. Dirección Nacional de Alimentos. www.alimentosargentinos.gov.ar 2008.

5. PRAT KRICUN, S.D. *Tipos de té.* Articulo de Divulgación. Grupo de Yerba Mate y té. INTA. Cerro Azul, Pcia. de Misiones. 2002.

6. YANG C.S., CHENG J.Y., YANG G., CHHABRA S., LEE M.J. *Tea and tea Polyphenols in cancer prevention*. Journal of Nutrition; 130:472S–478S. 2000.

7. DU TOIT R. *Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as Vitamin C equivalents*. Toxicology; 166 (1–2): 63–69. 2001

8. BALENTINE D.A., WISEMAN S.A., BOUWENS L.C.M. *The chemistry of tea flavonoids*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.; 37:693–704. 1997.

9. FREI B., HIGDON J.V. *Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies.* J. Nutr.; 133(10):32758–32848. 2003.

10. HENNING S.M., NIU Y., LEE N.H., THAMES G.D., MINUTTI R.R., WANG H., GO V.L., HEBER D. *Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement*.Am. J. Clin. Nutr.; 80(6):1558–64. 2004.

11. RIETVELD A., WISEMAN S. *Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials*. J. Nutr., October 1, 2003; 133(10): 3285S–3292. 2003.

12. YANG C.S., LANDAU J.M. *Effects of tea consumption on nutrition and health*. J. Nutr. 130: 2409–2412. 2000.

13. HAMILTON MILLER J.M. *Anti–cariogenic propierties of tea (Camellia sinensis*). J. Med. Microbiol.; 50(4):299–302. 2001.

14. KAWAMURA J., TAKEO, T. *Antibacterial activity of tea catechin to Streptococcus mutans.* J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.; 36:463–467. 1989.

15. RASHEED A., HAIDER M. *Antibacterial activity of Camellia sinensis extracts against dental caries*. Arch. Pharm. Res; 21:348–352. 1998.

16. LU Y., GUO W.F.; YANG X.Q. Fluoride content in tea and its relationship with tea quality. J. Agric. Food Chem.; 52(14):4472–4476. 2004.

17. WONG M.H., FUNG K.F., CARR H.P. *Aluminium and fluoride contents of tea, with emphasis on brick tea and their health implications*. Toxicology Letters; 137(1–2):111–120. 2003.

18. DREOSTI I.E., WARGOVICH M.J., YANG C.S. *Inhibition of carcinogénesis by tea: the evidence from experimental studies.* Crit. Rev. Food Sci. Nutr; 37:761–770. 1997.

19. BUSCHMAN J.L. *Green tea and cancer in humans: a review of the literature*. Nutr. Cancer; 31:151–159. 1988.

20. YANG C., MALIAKAL P., MENG X. *Inhibition of carcinogenesis by tea.* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 42: 25–54. 2002.

21. SESSO H.D., PAFFENBARGER JR. R.S., OGUMA Y., LEE I.M. *Lack of association between tea and cardiovascular disease in college alumni.* Int. J. Epidemiol., 32(4):527–533. 2003.

22. ARTS I.C., HOLLMAN P.C., FESKENS E.J., BUENO DE MESQUITA H.B., KROMHOUT D. *Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study.* Am. J. Clin. Nutr.; 74: 227–32. 2001.

23. VITA J.A. *Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function.* Am. J. Clinical Nutrition; 81(1): 292S–297S. 2005.

24. HODGSON J.M., DEVINE A., PUDDEY I.B., CHAN S.Y., BEILIN L.J., PRINCE R.L. *Tea Intake Is Inversely Related to Blood Pressure in Older Women*. J. Nutr., September 1, 2003; 133(9): 2883–2886. 2003.

25. YANG Y.C., LU F.H., WU J.S., WU C.H., CHANG C.J. *The Protective Effect of Habitual Tea Consumption on Hipertensión.* Archives of Internal Medicine; 164(14): 1534–1540. 2004.

26. ZHENG G., SAYAMA K., OKUBO T., JUNEJA L.R. *Anti–obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice*. In Vivo; 18(1):55–62. 2004.

27. MARON D.J., LU G.P., CAI N.S., WU Z.G., LI Y.H., CHEN H., ZHU J.Q., JIN X.J., WOUTERS B.C., ZHAO J. *Cholesterol–Lowering Effect of a Theaflavin–Enriched Green Tea Extract: A Ran-*

domized Controlled Trial. Archives of Internal Medicine; 163(12): 1448–1453. 2003.

28. Stash Tea Company. *The History of tea: from 2337 B.C through today*. *Tea types–Black teas, green teas, oolong teas, white teas, herbal teas and a tea tasting glossary.* http://www.stashtea.com/facts.htm Oregon. EEUU. 2005.

29. Norma IRAM 20517:2004. *Yerba mate canchada y yerba mate elaborada*. Análisis microbiológicos. 1° Edición. 21 págs. 2004.

30. Norma IRAM 20617:2007. *Té negro. Requisitos microbiológicos y métodos de ensayo*. Esquema 1. Documento en estudio. 22 págs. Abril 2007.

31. JERKE G., MARUCCI R.S., KNASS P.S. *Calidad microbiológica de té negro comercial: en hebras y en saquitos*. VI Congreso Latinoamericano de Microbiología de los Alimentos. MICROAL 2000. Buenos Aires. Argentina. Código G 26. Pág. 135. 2000.

32. MORAGAS ENCUENTRA M. Mª Begoña de Pablo Busto. *Recopilación de Normas Microbiológicas de los Alimentos.* En http://veterinaria.unex.es/sem/normical.htm. Límites Microbiológicos para té y sus Derivados. R.D. 1354/83, B.O.E. 27/5/83; B.O.E 14/7/84. Comunidad Económica Europea. 2002.

