

REBIOLEST

REVISTA CIENTÍFICA DE ESTUDIANTES



Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de Trujillo

Volumen 2 , Número 1

Enero - Junio, 2014



Alguna vez alguien me dijo, si quieres problemas haz algo. Y ahora lo entiendo a la perfección. Puedo resumir ese sentimiento solo con agradecimiento a todos los que alguna vez quisieron, pudieron y lo hicieron; ahora ese esfuerzo se ve recompensado con el silencio de quienes muchas veces nos criticaron y menospreciaron.

Nada es casualidad ni tampoco suerte, todo cuesta y todo se consigue si se quiere triunfar.

LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE BIOQUÍMICA APLICADA-EEBA “Julio César Arellano Barragán” reconoce con su nombre a un importante hombre de la ciencia de nuestra Facultad, con muchos aciertos, errores y virtudes, como cualquiera de nosotros. Por ello tal designación: como agradecimiento al amigo, al maestro.

La EEBA tiene como objetivo Interrelacionar los conocimientos teóricos impartidos en el curso de Bioquímica General, con la práctica cotidiana del desarrollo del profesional Biólogo. Involucrando los diferentes ciclos y rutas bioquímicas de microorganismos, plantas y animales, propiciando en el estudiante la iniciativa de investigación, cooperación, compañerismo, solidaridad y amor por la naturaleza; Así también incentivando el emprendimiento empresarial con la obtención de productos con valor agregado comercial. Así mismo nuestra Misión es Generar competencias Académico-Profesionales, en los estudiantes de Ciencias Biológicas y afines, incentivando la investigación formativa, además consolidar valores como la responsabilidad, lealtad, solidaridad y respeto al medio ambiente. Y nos proyectamos a ser un Instituto de investigación líder en el Perú, que promueva el desarrollo de soluciones integrales para los complejos problemas del sector: salud, agroindustria, ganadería, pesquería y medio ambiente. Local, regional, nacional y mundial.

La EEBA inició sus actividades en Julio del 2009 con la concesión del terreno por parte del Dr. José Mostacero León Decano por esa época y se oficializa su funcionamiento en setiembre del 2013 con resolución de Consejo de Facultad N° 128-2013 Fac.CCBB., firmada por el entonces Decano Dr. Hermes Escalante Añorga.

La EEBA es un ente promotor de la **Investigación Formativa**, la cual **forma** al estudiante con las herramientas básicas de la investigación científica logrando organizar y construir conocimiento científico como resultado de la investigación-acción.

La EEBA cuenta con 17 módulos de investigación formativa y se están desarrollando 12 tesis con estudiantes de pregrado y postgrado de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; Además difunde sus logros a estudiantes del nivel primario y secundario de Instituciones Educativas estatales y Privadas con visitas técnicas guiadas como parte de la Proyección social y Extensión Universitaria.

A todos los interesados, pueden visitar la página Web: www.eebaunt.wix.com

Foto de la portada: "Zarcillo", *Larosterna inca* (Lesson, 1827). Pertenece a la familia Sternidae, Orden Charadriiformes. Se distribuye en las costas de Perú y Chile, única del género *Larosterna*, fue registrada en la Reserva Nacional Islas Islotes y Puntas Guaneras, Islas Guañape Norte, Virú, La Libertad. Estado de conservación **CASI AMENAZADO (NT)**. Foto gentilmente proporcionada por el Dr. Luis Pollack Velásquez.

Dr. Carlos Alberto León Torres
Docente Dpto Q.B.y F.A. Fac.CCBB.

Editorial

Alguna vez alguien me dijo, si quieres problemas haz algo. Y ahora lo entiendo a la perfección. Puedo resumir ese sentimiento solo con agradecimiento a todos los que alguna vez quisieron, pudieron y lo hicieron; ahora ese esfuerzo se ve recompensado con el silencio de quienes muchas veces nos criticaron y menospreciaron. Nada es casualidad ni tampoco suerte, todo cuesta y todo se consigue si se quiere triunfar. 2

Contenido/Contents 3

Artículos originales/Original papers

- Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de quina, *Cinchona pubescens*. **Effect of gibberellic acid, potassium nitrate, and coconut water on seed germination of *Cinchona pubescens***. Joseph Campos-Ruíz, Lisi Cerna-Rebaza de Chico, Julio Chico-Ruíz(e20)..... 5
- Efecto del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis lactis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*. **Effect of the culture supernatant of *Bifidobacterium animalis lactis* on the survival of *Salmonella typhi***. Jonatan C. Abad-Castillo y Luis A. Llenque-Díaz(e21)..... 16
- Efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* “in vitro”. **Effect of the hydroalcoholic extract of *Punica granatum* on "in vitro" *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* viability**. Ruby Bernal Sepúlveda, Icela Rodríguez Haro y Marco Salazar Castillo(e22) 23
- Efecto de *Rhizobium etli* en el crecimiento de plántulas de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, en condiciones de laboratorio. **Effect of *Rhizobium etli* on seedling growth of sugar cane, *Saccharum officinarum*, under laboratory conditions**. Nolia Ferrel-Caballero y Bertha Soriano(e23)..... 32
- Efecto de dos especies nativas de *Trichoderma* sobre huevos y juveniles de *Meloidogyne sp.* en condiciones de laboratorio. **Effect of two native species of *Trichoderma* on eggs and juveniles of *Meloidogyne sp.* under laboratory conditions**. Olinda del Castillo-Algarate, Carlos Collantes-Arana , Guillermo Cox-Trigoso y Juan Wilson- Krugg(e24) 44
- Sensibilidad bacteriana de cultivos de *Listeria* de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo, Perú. **Bacterial sensibility of *Listeria* cultures from places of fish sale from Trujillo city, Peru, markets**. Yulissa L. Moreno-Córdova, Pedro Mercado-Martínez(e25)..... 53
- Resistencia Bacteriana según MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena aislada en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope-EsSalud (Perú). **Bacterial resistance as MIC 90 of uropathogenic *Escherichia coli* isolated in the Microbiology Laboratory of Hospital II-Essalud Chocope (Peru)**. Sandra Tucto-Succhil, Pedro Mercado-Martínez y Tony Hurtado-Escamilo(e26) 59

- Efecto de *Beauveria bassiana* sobre la mosca *Anastrepha sp.* y larvas del cogollero *Spodoptera frugiperda* en condiciones de laboratorio. **Effect of *Beauveria bassiana* on the fly *Anastrepha sp.* and larvae of the armyworm under laboratory conditions.** Pamela Arias López, Brenda Banda Banda, Renzo Bejarano de la Cruz, Diana Benites Salcedo y Julio Arellano Barragán(e27) 72
- Efecto de antígenos de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* obtenidos a diferentes tiempos de incubación sobre anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. **Effect of antigens of *Trypanosoma cruzi* epimastigote obtained at different times of incubation on antibodies produced in *Oryctolagus cuniculus*.** Meily Mezarina-Sánchez, Greicy Valdera-Torres, Fernanda Vásquez-Miranda, Nelida Velezmoro-Casanova, Yolanda Vértiz-Vereau, Hermes Escalante-Añorga(e28) 79
- Prevalencia del enteroparasitismo en pacientes atendidos en el Laboratorio Quintanilla SRL., Trujillo (Perú): 2008-2012. **Enteroparasitism prevalence in patients attending in the Quintanilla SRL Laboratory, Trujillo (Peru): 2008-2012.** Paola P. Poma Sotero y César A. Jara(e29) 84
- **Guía para los autores** 91



Efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de semillas de quina, *Cinchona pubescens*

Effect of gibberellic acid, potassium nitrate, and coconut water on seed germination of *Cinchona pubescens*

Joseph Campos-Ruíz¹, Lisi Cerna-Rebaza de Chico², Julio Chico-Ruíz²

¹Escuela AP de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú. ²Laboratorio de Fisiología y Cultivo de Tejidos Vegetales. Facultad de Ciencias Biológicas. UNT.

RESUMEN

Cinchona pubescens Vahl. es una especie forestal de gran valor medicinal, comercial y ecológica que se encuentra distribuido desde Costa Rica hasta el Perú y que, por la alteración de su hábitat y la difícil germinación de sus semillas en campo, se encuentra en peligro de extinción. En el presente trabajo se evaluó el efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de sus semillas en material colectado en las montañas del distrito de Colasay (Jaén, Perú). El nitrato de potasio actuó como un promotor en la aceleración de la germinación de las semillas, donde a la concentración de 1000 ppm brindó la más alta tasa en porcentajes de germinación, energía germinativa y valor de germinación; en cambio, el tratamiento con AG3 a las concentraciones de 1000, 2000 y 3000 ppm actuó como un inhibidor en la germinación de estas semillas; recomendando que no se justifica una alta inversión en la adquisición del ácido giberélico, cuando se puede implementar un sistema fácil y económico, como lo es el tratamiento con KNO₃.

Palabras clave: Germinación, *Cinchona pubescens* Vahl, ácido giberélico.

ABSTRACT

Cinchona pubescens Vahl. is a forest species of high medicinal, commercial and ecological value which is distributed from Costa Rica to Peru. Nowadays is endangered to extinction, mainly due to habitat alteration and the difficult germination of the seed on field. The present study aims to evaluate the effect of gibberellic acid (AG3), potassium nitrate (KNO₃) and coconut water on *C. pubescens* seed germination. Mature and enclosed fruits of *Cinchona pubescens* were collected in the mountains Colasay District (Laurel Branches, the Clarinero and cold water), Jaén. The analysis results show that a batch of 1000 seeds weigh 0.24 grams with a moisture content of 16.67%. Potassium nitrate act as a promoter in the acceleration of seed germination where treatment at a concentration of 1000 ppm gave the highest germination rate, germination energy and germination value, in contrast to treatment with AG3 concentrations of 1000, 2000 and 3000 ppm acted as an inhibitor in the germination of these seeds; recommending is not necessary a high investment in the acquisition of AG3 if you can implement a simple and economic system, as is the treatment with KNO₃.

Keywords: Germination, *Cinchona pubescens* Vahl., plants at risk of extinction.

INTRODUCCIÓN

Considerada como símbolo del patrimonio peruano, *Cinchona pubescens*, denominada “cascarilla”, “árbol de la quina” o “cinchona”, habita en la Cordillera de los Andes, desde Colombia hasta Bolivia; en el Perú, se la encuentra en los departamentos de Piura, Cajamarca, Amazonas, Lambayeque, Huánuco, Pasco, Junín, Cusco y Puno, entre los 400 a 3 200 msnm¹.

El árbol de la quina está considerado en el grupo de plantas medicinales de mayor importancia en el mundo debido a que ayudó a combatir las fiebres recurrentes o malaria desde 1949, debido a que su corteza contiene quinina y otros alcaloides fenólicos². En efecto, la quinina, quinidina, cinchonina y cinchonidina han sido registradas como los cuatro principales alcaloides del árbol de la quina, además del ácido quínico, ácido quinotánico y la quinovina; por esta razón, la corteza tiene diversas propiedades terapéuticas, tales como: tónica, anti fermentativa, antipirética, anticeboreica y, por cierto, anti malárica³. Al mismo tiempo, la quina no sólo es reconocida por su valor medicinal, sino también, por su alto valor maderable⁴.

La corteza de la cinchona se viene extrayendo desde hace muchos años, lo que ha conducido a la destrucción de miles de árboles sin que se haya repuesto uno solo; actualmente, los bosques montanos de Jaén y San Ignacio, hábitat natural de esta especie, se han convertido en ecosistemas amenazados por la colonización espontánea y la extracción y comercialización de madera, haciendo que desaparezcan los pocos árboles que aún quedan⁵.

En general, la semilla es uno de los principales recursos para el manejo agrícola y silvícola de las poblaciones de plantas, para la reforestación, para la conservación del germoplasma vegetal y para la recuperación de especies valiosas sobreexplotadas; éstas pueden almacenarse vivas por largos periodos, asegurándose así la preservación de especies y variedades de plantas valiosas⁶, no obstante, las semillas de cinchona no pueden ser guardadas por largos periodos de tiempo porque rápidamente pierden su viabilidad⁷. Ante esto, se ha propuesto que las semillas deben almacenarse a una temperatura de 6-8 °C, en ambiente húmedo y utilizarse tratamientos pregerminativos^{8,9,10}.

El ácido giberélico y los compuestos nitrogenados figuran entre las sustancias que pueden ser aplicadas a las semillas en tratamientos pregerminativos para romper la dormición¹¹. La aplicación exógena de hormonas suplementa los requerimientos del control endógeno de las semillas reduciendo el tiempo de estratificación necesario para su germinación y los compuestos nitrogenados estimulan de diferentes formas la germinación de semillas produciendo diversos efectos en varias especies, por lo que no existe un acuerdo generalizado que explique su mecanismo de acción^{12,13}.

Las giberelinas desempeñan un papel importante en dos etapas de la germinación de las semillas: en la primera, actúan en la inducción de enzimas y en la segunda, activan las enzimas que intervienen en la movilización del sistema de alimentos de reserva; al mismo tiempo, tienen efecto sobre la elongación del tejido embrionario alterando la extensibilidad de la pared celular que facilita la toma de agua^{14,15,16}.

Hartman y Kester¹⁷ sostienen que muchas semillas recién cosechadas y en letargo germinan mejor después de ser remojadas en una solución de nitrato de potasio al 2% y Ovalles et al.¹⁸ señalan que el agua de coco, *Cocos nucifera*, contiene citoquinina que es una fitohormona que entre otras funciones promueve la ruptura de la dormancia y la germinación de semillas al estimular la elongación de las células de los cotiledones en respuesta a la luz.

En Trujillo (Perú), ubicado al nivel del mar, se encontró que semillas de *Cinchona* sp. procedente del centro poblado de La Cascarilla-Jaén, con sustratos de suelos originarios, mostraron un tiempo de germinación de semillas variable entre 13 y 25 días, independientemente de la procedencia de los distintos lugares del mencionado poblado, que un 30-50 % de semillas (de un total de 100 ensayadas por recipiente) logran germinar bajo estas condiciones, y que la humedad y el calor favorecen el proceso germinativo; asimismo, se obtuvieron buenos resultados con semillas de *C. officinalis* a las cuales se aplicó tratamientos pre germinativos con ácido giberélico y nitrato de potasio^{19,20}.

Considerando que las semillas de *C. pubescens* presentan dificultades en su germinación porque están influenciadas directamente por la maduración fisiológica y porque de cada 1000 semillas sólo germinan un promedio de 50 semillas empleando como sustrato suelo del bosque natural^{20,21}, se planteó esta investigación dirigida a evaluar el efecto del ácido giberélico, nitrato de potasio y agua de coco en la germinación de las semillas de esta importante especie vegetal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- Semilla botánica de *C. pubescens* Vahl. de un mes de cosechado, procedente del distrito de Colasay, provincia de Jaén, Departamento de Cajamarca, Perú.
- “Agua de coco” obtenida de cocos maduros, *Cocos nucifera*, adquirida en mercados de Trujillo. El agua de coco tiene un alto contenido en potasio, antioxidantes, citoquininas, L-arginina, ácido ascórbico, y magnesio.

Recolección del material biológico

Las semillas de *C. pubescens* Vahl fueron seleccionados por sus mejores características fenotípicas encontradas en los montañas naturales de las montañas de los sectores el Laurel, el Clarinero y aguas frías del distrito de Colasay (5° 58'31" LS, 79° 3'31" LO), cuya altitud es de 1775 m.s.n.m., entre marzo y setiembre del 2013.

Los frutos se recolectaron es estado maduro y semimaduro presentando un color marrón y pardo, respectivamente. Se recolectó un promedio de 5 kg y luego se empacaron en bolsas de tela para su posterior transporte a las instalaciones del laboratorio de Fisiología y Cultivos de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de Trujillo donde se realizó la investigación. Una muestra de hojas, frutos y tallos fueron enviados al Museo de Historia Natural de San Marcos (UNMSM), Lima y al Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo (HUT) para su determinación.

Secado de los frutos, selección, desinfección y siembra

Se hizo al aire libre durante tres días, para lo cual fueron colocados en una tela y removidos constantemente para obtener un secado homogéneo. Los frutos secados al aire libre fueron seleccionados teniendo en cuenta su estado fitosanitario y las de mejor apariencia. Una vez seleccionados los frutos se realizó el proceso de desinfección que consistió en lo siguiente: se lavaron en una solución de detergente, enjuagándolas luego con agua corriente, luego en la cámara de flujo laminar se manipuló el fruto en condiciones de máxima asepsia utilizando mandil, mascarilla, gorro quirúrgico y guantes de goma desechables. Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a remojar el material vegetal en una solución de alcohol al 70 % por 1 minuto y luego se dejó 2 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 2%, después se lavó 3 veces con agua estéril. Seguidamente, con la ayuda de pinzas y bisturís (previamente esterilizados) se manipuló el fruto dentro de la cámara de flujo laminar realizando cortes longitudinales, quedando las semillas expuestas (Fig. 1a); luego, con la ayuda de una espátula pequeña se depositó cincuenta semillas por cada placa Petri, y se trasladaron las placas a la sala de incubación.

Preparación de las placas Petri para el ensayo de germinación

Los ensayos de germinación fueron realizados a nivel de laboratorio, con luz y temperatura ambiente, se utilizaron placas Petri de 7.5 cm de diámetro previamente esterilizadas. Las semillas se distribuyeron en las placas Petri sobre papel toalla humedecido con las sustancias requeridas a utilizar según tratamientos, colocando 50 semillas por unidad experimental con 3 repeticiones por tratamiento. La distribución de los tratamientos en el laboratorio se realizó de acuerdo al diseño estadístico completamente aleatorizado.

Tratamientos y diseño experimental

La unidad experimental estuvo constituido por 50 semillas de *Cinchona pubescens* Vahl. y el total de semillas utilizadas fueron 1 500 semillas. El ácido giberélico utilizado fue obtenido de un regulador de crecimiento comercial denominado ACTIVOL, en donde el ingrediente activo es Ácido giberélico (9.4 %). El KNO₃ utilizado fue un fertilizante proveniente del laboratorio de Fisiología y Cultivos de Tejidos Vegetales. La presente investigación es del tipo experimental, bajo el diseño completamente aleatorizado (DCA), con 10 tratamientos y 3 repeticiones.

Evaluaciones y registros

Se determinó el peso de 1000 semillas por gramo y el contenido de humedad que hay en estas. Se evaluó diariamente el desarrollo de las semillas durante 40 días, y se consideró como indicador de la germinación la aparición del ápice de la radícula. Los parámetros germinativos que se evaluaron fueron: porcentaje de germinación, energía germinativa (EG) y el valor de germinación (VG).

Tabla 1. Número de tratamientos, soluciones y concentraciones empleadas en semillas de *Cichona pubescens* procedente de Jaen (Perú)

Tratamientos	Solución /concentración
T1	AG ₃ (1000 ppm)
T2	AG ₃ (2000 ppm)
T3	AG ₃ (3000 ppm)
T4	KNO ₃ (1000 ppm)
T5	KNO ₃ (2000 ppm)
T6	KNO ₃ (3000 ppm)
T7	AGUA DE COCO (30 %)
T8	AGUA DE COCO (50 %)
T9	AGUA DE COCO (70 %)
T10	TESTIGO

- Porcentaje de germinación.

Para medir el porcentaje se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ de germinacion} = \frac{N^{\circ} \text{ de semillas germinadas}}{N^{\circ} \text{ de semillas sembradas}} \times 100$$

- Energía germinativa (EG %).

La energía germinativa se refiere al porcentaje de semilla que ha germinado durante una prueba, hasta el momento en que la cantidad de semilla que germina por día ha llegado a su máximo. La cantidad de días requeridos para alcanzar este máximo es el período energético. Por lo general, las plántulas que se originan de las semillas que germinan dentro del período energético constituyen el stock de plantación de mejor calidad.

$$\text{Energía germinativa (EG \%)} = \frac{N^{\circ} \text{ de semillas germinadas diariamente}}{N^{\circ} \text{ de semillas puestas a germinar}} \times 100$$

- Valor de germinación (VG).

Es la capacidad germinativa de un lote de semillas para poder formar plántulas en condiciones desfavorables para la semilla (Thomson 1979). Tiene por finalidad combinar en una sola cifra una expresión de la germinación total al término del período de ensayo y una expresión de la energía o velocidad de germinación (Czabator, 1962)

El valor de germinación (VG) puede por tanto calcularse mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Valor de germinacion (VG)} = \text{GDM (final)} \times \text{VM}$$

Donde:

GDM (Germinación diaria media): La germinación total se expresa en forma de germinación diaria media (GDM) (final), que se calcula como el porcentaje acumulado de semillas germinadas al final del ensayo dividido por el número de días que transcurren desde la siembra hasta el término del ensayo.

$$\text{GDM} = \frac{\% \text{ de germinación total}}{N^{\circ} \text{ de días totales del ensayo}}$$

VM (Valor máximo): La velocidad de germinación se expresa en forma de valor máximo (VM). Es el cociente máximo entre el porcentaje de germinación acumulado hasta un periodo determinado y el número de días en que se logró dicho porcentaje. A su vez, el Valor Máximo (VM) determina la Energía Germinativa (porcentaje de germinación acumulado en el día en que se produce el VM) y el Período de Energía (número de días en que ocurre el VM)

$$\text{VM} = \frac{\% \text{ EG}}{\text{PEG}}$$

PEG: Período de la energía germinativa.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando estadísticos ANAVA y TUKEY.

RESULTADOS

Las semillas de *C. pubescens* Vahl. presentaron un porcentaje de humedad de 16.67 % en 1 000 semillas que pesaron 0.24 g. Se encontró que el KNO₃, seguido del agua de coco indujo a los mayores porcentajes de germinación (Tabla 2, Figs. 2 y 3)

Se encontró, igualmente, que KNO₃ a sus diferentes concentraciones indujo los mayores porcentajes de energía germinativa (Tabla 3, Fig 4). En el mismo sentido, KNO₃ a sus diferentes concentraciones indujo los mayores porcentajes de energía germinativa (Tabla 4, Fig. 5)

Tabla 2. Porcentaje de germinación de las semillas de *Cinchona pubescens* “quina” en los diferentes tratamientos, a los 40 días, con ácido giberélico (AG₃), nitrato de potasio (KNO₃) y agua de coco, *Cocos nucifera* (ACN)

Tratamientos	Promedio de semillas germinadas	% de germinación
T1: AG ₃ (1000 ppm)	16.67	33.34
T2: AG ₃ (2000 ppm)	0	0
T3: AG ₃ (3000 ppm)	0	0
T4: KNO ₃ (1000 ppm)*	45.33	90.67
T5: KNO ₃ (2000 ppm)	44.67	89.94
T6: KNO ₃ (3000 ppm)	42	84
T7: ACN (30 %)	33	66
T8: ACN (50 %)*	35.67	71.34
T9: ACN (70 %)	27.67	55.44
T10: Testigo	42.33	84.66

*p<0,05

Tabla 3. Energía germinativa de las semillas de *Cinchona pubescens* “quina” tratadas con ácido giberélico (AG₃), nitrato de potasio (KNO₃) y agua de coco, *Cocos nucifera*, (ACN) evaluada durante 40 días.

Tratamientos	Germinación (días)		Repeticiones			Prom.	% EG
	Inicio	Término	R1	R2	R3		
T1: AG ₃ (1000 ppm)	13	24	14	15	19	16	32
T2: AG ₃ (2000 ppm)	0	0	0	0	0	0	0
T3: AG ₃ (3000 ppm)	0	0	0	0	0	0	0
T4: KNO ₃ (1000 ppm)	12	23	43	41	49	44.33	88.66
T5: KNO ₃ (2000 ppm)	11	22	45	39	45	43	86
T6: KNO ₃ (3000 ppm)	13	23	43	44	38	41.67	83.34
T7: ACN (30 %)	13	28	31	35	28	31.33	62.66
T8: ACN (50 %)	15	30	30	35	38	34.33	68.66
T9: ACN (70 %)	17	33	21	32	25	26	52
T10: Testigo	12	24	43	44	40	42.33	84.66

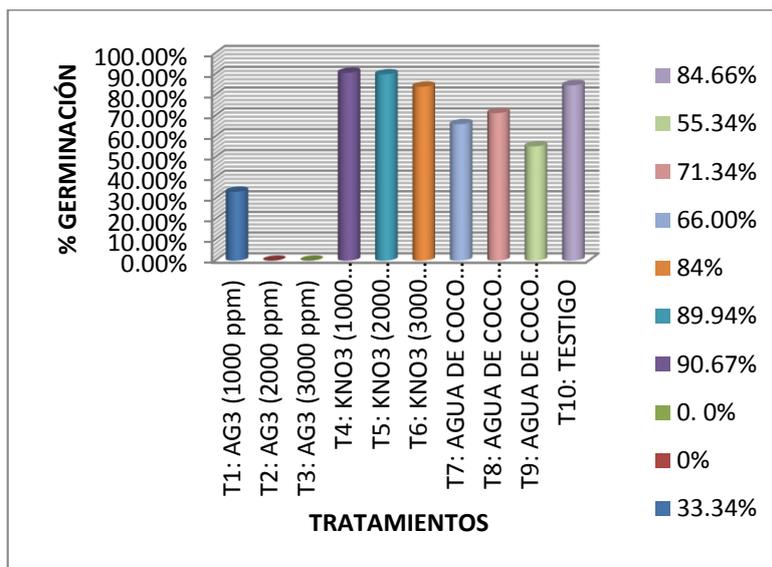


Fig. 1. Porcentaje de germinación de semillas de *Cichona pubescens* Vahl., según tratamiento, con ácido giberélico (AG3), nitrato de potasio (KNO₃) y agua de coco, *Cocos nucifera*. Se aprecia el consolidado de los tratamientos con sus respectivos porcentajes de germinación.

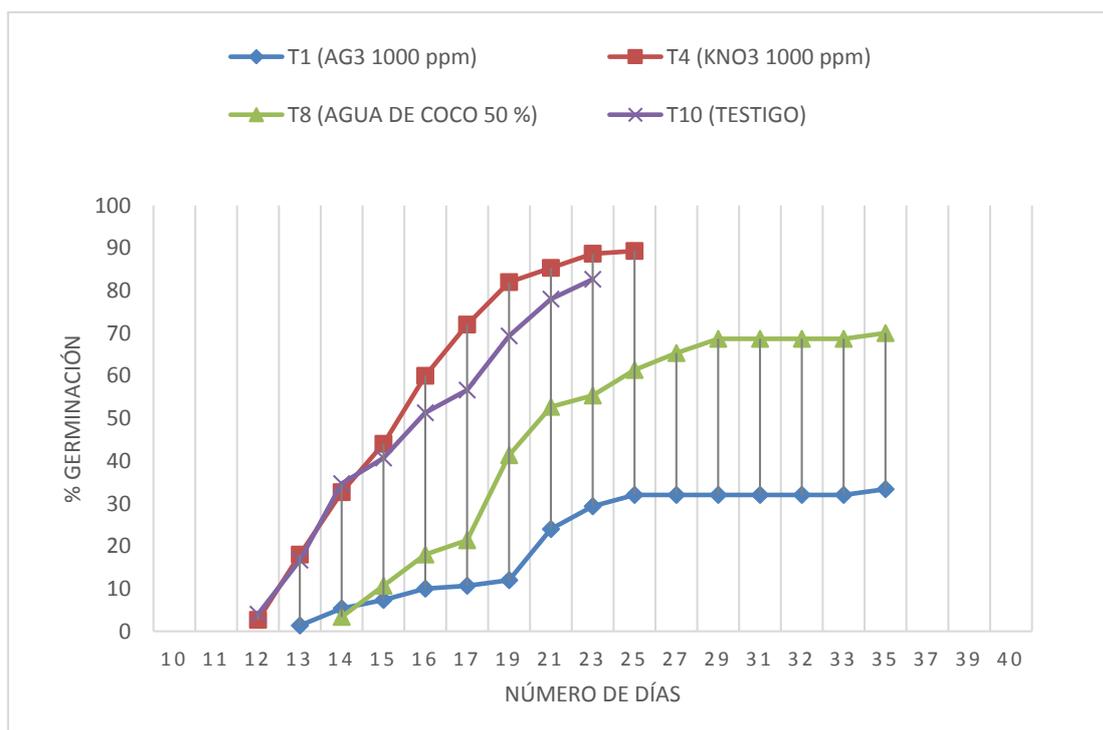


Fig. 2. Curva de germinación diaria de semillas de *Cinchona pubescens* Vahl., por tratamientos durante 40 días, tratadas con ácido giberélico (AG3), nitrato de potasio (KNO₃) y agua de coco, *Cocos nucifera*.

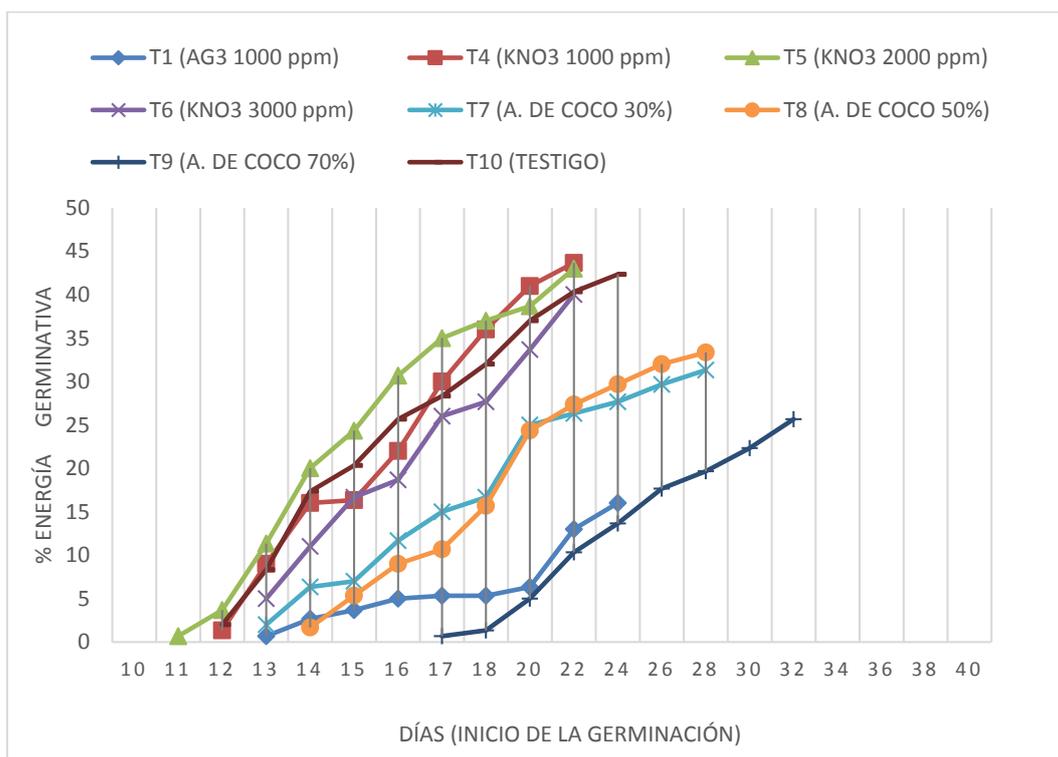


Fig. 3. Curva de la energía germinativa diaria porcentual de semillas de *C. pubescens* Vahl., según tratamiento, tratadas con ácido giberélico (AG3), nitrato de potasio (KNO₃) y agua de coco, *Cocos nucifera*, (ACN).

Tabla 4. Valor de la germinación de la semilla de *Cichona pubescens* “quina” durante 40 días, tratadas con ácido giberélico (AG3), nitrato de potasio (KNO₃) y agua de coco, *Cocos nucifera*, (ACN).

TRATAMIENTOS	% PG	% EG	PEG días	VM	GDM final	VG (VM x GDM)
T1	33.34	32	24	1.33	0.95	1.264
T2	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0
T4	90.67	88.66	23	3.85	3.49	13.436
T5	89.94	86	22	3.91	3.46	13.529
T6	84	83.34	23	3.62	2.33	8.435
T7	66	62.66	28	2.24	1.83	4.099
T8	71.34	68.66	30	2.29	1.93	4.419
T9	54.74	52	33	1.58	1.52	2.402
T10	84.66	84.66	24	3.53	3.53	12.461

PG: Porcentaje de germinación, EG: Energía germinativa, PEG: Periodo de energía germinativa, VM: Valor máximo, GDM final: Germinación diaria media final, VG: Valor de germinación.

DISCUSIÓN

A la hora de analizar los resultados obtenidos, se determinó que las semillas de *C. pubescens* presentaron un contenido de humedad del 16.67% porcentaje un poco más elevado comparándolo con *C. officinalis* cuyo porcentaje de humedad fue de 12.5%²⁰. Estos resultados son corroborados en otra investigación, en donde se menciona que la estructura de las semillas de las latifoliadas en el momento de la caída de las semillas tiene un contenido de humedad entre los rangos del 10 hasta el 40 de humedad²².

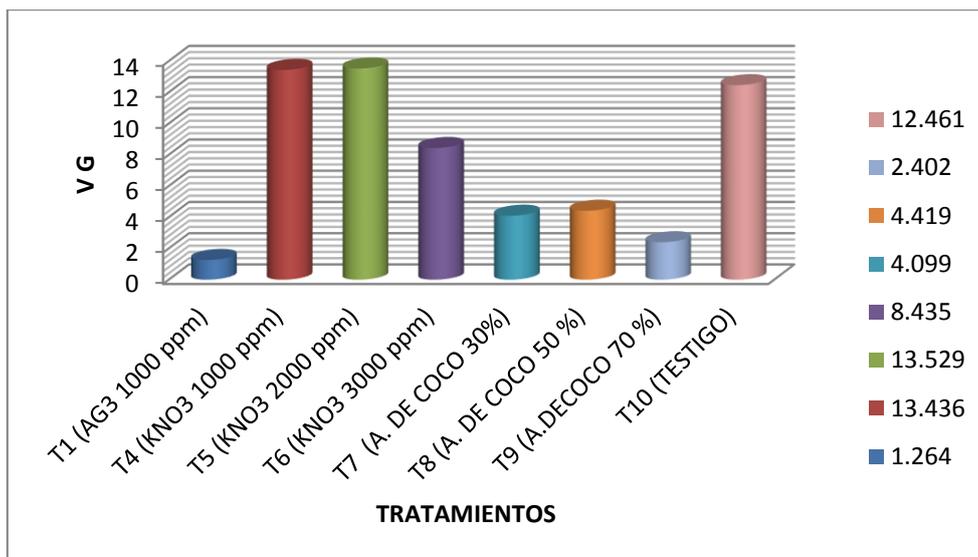


Fig. 4. Valor de la germinación (VG) de semillas de *C. pubescens* Vahl., según tratamiento, tratadas con ácido giberélico (AG₃), nitrato de potasio (KNO₃) y agua de coco, *Cocos nucifera*.

Se determinó que un lote de 1 000 semillas pesan 0.24 g, un número alto de semillas con un peso demasiado bajo; estos resultados son similares a los obtenidos previamente con *C. officinalis* en donde mil semillas pesaban 0.9 g¹⁸ y las registradas por ANACAFE²⁰ mencionando que 1 000 semillas de *Cinchona* sp. pesaban 0.11 g probablemente se refiera a otra especie de este género.

Los recursos de una planta para producir semillas son limitados, así que cierta cantidad de energía disponible para producirlas puede traducirse en un gran número de semillas pequeñas o en un número menor de semillas grandes; el número producido y su tamaño afectarán la capacidad de sobrevivencia y perpetuación de las especies; las plantas que producen muchas semillas pequeñas se distribuyen ampliamente y tienen mayores oportunidades de encontrar un sitio favorable para germinar y crecer, sin embargo, su tamaño aporta poco al crecimiento de la nueva planta y esta depende muy pronto de los recursos disponibles en su medio, por lo que su riesgo de morir es muy alto, también tienen menor resistencia a los efectos de la defoliación por herbívoros y pueden ser aplastadas fácilmente por la hojarasca que cae al suelo, aunque esto se compensa de alguna manera por el gran número, solo una pequeña fracción sobrevive a todos esos accidentes^{22,23,24}.

El lote de semillas del tratamiento testigo (T10) dio un 84.66 % de germinación superiores a los encontrados anteriormente²⁰ (66.67%) utilizando como sustrato algodón para las semillas de *C. officinalis* y 30-50 % de germinación con semillas de *Cinchona* sp. con sustratos de suelos originarios y sin aplicación de tratamientos²⁰.

Las concentraciones con ácido giberélico (AG₃) a 1000, 2000 y 3000 ppm no han influenciado en la germinación de semillas de *C. pubescens* obteniendo valores de germinación del 33.34 %, 0% y 0% respectivamente. Estos valores son realmente muy bajos a comparación del testigo, y de los resultados previos trabajados con semillas de *C. officinalis* a las concentraciones de 1000 y 2000 ppm de AG₃ arrojándole 88.67 y 83.33% respectivamente²⁰. Al respecto, se ha constatado que semillas de maracuyá escarificadas y tratadas con 300 ppm de AG₃ tuvo un efecto fitotóxico, lo cual prueba que el ácido giberélico a altas concentraciones es inhibidor de la germinación para ciertos tipos de semillas^{24,25}.

Teniendo en cuenta que *C. pubescens* es una especie caducifolia, cuyas semillas requieren generalmente de hormonas entre ellas el ácido giberélico para asegurar su germinación y romper el letargo¹⁷, es necesario entonces poder determinar la concentración óptima de ácido giberélico en la aplicación exógena para las semillas de del género *Cinchona*²⁶.

El nitrato de potasio (KNO₃) a las concentraciones de 1000, 2000 y 3000 ppm dieron los más altos porcentajes siendo 90.67%, 89.94% y 84% respectivamente. Estos resultados fueron casi similares a los obtenidos²⁰ (82.67% y 82% a 1000 y 2000 ppm de KNO₃). El efecto observado con nitrato de potasio es bien conocido en otras especies^{26,27}; sin embargo, no existe un acuerdo generalizado que explique su mecanismo de acción¹³.

Resultados en germinación de las semillas de caoba (*Swietenia macrophylla* King), cedro rojo (*Cedrela odorata* L) y roble (*Tabebuia rosea* (Bertol), mostraron que el patrón de respuesta al tratamiento con agua de coco fue similar en las tres especies²⁸. Conforme el grado de madurez del coco fue mayor (de tierno a seco) la germinación fue menor ($P < 0.05$) indicando que el agua de coco perdió efectividad en promover mayor germinación, así en los tres árboles la máxima ($P < 0.05$) germinación se encontró en semillas con inmersión en agua de coco tierno, la mejoría en germinación fue de 10, 7 y 2 veces con respecto a la encontrada con agua de coco, seco en caoba, cedro y roble, respectivamente. Ovalles et al.¹⁸ señalan que el agua de coco (*Cocos nucifera* L) es rica en nutrientes y su composición específica depende de la madurez del fruto, a menor madurez mayor concentración de nutrientes. El agua de coco contiene citoquinina, fitohormona que entre otras funciones promueve la ruptura de la dormancia y la germinación de semillas al estimular la elongación de las células de los cotiledones en respuesta a la luz²⁹.

Si bien es cierto los resultados expresados en porcentajes de germinación de los tratamientos con KNO_3 (90.67%) y el testigo (84.66) no muestran diferencias estadísticas según la prueba de TUKEY; aun así, se puede afirmar con mucho criterio de acuerdo a lo experimentado y observado en la investigación, que existe gran ventaja en la utilización de uno de ellos; dado que las semillas germinadas con nitrato de potasio al mes desarrollan plántulas más vigorosas comparándolas con el testigo (anexo 8), y esto da un ventaja para su posterior trasplante a un sustrato más estable.

El inicio de la curva de germinación diaria encontrada (12 días) varía en algo respecto de las investigaciones llevadas a cabo con semillas de *Cinchona* sp.¹⁹, que germinaron a partir de los 13 días, y de *C. officinalis* que, en promedio, iniciaron la germinación a los 15 días²⁰. Segura²¹, experto en forestales, menciona que las semillas de *C. pubescens* presentan dificultades en su germinación, las cuales están influenciadas directamente por la maduración fisiológica de las semillas, y hay que tener en cuenta el momento óptimo de recolección de este tipo de semillas. Según sus experiencias, de cada 1000 semillas de *Cinchona* sp. germinan un promedio de 50 semillas empleando suelo de bosque natural como sustrato y en donde la germinación empieza a los ocho días.

El periodo de la Energía germinativa de las semillas de *C. pubescens* por tratamientos aplicados, siendo los valores más altos para los tratamientos con KNO_3 (88.66, 86, 83.34) juntamente con el testigo (84.66); los valores medios para los tratamientos con agua de coco (62.66, 68.66 y 52) y los más bajos para el AG_3 (32). La energía germinativa es el concepto más importante para cuantificar el valor de germinación y un factor de gran importancia para las especies forestales debido a la alta competencia que se presenta, principalmente en las primeras etapas de crecimiento; es decir, el aumento de la energía germinativa y una disminución en el periodo de esta permite que las plántulas originadas de las semillas que lograron germinar dentro de este período energético constituyan el stock de plantación de mejor calidad^{30,31}. En concordancia con ello, el valor de germinación en las semillas de *C. pubescens* aumenta con la aplicación del KNO_3 a las concentraciones de 1000 y 2000 ppm respectivamente; es decir, esta sustancia tiene efectos que estimulan la germinación rápida de las semillas de quina, esto se reflejó en un Valor germinativo mayor que el de los otros tratamientos ensayados. El valor de germinación es diferente en cada especie; por ejemplo, en *Pinus leiophylla* alcanza valores del 30.70, en cambio en *Ononis tridentata* alcanza valores de 2.6 y en *Juglans neotropica* “cedro negro” valores de 0.45^{28,29}.

Existe escasa información de ensayos en la germinación para esta especie, por lo que es de importancia que se siga investigando al respecto para poder entender mejor el comportamiento de la germinación de *Cinchona pubescens* Vahl. y otras especies pertenecientes al género *Cinchona*.

