

REBIOLEST

REVISTA CIENTÍFICA DE ESTUDIANTES



Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de Trujillo

Volumen 3 , Número 1

Enero - Junio, 2015



La investigación científica en la nueva curricula de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo

En la Escuela AP de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo, la investigación científica ha sido tomada en cuenta de manera permanente, bajo las dos formas ahora aceptadas: formativa y de fin de carrera. En efecto, en una primera fase, además de investigaciones que se llevaban a cabo en algunas asignaturas, se contaba con dos cursos, Metodología de la Investigación Científica (VII ciclo) y Seminarios de Informes de Investigación (VIIIc).

En una segunda fase, se implementó el esquema que está por culminar con la extinción del currículo en vigencia, basado en tres cursos de investigación formativa: Investigación I, dedicado a formular el proyecto de investigación (VIIIc), investigación Científica II, dirigido a ejecutar el proyecto (IXc) e Investigación Científica III en el cual se redacta, en diferentes formatos (Tesis, artículo científico y Poster), el producto de la investigación. Además, se cuenta con la investigación de fin de carrera: la tesis, la cual es ejecutada por casi la totalidad de egresados.

Durante el proceso de acreditación de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología, sin embargo, en atención a los estándares relacionados con la investigación, se señala que ésta debe ser formativa y de fin de carrera, que debe estar ligada a las asignaturas y que debe ser de índole transversal en la parte formativa; es decir, no del modo como se desarrolla actualmente, en los últimos ciclos, sino desde el inicio de la carrera. Concordantes con este mandato, la nueva curricula, aprobada por Resoluciones de Decanato y de Consejo Universitario, propone lo siguiente: el curso de Epistemología (IIc) orientado a introducir al estudiante en la Teoría del Conocimiento, el curso de Estadística Aplicada a la Investigación (IVc) dirigido a preparar al estudiante en las técnicas de muestreo y validación estadística de resultados, el curso de Metodología de la Investigación Científica (VIc) encaminado a entrenar al alumno en esta disciplina tan necesaria; junto con estos cursos, se propone los cursos de Inglés Técnico, teniendo en cuenta que las fuentes bibliográficas están en este idioma. Con estos cursos, se pretende, que el alumno esté preparado para ejecutar investigación y, se propone, que se haga de forma obligatoria en cursos básicos formativos: Virología, Micología, Bacteriología, Parasitología, Microbiología Industrial y Microbiología Ambiental. Finalmente, se ha planificado, hayan dos cursos de fin de carrera: Tesis I y Tesis II, en los ciclos finales, con el propósito que el estudiante termine, en 10 y no más ciclos, su carrera y de cumplir con lo que manda la nueva Ley Universitaria, que para obtener el grado de bachiller (este era automático en la Ley Universitaria anterior) debe sustentarse la Tesis

Esperamos que con esta nueva propuesta mejore la calidad de la investigación científica en la Carrera de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo. Depende de toda la comunidad: de autoridades, para que sean vigilantes del cumplimiento y mejora continua; de los docentes, para que mejoren cada vez más su actitud hacia la investigación; del personal administrativo, para que brinde el apoyo que le corresponde y, por su puesto alumnos, para que adquieran actitudes y aptitudes de buena calidad respecto de la investigación científica.

Foto de la portada: “Tuna” *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (1768) family: Cactaceae Juss., genus: *Opuntia* Mill. Foto proporcionada por el Dr. Luis Pollack

Contenido/Contents

Editorial

La investigación científica en la nueva curricula de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo.....2