33. JERKE G. "*Propuesta de evaluación microbiológica para yerba mate (Ilex paraguarienses) y té (Camellia sinensis)"* Congreso internacional de Ciencia y Tecnologia de los alimentos. Córdoba. Argentina. 2004.

34. ICMSF. 1–*Microorganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración*. ed. ICMSF. 2° Ed. Zaragoza: ACRIBIA. España. 454 págs. 2000.

35. MOSSEL D.A.A., MORENO GARCIA B., STRUIJK C.B. *Microbiologia de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos.,* 2° Ed. ACRIBIA: Zaragoza. 734 págs. 2003.

Recibido: 26/08/09.
Aprobado: 18/03/10

- Gladis Jerke[1]
  Títulos de Grado: Bioquímico. Postgrado: Magister en Tecnología de los Alimentos. Cargo/Posición en el lugar de trabajo: Jefe de trabajos prácticos de Microbiología e Inmunología. Categoría del Incentivo: IV.

- Severino Bargardi[1]
  Títulos de Grado: Farmacéutico; Bioquímico. Postgrado: Magister en Microbiología Clínica. Cargo/Posición en el lugar de trabajo: de ex-profesor titular de Microbiología e Inmunología (Jubilado). Categoría del Incentivo: II.

- Martha Gladys Medvedeff[1]
  Títulos de Grado: Bioquímico. Postgrado: Doctorado en Ciencias Técnicas. Cargo/Posición en el lugar de trabajo: Profesor adjunto de Micología y profesor a cargo de Microbiología e Inmunología. Categoría del Incentivo: II.

- Erenio Gonzalez Suarez[2]
  Títulos de Grado: Ingeniería Quimica. Universidad Central de Las Villas. Cuba. Postgrado: Doctor en Ciencias Técnicas (PhD) con tesis de disertación en "Modelación y Optimización de un Proceso Tecnológico para la Producción de Cartoncillo" en la Universidad Central de Las Villas (1982). Doctor en Ciencias (Segundo nivel) con la tesis de disertación "Aplicación del Análisis de Procesos en intensificación de distintas industrias de Cuba" en la Universidad Central de Las Villas (1991). Post doctoral Gestión Ambiental y de Seguridad Industrial. Universidad de Magdeburg, Alemania (2002).

1. Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Mariano Moreno 1375. (3300). Posadas, Misiones, Argentina.
2. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 11 / Nº 12 / 2009 / 58–64

Aislamiento de *Aspergillus aflatoxigénicos* en té negro durante las etapas de su elaboración tradicional

Gladis Jerke, Karina Alejandra Salvatierra, Severino Bargardi

Aflatoxigenic aspergillus isolates from tea (*Camellia sinensis*) during its traditional manufacture

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and identify, at genera and species level, strains of *Aspergillus* spp obtained from different stages of black tea traditional processing. Strains taxonomically characterized as *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* were evaluated in terms of their potential biosynthesizing aflatoxins *"in vitro".*

A total of 72 tea samples were taken from traditional processing plants from Misiones, Argentina. Out of a total of 180 strains of *Aspergillus* spp. isolated, 76 strains (42 %) were characterized as *A. flavus*, of which 65 strains (86 %) showed aflatoxicogenic capacity *"in vitro",* and 11 strains (14 %) were negative. 47 % of all strains of *A. flavus* isolated was able to biosynthesize aflatoxins B_1 and B_2 while 35 % only synthesized aflatoxin B_1. There were no strains of A. parasiticus.

KEY WORDS: Aflatoxins, *Aspergillus flavus, Aspergillus parasíticus,* Black tea.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar, a nivel de género y especie, cepas de *Aspergillus* spp, obtenidas de las distintas etapas de elaboración tradicional del té negro. Las cepas taxonómicamente caracterizadas como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* se evaluaron en cuanto a su capacidad de biosintetizar aflatoxinas *"in vitro".*

Un total de 72 muestras de té fueron tomadas de plantas de procesamiento tradicionales de Misiones, Argentina. Sobre un total de 180 cepas de *Aspergillus* spp. aisladas, 76 cepas (42 %) fueron caracterizadas como *A. flavus,* de las cuales 65 cepas (86 %) presentaron capacidad aflatoxicogénica *in vitro,* y 11 cepas (14 %) resultaron negativas. El 47 % del total de cepas de *A. flavus* aisladas, resultó capaz de biosintetizar las aflatoxinas B_1 y B_2 mientras que el 35 % sólo sintetizó aflatoxina B_1. No se hallaron cepas de *A. parasiticus.*

PALABRAS CLAVE: Aflatoxinas, *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus,* té negro.

INTRODUCCIÓN

Ciertos metabolitos producidos por hongos contaminantes de alimentos son riesgosos para la salud humana y animal. Estos productos llamados micotoxinas presentan toxigenicidad variada y algunas de ellas, como la aflatoxina B_1, un alto poder cancerígeno. Los hongos productores de micotoxinas están ampliamente distribuídos en el medio ambiente [1, 2] y se los puede encontrar como contaminantes comunes de una gran variedad de alimentos vegetales de importancia en la dieta humana y animal. Se han encontrado en alimentos tales como arroz [3, 4], yerba mate [5], hierbas aromatizantes [6], girasol [7], plantas herbáceas [8, 9], maiz [10], café verde [11], cacao y chocolate [12]. Pueden resultar muy perjudiciales para la salud humana, ya sea mediante su sola presencia somática, dando origen a una infección fúngica, o a su capacidad de producir poderosas toxinas hepatotóxicas, nefrotóxicas e inmunosupresoras, ocasionando entonces una toxiinfección fúngica. El principal riesgo para la salud humana lo constituye la ingestión reiterada de pequeñas concentraciones de la micotoxina que se bioacumula y puede conducir al desarrollo de carcinomas en diversos órganos [1, 2, 13].