CONCLUSIONES

- La germinación de semillas de *Cinchona pubescens* Vahl “quina”, es mayor al 90 % cuando se utiliza nitrato de potasio.
- El Porcentaje de germinación, energía germinativa y valor de germinación cuando se utiliza ácido giberélico a la concentración de 1000 ppm es de 33.34 %, 32 % y 1.264 respectivamente.
- El Porcentaje de germinación, energía germinativa y valor de germinación cuando se utiliza nitrato de potasio a la concentración 1000 ppm es de 90.67 %, 88.66 % y 13.436 respectivamente.
- El Porcentaje de germinación, energía germinativa y valor de germinación cuando se utiliza agua de coco a la concentración del 30 % es de 66 %, 62.66 % y 4.099 respectivamente.

- El análisis de varianza muestra diferencias significativas entre los tratamientos y la prueba de Tukey muestra que los mejores tratamientos son T4 (KNO₃ 1000 ppm), T10 (Testigo) y T8 (Agua de coco 50 %); pero el que presenta mayor ventaja entre ellos es el tratamiento con KNO₃ 1000 ppm.
- Un lote de 1000 semillas de *Cinchona pubescens* Vahl. pesaron 0.24 gr. con un porcentaje de humedad del 16.67 %.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zevallos PP. Taxonomía, distribución geográfica y estatus del genero *Cinchona* en el Perú. Lima, Perú: Centro de Datos Para la Conservación (CDC). Edit. Virginia Isayama Okamoto. 1989.
2. Stell R. Flores para el Rey. Barcelona: Edit. Del Serbal. 1982.
3. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O. Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú. Trujillo, Perú: Edit. Normas Legales SAC. 2002.
4. Acosta S. Maderas económicas del Ecuador y sus usos. Quito: Edit. Casa de la cultura. 1960.
5. Tapia A. Germinación de semilla botánica de *Cinchona officinalis* L. utilizando cinco tratamientos pregerminativos. Tesis de Ingeniero Forestal. Universidad Nacional de Cajamarca. Jaén, Perú. 2007.
6. Trujillo E. Manejo de semillas, viveros y plantación inicial. Bogotá: Edit. PRINTER. 1990.
7. Ascon-Bieto J, Talon M. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Madrid: Edit. Interamericana-McGraw-Hill. 2001.
8. Trujillo E. En el Curso Nacional "Recolección y Procesamiento de Semillas Forestales". Campus de Adefor (8-10 oct. 1996). ADEFOR, RASEFOR, INTERCOOPERATION, CONIF/INSEFOR. Cajamarca, Perú. 1996.
9. Donoso C. Bosques Templados de Chile y Argentina. Variación, Estructura y Dinámica. Santiago de Chile: Edit. Universitaria. 1993.
10. Arnold FE. Manual de vivero forestal: Elaborado para algunas especies forestales nativas de la zona templada del Sur de Chile. Documento Técnico CONAF-DED. 1996.
11. ISTA. International Seed Testing Association. International rules for seed testing. Zurich. Supplements rules. 27. 2006.
12. Lincoln T, Zeiger E. Fisiología Vegetal. Castello Publicaciones. Madrid: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. 2006.
13. Bewley J, Black M. Fisiología y Bioquímica de Semillas en el Proceso de Germinación. Vol. 2: Viabilidad, Dormancia y control ambiental. New York: Edit. Springer-Verlag. 1982.
14. Hartmann H, Kester D. Propagación de plantas. Principios y prácticas. México, DF: Compañía Editorial Continental, S.A. de C. V. 1998.
15. Hong DT, Ellis RH. A protocol to determine seed storage behavior. Department of Agriculture, The University of Reading, UK. 1996.
16. Hilhorst HWM, Karssen YCM. Effects of chemical environment on seed germination. En: Fenner M. (ed.), Seeds: the ecology of regeneration in plants communities. UK: CAB International. 2000; pp. 293-309
17. Harper JL. Population Biology of Plants. London: Academic Press. 1977.
18. Ovalles JF, León LA, Vielma RA, Medina A. Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco. Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes. Mérida, R. B. de Venezuela 2002; 44: 70-78.
19. Theodore W, Helms J, Backer F. Principios de Silvicultura. 2a ed. México: Edit. Mc Graw-Hill Latinoamericana. 1982.
20. ANACAFE (Asociación Nacional del café). Cultivo de Quina: Programa de Diversificación de Ingresos en la Empresa Cafetalera. 2004.
21. Vázquez Y, Orozco A, Rojas M, Esther S, Cervantes V. Semillas. México, DF: Edit. Fondo de Cultura Económicas S. R. 1997.
22. Rosseto C, Coneglian R, Nakagawa J, Shimizu M, Marin V. Germinacao de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand) em funcao de tratamento pre-germinativo. Rev Bras Sementes 2000; 22(1): 247-252
23. Devlin RM, Karczmarczyk SJ. Influence of light and growth regulators on cranberry seed dormancy. J Hort Sci 1977; 52: 283-288
24. Taiz L, Zeiger E. Plant physiology. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers. 1998.
25. Czabator FP. Germination value: an index combining speed and completeness of pine seed germination. Forest Science 1962; 8(4): 386-396
26. Escribá M, Laguna E. Estudio de la germinación de *Ononis tridentata* L. Acta Botanica Malacitana 2006; 31: 89-95

27. Santos A, Armijos R. Modificación de nutrientes y agentes osmóticos sobre la alimentación del crecimiento In vitro de *Cinchona officinalis*, L. como herramienta de conservación. Instituto de Ecología - Unidad de Fisiología Vegetal. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. 2011.
28. Schmidt L. Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark. 2000.
29. Torres J, Mogollón N. Micropropagación de *Cattleya mossiae* Parker ex Hook mediante brotaciónaxilar inducida por tiazurón. Bioagro 2000; 12(1): 10-14.



Efecto del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis lactis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*

Effect of the culture supernatant of *Bifidobacterium animalis lactis* on the survival of *Salmonella typhi*

Jonatan C. Abad-Castillo¹ y Luis A. Llenque-Díaz²

¹Tesista Escuela AP de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología-UNT.

RESUMEN

Se evaluó el efecto bactericida del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, para lo cual se prepararon tres sistemas de evaluación, dos de ellos sirvieron de control constituidos por caldo MRS pH 7 y caldo MRS pH 4, y un sistema problema constituido por el sobrenadante obtenido de *B. animalis lactis*. Se colocó a cada sistema 1 mL del inóculo de 3×10^8 células/mL de *S. typhi* y se incubó a 37°C durante 24 horas. A partir de la 0 hora y cada tres horas hasta completar las 24 horas se monitoreo la supervivencia de *S. typhi*, por el método de recuento en placa, mediante la siembra por incorporación. Los resultados evidencian una disminución de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de *S. typhi* hasta las 24 h de evaluación en condiciones de refrigeración. Entonces se concluye que el sobrenadante de *B. animalis* subsp. *lactis* sí afecta la supervivencia de *S. typhi* en las condiciones de ensayo.

Palabras clave: Efecto, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, Supervivencia, *Salmonella typhi*

ABSTRACT

Bactericidal effect of supernatant from culture of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the survival of *Salmonella typhi* was evaluated in three prepared systems of evaluation; two of them served control constituted by MRS broth pH 7 and MRS broth pH 4, and a system problem constituted by the supernatant obtained from *B. animalis lactis*. It was placed to each system 1 mL of inoculum of 3×10^8 cells/mL of *S. typhi* and incubated at 37 ° C for 24 hours. From 0 hour and every three hours up to complete the 24 hours is monitoring the survival of *S. typhi*, the counting method in plate, through the planting by incorporation. Results show a decrease in colony forming units of colonies (CFU/mL) of *S. typhi* until 24 h of evaluation at refrigerated conditions. It was then concluded that the supernatant from *B. animalis lactis* affects the survival of *S. typhi* in the test conditions.

Keywords: Effect, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, Survival, *Salmonella typhi*

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos probióticos aparecen en el tracto gastrointestinal del hombre desde etapas tempranas de la vida, pero al pasar el tiempo y debido a factores como la edad, la dieta, el ambiente, el estrés y la medicación descienden a cantidades que pueden llegar a ser muy pequeñas, lo cual puede favorecer el crecimiento de bacterias patógenas^{1,2}. Cuando se logra que los probióticos se conserven en número o vuelvan a alcanzar niveles importantes en el intestino, el huésped puede experimentar una serie de beneficios como el mejoramiento de la tolerancia a lactosa, acción contra bacterias patógenas y el mejoramiento de la respuesta inmune³. Gracias a su gran capacidad antagónica contra otros microorganismos y conservante se les usa en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos^{4,5}.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) están presentes en la alimentación del hombre desde hace mucho tiempo y es posible encontrarlas en muchos productos de leche fermentada como yogurt, también se encuentran en quesos frescos, en diferentes carnes y sus productos y en algunas hortalizas; su actividad antimicrobiana ha sido atribuida a la acumulación de los productos finales de los procesos de fermentación, como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrogeno, o bacteriocinas^{6,7,8}.

Los ácidos orgánicos mayoritarios (láctico y acético) generados como consecuencia del metabolismo fermentativo de las hexosas se han considerado los principales responsables del efecto inhibitor de cepas del género *Bifidobacterium* frente a patógenos gastrointestinales, como *Helicobacter pylori* y *S. entérica*. Los ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) generados a partir del metabolismo de polisacáridos no digeribles en la parte alta del tracto gastrointestinal (prebióticos) por este grupo bacteriano también contribuyen a la reducción del pH en el colon, inhibiendo así su colonización por bacterias patógenas^{9,10,11,12}.

Las bacterias del género *Bifidobacterium* bajan el pH intestinal mediante la producción de ácidos con lo cual impide el desarrollo de bacterias entre ellas *Salmonella* sp. y *S. typhi*^{10,11}. El crecimiento de BAL en medios aerobios conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno como: peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la flora láctica y no láctica^{13,15,16}. El peróxido de hidrógeno ha sido estudiado más ampliamente en leche cruda, donde se genera el sistema antimicrobiano "lactoperoxidasa", sin embargo a pesar de su potencial en la preservación, es reconocida la poca viabilidad de este compuesto en los alimentos, ya que puede tener efectos perjudiciales en su calidad organoléptica causando rancidez de las grasas y reacciones de decoloración y enverdecimiento^{14,17,18,20,21}.

Los ácidos orgánicos mayoritarios (láctico y acético) generados como consecuencia del metabolismo fermentativo de las hexosas se han considerado los principales responsables del efecto inhibitor de cepas del género *Bifidobacterium* frente a patógenos gastrointestinales, como *Helicobacter pylori* y *S. entérica*. Los ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) generados a partir del metabolismo de polisacáridos no digeribles en la parte alta del tracto gastrointestinal (prebióticos) por este grupo bacteriano también contribuyen a la reducción del pH en el colon, inhibiendo así su colonización por bacterias patógenas²¹.

En los últimos años se han identificado y caracterizado diversos **péptidos antimicrobianos** denominados **bacteriocinas** los cuales en su mayoría son producidos por BAL. Los beneficios de éstas en salud humana y animal están bien documentados: presentan varias características y ventajas que las hacen particularmente atractivas: un espectro de inhibición específico, un sistema de autorregulación, estabilidad y procesos de producción costo – efectivo y el consumo en forma segura por los humanos por muchos siglos²².

El modo de acción de las bacteriocinas de bacterias lácticas es la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles^{23,24}. Este proceso induce la disipación de la fuerza motriz protónica. La formación de poros y la eliminación de la fuerza motriz protónica (fuente de energía celular) promueven la salida rápida de metabolitos de pequeño tamaño, como aminoácidos y nucleótidos, interrumpiendo los procesos de biosíntesis de la célula; además, de la formación de poros, para ciertas bacteriocinas se ha descrito la lisis celular como modo de acción secundario^{15,25}.

La capacidad bactericida de las bacterias probióticas sobre agentes patógenos presentes en alimentos ha sido abarcada en distintas investigaciones, pero no el sobrenadante producto del crecimiento de estas bacterias. Entonces evaluar el sobrenadante obtenido durante las incubaciones del cultivo de *B. animalis lactis* podría resultar efectivo y ser utilizado como conservante de los alimentos que son almacenados en condiciones de refrigeración, como una medida preventiva para controlar el crecimiento de microorganismos contaminantes y evitar la propagación de patógenos. En tal sentido, la presente investigación estuvo dirigida a determinar: (i) el efecto del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, en condiciones de refrigeración, (ii) estadísticamente si hay o no diferencia significativa entre el efecto del sobrenadante de *B. animalis lactis* con el medio MRS a pH 7.0 respecto a la supervivencia de *S. typhi* en condiciones de refrigeración y (iii) estadísticamente si hay o no diferencia significativa entre el efecto del sobrenadante de *B. animalis lactis* con el medio MRS a pH 4 respecto a la supervivencia de *Salmonella typhi* en condiciones de refrigeración.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos

- Cultivo de *Salmonella typhi*, proporcionado por el laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo.
- Cultivo liofilizado de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, comercializado por la empresa Sacco, S.A Italia.
- Sobrenadante obtenido de *B. animalis* subsp. *Lactis* en medio Man Rogosa Sharpe (MRS).

Reactivación y obtención de biomasa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Se pesó 0.1 g del cultivo liofilizado y se añadió en 4 mL de caldo MRS; luego se incubó en una jarra con tapa hermética, en condiciones de microaerobiosis a 37°C durante 72 h. Posteriormente las colonias fueron cosechadas y colocados en un matraz conteniendo 28 mL de caldo MRS y se incubó en condiciones de microaerobiosis a 37°C durante 72 h. Finalmente, se cosechó toda la biomasa en solución salina fisiológica estéril (SSFE) y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min¹⁰.

Inoculación y obtención del sobrenadante del cultivo de *B. animalis lactis*

La biomasa obtenida anteriormente, se inoculó en 100 mL de caldo MRS, y se incubó por 15 h a 37°C en microaerobiosis. Terminado el periodo de incubación, se centrifugó el caldo a 4000 rpm durante 15 min. Luego se filtró el sobrenadante por el método de filtración de membrana empleando una membrana filtrante bacteriológica de 0.45 micras de diámetro¹⁰.

Reactivación y estandarización del inóculo de *Salmonella typhi*.

A partir del cultivo puro, conservado en congelación, se sacó una asada y se sembró en 3 mL de caldo nutritivo, y se incubó a 37°C durante 24 h, en condiciones de aerobiosis. Luego se preparó una suspensión bacteriana en SSFE a una turbidez equivalente al tubo N° 1 del nefelómetro de Mac Farland (3x10⁸ células/mL), que fue considerado como inóculo¹⁰.

Efecto del sobrenadante del cultivo de *B. animalis* sobre la supervivencia de *S. typhi*.

Se prepararon tres sistemas de ensayo:

Sistema 1: 9 mL Caldo MRS a pH 7

Sistema 2: 9 mL Caldo MRS a pH 4

Sistema 3: 9 mL del sobrenadante obtenido de *B. animalis lactis*

Luego se agregó 1 mL de inóculo de *S. typhi*, a cada sistema y se incubó a condiciones de refrigeración durante 24 h. A la 0 h, se extrajo 0.5 mL del sistema de evaluación, se hicieron diluciones en SSFE, y se sembró 1 mL en placas, mediante la técnica de incorporación en agar nutritivo; seguidamente, se incubó a 37°C durante 24 h. Se sembró las tres últimas diluciones. Cada uno de los sistemas se evaluó cada tres horas hasta completar las 24 h. Finalmente, se realizó el recuento de colonias y se expresó en UFC/mL¹⁰.

Análisis de datos

El crecimiento promedio (UFC/mL) de *S. typhi* en placa, durante las 24 h de incubación, en cada uno de los sistemas de ensayo, se registró y se presentó en una figura, al mismo tiempo que se aplicó el análisis de varianza a los datos obtenidos^{10,20}.

RESULTADOS

Se observó que la supervivencia de *S. typhi* evaluada en el sobrenadante del cultivo de *B. animalis lactis* con pH 4, que disminuyó en seis logaritmos en relación al recuento inicial, al igual que en caldo MRS a pH 4, por lo que no hay diferencia significativa entre estos dos medios, pero al evaluar la supervivencia de *S. typhi* en caldo MRS, en esta solo disminuye dos logaritmos, por lo tanto aquí si hay diferencia significativa (Fig. 1).

DISCUSIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos con gran capacidad antagónica contra otros microorganismos; siendo de gran interés, ser utilizados como bioconservantes naturales, y disminuyendo en parte el uso de conservantes químicos en los alimentos¹³. Los mecanismos de defensa de bacterias probióticas en contra de diversos tipos de microorganismos patógenos que atacan a individuos, aún sigue siendo un tema muy complejo, lo cual ha motivado que el mundo científico se

interese por conocer con mayor detalle el modo de acción de las bacterias ácido lácticas y de sus metabolitos sobre los microorganismos patógenos^{13,26}. Según Gutiérrez y cols., las cepas de *B. animalis* son consideradas probióticas y producen numerosas sustancias microbianas específicas como ácido láctico y bacteriocinas, entre otras que les confiere su capacidad bactericida; sobre diferentes cepas de bacterias gran negativas^{10,13}.

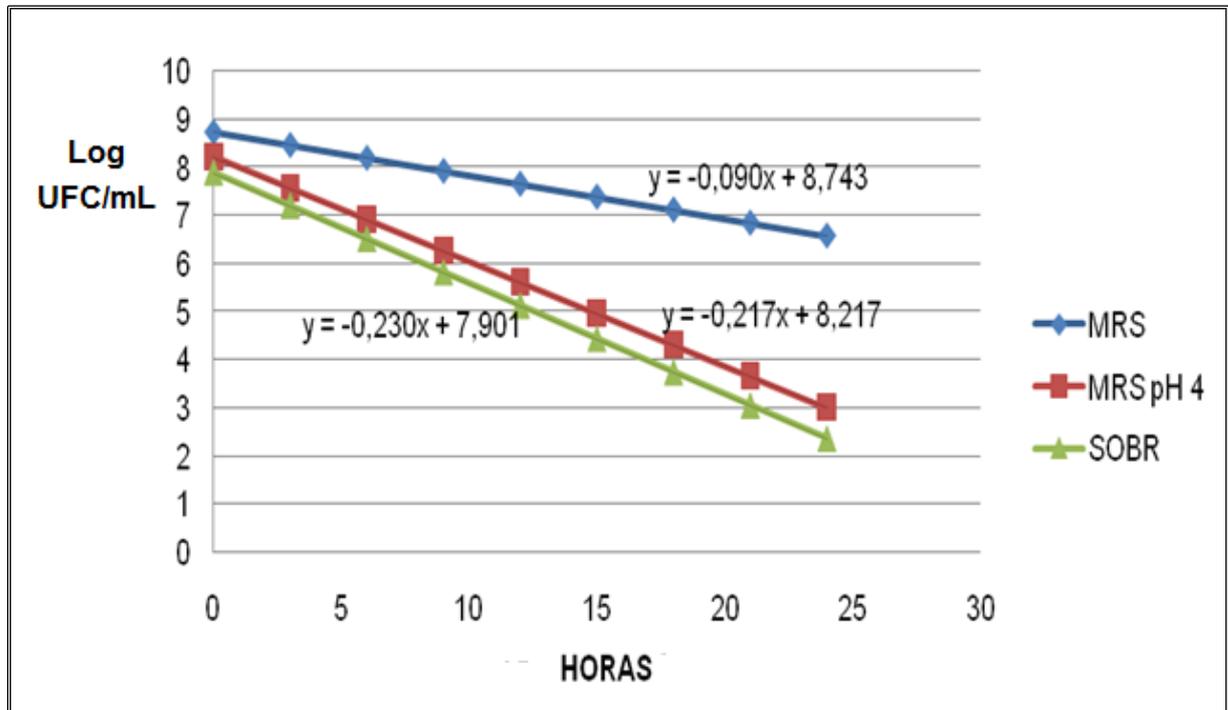


Fig 1. Curvas de supervivencia de *Salmonella typhi* en caldo MRS pH 7, en caldo MRS pH 4, y en sobrenadante de cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis*.

Con los resultados obtenidos, se determinó que los productos metabólicos de *B. animalis* subsp. *Lactis* excretados al medio de cultivo presentaron actividad antagónica “in vitro” contra *S. typhi*. Es probable que esta actividad se deba a la producción de sustancias bactericidas específicas contra Gram negativas, las cuales solubilizan el lipopolisacárido y destruyen la membrana citoplasmática vaciando su contenido celular, de esta manera generan inhibición parcial o total de estos microorganismos¹⁵. Al evaluar los productos metabólicos de *B. animalis* subsp. *Lactis* se observa disminuciones logarítmicas significativas de la población de *S. typhi* en los diferentes sistemas de ensayo. El descenso de la población de *S. typhi* durante el proceso podría estar relacionado a la acidez del medio, ya que al evaluar la disminución de la población en el sobrenadante y en el caldo MRS a pH 4 no presenta una diferencia significativa ($p > 0.05$).

Durante la producción de probióticos o alimentos funcionales con bifidobacterias, la viabilidad de las bacterias patógenas se ve afectada por la acidez del medio de cultivo¹⁸. El sobrenadante y el caldo MRS a pH 4 presentaron actividad de inhibición frente a *S. typhi* indicando que la acción inhibitoria podría ser debida a los ácidos orgánicos producidos por *B. animalis*; estos ácidos orgánicos mayoritarios generados como consecuencia del metabolismo fermentativo de las hexosas (láctico y acético) se han considerado los principales responsables del efecto inhibitorio de cepas de *Bifidobacterium* frente a patógenos gastrointestinales como *Salmonella*¹⁹.

La disminución de la población de *S. typhi*, en el sistema inoculado con el sobrenadante, pone en evidencia que fueron excretados los productos metabólicos de *B. animalis* subsp. *Lactis*, entre ellos las bacteriocinas, que podrían tener efecto inhibitorio o bactericida sobre el crecimiento de *S. typhi*. En este sentido, algunos autores han considerado que el espectro de inhibición de estas proteínas es reducido, generalmente sobre microorganismos relacionados taxonómicamente, de forma que presentan actividad bactericida solamente frente a cepas sensibles¹⁷. La producción de bacteriocinas

con un espectro de inhibición relativamente amplio es propia de bacterias de origen alimentario incluidas la carne y sus derivados²⁷. Al respecto, Vásquez y cols, midiendo el efecto del extracto crudo de bacteriocinas sobre las características microbiológicas y sensoriales de *Longissimus dorsi* (solomo redondo) empacado al vacío, encontraron que la eficacia de las bacteriocinas sobre un microorganismo depende del número de microorganismos existentes a inhibir y de la concentración de la bacteriocina. Además, no siempre una buena condición de crecimiento del microorganismo significa una buena producción de bacteriocinas; así mismo, no siempre una bacteriocina es activa in vitro¹⁷.

Con el análisis de los resultados, en relación al sobrenadante obtenido de *B. animalis* subsp. *Lactis*, supone que dicha disminución logarítmica de las bacterias *S. typhi* fueron disminuyendo por la presencia de otros parámetros y de las condiciones que se encontrarían en el sobrenadante. Por lo que, Gutiérrez y cols (2005) mencionan que trabajos previos de Reddy et al., 1984; Abdel-Bar; Harris y Rill, 1987 demostraron que a un pH 5.5, se presenta un mejor nivel de inhibición de los productos metabólicos de *B. animalis*¹⁶, aunque a pH de 3.5 y 4.5 también se encontró actividad bactericida lo que concuerda con el resultado, mostrados en la Fig. 1, en caldo MRS a pH 4 y del sobrenadante, en donde no se encontró diferencia significativa entre los resultados obtenidos. Por su parte, Larrea y cols.²⁰ encontraron que *B. animalis* presenta actividad antimicrobiana frente a *S. typhi*, utilizando la técnica de difusión en pocillos y obtiene solo resultados cualitativos.

El análisis estadístico de los recuentos promedios de las colonias sobrevivientes de *S. typhi* sembrado en caldo MRS y en el sobrenadante del cultivo de *B. animalis* subsp. *Lactis* con pH 4; obteniéndose resultados que confirman que el sobrenadante está ejerciendo un efecto bactericida contra *S. typhi* y nos muestra que existe diferencia significativa al comparar los resultados de estos medios. De igual forma, el análisis estadístico hecho a los recuentos promedios de las colonias sobrevivientes de *S. typhi* sembrado en caldo MRS a pH 4 y en el sobrenadante del cultivo de *B. animalis* subsp. *Lactis*, con pH 4; obteniéndose resultados que nos muestran que no existe diferencia significativa al comparar los resultados de estos medios. Cabe indicar que estos medios presentaron efecto bactericida y esto lo podemos observar en los resultados que muestra la Tabla 1.

Cabe resaltar que las condiciones de microaerobiosis son necesarios para que *B. animalis* subsp. *Lactis* pueda reactivarse ya que es una bacteria que crece en estas condiciones, por ello se adecuó un medio en el cual se pueda generar estas condiciones de microaerobiosis^{15,16,17}, por lo que se logró implementar esta condición incubando en una jarra con tapa hermética, adicionando un sobre de alkaetzer en un tubo de ensayo con agua, y se colocó una vela prendida, para así generar un medio de microaerobiosis.

La conservación de los alimentos y la prevención de la ocurrencia de Enfermedades de Transmisión Alimentaria, han motivado que el mundo industrial y el científico se interesen por conocer con mayor detalle el modo de acción de las bacterias ácido lácticas y de algunos de sus metabolitos sobre los microorganismos patógenos, por lo que la investigación confirmó la utilidad de los extractos obtenidos a partir del crecimiento de las bacterias ácido lácticas pueden controlar el crecimiento de las bacterias entéricas como *S. typhi*; al mismo tiempo que, esta información sirve de base para continuar con otros estudios a fin de evaluar su acción frente a otros microorganismos patógenos²⁰.

CONCLUSIONES

- El sobrenadante de *B. animalis* subsp. *Lactis* sí afecta la supervivencia de *S. typhi* en condiciones de refrigeración hasta por 24 h de incubación.
- Existe diferencia significativa entre el efecto del sobrenadante de *B. animalis* subsp. *Lactis* con el medio MRS pH 7 respecto a la supervivencia de *S. typhi* en las condiciones de ensayo.
- No existe diferencia significativa entre el efecto del sobrenadante de *B. animalis* subsp. *Lactis* con el medio MRS a pH 4 respecto a la supervivencia de *S. typhi* en las condiciones de ensayo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gutiérrez-Ramírez L, Gómez-Espina A, Arias-Jaramillo L, Tangarife - Patiña B. Evaluación de la viabilidad de una capa prebiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. REDALYC. 2007; 4 (2): 37-42.
2. Martins A, Martins F, Gomes D, Elian S, Vieira A, Teixeira M, Cara D, Nardi R, Nicoli J. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. Lactis. Arch Microbiol. 2010;192(12): 995-1003
3. Bustamante P, Mayorga L, Ramírez H, Martínez P, Barranco E, Azaola A. Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica. Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 2006. 37(002): 5-10
4. Cástulo I, Del campo M, Gómez H, Alaníz R. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. REDALYC. 2008; 6(5): 1-17.
5. Amores R, Calvo A, Maestre J, Martínez-Hernández D. Probióticos. Rev.Esp. Quimioterapia.2004; 17(2): 131-139.
6. González B, Jiménez Z, Heredia N, Villarreal L, García G, Gómez M. Efecto de microorganismos prebióticos sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var *typhimurium*. REDALYC. 2006; 9(4):365-374.
7. Ferreira F, Marcal A, Duarte R, Nicoli J. Perfil de susceptibilidad de antimicrobiana de *Bifidobacterium bifidum* Bb12 y *Bifidobacterium longum* Bb46. REDALYC. 2001; 1(2):1519-5228.
8. Corrales A, Henderson M, Morales LI. Sobrevivencia de microorganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *bifidobacterium lactis* en helado batido. REDALYC.2007;34(2): 2-5
9. Veiga P, Ann C, Beal C, Michaud M, Delaney M, Dubois A, et al. *Bifidobacterium animalis* subs. Lactis fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes.PNAS.2010;107(42): 18132-18137.
10. Organización Mundial de Gastroenterología. Guías Prácticas: Prebióticos y probióticos 2008. España. Organización Mundial de Gastroenterología. 2008.
11. Castellanos A, Murguía M. Evaluación de un probiótico para el control de salmonella en pollos de engorda en Yucatán. REDALYC.1999;30(3): 243-248
12. Esterso E, Paiba J, Mesquita A. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella enteric* Serovar enteritidis experimental infection in Chickens. Revista Brasileira de Ciencia Avícola. 2007; 9 (1): 69 – 73
13. Gutiérrez - Ramírez L, Acosta - Otálvaro E. Determinación del potencial bactericida in vitro de un callado nativo de *L. casei* frente a *E. coli*. REDALYC. 2008; 5(2): 68-73.
14. Vásquez S, Suarez H, Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. SCIELO. 2009;36(1): 64-71
15. Rojas C, Vargas P. Bacteriocinas: Sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. Tecnología en marchas. 2008; 21(2): 9-16.
16. Gutiérrez L, Estrada A, Montoya O. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. REDALYC. 2005; 58(1):2601-2609
17. Vásquez S, Suarez H, Montoya O. Efecto del extracto crudo de bacteriocinas sobre las características microbiológicas y sensoriales de solomo redondo (*Longissimus dorsi*) empacado al vacío. REDALYC. 2008;16(2): 10-14
18. Mayorga-Reyes P, Bustamante C, Gutiérrez-Nava A, Barranco-Florido E. y Azaola-Espinosa A. Crecimiento, sobrevivencia y adaptación de *Bifidobacterium infantis* a condiciones ácidas. Rev. Mexicana de Ingeniería Química. 2009; 8(3): 259-264
19. Sanz Y, Collado M, Dalmau J. Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC). Unidad de Nutrición y Metabolopatías. Hospital Infantil La Fe. Valencia. Acta Pediatra Esp. 2006; 64: 74-78
20. Larrea H, Flores M, Huapaya J. evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I. REDALYC. 2007
21. Lee J, O'Sullivan D. Genomic insights into bifidobacteria. Microbiology and molecular biology. 2010; 74(3): 378-416
22. Coventry M, Gordon J, Alexander M, Hickey M, Wan J. A food-grade process for isolation and partial purification of Bacteriocins of lactic acid bacteria that uses Diatomite calcium silicate. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62(5): 1764-1769
23. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. J Mol Microbiol Biotechnol 2007;13:194-199

24. Monroy-Dosta M, Castro-Barrera T, Fernández-Perrino F, Mayorga-Reyes L. Bacteriocinas producidas por bacterias prebióticas. 2009
25. Ralph J, Tagg J, Bibek R. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiological Reviews*. 1995; 59(2): 171-200
26. Mejía J, Chacón Z. Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización *in vitro* como potenciales probióticos. *REDALYC*. 2007; 17(2): 178-185
27. Laurencio M, Perez M, Millian G, Rondón A. Actividad probiotica de una mezcla de exclusión competitiva en indicadores microbiológicos en pollos de ceba. *REDALYC*. 2005; 5(1):48-53.



Efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* "in vitro"

Effect of the hydroalcoholic extract of *Punica granatum* on "in vitro" *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* viability

Ruby Bernal Sepúlveda¹, Icela Rodríguez Haro² y Marco Salazar Castillo³

¹Tesista Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT. ³Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. UNT.

RESUMEN

Se determinó el efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto de *Punica granatum* cultivada en Chao (La Libertad, Perú) sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa*. Se trabajó con cinco concentraciones del extracto (500; 250; 125; 62.5, y 31.25 mg/ mL) y Gentamicina como control positivo. El efecto se determinó siguiendo lo propuesto por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): sembrando un inóculo estandarizado con el patrón de turbiedad 0,5 del Nefelómetro de Mac Farland en placas con Agar Mueller Hinton por la técnica placa vertida y a su vez se realizó la Concentración Mínima Bactericida a partir de las concentraciones de: 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 y 0.98 mg/mL, respectivamente, para *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa*. Se observó que a medida que aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico aumenta porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana en el rango de 31,25 a 500 mg/mL. También se demostró que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *S. aureus* y *S. aureus* ATCC 25923 es a partir de la concentración 7,88 mg/mL, mientras que para *P. aeruginosa* es a partir de 31.25 mg/mL del extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *P. granatum*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Punica granatum*, Extracto hidroalcohólico, Actividad antimicrobiana

ABSTRACT

The effect of the concentration of the hydroalcoholic extract of the fruit peel of *Punica granatum* cultivated Chao (La Libertad, Peru) on the viability of *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* was determined. We worked with five concentrations of the extract (500, 250, 125, 62.5, and 31.25 mg / mL) and gentamicin as a positive control. The effect was determined following the proposal of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS): planting a standardized pattern Nephelometer turbidity of 0.5 Mac Farland on Mueller Hinton Agar plates with the poured plate technique and in turn inoculum Minimum Bactericidal Concentration was based concentrations: 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95 and 0.98 mg / mL, respectively, for *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 and *P. aeruginosa*. It was observed that as the concentration increases the hydroalcoholic extract or percent inhibition relative index of antibacterial activity in the range of 31.25 to 500 mg / mL. It was also shown that the Minimum Bactericidal Concentration (CMB) for *S. aureus* and *S. aureus* ATCC 25923 is from the concentration 7.88 mg / mL, whereas *P. aeruginosa* is from 31.25 mg / mL of the extract hydroalcoholic shells ripe fruits of *P. granatum*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Punica granatum*, hydroalcoholic extract, Antimicrobial Activity

INTRODUCCIÓN

Las infecciones comunitarias y nosocomiales siguen constituyendo una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial, a ello se ha sumado la aparición de nuevas enfermedades de origen bacteriano, viral y micótico; tales como, las ocasionadas por *Legionella pneumophila*, *Campylobacter*, *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae*, estafilococo dorado meticilinorresistente (MRSA), virus influenza H5N1 de la gripe aviar de humanos, entre otros¹.

Staphylococcus aureus es un patógeno que causa infecciones de diversa gravedad en niños y adultos, su frecuencia es alta y se estima en 28,4 casos por cada 100.000 personas de todas las edades^{2,3,4}; causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas (como osteomielitis y endocarditis), infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales^{5,6}. Aproximadamente el 15 % de los adultos sanos son portadores de *S. aureus* en la nasofaringe, aunque se ha descrito una incidencia más elevada en los pacientes hospitalizados, el personal sanitario, los sujetos aquejados de enfermedades eccematosas de la piel y aquellos que utilizan frecuentemente agujas, ya sea de forma ilegal (por ejemplo drogodependientes) o por motivo médicos (por ejemplo pacientes con diabetes insulino dependiente)⁷.

De amplia distribución en suelo, materia orgánica en descomposición, vegetales, agua y ambientes hospitalarios, *Pseudomonas aeruginosa* es otro agente etiológico de suma importancia ya que puede provocar infecciones graves como: bacteriemias, neumonía, infecciones del sistema nervioso central, infecciones del tracto urinario, infecciones cutáneas en pacientes quemados e infecciones gastrointestinales^{8,9}. Son llamadas bacterias oportunistas y son causantes más frecuentes de las infecciones nosocomiales, debido que presentan resistencia, aunque la resistencia a los antibióticos es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, ciertos factores también contribuyen al aumento de la expresión y diseminación de esta característica inherente¹⁰. Son múltiples los factores que originan este problema; sin embargo, el factor más importante es probablemente el uso excesivo e inapropiado de antibióticos a nivel nosocomial ante el temor de estar ante una cepa resistente y por haberse incrementado el número de pacientes inmunocomprometidos, con enfermedades críticas, pacientes debilitados o ancianos¹¹. La aparición de cepas resistentes trae como consecuencia el incremento en la morbimortalidad, la disminución del número de antimicrobianos disponible para el tratamiento de las infecciones, prolongación de la estadía hospitalaria y aumento del gasto hospitalario, lo que hace necesario la búsqueda de nuevas opciones o alternativas terapéuticas^{12,13}.

Frente a ello, cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales de forma tal que la etnobotánica y la fitoterapia están tomando un gran auge en el mundo actual, tanto en la medicina aplicada como en la investigación experimental, a tal punto que el 80 % de la población mundial, aproximadamente unos cuatro mil millones de personas, utiliza a las plantas como principal remedio medicinal en muchas de sus enfermedades¹⁴. Un gran porcentaje de los “principios activos” están presentes en extractos y en aceites esenciales que pueden obtenerse a partir de hojas, bulbos, rizomas y frutos y contienen: alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, gomas, resinas y taninos, etc., que pueden ser letales para las células microbianas (bacterias, levaduras y mohos) o simplemente servir como inhibidores de sus actividades metabólicas^{15,16,17,18}. Así, se ha demostrado la actividad antibacteriana de los extractos de frutas de *Citrus reticulata*, *C. paradise*, *Mangifera indica*, *C. sinensis*, *Psidium guajava*, *C. grandis* y *C. aurantifolia* frente a cepas Gram negativas y Gram positivas de bacterias^{20,21,22}.

Originaria del medio oriente y de la región mediterránea, *Punica granatum* (granada) es una planta medicinal cuyo fruto posee propiedades terapéuticas^{23,24}, es cultivada en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo²⁵, en Perú se cultiva en Ica, Lima, La libertad, Tacna, Moquegua y Lambayeque^{26,27,28}. El uso popular extendido de esta planta le ha otorgado propiedades útiles para la medicina; las semillas son demulcentes, la corteza y las flores se preparan para eliminar la tenia y como vermífugo en general, las flores y las cascarras del fruto se usan como astringentes y para descargar crónicas de moco, hemorragias pasivas, enfermedades de la boca, sudor de noche, diarreas y diabetes, en el caso particular del pericarpio del fruto se emplea en diferentes preparados para tratar úlceras pépticas, lepra, inflamación, como abortivo, anticonceptivo, trastornos del tracto respiratorio, urinario y gastrointestinal^{29,30}.

Considerando que los productos naturales constituyen una alternativa para las industrias químicas y farmacéuticas para obtener medicamentos que puedan combatir diversas enfermedades infecciosas y dado que nuestro país posee una variedad de plantas medicinales, entre ellas *P. granatum*, se propuso la presente investigación para determinar el efecto, a través del índice antibacteriana y la concentración mínima bactericida, del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto maduro sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* ATCC25932 y *Pseudomonas aeruginosa* “in vitro”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio.

- Frutos maduros de *Púnica granatum* L. “granada”, recolectados en el Distrito de Chao, Provincia de Virú, Departamento de la Libertad, Perú.
- Cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* proporcionados por el laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo (Trujillo, Perú).

Obtención del extracto hidroalcohólico de la cáscara de los frutos maduros de *Púnica granatum*

Las plántulas, ramas, flores y frutos de *P. granatum* recolectadas fueron identificadas en el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo. Se seleccionaron aproximadamente 2 Kg de frutos maduros, los que fueron lavados con agua destilada, luego se retiró la materia comestible a fin de obtener la cáscara, la cual fue cortada en trozos y secada en estufa, a una temperatura de 40 ° C. Los trozos fueron pulverizados en un molino de cuchillas hasta obtener un polvo fino por tamizaje³¹.

El extracto hidroalcohólico se obtuvo a partir de 150g del polvo fino obtenido, mediante el método de maceración³² en 500 mL de alcohol etílico al 70% durante 8 días en oscuridad, con agitación diaria (5 minutos). Al término de este tiempo se realizó la extracción en caliente por reflujo continuo por 2 horas, luego se filtró en caliente para obtener un líquido que fue llevado a sequedad en rotavapor; obteniéndose un residuo que constituyó el extracto hidroalcohólico; a su vez se le protegió de la luz con papel de aluminio y se guardó en refrigeración a 4°C, hasta su posterior uso.

Preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico.

Se tomó 3g de extracto y se disolvió en 3mL de agua destilada estéril, a partir de esta solución se realizaron diluciones decrecientes (factor de dilución 2) establecido por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), a fin de obtener las concentraciones de trabajo, que fueron 500, 250, 125, 62.5, 31.25 mg/ mL respectivamente^{33,34,35}.

Activación de los cultivos y pruebas de pureza para *S. aureus*

Los cultivos de *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* se sembraron en tubos de ensayo conteniendo Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)³⁶ para su reactivación, y se incubaron a 37 °C por 20-24 horas. Las pruebas de pureza usadas fueron:

- Crecimiento en agar Baird-Parker.

A partir de los cultivos reactivado se realizaron siembras en Agar Baird-Parker³⁶ para comprobar la pureza y se incubaron a 37 °C por 48 horas, luego de lo cual se obtuvo el crecimiento de colonias negras, por la reducción del potasio telurito a telurio, rodeadas de un halo de transparencia debido a la actividad lecitinasa. Se tomaron colonias aisladas y se sembró en Agar nutritivo inclinado.

- Prueba de la coagulasa.

A los cultivos de *S. aureus* obtenidos se les realizó la prueba de la coagulasa³⁷, se agregó 0.5 mL de plasma de conejo y 50µL de cultivos sembrados previamente en caldo BHI de 18 horas de incubación se hizo una suspensión y se llevó a incubar a 37°C. Se observó cada media hora durante las cuatro primeras horas, la formación del coágulo que indica una prueba positiva.

- Tinción de Gram.

A los cultivos evaluados se les tiñó según la técnica de Gram³⁸, observándose células en forma de cocos coloreadas de color azul oscuro o violeta con su respectiva agrupación característica racimos.

Pruebas de pureza para *P. aeruginosa*.

- Crecimiento en Agar Glutamato.

A partir de los cultivos reactivados en caldo BHI se realizaron siembras en Agar glutamato³⁶ para comprobar la pureza y se incubaron a 37 °C por 48 horas, luego de lo cual se obtuvo el crecimiento de

colonias grandes mucoides o secas de color verde oscuro. Se tomaron colonias aisladas y se sembró en Agar nutritivo inclinado.

- Prueba de la oxidasa modificada.