Contenido/Contents3

Artículos originales/Original papers

- Efecto de la concentración de Difenconazol más Azoxystrobin sobre la germinación y el crecimiento de *Stemphylium vesicarium* en condiciones de laboratorio. / **Effect of concentration of Difenconazole more Azoxystrobin on germination and growth of *Stemphylium vesicarium* under laboratory conditions.** Yuseff Rojas Fiestas y Juan Wilson-Krugg (e38)5
- Identificación de *Listeria monocytogenes* por amplificación del gen *iap* a partir de cultivos de *Listeria* sp. obtenida en lugares de expendio de carne de res en Trujillo, Perú. / **Identification of *Listeria monocytogenes* by *iap* gene amplification from cultures of *Listeria* sp. obtained in places of sale of beef in Trujillo, Peru.** Darwin Zavaleta Isquierdo y Pedro Mercado Martínez (e39).....14
- Degradación de cianuro de sodio por *seudomonas* sp. a dos temperaturas y tres pH. / **Sodium cyanide degradation by *Pseudomonas* sp. at two temperaturas and three pH.** Jhonn Morillo Mendoza y Juan Guevara Gonzales (e40).....23
- Efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*. / **Effect of the culture supernatant of *Lactobacillus* sp. on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis*.** Giovana Bustamante Saldaña y Pedro Alvarado Salinas (e41).....33
- Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus*. / **Effect of *Syzygium aromaticum* esencial-oil on *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A and *Bacillus cereus* survival.** Jessenia M. Gamboa Anticona y María N. Vásquez Valles (e42)42

- Efecto de la inoculación mixta de *Rhizobium etli* y *Bradyrhizobium yuanmingense* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Oryza sativa* var. NIR. / **The effect of the mixed inoculation of *Rhizobium etli* Rf 188-03 and *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc 391-01 on the aerial and root growth of *Oryza sativa* var. NIR.** Héctor Daniel Bacilio Pérez y Bertha Soriano Bernilla (e43).....**52**

- Efecto de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre *Planococcus citri* en condiciones de laboratorio. / ***Lecanicillium lecanii* and *Beauveria bassiana* effect on *Planococcus citri* under laboratory conditions.** Karen L. Avalos Vela y Juan Wilson-Kugg (e44).....**63**

- Efecto de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* C1 atenuados por temperatura a la infección experimental en *Mus musculus* BALB/c con formas infectivas del parásito. / **Effect of *Trypanosoma cruzi* C1 tripomastigotes attenuated by temperature to experimental infection in *Mus musculus* BALB/c with infective forms of the parasite.** Yolanda Vértiz Vereau y Hermes Escalante Añorga (e45)**71**

- Efecto insecticida del extracto alcohólico de *Ocimum basilicum* en *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio. / **Insecticide effect of *Ocimum basilicum* alcoholic-extract on *Aedes aegypti* under laboratory conditions.** Ana María Torres Cordero y Judith Roldán Rodríguez (e46)**78**

- Ciclo biológico y Tabla de Vida de *Aedes aegypti*, en laboratorio: Trujillo (Perú), 2014. / **Biological cycle and Life Table of *Aedes aegypti*, under laboratory conditions: Trujillo (Peru), 2014.** Elia Quispe-Pretel, Aida Carbajal-Villaverde, Janeth Gozzer-Fernández y Bertha Moreno-Rodríguez (e47)**91**

- Guía para los autores.....**102**



Efecto de la concentración de Difenconazol más Azoxystrobin sobre la germinación y el crecimiento de *Stemphylium vesicarium* en condiciones de laboratorio

Effect of concentration of Difenconazole more Azoxystrobin on germination and growth of *Stemphylium vesicarium* under laboratory conditions

Yuseff Rojas Fiestas y Juan Wilson-Krugg

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Se determinó el efecto del Difenconazol más Azoxystrobin, principios activos del "Amistar Top", sobre la germinación y crecimiento de *Stemphylium vesicarium* en condiciones de laboratorio. Se trabajó con dos concentraciones del fungicida (243.75 ppm y 325 ppm). El porcentaje de germinación se determinó adicionando 1 mL de cada dilución (doble concentrado) de cada concentración a tubos que contenían 1 mL de suspensión de conidios estandarizada de *S. vesicarium* con lo que se obtuvo una concentración final de 1×10^4 conidios/mL, incubándose a 20°C por 24 horas. Luego se realizó el recuento de conidios germinadas y no germinadas. El crecimiento micelial de *S. vesicarium* se evaluó sembrando por puntura en la zona central en placas de Petri conteniendo Agar Papa Sacarosa suplementado con Carbonato de Calcio con las dos concentraciones del Difenconazol más Azoxystrobin, estas se incubaron a temperatura ambiental entre 20 a 25 °C con una humedad del 65 a 70% que fue registrado por un termohigrómetro digital durante 14 días de evaluación, al término de los cuales se midió el diámetro de crecimiento micelial (mm) y se sacó el radio promedio de cada día en (cm), para cada concentración a evaluar. Se encontró que el Difenconazol más Azoxystrobin a la concentración de 243.75 ppm presentó un porcentaje de germinación de 15.75% disminuyendo hasta un 100%, en la concentración de 325 ppm, en el crecimiento a la concentración de 243.75 ppm presentó un porcentaje 18.37% mientras a la concentración de 325 ppm presentó 8.16% de crecimiento. Se concluye que el Difenconazol más Azoxystrobin en las dos concentraciones establecidas presenta un efecto significativo en la germinación y crecimiento de *Stemphylium vesicarium*.