Entre las miles de micotoxinas hoy descriptas, las aflatoxinas se encuentran entre las más relevantes, ya que ocurren frecuentemente y con una distribución mundial [1, 5–11], siendo su incidencia significativamente mayor en regiones de clima subtropical como el nuestro, dado que la temperatura reinante y la elevada humedad relativa ambiente locales, favorecen la contaminación fúngica de cualquier sustrato así como la biosíntesis de las toxinas. Las aflatoxinas son sintetizadas por hongos del grupo "flavi" pertenecientes a las especies *Aspergillus flavus*, productora de las aflatoxinas B_1 y B_2, y *Aspergillus parasiticus*, capáz de biosintetizar aflatoxinas B_1, B_2, G_1 y G_2 [14]. Estas toxinas producen cuatro distintos efectos: alteración hepática aguda, cirrosis hepática, inducción de tumores y efectos teratogénicos [15–17]. El metabolito principal de este grupo de micotoxinas, la aflatoxina B_1, es el carcinógeno natural más potente que se conoce en la actualidad [15, 17].

El cultivo de té Argentino se lleva a cabo en dos provincias: Misiones y Corrientes. La primera presenta 6.108 explotaciones agropecuarias (EAP) dedicadas a este cultivo, mientras que la cantidad es de 23 en Corrientes. Respecto de la superficie nacional total con cultivo de té, 34.899,6 ha de las 36.660,1 ha totales se encuentran en Misiones (95,2 %) [18, 19, 21].

El procesamiento y elaboración del té en Misiones se cuenta entre las actividades agrícolas de mayor relevancia económica regional. Su práctica involucra la participación de cerca de 9.000 colonos en su mayoría con hasta 10 hectareas de superficie cultivada [19, 20]. El rendimiento total aproximado es de 300.000 toneladas de brote verde que se procesa en 70 plantas elaboradoras [18, 21] con la obtención de 65.000 toneladas de té negro seco [19, 21]. El 89 % de este volumen se destina a la exportación representando el 3,5 % del comercio mundial. El té elaborado se exporta a 20 paises, entre los principales importadores se destacan: EE.UU., Chile, Reino Unido, Rusia, Holanda y Alemania [21].

La manufactura del té se realiza normalmente mediante tres métodos de industrialización. El ortodoxo o tradicional (realizado manualmente), el Moderno (actualmente automatizado, aunque se reproducen fielmente los pasos del método tradicional) y el denominado CTC (Crush, Tear and Curl, que traducido significa: triturado, desmenuzado y enrulado), aplicado a la elaboración de tes genéricos o estándares. En el presente estudio las muestras fueron recolectadas de plantas elaboradoras que emplean el método ortodoxo o tradicional. [18, 19].

El té es la bebida que más se toma en el mundo después del agua. Tres son los tipos de té de mayor producción y consumo mundial: el 78 % es té negro consumido por paises occidentales, 20 % es té verde comúnmente consumido en países asiáticos como China y Japón y 2 % es té Oolong que se produce principalmente en el sur de China [3, 6]. El consumo tan difundido de la infusión, se debe a su contenido en taninos, catequinas y flavonoides, que ejercen un importante papel antioxidante [22–25] y son los responsables de los numerosos efectos beneficiosos que se han asociado al consumo del té. Se ha demostrado su actividad anticariogénica por su acción bactericida que permitiría disminuir la acción de las bacterias del género *Streptococcus* en la formación de la placa dental y de las caries [26–28]. El elevado contenido en fluor del té se ha asociado a la prevención de caries y al fortalecimiento del esmalte dental [29, 30]. El consumo del té verde o negro, según estudios recientes, podrían reducir los riesgos de cáncer [31–35], prevenir enfermedades cardiovasculares [36, 37], retrasar el envejecimiento [23, 33], prevenir la hipertensión arterial [38, 39], la obesidad [40] y la arterioesclerosis [41]. No obstante, para lograr estos efectos beneficiosos, los investigadores sugieren la ingesta diaria de 2 a 3 tazas de la infusión [23, 33].

Los objetivos del presente estudio fueron:

1. aislar e identificar a nivel de género y especie cepas de *Aspergillus* spp, obtenidas de las distintas etapas de elaboración del té negro en Plantas de procesamiento con tecnología tradicional
2. evaluar la incidencia de cepas taxonómicamente caracterizadas como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* y evaluar su capacidad de biosintetizar aflatoxinas "*in vitro*".

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y Procesamiento de las muestras

Se estudiaron muestras de té negro (*Camellia sinensis*) obtenidas durante las etapas de su procesamiento industrial. El muestreo se realizó en Plantas de procesamiento de té ortodoxos o tradicionales situados en diferentes puntos geográficos de la Provincia, recolectándose un total de 72 muestras. En cada caso se estudiaron muestras tomadas por integrantes de nuestro grupo de trabajo, correspondientes a:

1. muestras de la materia prima previa a su procesamiento: hoja verde del té que se tomaron al azar de la plancha de recepción realizando tomas de producto en diez a doce diferentes lugares con distribución aleatoria,
2. muestras de las etapas del procesamiento del té: marchitado, enrulado, fermentado, secado. Se realizaron entre 10 y 20 tomas aleatorias de cada etapa para conformar una muestra analítica. Para las muestras de las etapas del fermentado y secado se emplearon sondas cilíndricas muestreadoras.
3. muestras del producto elaborado y en almacenamiento. Se tomaron luego del proceso de clasificación del té, desde las bolsas apiladas en la planta elaboradora y que presentaran por lo menos un mes de almacen.