Se utilizan tiras de papel de filtro impregnados con dicloruro de tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo para oxidasa)⁶ en dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO hace que las células sean permeables al reactivo. Se extrae una colonia del medio de crecimiento y se frota en las tiras de papel. La aparición de un color azul púrpura dentro de los 30 segundos constituye una prueba positiva.

- Tinción de Gram.

A los cultivos evaluados se les tiñó según la técnica de Gram, observándose células coloreadas de color rosado en forma de bacilo (Gram negativas)³⁸.

Preparación y estandarización del inóculo bacteriano.

De la placa de cultivo en crecimiento activo (incubado a 37 OC durante 18 horas) con la ayuda de la asa bacteriológica se tomará de 2 a 4 colonias y se inoculó en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar la densidad similar a la turbidez del tubo N° 0,5 del Nefelómetro de Mac Farland (1,5 108 cel/mL)³¹.

Determinación de la capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano.

Se realizó de acuerdo a lo recomendado por el NCCLS, por el método de siembra de los microorganismos en medios de cultivo sólido conteniendo el extracto en estudio³³: en una caja Petri para cada bacteria con un inóculo (1.5x108 cel/mL), determinado por la escala de Mac Farland, se sembró por la técnica placa vertida conteniendo 20 mL de agar Mueller Hinton (aMH) a un pH entre 7.2 a 7.4; después, se abrió cinco pozos con un sacabocados de 6 mm de diámetro y 4 mm de profundidad, se colocó en cada pozo 30µL³¹ de cada uno de las concentraciones del extracto hidroalcohólico determinadas. Se mantuvo las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos, se incubo a 37°C por 18 a 24 horas³⁹.

En una placa independiente después de sembrar en camada¹⁶ se perforó un pozo para el control negativo y en otra placa se colocó el control positivo utilizando disco estándar de gentamicina incubándose a 37°C por 18 horas a 24 horas. Se evaluó el crecimiento de los microorganismos alrededor de cada pozo. La actividad antibacteriana se determinó midiendo tres diámetros de cada halo de inhibición y se tomó como resultado el valor promedio de estas mediciones para calcular el porcentaje de inhibición relativa o índice de actividad antibacteriana, aplicando la siguiente fórmula: Halo del control positivo= Gentamicina, Halo del control negativo = Agua destilada estéril; se realizó controles de viabilidad de cada una de las cepas bacterianas, esterilidad de los extractos y del agua destilada estéril. La prueba se realizó para el extracto y cada una de las bacterias; todos los ensayos se realizaran por duplicado³¹.

Determinación de la Concentración Mínima bactericida.

Se trabajó con las concentraciones de: 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 mg/mL, respectivamente, contenidos en caldo Mueller Hinton (cMH), luego se le agrego 1000 uL de inóculo (1x106cel/mL). Se incubaron a 37oC por 18 horas, y se observó la presencia de crecimiento bacteriano por turbidez. Para determinar el crecimiento bacteriano se sembró una asada en aMH, se incubó 24 horas. (Anexo 20, 21 y 22) Se consideró que la concentración mínima bactericida correspondió a la mínima dilución del extracto hasta el cual no hubo crecimiento bacteriano visible. Se añadió tres sistemas adicionales: control positivo (cMH, extracto + bacteria), control negativo (cMH + bacteria) y uno para el control del extracto (para verificar que el extracto este estéril)³⁴.

Análisis de datos.

La asociación estadística entre el porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto fueron procesados mediante la prueba de Análisis de Varianza Unidireccional (ANOVA), utilizando el paquete estadístico SPSS v. 20.

RESULTADOS

Se encontró que a medida que aumenta la concentración del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto maduro de *P. granatum* el porcentaje de inhibición aumenta y la cepa *S. aureus* tiene mayor porcentaje de inhibición (p<0,05) que *S. aureus* ATCC 25923, mientras que *P. aeruginosa* es la que menos porcentaje de inhibición presenta (Fig. 1).

También se encontró que la concentración mínima bactericida de *S. aureus* y *S. aureus* ATCC 25923 es a partir de la concentración 7,88 mg/mL, mientras que para *P. aeruginosa* es a partir de 31.25 mg/mL del extracto hidroalcohólico: 112.81 102.72 96.53 90.29 75.88 86.67 80.13 71.96 61.88 52.27 85.48 70.47 61.6 52.57 41.57 0 20 40 60 80 100 120 500 mg/mL 250 mg/mL 125 mg/mL 62,5 mg/mL 31,25 mg/mL INHIBICIÓN (%) CONCENTRACIONES *S. aureus*, *S.aureus* ATCC 25923 *P. aeruginosa* (Tablas 1, 2 y 3).

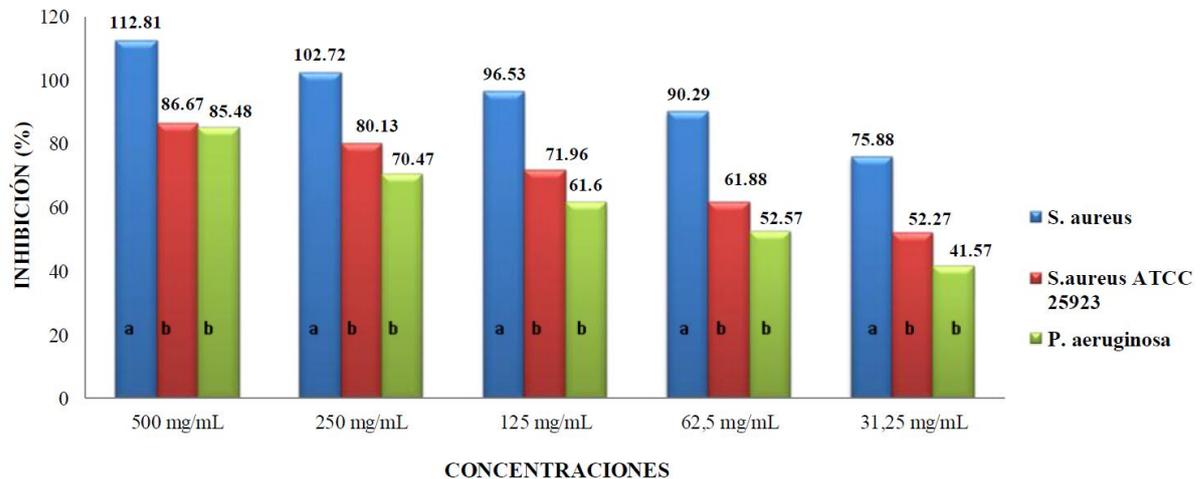


Fig. 1. Porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum L.* (granada) sobre la cepa de *S.aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa*. **a:** $p < 0.05$; **b:** $p > 0.0$

Tabla 1. Concentración mínima bactericida de *Staphylococcus aureus*, a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *Punica granatum L.* "granada".

Concentración Mínima Bactericida de <i>Staphylococcus aureus</i>										
Concentración del extracto hidroalcohólico de las cáscaras del fruto maduro de <i>Punica granatum L.</i> (mg/ml)										
Ensayos	62.5 (1)	31.25 (2)	15.75 (3)	7.88 (4)	3.94 (5)	1.97 (6)	0.98 (7)	Control positivo* (CP)	Control negativo** (CN)	Control del Extracto*** (C.E)
1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
2	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
4	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
5	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
6	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
7	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-

* caldo MH, extracto y bacteria;

** caldo Mueller Hinton inoculado con bacteria. *** caldo Mueller Hinton más el extracto

(+): Crecimiento

(-): No crecimiento.

Tabla 2. Concentración mínima bactericida de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de cascaras de frutos maduros de de *Punica granatum L.* "granada".

Concentración Mínima Bactericida de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923										
Concentración del extracto hidroalcohólico de las cascaras del fruto maduro de <i>Punica granatum L.</i> (mg/ml)										
Ensayos	62.5	31.25	15.75	7.88	3.94	1.97	0.98	Control positivo*	Control negativo**	Control del Extracto***
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(CP)	(CN)	(C.E)
1	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
2	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
3	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
4	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
5	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
6	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
7	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-

* caldo MH, extracto y bacteria ** caldo Mueller Hinton inoculado con bacteria. *** Caldo Mueller Hinton más el extracto

(+): Crecimiento

(-): no crecimiento.

Tabla 3. Concentración mínima bactericida de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de cascaras de frutos maduros de de *Punica granatum L.* "granada".

Concentración Mínima Bactericida de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>										
Concentración del extracto hidroalcohólico de las cascaras del fruto maduro de <i>Punica granatum L.</i> (mg/ml)										
Ensayos	62.5	31.25	15.75	7.88	3.94	1.97	0.98	Control positivo*	Control negativo**	Control del Extracto***
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(CP)	(CN)	(C.E)
1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
3	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
4	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
5	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
6	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
7	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-

* caldo MH, extracto y bacteria ** caldo Mueller Hinton inoculado con bacteria. *** caldo Mueller Hinton más el extracto

(+):crecimiento

(-): no crecimiento.

DISCUSIÓN

Por muchos años, la medicina ha dependido del uso exclusivo de hojas, flores y cortezas de las plantas; solo recientemente se han generado estudios referentes al uso medicinal de los frutos y las cascaras de estos²⁰. Los frutos maduros de *P. granatum* constan de tres partes, las semillas, el jugo y el pericarpio incluyendo las membranas internas²⁴ en la medicina tradicional se le usa para la colitis, diarreas, flatulencias, tratamientos de las inflamaciones de las encías , garganta y su propiedad fundamental es la de vermífuga²⁸.

Debido a estos inicios se tomó un interés en el fruto maduro de *P. granatum* especialmente por la cáscara. En relación al efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de cáscaras del fruto maduro de *Punica granatum L.* sobre la cepa *S. aureus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* en la Fig. 1 se puede observar que hay un porcentaje de inhibición o índice de actividad antibacteriana afectando la viabilidad de dichas cepas. Esto se debe que al extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *Punica granatum L.*, que viene hacer una combinación de (alcohol y agua) además de ser menos costoso y tóxico que otros solventes orgánico, permite extraer metabolitos con polaridad intermedia y alta⁴⁰ pudiendo explicarse sobre la base de la diferencia de polaridades entre ambos solventes lo cual, a su vez implica una diferencia en las naturalezas químicas y concentraciones de los principios activos que cada uno de ellos es capaz de extraer de la cáscara del fruto cuando se obtienen los extractos; a la vez que el agua posee una polaridad considerablemente mayor que el alcohol lo cual determina un mayor poder de extracción para compuestos polares como los taninos y otros compuestos con funciones químicas de naturaleza oxidante.

Debido a esto el extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *P. granatum* presenta principios activos como los taninos, flavonoides, antocianinas, saponinas, principios amargos y astringentes entre otros que se puede corroborar con trabajos realizados por Peña en el 2008 donde realizo la estandarización y tamizaje fitoquímica de extractos de frutos de *P. granatum* y a su vez se determinó de forma cualitativa la presencias de algunos de estos componentes en el extracto de estudio.

Los taninos son sustancias complejas que se presentan como mezclas de polifenoles difíciles de separar. Los taninos pueden ser tóxicos a hongos filamentosos, levaduras y bacterias⁴¹. Por lo tanto, existen tres hipótesis en cuanto a su mecanismo de acción: la inhibición de enzimas de microorganismos, ligándose como sustrato a esas enzimas; a través de su acción sobre la membrana celular, modificando su metabolismo, y por la complementación de los taninos en los iones metálicos, disminuyendo estos iones esenciales para el metabolismo de los microorganismos. Además los taninos precipitan proteínas formando una capa protectora sobre la mucosa y piel inflamada disminuyendo así el proceso inflamatorio⁴². Además se clasifican en taninos hidrolizables y condensados, lo cual los taninos hidrolizables están constituido por unidades de ácido elálgico que es un compuesto estable y con demostradas propiedades benéficas para la salud humana incluyendo efectos antivirales, antibacterianos, y antioxidantes⁴³.

Los flavonoides son estructura fenólicas que contienen un solo grupo carbonilo; tiene la capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, así como una actividad sobre la pared celular, actuando posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los poli péptidos de la pared celular y sobre enzimas unidas a las membranas⁴⁴, esto explicaría el mecanismo de acción de varios de sus efectos farmacológicos. Dentro de los acciones biológicas que se les atribuyen a los flavonoides se encuentra actividades antibacterianas, anti fúngicas, antivirales y antiparasitarias²⁰. Las saponinas provocan una gran disrupción de membranas, con efecto de lisis, no activos sobre todo a pH ácido⁴⁵.

En las Fig. 1 se presenta el porcentaje de inhibición o índice de actividad antibacteriana a la concentración (500 mg/ml); se observa que *S. aureus* presenta un porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana de (112,81%) en comparación a *S. aureus* ATCC 25923 que presenta (86.67%) y *P. aeruginosa* que presenta (85.48%), observándose que el mayor porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana lo presenta *S. aureus* con una diferencia significativa con respecto a las otras cepas a: $p < 0.05$. Se puede inferir que la actividad antibacteriana que presenta el extracto hidroalcohólico de cáscaras de la granada se le puede atribuir la presencia de sus metabolitos, siendo mucho más efectivo contra las bacterias Gram positivas que gram negativas; Esto se debe a que hay una mayor sensibilidad de las bacterias gram positivas que las gram negativas podría ser atribuido a diferencia en sus constituyentes en la membrana celular y su disposición^{46,47}. Las bacterias Gram positivas contienen una capa externa de peptidoglucano que es una barrera de permeabilidad efectiva por otro lado las bacterias Gram negativa como presenta una resistencia debido a la membrana externa fosfolipídicas que presenta componente lipolisacáridos estructurales que hacen impermeables a los solutos lipófilicos y las porinas q constituyen una barrera selectiva a los solutos hidrofílicos⁴⁷ y además que los compuestos fenólicos desnaturalizan enzimas, pero también pueden unirse a sustratos tales como minerales , vitaminas y carbohidratos impidiendo que estén disponibles para los microorganismos⁴⁸.

Se encontró que el extracto hidroalcohólico de frutos maduros de la granada tiene un efecto bactericida sobre las tres poblaciones, lo cual se evidencia en la ausencia de crecimiento de esas bacterias; se determinó que a partir de las concentraciones 7.88mg/ml la falta de crecimiento es total y que a las concentraciones de 3.94mg/ml se aprecia crecimiento en los ensayos para ambos *S. aureus*. Con respecto a *P. aeruginosa* el extracto tiene un efecto bactericida a la concentración de 31.25 mg/mL y a partir de la concentración 15.75mg/ml se observa crecimiento en placa. En general la actividad antimicrobiana se le atribuye a los principios activos que tiene este extracto que ya ha sido mencionado al inicio.

CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de cáscaras de frutos maduros de *Punica granatum* L. afecta la viabilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa*.
- El porcentaje de inhibición relativo o índice de actividad antibacteriana está en relación directa a la concentración del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* L.
- Que el extracto hidroalcohólico tuvo mejor efecto para *Staphylococcus aureus* presentando estadísticamente diferencia significativa con respecto a las otras cepas evaluadas.
- La concentración mínima bactericida, tanto para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, es de 7.88mg/mL del extracto hidroalcohólico.
- La concentración mínima bactericida para *Pseudomonas aeruginosa* es de 31.25 mg/mL del extracto hidroalcohólico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez M, Batlle M, Verdera J, Llop A. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística. Rev Cubana Med Trop. 2006; 58(3):207-11.
2. Lebeque Y, Morris H, Calás N. Infecciones Nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Cubana Med.2006; 45(1).
3. Paganini H, Verdaguer V, Rodríguez A, Della P, et al. M. Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en niños provenientes de la comunidad de niños de la Argentina. Arch Argent Pediatr.2006; 104(4):293-298.
4. Bustos J, Hamdan A, Gutiérrez M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomédica.2006; 17:287-305.
5. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico.5a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1999.
6. Sandoval C, Moreno C, Abarca K. Sepsis por *Pseudomonas aeruginosa* en un lactante previamente sano. Rev Chil Infect.2011; 28(6):592-596.
7. Zambrano A, Herrera N. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas la *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el laboratorio del hospital regional Dr. Leonardo Guzmán de Anfogasta, Chile Rev Chil Infect.2004; 21(2):117-124.
8. Cabrera C, Fabián R, Zuñiga A. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Rev Colomb Med.2007; 38(2):149-158.
9. Avellaneda Y, Pecho E. Estudio de la resistencia a los antibacterianos en el centro médico naval de Enero a Diciembre del 2000. (Tesis).Lima .Universidad Mayor de San Marco: 2002.
10. Zampini I,Cudmani N, Isla M.Actividad antimicrobiana de plantas medicinales sobre bacterias antibiótico-resistentes. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.Universidad Nacional de Tucumán.Argentina. Rev Argentina 2007; 41.
11. Mendoza C, Moreno M, Weil M, Elango F. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de *Phytophthora palmvora* Butl y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz).Tierra Tropical. 2007; 3(1)81-89.
12. Pérez J; Isaza G, Acosta S. Actividad antibacteriana de extractos de *Phenax rugosus* y *Tabebuia chrysantha*. Biosalud.2007;(6):59-68.
13. Madaleno I .Etno-farmacología en Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. Cuadernos geográficos. Universidad de Granada, España 2007; 61-95.
14. Muñoz M. Efecto del extracto Etanólico de hojas *Passiflora foetida* “Granadilla de Culebra” sobre el crecimiento in vitro de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tiphy* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Trujillo.

15. Benítez J, Díaz R, López J, Gajardo S, Kusch F, Rojas M. Actividad antioxidante y antibacteriana de seis cáscaras de frutos del oasis de pica. *Biofarvo*.2011; 19(1):1-7.
16. Cuellar O, Obtención del extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana. Universidad Tecnológica de Pereira.2010
17. Moreno M, Belén D, Sánchez M, Viloria M, García D. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de cáscara de naranja en el aceite de soja desodorizado. *Venezuela* (2004);29(9):532-538
18. Sánchez A. Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el peróxido de hidrógeno. *Rev. Cubana Plant. Med. Cuba* 2005; 10 (2).
19. Gorena T, Sepulveda E, Sáenz C. Compuestos bioactivos y actividad antioxidantes de frutos de “granado” *Punica granatum* l. La alimentación Latinoamericana. Chile 2010; N O285:48-52.
20. Peña B, Morejón Z, García A, Morón F. Estandarización y Tamizaje fitoquímica de extractos de frutos de *Punica granatum* L. *Rev. Cubana Plant Med.*2008; 13(4).
21. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O, Charcape J, Ramirez R. *Plantas Medicinales del Perú*.1ed. Perú. Asamblea Nacional de Rectores; 2011.
22. Ríos ADA. Evaluación de la actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales, usadas en la medicina tradicional mexicana, contra enterobacterias causantes de diarrea y disentería.(Tesis Doctoral).México. Escuela Superior de Medicina.2006.
23. Álvarez M, Isaza G, Echeverry H. Efecto antibacteriano in vitro de *Austroeupeatorium inulaefolium* H.B.K. (*Salvia amarga*) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (*Clavo de laguna*).*Rev Biosalud*.2005;(14):46-55.
24. Lock O. Investigación Fotoquímica- método en el estudio de productos naturales. 3era ed. Lima: Editorial pontificia; universidad católica del Perú; 1994.
25. Corzo a, Bravo E, Serrano F, Vtuone M. Actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Prosopis alba*, Griseb, frente a cepas patógenas humanas y fitopatogenas. *Rev Quebrado*.2009; 17(1,2).106-114.
26. Malbrán C. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas en humanos. Buenos Aires. 2001. (42).
27. Bucay L, Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana de la Violetilla (*Hybanthus parviflorus*). (Tesis Doctoral)9. Riobamba: Escuela superior politecnica de Chimborazo.2009.
28. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3° ed. Edit. Medica panamericana. Argentina. 2003.
29. Edwin E, Sheeja E, Toppo E, Tiwari V, Dutt KR. Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy) *Ars Pharm* .2007; 48 (2): 135-144.
30. Cabrera H, Morón F, Amador M.C.V. Composición fitoquímica de partes aéreas frescas de *Phania matricarioides*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012;17(3):268-278.
31. De la cruz R, Aguilera A, Prado A. Biodegradación Microbiana de Elagitaninos. *Biotecnología*. 2011; 15(3).
32. Araujo J, Salas R. Actividad Antimicrobiana de Plantas. Universidad científica del sur. Perú. 2008.
33. Hernández R. Obtención de crudos de saponinas hipocolesteromizantes del *Chenopodium quinoa* Willd. *Rev Cubana Med Milit* 1997; 26(1):55-62.
34. Samara N, Benites N, Cabezas F. Actividad Antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2011; 9(1): 8-16.
35. Kadi H, Moussaoui A , Benmehdi H, Lazouni H, Benayahia A, Nahal bouderberba N. Antibacterial activity of ethanolic and aqueousextracts of *Punica granatum* L. bark. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011; 1(10): 180-182.
36. Parseh H, Hassanpour S, Emam Z, Shahab A. Antimicrobial properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) as a Tannin rich Fruit: a review. The 1th International and The 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture. Iran.2012.



Efecto de *Rhizobium etli* en el crecimiento de plántulas de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, en condiciones de laboratorio

Effect of *Rhizobium etli* on seedling growth of sugar cane, *Saccharum officinarum*, under laboratory conditions

Nolia Ferrel-Caballero¹ y Bertha Soriano²

¹Tesista Escuela AP de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo, Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología, UNT.

RESUMEN

Se determinó el efecto de *Rhizobium etli* a una concentración de 10^8 UFC/mL sobre el crecimiento de plántulas de *Saccharum officinarum* "caña de azúcar" mediante la medición de: altura de plántulas, longitud de raíz mayor, densidad radicular, peso seco de la parte aérea e índice de efectividad de la inoculación a los 30 y 60 días post-inoculación en condiciones de laboratorio y en tres repeticiones. Se cultivó en suelo agrícola 135 yemas previamente desinfectadas; después de 30 días de crecimiento se procedió a la inoculación, para ello, el cultivo de *R. etli* 188-03 se reactivó en Agar Extracto de Levadura Manitol Rojo de Congo a 28°C por 48 horas y se propagó en Agar Extracto de Levadura Manitol a 28°C por 48 horas. Después se prepararon 30 suspensiones a la concentración de 9×10^8 UFC/mL. Se inoculó 100 mL de suspensión bacteriana a cada plántula de *S. officinarum* entre la raíz y parte del suelo; además, se agregó agua destilada y fertilizante químico "Nutri Sil Premium". Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las cuatro variables agronómicas medidas. Se concluye que, en condiciones de laboratorio, *R. etli* 188-03 presenta un efecto positivo en el crecimiento de plántulas de *S. officinarum* a los 30 y 60 días post-inoculación.

Palabras claves: *Rhizobium etli*, *Saccharum officinarum*, variable agronómica

ABSTRACT

The effect of *Rhizobium etli* at a concentration of 10^8 CFU / mL on seedling growth of *Saccharum officinarum* "sugar cane" was determined by measuring: seedling height, root length increased, root density, dry weight of the part Aerial and effectiveness index inoculation at 30 and 60 days post-inoculation in laboratory conditions and in three replications. In agricultural land was cultivated 135 previously disinfected buds; after 30 days of growth inoculation was made, for it, growing *R. etli* 188-03 was reactivated in Agar Yeast Extract Mannitol Red Congo at 28 ° C for 48 hours and spread on Agar Yeast Extract Mannitol to 28 ° C for 48 hours. After 30 concentration suspensions 9×10^8 CFU / mL were prepared. 100 ml of bacterial suspension was inoculated to each seedling from *S. officinarum* between the root and part of the floor; additional distilled water and chemical fertilizer "Nutri Premium Sil" was added. Statistically significant difference ($p < 0.05$) was found between the four agronomic variables measured. We conclude that, under laboratory conditions, *R. etli* 188-03 has a positive effect on seedling growth of *S. officinarum* at 30 and 60 days post-inoculation.

Keywords: *Rhizobium etli*, *Saccharum officinarum* variable agronomic

INTRODUCCIÓN

La capacidad de varias cepas de *Rhizobium* para promover el desarrollo y crecimiento de diferentes plantas hospederas ha sido ampliamente estudiada en los últimos años con el fin de verificar si la fijación de nitrógeno es factible en plantas no leguminosas^{1,2,3}. En efecto, el beneficio que proporciona *Rhizobium* a leguminosas en términos de fijación biológica de nitrógeno es conocido y se ha verificado que estas bacterias simbióticas tienen el potencial para ser empleadas como promotores de crecimiento de plantas no leguminosas⁴.

El uso de cepas nativas de *Rhizobium* presenta la posibilidad de gestionar la fertilización biológica del cultivo mediante el uso de biofertilizantes, con la finalidad de suplementar el nitrógeno, así como, activar procesos bioquímicos adicionales asociados con otros microorganismos presentes en el suelo^{5,6,7}. De esta forma, se puede incrementar la disponibilidad de otros nutrientes y sustancias promotoras del crecimiento, lo que constituye una alternativa ecológica y económicamente viable⁸.

Se han realizado estudios de aislamiento de *Rhizobium* en plantas no leguminosas como en lechuga, en cuyas semillas se detectó la presencia de microorganismos endófitos fijadores de nitrógeno, lo cual no constituye un hecho aislado, ya que se ha encontrado microorganismos similares en especies tanto agronómicas como silvestres: 853 aislamientos endófitos de plantas de soya, sorgo, trigo y maíz, así como, 27 de especies silvestres^{9,10,11}.

Una de las plantas de más alto rendimiento en biomasa por área y unidad de tiempo es la caña de azúcar, *Saccharum officinarum*; ésta produce el azúcar y es materia prima de alrededor de un centenar de productos derivados de gran valor para el desarrollo humano^{12,13,14}. Además, posee gran adaptabilidad a condiciones adversas del medioambiente, resistente a plagas y fija dióxido de carbono en proporciones comparables a la de los bosques tropicales¹⁵. Las mayores producciones de caña de azúcar se obtienen cuando se aplica una dosis de nitrógeno de 30 días después de la siembra o corte; otros autores indican cuando se aplica dosis fraccionada a los 30 y 60 días post-siembra¹⁶. Sin embargo, al igual que otros cultivos, es atacado por hongos, principalmente miembros del género *Puccinia*^{17,18,19}. La producción nacional proviene de 12 ingenios azucareros que se encuentran distribuidos en Lima, Ancash, Arequipa, Lambayeque y La Libertad²⁰.

Se ha encontrado a microorganismos nitrofixadores en tallos y raíces aéreas de caña de azúcar, aunque se desconoce la magnitud del efecto que provocan²¹. *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium* son los microorganismos que tienen la capacidad de producir y mantener la secreción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas) en la rizosfera, aspecto que abre la posibilidad que puedan ser obtenidas por métodos biotecnológicos y utilizadas como inoculantes para mejorar la producción^{22,23}.

Es conocida la capacidad de las leguminosas para utilizar el nitrógeno del aire a través de la eficiente relación simbiótica que se establece entre estas plantas y las bacterias fijadoras de nitrógeno²⁴. El proceso de colonización de estas bacterias, si bien ocurre de forma natural, en ocasiones no resulta del todo eficiente, lo cual se debe, entre otras causas, a que la carga microbiana en los suelos es muy baja, como producto de la erosión, por ello, en los últimos años se ha incrementado el uso de rizobios como biofertilizantes, ya que son beneficios para las plantas²⁵.

Considerando el gran aporte a la economía nacional que proporciona la caña de azúcar, resulta importante investigar aspectos que mejoren la producción. La presente investigación se diseñó para determinar el efecto de *Rhizobium etli* 188-03, a una concentración de 10^8 UFC/mL, en el crecimiento de plántulas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” en condiciones de laboratorio, a través de la medición de las variables agronómicas: altura de plántulas, longitud de raíz mayor, densidad radicular, peso seco de la parte aérea e índice de efectividad de la inoculación (IEI) expresado en porcentaje.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico:

- Cultivo de *Rhizobium etli* 188-03, procedente del Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo.
- 135 yemas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar”, procedente de San Idelfonso-Virú-La Libertad.
- 1L de fertilizante químico “HOMAI W.P” obtenido de un lote comercial intacto.

Determinación físico-químico del suelo agrícola

El suelo agrícola utilizado fue recolectado del fundo San Idelfonso-Virú-La Libertad, en el mes de noviembre del 2013; con peso de 54kg para las tres repeticiones. Se realizó una caracterización físico-químico en base a los siguientes análisis: pH, materia orgánica (%), nitrógeno (%), potasio (%), fósforo (%), salinidad, humedad (%) y resistividad específica (AnexoN°03). Luego se procedió al tamizaje.

Desinfección de yemas de *S. officinarum* “caña de azúcar”

Las 135 yemas (45 yemas/repeticion) fueron sometidas a un proceso de desinfección que consistió en sumergirlas en una solución de “HOMAI W.P” en el cual su preparación consistía en la proporción 30g/ 20L, durante cinco minutos.

Siembra de yemas de *S. officinarum* “caña de azúcar”

Se procedió a la siembra de las 135 yemas de *S. officinarum* “caña de azúcar” en suelo agrícola (1Kg de suelo /yema) a una profundidad de 20 centímetros aproximadamente, con la finalidad que el suelo cubra totalmente la yema. Luego cada 4 días se procedió a agregarle agua.

Reactivación, evaluación de la pureza y propagación del cultivo de *R.etli* 188-03

Las bacterias de un cultivo se sembraron por agotamiento en placas que contenían ELMARC e incubado a 28°C por 48 horas. A partir del cultivo reactivado se observaron las características macro y micro-morfológicas de las colonias mediante las observaciones típicas y coloración Gram²⁶. A partir del cultivo de *R.etli* 188-03 reactivado, se propagó en siembra por agotamiento en 30 chatas de ron previamente esterilizadas conteniendo medio ELMA y se incubó a 28°C, durante 48 horas.

Preparación de inóculo de *R.etli* 188-03

Se preparó 30 suspensiones en 100mL de agua destilada con el cultivo de *R.etli* 188-03 propagado y se comparó con el tubo número tres del Nefelómetro de Mac Farland (9×10^8 UFC/mL). Luego se realizó el recuento en placa por siembra en superficie, en ELMARC; con la finalidad de corroborar la concentración utilizada en la suspensión. Se contó con un total de 135 plántulas, de las cuales 45 fueron utilizadas por repeticion y de ellas 15 plántulas /tratamiento.

La inoculación se realizó de la siguiente manera:

Grupo 01:

De las 15 plántulas, 5 fueron para la medición inicial (después de 30 días de crecimiento, sin inoculación) y las otras 10 (5 plántulas para la medición a los 30 y 5 plántulas para los 60 días post-aplicación de agua destilada estéril). Se inoculó entre la raíz y parte del suelo, 100 mL de agua destilada estéril/plántula.

Grupo 02:

De las 15 plántulas, 5 fueron para la medición inicial (después de 30 días de crecimiento) y las otras 10 (5 plántulas para la medición a los 30 y 5 plántulas para los 60 post-aplicación de fertilizante). Se aplicó el fertilizante químico “Nutri Sil Premium” (que contiene 33% de nitrógeno) a cada plántula, para lo cual su preparación fue de 10mL de fertilizante/20L de agua destilada.

Grupo experimental:

De las 15 plántulas, 5 fueron para la medición inicial (después de 30 días de crecimiento) y las otras 10 (5 plántulas para la medición a los 30 y 5 plántulas para los 60 post-inoculación bacteriana). Se inoculó entre la raíz y parte del suelo, 100 mL de suspensión bacteriana a una concentración aproximada de 9×10^8 UFC/mL. Luego se realizó el recuento en placa por siembra en superficie, en ELMARC; con la finalidad de corroborar la concentración utilizada en la suspensión. Se realizó por triplicado.

Efecto de la inoculación de *R.etli* 188-03 sobre el crecimiento de *S. officinarum*

El efecto de de *R.etli* 188-03 en el crecimiento de plántulas de caña de azúcar se determinó mediante la evaluación de las variables agronómicas tale como: altura de plántulas, longitud de raíz mayor, densidad radicular, peso seco de la parte aérea e índice de efectividad de la inoculación (IEI) expresado en porcentaje^{27, 28}, mediante la siguiente fórmula.

$$IEI = \frac{(\text{Tratamiento con inoculación} - \text{control sin inoculación})}{\text{Control sin inoculación}} \times 100$$

Recolección de datos y análisis estadístico

Se procedió a la recolección de datos de la siguiente manera: a los 30 días de crecimiento (antes de inoculación de agua destilada estéril, aplicación de fertilizante e inoculación de *R. etli* 188-03), a los 30 y 60 días post-inoculación de agua destilada estéril, post-aplicación de fertilizante y post-inoculación de *R. etli* 188-03. Para ello se evaluó las variables agronómicas anteriormente descritas. Las plántulas fueron lavadas con agua corriente para eliminar los restos del suelo presentes en raíces; se midió la altura de las plántulas, longitud de raíz mayor y densidad radicular. Posteriormente la parte aérea fue separada de las raíces y luego colocada en papel bond; luego se secó en el horno a 60°C por 72 horas y se determinó el peso seco de la parte aérea de la plántula. Los valores obtenidos de la evaluación se organizaron en tablas y figuras.

Los datos encontrados se analizaron por el método estadístico ANOVA, con el propósito de determinar la diferencia significativa entre las variables agronómicas de las plántulas de *S. officinarum* con los controles respectivos.

RESULTADOS

La altura promedio de las plántulas de caña de azúcar a los 30 y 60 días post-aplicación de agua destilada (Grupo 01), fertilizante químico (Grupo 02) y post-inoculación de *R. etli* 188-03 (Grupo experimental), en condiciones de laboratorio, mostró un mayor incremento de la altura promedio de las plantas inoculadas con *R. etli* 188-03 en comparación con el agua destilada y fertilizante químico (Figs. 1 y 2). Los mismos resultados fueron observados para el efecto sobre la longitud promedio de la raíz mayor (Figs. 3 y 4), la densidad promedio radicular de plántulas (Figs. 5 y 6), el peso seco aéreo promedio (Figs. 7 y 8) y el IEI (Fig. 9).

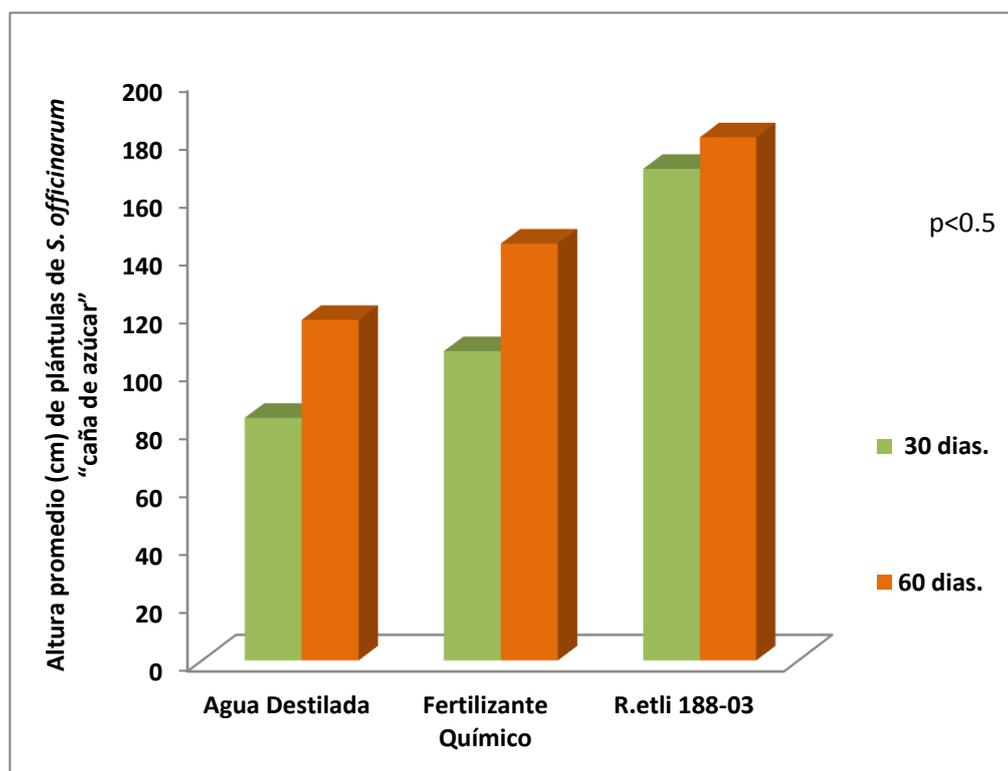


Fig. 1. Altura promedio (cm) de plántulas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” a los 30 y 60 días post-aplicación de agua destilada, fertilizante químico post-inoculación de *Rhizobium etli* 188-03 en condiciones de laboratorio.



Fig.2. Altura de plántulas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” inoculadas con: agua destilada (izquierda), fertilizante químico (centro) y *Rhizobium etli* 188-03 (derecha).

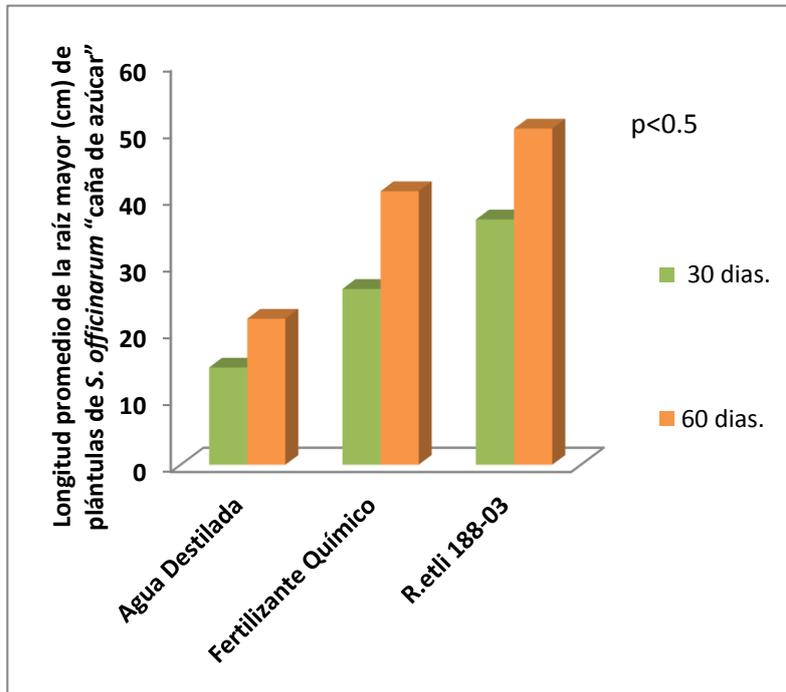


Fig. 3. Longitud promedio de la raíz mayor (cm) de plántulas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” a los 30 y 60 días post-aplicación de agua destilada, fertilizante químico y post-inoculación de *Rhizobium etli* 188-03 en condiciones de laboratorio.

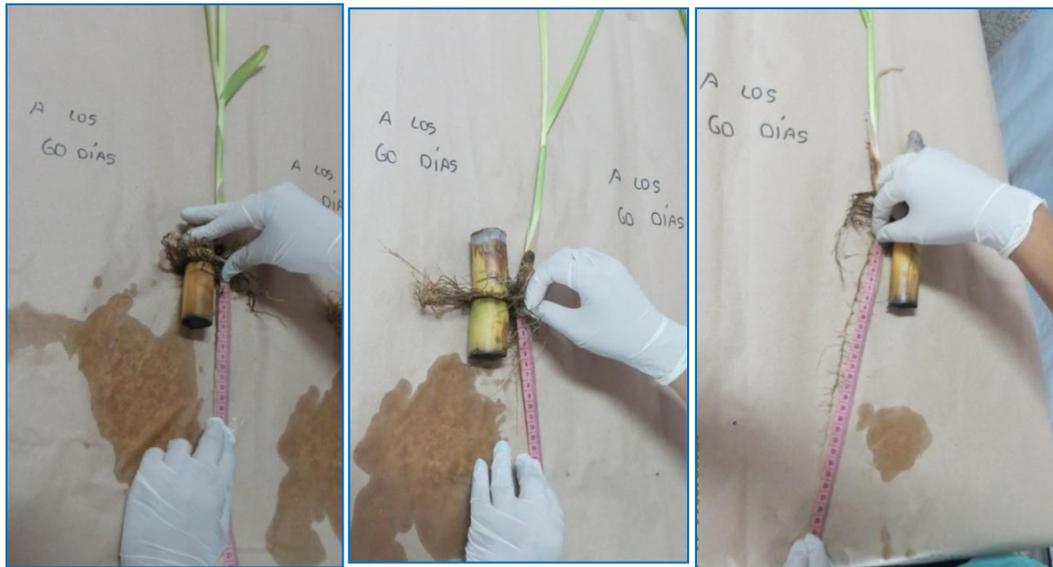


Fig. 4. Raíz mayor de plántulas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” inoculadas con: agua destilada (izquierda), fertilizante químico (centro) y *Rhizobium etli* 188-03 (derecha).

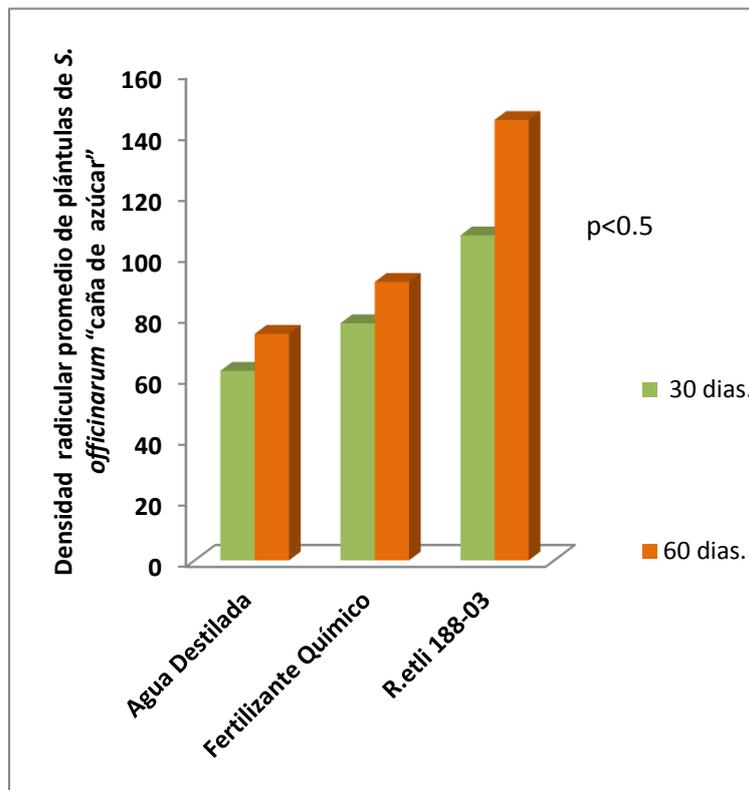


Fig. 5. Densidad radicular promedio de plántulas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” a los 30 y 60 días post-aplicación de agua destilada, fertilizante químico y post-inoculación de *Rhizobium etli* 188-03 en condiciones de laboratorio.