Palabras clave: *Stemphylium vesicarium*, Difenconazol, Azoxystrobin, Agar-papa-sacarosa.

ABSTRACT

The effect of Difenconazole (Di) more Azoxystrobin (Az), active principles of "Amistar Top", on germination and growth of *Stemphylium vesicarium* under laboratory conditions was determined. It was worked with two concentrations of the fungicide (243.75 ppm and 325 ppm). The germination percentage was determined by adding 1 mL of each dilution (double concentrated) of each concentration to tubes containing 1 ml of conidial suspension of *S. vesicarium* standardized so that a final concentration of 1×10^4 conidia/mL was obtained and incubated at 20°C for 24 hours. Germinated conidia count was then performed and not germinated. The mycelial growth of *S. vesicarium* was evaluated by growth in Petri plates containing Potato Sucrose Agar supplemented with calcium carbonate with both concentrations of Di more Az, these were incubated at room temperature between 20-25 °C with a humidity of 65-70% which was recorded by a digital hygrometer for 14 days of evaluation, the term of which the diameter of mycelial growth (mm) was measured and the average of each day (cm) radio to each concentration was evaluated. It was found that Di more Az at concentration of 243.75 ppm presented a germination rate of 15.75% to 100% decline in the concentration of 325 ppm, the growth of the concentration of 243.75 ppm presented a percentage 18.37% while a 325 ppm concentration of 8.16% growth present. It was concluded that Azoxystrobin more Difenconazole in both established concentrations has a conspicuous effect on germination and growth of *S. vesicarium*.

Keywords: *Stemphylium vesicarium*, Difenconazole, Azoxystrobin, Agar-potato-sucrose

INTRODUCCIÓN

El control de plagas y enfermedades depende, en gran parte, de la aplicación de productos químicos; sin embargo, el uso indiscriminado de éstos ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental y la aparición de organismos altamente resistentes^{1,2,3,4}. Los fungicidas constituyen el grupo más numeroso y utilizados de productos químicos para el combate de enfermedades en vegetales, los cuales, de acuerdo a su movilidad en las plantas, pueden ser: (i) de contacto o residuales, que no penetran en la planta, sino forman una capa protectora e interfieren con los mecanismos de penetración del patógeno, o (ii) sistémicos, los cuales penetran en la planta y se mueven en ella en grado diverso, pequeñas o grandes distancia desde el punto de aplicación^{5,6}.

El Amistar Top es un poderoso fungicida sistémico usado principalmente para combatir el ataque de *Puccinia asparagi* “roya del espárrago”; sus dos ingredientes activos sistémicos: Azoxystrobin (inhibe la respiración mitocondrial) y Difenconazol (inhibe la síntesis de ergosterol -EBI's- y la formación de haustorios), tienen acción prolongada preventiva, curativa, erradicante y antiesporulante, debido a que se distribuyen de manera uniforme en la lámina foliar y llega a brotes nuevos⁷.

La resistencia a fungicidas, habilidad desarrollada por un hongo para sobrevivir frente a estos tipos de químicos que antes fueron nocivos o fatales para él, es un fenómeno cada vez más frecuente que conduce a la pérdida de productividad cada vez más cuantiosa; en efecto, se ha observado altos niveles de resistencia a Fenilamidas en la población de *Phytophthora infestans*, patógeno de muchos cultivares, procedentes de Ecuador encontrando un mayor nivel de resistencia en la población de *P. infestans* presentes en el Perú^{8,9,10,11}.