Una vez obtenidas las muestras, de aproximadamente 1000–1500 gr, estadísticamente representativas de cada etapa del procesamiento del té, fueron trasladadas hasta nuestro laboratorio dentro de una heladera portátil para ser mantenidas en cadena de frío.

Se pesó una alicuota de 50 gr de cada muestra y se homogeneizó con agua peptonada al 0,1 % estéril en licuadora industrial. Se filtraron los homogenatos a través de gasa estéril, realizándose diluciones decimales hasta obtener las diluciones de 10^{-3} y 10^{-5}. Se sembraron por duplicado 100 µl de cada dilución en medios de cultivo HyL (hongos y levaduras con Cloranfenicol). Las placas se incubaron en estufa a 27 ± 2 ºC durante 5 a 7 días. Se realizó el recuento fúngico total de las cepas que desarrollaron y la identificación de los géneros presentes [1, 2]. La identificación a nivel de géneros se basó en la experiencia de diversos investigadores dedicados al estudio de la taxonomía fúngi-

ca [1, 2, 42–44]. Se procedió al aislamiento de las colonias cuya macro–micromorfologia fuera coincidente con el género *Aspergillus,* de conocida capacidad toxicogénica, para su caracterización a nivel de especies y la detección de la aflatoxicogenicidad de las cepas de las especies *A. flavus* y *A. parasíticus* "*in vitro*".

Caracterización de las cepas de *Aspergillus* spp

Las claves de identificación de las especies de *Aspergillus* se basaron primariamente en procedimientos estandarizados descriptos por diversos investigadores [1, 2, 45, 46]. Mediante el análisis de las características macroscópicas (diámetro y color de las colonias, modo de crecimiento, color y disposición de los conidios) y microscópicas (Forma y tamaño de la vesícula, las fiálides y las conidias) de las cepas se ingresó a la clave de Klich and Maren, lográndose la clasificación de las mismas a nivel de especies.

Pruebas de Toxicogenicidad *"in vitro"*

Para la detección de la capacidad aflatoxigénica de las cepas de *A. flavus* aisladas, se empleó la Prueba del Mini Arroz, según técnica recomendada por Moreno y col [47]. Esta consiste básicamente en sembrar la cepa sobre un sustrato natural (arroz) de probada sensibilidad para la producción de aflatoxinas. Las cepas aisladas y caracterizadas como *Aspergillus flavus* y/o *A. parasiticus*, se siembran en erlenmeyer conteniendo un medio preparado con granos de arroz pulido y cantidad suficiente de agua, logrando una a_w de 0,98, que permita la biosíntesis de aflatoxinas *in vitro*. Simultaneamente se procesó la cepa patrón, *Aspergillus parasíticus* NRRL 3000. Se incubaron los erlenmeyer durante 5 días a 27 ºC. Las toxinas fueron extraídas con 15 ml de cloroformo y se evaporó el solvente a sequedad en baño de vapor. Se resuspendieron los extractos en 200 µl de benceno: acetonitrilo (98:2) y se confirmó la presencia de aflatoxinas dada su emisión fluorescente en placa de TLC bajo luz UV, por comparación con un patrón de aflatoxina B_1, B_2, G_1 y G_2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras analizadas presentaron un porcentaje importante de contaminación con cepas de *Aspergillus flavus*. Se aislaron 76 cepas (42 %) sobre un total de 180 cepas de *Aspergillus* spp aisladas y caracterizadas a nivel de especie.

En la Tabla 1 se muestra el número de cepas de *Aspergillus* spp y su caracterización taxonómica para cada una de las etapas de procesamiento del té negro proveniente de las tres plantas elaboradoras estudiadas.

Tabla 1: Identificación taxonómica de las cepas de *Aspergillus* spp aisladas en cada una de las etapas de elaboración del té, proveniente de tres plantas elaboradoras con tecnología tradicional.

Etapa evaluada	Planta elaboradora Nº 1	Planta elaboradora Nº 2	Planta elaboradora Nº 3
Materia prima	2 *A. flavus* 1 *A. fumigatus*	1 *A. flavus* 2 *A. niger* 1 *A. fumigatus*	1 *A. fumigatus* 1 *A. niger*
Marchitado	6 *A. flavus*	2 *A. flavus*	7 *A. flavus*
Enrulado	2 *A. flavus*	2 *A. flavus*	1 *A. flavus* 1 *A. niger* 1 *A. fumigatus*
Fermentado	22 *A. flavus*	2 *A. flavus*	6 *A. flavus* 2 *A. japonicus*
Secado	4 *A. flavus* 2 *A. niger*	2 *A. flavus*	2 *A. flavus* 2 *A. fumigatus*
Almacenado	9 *A. flavus* 56 *A. niger* 26 *A. fumigatus*	2 *A. flavus* 5 *A. niger*	2 *A. flavus* 5 A. niger

En la Tabla 2 se presenta la incidencia de las cepas de *Aspergillus flavus* aisladas en cada una de las etapas del procesamiento Industrial del té con tecnología tradicional. El mayor número de cepas de *Aspergillus* spp se observa en las muestras obtenidas del té almacenado, corroborando que, como lo sugiere la bibliografía [48, 49], el género *Aspergillus* es un "hongo de almacén".

Tabla 2: Incidencia de cepas de Aspergillus spp y Aspergillus flavus aisladas en cada una de las etapas de elaboración del té.