Fig. 6. Densidad radicular de plántulas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” inoculadas con: agua destilada (izquierda), fertilizante químico (centro) y *Rhizobium etli* 188-03 (derecha).

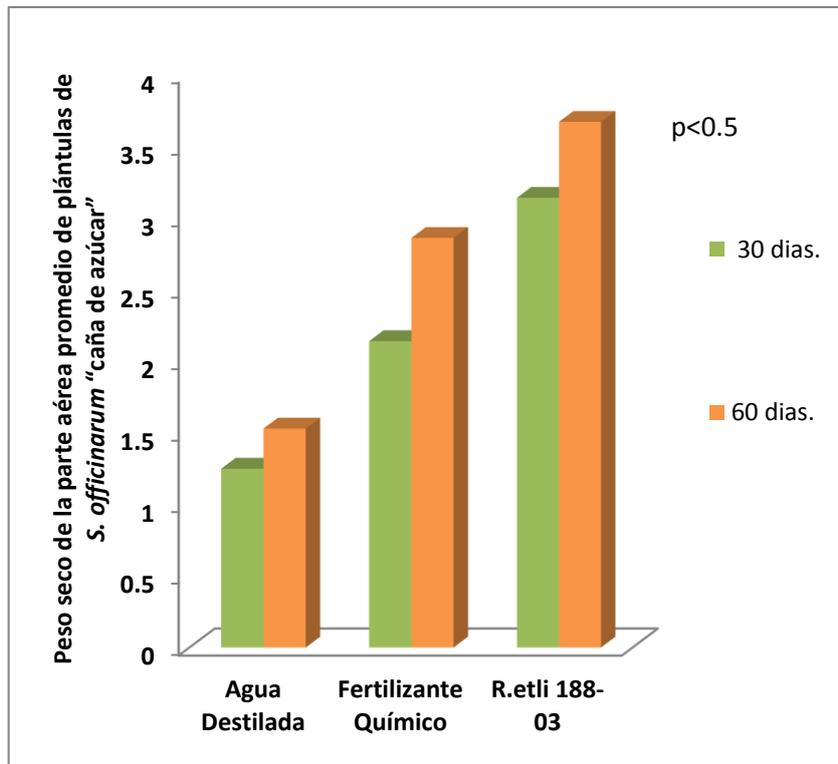


Fig. 7. Peso seco de la parte aérea promedio de plántulas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” a los 30 y 60 días post-aplicación de agua destilada, fertilizante químico post-inoculación de *Rhizobium etli* 188-03 en condiciones de laboratorio.



Fig. 8. Peso seco de la parte aérea promedio de plántulas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” a los 30 y 60 días post-aplicación de agua destilada (izquierda), fertilizante químico (centro) y *Rhizobium etli* 188-03 en condiciones de laboratorio. Después de 72 horas a 60°C.

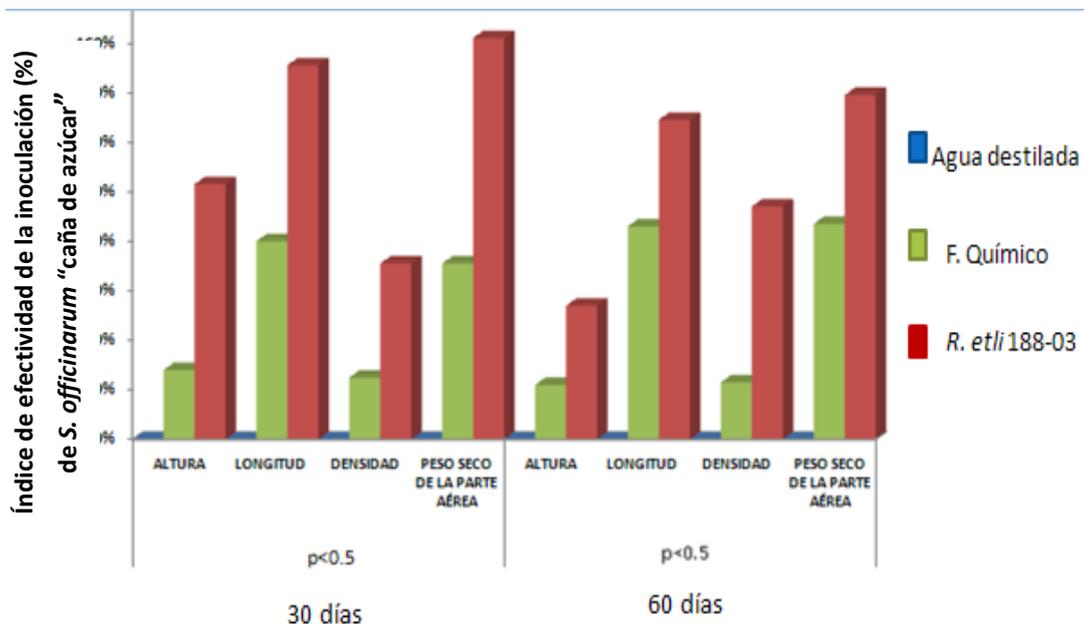


Fig 9. Índice de efectividad de la inoculación (IEI) expresado en porcentaje de plántulas de *Saccharum officinarum* “caña de azúcar” a los 30 y 60 días post-aplicación de agua destilada, fertilizante químico y post-inoculación de *R. etli* 188-03 en condiciones de laboratorio.

DISCUSIÓN

Es bien conocido que un considerable número de especies bacterianas asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de ejercer un efecto benéfico en su crecimiento. Este grupo de bacterias llamadas PGPR incluye a *R. etli* 188-03³². La actividad de esta rizobacteria en general se inicia con mecanismos de quimiotaxis que están relacionados con la presencia de flagelos, quimiorreceptores y sistemas de regulación codificados genéticamente. Logrando mantener la comunicación entre las células de la raíz con estas rizobacterias presentes en el suelo. Las rizobacterias capaces de interactuar con las raíces de plántulas no leguminosas como *S. officinarum* “caña de azúcar” son atraídas por sustancias excretadas por la raíz, que ocasionan el movimiento de la bacteria hacia la raíz de la plántula y así dar inicio a una relación benéfica³³.

Los efectos del uso de estos tratamientos biológicos en plántulas son directos o indirectos. En cuanto a la acción directa realizada por *Rhizobium* tenemos producción de fitohormonas, las cuales pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, cada uno de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación en el crecimiento de las plántulas. En estos grupos se incluyen auxinas, etileno, giberelinas (GA), citocinas y ácido abscísico; todas son moléculas que se encuentran en un rango de peso molecular entre 28 Da (etileno) y 346 Da (GA)³⁴.

Es posible que esta rizobacteria haya producido la fitohormona llamada giberilina capaz de aumentar el crecimiento de las plántulas³⁷, como lo observado en los resultados (Fig. N°1 y 2), donde se aprecia la diferencia de altura del grupo experimental con los grupos 01 y 02. Además fue corroborado por análisis estadístico (Anexos 11, 12, 13 y 14), ya que en las plántulas tratadas existió diferencia significativa ($p < 0.05$) al compararlo con los grupos respectivos, siendo posible afirmar que *R. etli* 188-03 produjo esta fitohormona.

La auxina típica es el ácido indol acético (AIA), fitohormona cuyo mecanismo de expresión, metabolismo, transporte y distribución final se conocen poco. Esta fitohormona vegetal otorga beneficios a la planta puesto que su división a nivel celular incrementa, en la que se presenta un aumento de tamaño de los frutos y del número de hojas^{35, 36}. Además aumenta el número de raíces laterales, tamaño de raíces y peso seco de la parte aérea³⁷. Evidenciándose los resultados en las figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8; puesto que *R. etli* 188-03 promueve el crecimiento significativamente de las variables agronómicas como: densidad radicular, longitud de raíz mayor y peso seco de la parte aérea con respecto a los controles a los 30 y 60 post-inoculación de *R. etli* 188-03.

La producción de AIA ocurre a partir del triptófano por medio de la indol-acetamida que se encuentra implicada en la generación de tumores en planta; existe una ruta alternativa tomada por otras rizobacterias que involucra la utilización del ácido 3- indol pirúvico como intermediario. Su efecto en las células es controlar los tropismos que se manifiestan como inclinaciones, giros o curvaturas del tallo y desarrollo del sistema radical^{38, 34}, por lo que es posible que *R. etli* 188-03 haya producido esta fitohormona, ya que los tallos no presentaron curvaturas ni inclinaciones (Anexos N° 8 y 9).

Otra fitohormona producida por esta rizobacteria es posiblemente las citocinas, compuestos químicos capaces de regular la citoquinesis de las células vegetales. Las citocinas o citoquinas son derivadas de las amino purinas, siendo la zeatina las más estudiadas hasta el momento, sin embargo, las diferentes especies químicas encontradas poseen diferencias en sus radicales manteniendo una estructura general. Las citocinas pueden ser estructuralmente clasificadas en dos familias, las adenin citocinas y las difenil urea citocinas. Ambos tipos tienen una estructura molecular similar, así como, una actividad biológica parecida, lo que sugiere que las dos familias poseen un receptor común³⁹.

La biosíntesis de esta fitohormona en plantas ha sido difícil de identificar, sin embargo, se cree que el principal sitio de producción es el tejido radicular, moviéndose desde este a los tejidos vegetales que lo requieran, permitiendo así el crecimiento del vegetal⁴¹. Estimulando el mayor desarrollo de la raíz y proporcionando la capacidad de absorción de nutrientes se la raíz en beneficio de la planta⁴¹.

Según algunos autores, refieren la existencia de otro factor estimulante de crecimiento producido por ciertas bacterias rizosféricas como *Rhizobium*; que son las vitaminas hidrosolubles del grupo B, factor que actúa específicamente en la longitud del tallo, la producción de materia seca de la parte aérea y la capacidad de absorción de nutrientes en algunos cereales y gramíneas, en las cuales estos autores obtuvieron resultados favorables en la promoción de crecimiento al inocular esta

rizobacteria⁴². Lo que concuerda con el resultado obtenido en la figuras N° 7 y 8 donde el peso seco aérea presentó diferencia significativa respecto a los controles (Anexos 26, 27,28 y 29) por lo que posiblemente *R. etli* 188-03 ha producido dicho factor.

Otros investigadores también aseguraron que en plantas de sorgo inoculadas con varias cepas de *Rhizobium*, y este al producir ácido indol acético (AIA) provoca la iniciación radicular y elongación celular; la producción de citocinas favorece la división celular y la expansión de los tejidos, y las giberelinas influyen en la elongación de la plántula. Los resultados que obtuvieron estos investigadores demostraron la capacidad de las cepas de rizobios de influir en las variables agronómicas, ya que los tratamientos que seleccionaron igualaron a los valores del control fertilizado y presentaron un incremento de más del 100% del peso seco aéreo, comparado con el control⁴³.

Estas fitohormonas producidas por *R. etli* 188-03 posiblemente estimularon la densidad y longitud de raíz mayor de los pelos radiculares, aumentando así la cantidad de raíces en las plántulas, incrementando la capacidad de absorción de agua y nutrimentos (Fig.3,4,5 y 6); permitiendo que las plántulas sean vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas, lo que concuerda con lo obtenido por ciertos autores que sostienen que el rápido establecimiento de raíces, ya sea por elongación de la raíz primaria o por surgimiento de raíces laterales secundarias, permite a las semillas jóvenes de canola, planta no leguminosa que se usa para obtener aceite, tener pronto acceso a nutrientes y agua provenientes de su medio ambiente⁴⁴. Investigadores hacen mención sobre la habilidad de las cepas de rizobios para producir aminociclopropano-1-acido carboxílico (ACC)-diaminasa, compuesto que reduce el nivel de etileno en las raíces de las plantas, incrementándose de esta manera la longitud y el crecimiento de raíces³⁰.

El rendimiento de un cultivo, en este caso la caña de azúcar, viene dado por la capacidad de acumular biomasa (peso seco) en los órganos que se destinan a la cosecha, donde las plántulas inoculadas con las suspensiones rizobacterianas presentaron diferencia significativa en peso seco aéreo al respecto con los controles respectivos (Anexos 26, 27, 28 y 29). Así la distribución de materia seca entre los diferentes órganos de la plántula es mayor, por lo tanto una mayor producción del cultivo. Los fotosintatos producidos por la fotosíntesis en los órganos “fuente” (principalmente hojas), pueden ser almacenados o distribuidos vía floema entre los diferentes órganos “sumideros” de la plántula. Puesto que el rendimiento de un cultivo viene dado por la capacidad de acumular materia seca en los órganos de la plántula, un incremento proporcional de la biomasa destinada a estos órganos garantiza un incremento del rendimiento en las plántulas de caña de azúcar⁴⁵.

La acción realizada por *R. etli* 188-03, posiblemente aportó las fitohormonas de las cuales la giberilina podría ser la que produjo más, permitiendo así obtener plántulas con mayor altura, densidad radicular, longitud de raíz mayor y peso seco de la parte aérea al compararla con los controles respectivos. Promoviendo de esta manera el crecimiento de las plántulas de caña de azúcar, contribuyendo a fomentar una agricultura sustentable libre de fertilizante y atender la creciente demanda de alimentos de calidad y de bajo costo de producción, por ende la utilización de esta rizobacteria con capacidad para promover el crecimiento de las plántulas de caña de azúcar, son una gran alternativa de biofertilización.

Otra estimulación posiblemente es la producción de sideróforos microbianos que juegan un papel importante en el control biológico de algunas enfermedades de las plantas y la disponibilidad de hierro⁵, además de solubilizar fosfatos⁴. En relación al análisis del índice de efectividad de la inoculación (IEI) (Fig.9), de las variables agronómicas evaluadas, se aprecia mayor IEI en la inoculación de *R. etli* 188-03, en comparación con los controles respectivos, esto posiblemente se deba a la estimulación de las bacterias en las plántulas de caña de azúcar directamente a través de la producción de fitohormonas⁴⁶.

Este trabajo indica que la inoculación de *R. etli* 188-03 tiene un excelente potencial para ser utilizado como promotor de crecimiento de plantas no leguminosas, constituyendo un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable para reducir el uso de agroquímicos en plantas. Los resultados obtenidos en la presente investigación corroboran otras investigaciones de investigadores en la promoción del crecimiento de plantas no leguminosas en el campo de la inoculación con cepas de rizobios^{47, 48}.

CONCLUSION

- *R. etli* 188-03 presenta un efecto positivo en el crecimiento de altura, longitud de raíz mayor, densidad radicular y peso seco de la parte aérea en plántulas de *S. officinarum* “caña de azúcar” a los 30 y 60 días post-inoculación, en condiciones de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García Delgado JM. Efecto de la coinoculación de *Bradyrhizobium yuanmingense* y *Rhizobium etli* para promover el crecimiento en *Lactuca sativa* L. “Lechuga” en condiciones de laboratorio. [Tesis de Biólogo-Microbiólogo]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2011.
2. Zavaleta Verde ED. Eficiencia en la nodulación de rizobios nativos autenticados y aislados de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. “Caupi” de los departamentos de Lambayeque y Ucayali-Perú. [Tesis de Biólogo-Microbiólogo]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2008.
3. Santillana N, Arellano C, Zúñiga D. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecol.Apl.* 2005; 4(2):47-51.
4. Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalander R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizocateria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant.soil.*1998; 204:57-67.
5. Loper JE, Buyer JS. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol Plant Microbe Int.*1991; 4:5-13.
6. Gutiérrez-Zamora M, Martínez-Romero E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zeamais*). *J. Biotech.*2001; 91:117-126.
7. Noel TC, Sheng CK, Pharis RP y Hynes MF. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Cand. J. Microb.*1996; 42:279-285.
8. Andreeva, IN, Redkina, TV y Ismailov SF. Involvement of indoleacetic acid in the stimulation of *Rhizobium* legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. *Russian J. Plant. Phys.*1993; 40:780-785.
9. Guerinot ML. Iron uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbioses. *Plant Soil.*1991; 130: 199-209.
10. Peña H, Reyes I. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia.* 1992; 32(8): 560-565.
11. Zinniel D, Lambrecht P, Harris B, Feng Z, Kuczmarski D, Higley P, Ishimaru C, Arunakumari A, Barletta R, Vidaver A. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl.Env.Microbiol.*2002; 68:2198-2208.
12. Rodríguez B y, López M. Evaluación de la fertilización biológica del frijol con cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de un ultisol de la altiplanicie del estado guarico. *Agron. Trop.*2009; 59(4): 381-386.
13. Villa Ramírez MS. Efectos de microbicidas y antagonistas microbianos sobre microorganismos causales del deterioro pos-cosecha de caña y su impacto en las pérdidas de sacarosa. [Tesis Para Obtener Grado De Magister]. Colombia: Instituto Politécnico Nacional; 2008.
14. Hernández Díaz R. Micropropagación de dos clones de Caña de azúcar (*Saccharum sp.*). [Tesis Para Obtener Grado De Biólogo-Microbiólogo]. Nicaragua: Universidad Nacional Agraria; 1998.
15. Zúñiga Pinto AI. Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) variedad CP 73-1547. [Tesis de Biólogo-Microbiólogo]. Honduras: Universidad Nacional Zamorano; 2012.
16. Kanwar JS, Youngdahl LJ. Micronutrient needs of tropical food crops. *Fert.Res.*1985; 7:43-67.
17. Ordosgoitti A, Aponte A. La roya de la caña de azúcar en la región central de Venezuela. *Agron trop.*1990; 40(4-6):317-326.
18. Bastidas L, Rea R, De Sousa O, Briceño R y Hernández E. Potencial azucarero y panelero de cinco cultivares de caña de azúcar en el valle de santa cruz de bucaral, estado falcón, Venezuela. *Agron.Trop.* 2009; 59(2): 137-148.
19. Torriente D. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar: Perspectivas de su uso en cuba. *Cult. Trop.*2010; 31:19-26.
20. Marín D. Indicadores básicos de producción cultivo caña de azúcar estado Lara, periodo 200-2005 [Tesis Para Obtener Grado De Magister]. Venezuela: Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. 2007.
21. Román Gutiérrez LA. Nematodos fitoparásitos en suelo de cultivo y raíces de *Saccharum officinarum* cv. CH 32-8560, sembrada en Cartavio, entre Julio y Setiembre del 2003. [Tesis Para Obtener Grado De Biólogo-Microbiólogo]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo. 2003.
22. Hernández Y, Olga A, Ramón M. Utilización de algunos microorganismos del suelo en cultivos de interés para la ganadería. *Rev Cub Cienc Agríc* 2001; 35(2):87-97.
23. Pedraza R, Teixeira K, Fernández Scavino A, García de Salamone I, et al. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Rev Corp Cienc Tec Agrop.*2010; 11(2):155-164.

24. Punschke K, Mayans M. Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay*.2011; 15:19-26.
25. Cavalcante V, Döbereiner J .A new acid-tolerant nitrogenfixing bacterium associated with sugarcane. *Plant. Soil* .1988; 108: 23-31.
26. Sosa A, Elías A, García OA, Sarmiento M. Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. *Rev. Cubana. Cienc. agríc.*2004; 38 (2):197-205.
27. Davies FT., Calderon CM, Huamán Z. Influence of Arbuscular Mycorrhizae Indigenous to Peru and a Flavonoid on Growth, Yield and Leaf Elemental Concentration of “Yungay” Potatoes. *Hort.Science*.2005; 40(2):381-385.
28. Rincon J, Clavero T, Razz R, Pietrosemoli S, Mendez F, Noguera N. Efecto de la inoculación de cepas nativas e introducidas de Rhizobium sobre la producción de materia seca en leucaena (*Leucaena leucocephala*).*Rev.Fac.Agron*.2000; 17(1):434-444.
29. Klopper JW, Beauchamp CJ. Areview of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol* 1992; 38:1219-1232.
30. Schlöter M, Wiehe W, Assmus B, Steindl H, BeckeH, Hoflich G and Hartmann A. Root colonization of different plants by plant-growth- promoting *Rhizobium leguminosarum* bv.Trifolii R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Appl.Environ.Microbiol.* 1997; 63:2038-2046.
31. Sabry RS, Sahel SA, Batchelor CA, Jones J, Jtam J, et. Al. Proceedings of the Royal Society of London Series B. *Biol.Sci*.2007; 264:341-346.
32. Alva Nuñez F. Selección *in vitro* de cultivos rizobianos con capacidad promotoras del crecimiento vegetal. [Tesis de Biólogo-Microbiólogo] .Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2011.
33. Camelo M, Vera S, Bonilla R. Mecanismo de Acción de las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. *CAPROICA*. 2011; 12(2):159-166.
34. Kamara A. Nutrición, Regulación del crecimiento y Desarrollo vegetal. *Integ.Tec. Rec.Agrup. Kam*.2001; 69:373-386.
35. Uggla C, Moritz T, Sandberg B. Auxin as a Positional Signal in Patten Formation in Plant. *Precoceeding of theNational Academy of Science*. 1996; 93:9282-9286.
36. Martín Pérez A. Efectos de la Inoculación del hongo de Micorrización Tuber melanosporum y la Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* en la calidad de plántulas de *Pinus halepensis*. [Tesis Para Obtener Grado De Biólogo].Madrid: Universidad Politecnica de Madrid; 2011.
37. Ahmad I, Pichtel J, Hayat S. *Plant-Bacteria Interactions*. WILEY-VCH Verlag GmbH and Co.KGaA.2008; 91:9182-9190.
38. Baca B, Elmerich C. *Microbial Production of Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers. 2007; 90:113-143.
39. Garcia de Salmone I, Hynes R, Nelson L. Role of Cytokinins in Plant Growth Promotion by Rhizosphere Bacteria.*Appl.Environ.Microbiol*.2005:173-195.
40. Becquer C, Salas B, Avila L, Palmero J, Napoles A, Ulloa L, et al. Selección de cepas Aisladas de Rizobios, Inoculadas en Maiz (*Zea mays*) en condiciones de campo en ecosistemas ganaderos de SantlSpirtus, Cuba. *Rev.Cub. Cienc. Agric*.2011; 45(4):445-449.
41. Izaguirre M, Labandera C, Sanjuan J. Biofertilizante en Ibero America: visión Técnica, científica y empresarial. *Rev.Cub. Cienc.Agric*. 2007; 22:107-149.
42. Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. Plant Growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical. Rev.Plant.Sci*.2003; 22(2):107-149.
43. Bécquer J, Salas B, Avila V, Palmero A, Napoles A, Ramos Y, et al. Efecto de la inoculación con Rizobios precedentes de Alberka, Canada, en sorgo en Condiciones de Campo. *Pastos y Forrajes*. 2011. 34 (3):3012-3013.
44. Patten C, Glick B. Role of *Pseudomonas putida* Indole acetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Environ Microbiol*.2002; 8(37): 3795-3801.
45. Marcelis L. The Dynamic of Growth and Dry Matter Distribution in Cucumber. *Annusl of Botany*.1992; 69: 487-492.
46. Lippmann B, Leinhos V, Bergmann H. Influence of auxin producing rhizobacteria on root morfology and nutrient accumulation of crops.I. Changes in root morphology and nutrient accumulation in maize(*Zea mays* L.) caused by inoculation with indole -3-acetic acid(IAA) producing *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains or IAA applied exogenously. *Ang. Bot.* 1995; 69:31-36.
47. Chabot R, Antoun H, Cescas MP. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminous arumbio* var phaseoli. *Plant. Soil* 1996a; 184:311-321.
48. Yanni YG, Rizk RY, Corich V, Squartini A, DazzoFB. Endorhizosphere colonization and growth promotion of Indica rice varieties by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. In Proc.15th North American Symbiotic Nitrogen-Fixation Cinferece. *Rev.Plant.Sci*. 1195; 70:31-36.



Efecto de dos especies nativas de *Trichoderma* sobre huevos y juveniles de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio

Effect of two native species of *Trichoderma* on eggs and juveniles of *Meloidogyne* sp. under laboratory conditions

Olinda del Castillo-Algarate¹, Carlos Collantes-Arana¹, Guillermo Cox-Trigoso¹ y Juan Wilson- Krugg².

¹Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo.

RESUMEN

Se determinó el efecto de dos especies nativas de *Trichoderma* sobre huevos y juveniles 2 (J2) de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. Para evaluar el efecto sobre J2 se realizaron seis tratamientos: T1: *Lycopersicon esculentum* sin *Meloidogyne*, T2: *L. esculentum* con *Meloidogyne*, T3: *L. esculentum* con *Meloidogyne* y Oxamyl, T4: *L. esculentum* con *Meloidogyne* y *Pochonia chlamydosporia*, T5: *L. esculentum* con *Meloidogyne* y *Trichoderma* sp1 nativa, T6: *L. esculentum* con *Meloidogyne* y *Trichoderma* sp2 nativa, evaluándose el porcentaje de peso radicular de *L. esculentum*, la cantidad de nódulos radiculares producidos por *Meloidogyne* y el porcentaje de J2 de *Meloidogyne*. Se sembró *L. esculentum* en 30 bolsas de almácigo las cuales contenían sustrato en una proporción (2:1), distribuidas en 5 bolsas por tratamiento. Luego se inoculó, a excepción del control negativo (T1), 15000 huevos de *Meloidogyne* sp. por bolsa a todos los tratamientos. Posteriormente, a los 5 días de siembra se inoculó una suspensión de 10⁶ conidias/mL de *Trichoderma* sp1(T5), *Trichoderma* sp2 (T6) y *P. chlamydosporia* (T4) respectivamente, realizándose posteriormente 5 inoculaciones más de cada hongo con un intervalo de 10 días entre cada inoculación; mientras que al T3 se le inoculó por única vez 900 ppm de Oxamyl y al T1 solo se le agregó agua, todos los tratamientos fueron incubados a temperatura ambiente durante 1 mes y 15 días. Para determinar el efecto de *Trichoderma* sp.1 y *Trichoderma* sp.2 sobre huevos de *Meloidogyne* se inoculó 2 mL de cada hongo y oxamyl, a una concentración de 10⁶ conidias/mL y 900 ppm respectivamente, en pocillos que contenían 1 mL de agua destilada estéril con aprox. 100 huevos de *Meloidogyne* sp. dejando se incubar por 72 horas, realizándose cuatro repeticiones por tratamiento. Se encontró que *Trichoderma* sp 1 y *Trichoderma* sp 2 destruyen los huevos del parásito. Asimismo, las plantas de *L. esculentum* inoculadas con *Trichoderma* sp1 nativa presentaron el mayor porcentaje de peso radicular, así como el menor porcentaje de nódulos en raíz, mientras que ambas especies nativas de *Trichoderma*, disminuyen significativamente la cantidad de J2. Se concluye que *Trichoderma* sp.1 y *Trichoderma* sp. 2 disminuyen significativamente tanto la población de huevos como J2 de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio, y que *Trichoderma* sp. 1 es el que ejerce el mayor efecto nematófago.

Palabras clave: *Trichoderma*, *Lycopersicon esculentum*, *Meloidogyne*, *Pochonia*, Oxamyl.

ABSTRACT

The effect of two native species of *Trichoderma* about 2 eggs and juveniles (J2) determined *Meloidogyne* sp. under laboratory conditions were determined. For this, to evaluate the effect on J2 six treatments were established: T1: *Lycopersicon esculentum* without *Meloidogyne*, T2: *Meloidogyne* with *L. esculentum*, T3: *L. esculentum* with *Meloidogyne* and Oxamyl, T4: *L. esculentum* with *Meloidogyne* and *Pochonia chlamydosporia*, T5: *L. esculentum* with *Trichoderma* sp1 native, T6: *L. esculentum* with *Meloidogyne* and *Trichoderma* sp2 native, assessing the percentage of root weight of *L. esculentum*, the amount of nodules produced by *Meloidogyne* root and percent J2 *Meloidogyne*. *L. esculentum* were seeded in 30 seedling bags which contained substrate in a ratio (2:1) in 5 bags per treatment. For this, it was inoculated, except the negative control (T1), 15000 *Meloidogyne* sp. per bag to all treatments. Subsequently, at 5 days of seeding a suspension of 10⁶ conidia / ml *Trichoderma* sp1 (T5), *Trichoderma* sp2 (T6) and *P. chlamydosporia* (T4) respectively was inoculated 5 inoculations performed subsequently each fungus over the range of 10 days between each inoculation; while T3

was inoculated at one time 900 ppm of Oxamyl and T1 will be only added water, all treatments were incubated at room temperature for 1 month and 15 days. To determine the effect of *Trichoderma* sp.1 and *Trichoderma* sp.2 on *Meloidogyne* sp. Eggs, about 2 mL was inoculated each fungus and oxamyl, at a concentration of 106 conidia/mL and 900 ppm, respectively, in wells containing 1 mL of distilled water sterile approx. 100 *Meloidogyne* sp. leaving it to incubate for 72 hours, performing four replicates per treatment. We found that *Trichoderma* sp.1 and *Trichoderma* sp.2 destroy parasite eggs. Also *L. esculentum* plants inoculated with *Trichoderma* sp1 native had the highest percentage of root weight as well as the lowest percentage of root nodules, while both native species of *Trichoderma*, and significantly decrease the amount of J2. We conclude that *Trichoderma* sp.1 and *Trichoderma* sp. 2 significantly decrease the population of both eggs and J2 of *Meloidogyne* sp. under laboratory conditions, and *Trichoderma* sp. 1 is the nematophagous exerted the greatest effect.

Keywords: *Trichoderma*, *Lycopersicon esculentum*, *Meloidogyne*, *Pochonia*, Oxamyl.

INTRODUCCIÓN

El tomate es un cultivo de alto riesgo fitosanitario en países tropicales, especialmente por los daños causados por enfermedades y plagas que afectan desfavorablemente los resultados productivos y económicos del cultivo. Los nemátodos fitoparásitos se encuentran en un lugar cimero en este grupo de patógenos a escala mundial, siendo bien reconocidas las pérdidas ocasionadas en el cultivo del tomate en el cual provocan pérdidas aproximadas del 12 % de la producción¹.

Seis especies de *Meloidogyne* son consideradas de importancia global en el cultivo de tomate: *Meloidogyne arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. hapla*, *M. incognita* y *M. javanica*; las tres primeras son importantes en climas templados y las restantes en climas tropicales y subtropicales². Estos parásitos dañan a las plantas al debilitar las puntas de la raíz y al inhibir su desarrollo o estimular una formación radical excesiva, pero principalmente al inducir la formación de hinchamiento de las raíces, las cuales privan a las plantas de sus nutrientes y del agua: el nematodo estimula a las células para que crezcan y licua parte de su contenido que succiona a través de su estilete³; en consecuencia, las raíces se hinchan en la zona de invasión y desarrollan las agallas típicas del nudo de la raíz, las cuales tienen un diámetro 2 o 3 veces mayor al de las raíces sanas^{2,4}.

El control de nematodos se realiza usualmente por la combinación de varias estrategias de manejo: el control cultural utiliza a los barbechos, las inundaciones, aplicaciones de abonos orgánicos, plantas trampa y de cobertura, rotación de cultivos, etc.; y el control físico, a la solarización, vapor de agua, encharcamiento, etc.; estos métodos reducen notoriamente las poblaciones de *Meloidogyne* sp. y pueden ser usados de manera individual o combinada, pero son poco usados por los agricultores por su alta inversión y largos periodos de aplicación, que reduce el tiempo de producción agrícola⁵.

Actualmente, el control químico es una de las medidas que más se utiliza para minimizar los daños causados por *Meloidogyne* sp., pues es indudable su eficacia; sin embargo, la principal limitación es que su aplicación modifica la microflora y microfauna del suelo, alterando las cadenas tróficas, eliminando los microorganismos antagonistas de los nematodos fitoparásitos⁶.

Entre los agentes microbianos para el control de nematodos formadores de agallas están los hongos nematófagos habitantes del suelo; se les encuentra en diferentes tipos de sustratos y son capaces de sobrevivir en condiciones climáticas o nutricionales extremas en diferentes regiones geográficas del mundo⁷. Su abundancia varía de 1,8-50 propágulos por gramo de suelo, lo cual está relacionado a la cantidad de materia orgánica, contenido de agua, tipo de suelo, temperatura y presencia de nematodos hospederos⁷. Los hongos del género *Trichoderma*, en particular *T. harzianum*, son usados para el control de enfermedades debido a que producen metabolitos que inhiben el crecimiento de otros hongos y a su alto nivel de competencia por el sustrato y el parasitismo⁸. Recientemente, se han registrado trabajos sobre el uso potencial de *Trichoderma* sp. en el control de *Meloidogyne* sp.⁹.

Considerando que: (i) las especies de *Trichoderma* sp. son muy usadas en el control biológico de hongos fitopatógenos, especialmente de aquellos que atacan a partes subterráneas de los vegetales ejerciendo un efecto positivo sobre la vigorosidad y sistema radicular de las plantas, aumentando los mecanismos de defensa de las plantas, (ii) se ha demostrado que *Trichoderma* sp. también puede controlar nematodos, haciendo de esta manera que los costos del tratamiento de sus cosechas disminuyan ya que necesitarían aplicar un solo tipo de controlador biológico y (iii) se tiene conocimiento que el éxito del control biológico radica en obtener y utilizar microorganismos que sean aislados en los lugares nativos, se propuso la presente investigación que estuvo orientada a

determinar el efecto de dos especies nativas de *Trichoderma* sobre huevos y juveniles 2 de *Meloidogyne* sp., en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

- Cultivos puros de *Trichoderma* nativos aisladas del distrito de Virú (La Libertad, Perú) denominados deliberadamente: *Trichoderma* sp1 y *Trichoderma* sp2.
- Cultivo de *Pochonia chlamydosporia* proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo (Trujillo, Perú).
- Huevos de *Meloidogyne* sp. extraídos de raíces de *Olea europea* “Olivo”.
- Treinta plantas de *Lycopersicon esculentum* var. Río Grande “Tomate”.
- Nematicida Nemat® 240 SL, cuyo principio activo es Oxamyl.

El diseño experimental

Se efectuaron seis tratamientos, de los cuales uno fue control negativo, tres controles positivos y dos experimentales, todos ellos con cinco repeticiones.

Efecto de *Trichoderma* nativos sobre J2 de *Meloidogyne* sp.

Obtención de cultivo joven de *Trichoderma* nativa y de *Pochonia chlamydosporia*²¹.

A partir de cada cultivo puro de *Trichoderma* sp 1 y de *Trichoderma* sp 2 nativas, y de *P. chlamydosporia* se procedió a resembrar por puntura, en tubos de ensayo conteniendo Agar Papa Dextrosa (APD), los cuales fueron incubados a 25°C durante 5 días, obteniéndose así un cultivo joven de cada hongo.

Propagación de las especies nativas de *Trichoderma* y de *P. chlamydosporia*.

A partir de los cultivos jóvenes de *Trichoderma* sp1 y de *Trichoderma* sp2 así como de *P. chlamydosporia* se realizaron siembras por suspensión en frascos planos de vidrio conteniendo Agar Papa Dextrosa (PDA), los cuales fueron incubados a 25 °C durante 7 días. Posteriormente, se obtuvo una suspensión de conidias a partir de estos cultivos, lo que se inoculó en bolsas de polipropileno conteniendo arroz, las cuales fueron incubadas a temperatura ambiente por dos semanas.

Recolección, esterilización y preparación del sustrato.

El sustrato estuvo conformado por dos partes de suelo y una parte de humus de lombriz de tierra (2:1). Se recolectó aproximadamente 60 Kg de suelo agrícola del campus de la Universidad Nacional de Trujillo que fue trasladado al laboratorio de Fitopatología, donde fue tamizado y lavado con agua de caño, y posteriormente esterilizado en autoclave. El humus no se sometió a esterilización. La preparación del sustrato consistió en agregar 2 Kg de suelo y 1 Kg de humus en cada bolsa de almácigo, llenándose 30 bolsas, que fueron distribuidas en 5 bolsas por tratamiento.

Tratamiento superficial y siembra de semillas de *L. esculentum* var. Río Grande Tomate.

Las semillas se lavaron con agua destilada estéril para eliminar los productos químicos de la certificación, luego se desinfectaron sumergiéndolas en alcohol al 70% durante tres minutos y se lavaron 10 veces consecutivas con agua destilada estéril; por último, se las dejó secar en condiciones de esterilidad. Se determinó el % de germinación de las semillas para posteriormente sembrar por maceta dos semillas de *L. esculentum* var Río Grande, a una profundidad de 1 cm.

Obtención de huevos de *Meloidogyne* sp.

Las masas de huevos fueron extraídas de raíces de *Olea europea* que se encontraban infectadas con *Meloidogyne* sp. Las raíces fueron lavadas con agua de caño y los nódulos presentes fueron cortados finamente. Luego se colocaron en frascos que contenían una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, sometiéndolos a agitación por 5 minutos aproximadamente. Luego se tamizaron y se determinó el número de huevos de *Meloidogyne* sp., estandarizándose hasta obtener una concentración de 5,000 huevos de nemátodos por kilogramo de sustrato³⁸.

Inoculación de *Meloidogyne* sp.

Inmediatamente sembradas las semillas de *L. esculentum*, se procedió a la inoculación de la dosis estandarizada de huevos de *Meloidogyne* sp., Esto se realizó para todos los tratamientos a excepción del grupo control negativo, que no se inoculó con *Meloidogyne* sp.

Estandarización del inoculo de conidias de *Trichoderma* sp1, *Trichoderma* sp2 y *P. chlamydosporia*.

Se agregó 10 mL de agua destilada estéril y 1 gr del arroz colonizado con el hongo respectivo a un matraz estéril, agitándose moderadamente a fin de liberar las conidias del hongo, determinándose la concentración de la suspensión resultante, mediante recuento en la cámara de Neubauer, para posteriormente estandarizar dicha suspensión a la concentración de 10^6 conidias/mL. Este procedimiento se empleó para cada uno de los hongos a evaluar.

Inoculación de *Trichoderma* sp1 y de *Trichoderma* sp 2 nativas y de *P. chlamydosporia*.

A los 5 días de sembrada la semilla de *L. esculentum* se inoculó una suspensión de 10^6 conidias/ml a cada tratamiento a evaluar. Para cada tratamiento se realizó 5 inoculaciones más del hongo respectivo, con un intervalo de 10 días entre cada inoculación. Las macetas se incubaron a temperatura ambiente y en fotoperiodo.

Preparación e inoculación de Oxamyl.

Se agregó 2 mL del Nematicida a un matraz conteniendo 98 mL de agua destilada, cantidad necesaria para lograr una concentración de 900 ppm. A los 5 días de la inoculación de *Meloidogyne* sp. y siembra de *L. esculentum* se realizó la primera y única inoculación del Nematicida.

Lectura

Se realizó a los dos meses de inoculada la suspensión de 5,000 huevos de nemátodos por kilogramo de sustrato. Para esto se procedió a tomar una muestra de 100 gr de sustrato de cada tratamiento y se determinó la cantidad de juveniles 2 de *Meloidogyne* sp. en el sustrato inoculado. Cada sustrato se pasó por tamices de 145 y 38 μ m, de mayor a menor tamaño respectivamente. También se procedió a extraer las plantas pertenecientes a cada tratamiento y se realizó el conteo de nodulaciones y peso de las raíces de *L. esculentum*, expresándose estos resultados como porcentaje promedio respectivamente. Cada tratamiento constó de 5 repeticiones; y tanto los tratamientos inoculados y no inoculados con *Meloidogyne* sp. fueron sometidos a la misma evaluación,

Efecto de *Trichoderma* sp.1 y de *Trichoderma* sp.2 nativas sobre huevos de *Meloidogyne* sp.

Preparación de las suspensiones de los tratamientos.

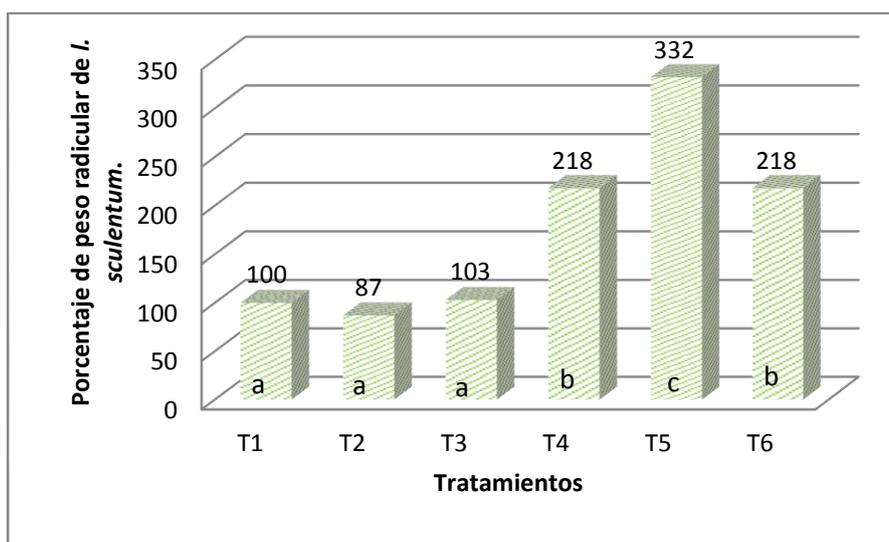
A partir del cultivo puro de cada hongo se preparó una suspensión de 10^6 conidios/mL y una solución de 900 ppm de oxamyl, colocándose 2mL de cada una en pocillos que contenían 1mL se suspensión de agua destilada estéril con aproximadamente 100 huevos de *Meloidogyne* sp, cada tratamiento constó de 4 repeticiones.