Stemphylium vesicarium (Moniliales) es un fitopatógeno que causa diversas enfermedades de importancia económica, tales como, la mancha gris de la hoja de tomate, quemadura foliar en ajo y cebolla, tizón rayado en los crisantemos, necrosis en el ápice de hoja en dalias, mancha marrón de la pera Europea (*Pyrus communis*) y mancha púrpura del espárrago^{10,12,13,14,15,16}. Esta última afección, se ha convertido en un problema significativo para el espárrago, debido a que las lesiones pueden afectar tallos, ramas, cladiolos y turiones cosechados, pudiendo, durante los años de epidemia, producirse pérdidas de entre un 60 a 90% de la cosecha de espárrago^{17, 18,19}.

La infección por *S. vesicarium* en espárrago, considerado como uno de los cultivos hortícolas más importantes en el Perú a lo largo de todo el año, ocurre en zonas donde existe una humedad localizada; se inicia con la aparición de pequeños puntos negros en la base de los tallos principales, los cuales evolucionan a estructuras ovaladas de 2 a 6 mm de diámetro conduciendo a una clorosis y total pérdida de^{20,21,22,23,24}.

Los valles de La Libertad ubicados en el Norte y los de Ica en la zona Sur, son las dos principales zonas de producción de espárragos en el Perú. En La Libertad, la mancha purpúrea del espárrago se ha convertido en un problema de difícil solución, porque a pesar del uso de Antracol, reconocido químico antifúngico, las infecciones persisten lo que conlleva a aumentar la dosis o a la aplicación repetitiva del químico con la consecuente e inevitable contaminación ambiental y deterioro del ecosistema. Ello justifica la búsqueda de sustancias alternativas con propiedades distintas al Antracol e igual de efectivos. En tal sentido, se diseñó una investigación encaminada a determinar el efecto de las concentraciones 243.75 y 325 ppm de Difenconazol más Azoxystrobin sobre la germinación y el crecimiento de *Stemphylium vesicarium* en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

- Un cultivo puro de *Stemphylium vesicarium*
- Un envase de 1L del fungicida, que tiene como principios activos Difenoconazol más Azoxystrobin

Recolección de muestras para la detección de *Stemphylium vesicarium* en cultivos de espárrago.

En el pueblo de la Portada Huancaco, distrito de Virú (La Libertad, Perú) se ubicaron los campos de cultivo de espárrago que mostraron signos compatibles con la enfermedad causada por *Stemphylium* sp. A partir de las plantas con estos síntomas, se seleccionaron los más representativos y cada uno de ellos. Luego se tomaron muestras de la siguiente manera. Se extrajo la base de la planta, tallos secundarios y primarios que mostraban los síntomas característicos de la enfermedad^{25, 26}, luego las muestras fueron correctamente embolsadas e identificados para luego ser trasladadas al Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo.

Aislamiento del hongo fitopatógeno.

Para este procedimiento se realizó unos cortes histológicos con un bisturí de las zonas de avance de la infección comprendiendo tejido sano y tejido enfermo, estas porciones de tejido se le realizó una desinfección superficial con una solución de hipoclorito de sodio al 2% para tejidos primarios manteniéndolos sumergido en frascos de vidrio estériles durante 2 minutos, transcurrido el tiempo, se enjuagaron en agua destilada estéril tres veces para luego ser transferidos asépticamente en una placa Petri que contenía papel filtro estéril luego se dejó secar, después con una pinza estéril los pequeños trozos de tejido se colocaron en cámaras húmedas (placas Petri que contienen una lámina porta objetos sobre 2 varillas de vidrio, agua de estéril para las condiciones de humedad), para poder realizar observaciones periódicas durante 2 semanas^{25,26}.

Identificación e incubación de *S. vesicarium*

Una vez transcurrido las dos semanas, con una asa bacteriológica en punta se realizó una toma de muestra de los micelios sobresalientes en distintos puntos de los cortes histológico para luego ser coloreadas con el Azul de Lactofenol y hacer la observación de las estructuras micromorfológicas encontradas de *S. vesicarium* para luego ser comparado e identificado con la literatura, luego se realizó una siembra por puntura en agar papa sacarosa suplementado con Carbonato de Calcio, de los puntos en el cual se hizo la toma de muestra al hongo fitopatógeno, y se dejó incubar a temperatura 20° C durante 14 días. Se realizó una observación micro y macroscópica para verificar la pureza del cultivo, obtenido el cultivo puro de *S. vesicarium* se sembró por puntura en frascos planos conteniendo Agar Papa Sacarosa suplementado con Carbonato de Calcio y se llevó a incubar 20 °C durante 14 días^{25,26}.