Etapa evaluada	Cepas de *Aspergillus* spp	Cepas de *Aspergillus flavus*	*A. flavus* Aflatoxigénicos (Mini arroz)	% de *A flavus* Aflatoxigénicos por etapa
Materia prima	9	3	3	100 %
Marchitado	16	16	16	100 %
Enrulado	6	6	3	50 %
Fermentado	32	32	27	86 %
Secado	12	7	5	67 %
Almacenado	106	13	13	100 %
Totales	**180**	**76**	**66**	**86 %**

En la materia prima se aislaron 9 cepas de *Aspergillus* spp, de las cuales 3 resultaron ser *A. flavus* aflatoxigénicas, 3 fueron *Aspergillus fumigatus* y 3 *A. niger*. Durante las etapas de Marchitado, Enrulado y Fermentado, todas las cepas de *Aspergillus* aisladas se caracterizaron como *A. flavus*, siendo aflatoxigénicas un importante número de las mismas. En la etapa del secado, sobre un total de 12 cepas de *Aspergillus* spp aisladas, 7 fueron *A. flavus*, 3 *A. niger* y 2 *A. japonicus*. Del té almacenado se obtuvo el mayor número de cepas de *Aspergillus* spp, con un total de 106 cepas provenientes de todas las Plantas de procesamiento tradicionales estudiadas. La distribución de las especies de las 106 cepas del género *Aspergillus* caracterizadas en ésta etapa, fue la siguiente: 12 cepas (12,5 %) *A. flavus*, 58 cepas (60,4 %) *A. niger* y 26 cepas (27 %) *A. fumigatus*. La distribución de número total de cepas de *Aspergillus* spp y de las especies caracterizadas por cada etapa de elaboración del té, se muestran en la Figura 1.

Las 76 cepas aisladas y caracterizadas como *Aspergillus flavus* (Tabla 1) se ensayaron para ver su capacidad aflatoxicogénica "*in vitro*". Se detectaron 66 cepas (86 %) productoras de aflatoxinas, de las cuales, 32 (49 %) fueron

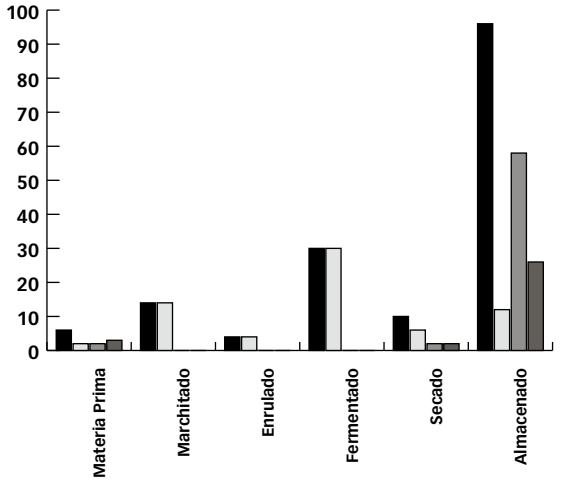


FIGURA 1. Número total de cepas de *Aspergillus* spp e incidencia de cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus,* en cada una de las etapas de elaboración del té a escala industrial en plantas de procesamiento tradicionales. Referencias: ■ *Aspergillus* spp, □ *Aspergillus flavus*, ■ *Aspergillus niger*, ■ *Aspergillus fumigatus.*

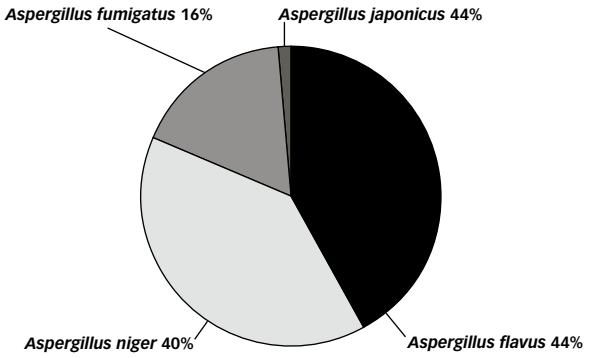


FIGURA 2. Distribución porcentual de especies de *Aspergillus* spp aisladas.

capaces de biosintetizar Aflatoxinas B_1 y B_2 y 24 (37 %) sintetizaron Aflatoxina B_1.

Se aislaron cepas de *Aspergillus* con capacidad aflatoxicogénica en todas las etapas de elaboración del té negro procedente de plantas elaboradoras con procesamiento ortodoxo o tradicional.

Otras especies de *Aspergillus* caracterizadas fueron: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus japonicus.* La distribución porcentual de las mismas se muestran en la Figura 2.

Si bien existen comunicaciones de estudios en relación a la micoflora del té negro elaborado [50] y en las etapas de su elaboración [51–56], hasta el presente se han realizado pocas evaluaciones de la presencia de hongos aflatoxicogénicos en té negro. Esta es la primer publicación local sobre la temática.

Elshafie analizó 48 muestras de té negro elaborado de Sultanate, Oman, India. Cinco fueron las especies fúngicas más aisladas con *A. niger* como el hongo dominante en todas las muestras. Otros hongos aislados por Elshafie fueron *A. flavus*, *Penicillium* spp y *Paecilomyces* spp. Ninguna de las 25 cepas de *A. flavus* analizadas *in vitro*, fueron aflatoxigénicas [50]. Al momento de realizarse el presente estudio, si bien se habian detectado cepas de *A. flavus* contaminantes de té negro [50], las mismas no demostraron capacidad aflatoxigénico *in vitro.* De modo que nuestros resultados son los primeros en demostrar la presencia de *A. flavus* con capacidad aflatoxigénicas *in vitro* aisladas de té negro.