Lectura y análisis de datos

La evaluación se realizó a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación, realizándose observaciones al microscopio a 40x. Los datos fueron, procesados mediante la prueba de Análisis de Varianza Unidireccional (ANOVA), utilizando el paquete estadístico SPSS v.15 para determinar si existía diferencia significativa entre los tratamientos realizados.

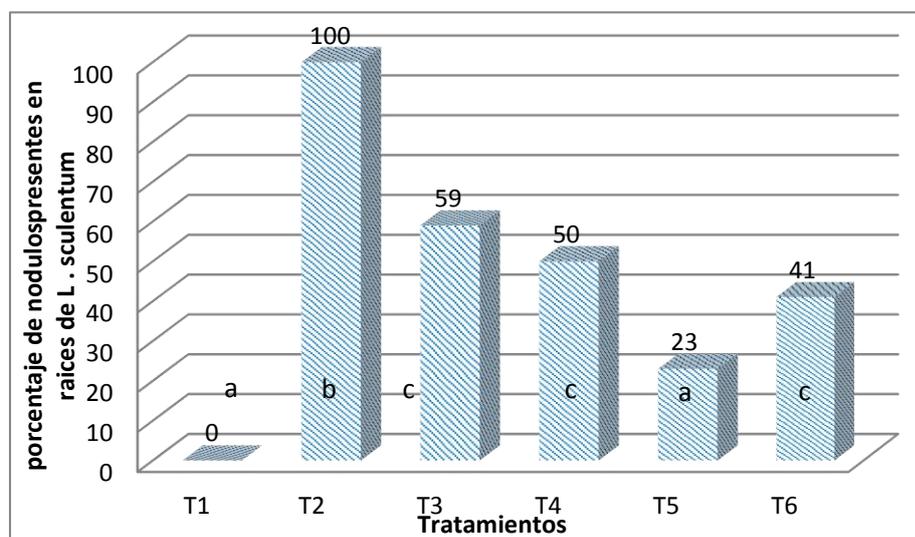
RESULTADOS

Se encontró que el porcentaje de peso radicular fue significativamente mayor en el T5: *Meloidogyne* + *Trichoderma* sp.1 + (Fig. 1), que el porcentaje de nódulos en las raíces de tomate fue mayor en el T2: sólo *Meloidogyne* y menor en el T5 (Fig. 2) al igual que el porcentaje de J2 (Fig. 3).



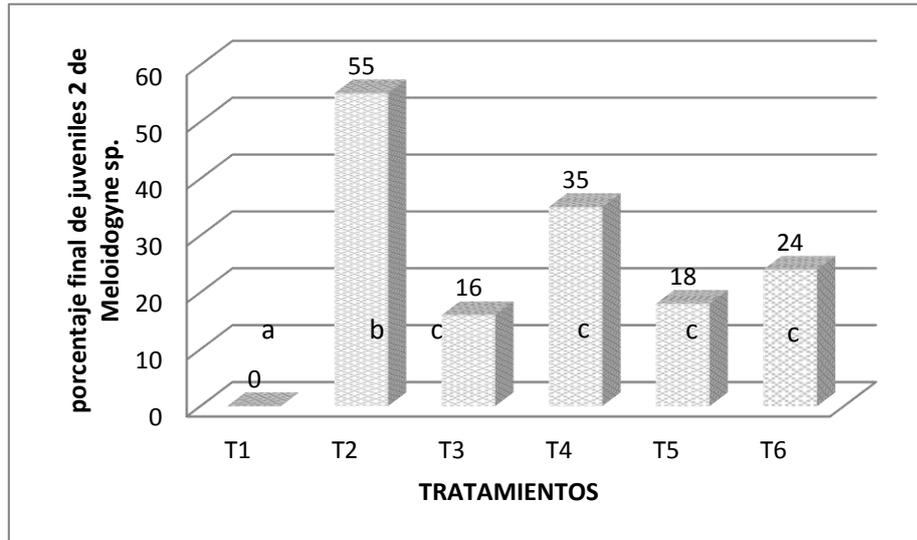
a: $p > 0.05$ b: $p > 0.05$ c: $p > 0.05$ a, b, c: $p < 0.05$

Fig. 1. Porcentaje de peso radicular de las plantas de *Lycopersicon esculentum* var. Río Grande infectadas con *Meloidogyne* sp. en seis tratamientos, después de dos meses de evaluación con *Trichoderma* sp.1 y de *Trichoderma* sp.2 nativas: T1: sin *Meloidogyne* sp., T2: con *Meloidogyne* sp., T3: con *Meloidogyne* sp. y Oxamyl, T4: con *Meloidogyne* sp. y *P. chlamydosporia*, T5: con *Meloidogyne* sp. y *Trichoderma* sp 1 nativa y T6: con *Meloidogyne* y *Trichoderma* sp 2 nativa.



a: $p > 0.05$ b: $p > 0.05$ c: $p > 0.05$ a, b, c: $p < 0.05$

Fig. 2. Porcentaje de nódulos presentes en raíces de las plantas de *Lycopersicon esculentum* var. Río Grande infectadas con *Meloidogyne* sp. en 6 tratamientos, después de 2 meses de evaluación con *Trichoderma* sp 1 y de *Trichoderma* sp 2 nativas: T1: sin *Meloidogyne* sp., T2: con *Meloidogyne* sp., T3: con *Meloidogyne* sp. y Oxamyl, T4: con *Meloidogyne* sp. y *P. chlamydosporia*, T5: con *Meloidogyne* sp. y *Trichoderma* sp 1 nativa y T6: con *Meloidogyne* y *Trichoderma* sp 2 nativa.



a: $p > 0.05$ b: $p > 0.05$ c: $p > 0.05$ a, b, c: $p < 0.05$

Fig. 3. Porcentaje final de juveniles 2 de *Meloidogyne* sp. en suelo, en 6 tratamientos, después de 2 meses de evaluación con *Trichoderma* sp 1 y de *Trichoderma* sp 2 nativas. T1: sin *Meloidogyne* sp., T2: con *Meloidogyne* sp., T3: con *Meloidogyne* sp. y Oxamyl, T4: con *Meloidogyne* sp. y *P. chlamydosporia*, T5: con *Meloidogyne* sp. y *Trichoderma* sp 1 nativa y T6: con *Meloidogyne* y *Trichoderma* sp 2 nativa.

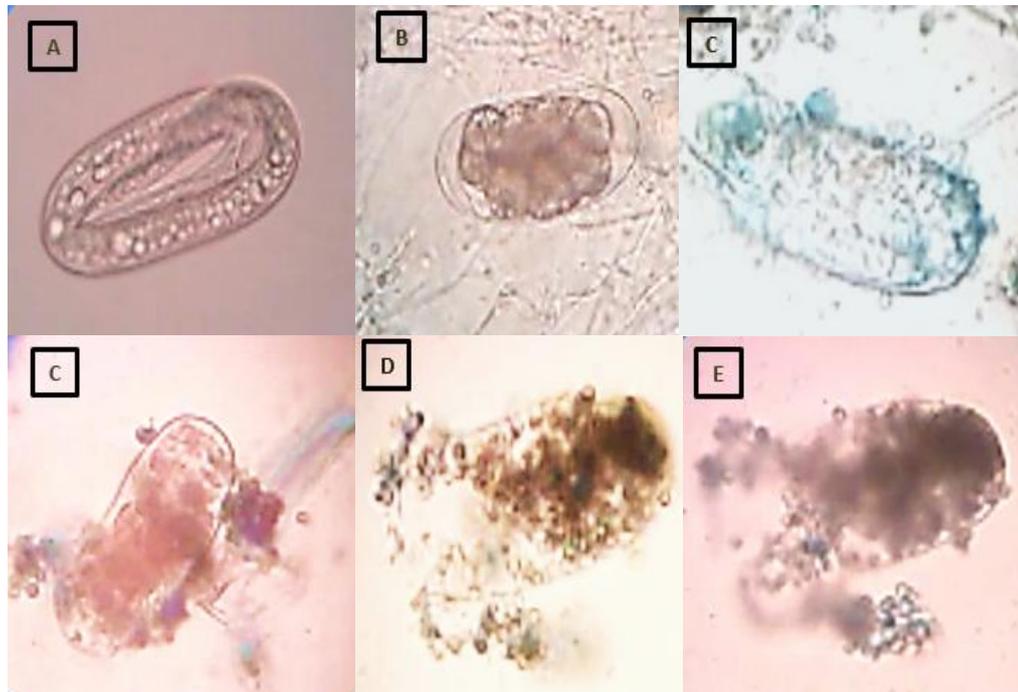


Fig. 4. Observación microscópica (40x) de la diferencia de huevos de *Meloidogyne* sp. no parasitados y parasitados con *Trichoderma* sp 1 y de *Trichoderma* sp 2 nativas a las 72 horas de inoculación: A. Huevo de *Meloidogyne* sp. sin inoculación, B. Penetración de hifas, C. Adherencia de hifas a la capa vitelina, D. Ruptura de la pared celular, E. Desintegración total del huevo de *Meloidogyne* sp.

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos al evaluar el efecto de *Trichoderma* sp 1 y de *Trichoderma* sp 2 nativas sobre *Meloidogyne* sp., se observó que el porcentaje de peso radicular de *Lycopersicon esculentum* disminuye cuando se encuentra infectado por nematodos (Fig. 1); esto podría deberse a que la formación de huevos es un proceso que implica una gran demanda de agua, nutrientes y productos de la fotosíntesis por lo tanto las raíces son mucho más susceptibles volviéndose raquílicas y por consiguiente disminuye la eficiencia en la formación de raíces primarias y secundarias¹³. De forma contraria se observó que el porcentaje de peso radicular de *Lycopersicon esculentum* se mantiene cuando se aplica oxamyl, por lo que este nematicida no es fitotóxico si se aplica en el momento y a la dosis recomendada¹³.

Al mismo tiempo, el porcentaje de peso radicular de *L. esculentum* aumentó significativamente en los tratamientos utilizados (T4, T5 y T6) respecto a las plantas no inoculadas (T1), el resultado obtenido puede deberse a la capacidad enzimática y parasítica, a la producción de metabolitos estimuladores del crecimiento vegetativo por parte de *Pochonia chlamydosporia* y *Trichoderma* sp. o a que ambos hongos son endófitos¹⁰.

Smith et al.¹⁴, señalan que estos incrementos pueden atribuirse a la eliminación de patógenos menores que se encuentran en la rizósfera; mientras que Windham et al.¹⁵ encontraron que *Trichoderma* produce un factor regulador de crecimiento sobre plantas de tomate, tabaco y rábano²⁴.

Altamore et al.¹⁶ sugieren que la promoción del desarrollo se debe a que *Trichoderma* tiene la capacidad de solubilizar el manganeso sin importar el pH del medio ni la disponibilidad del mismo, es decir, que lo solubiliza constantemente, estos autores señalan que este microelemento es requerido para varias funciones fisiológicas de las plantas, tales como la fotosíntesis, el metabolismo del nitrógeno y la síntesis de los compuestos aromáticos como precursores de aminoácidos y hormonas, de fenoles y de lignina; resaltando, que por consiguiente el manganeso juega un papel importante en el crecimiento y la resistencia a enfermedades de las plantas.

Con respecto al porcentaje de nódulos producidos por *Meloidogyne* sp. en raíces de *L. esculentum*, según el análisis estadístico existe diferencia significativa entre los tratamientos 1y5; tratamientos 3,4,6 y el tratamiento 2 (control positivo) donde solamente se inoculó *Meloidogyne* sp., esto quiere decir que *Trichoderma* sp 1 nativa afectó considerablemente al nemátodo impidiendo que se forme mayor cantidad de nódulos; oxamyl, *P. chlamydosporia* y *Trichoderma* sp 2 nativa consiguieron el mismo objetivo de reducir los nódulos pero no fueron tan efectivos en comparación con *Trichoderma* sp 1 nativa ya que este último estadísticamente resultó ser igual que el control negativo (sin inoculación de *Meloidogyne* sp.). A diferencia del tratamiento 2 el porcentaje de nódulos formados en raíces fue mayor que todos. En relación a los nódulos debemos añadir que las especies *Meloidogyne* sp. son endoparásitos sedentarios. Los especímenes jóvenes móviles en la segunda etapa (J2) emergen de los huevos, se mueven hacia las raíces y penetran en ellas a través de la punta, en las regiones de una penetración previa, o donde se encuentran pequeñas heridas¹².

En la raíz, los J2 invaden la endodermis y, al entrar en la estela, inducen la producción de células gigantes con núcleos múltiples que se derivan del parénquima vascular o de la diferenciación de las células vasculares en la parte central de la estela. La formación de estas células gigantes trastorna o bloquea los vasos de xilema que la rodea. También se induce la multiplicación de las células corticales, lo que resulta en la formación de llagas características. Los especímenes jóvenes J2 se alimentan de estas células gigantes y mudan tres veces para convertirse en hembras adultas que crecen rápidamente. La disección de las llagas revela las típicas hembras hinchadas en varias etapas de maduración. Cuando las hembras maduran, forman sacos. La reproducción es partenogénica. Un alto porcentaje de machos se producen sólo en condiciones adversas. Los huevos se depositan dentro de una matriz gelatinosa para que se forme una masa de huevos. Una sola masa de huevos puede contener varios centenares de huevos. En las raíces primarias, carnosas y gruesas, las masas de huevos pueden quedarse dentro de la raíz^{3, 12}.

El nematicida oxamyl (control positivo) disminuyó a un 59% la cantidad de nódulos formados respecto al total, mientras que en los tratamientos donde se aplicaron las 2 especies de *Trichoderma*, se presentó una disminución del porcentaje de nódulos, esto puede deberse a que *Trichoderma*, forma una capa protectora en la rizósfera, haciendo una simbiosis. El hongo se alimenta de los exudados de las

raíces y las raíces son protegidas por el hongo y al mismo tiempo reduce o elimina las fuentes de alimento para las J2 de *Meloidogyne*, impidiendo además el ingreso del nematodo a la raíz, variando este tipo de protección según la especie de *Trichoderma*^{11,17}.

En la Fig. 3 se observa que al realizar el análisis estadístico las dos especies nativas de *Trichoderma* disminuyen la población de juveniles 2 de *Meloidogyne sp.*, siendo *Trichoderma sp 1* la que presentó mayor efecto, esto probablemente se deba a que esta especie produce mayor cantidad de diferentes antibióticos volátiles y no volátiles; ya que se ha demostrado que las especies de este hongo pueden parasitar, controlar y destruir los fitonemátodos¹¹. Es así que, Pérez *et. al.*¹⁸ afirman que *Trichoderma spp.* es un biorregulador efectivo contra nematodos del género *Meloidogyne* por medio de sus toxinas e hifas. Méndez y Polanco¹⁹ informan resultados similares, obteniendo un notable decrecimiento de las poblaciones de nematodos formadores de agallas con una dosis de 8kg/ha de *T. harzianum* en diferentes etapas del cultivo del tomate al reducir las poblaciones de grado tres y cuatro, de una escala de cinco grados, a grado uno.

Las cepas de *Trichoderma* se diferencian entre sí por los niveles de expresión de las enzimas hidrolíticas, lo cual determina sus características antagónicas^{8,11,20}, esto explicaría porque el porcentaje de J2 de *Meloidogyne sp.* difiere en las dos especies de *Trichoderma* tratadas, además éste género produce metabolitos que actúan como nematicidas, tales como Trichodermin, Suzukacilina, Alamecicina, Dermadina, Penicilina, Trichotecenosa y Tricorzinianos que se han reportado como sintetizados por *Trichoderma harzianum*; o Gliotoxina producido por *Trichoderma viride*^{20,21,22}.

El efecto que tienen las dos especies de *Trichoderma* nativas utilizados sobre huevos de *Meloidogyne sp.* (Fig. 4), se podría deber a que este género parasita al fitopatógeno mediante enrollamiento, ganchos y cuerpo de tipo apresorio, que penetran la pared celular por acción hidrolítica de las enzimas quitinasas y gluconasas. Estas enzimas pueden degradar la cutícula de los insectos, cuya estructura está compuesta por quitina. El huevo de *Meloidogyne* presenta una capa vitelina externa, una capa media de quitina y una capa interna de glicolípidos. Esto explicaría porque los huevos de nematodos son grandemente afectados con el tratamiento de las especies de *Trichoderma*^{21,23,24,25}.

CONCLUSIONES

- Los dos especies nativas de *Trichoderma* tienen un efecto negativo sobre los huevos y juveniles 2 (J2) de *Meloidogyne sp.* en condiciones de laboratorio.
- *Trichoderma sp.1* nativa es la que ejerce el mayor efecto inhibitorio sobre J2 de *Meloidogyne sp.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santana Y, Del Busto A. Alternativas agroecológicas en el manejo de Nemátodos. Universidad de Pinar del Río, México; 2010
2. Talavera M. Manual de nematología agrícola. Introducción al análisis y control nematológico para agricultores y técnicos de agrupaciones de defensa vegetal. México: Edit.Limusa. 2003.
3. Montero Z, García C, Salazar L, Valverde R, Gómez L. Detección de *Meloidogyne incognita* en tubérculos de papa en Costa Rica .Rev. Agronomía Costarricens, 2007; 31 (1):78.
4. Agrios G. Fitopatología. México: Edit. Limusa. 1988.
5. Zavaleta E. Alternativas del manejo de las enfermedades de las plantas. Rev Terra, 1999; 17 (3): 201-207.
6. Araya M. Situación actual del manejo de nemátodos en banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*) en el Trópico Americano. En: Rivas G, Rosales F editores. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas en los trópicos. Actas del taller "Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas" celebrado en Guayaquil; Ecuador. 11-13 de agosto de 2003. Montpellier, FR. INIBAP, 2003; pp.79-102.
7. Peraza W, Orozco M, Esquivel A, Rivera G, Chaverri F. Aislamiento e identificación de hongos nematófagos nativos de zonas arroceras de Costa Rica. Rev Agronomía mesoamericana, 2011; 22(2):233-243.
8. Reyes R, Barranco B, García G, Jiménez G. Actividad in vivo de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. Rev. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología .Costa Rica 2002; 45-48.
9. Belanger R, Dufour N, Caron J, Benhamou N. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. Rev. Biocontrol Science Technology. 1995; 5: 41-54.

10. Rey M, Delgado-Jarana J, Rincón A, Limón M, Benítez T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Rev Iberoamericana de Micología, 2000; 17: 531-536.
11. Howell C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Rev Plant Disease, 2003; 87(1): 4-10.
12. Mendoza G., Wilson J, Colina J. Efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. REBIOLEST 2013; 1(2): 65-71
13. De Waele D, Davide R. Nemátodos noduladores de las raíces del banano. Francia. 1998. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and Challenges to Improve Its Performance as Biological Control Agent of Sedentary Endo-parasitic Nematodes. Rev Nematol, 2013; 45 (1):1-7.
14. Smit V, Wilcox W, Harman G. Potential for biological control of Phytophthora and Crown Rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. Phytopathol, 1990; 80(9):880-885.
15. Winham M, Elod Y, Baker R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Rev. Phytopathol, 1986; 76: 518 – 521.
16. Altomare, C., Börkman, T., Norvell, W. and Harman, G. “Solubilidad del dióxido de manganeso por el hongo *Trichoderma harzianum* 1295-22”.
17. Guilcapi E. Efecto de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, en la producción de plantas de café (*Coffea arabica*) variedad caturra a nivel de vivero. [Tesis de título]. Ecuador. 2009.
18. Pérez J *et. al.* *Trichoderma*: alternativa para el control biológico de nemátodos en el marco de una agricultura sostenible. Rev. Fitosanidad. 2006; 10 (2): 165
19. Méndez M, Polanco W. Método de control con *Trichoderma harzianum* en casas de cultivo. En Memorias Taller Latinoamericano de Control Biológico de Fitopatógenos con *Trichoderma harzianum* en casas de cultivo. La Habana, Cuba. 2006.
20. Zeilinger S, Omann M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. Rev Gene Regul Syst Bio. 2007; 1: 227 – 234.
21. Martínez J. Uso de *Trichoderma* para el Control Biológico de Organismos Patógenos de Plantas. En: Mem Simp, Agricultura Orgánica y de baja residualidad. Cuautémoc, Chih. México. 1998
22. Bell, D., Wells, H. and Markman, C. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathol, 1982; 72: 379-382.
23. Chérif M, Benhamou N. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f sp. radiscis - lycopersici. Phytopathol, 1990; 80(12): 1406-1414.
24. Bokhari F. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. Rev. Arch Phytopathol Plant Prot. 2009; 42(4): 361 – 369.
25. Jin R, Suh J, Park R, Kim Y, Krishnan H, Kim K. Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Rev Nematol, 2005; 7: 125 – 132.



Sensibilidad bacteriana de cultivos de *Listeria* de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo, Perú

Bacterial sensibility of *Listeria* cultures from places of fish sale from Trujillo city, Peru, markets

Yulissa L. Moreno-Córdova¹, Pedro Mercado-Martínez²

¹Tesista de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú..

²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo.

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno de amplia distribución, se transmite a humanos a través de diversos alimentos y muestra resistencia al tratamiento con antibacterianos. En la presente investigación se determinó la sensibilidad antibacteriana de 10 cultivos de *L. monocytogenes* y 15 cultivos de *Listeria* sp. frente a once antibióticos a elección, para lo cual se realizó antibiogramas de dichos cultivos. A estos cultivos se les reactivó en agar oxford para luego ser pasados a agar nutritivo, a continuación se realizó una suspensión bacteriana de cada cultivo con un patrón de turbidez McFarland 0,5; el equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL. Esta suspensión se estrió con hisopos estériles en placas con Agar Müller Hinton en diferentes direcciones, se colocaron los discos de sensibilidad, se incubó y a las 18 h se leyeron los resultados. Los antibacterianos empleados fueron: B-Lactámicos (Penicilina y Ampicilina), Macrólidos (Eritromicina), Sulfonamidas (Cotrimoxazol), Quinolonas (Ac. Nalidixico), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina), Aminoglicósidos (Gentamicina), Glicopéptidos (Vancomicina), Fenicoles (Cloranfenicol), Rifamicinas (Rifampicina) y Tetraciclinas (Tetraciclina). Finalmente se concluye que existe mayor frecuencia de sensibilidad frente a los antibacterianos usados en los cultivos de *Listeria* sp.

Palabras clave: Antibiograma, antibacterianos, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a widely distributed pathogen is transmitted to humans through various foods and shows resistance to antibacterial therapy. In the present investigation the antibacterial sensitivity of 10 cultures of *L. monocytogenes* and 15 *Listeria* sp cultures versus eleven choice antibiotics for which susceptibility of these crops was determined. These cultures were reactivated in oxford agar before being passed onto nutrient agar was then a bacterial suspension of each culture was performed with 0.5 McFarland turbidity standard, equivalents to 1.5×10^8 CFU/mL. This suspension was streaked with sterile swabs on Mueller Hinton Agar plates in different directions, sensitivity discs were placed, were incubated 18 h and the results were read. Antibacterial used were: B-lactam (penicillin and ampicillin), macrolides (erythromycin), sulfonamides (co-trimoxazole), quinolones (Ac. Nalidixic) Fluoroquinolones (Ciprofloxacin) Aminoglycosides (Gentamicin), glycopeptides (vancomycin), phenicols (Chloramphenicol), rifamycins (rifampin) and Tetracycline (Tetracycline). Finally it is concluded that there is a higher frequency of sensitivity to antibacterial used in the cultivation of *Listeria* sp.

Keywords: Susceptibility, antibacterial, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUCCIÓN

Se han descrito alrededor de 250 agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales¹. Una de ellas es la Listeriosis, zoonosis que puede ser transmitida por contacto directo con animales infectados (exposición ocupacional), por ingestión de alimentos contaminados y de madre a hijo intrauterino o durante el parto². A pesar de presentarse con baja frecuencia, en la actualidad es una de las ETAs más letales conocidas, causando gran alarma a nivel mundial en productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias^{3,4}.

Estrechamente relacionado con los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*, las bacterias del género *Listeria* se caracterizan por soportar altas concentraciones de sal, así como, multiplicarse en un rango de temperatura de 3 a 45°C y de pH entre 5,6 y 9,6⁵. De las seis especies registradas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi*, de las cuales sólo las dos primeras son consideradas patógenas para humanos y animales y mayormente para animales, respectivamente^{6,7}.

L. monocytogenes, gracias a su capacidad de sobrevivir durante periodos de tiempo prolongados en diferentes medios, presenta amplia distribución en particular dentro de los alimentos, que pueden estar contaminados en cualquier eslabón de la cadena productiva y en el almacenamiento en frío, así como en el agua, que posibilita su llegada a huéspedes^{8,9}. Por ello, es frecuente la infección subclínica en humanos y diversas especies de animales, los cuales distribuyen al microbio a través de heces: vía fecal-oral¹⁰. Además, la infección humana puede ocurrir a través de alimentos como la leche fluida cruda y pasteurizada, quesos (en particular las variedades blandas), helado, verduras crudas, chorizos fermentados de carne cruda, carne cruda y cocida de ave de corral, carnes de todo tipo, y pescado crudo y ahumado⁷.

La presencia de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria, como leche, carne, pescado y vegetales, refuerza la necesidad de que las industrias procesadoras de estos alimentos establezcan barreras que minimicen su ingreso a los lugares de proceso, en particular en aquellos puntos donde el alimento no es sometido a un tratamiento que permita la destrucción del patógeno; por ello, las industrias tienen, o deberían tener barreras sanitarias al ingreso de las salas de proceso, consistentes en un riguroso control del uniforme del personal, lavado de manos, uso de pediluvios y reducción del tránsito de personas que ingresan al lugar donde se procesan alimentos^{11,12,13}.

La listeriosis tiene una tasa de mortalidad entre 20-30%, siendo más alta que la de casi todas las demás ETAs, porque en Estados Unidos anualmente se presentan 2500 casos¹⁴, en Europa la incidencia anual es de 0,1-11,3 casos por millón de habitantes¹⁵ y en el Perú, sólo en la región La Libertad, se han reportado 42 casos entre los años 2001-2008¹⁶. Dos formas clínicas se presentan en la listeriosis: la perinatal y la del paciente adulto, ambas como infección local diseminada o del sistema nervioso central (SNC)⁸. El diagnóstico oportuno y tratamiento temprano con antibacterianos como ampicilina y aminoglucósidos o clotrimazol son efectivos; sin embargo, la sintomatología generalmente no permite un diagnóstico temprano, ya que los primeros signos de un brote son generalmente el aborto y/o la muerte del individuo¹².

Los estudios confirman que la susceptibilidad natural de *Listeria* sp y *L. monocytogenes* a los aminoglucósidos, penicilinas, quinolonas, rifampicina, trimetropin asociado a una sulfonamida (cotrimoxazole), fosfomicina y ácido fusídico, aún se mantiene en el género; sin embargo, la incidencia de al menos una cepa resistente a la ampicilina, eritromicina, vancomicina, cloranfenicol y tetraciclina, ha sido detectada en aislados procedentes de alimentos e infecciones clínicas^{4,17,18}. Así, el patrón de sensibilidad a los antibacterianos de *L. monocytogenes* ha permanecido relativamente estable con el paso de los años. Generalmente, este microorganismo es sensible “in vitro” a una amplia gama de antibacterianos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclina, rifampicina, cotrimoxazol y vancomicina. Las fluorquinolonas y las cefalosporinas actuales presentan una pobre actividad, especialmente las de tercera y cuarta generación como cefotaxima y cefepima; todas las cepas de *L. monocytogenes* son resistentes a fosfomicina⁸. A pesar de que la data refiere una incidencia de resistencia antimicrobiana relativamente baja en *Listeria* sp., es oportuno señalar que en los últimos diez años los cambios en la susceptibilidad casi uniforme del género, representa un tema de importancia y del cual aún falta mucho por discutir⁴.

El monitoreo continuo del curso y la naturaleza de la adquisición y diseminación de resistencia a antibacterianos por *L. monocytogenes* y otros miembros del género, se ha convertido casi en una exigencia para todos los aislados procedentes de ambientes, infecciones clínicas y primordialmente los provenientes de alimentos; ya que constituyen los vehículos de transmisión primaria de la listeriosis⁴. La emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos es un asunto de máximo interés en Salud Pública por lo que se deben dar cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos; además, el aislamiento de *Listeria* sp. en alimentos como el pescado, indican su distribución en la cadena alimentaria⁷.

Ante esta situación y la posible emergencia de cultivos resistentes a antibióticos, se planteó la siguiente investigación con la finalidad de evaluar la actividad de antibióticos de elección en 25 cultivos de *Listeria* provenientes de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo (Perú) y conocer, en base a análisis estadísticos, cual es el antibacteriano que tiene un mejor efecto sobre *Listeria*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos

Se dispuso de 10 cultivos de *Listeria monocytogenes* y 15 de *Listeria* sp., debidamente identificados, los cuales fueron aislados de los lugares de expendio de pescado obtenidos de los mercados del distrito de Trujillo, La Libertad, Perú.

Reactivación de los cultivos y obtención del inóculo.

Se hizo en placas conteniendo agar Oxford e incubándolos a 30°C por 24 horas. Luego se hizo una suspensión bacteriana semejante al patrón de turbidez McFarland 0,5; que es equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml.

Preparación de placas con medio de cultivo y siembra.

Se prepararon placas Petri con agar Müeller-Hinton (12-15 mL por placa), las que se dejaron secar por unos minutos en estufa para eliminar el exceso de humedad; luego se sembró la suspensión bacteriana, con ayuda de un hisopo estéril, sobre la superficie del medio de cultivo y en todas las direcciones.

Aplicación de discos de antibióticos para sensibilidad.

Sobre la superficie de la placa ya sembrada, con la suspensión bacteriana (inóculo), se colocó los discos de antibióticos, con ayuda de una pinza estéril, y se incubó a 37°C por 18 horas. Los antibacterianos probados fueron: B-Lactámicos (Penicilina y Ampicilina), Macrólidos (Eritromicina), Sulfonamidas (Sulfametoxazol trimetoprim), Quinolonas (Ac. Nalidixico), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina), Aminoglicósidos (Gentamicina), Glicopéptidos (Vancomicina), Fenicoles (Cloranfenicol), Rifamicinas (Rifampicina) y Tetraciclinas (Tetraciclina).

Medición del halo.

Pasado el tiempo de incubación, se midió el diámetro (en milímetros) de la zona alrededor de cada disco, esto fue interpretado de acuerdo a los lineamientos del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)^{19,20}, y se clasificó la sensibilidad del antibacteriano en cada cepa, como susceptible, intermedio o resistente.

RESULTADOS

Se observó una frecuencia del 90% de sensibilidad del cultivo de *L. monocytogenes* ante Gentamicina pero 0% de sensibilidad ante Penicilina y Tetraciclina. Además se observa 100% de sensibilidad del cultivo de *Listeria* sp. ante Vancomicina y 0% ante Rifampicina y Tetraciclina, sin diferencia significativa entre los resultados para las dos especies de *Listeria* (Tabla 1). Se evidenció que los antibacterianos que tienen mejor acción para *L. monocytogenes* son: Ampicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina y Eritromicina; y para *Listeria* sp. son: Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Eritromicina, Ampicilina y Ciprofloxacina; por encontrarse por encima de la media aritmética (Fig. 1).

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos de frecuencia en cuanto al ensayo de sensibilidad antibacteriana realizado a los diez cultivos de *Listeria monocytogenes*, tal como se muestra en la Tabla 01, se evidencia que esta bacteria es sensible en su valor más alto (90 %) al antibiótico gentamicina, por que dicha especie posee una sensibilidad natural a Gentamicina por ser un aminoglucósido, ya que inhibe la síntesis de proteínas a nivel ribosomal⁴.

Tabla 1. Frecuencia de cultivos sensibles de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp. provenientes de lugares de expendio de pescado de mercados de la ciudad de Trujillo (Perú) frente a los antibacterianos seleccionados.

Antibacteriano	Frecuencia (%) de cultivos sensibles de:	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> sp.
Ampicilina	80	87
Penicilina	0	7
Eritromicina	70	73
Sulfametoxazole Trimetoprim	80	73
Ácido Nalidíxico	30	13
Ciprofloxacina	30	87
Gentamicina	90	87
Vancomicina	80	100
Clorafenicol	30	27
Rifampicina	10	0
Tetraciclina	0	0

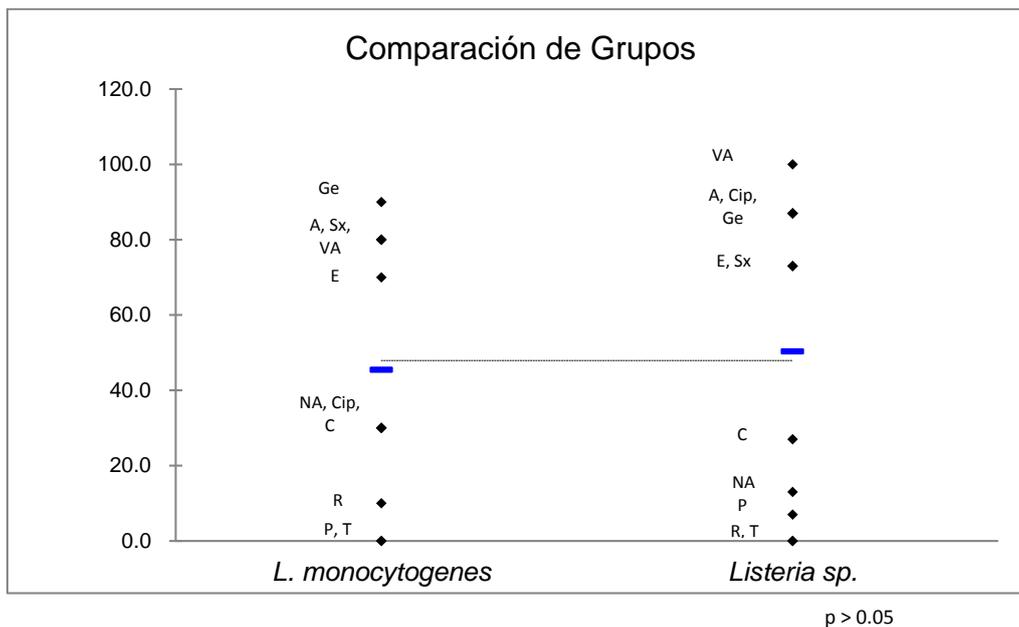


Fig. 1. Análisis de varianza (ANOVA) de la frecuencia de cultivos sensibles de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp. Donde: A=Ampicilina; P= Penicilina; E=Eritromicina; SX= Sulfametoxazol Trimetoprim; NA=Acido Nalidíxico, CIP=Ciprofloxacina, G=Gentamicina; VA=Vancomicina; C=Cloranfenicol, R=Rifampicina; T=Tetraciclina.
— Representa la Media Aritmética

Asimismo, revela una sensibilidad del 80% a ampicilina y sulfametoxazole trimetoprim, esto sería porque ampicilina, siendo un betalactámico, actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular e induce un efecto bacteriolítico; y en el caso del sulfametoxazol y trimetoprim, se combina una sulfonamida, que tiene acción bacteriostática por ser antagonista del PABA (ácido para aminobenzoico) impidiendo así la síntesis de ácido fólico y consecuentemente la síntesis de timina y purina; con el trimetoprim que complementa ésta acción por ser un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa que actúa en la

síntesis de ácido fólico; actualmente, se considera que las mejores opciones son la penicilina o la ampicilina, solas o asociadas a gentamicina. Y la combinación de trimetoprim y sulfametoxazol se ha utilizado con éxito en pacientes alérgicos a penicilinas, considerándose en la actualidad la terapia alternativa en esta circunstancia²¹.

La actividad inhibitoria y bactericida de la ampicilina y gentamicina observada en el estudio frente a *L. monocytogenes* es una clara evidencia de que aún se mantiene el patrón de susceptibilidad a estos antibióticos de elección; sin embargo, también se obtuvo un porcentaje de 80% de sensibilidad ante el antibiótico vancomicina, el que inhibe la síntesis de peptidoglucano y por lo tanto la síntesis de la pared celular⁴.

Para *Listeria* sp., se evidenció que el 100 % de los cultivos (15) fueron sensibles a vancomicina y se encontró una sensibilidad elevada (83%) para ampicilina, ciprofloxacina y gentamicina. La ciprofloxacina, como parte de las fluoroquinolonas, es un antibiótico de amplio espectro e inhibe la enzima topoisomerasa IV y provoca lisis celular. En el caso de gentamicina, ésta inhibe la síntesis proteica por alterar la interacción codón-anticodón dando una mala lectura del código genético e inhibir los procesos de iniciación y elongación de la síntesis proteica; siendo así un bacteriostático.

Cabe señalar que según los datos obtenidos, no hubo registro de sensibilidad para rifampicina y tetraciclina, pero sí hubo resistencia intermedia y resistencia. La literatura revela que existe una incidencia de al menos una cultivo resistente a ampicilina, eritromicina, vancomicina, cloranfenicol y tetraciclina, detectada en aislados procedentes de alimentos e infecciones clínicas⁴. Coincidiendo con los resultados obtenidos en la presente investigación.

El análisis de varianza (ANOVA) indica que para *L. monocytogenes* se puede utilizar Ampicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina y Eritromicina, por encontrarse por encima de la línea que representa la media aritmética; en el caso de *Listeria* sp., los antibacterianos factibles de usar son Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Eritromicina, Ampicilina y Ciprofloxacina. Además, resultó q no hay diferencia significativa entre los resultados de ambas especies trabajadas de *Listeria*; por lo que se pueden utilizar los mismos antibióticos para ambas especies. Antibióticos que se encuentren sobre la media aritmética, ya que éstos serían más eficaces.

Por lo tanto, el presente trabajo evidencia que *Listeria* es un microorganismo sensible a una amplia gama de antibióticos, como lo describen Oteo y Alós; antibióticos como penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina y vancomicina. Describiéndose además resistencias a macrólidos y a tetraciclinas en algunos aislamientos; que suelen estar codificadas por plásmidos, aunque también hay casos de resistencia a tetraciclinas codificada por el cromosoma; puntualizado así por dichos autores.

CONCLUSIONES

- No hay diferencia significativa entre *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp. con respecto a los antibacterianos evaluados.
- Se pueden usar los antibióticos Ampicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Eritromicina y Ciprofloxacina para *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alcayaga S, Hott B. *Listeria* y Listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. Rev Chile Salud Pública, 2008; 12(3): 188-195.
2. Rossi L, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso A. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: una revisión de las vías que llevan a su aparición. Chile Infect, 2008; 25(5): 328-335.
3. Schöbitz R, Ciampi L, Nahuelquin Y. *Listeria monocytogenes* un peligro para la industria alimentaria. Agro sur Chile, 2009; 37(1): 1-8.
4. Villalobos L, Martínez R. Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. aisladas de alimentos durante el periodo 2003-2004. Cumaná, Venezuela. Rev Soc Venezolana Microbiol, 2006; 26:31-34.
5. Gesche E, Ferrer J. Detección de *Listeria monocytogenes* en agua de mar y pescado provenientes de Áreas de Recolección de Productos Marinos. Alimentos, 1995; 20(34): 21-25.
6. Torres KJ, Sierra SC, Poutou RA, Vera H, Carrascal AK, Mercado M. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. Rev. UDCA Act Divulg Cient, 2004; 7(1): 25-57.
7. Manual de la OIE sobre animales terrestres. *Listeria monocytogenes*. 2004. capítulo 2.10.14.

8. Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. Rev MVZ Córdoba. Colombia, 2005; 10(1):511-543
9. Chávez R. Evaluación del control de *Listeria monocytogenes* usando métodos físicos y químicos en condiciones de laboratorio y sobre superficies contaminadas en relación al tiempo. Trujillo, Perú. 2011
10. Gesche, E. *Listeria monocytogenes* como causal de enfermedad transmitida por alimentos. Fleischwirtsch, español, 1989. (2): 41-44.
11. Gamboa A, Mejía D, Moreno P, Buitrago S, Pérez K, et al. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria* especies isolated from swine processing facilities in Colombia. J Swine Health Prod, 2013; 21(1): 10-21.
12. Schöbit ZR, Ciampi L, Nahuelquín Y. *Listeria monocytogenes* un peligro para la industria alimentaria. Agro sur Chile, 2009; 37 (1): 1-8
13. FAO. Codex Alimentarius, Directrices Sobre la Aplicación de Principios Generales de Higiene de los Alimentos para el Control de *Listeria monocytogenes* en los Alimentos. 2007.
14. Murray P, Rosenthal K, Kabayashi G, Pfaller M. Microbiología Médica. 5ª ed. Barcelona: Elsevier Science. 2006.
15. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 2004.
16. Ministerio de Salud del Perú. Información estadística sobre listeriosis-años 2001 al 2008. La Libertad: Gerencia Regional de Salud La Libertad – Oficina de Informática. Telecomunicaciones y Estadística; 2009.
17. Malbrán GC. Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de animales: test de difusión por discos y test de dilución. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento Bacteriología. Servicio Antimicrobianos. Buenos Aires, Argentina. 2001.
18. Oteo J, Alós J. Servicio de Microbiología. Control de Calidad SEIMC. Hospital de Móstoles. Móstoles. Madrid. [Consulta en línea]. <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/listeria.pdf> [Consulta: Septiembre del 2012]
19. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard—Second Edition. NCCLS document M31-A2 [ISBN 1- 56238-461-9]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventh Informational Supplement. CLSI document M100-S17 [ISBN 1- 56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
21. Zamora J, Chaves C, Arias M. Comparación del perfil de sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico. Rev Alan Venezuela, 2006; 56 (2).