Preparación de medios de cultivos con Difenoconazol más Azoxystrobin

Se preparó en 3 matraces conteniendo cada uno de ellos 100 mL de Agar Papa Sacarosa suplementado con Carbonato de Calcio los cuales se esterilizaron en autoclave y se dejó enfriar a una temperatura aproximadamente de 45°C, posteriormente en solo dos matraces se agregó una cantidad suficiente del Difenoconazol más Azoxystrobin hasta obtener una concentración de 243.75 ppm y de 325 ppm, respectivamente, y al tercer matraz no se le agregó a fin de utilizar como control.

Evaluación del crecimiento del *S. vesicarium* frente al Difenoconazol más Azoxystrobin.

- **Siembra e incubación de *S. vesicarium* en un medio con Difenoconazol más Azoxystrobin.**

A partir de un cultivo puro de *S. vesicarium* se procedió a sembrar por puntura en el centro de cada una de las placas de Petri que contenían Agar Papa Sacarosa suplementado Carbonato de Calcio con las concentraciones de 243.75 y 325 ppm, y la placa control conteniendo solo el medio de cultivo sin agregar el fungicida. Todas las placas fueron incubadas a temperatura ambiente, manteniendo un registro de temperatura y humedad relativa con un termohigrómetro digital entre el rango de 20 a 25° C y la humedad de 60 a 65% durante 14 días de evaluación.

- **Lectura de los resultados**

A partir del tercer día después de la siembra, y hasta el décimo cuarto día, se midió el diámetro de crecimiento lineal (mm) del hongo en 4 diferentes direcciones para cada repetición, para luego

obtener un radio promedio (cm) final diario de crecimiento de *S. vesicarium*, en cada una de las concentraciones del Difenconazol más Azoxystrobin y el grupo control evaluados. Los resultados de crecimiento fueron expresados en centímetros (cm) y se calculó el porcentaje de crecimiento (%C) del hongo en cada concentración del Difenconazol más Azoxystrobin de la siguiente manera:

$$\%C = \frac{\text{Radio promedio de la colonia problema}}{\text{Radio promedio de la colonia testigo}} \times 100$$

Se consideró el crecimiento alcanzado en el ensayo control como el 100%.

Evaluación del efecto Azoxystrobin más Difenconazol sobre la germinación de esporas de *S. vesicarium*.

• Preparación de las concentraciones del Difenconazol más Azoxystrobin

Se realizaron diferentes diluciones del Difenconazol más Azoxystrobin en agua destilada estéril respectivamente, hasta obtener una doble concentración del fungicida en cada una de las concentraciones a partir de sus muestras originales.

• Preparación del inóculo de conidios de *S. vesicarium*

Se agregó 10 mL de agua destilada a cada frasco plano con Agar Papa Sacarosa que contenía cultivo puro *S. vesicarium*, luego se agitó moderadamente con el fin de liberar las esporas del hongo. Seguidamente, la suspensión resultante se colocó en un matraz estéril, donde se determinó la concentración de esporas mediante el recuento en Cámara de Neubauer y se estandarizó a una concentración final de 1×10^4 conidios/mL.

• Inoculación e incubación

En tubos de 13 x 100 mL se colocó, en cada uno de ellos, 1mL de la suspensión de esporas obtenidas anteriormente, a los cuales se adicionaron 1 mL de cada dilución del Difenconazol más Azoxystrobin doblemente concentrado respectivamente, con lo que se obtuvo una concentración final de 1×10^4 esporas/mL y concentraciones finales de 243.75 y 325 ppm para Difenconazol más Azoxystrobin respectivamente. Para el tratamiento control se utilizó un tubo de 13 x 100 mL, adicionando 1 mL de la suspensión de esporas más 1 mL de agua destilada estéril. Los tubos fueron incubados a la temperatura de 20°C durante 24 horas.