En estudios previos, se realizó la evaluación de la micoflora del té en su elaboración desde la materia prima y en todas las etapas del procesamiento industrial hasta su almacenamiento [51–55]. Se halló contaminación fúngica en todas las etapas del proceso. Los recuentos fúngicos que se mostraron elevados en la materia prima y todas las etapas de elaboración, disminuyen drásticamente [51–55] o son eliminados [56] en la etapa del secado. Los géneros fúngicos más aislados del té negro durante su elaboración, en nuestros estudios locales, fueron *Aspergillus*, *Cladosporium, Scopulariopsis*, *Penicillium* y levaduras de los géneros *Rhodotorula*, *Candida* y *Saccharomyces* [52–55], en coincidencia con las comunicaciones internacionales [50, 56]. Los géneros identificados varían ligeramente dependiendo de la etapa de elaboración evaluada.

Cuando analizamos la distribución de las cepas de *Aspergillus* spp durante el procesamiento ortodoxo o tradicional del té negro, cabe destacar la mayor incidencia de las mismas en las muestras de almacén, con una marcada presencia de la especie *A. Níger* coincidente con las comunicaciones de Elshafie [50]. Actualmente los *Aspergillus* de la seccion "nigri" se asocian a la capacidad biosintética de Ocratoxina [57], micotoxina de conocida acción nefrotóxica [58].

Hasta el presente no se encontraron comunicaciones de la presencia de aflatoxinas en té negro. En este sentido se comunicó la contaminación con Aflatoxinas en 28 muestras de hierbas medicinales de Tailandia empleando columnas de inmunoafinidad con límites de detección muy bajos. Los resultados indicaron que 5 muestras (18 %) estaban contaminadas con Aflatoxinas, con valores entre 1,7 a 14,3 ng/g. Estos valores están por debajo del límite, de 20ng/g, permitido en Tailandia y en nuestro país. No obstante es un llamado a la reflexión para el control periódico de Aflatoxinas en drogas y plantas medicinales. En este estudio no se incluyeron muestras de té. También en otros sustratos similares como café verde y cacao [12] se detectó la presencia de ocratoxinas. Otra micotoxina investigada en té fue fumonisina. Martins y col. investigaron la presencia de fumonisinas B_1 y B_2 en té negro y plantas medicinales. Sobre un total de 87 muestras analizadas se detectó fumonisina B_1 en 55 (65,5 %) de las muestras. El mayor número de muestras positivas se encontró en las 18 muestras de té negro evaluadas (88,8 %) con niveles de 80 a 280 µg/kg [59]. Omurtag y col, también detectaron fumonisina B_1 en muestras de té negro. Fumonisina B_2 en cambio no se detectó en ninguna de las muestras evaluadas [59, 60].

La presencia de géneros potencialmente aflatoxigénicos en té negro, tanto en las etapas de su elaboración industrial

como en el producto comercializado podría implicar la presencia de aflatoxinas en la infusión, dado que las mismas son termoestables y por lo tanto no son eliminadas en el proceso térmico del secado ni por el empleo del agua caliente en su preparación. Por ello, de hallarse micotoxinas en té, su consumo habitual también podria resultar un riesgo para la salud. Recordemos que para lograr el efecto beneficioso de las catequinas, flavonoides, taninos y demás componentes beneficiosos para la salud [22–41], los investigadores sugieren la ingesta de 3 a 4 tazas de té diario [23, 33] que, de contener micotoxinas implicaría un consumo reiterado y crónico de pequeñas trazas de las mismas con el consiguiente desarrollo potencial de micotoxicosis crónicas.

CONCLUSIONES

Las muestras analizadas presentaron un porcentaje importante de cepas de *Aspergillus* spp contaminantes aislados de cada una de las etapas de elaboración del té negro en plantas elaboradoras tradicionales.

Las cepas de *Aspergillus flavus* se aislaron de todas las etapas de elaboración del té negro en plantas elaboradoras tradicionales.

El 86 % de las cepas de *A. flavus* presentó capacidad aflatoxicogénica *in vitro*. No se hallaron otras especies de *Aspergillus* aflatoxicogénicos.

Otras especies de Aspergillus caracterizadas fueron *A. niger*, *A. fumigatus* y *A. japonicus*

En muestras de té negro almacenado presenta una incidencia importante el *Aspergillus* negro de la sección "nigri" con potencial capacidad ocratoxigénica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PITT J.I., HOCKING. A.D. *Fungi and Food Spoilage*. 2º ed. London, Wienheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Blackie Academic & Professional. 1997.

2. CARRILLO L. *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Editorial Universidad Nacional de Jujuy. Libro electrónico. 2003.

3. TONON S.A., MARUCCI R.S., JERKE G., GARCÍA A. *Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region of Northeastern Argentina and Southern Paraguay.* International Journal of Foof microbiology. 37: 231–235. 1997.

4. TONON S.A., MARUCCI R.S., JERKE G., GARCÍA A., VELLÓN L., FERRERAS J.A. *Hongos contaminantes del arroz producido en la región central del Mercosur.* La Alimentación Latinoamericana. 214: p. 39–45. 1996.

5. TONON S.A., MARUCCI R.S. *Flora fúngica contaminante de Yerba Mate estacionada. Presencia de hongos productores de aflatoxinas*. La Alimentación Latinoamericana. 206: p. 23–32. 1995.

6. JERKE G., MARUCCI R.S. *Micoflora de hierbas aromatizantes utilizadas para elaborar yerba mate compuesta.* Revista de Ciencia y Tecnología. Año 2. Nº 2: 209–212. 1999.

7. VARSAVSKY E., *ET AL.* *Hongos toxicogénicos y aflatoxinas en semillas de girasol.* La Alimentación Latinoamericana, 3: p. 58–60. 1983.

8. EFUNTOYE M.O. *Mycotoxins of fungal strains from stored herbal plants and mycotoxin contents of Nigerian crude herbal drugs.* Mycopathologia; 147(1):43–48.1999.