Resistencia Bacteriana según MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena aislada en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope-EsSalud (Perú)

Bacterial resistance as MIC 90 of uropathogenic *Escherichia coli* isolated in the Microbiology Laboratory of Hospital II-Essalud Chocope (Peru)

Sandra Tucto-Succhil¹, Pedro Mercado-Martínez² y Tony Hurtado-Escamilo³

¹Escuela AP de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT. ³Hospital II-EsSalud Chocope, La Libertad. Perú.

RESUMEN

El aumento de la resistencia bacteriana, el uso inadecuado de antibióticos y las formulaciones empíricas, en infecciones urinarias, obligan a establecer las características epidemiológicas y de resistencia de nuestro medio. Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo y prospectivo, con el objetivo de Evaluar la Resistencia Bacteriana según el MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena. La población y la muestra de estudio fueron los reportes clínicos y los urocultivos de los pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital II Chocope – EsSalud, durante Octubre 2010 a Agosto 2013. Los análisis estadísticos mostraron que existe diferencia significativa para la resistencia de *Escherichia coli* uropatógena en el periodo de estudio 2010- 2013 a los antimicrobianos: Cefolatina ($\chi^2 = 13.8064$, $p = 0.0002$), Cefepima ($\chi^2 = 33.8063$, $p = 0.0000$), Tetraciclina ($\chi^2 = 13.5552$, $p = 0.0036$), Ciprofloxacino ($\chi^2 = 13.2999$, $p = 0.004$) y Levofloxacina ($\chi^2 = 20.3704$, $p = 0.0001$); a excepción de los siguientes antimicrobianos: Ampicilina ($\chi^2 = 6.5830$, $p = 0.0864$), Amoxicilina/ A Clavulánico ($\chi^2 = 5.9873$, $p = 0.1122$), Gentamicina ($\chi^2 = 5.1083$, $p = 0.164$) y Trimetropina/ Sulfametoxazol ($\chi^2 = 4.5207$, $p = 0.2105$) que no se observa diferencia significativa. Ninguna cepa de *Escherichia coli* fue resistente a Imipenem durante el periodo de estudio. La interpretación de los perfiles de resistencia antimicrobiano encontrados permite considerar como prudente la administración empírica de Amoxicilina/ A clavulánico e Imipenem como tratamiento inicial de las infecciones urinarias en esta población debido a los altos niveles de sensibilidad encontrados en aquellos aislamientos.

Palabras clave: *Escherichia coli*, uropatógeno, resistencia bacteriana, ITUs.

ABSTRACT

Increased bacterial resistance, inappropriate use of antibiotics and empirical formulations in urinary infections, undertake to establish the epidemiology characteristics and resistance of our environment. A retrospective and prospective study was performed in order to evaluate the resistance as the Bacterial MIC 90 uropathogenic *Escherichia coli*. The population and the study sample were clinical reports and urine cultures of outpatient and inpatient Hospital II Chocope - EsSalud during October 2010 to August 2013. Statistical analyzes showed that there is significant difference for the resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in the study period 2010 - 2013 to antimicrobials: Cefolatin ($\chi^2 = 13.8064$, $p = 0.0002$), Cefepime ($\chi^2 = 33.8063$, $p = 0.0000$), Tetracycline ($\chi^2 = 13.5552$, $p = 0.0036$), ciprofloxacin ($\chi^2 = 13.2999$, $p = 0.004$), Levofloxacin ($\chi^2 = 20.3704$, $p = 0.0001$); except for the following antimicrobials: ampicillin ($\chi^2 = 6.5830$, $p = 0.0864$), Amoxicillin / Clavulanic A ($\chi^2 = 5.9873$, $p = 0.1122$), Gentamicin ($\chi^2 = 5.1083$, $p = 0.164$) Trimethoprim / Sulfamethoxazole ($\chi^2 = 4.5207$, $p = 0.2105$) no significant difference was observed. No strain of *Escherichia coli* was resistant to Imipenem during the study period. The interpretation of antimicrobial resistance profiles found can be considered prudent empirical Amoxicillin / clavulanate and Imipenem A as initial treatment of urinary tract infections in this population due to the high levels of sensitivity found in those isolates.

Keywords: *Escherichia coli*, uropathogenic, Bacterial Resistance, UTIs.

INTRODUCCIÓN

La etiología de las infecciones del tracto urinario (ITU) se ha considerado durante décadas bien establecidas y por tanto de escaso interés; un análisis de las series más recientemente publicadas permite comprobar que *Escherichia coli* sigue siendo el uropatógeno predominantemente aislado^{1,2,3,4,5,6}. Se estima que globalmente ocurren al menos 150 millones de casos de ITU por año⁷. En EE UU, 7 millones de consultas son solicitadas cada año por ITU. En el Perú se desconocen cifras exactas de su incidencia pero es muy probable que sean similares a las de EE UU⁸.

Las mujeres jóvenes son comúnmente afectadas por las ITU, con una frecuencia estimada de 0,5 a 0,7 infecciones por año; de ellas, el 25% al 30% desarrollará infecciones recurrentes que no están relacionadas con alguna anomalía del tracto urinario, ya sea funcional o anatómica⁷. La incidencia estimada en los hombres jóvenes con respecto a las mujeres de la misma edad es significativamente inferior: 5 a 8 infectados por 10 000⁹.

La ITU es la infección más frecuente en el medio hospitalario y la segunda en la práctica médica extrahospitalarias después de la infección respiratoria¹⁰. En la actualidad *E. coli* sigue siendo el microorganismo más frecuentemente aislado, en todos los tipos de infección urinaria y tanto en infecciones intrahospitalarias (50%) como extrahospitalarias (63%)¹.

La instauración precoz del tratamiento antibiótico constituye la medida más eficaz para reducir su morbimortalidad, ya que disminuye la gravedad de la infección y reduce el riesgo de que ésta ascienda a las vías urinarias superiores. Evidentemente, este tratamiento precoz comporta la prescripción empírica y el uso abusivo de un antibiótico^{2,4,12,13,14,15,16}.

Para que la antibioterapia sea lo más eficaz posible, el médico tiene que decidirla basándose en 2 pilares fundamentales: a) deducir qué bacteria tiene más probabilidades de ser la causa de la infección a partir de las características del paciente, especialmente su edad, sexo, estado de las vías urinarias, y antibioterapia previa, y b) deducir qué antibiótico es el más eficaz para aquella bacteria a partir de los datos locales de sensibilidad antimicrobiana^{12,17,18,19}.

La resistencia bacteriana de *E. coli* a los antibióticos se relaciona con el consumo de éstos ya que, la presión selectiva que ejercen, favorece la creación, adaptación y diseminación de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos²⁰. Las bacterias tienen defensas intrínsecas y extrínsecas que las protegen de los antibióticos, la resistencia bacteriana intrínseca es una característica inherente de las bacterias que evita la acción de los antibióticos, por ejemplo, algunas paredes celulares bacterianas impiden la entrada de los antibióticos o contienen bombas que expulsan a los antibióticos desde el interior de la célula. La resistencia bacteriana extrínseca o adquirida resulta de la exposición inadecuada de las bacterias a los antibióticos produciéndose cepas resistentes^[16]. En los últimos años se ha detectado una progresiva disminución en la sensibilidad de este microorganismo a los antimicrobianos utilizados habitualmente para el tratamiento de la ITU^{3,17,21}.

Tradicionalmente, el tratamiento de la ITU ha consistido en la prescripción de agentes antimicrobianos durante 5-10 días, pero en la actualidad se está haciendo hincapié en las ventajas que conlleva una terapia a corto plazo o incluso de dosis única, la cual mejora el cumplimiento del paciente, ocasiona una menor alteración de la flora intestinal, menor toxicidad y reduce el coste²². Para que un antimicrobiano pueda ser usado como terapia en dosis única de la ITU es preciso que reúna todas o algunas de las siguientes propiedades (aparte de ser activo *in vitro* frente a los patógenos urinarios comunes): alcanzar elevadas y prolongadas concentraciones en orina, tener una actividad bactericida rápida frente a *E. coli* y otros uropatógenos, ser bajo inductor de resistencias, no poseer resistencia cruzada con otros antibióticos y ser bien tolerado²².

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se ha establecido como “**Gold Standard**” frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado^{23,24}. Varias compañías fabrican paneles de CIM que contienen diluciones de uno o múltiples agentes antimicrobianos en un formato de microdilución en caldo. En los Estados Unidos, previo al uso de un producto comercial para aislamientos clínicos, este debe ser aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos). Cada prueba comercial tiene procedimientos con pasos únicos. Por ejemplo, el procedimiento de preparación del inóculo varía considerablemente de método a método.

La confiabilidad de cualquier prueba de susceptibilidad para detectar bacterias resistentes a los antimicrobianos depende del seguimiento preciso de las instrucciones²⁵.

Los Sistemas de microbiología automatizada MicroScan, están basados en un principio de fotometría-fluorometría. Están disponibles tres sistemas: (i) TouchSCAN-SR: un lector de panel semiautomatizado con sistema de manejo de datos, el lector leerá el panel manualmente y el sistema proveerá automáticamente una interpretación; (ii) AutoSCAN-4: un lector de panel automatizado con sistema de manejo de datos, el usuario carga el panel y el sistema leerá e interpretará el panel automáticamente y (iii) AutoSCAN- WA: un sistema completamente automatizado con automatización libre de supervisión y sistema de manejo de datos. Los componentes varían con el sistema, pero cada sistema viene con un sistema computadorizado de manejo de datos con opciones de interfaz a un computador central. El sistema MicroScan puede procesar paneles congelados o deshidratados²⁵.

El tratamiento antibiótico adecuado y oportuno de las ITU soluciona el problema en forma eficiente en la gran mayoría de los casos y evita la aparición de complicaciones como infecciones recurrentes, infecciones del parénquima renal e infecciones sistémicas. El tratamiento antibiótico se inicia inmediatamente tras la toma de muestra de orina, de forma empírica según consideraciones epidemiológicas, debiendo escogerse un antimicrobiano efectivo contra el microorganismo más probablemente involucrado tomando en cuenta los antecedentes del paciente. Esto implica que es necesario conocer la susceptibilidad *in vitro* de los agentes etiológicos de ITU, frente a los antimicrobianos de uso habitual, debido al fenómeno dinámico y en constante aumento de la resistencia bacteriana.

Por ello, en la actualidad es importante mantener una vigilancia de los perfiles de resistencia bacteriana en ITUs que permita dar orientaciones terapéuticas a nivel local y nacional, con lo cual se puede evitar la selección y diseminación de cepas resistentes. Por lo que en el presente trabajo se evaluó la Resistencia Bacteriana según el MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena, aislada en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope-EsSalud: Octubre, 2010 a Agosto, 2013.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo descriptivo y se realizó en dos períodos: (i) Período Retrospectivo (octubre 2010 a Diciembre 2012) se realizó un estudio de seguimiento epidemiológico de cada paciente, en el que se analizó los reportes clínicos de la Susceptibilidad antibiótica según MIC 90 de *Escherichia coli*, la bacteria causante de ITU más frecuente en el Hospital II Chocope-EsSalud y (ii) Período Prospectivo (Enero a Agosto 2013) se realizó un estudio de seguimiento epidemiológico, en el que se analizó la Susceptibilidad antibiótica según MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena aislados en pacientes hospitalizados y ambulatorios atendidos en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope - EsSalud.

Recolección de muestras de orina y aislamiento e identificación de *Escherichia coli*

Se recolectó muestra de orina para urocultivos en estrictas condiciones de asepsia. Luego se procesó de inmediato en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope-EsSalud. El urocultivo se realizó mediante siembra con asa calibrada (0.1 ul.) sobre la superficie de Agar Mc Conkey. Los cultivos fueron incubados a 35 °C y se realizó una lectura a las 18-24 horas de incubación.

Criterios de selección

Colonias medianas, circulares, convexas, bordes redondeados lisos, lactosa positiva con crecimiento en Agar Mac Conkey. Se consideró cultivo positivo cuando se obtuvo un recuento mayor o igual a 100.000 UFC/mL [14], los cultivos con recuentos menores a 100.000 UFC/mL se consideraron negativos ya que estos recuentos procedieron de pacientes con tratamiento antimicrobiano. Se realizó una coloración de Gram para identificar a los bacilos Gram negativos. Para asegurar la pureza del microorganismo de estudio, se realizó un cultivo puro a partir de los cultivos considerados positivos en agar Mac Conkey. Posteriormente, se realizó la Identificación de *Escherichia coli* simultáneamente con la Identificación e Interpretación de la Susceptibilidad Antibiótica según MIC 90 utilizando el Sistema Semiautomatizado Microscan®- 4.

Preparación del inóculo

A partir del cultivo puro, se seleccionó con un hisopo estéril la superficie de 4-5 colonias grandes ó 5-10 colonias pequeñas morfológicamente similares y bien aisladas, se emulsificó en 3 ml de agua

para inóculo (la turbidez final fue equivalente a la del patrón de turbidez Mc Farland 0,5). Se Agitó la suspensión durante 2-3 segundos y luego se Pipeteó 0,1 ml (100 µl) de la suspensión estandarizada en 25 ml de agua para inóculo. Con la suspensión estandarizada del microorganismo se inoculó e hidrató los paneles gram negativos, luego se incubaron durante un período mínimo de 16 horas a 35°C.

Identificación de *Escherichia coli* uropatógena (EcU)

La identificación de *Escherichia coli* uropatógena se analizó en el sistema semiautomatizado microscan®- 4 mediante códigos en base a criterios bioquímicos tales como: Glu, Suc, Sor, Raf, Rha, Ara, Ino, Ado, Mel, Ure, Tda, Ind, Lys, Arg, Orn, H₂S, Of/G, Vp, Onpg, Cit, Mal, Ace, Tar, Esc, Nit.

Identificación e interpretación de la susceptibilidad antibiótica según MIC 90

Existen 30 agentes antimicrobianos en los paneles gram negativos deshidratados: Ak, Aug, Am, A/S, Azt, Cf, Cfz, Cpe, Cft, To, Ctn, Caz, Caz/CA, Cax, Crm, Cp, Etp, Gm, Imp, Lvx, Mer, Mxf, Fd, Pi, P/T, Te, Tim, Tgc, Cf/CA y T/S, de los cuales para el estudio solo se tomaron como referencia a 10 antimicrobianos de diferentes familias: Am, Cf, Cpe, Imp, T/S, Gm, Cp, Lvx, Aug y Te.

Identificación de la susceptibilidad antibiótica según MIC 90

La identificación y pruebas de Susceptibilidad antibiótica según MIC 90, de las cepas aisladas se analizaron en el sistema semiautomatizado microscan®- 4. La lectura se fundamenta en la detección del crecimiento bacteriano por turbidez. La identificación se basó en la detección de cambios de pH, la utilización del sustrato y el crecimiento en presencia de agentes antimicrobianos después de 16-48 horas de incubación a 35 °C.

Interpretación de la susceptibilidad antibiótica según MIC 90

Para la interpretación de la Susceptibilidad antibiótica según MIC 90 se siguieron las siguientes normas: se determinaron cepas sensibles o resistentes de acuerdo con la concentración mínima inhibitoria, según los parámetros del **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**; las bacterias que se encontraban en un rango intermedio se asumieron como susceptibilidad disminuida¹⁸. Como el reporte del perfil de susceptibilidad sólo contemplaba las categorías sensible y resistente, la susceptibilidad disminuida correspondiente a la categoría intermedia se incluyó dentro de ella.

Captación de información

Periodo retrospectivo: la información de cada paciente fue obtenida de sus respectivas historias clínicas. Periodo prospectivo: la información sobre los urocultivos y antibiogramas de cada paciente fue obtenida de la base de datos del Laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope - EsSalud.

Recolección y análisis de datos

Los datos recolectados mediante el software LabPro versión 4.0 en el año 2010, 2011, 2012 y 2013 fueron de 91, 266, 478 y 617 aislamientos de EcU, respectivamente. Los datos de susceptibilidad antibiótica según MIC 90 de EcU de los pacientes atendidos en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope – EsSalud, durante Octubre 2010 a Agosto 2013, obtenidos mediante el software LabPro versión 4.0 fueron presentados en cuadros de doble entrada. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística X² con el software EPIDAT 3.1.

RESULTADOS

Se encontró que el mayor porcentaje de resistencia de EcU durante el periodo 2010-2013 a: AMPICILINA (87%-p>0,05-) fue en el 2013 (Fig. 1); a CEFALOTINA (63% -p<0,05-) fue en el 2013 (Fig. 2) y a CEFEPIMA (46% -p<0,05-) fue también en el 2013 (Fig. 3), asimismo, que ningún aislamiento fue resistente a IMIPENEM (p>0,05) durante dicho periodo (Fig. 4).

También se observó que EcU en el periodo de la investigación mostró el mayor porcentaje de resistencia a AMOXICILINA/ A. CLAVULÁNICO (14 % -p<0,05-) fue en el año 2013 (Fig. 5), a TETRACICLINA (76 % -p<0,05-) fue tanto en el año 2010 como 2013 (Fig. 6), a GENTAMICINA (35 % -p>0,05.) fue en el año 2013 (Fig. 7), a CIPROFLOXACINO (74 % -p<0,05-) fue en el año 2010 (Fig. 8), a LEVOFLOXACINA (66 % -p<0,05-) fue en el año 2013 (Fig. 9) y a TRIMETOPRIMA/ SULFAMETOXAZOL (84 % -p>0,05-) fue en el año 2010.

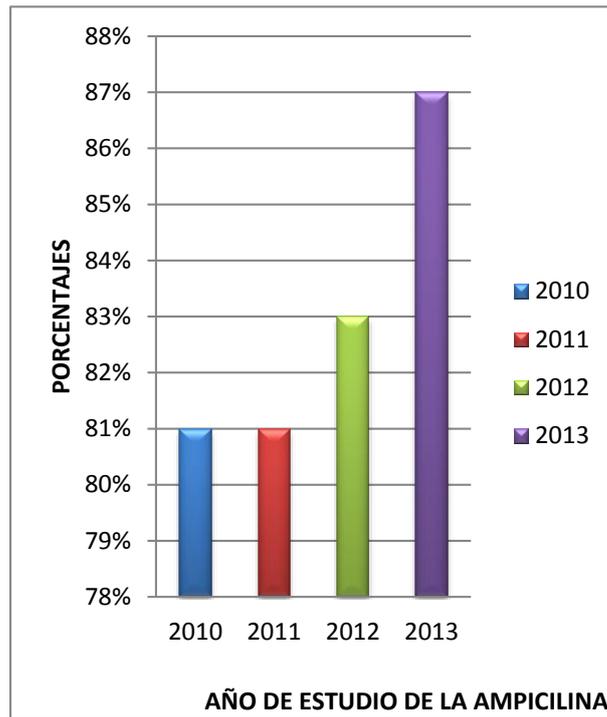


Fig. 1. Porcentaje de la Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli* para la AMPICILINA durante Octubre 2010 a Agosto 2013. * $p > 0.05$: la diferencia NO es significativa

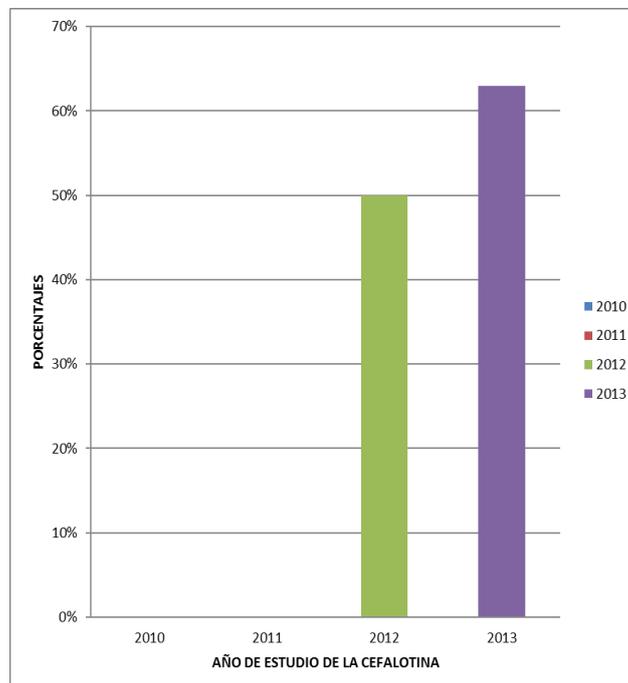


Fig. 2. Porcentaje de la Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli* para la CEFALOTINA durante Octubre 2010 a Agosto 2013. * $p < 0.05$: la diferencia es significativa.

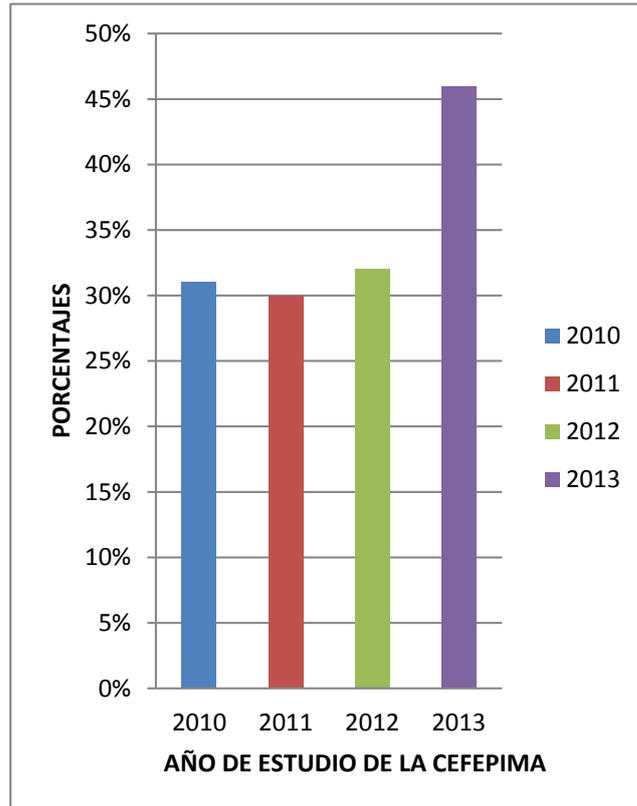


Fig. 3. Porcentaje de la Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli* para la CEFEPIMA durante Octubre 2010 a Agosto 2013. * $p < 0.05$: la diferencia es significativa

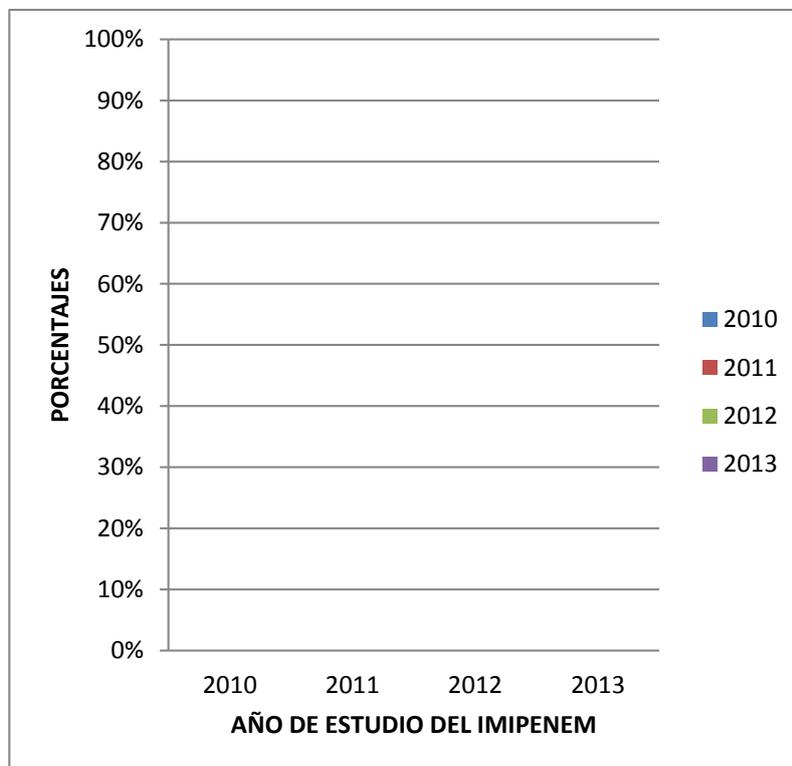


Fig. 4. Porcentaje de la Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli* para el IMIPENEM durante Octubre 2010 a Agosto 2013. *no se aislaron cepas de *Escherichia coli* resistentes

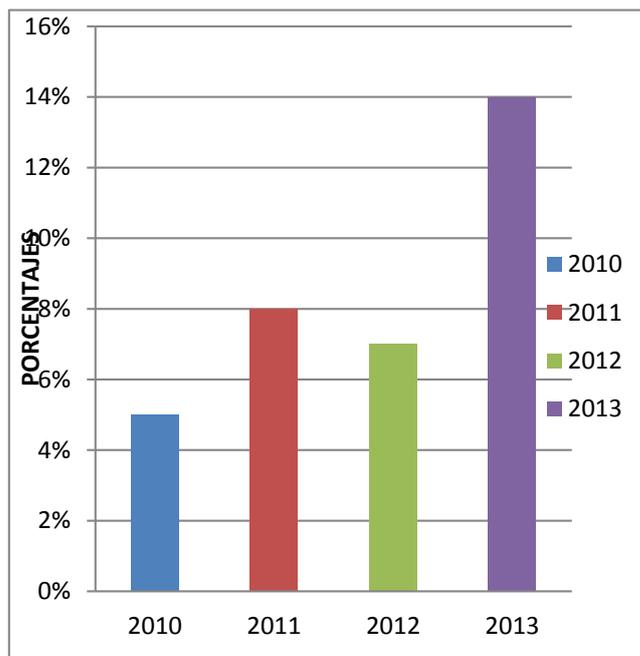


Fig. 5. Porcentaje de la Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli* para la AMOXICILINA/ A. CLAVULÁNICO durante Octubre 2010 a Agosto 2013. *p > 0.05: la diferencia NO es significativa

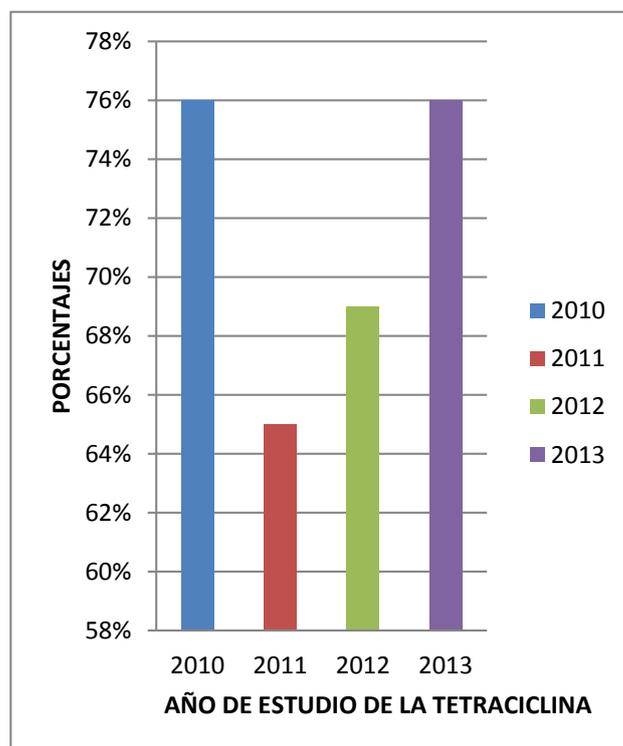


Fig. 6. Porcentaje de la Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli* para la TETRACICLINA durante Octubre 2010 a Agosto 2013. *p < 0.05: la diferencia es significativa

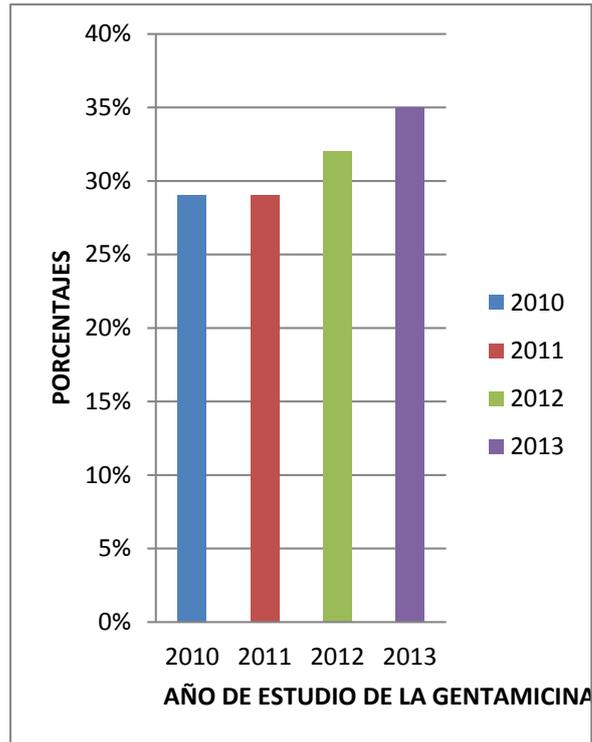


Fig. 7. Porcentaje de la Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli* para la GENTAMICINA durante Octubre 2010 a Agosto 2013. * $p > 0.05$: la diferencia NO

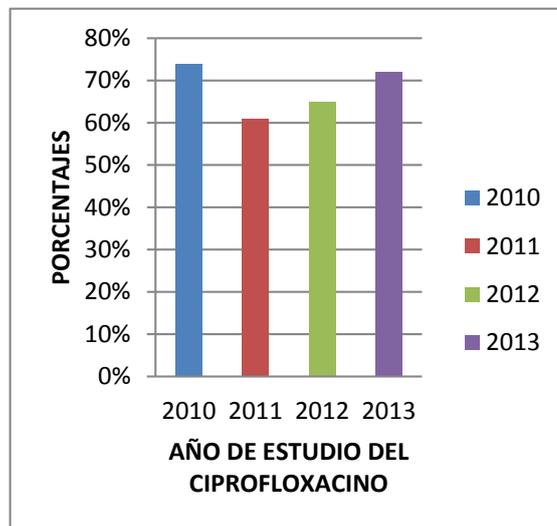


Fig. 8. Porcentaje de la Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli* para el CIPROFLOXACINO

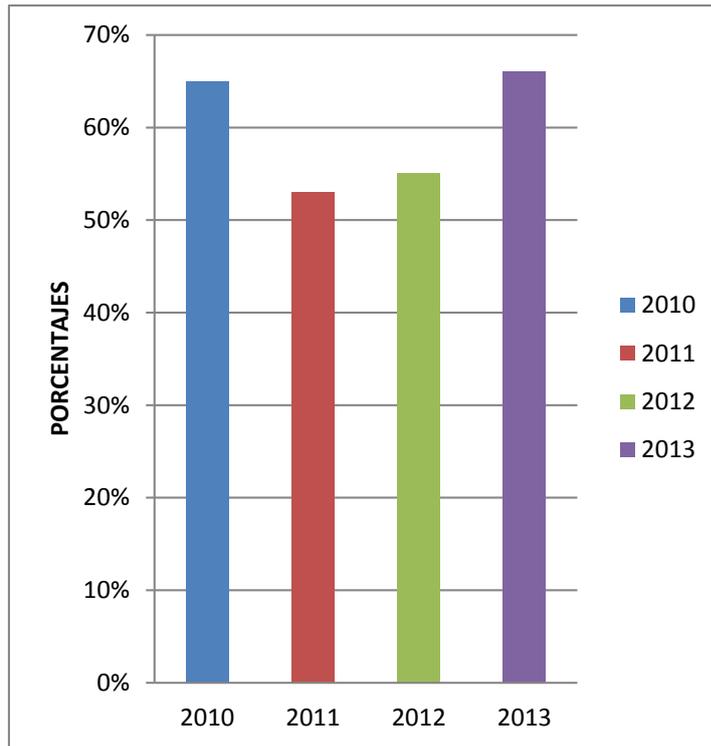


Fig. 9. Porcentaje de la Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli* para la LEVOFLOXACINA durante Octubre 2010 a Agosto 2013. * $p < 0.05$: la diferencia es significativa

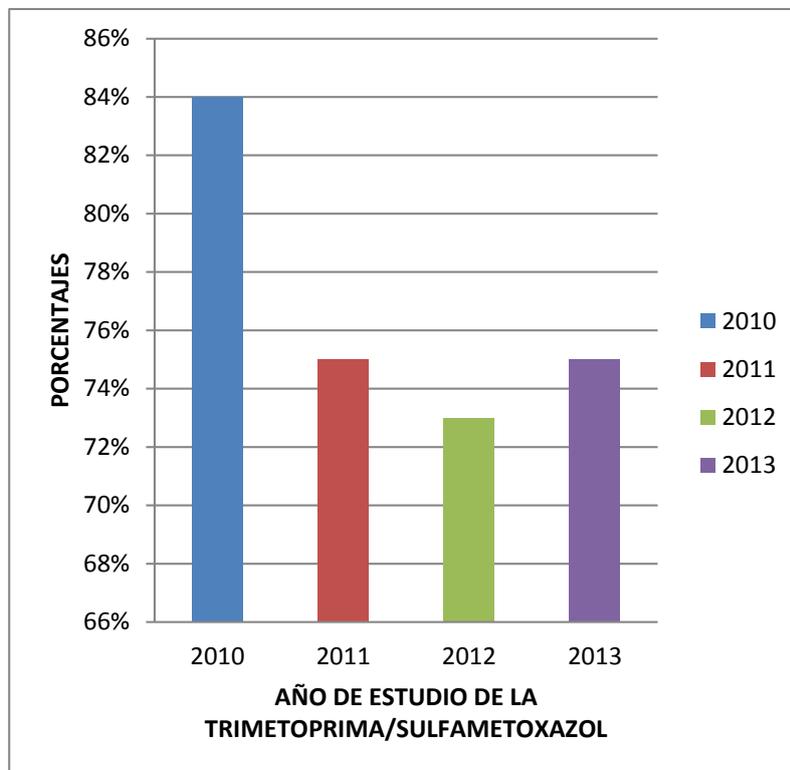


Fig. 10. Porcentaje de la Resistencia Antibiótica de *Escherichia coli* para la TRIMETOPRIMA/ SULFAMETOXAZOL durante Octubre 2010 a Agosto 2013. * $p > 0.05$: la diferencia NO es significativa

DISCUSIÓN

Comparando los reportes encontrados en el Hospital II Chocope-EsSalud con el de los hallados en los artículos se verifica que la mayoría de las ITUs son producidas por Bacilos Gram negativos de la familia Enterobacteracea, de los cuales *E. coli* es la bacteria que se encuentra con mayor frecuencia²⁶.

Los estudios para conocer los patrones de resistencia en los aislamientos de *E. coli* causante de ITU, son importantes al momento de elegir la terapia empírica más adecuada. El diagnóstico acertado, así como el tratamiento temprano de las infecciones urinarias, es de suma importancia, ya que además de que se resuelven los signos y síntomas del cuadro agudo, se evitan complicaciones secundarias. Debido a que el uropatógeno sembrado tarda hasta 72 horas en crecer, se recomienda iniciar un tratamiento empírico cuando se cuente con un examen general de orina sugestivo y/o una tinción de Gram de infección urinaria con base en los agentes etiológicos más frecuentes en la región donde se encuentra el paciente²⁷.

El incremento del consumo de antibióticos es una de las principales causas reconocidas del aumento de las resistencias bacterianas a los mismos²⁷. En el presente estudio se detectaron elevadas tasas de resistencia a ampicilina (84%), trimetoprima/ sulfametoxazol (74%), tetraciclina (72%), Ciprofloxacino (67%), levofloxacina (59%), cefalotina (58%), cefepima (37%), gentamicina (32%). La Sociedad Americana para las Enfermedades Infecciosas (IDSA) recomiendan no utilizar antimicrobianos en las ITUs cuando los estudios de vigilancia demuestren una prevalencia de resistencia >20.0%^{28,29}. También se detectaron antimicrobianos con una resistencia < a 20 % tal como la Amoxicilina/ A Clavulánico (8%); para el caso del Imipenem, no se observó cepas de *E. coli* resistentes. Estos porcentajes de resistencia resultan realmente importantes ya que son similares a los hallados en diferentes estudios en otros países lo que quiere decir que la resistencia que manejamos es comparable, y debemos acoger e implementar medidas para el control de esta resistencia³⁰.

De los antibióticos más frecuentemente usados en la práctica clínica, se observó una resistencia de *E. coli* a trimetoprim/ sulfametoxazol de 74 %, valor que se encuentra por encima de lo encontrado en países europeos donde la resistencia de *E. coli* a trimetoprim/ sulfametoxazol varía de 19,1% a 34,5%. En los Estados Unidos de Norteamérica la resistencia reportada fue de 16,1% en el 2001³¹.

La resistencia a trimetoprima/ sulfametoxazol (T/S) observada en nuestro estudio es semejante a la que halló Guajardo Lara y cols. (59.2%)²⁹ y Pinto (55%)³⁰. En España, se encontró una prevalencia de resistencia a T/S de 41.0% en aislamientos comunitarios de *E. coli* uropatógena. Debido a las elevadas tasas de resistencia a T/S, en algunas regiones se ha incrementado el uso de las fluoroquinolonas y cefalosporinas para tratar las ITU. La amoxicilina ha sido utilizada como antibiótico de primera línea para la infección del tracto urinario en niños. Sin embargo, el incremento en la prevalencia de resistencia en *E. coli* uropatógena la ha convertido en una opción menos aceptable. Otras opciones incluyen amoxicilina-ácido clavulánico o cefalosporinas, tales como cefalexina, cefixima o cefpodoxima³².

En la revisión realizada en Chile se destaca la alta resistencia a ampicilina (75%)³⁰. Un estudio para determinar la susceptibilidad bacteriana en Israel se encontró una resistencia de *E. coli* a ampicilina en 68%³³. En España, los resultados de estudios recientes indican una alta prevalencia (> 50%) de resistencia de *E. coli* a las aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina), lo que desaconseja su uso como tratamiento empírico³⁴.

En cuanto a los aminoglucósidos, Gentamicina, una resistencia de 32% encontrada en el presente estudio es superior al 14% registrado por Guevara Ducan y al determinado por Jones en España³², probablemente por el mayor uso del antimicrobiano en nuestro país, que corresponde a uno en vías de desarrollo con poco apoyo laboratorial en el diagnóstico de enfermedades. Por su lado, la resistencia de *E. coli* a ciprofloxacino fue de 67%, valor que se encuentra elevado en comparación con los Estados Unidos de Norteamérica y algunos países de Europa, donde la resistencia varía desde 0,7% a 21%.^[31] En otro estudio, en el caso de ciprofloxacino es preocupante el aumento progresivo de la resistencia (15%) debido probablemente, a su mala utilización³⁰.

En estudios relacionados con el grupo de las tetraciclinas, *E. coli* presentaron una sensibilidad de 41 % y 44 %³⁵, en el caso de nuestro estudio se obtuvo una alta resistencia de 72%. La resistencia a ciertos antibióticos se ha considerado clásicamente un problema hospitalario, en este contexto cabe destacar que el aumento de la resistencia a cefalosporinas de 3ª y 4ª generación se ha producido de forma significativa en aislamientos de *E. coli* implicados tanto en infecciones comunitarias como

nosocomiales³⁵. Las cefalosporinas de 1ª generación (cefalotina) se tiene en el presente estudio 58%, a diferencias a reportes previos con 43%, 45% de resistencia, en aumento para nuestro medio, motivado tal vez por el mal empleo de estos fármacos que en muchas ocasiones se adquieren sin prescripción médica y por dosis y tiempo inadecuado; este valor hallado difiere de lo reportado en el estudio extranjero 9%³². Las cefalosporinas de 4ª generación (cefepima) se tiene en el presente estudio 37%, en estudios hallados se encontró que cefepima presentó una sensibilidad de 96,9% sensibilidad intermedia 3,1% resistencia 0% [32], lo cual se observa una gran diferencia con los resultados obtenidos.

Entre los antibióticos con menor resistencia se encontraron imipenem 0% y Amoxicilina/ A. Clavulánico 8%; siendo la tasa de resistencia menor comparado con otros estudios donde la resistencia de *E. coli* a Amoxicilina/ A. Clavulánico varió desde 40%³⁰, mientras que la resistencia de *E. coli* a imipenem fue del 0% en el Reino Unido [31]. La baja resistencia a Imipenem y Amoxicilina/ A. Clavulánico nos señala como un antibiótico que ha sido poco utilizado mantiene intacta su actividad in vitro y puede considerarse como un antibiótico de primera línea.

Una vez realizado el análisis estadístico, se encontró que las variaciones de la resistencia observadas al Ciprofloxacino ($x^2= 13.2999$, $p= 0.004$) son significativas, al que la Cefolatina ($x^2= 13.8064$, $p= 0.0002$), Cefepima ($x^2= 33.8063$, $p= 0.0000$), Tetraciclina ($x^2= 13.5552$, $p= 0.0036$), Ciprofloxacino ($x^2= 13.2999$, $p= 0.004$) y Levofloxacina ($x^2= 20.3704$, $p= 0.0001$); a excepción de la Ampicilina ($x^2= 6.5830$, $p= 0.0864$), Amoxicilina/ A Clavulánico ($x^2= 5.9873$, $p= 0.1122$), Gentamicina ($x^2= 5.1083$, $p= 0.164$) y Trimetropina/ Sulfametoxazol ($x^2= 4.5207$, $p= 0.2105$). La resistencia al Imipenem se mantiene cero por ciento desde el comienzo hasta el final del estudio, es decir no se aislaron cepas de *Escherichia coli* resistentes.