• Lectura

Posterior al período de incubación se agregó 2 gotas de Azul de Lactofenol para detener el proceso de germinación y realizar el recuento de conidios, con un microscopio (40 X). Se contarán tanto conidios germinados, como no germinados para cada concentración de Difenconazol más Azoxystrobin evaluada, incluyendo el control, con el fin de determinar el porcentaje de germinación.

Análisis de datos

Los datos obtenidos se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS v.15, aplicando un análisis de varianza simple para comparar las medias de germinación y de crecimiento del hongo evaluado, obtenidas en cada concentración de Difenconazol más Azoxystrobin; aplicándose, un análisis postanova mediante la Pruebas de Tukey y Duncan^{27,28}

RESULTADOS

Se encontró que *Stemphylium vesicarium* presenta resistencia a Difenconazol más Azoxystrobin, con diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de crecimiento radial promedio frente a dos diferentes concentraciones utilizadas del Difenconazol más Azoxystrobin (Fig. 1). Asimismo, que el hongo muestra un crecimiento lineal frente a dos concentraciones utilizadas del Difenconazol más Azoxystrobin a los 14 días de ser sembrados (Fig. 2) y que existe diferencia significativa entre el porcentaje de germinación frente a diferentes concentraciones utilizadas (Fig. 3).

DISCUSIÓN

En relación a la resistencia “in vitro” de *Stemphylium vesicarium* a diferentes concentraciones del Difenconazol más Azoxystrobin en las (Figs. 1 y 2), se observó que en el crecimiento a la concentración de 243.75 ppm presento un porcentaje 18.37% mientras a la concentración de 325 ppm presento 8.16%, por lo tanto *S. vesicarium* disminuye al incrementarse la concentración del fungicida, sin embargo el Difenconazol más Azoxystrobin un fungicida sistémico que se utiliza para el control de *S. vesicarium*, no debió haber ocurrido crecimiento alguno de este hongo en ninguna de las concentraciones empleadas, razón por la cual el crecimiento de *S. vesicarium* nos demuestra que es

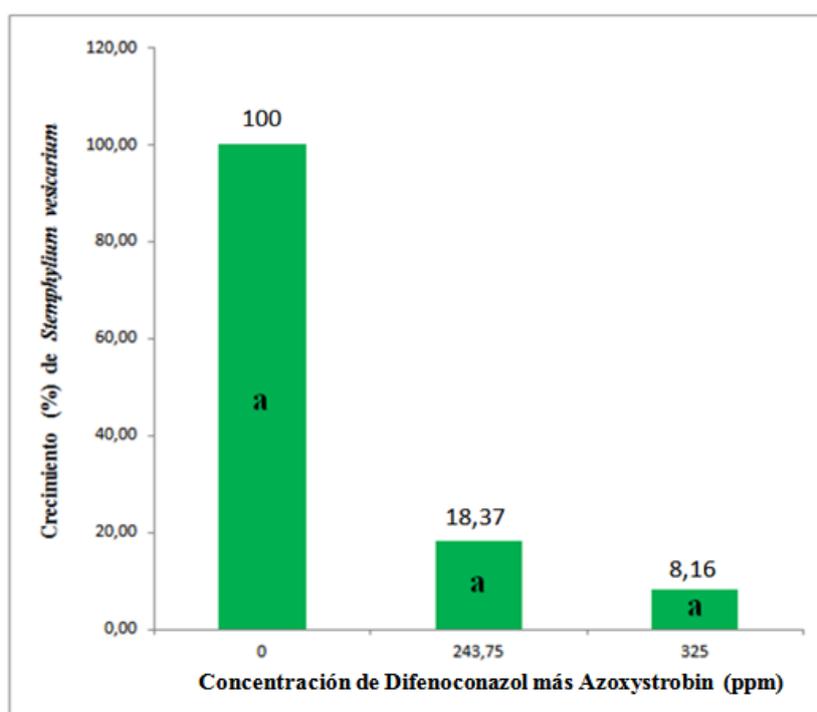


Fig. 1. Porcentaje de crecimiento radial promedio de *Stemphylium vesicarium* frente a dos concentraciones (ppm) del Difenconazol mas Azoxystrobin a los 14 días de incubación. a: $p < 0,05$