9. TASSANEEYAKUL W., RAZZAZI FAZELI E., PORASUPHATANA S., BOHM J. *Contamination of aflatoxins in herbal medicinal products in Thailand*. Mycopathologia; 158(2):239–244. 2004.

10. PAYNE G.A. *Aflatoxin in maize*. CRC in Plant Sciences, 10(5): p. 423–440. 1992.

11. ROBLEDO M.D., MARIN S., RAMOS A.J. *Natural contamination with mycotoxins in forage maiza and green coffee in Nayarit State (Mexico)*. Rev. Iberoam. Micol. Sep.:18(3):141–144. 2002.

12. SERRA BONVEHI J. *Occurrence of Ochratoxin A in cocoa products and chocolate*. J. Agric. Food Chem. 52(20):6347–52. 2004.

13. ABARCA MA LOURDES *ET ALL.* *Hongos productores de micotoxinas emergentes.* Rev. Iberoam. Micol. 2000; 17: S63–S68. 2000.

14. HESSELTINE C.W. *ET AL.* *Aflatoxin formation by Aspergillus flavus*. Bacterial Revieu, 30: p. 795–805. 1966.

15. VENTURINI M.C. AND PERFUMO C.J. *Aflatoxinas. Sus efectos tóxicos, Carcinogenéticos e Inmunosupresores.* Clinica & Producción Veterinaria. p. 7–8.

16. IARC *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Aflatoxins*. Vol: 82 pp. 171–300. 2002.

17. WHO *WHO Food Additives Series: Aflatoxins*. Vol: 40 pp. 359–468. 1998.

18. DE BERNARDI L.A. Y PRAT KRICUN S.D. *Té "Camellia sinensis" Análisis de Cadena Alimentaria*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Dirección Nac. de Alimentación. Dirección de Industria Alimentaria. Cadenas alimentarias: Infusiones http://www.alimentosargentinos.gov.ar. 2004.

19. PARRA A.P. *Infusiones en Argentina: desempeño 2000–2007 y perspectivas*. Articulo de Divulgación. Secretaría de Agricultura, Ganaderia, Pesca y Alimentos. Dirección Nacional de Alimentos. http://www.alimentosargentinos.gov.ar . 2008.

20. PRAT KRICUN S.D. *Té: Procesos de elaboración.* Articulo de Divulgación. Grupo de Yerba mate y Te. INTA. Cerro Azul, Pcia. de Misiones. 2002.

21. PARRA A.P. *Té "Camellia sinensis" Análisis de Cadena Alimentaria*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Dirección Nac de Alimentación. Dirección de Industria Alimentaria. http://www.alimentosargentinos.gov.ar. 2006.

22. DU TOIT R. *Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as Vitamin C equivalents*. Toxicology; 166 (1–2): 63–69. 2001

23. HENNING S.M., NIU Y., LEE N.H., THAMES G.D., MINUTTI R.R. WANG H., GO V.L., HEBER D. *Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement*. Am. J. Clin. Nutr.; 80(6): 1558–64. 2004.

24. RIETVELD A., WISEMAN S. *Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials*. J. Nutr., October 1, 2003; 133(10): 3285S–3292. 2003.

25. YANG C.S., LANDAU J.M. *Effects of tea consumption on nutrition and health*. J. Nutr. 130: 2409–2412. 2000.

26. HAMILTON MILLER, J.M. *Anti–cariogenic propierties of tea (Camellia sinensis*). J. Med. Microbiol.; 50(4):299–302. 2001.

27. KAWAMURA J., TAKEO T. *Antibacterial activity of tea catechin to Streptococcus mutans.* J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.; 36:463–467. 1989.

28. RASHEED A., HAIDER M. *Antibacterial activity of Camellia sinensis extracts against dental caries*. Arch. Pharm. Res.; 21:348–352. 1998.

29. LU Y., GUO W.F., YANG X.Q. Fluoride content in tea and its relationship with tea quality. J. Agric. Food Chem.; 52(14): 4472–4476. 2004.

30. WONG M.H., FUNG K.F., CARR H.P. *Aluminium and fluoride contents of tea, with emphasis on brick tea and their health implications*. Toxicology Letters; 137(1–2): 111–120. 2003.

31. DREOSTI I.E., WARGOVICH M.J., YANG C.S. *Inhibition of carcinogénesis by tea: the evidence from experimental studies.* Crit. Rev. Food Sci. Nutr.; 37:761–770. 1997.

32. BUSCHMAN J.L. *Green tea and cancer in humans: a review of the literature*. Nutr. Cancer; 31:151–159. 1988.

33. YANG C.S., CHENG J.Y., YANG G., CHHABRA S., LEE M.J. *Tea and tea Polyphenols in cancer prevention*. Journal of Nutrition; 130: 472S–478S. 2000.

34. YANG C., MALIAKAL P., MENG X. *Inhibition of carcinogenesis by tea.* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 42: 25–54. 2002.

35. SESSO H.D., PAFFENBARGER JR R.S., OGUMA Y., LEE I.M. *Lack of association between tea and cardiovascular disease in college alumni.* Int. J. Epidemiol., 32(4): 527–533. 2003.

36. ARTS I.C., HOLLMAN P.C., FESKENS E.J., BUENO DE MESQUITA H.B., KROMHOUT D. *Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study.* Am. J. Clin. Nutr.; 74: 227–32. 2001.

37. VITA J.A. *Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function.* Am. J. Clinical Nutrition; 81(1): 292S–297S. 2005.

38. HODGSON J.M., DEVINE A., PUDDEY I.B., CHAN S.Y., BEILIN L.J., PRINCE R.L. *Tea Intake Is Inversely Related to Blood Pressure in Older Women*. J. Nutr., September 1, 2003; 133(9): 2883–2886. 2003.