Los resultados aquí presentados son consistentes con reportes previos que muestran una alta resistencia de los patógenos urinarios a la ampicilina y a algunas cefalosporinas, por lo que se hace necesario buscar otras opciones de tratamiento antibiótico. Los mecanismos de resistencia que han adquirido diferentes bacterias han hecho que la respuesta al tratamiento sea diferente; de lo cual se deriva la importancia de realizar seguimiento al manejo de estas infecciones y controlar el uso indiscriminado de antibióticos, la flora patógena y los índices de resistencia²⁷. Por lo tanto el aumento de las tasas de resistencia de las bacterias productora de infecciones urinarias de la comunidad, *Escherichia coli* uropatógena, conducen a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, entre las cuales debería tenerse en cuenta el uso de Amoxicilina/ A clavulánico e Imipenem debido a los altos niveles de sensibilidad encontrados en aquellos aislamientos.

Actualmente, la resistencia a antimicrobianos en la mayoría de los patógenos bacterianos prevalentes en clínica humana se ha convertido en un problema clínico, epidemiológico y de salud pública reconocido en todo el mundo. La aparición y diseminación de la resistencia a antibióticos es el resultado de un proceso de selección adaptativa en respuesta al uso de antibióticos. La eliminación de una población bacteriana sensible en presencia de un antibiótico permite la reproducción y diseminación sin competencia de los escasos microorganismos que son resistentes de una forma natural y, generalmente, debido al azar³⁵.

Existe una relación causa-efecto entre el consumo de antibióticos y el desarrollo de resistencia a estos fármacos. Sin embargo, esta relación es compleja, no siempre bien conocida y con frecuencia condicionada por otros factores, algunos de los cuales no están bien establecidos. El continuo desarrollo de nuevas moléculas de antibióticos ha paliado hasta la fecha la falta de eficacia de otras frente a las cuales se había desarrollado resistencia, pero puede llegar el momento en el cual nuestro arsenal terapéutico se vea superado por la rápida capacidad adaptativa de las bacterias³⁴.

Por tanto, es necesario establecer estrategias locales, nacionales e internacionales que nos ayuden a combatir eficazmente la resistencia a antibióticos, o al menos minimizar su impacto. La reducción del consumo innecesario o inapropiado de antibióticos y la vigilancia epidemiológica de la resistencia son algunas de las más importantes. El conocimiento detallado de la situación de la resistencia a antibióticos y sus tendencias evolutivas, mediante el establecimiento de estudios multicéntricos y de sistemas de vigilancia, debe ser el primer paso para la toma de decisiones que ayuden a su contención así como para la elaboración de protocolos de tratamiento Empírico⁴⁵.

CONCLUSIÓN

- *Escherichia coli* uropatógena en el periodo de estudio 2010- 2013 es resistente a los antimicrobianos: Cefolatina, Cefepima, Tetraciclina, Ciprofloxacino y Levofloxacina ($p < 0,05$) y sensible a: Ampicilina, Amoxicilina/ A Clavulánico, Gentamicina y Trimetropina/ Sulfametoxazol ($p > 0,05$). La resistencia al Imipenem se mantiene cero por ciento desde el comienzo hasta el final del estudio

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Horna Q, Silva D, Vicente T, Tamariz O. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de Ciprofloxacina en Bacterias Uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Rev Med Hered 2005; 16(1): 39- 43
2. Luis C. Infecciones de vías urinarias en el Hospital Universidad del Norte. Salud Uninorte. Barranquilla 2007; 23(1): 9-18
3. Alós J. Epidemio-etilogía de la infección urinaria comunitaria. Sensibilidad antimicrobiana de los principales patógenos y significado clínico de la resistencia. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23(4): 3-8
4. Eiros J, Bouza C, Ochoa S y Grupo Investigador del Proyecto. Perfil etiológico de las infecciones urinarias y patrón de sensibilidad de los uropatógenos. An Pediatr (Barc) 2007; 67(5): 61- 84
5. Ochoa C, Eiros J, Bouza, C, Mendez, L y Grupo de Estudio de los Tratamientos Antibióticos. Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos. Rev Esp Quimioterap 2005; 18(2): 124- 135
6. Seija V, Frantchez V, Marcos P, Bataglino N, Torales M, Díaz Á, Dufrechou C. Etiología de la infección urinaria de adquisición comunitaria y perfil de susceptibilidad de *Escherichia coli* a los principales agentes antimicrobianos. Rev Med Urug 2010; 26: 14-24
7. Members of the Jury of the Consensus Conference on nosocomial urinary tract infections (NUTI) in adult patients. Consensus conference 2002, short text / Médecine et maladies infectieuses 2003; 33:218- 222
8. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Am J Med. 2002; 113(1): 5- 13
9. Echevarría J, Sarmiento A, Osoreo S. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. Acta Med Per 2006; 23(1): 20- 25
10. Hooton T, Scholes D, et al. A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. N Engl J Med 2000; 335(7): 468-474
11. Rushon H. Urinary tract infections in children: epidemiology, evaluation and management. Pediatr Clin North Am 2000; 44: 1133-1169.
12. Andreu A, Planells I y Grupo Cooperativo Español para el Estudio de la Sensibilidad Antimicrobiana de los Patógenos Urinarios. Etiología de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad y resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos de primera línea. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Vall d' Hebron. Barcelona. España. Med Clin (Barc) 2008;130(13): 481-6
13. Martínez M. Infecciones urinarias complicadas: Revisión y tratamiento. Información Terapéutica Del Sistema Nacional de Salud 2004; 28(6): 138-143
14. Cornejo P, Juárez M, Velásquez, Acosta Q, Sandoval S, Sandoval E, Gordillo P, Volkow P, Fernández M. Patrones de resistencia bacteriana en urocultivos en un Hospital Oncológico. Salud pública de México 2007; 49(5): 330- 336
15. Junquera S, Loza E, Baquero F. Evolución del patrón de sensibilidad de aislados de *E. coli* en urocultivos procedentes del medio hospitalarios y extrahospitalario. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23: 197-201
16. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Métodos Básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Procedimientos en Microbiología Clínica. 2000
17. Caicedo S, Meneses D, Joaquín G, Imbachí R, Mahe D, Ramírez E. Etiología y resistencia bacteriana en infección de vías urinarias en el hospital universitario san José de Popayán, Colombia entre enero y diciembre de 2008. Revista Colombiana De Urología. 2009; 18(3): 45 – 52
18. Saavedra L. Servicio de Pediatría. Hospital de Fuenlabrada. Bases elección tratamiento racional 2006; 1: 22- 27 Guajardo C, Lara Q, González, Ayala G. Resistencia antimicrobiana en la infección urinaria por *Escherichia coli* adquirida en la comunidad. ¿Cuál antibiótico voy a usar. Salud pública de México 2009; 51(2): 155- 158
19. Sánchez J, Guillán C, Fuster C, García F, Jiménez M, García J. Sensibilidad Microbiana de *Escherichia coli* En Infecciones Urinarias Extrahospitalarias. Actas Urol Esp. 2003; 27(10): 783-787
20. Junquera S, Loza E, Baquero F. Evolución del patrón de sensibilidad de aislados de *Escherichia coli* en urocultivos procedentes del medio hospitalario y extrahospitalario. Enferm Infecc Microbiol Clin 2005; 23 (4): 197-201

21. Garau M, Latorre A, Sanz. Fosfomicina: un antibiótico infravalorado en infecciones urinarias por *Escherichia coli*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2001; 19(10): 462- 466
22. Poole K. Multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001; 4:500-8.
23. Martínez J, Sánchez F. Mecanismo de acción de los antibióticos. *Jano* 2007
24. Stephen J. Cavalieri A, et al. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana 2005.
25. Jones R. Global aspects of antimicrobial resistance among key bacterial pathogens. Results from the 1997-1999 SENTRY Antimicrobial Programs. *Clin Infect Dis*. 2001; 32: 1-156
26. Ferreira F, Olaya S, Zúñiga P, Angulo M. Infección Urinaria Durante El Embarazo, Perfil De Resistencia Bacteriana Al Tratamiento En El Hospital General De Neiva, Colombia. *Rev Colombiana Obstet Ginecol* 2005; 56(3): 239-243
27. Carranza R, Rodríguez H, Díaz F. Etiología y resistencia bacteriana de las infecciones urinarias en pacientes hospitalizados en el Centro Médico Naval 2003. *Rev Soc Per Med Inter*. 2003; 16(3): 54-60
28. Aguirre A, Plascencia H, Rivera M, Guerrero B, Murillo N. Resistencia de *Escherichia coli* en infecciones de vías urinarias en pacientes pediátricos del Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde". *Enf Inf Microbiol* 2007; 27(3): 83-87
29. Andreu A, Alós J, Gobernado M, Marco F, De la Rosa M, García R, et al. Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio nacional multicéntrico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005; 23:4-9.
30. Lázaro E, Madurga M, de Abajo FJ. Evolución del consumo de antibióticos en España, 1985-2000. *Med Clin* 2002; 118: 561-568.
31. Metlay J, Powers J, Dudley M, Christiansen K, Finch R. Antimicrobial drug resistance, regulation, and research. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 183-190.
32. Hendricks Bergey D., Holt J. Manual de determinación bacteriológica de Bergey. 2001
33. Manual de Procedimiento para Gram Negativo Deshidratado. Microscan® Siemens. Revised March 2009.
34. Andreu A, Alós J, Gobernado M, Marco F, De la Rosa M, García R, et al. Etiología y sensibilidad a los antimicrobianos de los uropatógenos causantes de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad. Estudio nacional multicéntrico. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005; 23:4-9.
35. Lázaro E, Madurga M, de Abajo FJ. Evolución del consumo de antibióticos en España, 1985-2000. *Med Clin* 2002; 118: 561-568.



Efecto de *Beauveria bassiana* sobre la mosca *Anastrepha* sp. y larvas del cogollero *Spodoptera frugiperda* en condiciones de laboratorio

Effect of *Beauveria bassiana* on the fly *Anastrepha* sp. and larvae of the armyworm *Spodoptera frugiperda* under laboratory conditions.

Pamela Arias López¹, Brenda Banda Banda¹, Renzo Bejarano de la Cruz¹, Diana Benites Salcedo¹ y Julio Arellano Barragán²

¹Estudiantes del tercer ciclo de la escuela Académico-Profesional de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. ²Docente principal del Departamento Académico de Química Biológica y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto entomopatógeno de *Beauveria bassiana* sobre la mosca de fruta *Anastrepha* sp. recolectada de huertos del Distrito de Simbal y sobre el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* extraído del campo de cultivo de la Facultad de Ciencias Biológicas. Se preparó PDA (Agar Papa Dextrosa) como medio de cultivo para el crecimiento de *Beauveria bassiana*. Para comprobar la patogenicidad de este hongo sobre las larvas de *Spodoptera frugiperda* se utilizaron seis placas de Petri con PDA colocándose una larva en cada una y posteriormente se inocularon las esporas del hongo sobre la superficie de éstas, observándose, luego de un proceso de incubación bajo condiciones de temperatura y humedad controlada, la formación de micelio blanco, comprobándose de esta manera el efecto insecticida de *Beauveria bassiana*; el mismo procedimiento se llevó a cabo para la evaluación de la patogenicidad en la mosca de la fruta *Anastrepha* sp. Se demostró que *Beauveria bassiana* es una alternativa clave para el manejo integrado de plagas, siendo de gran ayuda para reducir las pérdidas de los cultivos y por lo tanto puede ser utilizado para amortiguar el efecto de insecticidas químicos en el medio ambiente.

Palabras clave: Maíz, *B. bassiana*, *S. frugiperda*, *Anastrepha* sp., entomopatógeno.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the entomopathogenic effect of *Beauveria bassiana* on fruit fly *Anastrepha* sp. from orchards of Simbal district and on the corn armyworm *Spodoptera frugiperda* extracted from the field of the Biological Sciences Faculty. It prepared PDA (potato dextrose Agar) which served as culture medium for the growth of *Beauveria bassiana*. To evaluate the pathogenicity of the fungus on the larvae of *Spodoptera frugiperda* used six Petri plates with PDA by placing a larva in each and it were subsequently inoculated spores of the fungus on the surface. After a process of incubation under conditions of temperature and humidity-controlled, the formation of white mycelium, proving thus the insecticidal effect of *Beauveria bassiana*; the same procedure was carried out for the evaluation of the pathogenicity in fruit fly *Anastrepha* sp. It was demonstrated that *Beauveria bassiana* is a key alternative to the integrated pest management, being of great help to reduce the loss of crops and can therefore be used to cushion the impact of chemical insecticides in the environment.

Keywords: Corn, *B. bassiana*, *S. frugiperda*, *Anastrepha* sp., entomopathogen.

INTRODUCCIÓN

El control biológico de plagas contempla el fortalecimiento del control natural, la introducción de especies no-nativas de controladores y el uso de plaguicidas derivados de animales, plantas, hongos, bacterias, virus y minerales para prevenir, repeler, eliminar o bien reducir el daño causado por las plagas. Estos bioplaguicidas no pretenden sustituir los plaguicidas químicos, sino buscar métodos más amigables con el ambiente, como un componente del manejo integrado de plagas ¹.

Los bioplaguicidas constituyen un importante medio de control biológico de plagas en la agricultura, de comprobada efectividad en muchos países. El grupo más importante de hongos entomopatógenos son los deuteromicetos u hongos imperfectos, en los cuales se desconoce la fase sexual. Los géneros más importantes son *Beauveria*, *Verticillium*, *Metarhizium*, entre otros ².

El hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) se ha estudiado como agente de control de insectos plagas pertenecientes a diferentes órdenes. En cultivos de la agricultura urbana lo recomendaron para el control de varias especies que afectan a muchos cultivos hortícolas ².

Entre los principales problemas fitosanitarios que afectan a diversas frutas; destacan las plagas, presentándose gran cantidad de insectos con hábitos alimenticios diversos y cuya presencia en sí no determina que dañe al fruto. Las plagas más importantes por los daños directos al fruto, o indirectos (follaje y ramas) que causan son: mosca de la fruta, trips, hormigas entre otros ³.

Las moscas de la fruta están consideradas como una de las 10 plagas agrícolas de mayor importancia económica en el mundo. El género *Anastrepha* (Diptera: tephritidae) es endémico del nuevo mundo y está restringido a ambientes tropicales y subtropicales; se encuentra distribuido desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina ³.

El maíz es afectado por un conjunto de especies que son consideradas plagas de mayor o menor importancia ocasionando un elevado porcentaje de daño a la producción de esta planta siendo uno de las más comunes las larvas del cogollero *Spodoptera frugiperda* ⁴.

Por lo expuesto en los antecedentes, el presente trabajo de investigación formativa (TIF) tuvo como objetivos, determinar el efecto biocida de *Beauveria bassiana* contra *Anastrepha sp.* y *Spodoptera frugiperda*, en condiciones de laboratorio, la adquisición de destrezas y habilidades en el manejo de técnicas y uso de materiales de laboratorio, así como el conocimiento de los procesos bioquímicos involucrados en la actividad entomopatógena de *Beauveria bassiana* sobre *Anastrepha sp.* y *Spodoptera frugiperda*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

- Cepa de *Beauveria bassiana*, obtenida del laboratorio de Tecnología Enzimática, Entomopatógenos y Productos Naturales. Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Larvas y moscas de *Anastrepha sp.*, obtenidas de frutos (mangos y guayabas) en estado de descomposición de huertos del distrito de Simbal.
- Larvas de *Spodoptera frugiperda*, obtenidas de cultivos de maíz en la Universidad Nacional de Trujillo.

Preparación y esterilización de material

Los materiales de laboratorio tales como placas de Petri, matraces y tubos de ensayo, fueron esterilizados en la autoclave a 121 °C y a 1 atm de presión por 15 minutos. Para preparar el agar-papa-dextrosa (APD) se utilizó 20 g de papa blanca sin cascara cortada en trozos pequeños, 2 g de glucosa, 1.5 g de agar y 100mL de agua destilada, se esterilizó el medio de cultivo en la autoclave, se enfrió aproximadamente a 50°C y se le añadió el antibiótico Cloranfenicol 30mg/100mL y se dispensó en placas de Petri estériles para solidificar.

Colecta y crianza de moscas de *Anastrepha sp.*

Se obtuvieron los frutos en huertos del distrito de Simbal que mostraron señales de haber sido atacadas por el insecto, a partir de ellos se recolectaron las larvas de *Anastrepha sp.* para luego ser distribuidas en frascos en ausencia de luz para que éstas cambien de larva a pupa. Luego de dos semanas aproximadamente, las pupas evolucionaron a su fase adulta.

Colecta de las larvas de *Spodoptera frugiperda*

Las larvas fueron colectadas del cogollo de las plantas de maíz las cuales mostraron señales de haber sido afectadas por la larva del cogollero (perforaciones en las hojas).

Reactivación y propagación de *B. bassiana*:

A partir de la cepa de *B. bassiana*, conservada en frascos con soluciones a distintos valores de pH, se realizaron subcultivos en placas de Petri con medio Agar papa dextrosa, después se realizó la respectiva siembra del hongo en tubos de ensayo, asegurando así la reactivación de *B. bassiana*.

Evaluación del efecto entomopatógeno de *B. bassiana* sobre moscas *Anastrepha* sp. y larvas de *S. frugiperda*:

Para llevar a cabo la evaluación del efecto entomopatógeno, para cada espécimen, se trabajó con dos grupos: un control y un experimental. El grupo experimental fue inoculado por aspersión con una suspensión de 1×10^9 esporas de *B. bassiana* / mL, mientras que al grupo control negativo se le inoculó por aspersión solución salina fisiológica estéril, los dos grupos se colocaron en una cámara húmeda de incubación que contenía agua destilada estéril para realizar la evaluación.

Aislamiento de *B. bassiana* a partir de moscas *Anastrepha* sp. y larvas de *S. frugiperda*:

Bajo condiciones de asepsia, se tomó una porción del micelio de *B. bassiana* desarrollado tanto en las moscas como en las larvas y se sembró en placas de Petri con Agar papa dextrosa, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 5 días para la formación del micelio del hongo.

Identificación de *B. bassiana* a partir de moscas *Anastrepha* sp. y larvas de *S. frugiperda* colonizadas:

Al obtener el micelio de *B. bassiana* a partir de las larvas y moscas momificadas, se realizó su aislamiento a través de placas de Petri con PDA y una cámara húmeda, para luego identificar las estructuras de *B. bassiana* colocándolas sobre una lámina portaobjeto donde se le adicionó una gota de colorante de azul de lactofenol e inmediatamente se cubrió con una laminilla y se observó al microscopio.

RESULTADOS

En las Tablas 1 y 2, se observan los síntomas de *Anastrepha* sp. y *S. frugiperda* como consecuencia de su exposición a las esporas de *B. bassiana*, resaltando que fue la parálisis y pérdida de apetito, respectivamente, los que se observaron con mayor intensidad.

En las Figs. 1 y 2, se observa el porcentaje de colonización por *B. bassiana* sobre *Anastrepha* sp. y *Spodoptera frugiperda*, respectivamente. Se determinó que en el grupo experimental la colonización fue del 100%, comparado con el grupo control que representó el 0 % de colonización.

Tabla 1. Síntomas observados en adultos de la mosca de fruta *Anastrepha* sp. inoculados con *Beauveria bassiana*, en condiciones de laboratorio.

Síntomas	<i>Anastrepha</i> sp.	
	Experimental	Control
Pérdida de apetito	+	-
Vuelo errático	+	-
Parálisis	++	-
Melanización	+	-
Muerte	+	-
Aparición de micelio sobre las moscas muertas	++	-

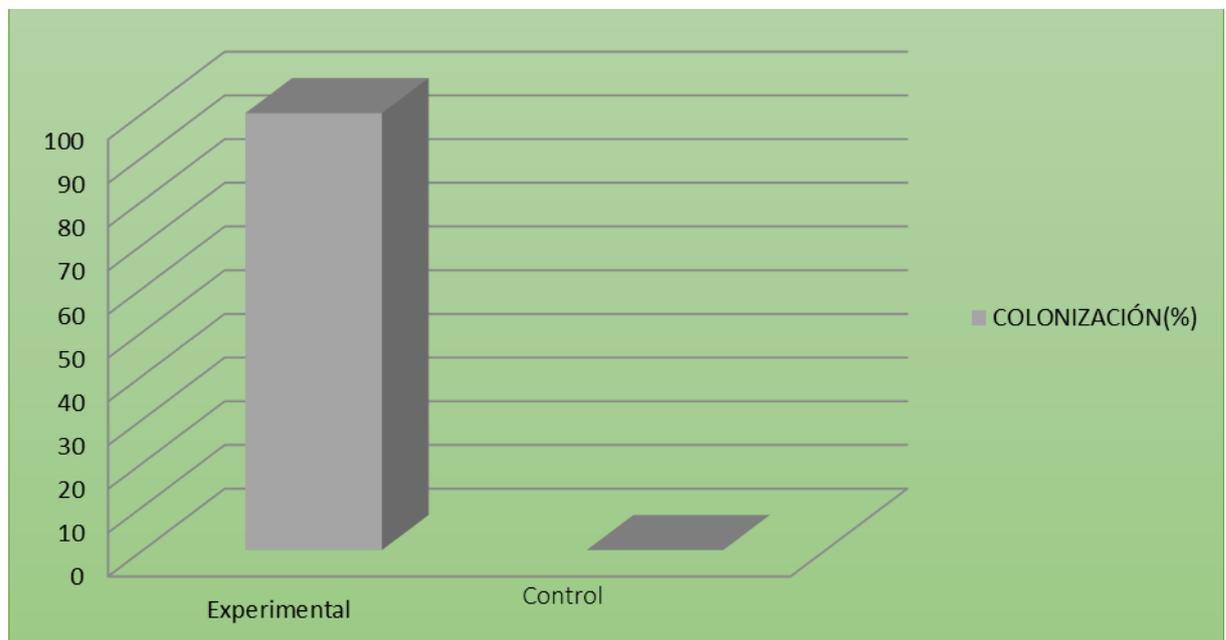
++: mayor incidencia de signos y síntomas, +: menor incidencia de signos y síntomas, -, ausencia de signos y síntomas

Tabla 2. Síntomas observados en las larvas del cogollero de maíz *Spodoptera frugiperda* inoculadas con *Beauveria bassiana*, en condiciones de laboratorio.

Síntomas	<i>Spodoptera frugiperda</i>	
	Experimental	Control
Pérdida de apetito	++	-
Vuelo errático	+	-
Parálisis	+	-
Melanización	+	-
Muerte	+	-
Aparición de micelio sobre las moscas muertas	++	-

++: mayor incidencia de signos y síntomas, +: menor incidencia de signos y síntomas, -, ausencia de signos y síntomas

Fig. 1. Porcentaje de colonización por *Beauveria bassiana* sobre moscas de *Anastrepha* sp. del grupo experimental en comparación con el grupo control negativo.

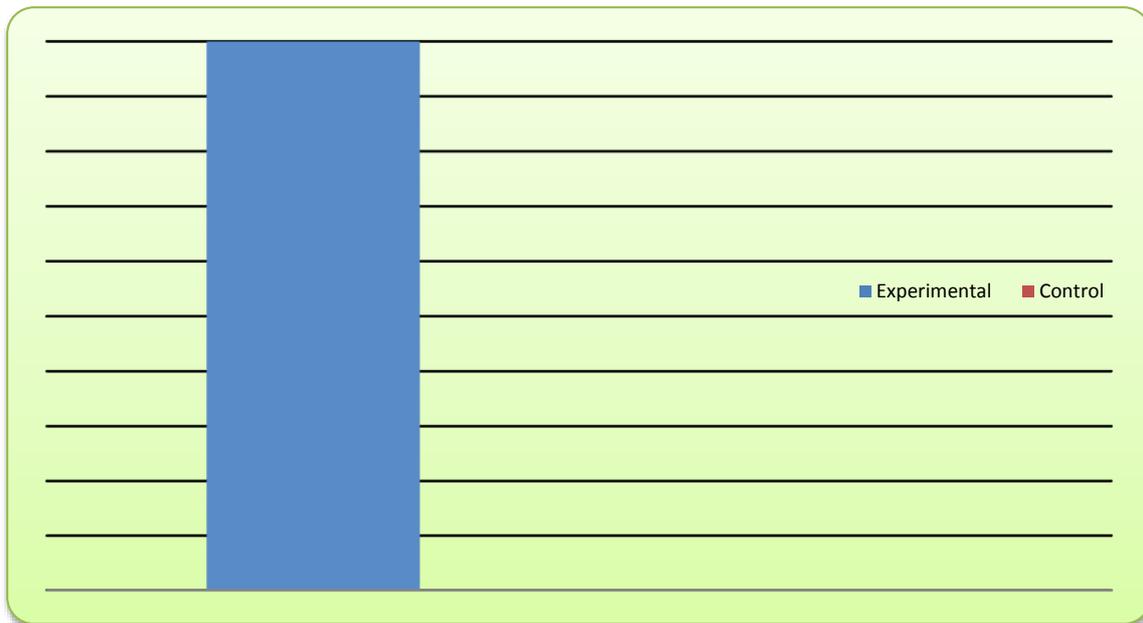


DISCUSIÓN

Los hongos entomopatógenos pueden ocasionar enfermedad y propagarse en la población de artrópodos, dependiendo de las interacciones y factores relacionados con: el patógeno (patogenicidad, virulencia, dispersión, germinación de las conidias y persistencia), el hospedero (susceptibilidad, densidad, distribución y comportamiento) y el medio ambiente (abióticos: temperatura, humedad, viento, lluvias y bióticos: parásitos, depredadores, planta - huésped) ^{5, 6}. Son considerados como los patógenos más promisorios contra insectos, ya que pueden infectarlos directamente a través de la penetración de la cutícula y poseen múltiples mecanismos de acción que les confieren una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia ^{7, 8}.

La evaluación del efecto entomopatógeno de acuerdo a los síntomas que posiblemente presentaron los especímenes adultos de la mosca *Anastrepha* sp. (Tabla 1) y larvas de cogollero *Spodoptera frugiperda* (Tabla 2), luego de ser inoculados con *Beauveria bassiana*; se debería a la acción propia del hongo y por la producción de toxinas en el hemocele, que actúan como inhibidores de las reacciones de defensas del hospedero, destruyen la hemolinfa, núcleos de las células y afectan al sistema nervioso.

Fig. 2. Porcentaje de colonización por *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* del grupo experimental en comparación con el grupo control negativo.



El proceso infectivo de un hongo entomopatógeno ocurre bajo condiciones de humedad y temperatura favorables, pero si éstas no se dan, el hongo producirá estructuras no infectivas llamadas conidias en forma de resistencia y reproducción vegetativa del hongo, con paredes gruesas y abundantes sustancias de reserva, con las que sobrevivirá frente a las condiciones adversas ⁹. Cuando las condiciones climáticas son adecuadas, las conidias germinan y producen conidias infectivas, dando inicio nuevamente al ciclo biológico del hongo ¹⁰.

Las esporas son las que infectan a *Anastrepha* sp. y *S. frugiperda*; el desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto^{5,10}.

La primera fase de adhesión y germinación empieza depositándose las esporas en la cutícula del insecto. Es con la cutícula con la que tienen el primer contacto las conidias, las características tanto físicas como químicas ayudan en la unión de ambos, algunas glicoproteínas pueden servir como receptor específico para las conidias. Para la germinación, las células del extremo de las hifas son las que permiten adherirse a la superficie cuticular ^{5,10}.

La penetración de la cutícula del insecto por las conidias germinadas se ocasiona como resultado de una combinación entre la degradación enzimática de la cutícula (proceso químico) y la presión mecánica por el tubo germinal (proceso físico), se desarrolla el apresorio, una estructura celular que ejerce presión contra las capas cerosas del exoesqueleto, al mismo tiempo que libera varios tipos de enzimas (quitinasas, cutinasas) ¹¹.

Las lipasas, proteasas y quitinasas liberadas al comienzo de la germinación de la espora; tienen un efecto específico sobre la epicutícula (capa externa), las lipasas, desintegran los lípidos que la constituyen y la quitinasa desintegra a la quitina, que le da la resistencia a la cutícula; del mismo modo el resto de proteínas de la cutícula son desintegradas por enzimas proteolíticas producidas por el hongo las cuales producen la histólisis de los tejidos ablandándolos y permitiendo la infección del hongo ⁹.

La germinación de las conidias sobre la cutícula depende en gran parte de la humedad ambiental, temperatura y en menor grado de las condiciones de luz o de su balance nutricional. El resultado de la germinación da como origen a las hifas, y la penetración de las hifas del hongo no depende necesariamente del porcentaje total de germinación sino del tiempo de su duración, modo, agresividad del hongo, el tipo de conidia y la susceptibilidad del hospedero ⁵. Los estimuladores y los inhibidores

de la germinación se encuentran en la cutícula por lo que el hongo debe estar adaptado a las condiciones de su superficie ¹².

Indudablemente, muchas enzimas patogénicas son importantes al determinar la virulencia debido a que permiten al patógeno coexistir con el proceso de cambios metabólicos asociados al estado de la enfermedad del hospedero ¹³. Sin embargo, las enzimas no son el único factor que influye en el fenómeno de la virulencia, o en el éxito del proceso de la infección. Otros factores pueden ser el éxito de la adhesión de la conidia a la cutícula, presencia de ácidos grasos en la superficie de la cutícula, crecimiento fúngico antes de la penetración, y la producción y regulación de otras toxinas ¹².

Los hongos pueden evitar la defensa inmune de un insecto por desarrollo de protoplastos que no son reconocidos por la población de hemocitos del insecto, formando cuerpos hifales multiplicándose y dispersándose rápidamente, produciendo micotoxinas ⁵. Las toxinas como beauvericina, beauverolides, bassianolides, isarolides, ácido oxálico, destruxinas a, b, c, d, y Cytochalasinas causan la muerte del insecto debido a la degeneración de los tejidos, producto de la pérdida de la integridad estructural de las membranas seguido de la deshidratación de las células por pérdida de fluido ^{13,14}.

El crecimiento de un micelio blanco, algodonoso, característico de *B. bassiana*, en la superficie de la mosca y larva del cogollero, confirmó que no hubo contaminación por otros organismos y que el porcentaje de colonización fue del 100% para el grupo experimental (Figuras 01 y 02). Para el caso del control negativo, se trabajó bajo las mismas condiciones, pero con la inoculación de solución salina fisiológica estéril, para comprobar que al no apreciarse crecimiento de micelio ni contaminación, las larvas y las moscas, del grupo experimental murieron a causa la infección por *B. bassiana*.

La identificación del hongo mediante microcultivo, permitió comprobar que el micelio presente sobre *Anastrepha* sp. y *S. frugiperda*, fue *B. bassiana* ¹⁵.

CONCLUSIONES

- En condiciones de laboratorio la cepa de *Beauveria bassiana* fue patógena para la mosca de fruta *Anastrepha* sp. y larvas del cogollero *Spodoptera frugiperda*, alcanzando porcentajes de colonización del 100%.
- Se lograron conocer los procesos bioquímicos involucrados en la acción entomopatógena de *B. bassiana* sobre *Anastrepha* sp. y *Spodoptera frugiperda*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carballo M. Control biológico de plagas agrícolas. 1ra ed. Managua: Catie; 2004.
2. González M. Efecto in vitro de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. Universidad de Cienfuegos, Cuba; 2011.
3. Munro k. Paquete para el cultivo de mango en el estado de colima. Comité Estatal de Sanidad Vegetal, México; 2005.
4. Soto J. Caracterización molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y evaluación de su toxicidad sobre gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*, Instituto Politécnico Nacional, Sinaloa, México; 2008.
5. Tanada Y, Kaya H. Insect Pathology. Academy Press. Mac Graw Hill. New York; 1993.
6. Vargas J. Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* y su virulencia en *Phthorimaea operculella*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ingeniería Agrícola. Perú; 1995.
7. Ferrón P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. Burgess HD, editor. Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. 1981; 24: 465-482.
8. Hayek A, Leger R. Interactions between fungal pathogens and insect host. Ann Rev Entomol 1994; (39): 293- 322.
9. Méndez S, Lage A, Donald WR. Detección de hongos Entomophthorales patógenos a insectos fitófagos, al sur de Bahía, Brasil. Entomotropica 2001; 16(3): 203-206.
10. Humber RA. An alternative view of certain taxonomic criteria used in the Entomophthorales (zygomycotina). Mycotaxon 1981; (13): 191-240.
11. Gongora BCE, Marin MP, Benavides MP. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. Avance técnico 348. Cenicafé; 2009.
12. Romaña CA. Potencial for triatoma biological control. Proc Intern Workshop on Pop Genet and Control of Triatominae. Santo Domingo de los colorados. Ecuador. 1996: 87-88.

13. Champlin FR, Cheung PYK, Pekar S, Smith RJ, et al. Virulence of *Beauveria bassiana* mutants for the pecan weevil. *J Econ Entomol.* 1981; 74: 617-621.
14. Rosas-Acevedo J, Boucias LDG, Lezama R, Sims K, Pescador A. Exudate from sporulating cultures of *Hirsutiella thompsonii*, inhibit oviposition by the twospotted spider mites *Tetranychus urticae*. *Appl Experim Acarol* 2003; 39: 213-225.
15. Zarate J. Empleo de microorganismos entomopatógenos para el control biológico de mosca doméstica *Musca domestica*. Tesis. México: Universidad Autónoma de Nueva León. Facultad de Ciencias Biológicas; 1997.



Efecto de antígenos de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* obtenidos a diferentes tiempos de incubación sobre anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*.

Effect of antigens of *Trypanosoma cruzi* epimastigote obtained at different times of incubation on antibodies produced in *Oryctolagus cuniculus*

Meily Mezarina-Sánchez¹, Greicy Valdera-Torres¹, Fernanda Vásquez-Miranda¹, Nelida Velezmoro-Casanova¹, Yolanda Vértiz-Vereau¹, Hermes Escalante-Añorga²

¹Escuela AP de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo (UNT), Trujillo, Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología, UNT.

RESUMEN

La técnica de Western blot es usada para confirmar el diagnóstico de diversas enfermedades parasitarias y está siendo estandarizada para la Enfermedad de Chagas, por ello es necesario resolver algunas interrogantes que permitan su mejor aplicación. Una de ellas es, cuál es el efecto de antígenos de excreción-secreción de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa C1 aislada de *Triatoma infestans* de Arequipa (Perú) obtenidos a seis y 18 horas de incubación, sobre anticuerpos producidos en conejo, *Oryctolagus cuniculus*, mediante la técnica de Western blot. Para ello, se emplearon sueros de conejos inmunizados con preparaciones antigénicas obtenidas a las seis y 18 horas de incubación en medio mínimo esencial (MEM-Eagle Difco), analizándose su reactividad mediante la técnica de Western blot. Se evidenció la presencia de seis bandas reactivas cuando se usaron los antígenos obtenidos a las seis horas de incubación y 15, cuando se usaron los antígenos obtenidos a las 18 horas, estas últimas, además, muestran mejor reactividad. En conclusión, a menor tiempo de incubación se producen menor número de antígenos de excreción-secreción detectados por la técnica de Western blot.

Palabras clave: Western blot, epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, *Oryctolagus cuniculus*

ABSTRACT

The Western blot is used to confirm the diagnosis of various parasitic diseases and is being standardized for Chagas disease, so it is necessary to resolve some questions that enable improved implementation. One is, what is the effect of excretory-secretory antigens of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* strain isolated from *Triatoma infestans* C1 of Arequipa (Peru) obtained six and 18 hours of incubation on antibody produced in rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, by Western blot technique. For this purpose, sera of rabbits immunized with antigenic preparations obtained at six and 18 hours of incubation in minimal essential medium (MEM-Eagle Difco), analyzed for reactivity by Western blot technique was used. The presence of six and 15 reactive bands were revealed when the antigens was obtained at six and 18 hours of incubation, respectively, the latter group of bands also show better reactivity. In conclusion, shorter incubation fewer excretory-secretory antigens detected by Western blot occur.

Keywords: Western blot, epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Oryctolagus cuniculus*

INTRODUCCIÓN

Endémica en 18 países de América Latina, la enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*, que puede transmitirse por triatominos, transfusiones de sangre, accidentes de laboratorio, trasplante de órganos o de modo vertical^{1,2}. En 2008, la Organización Mundial de la Salud La Salud (OMS) estimó que alrededor de ocho millones de personas fueron infectados de los cuales aproximadamente 11 000 mueren por año³. En el Perú, la mayoría de casos se presentan en la zona sur y nororiente, sin embargo, el parásito se encuentra distribuido en casi todos los departamentos^{4,5,6}

A pesar de décadas de esfuerzos, todavía no existe una prueba gold standar para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y varias organizaciones internacionales han subrayado recientemente la necesidad de mejorar las pruebas de diagnóstico serológico⁷. Para este fin, muchos grupos de investigación han desarrollado una gama de ensayos serológicos utilizando como métodos, en la mayoría de casos, a la inmunofluorescencia indirecta (IFA), hemaglutinación indirecta (HAI) y ELISA; los antígenos utilizados en estos últimos ensayos han incluido parásitos completos, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes y antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas (TESA), de los cuales los últimos han mostrado ser de promisoría eficacia cuando se usa la técnica de Western blot; desafortunadamente, la producción de antígeno TESA requiere de sofisticadas instalaciones para cultivos celulares o medios de cultivo no disponibles en la mayoría de laboratorios^{8,9,10,11}.

Sin embargo, una alternativa es la obtención y uso de antígenos de los epimastigotas que, como se sabe, son formas evolutivas de *T. cruzi* que han sido clásicamente cultivados en medios a base de sangre con relativa sencillez, de modo que constituyen una buena fuente de anígenos; en efecto, estos han sido probados utilizando el ELISA^{12,13,14}, pero no el de Westen blot que, a diferencia del anterior, es más específico.

La presente investigación estuvo orientada a determinar el efecto en la producción de anticuerpos en conejo, *Oryctolagus cuniculus*, inmunizados experimentalmente con proteínas de excreción-secreción de epimastigotas de la cepa C2 de *Trypanosoma cruzi* aisladas de *Triatoma infestans* en la ciudad de Arequipa, obtenidas a dos tiempos diferentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Parásitos:

En el estudio se utilizó una población de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, denominada C1, obtenida de *Triatoma infestans* recolectada en el valle de Vitor (Arequipa Perú) y mantenida por cultivos sucesivos en medio 3N⁶

Proteínas de excreción-secreción^{8,11}

Las formas epimastigotes C1 de *T. cruzi* fueron cultivadas en 20 tubos de 25x150mm, estériles, con medio bifásico constituido por BHI, fase sólida (10mL), y PYLB fase líquida (7mL). La siembra se hizo a partir de dos tubos procedentes del mantenimiento de la cepa, a razón de 0.5 mL por tubo. Cumplidas 140 horas, se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min y se descartaron los sobrenadantes. Posteriormente, fueron cultivados en Eagle's Minimum Essential Medium SIGMA® (MEM), luego, se centrifugaron nuevamente por 5 minutos. La biomasa de tripomastigotes reagrupados fueron traspasados a un solo tubo de 13x100mm, nuevo y estéril, provisto con tapón de jebes estéril, con Minimum Essential Medium Eagle (MEM) en proporción 1:3 y aditivado con Penicilina G sódica 1 000 000 UI (0.5 mL/100mL) y Gentamicina 160 mg (0.25mL/100mL), a 37°C, separadamente, por seis y 18 horas. Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 4000 rpm por 5 min para separar los antígenos de excreción-secreción producidos, presentes en el sobrenadante, los cuales fueron almacenados en tubos Eppendorf a -20°C debidamente rotulados. Según disponibilidad, previamente se añadieron inhibidores de proteasas. La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford

Sueros

0.5 mL de las proteínas de excreción-secreción fueron inoculados, por la vía intramuescular, a ejemplares de conejo, *Oryctolagus cuniculus*, de raza neozelandesa, machos, de dos meses de edad en

tres ocasiones, con intervalos de una semana: la primera mezclada con coadyuvante de Freud, completo, y las tres restantes con coadyuvante incompleto.

La técnica de Western blot^{8,11}.

Se hizo siguiendo el protocolo establecido en trabajos previos, con las siguientes particularidades: cada suero fue preparado a la dilución 1/50 en PBSTWEEN®20, se conformó un “pool” de sueros de conejo, se colocaron 500uL de la solución bloqueadora preparada previamente y 10uL de los sueros previstos, en cada uno de los canales de ensayo. Las tiras de nitrocelulosa con los antígenos de excreción-secreción, fueron enumeradas en orden progresivo y colocadas en placas, las mismas que fueron incubadas durante 1 hora con agitación constante. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-TWEEN®20; a temperatura ambiente, todas durante 5 mins. y con agitación constante.