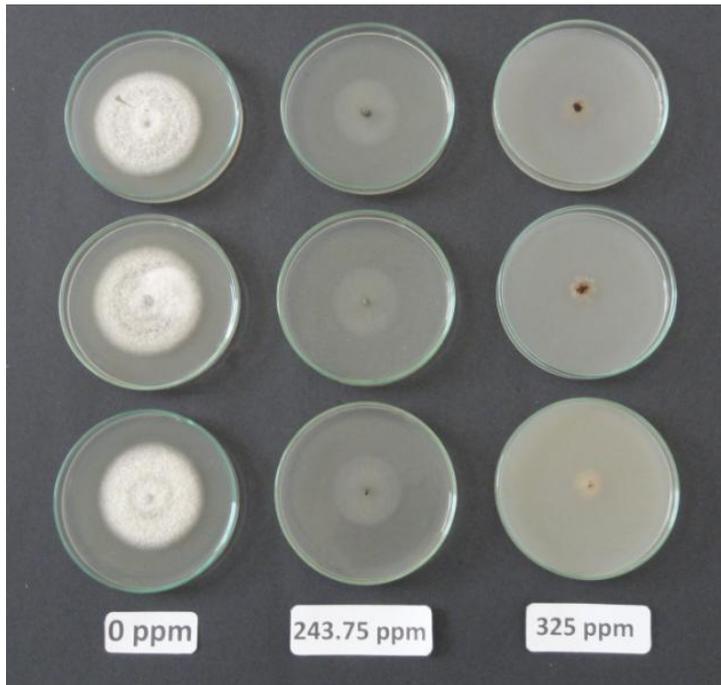


Fig. 2 Crecimiento lineal de *Stemphylium vesicarium* a dos concentraciones del Difenoconazol más Azoxystrobin a los 14 días de ser sembrado.

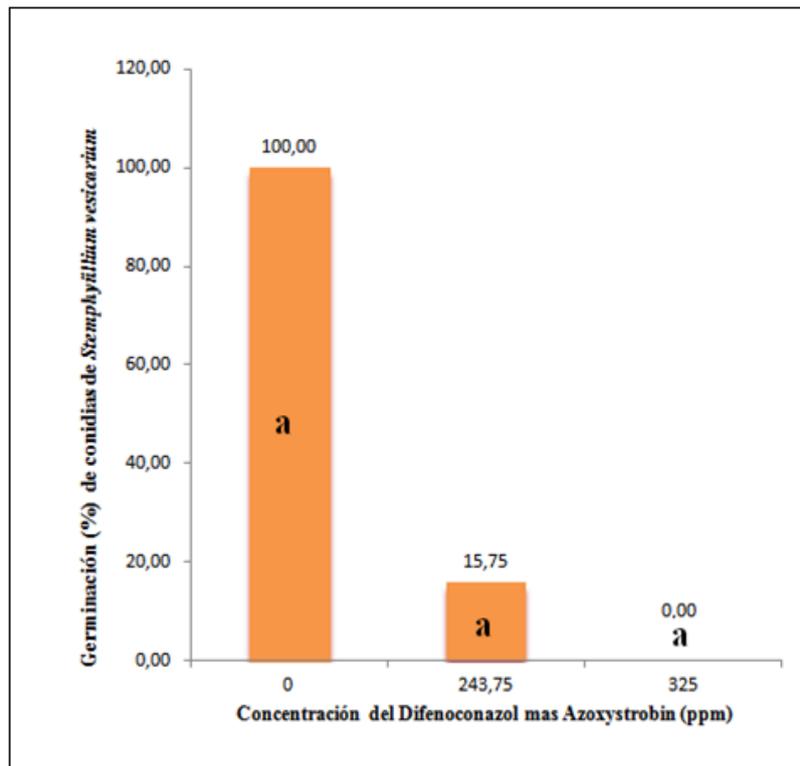


Fig. 3 Porcentaje de germinación de *Stemphylium vesicarium* frente a dos concentraciones (ppm) del Difenoconazol más Azoxystrobin a 24 con una temperatura de 20°C de incubación. a: $p < 0,05$.

resistente al fungicida, Sin embargo, valores obtenidos de cualquier compuesto químico como agente de control para enfermedades, depende del modo de acción de la molécula²⁹, dosis, frecuencia y etapa de aplicación en unos o más componentes fisiológicos del ciclo de vida del patógeno.