39. YANG Y.C., LU F.H., WU J.S., WU C.H., CHANG C.J. *The Protective Effect of Habitual Tea Consumption on Hipertensión.* Archives of Internal Medicine; 164(14): 1534–1540. 2004.

40. ZHENG G., SAYAMA K., OKUBO T., JUNEJA L.R. *Anti–obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice*. In Vivo; 18(1): 55–62. 2004.

41. MARON D.J., LU G.P., CAI N.S., WU Z.G., LI Y.H., CHEN H., ZHU J.Q., JIN X.J., WOUTERS B.C., ZHAO J. *Cholesterol–Lowering Effect of a Theaflavin–Enriched Green Tea Extract: A Randomized Controlled Trial.* Archives of Internal Medicine; 163(12): 1448–1453. 2003.

42. KONEMAN E.W. AND G.D. ROBERTS *Micologia. Práctica de Laboratorio*. 3º ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S. A. 221. 1983.

43. PIONTELLI E.L. *Bases y conceptos para la clasificación de los hongos de imporancia Médico–Veterinaria*. in *CURSO: 'Criterios taxonómicos básicos para las Disciplinas microbiológicas*. Posadas, Misiones: UNaM. 1995.

44. WEBSTER J. *Introduction to Fungi*. 2º ed. Cambridge: University of Cambridge. C.U. Press. 1991.

45. KLICH MAREN A. *Identification of common Aspergillus species*.Centraalbureau voor schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 2002.

46. KLICH M. AND J. PITT *A Laboratory Guide to the common Aspergillus species and their Teleomorphs*., North Ryde, Australia: CSIRO Division of food processing. 1986.

47. MORENO M. A. Y COL. Improved methodology for detecting aflatoxin production quantitatively in natural media. *Micotoxin Research*. 5:p. 51–56. 1989.

48. SCUDAMORE K.E. Mycotoxins in stored products: Myth or menace. International Biodeterioration & biodegradation. 32: p. 191–203. 1993.

49. EFUNTOYE M.O. *Fungi associated with herbal drug plants during sto*rage. Mycopathologia; 136(2): 115–118. 1996.

50. ELSHAFIE A.E., AL LAWATIA T., AL BAHRY S. *Fungi associated with black tea and tea quality in the Sultanate of Oman.* Mycopathologia; 145: 89–93. 1999.

51. TONON S.A., MARUCCI R.S., FONTANA J., JERKE G., FERRERAS J.A. Contaminación fungica del té. Cambios durante la elaboración controlada de té negro. Revista de Ciencia y Tecnología. UNAM. Nº 1: 205–206. 1997.

52. JERKE G., MARUCCI R. S., KNASS P. S. *Micoflora de té (camellia sinensis) elaborado y comercializado en Misiones, Argentina.* La alimentación Latinoamericana. Editorial Publitec S.A. Argentina Nº 237. p. 62–67. 2001.

53. JERKE G., MARUCCI R. S., KNASS P. S. *Micoflora de té (Camellia sinensis) elaborado y comercializado en Misiones, Argentina.* VI Congreso Latinoamericano de Microbiología de los Alimentos. MICROAL 2000. Buenos Aires. Argentina. Código I 8. Página 209. 2000.

54. JERKE G., ET AL. *Evolution of contaminating mycoflora in the commercial elaboration of tea (Camellia sinensis)*

from Misiones, Argentina. Congreso Mundial De Micologia. Buenos Aires. Argentina. 2000.

55. JERKE G., MARUCCI R.S., TONON S.A., FONTANA H., IPUCHA C. Hongos aflatoxigénicos en té *(Camellia sinensis)* durante su procesamiento a escala industrial. III Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. p. 47. 2000.

56. CLOETE T.E., KOTZE J.M. *Microbiological aspects of tea manufacture in South Africa.* Acta horticulturae; 275: 691–698. 1990.

57. ABARCA M.L., ACCENSI F., BRAGULAT M.R., Y CABAÑES F.J. *Current importante of ochratoxin A – producing Aspergillus* spp. J. Food Prot. Vol. 64, Nº 6. Pag 903–906. 2001.

58. CALDAS E.D., SILVA S.C., OLIVEIRA J.N. *Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health.* Rev. Saúde Pública,36(3): 319–323. 2002.

59. MARTINS M. L., MARTINS H M., BERNARDO F. *Fumonisins B_1 and B_2 in Black Tea and Medicinal Plants*. Journal of Food protection. 64(8): 1268–1270. 2001.

60. OMURTAG G.Z., YAZICIOGLU D. *Determination of fumonisins B1 and B2 in herbal tea and medicinal plants in Turkey by high–performance liquid chromatography*. J. Food Prot.; 67(8): 1782–1786. 2004.

Recibido: 26/08/09.
Aprobado: 08/04/10

- Gladis Jerke
  Bioquímica. Magister en Tecnología de los Alimentos. Jefe de trabajos prácticos de Microbiología e Inmunología. Categoría del Incentivo: IV.

- Karina Alejandra Salvatierra
  Bioquímica. Master en Medicina y cirugía troical, Universidad de Valencia, España. Auxiliar docente de primera, Cátedras de Microbiología e Inmunología y Virología. Categoría del Incentivo: no posee.

- Severino Bargardi
  Farmacéutico, Bioquímico. Magister en Microbiología Clínica. Ex profesor titular de Microbiología e Inmunología (jubilado) Categoría del Incentivo: II.

. Laboratorio de Análisis Microbiológico (LAM). Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDeT); Facultad de Ciencias Exactas, Químicas. y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Mariano Moreno 1375. (3300) Posadas. Misiones. Argentina. Télefono: 054-3752-427687. Fax:054-3752-435118. E-mail: diskega@fceqyn.unam.edu.ar.