RESULTADOS

Se evidenció mediante la observación de bandas antigénicas de diferentes pesos moleculares, la presencia de anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus* inducidos por los antígenos de excreción/secreción de epimastigota de *T. cruzi*, como se muestra en la Fig.1

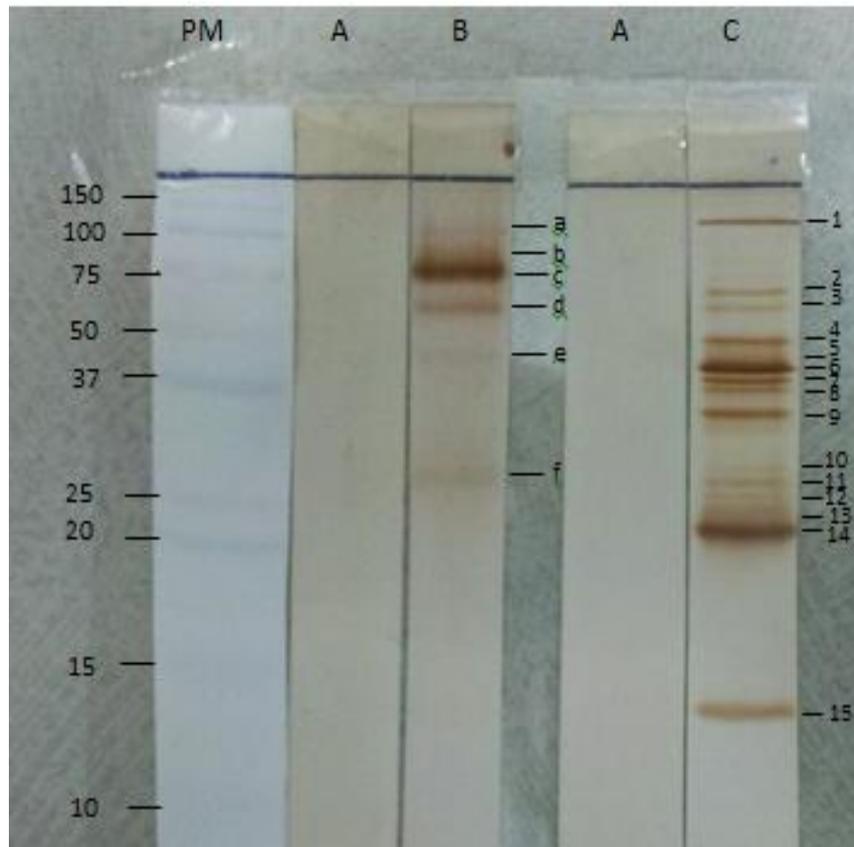


Fig. 1. Antígenos de excreción/secreción obtenidos a 6 y 18 horas de incubación de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* en Medio Mínimo Esencial reconocidos por anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizados experimentalmente. (PM) Peso molecular; (A) Suero pre-inmune; (B) Suero hiperinmune a seis horas: (a) 100kDa, (b) 70kDa, (c) 51kDa, (d) 38kDa, (e) 28kDa, (f) 13kDa; (C) Suero hiperinmune a 18 horas: (1) 100kDa, (2) 58kDa, (3) 51kDa, (4) 43kDa, (5) 38kDa, (6) 37kDa, (7) 34kDa, (8) 32kDa, (9) 26kDa, (10) 24kDa, (11) 22kDa, (12) 29kDa (13y14) 19kDa, (15) 13kDa.

DISCUSIÓN

Los investigadores de la enfermedad de Chagas coinciden que ésta es una enfermedad silenciosa que, a diferencia de la mayoría de enfermedades infecciosas, compromete la salud del parasitado cuando han pasado muchos años de la interacción con el protozooario y los daños que éste, poco a poco, produce determinan la formación de un cuadro dramático e incurable puesto que los medicamentos disponibles no son efectivos^{15,16,17}. Esto justifica la ejecución de investigaciones que permitan una rápida detección de los infectados a fin de que, en etapas tempranas de la infección, se proponga un esquema de tratamiento. Un de ellas es, la técnica de Western blot (Wb) que ha demostrado ser tan sensible como ELISA y específica como IFI⁷.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de Wb revelaron la presencia de 15 componentes antigénicos de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* y a su vez las variaciones en el perfil antigénico entre los corridos, tanto en el número como en la intensidad de bandas, destacando que a mayor tiempo de incubación los antígenos son más específicos ya que son de menor o mediano peso molecular, porque a seis horas aparecen pocas bandas. Este fenómeno se produce porque, usualmente, el parásito tiene un metabolismo lento comparado con otros protozoarios, aspecto que se traduce en la excreción de poca cantidad de proteínas a las seis horas. Otras investigaciones en las que se aplica el Wb con los productos excretados secretados también mostraron tiempos de incubación apropiados entre 18 y 24 horas^{8,10,11,13}. Sin embargo, esto tal vez podría revertirse utilizando mayor número de epimastigotes en el cultivo para compensar el poco tiempo de incubación en el medio mínimo esencial, porque, lógicamente un buen atributo de una eficaz técnica de diagnóstico es la rapidez en la obtención de sus componentes porque mejora su eficiencia y en su aplicación porque mejora su eficacia, y la técnica Wb carece de ello.

La similitud observada en el patrón antigénico reconocido por los diferentes tiempos de incubación especialmente dentro del rango comprendido entre 70 y 19 kDa, destacan los componentes de peso molecular de 70,37 y 19 kDa, representados en el Wb como bandas más intensas entre las 6 y 18 horas de incubación. Esto resulta bueno si las bandas reactivas que aparecen a las seis horas de incubación, sobre todo la de 38 kDa, serían reconocidas como bandas diagnósticas, porque significaría que la sola aparición de esta banda permite confirmar el diagnóstico, como ocurre con otras infecciones^{7,11}; sin embargo, este aspecto requiere de mayores pruebas.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que es bueno obtener una técnica de Wb usando antígenos de excreción secreción de las formas de epimastigota de *T. cruzi*, ya que son mucho más fáciles de obtener in vitro, y en grandes poblaciones, que los de tripomastigotas que requieren una previa transformación (metaciclogenesis), aspecto que demanda mayor tiempo y un medio de cultivo adicional^{10,11}, aun cuando el uso de antígenos de tripomastigotas es más plausible porque los estas formas son las patógenas¹⁸. Otro aspecto que debiera tomarse en cuenta es que el Wb, al ser más específico que otras técnicas serológicas, permite descartar la presencia de otras infecciones endémicas en el Perú, como la leishmaniasis^{19,20}.

CONCLUSIÓN

- Se evidenció la presencia de un mayor número de bandas antigénicas a las 18 que a las seis horas de incubación de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* C1 aislada de *Triatoma infestans* de Arequipa (Perú) en MEM-Eagle reconocidos por anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizados experimentalmente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carod-Artal FJ, Gascon J. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol* 2010; 9:533-542
2. Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Dereloux M, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:556-570
3. Nuns MPC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, et al. Chagas disease Nuns MPC, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am College Cardiol* 2013; 2(9):767-776

4. Hunter GC, Barrini-Mayori K, Ancca-Juarez J, Castillo-Neyra R., et al. A field of alternative targeted screening strategies for Chagas disease in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(1): e1468
5. Solís H, Huamán A, Ferrer A, Tarqui K, et al. Comunicación preliminar sobre la presencia de *Trypanosoma cruzi* en departamentos del norte y nororiente del Perú. *An Fac med* 2012; 73(1): 43-46
6. Vega CS, Náquira VC. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas). Inst Nac de Salud. Lima. Perú. 2006.
7. Luquetti AO, Schnmunis GA. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. En: Telleria & Tibayrenc (eds.), *American Trypanosomiasis, Chagas Disease: One hundred years of research*. Amsterdam: ELSEVIER, 2010; pp.744-792
8. Escalante H, Davalois A, Reyes W. Eficiencia de la técnica de electroinmunotransferencia o Western blot para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en el Perú. *Rev Biomédica*; 2011; 31: 209-421.
9. Kesper, N, De Almeida K, Stof A, Umezawa E. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. *J. Parasitol.* 2000; 86: 862-867
10. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S, Medina M, Ward B. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:291-296.
11. Escalante H, Jara CA, Mayhuay R. Antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* detectados por Western Blot usando sueros de pacientes con parasitosis confirmada. *REBIOL* 2013; 33(2): 67-75
12. De Souza M, Amato Neto V. Discrepancies and consequences of indirect haemagglutination, indirect immunofluorescent and ELISA tests for the diagnosis of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012; 54(3): 141-143
13. Zarate-Blades CR, Blades N, Nascimento MS, Silveira JF, et al. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens in an endemic area for Chagas disease in Bolivia. *Diag Microbiol Infec Dis* 2007; 57: 229-232.
14. Berrizbeitia M, Figueroa M, Ward BJ, Rodriguez J. et al. Development and application of an ELISA assay using excretion/secretion proteins from epimastigote forms of *T. cruzi* (ESEA antigens) for the diagnosis of Chagas disease. *J Trop Med* 2012; ID. 875909.
15. Moncayo A, Silveira AC. Current trends and future prospects for control of Chagas Disease. En: Telleria & Tibayrenc (eds.). *American Trypanosomiasis, Chagas Disease: One hundred years of research*. Amsterdam: ELSEVIER 2010; pp.55-82
16. Bayer AM, Hunter GC, Gilman RH, Cornejo del Carpio JG, et al. Chagas disease, migration and community settlement patterns in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3(2): e567
17. Delgado S, Castillo-Neyra R, Quispe-Machaca VR, Ancca-Suarez J; et al. A history of Chagas disease transmission, control and reemergence in peri-rural La Joya, Peru. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(2): e970
18. Frade AF, Luquetti AO, Prata A, Ferreira AW. Western blotting method (TESAcruzi) as a supplemental test for confirming the presence of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in finger prick blood samples from children aged 0-5 years in Brazil. *Acta Tropica* 2011; 117: 10-13
19. Malchiodi L, Chiamonte M, Taranto N, Zwirner N, Margni R. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag163B6). *Rev Clin Exp Immunol* 1994; 97(1): 417-423
20. Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, et al. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med & Hyg* 2012. 86(3):412-416.



Prevalencia del enteroparasitismo en pacientes atendidos en el Laboratorio Quintanilla SRL., Trujillo (Perú): 2008-2012

Enteroparasitism prevalence in patients attending in the Quintanilla SRL Laboratory, Trujillo (Peru): 2008-2012

Paola P. Poma Sotero¹ y César A. Jara²

¹Tesista Escuela AP de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Las prevalencias del parasitismo intestinal son reportadas en poblaciones infantiles o en entidades estatales, habiéndose analizado poco respecto de lo que sucede en entidades particulares, como laboratorios de análisis clínicos. En el presente informe se presentan los resultados de una investigación retrospectiva longitudinal que estuvo orientada a determinar la prevalencia del enteroparasitismo en pacientes atendidos en el Laboratorio Quintanilla SRL., Trujillo (Perú) en el periodo 2008-2012. Los datos obtenidos fueron obtenidos en la base de datos del laboratorio y agrupados según los años de estudio, sexo y edad. La mayor prevalencia se presentó para *Blastocystis hominis* en el año 2008 con 64,8%, *Enterobius vermicularis* en el año 2012 con 11,8%, *Entamoeba coli* en el año 2010 con 23,3%. El grupo etáreo de 0 a 15 años fue el más afectado puesto que se obtuvo una frecuencia de enteroparasitismo de 29,4%; el sexo masculino presentó la mayor frecuencia de enteroparasitismo con 33,1%.

Palabras clave: Prevalencia, Enteroparasitismo, *Blastocystis hominis*, *Enterobius vermicularis*

ABSTRACT

The prevalence of intestinal parasitism are reported in pediatric populations or state entities, little about what happens in private institutions, like as clinical laboratories. The results of a retrospective investigation that was aimed to determine the prevalence of enteroparasitism in patients treated at the Laboratory Quintanilla SRL, Trujillo (Peru) in the period 2008-2012 are presented in this report. The data were obtained on the basis of laboratory data and grouped by year of study, gender and age. The highest prevalence was introduced to *Blastocystis hominis* in 2008 with 64.8%, *Enterobius vermicularis* in 2012 with 11.8%, *Entamoeba coli* in 2010 with 23.3%. The age group 0 to 15 years was the most affected since enteroparasitism a frequency of 29.4% was obtained; males had the highest rate with 33.1% enteroparasitism.

Keywords: Prevalence, Enteroparasitism, *Blastocystis hominis*, *Enterobius vermicularis*

INTRODUCCIÓN

Las infecciones intestinales causadas por protozoarios y helmintos se encuentran entre las más frecuentes en el hombre, con mayor prevalencia en países en vías de desarrollo, de zonas tropicales y templadas. En América Latina, los países con características sociales de pobreza, hacinamiento y deficiente educación sanitaria no han registrado modificaciones importantes en la disminución de enfermedades parasitarias intestinales en los últimos 50 años^{1,2,3}.

En el Perú, la prevalencia de enteroparasitosis es alta en zonas rurales y urbano-marginales, debido a las condiciones ambientales y sanitarias que favorecen su transmisión; además, la poliparasitosis tiene una alta incidencia, afectando el estado de salud, principalmente de niños, quienes están más expuestos a factores de riesgo y reinfección, alterando negativamente a su nutrición, desarrollo, función cognitiva y habilidad para el aprendizaje^{4,5,6,7,8}. Se ha referido que uno de cada tres peruanos es portador de uno o más parásitos en el intestino y que cada una de las tres regiones naturales del Perú presentan características particulares que permiten un marcado predominio de protozoarios en la costa y sierra, y de helmintos en la selva^{6,8,9}.

En la región La Libertad, el panorama no es distinto y los estudios en diferentes grupos sociales reiteran la importancia de las infecciones causadas por protozoarios, en particular por *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* y *Blastocystis*, y en menor proporción por helmintos, con especial prevalencia de las infecciones por *Hymenolepis nana* y *Enterobius vermicularis*^{10,11,12,13}.

Como se puede apreciar, la gran mayoría de investigaciones dirigidas a determinar las prevalencias de parasitismo intestinal en el Perú se hacen en poblaciones infantiles, en particular las escolares, por la facilidad que se tiene para la toma de las muestras fecales. Adicionalmente, tales investigaciones se hacen en periodos cortos y los resultados valen sólo para ese periodo. Por ello, actualmente, la tendencia es efectuar investigaciones respecto del parasitismo intestinal en poblaciones que puedan relacionar la infección con la enfermedad. Una de ellas es aquella que solicita su atención en hospitales o laboratorios particulares, debido a que estos centros atienden a poblaciones heterogéneas en cuanto a edad, sexo, procedencia y estrato social. Los resultados que se obtienen permiten interpretar las tendencias del parasitismo en varios años y poder proponer medidas, en caso haya una tendencia al aumento de las prevalencias^{14,15,16}.

Al respecto, una investigación de enteroparasitosis e infección a las vías urinarias en pacientes con sospecha clínica atendidos en el Centro de Análisis e Investigación Escalabs de Trujillo, Perú en los años 2005, 2007 y 2009, encontró una prevalencia global de enteroparasitosis del 34%; además, registró como especies más frecuentes a *B. hominis*, *G. lamblia* e *H. nana*, con porcentajes promedio de 54,1%, 17,2% y 15,9% respectivamente, afectando en un alto índice al grupo etario de 0 a 15 años¹⁴. Asimismo, se determinó la frecuencia de enteroparasitismo y de infecciones bacterianas de las vías urinarias en 2 160 y 3 640 pacientes respectivamente atendidos en el Laboratorio Clínico HALMERS de Chepén, La Libertad, Perú en los años 2009, 2010, y 2011; las enteroparasitosis más frecuentes fueron: *B. hominis* (28,6%) en el 2009 y *G. lamblia* (48,0%) en el 2010; el grupo de edad de 0 a 15 años fue el más afectado pues registró una prevalencia de enteroparasitismo de 58,0% en el 2011; en tanto que en el 2010 el sexo femenino presentó la mayor frecuencia (76,0%) de enteroparasitismo¹⁵.

El presente informe contiene los resultados de una investigación retrospectiva longitudinal dirigida a determinar las tendencias de las prevalencias del enteroparasitismo en pacientes atendidos en la Clínica Peruano Americana de Trujillo (Perú), que corresponde a una población heterogénea, y evaluados en el Laboratorio de dicha entidad: Quintanilla SRL durante cinco años, 2008, 2009, 2010, 2011 y 2012.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada

Todos los pacientes con sospecha clínica de enteroparasitosis atendidos en el laboratorio Quintanilla de Trujillo (Perú) durante cuatro años: 2008-2012.

Acceso a la base de datos

Contando con la autorización del Director Gerente del Laboratorio Quintanilla SRL, solicitada por escrito conjuntamente con el formal compromiso de confidencialidad, se accedió y revisó la base de datos sistematizada de los años indicados en el Área de Sistemas del Laboratorio.

Elaboración de formatos y recolección de datos

Luego de diseñar y validar las fichas, se revisó la base de datos sistematizada del Laboratorio Quintanilla SRL correspondiente al periodo 2008-2012, a fin de registrar, en los formatos elaborados, el número total de pacientes con sospecha clínica de enteroparasitosis atendidos en el Laboratorio Quintanilla SRL. Se registró para cada paciente, la edad, sexo y la especie de parásito encontrada.

Análisis e interpretación de datos

Los datos revisados y registrados fueron presentados en gráficos de frecuencia de ocurrencia en porcentaje de casos positivos por especie de parásito según año. Se utilizó el programa Microsoft Excel con el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) en su versión 12, para efectuar el análisis bivariado que incluyó la prueba de Chi-cuadrado para la comparación de frecuencias y la prueba t de Student o prueba Z para la comparación de promedios, con significancia de 0,05%.

RESULTADOS

Se evaluaron los resultados de análisis de 7 512 pacientes con sospecha clínica de enteroparasitosis que fueron atendidos en el Laboratorio Quintanilla SRL. , Trujillo-Perú en el lustro 2008-2012 encontrando 2 121 parasitados que representan una prevalencia promedio de 28,2% observando un ligero incremento del parasitismo en relación al tiempo estudiado (Tabla 1).

Se encontraron protozoarios y helmintos, siendo los más frecuentes *Blastocystis hominis*, *Entamoeba*, *Enterobius vermicularis* y *Ascaris Lumbricoides* y los menos frecuentes *Giardia Lamblia*, *Trichuris trichiura* y *Hymenolepis nana* cuando la evaluación estuvo relacionada al tiempo (Tabla 2).

En relación al grupo etáreo se encontró un mayor porcentaje de parasitismo en adolescentes de 16 a 30 años, siendo el menor grupo los pacientes entre las edades de 61 a más (Tabla 3). También se encontró que el parasitismo fue menor en el sexo femenino con un 23,8% mientras que en el sexo masculino fue un promedio de 33,1% (Tabla 4. Sólo se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) cuando se examinó el sexo: el sexo masculino estuvo más parasitado.

Tabla 1: Prevalencia anual del enteroparasitismo en pacientes atendidos en el Laboratorio Quintanilla SRL. Trujillo-Perú en el periodo 2008-2012.

Año	2008	2009	2010	2011	2012	Promedio
	N°(%)	N°(%)	N°(%)	N°(%)	N°(%)	N°(%)
Prevalencia	1351(21.5)	1401(26.0)	1488(33.4)	1508(25.0)	1770(33.6)	7512(28.2)

Fuente: Datos obtenidos del Área de Sistemas del Laboratorio Quintanilla SRL. , Trujillo-Perú

Tabla 2: Prevalencia anual del enteroparasitismo en pacientes atendidos en el Laboratorio Quintanilla SRL. Trujillo-Perú en el periodo 2008-2012, respecto de la especie de parásito.

Enteroparasito	2008	2009	2010	2011	2012	Promedio
	N° (%)					
<i>Blastocystis hominis</i>	188(64,8)	205(56,3)	220(44,4)	195(51,7)	324(54,5)	1132(53,4)
<i>Entamoeba coli</i>	50(17,3)	61(16,8)	115(23,3)	70(18,6)	30(5,0)	326(15,4)
<i>Giardia lamblia</i>	8(2,8)	15(4,1)	30(6,1)	24(6,4)	78(13,1)	155(7,3)
<i>Hymenolepis nana</i>	1(0,3)	5(1,4)	15(3,0)	13(3,4)	32(5,4)	66(3,1)
<i>Enterobius vermicularis</i>	25(8,6)	20(5,5)	55(11,1)	40(10,6)	70(11,8)	210(9,9)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	10(3,4)	40(11,0)	36(7,3)	30(8,0)	54(9,1)	170(8,0)
<i>Trichuris trichiura</i>	8(2,8)	18(4,9)	24(4,8)	5(1,3)	7(1,1)	62(2,9)
Total	290(100)	364(100)	495(100)	377(100)	595(100)	2121(100)

Fuente: Datos obtenidos del Área de Sistemas del Laboratorio Quintanilla SRL., Trujillo-Perú.

Tabla 3: Prevalencia anual del enteroparasitismo en pacientes atendidos en el Laboratorio Quintanilla SRL. Trujillo-Perú en el periodo 2008-2012, respecto de la edad.

Edad	2008	2009	2010	2011	2012	Promedio
	N° (%)					
0-15	348(25,8)	397(28,3)	402(27,1)	453(30,0)	605(34,2)	2205(29,4)
16-30	395(29,2)	408(29,1)	421(28,4)	417(27,7)	454(25,6)	2095(27,9)
31-45	301(22,3)	312(22,3)	341(23,0)	362(24,0)	427(24,1)	1743(23,2)
46-60	155(11,5)	164(11,7)	173(11,7)	186(12,3)	177(10,0)	855(11,4)
61- más	152(11,2)	120(8,6)	145(9,8)	90(6,0)	107(6,1)	614(8,1)
Total	1351(100)	1401(100)	1482(100)	1508(100)	1770(100)	7512(100)

Fuente: Datos obtenidos del Área de Sistemas del Laboratorio Quintanilla SRL., Trujillo-Perú.

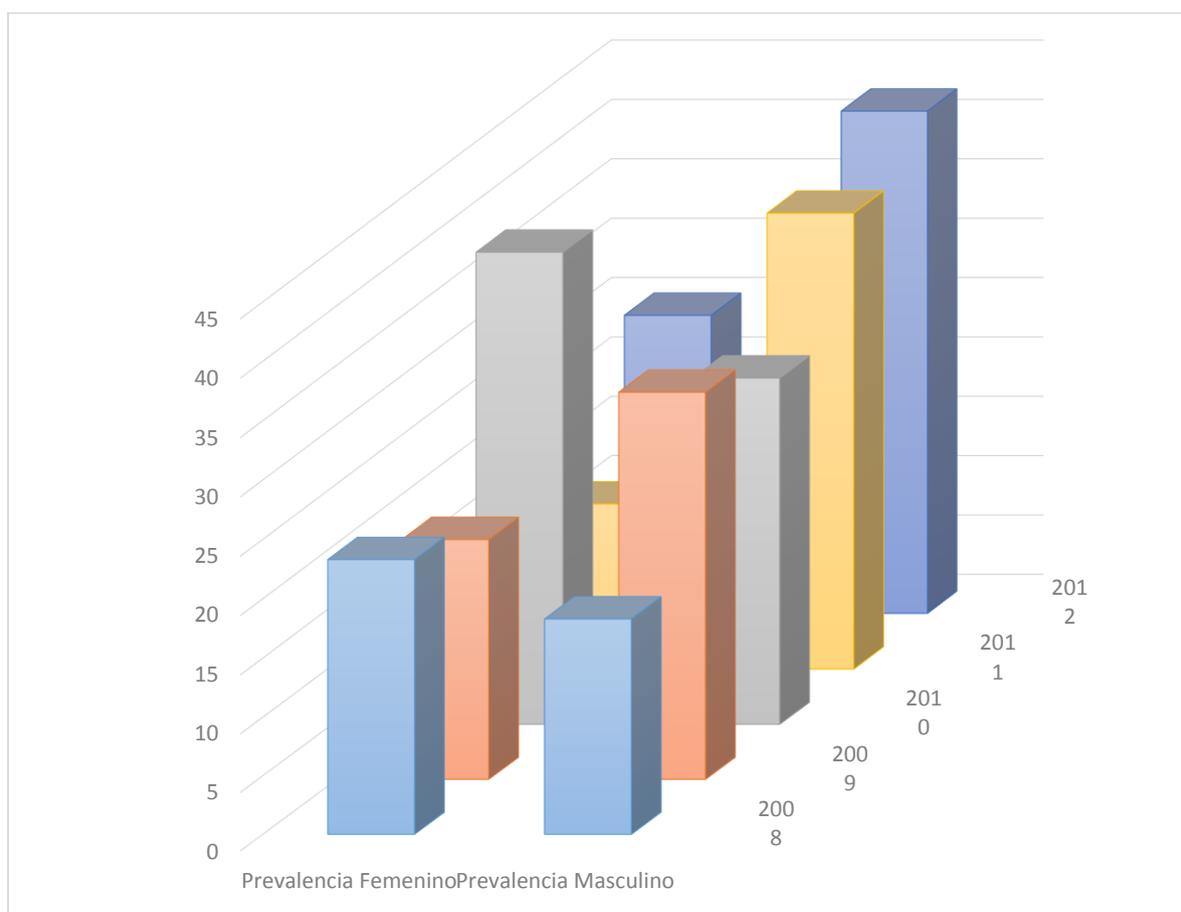


Fig. 1. Distribución Porcentual de pacientes con enteroparasitosis según sexo que fueron atendidos en el Laboratorio Quintanilla SRL. Trujillo-Perú en el periodo 2008-2012 (Fuente: Datos obtenidos del Área de Sistemas del Laboratorio Quintanilla SRL., Trujillo-Perú)

DISCUSIÓN

Las investigaciones respecto del parasitismo intestinal se hacen con mayor frecuencia en escolares o grupos infantiles, teniendo en cuenta que es la población más afectada por la poca práctica de buenos hábitos higiénicos y porque el sistema inmune aún no está completamente desarrollado^{1,8,24}; sin embargo, al tratarse de poblaciones homogéneas, no se mide la variación de parasitismo respecto de la edad, condición social y procedencia, ni la relación con la presentación clínica. Estos factores pueden medirse en entidades que rutinariamente reciben pacientes de diverso lugar, edad, condición social y con sintomatología que motiva la consulta, pero los datos no son dados a conocer y ello, no permite

medir la tendencia del parasitismo e interpretar su probable control. Sólo pocos estudios han abordado en Trujillo, poblaciones atendidas en clínicas particulares, que, con la asociación con los Seguros Particulares, las ha convertido en servivio para personas con recursos económicos variables^{14,15}.

El 28,2% de prevalencia global corresponde a un menor porcentaje en comparación a lo encontrado en el Hospital Rebagliati de EsSalud, Lima-Perú² (51,9%). Estas diferencias dependerían de las condiciones socioeconómicas, de higiene y hacinamiento de los pacientes que se atienden en clínicas particulares en relación a los que se atienden en Hospitales del Seguro Social, que son personas de recursos económicos bajos y que por lo general presentan mayor porcentaje de infección. Más bien el 28.2% es comparable al 33.6% detectado en otro laboratorio particular de Trujillo¹⁴, aspecto que parece lógico, puesto que ambos son de la misma localidad y tienen el mismo tipo de población atendida.

B. hominis fue el parásito más frecuentemente encontrado (53,4%), este fenómeno se viene presentado con frecuencia, con el resultado de que este parásito aparece en los primeros lugares de frecuencia, tanto cuando se investiga la infección (poblaciones de escolares)^{10,11,12,13,18}, o frecuencias relacionadas con sintomatología^{14,15}. Esto hace que las frecuencias sean variables, por ejemplo, en general, el porcentaje detectado en la presente investigación es mayor a los reportadas en varias investigaciones en escolares^{12,13,16,17} y comparable a lo registrado en poblaciones de la sierra¹⁹ o poblaciones atendidas en centros nosocomiales^{2,3}. Esto se debe a que es un protozooario que se reproduce rápidamente por fisión binaria y porque algunos autores consideran que causa zoonosis, haciendo más fácil la transmisión ya sea por contaminación fecal de algún portador humano o animal y por las deficientes condiciones de saneamiento³², el quiste es la forma más resistente del parásito y es capaz de sobrevivir a condiciones muy duras debido a las múltiples capas de la pared. Los experimentos que se han llevado a cabo han mostrado su capacidad para soportar los ácidos gástricos, no se abren cuando se colocan en agua destilada y pueden sobrevivir a la temperatura durante un máximo de 19 días^{18,24}.

De igual manera, la frecuencia de parasitosis por *G. lamblia* encontrada en el presente trabajo (7,3%), no coincide con lo registrado en otras investigaciones, siendo en algunos casos mayor a lo informado anteriormente² y menor a lo detectado en trabajos cuya población ha sido la escolar^{12,19,20}. Esto se debe a que la giardiasis es una enfermedad endémica y la transmisión es continua y afecta sobre todo a los niños y son relativamente comunes los brotes en instituciones infantiles, tales como orfanatos y guarderías; siendo relacionados con su forma de contagio por heces, agua potable y alimentos, siendo su forma infectante el quiste, muy resistente a factor ambiental y desinfectantes clorados²⁴.

Aunque no se trata de un patógeno, *E. coli* siempre aparece en los reportes de parasitismo intestinal y cuando se trata de poblaciones infantiles, con elevadas prevalencias; este aspecto está relacionado con su mecanismo de transmisión, semejante a lo que ocurre con *G. lamblia*, a través de la ingestión de quistes con los alimentos y el agua^{7,10,11,12,13,14,15}. De manera que, estas elevadas prevalencias deben interpretarse como una falta de precaución sanitaria al momento de ingerir los alimentos y que ello está sucediendo no sólo con la población infantil sino con la población en general.

La frecuencia de *H. nana* (3,1%) es menor al encontrado en poblaciones escolares^{5,8,11,12}, aspecto que tiene lógica, porque se ha verificado que los niños son los mayormente parasitados por este cestodo; entonces, el 3.1% corresponde al total de frecuencia, tomando en cuenta a menores y mayores de edad, lo que significa que si tomamos en cuenta solamente a los niños, probablemente el porcentaje se acerque a los registrado en. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que *H. nana* provoca la más frecuente de las cestodiasis humanas por la facilidad con que se trasmite, sea principalmente por ciclo monoxénico, de rápido desarrollo o bien por el ciclo heteroxénico y la posible participación de reservorios animales^{17,19,22}. Este cestodo está registrado en la costa y no depende de las condiciones ambientales para distribuirse en la naturaleza porque el huevo sale del huésped con capacidad de infectar y se ha presentado en la costa y en la sierra^{22,23}.

El porcentaje de *E. vermicularis* (9,9%) dependería por contaminarse accidentalmente con los huevos que se pueden encontrar en la ropa de cama, juguetes, o en la ropa interior de las personas infectadas, En la mayoría de los países latinoamericanos, las tasas de prevalencia también son variables, aunque generalmente son elevadas, siempre que se use la técnica apropiada para su detección^{1,17,21}. Sin embargo, no todos los informes respecto del parasitismo intestinal presentan a este nematodo debido, precisamente, a que no se le detecta normalmente en heces, lo que determina la aplicación de la técnica específica: la prueba del “parche” que sí se hace en los laboratorios

particulares, aunque con limitaciones respecto de la toma de muestra que casi siempre lo hace la madre y en sólo una ocasión (la prueba correcta señala tres días consecutivos en caso de no hallar en los anteriores⁴), porque es precisamente una prescripción médica. De manera que este dato es de válida interpretación, lo que quiere decir que el parasitismo por *E. vermicularis* es la infección y enfermedad parasitaria provocada por helmintos más frecuente en la costa norte del Perú.

De igual manera la prevalencia de parasitismo por *A. lumbricoides* (8,0%) y *T. trichiura* (2.9%) está relacionado al consumo de alimentos o bebidas contaminados con huevos del parásito, la ascariasis es la más común de las infecciones por lombrices intestinales y está relacionada con una higiene personal deficiente y condiciones sanitarias precarias¹. Las personas que viven en lugares donde se utilizan heces humanas como fertilizante también están en riesgo de padecer de estas enfermedades^{16,23}. Si la temperatura, humedad y calidad del suelo son adecuados se desarrollará su forma infectante para el huésped, por ello es que está confirmado que en la selva y sierra, las infecciones por estas dos especies de nematodos es más frecuente que en la costa, que casi siempre el porcentaje es bajo^{10,11,12,17,19}; sin embargo, al igual que en el caso de la infección por *E. vermicularis*, este dato es de interesante interpretación puesto que significa que el parasitismo por estos helmintos se mantiene vigente y puede presentarse con medianas frecuencias en poblaciones totales de la costa

El grupo etéreo de pacientes con mayor porcentaje de enteroparasitosis fueron niños de 0-15 años con 29,4%. Estos datos concuerdan con los realizados por Urbina¹², en preescolares de la provincia de Trujillo entre los años 2006-2007, encontrando una prevalencia de infección por protozoarios y helmintos intestinales en relación al sexo, disponibilidad y lugar de defecación, así como el grado de nutrición demostrando que el 49,0% de los niños presentan una o más especies de protozoarios y/o helmintos intestinales, Susanibar, por su lado, en el 2001 encontró 76,0% de enteroparasitosis en una población escolar en Junín²², y Cornejo²³ en la sierra de Lima en el 2001 encontró 71,0% de enteroparasitosis. Esto puede deberse a que durante la infancia por haber más oportunidades de contacto con dichos parásitos, hay menor nivel inmunológico y por tanto menor tolerancia a estos, sin embargo a medida que se va desarrollando el sistema inmunológico cambia y el cuerpo tiende a acostumbrarse más al invasor; por ello es que la afección puede desencadenar síntomas más evidentes y serios en el transcurso de los primeros 5 años de vida; en las guarderías infantiles el contagio es directo, así como por sus hábitos de juego en contacto con el suelo, el nivel socioeconómico y las deficientes condiciones de higiene²⁴. Según los datos obtenidos de enteroparasitosis se puede apreciar que hay un aumento anual de enteroparasitosis en niños de 0-15 años, esto puede darse por el aumento de instituciones infantiles como orfanatos, guarderías y colegios; y una disminución anual en edades de 16 a más, podría relacionarse a mejoras socioeconómicas de un sector de la población y mejoras en saneamiento ambiental^{1,4}.

Cuando se examinan las prevalencias parasitarias, tanto en poblaciones infantiles como en poblaciones generales (homogéneas y heterogéneas), casi siempre se verifica que esta relación no tiene que ver con la influencia de género, porque los factores de riesgo y la conformación del sistema inmune y del digestivo, básicamente, son los mismos^{9,10,12}; sin embargo, algunos informes presentan tendencias para uno y otro género: femenino o masculino, por ejemplo, en el Valle de Mantaro se encontró un mayor porcentaje de parasitismo en varones (23.8 vs. 33.1), en cambio, en la sierra peruana se una tendencia favorable al sexo femenino (41.7 vs. 59.3)⁹ debido, probablemente, a las costumbres familiares, como por ejemplo tener contacto con la preparación de los alimentos, que aumenta la probabilidad de adquirir la infección mediante el consumo de vegetales crudos o agua contaminada con metacercarias o mayor susceptibilidad inmunológica a permanecer con la infección por años; son algunas hipótesis de este hecho muy importante.

CONCLUSIONES

- La prevalencia global de los pacientes atendidos en el Laboratorio Quintanilla de Trujillo (Perú) fue de 28.2% en el lustro 2008-2012, sin variaciones anuales significativas.
- *Blastocystis* fue el parásito más frecuentemente encontrado (53.4%) y *T. trichiura* el menos frecuente (2.9%)
- La población de 0-15 años presentó los altos porcentajes de parasitosis y no hubo diferencia respecto del género.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brooker S. Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: adding up the numbers – A review. *Int J Parasitol* 2010; 40: 1137-1144
2. González J, Rodríguez A. Incidencia de parasitosis intestinal en pacientes del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, IPSS 1976-1982. *Rev Gastroenterol Perú*. 1982; 4: 152-157.
3. Valladolid J, Vilela E, Zavaleta V. Parasitosis intestinal; Estudio en el Hospital de Yurimaguas. *Rev Gastroenterol Perú* 1982; 2: 44-58.
4. Tantaleán M, Atencia G. Nota sobre el parasitismo intestinal diagnosticado en el Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión. *Rev Per Med Trop*. 1993; 7 (2): 99-103.
5. Marcos RL, Maco V, Terashima A, et al. Prevalencia de parasitosis intestinal en niños del valle del Mantaro, Jauja, Perú. *Inst Med Trop. Alexander von Humboldt. Univ Per Cayetano Heredia. Lima, Perú. Rev Med Hered*. 2002; 13 (3): 85-89.
6. Cabrera M, Verástegui M, Cabrera R. Prevalencia de enteroparasitosis en una comunidad alto andina de la Provincia de Víctor Fajardo, Ayacucho, Perú. *Rev Gastroenterol Perú*. 2005; 25 (2): 150-155.
7. Pajuelo G, Lujan D, Paredes B. Estudio de enteroparásitos en el Hospital de Emergencias Pediátricas, Lima-Perú. *Rev Med Hered*. 2005; 16 (3): 178-183.
8. Ubillus G, Ascarrus A, Soto C, et al. Enteroparasitosis y estado nutricional en niños menores de 4 años del wawa-wasi de Pamplona Alta San Juan de Miraflores. Lima, Perú 2006. *Rev. Horizonte Médico*. 2008; 8 (2): 36-40.
9. Rúa, O.; G. Romero y F. Romaní. Prevalencia de parasitosis intestinal en escolares de una institución educativa de un distrito de la sierra peruana. *Rev Peru Epidemiol* 2010; 14 (2): 1-5.
10. Díaz E, Escalante H, Jara C. Frecuencia de infección por protozoarios y helmintos intestinales en la población escolar de Poroto, La Libertad, Perú. *REBIOL*. 2002; 22 (1-2): 57-63.
11. Murga S. Parásitos intestinales asociados con enfermedad diarreica aguda en niños menores de cinco años de Virú, Trujillo, Perú en el 2000. *REBIOL*. 2002; 22 (1-2): 35-40
12. Urbina R, Jara C. Prevalencia de infección por protozoarios y helmintos intestinales relacionados al grado de nutrición en preescolares de la provincia de Trujillo, Perú. *SCIENDO* 2007; 10 (2): 87-97.
13. Sánchez L, Jara C. Prevalencia de infección por helmintos intestinales en niños de Alto Trujillo, La Libertad, Perú. *Univ Nac Trujillo. REBIOL*. 2010; 30 (1): 58-64
14. Rodríguez L. Prevalencia de enteroparasitosis e infección de vías urinarias en pacientes atendidos en el Centro de Análisis e Investigación Escalabs de Trujillo, Perú en los años 2005, 2007 y 2009 [Tesis]. Trujillo: Univ Nac Trujillo. Fac Cienc Biol. 2010.
15. Saravia C. Frecuencia de enteroparasitosis e infecciones bacterianas de las vías urinarias en pacientes atendidos en el Laboratorio Clínico HALMERS S.R.L., Chepén, Perú en los años 2009, 2010 y 2011 [Tesis]. Trujillo: Univ Nac Trujillo. Fac Cienc Biol. 2012.
16. Ibañez N, Jara, Guerra A, Prevalencia de Enteroparasitismo en escolares de comunidades nativas del Alto Marañón, Amazonas, Perú. *Rev. Med Exp Salud Pública* 2004; 3:21-22.
17. Ibañez N, Jara C, Guerra A, Prevalencia e Intensidad de Infección por protozoarios y helmintos intestinales en la población escolar primaria de la Esperanza y de Chanaybaños (Santa Cruz, Cajamarca-Perú). *Acta Med Orreguiana Hampi Runa* 2006; 2:6-8.
18. Barahona-Rondon L, Maguiña C, Terashima, Tello R, *Blastocystis hominis*, estudio prospectivo, sintomatología y factores epidemiológicos asociados. *Rev Gastroenterol Perú*. 2003; 23:29-35.
19. Marcos-Raymundo LA, Maco V, Terashima A, salmavides F, Gotuzzo E. Prevalencia de parásitos intestinales en niños del valle de Mantaro, Jauja- Perú. *Rev Med Hered*; 2002; 13(3):85-89.
20. Villavicencio Z, Bornay F, Delgaso E, Meseguer I. Prevalencia de parasitosis intestinal en la provincia de Cajamarca Perú. *Rev Gastroenterol Per* 2005; 25: 2-5.
21. Urbina R, Jara C. Prevalencia de infección por protozoarios y helmintos intestinales relacionados al grado de nutrición en preescolares de la provincia de Trujillo, Perú. *SCIENDO*. 2007; 10: 87-97.
22. Susaníbar L, Enteroparasitosis en la población del distrito de Villa Perene. Chanchamayo. Junín. *Rev Per Med Exp Salud Pública*. 2002; 19: 24-26.
23. Cornejo M, Cerrón C, Cruz R, Gastón M. Enteroparasitosis infantil en la sierra de Lima. Centro de Salud de Oyon-Lima. *Rev Med Exp Salud Pública* 2000; 19:24-26.
24. Cholan S, Boyd M, Guerra R. Prevalencia y distribución de enteroparasitos en Aldea Hogar de Dios “Ayuda a tu prójimo” de la ciudad de Cajamarca. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2002; 14: 25-26.

Guía para los autores

Siguiendo normas gramaticales, de puntuación, de escrituras de nombres científicos, de abreviaciones y de escritura de símbolos químicos de aceptación universal, la redacción deberá hacerse de modo impersonal en una extensión máxima de 20 páginas. El tipeado deberá hacerse a espacio y medio, en papel Bond de 80g, A4, con márgenes de 2,5cm a cada lado y presentados, por duplicado, acompañados de la versión grabada en CD

ESTRUCTURA

Deberán estructurarse como sigue:

- a. **Título:** sin abreviaturas, símbolos químicos, ni autores de taxa científicos.
- b. **Auto(es):** , primer nombre, seguido por la inicial del segundo nombre (opcional), apellido paterno y materno (opcional)
- c. **Dirección(es);** de la Institución y e-mail del primer autor
- d. **Resumen:** en un solo párrafo y aproximadamente 200 palabras. Debe contener el problema u objetivo, la metodología empleada, los resultados más importantes y la(s) conclusión(es). Al final debe tener sus Palabras Clave (cinco como máximo)
- e. **Abstract:** es una traducción, al inglés, del resumen. Al final debe aparecer: Keywords
- f. **Introducción**
- g. **Material y métodos**
- h. **Resultados**
- i. **Discusión**
- j. **Agradecimientos** (opcional y sólo para los que han aportado significativamente con la investigación)
- k. **Referencias bibliográficas**
- l. **Tablas y/ o figuras** (opcional y con su leyenda).

Las citas de los autores deberán hacerse utilizando números, a modo de superíndice, separados por comas y las referencias deberán enumerarse de acuerdo al orden de aparición en el texto y deberán ser estructuradas siguiendo la última versión de Las Normas Vancouver.

Formalmente, las Tablas deberán tener solamente líneas horizontales, un título claro, completo y entendible sin necesidad de recurrir al texto y con esta denominación numerada con números arábigos, por ejemplo: Tabla 1. Las llamadas o notas de pie de Tabla se harán mediante letras como exponentes en orden alfabético o con asteriscos, en caso que sean una o dos.

Las figuras, que incluyen gráficas, fotografías y/o esquemas, deberán abreviarse como **Fig.** y numerada, por ejemplo **Fig. 1.**, seguida de un título claro y entendible por sí mismo.