EL análisis estadístico del crecimiento de fúngico obtenido frente al Difenconazol más Azoxystrobin se puede apreciar que existe diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas 243.75 y 325 ppm con relación al control; Sin embargo, los hongos fitopatógenos pueden adquirir resistencia a los fungicidas, lo cual debe verse como un ejemplo más de la capacidad de sobrevivencia y/o adaptación del hongo, lo que sustenta en la variabilidad genética. Normalmente la sensibilidad de los hongos a los fungicidas está regulada por un gen simple, debido a que los fungicidas actúan sobre un punto concreto del metabolismo; ello permite la aparición por mutación genética individual, de un individuo resistente que puede dar origen a una población resistente al fungicida; por lo que la resistencia se basa en dos fuerzas evolutivas que son la mutación y la selección. Las mutaciones se encargan de crear la información genética necesaria para resistir a los fungicidas y la selección se encarga de hacer que la frecuencia en la población de estos individuos resistentes, se incremente hasta alcanzar niveles tales que harán fracasar al control que se realiza, lo que conlleva a un incremento de los problemas de resistencia, explicando en cierta forma lo que pudo haber pasado con *S. vesicarium* al ofrecer resistencia “in vitro” con Difenconazol más Azoxystrobin en términos de crecimiento fúngico^{6,22}.

El mecanismo de acción de los fungicidas que afectan a las células de los hongos, es inhibiendo su respiración, es decir, la transformación de los hidratos de carbono en energía al unirse las moléculas de los fungicidas a los grupos sulfhídricos de los aminoácidos. Las enzimas que afectan al ciclo de Krebs se desactivan y no producen ATP y al no poder completar este proceso la célula muere; los fungicidas inhiben el transporte de electrones en la cadena respiratoria, al combinarse con algunos de los portadores del complejo QB del fotosistema II; disminuyen el potencial de membrana, pudiendo así los compuestos de los fungicidas atravesar la membrana en forma molecular perdiendo H⁺, y por consiguiente no produciendo ATP⁶.

Respecto al porcentaje de germinación de conidios de *S. vesicarium* frente a las dos concentraciones del Difenconazol más Azoxystrobin, el análisis estadístico muestra que entre las dos concentraciones del Fungicida, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medidas de los porcentajes de germinación obtenidos en los dos tratamientos realizados del Difenconazol más Azoxystrobin; es decir, que a medida que aumenta la concentración del fungicida disminuye el porcentaje de germinación. Así, por ejemplo, Difenconazol más Azoxystrobin en la concentración de 243.75 ppm presenta un porcentaje de germinación de 15.75 % disminuyendo hasta un 100 % en la concentración de 325 ppm; destacándose que el Difenconazol más Azoxystrobin presenta un mayor efecto adverso sobre la germinación de *S. vesicarium*. La disminución de la germinación del hongo podría deberse posiblemente a la variabilidad genética que existe entre ellos, tal es así que pueden existir conidios con una versatilidad metabólica que le brinde resistencia a inhibidores microbianos y a las condiciones adversas dadas por los agroquímicos, esto explica la existencia de conidios que germinaron a pesar de la presencia de los agroquímicos; esto podría deberse a las diferencias estructurales que presentan las conidios aun cuando pertenezcan a una misma especie; posiblemente por la variabilidad genética (heterocariosis) que existe entre ellas^{30,31}, una diferencia estructural sería la pared celular que actúa como barrera mecánica, evitando que las sustancias del medio exterior puedan ingresar o que sólo pequeñas concentraciones puedan lograrlo³². Estas propiedades de permeabilidad y selectividad, le confiere la constitución de la membrana citoplasmática que le brinda protección frente a sustancias tóxicas que se encuentren en el entorno de la membrana que puedan alterar su comportamiento en respuesta a estímulos como la transducción de las señales de iniciación de la germinación y el reconocimiento del sustrato^{29,33}.

La germinación de esporas y el crecimiento micelial son fundamentales en el ciclo de vida *S. vesicarium* y en el desarrollo de la enfermedad, en este sentido un químico que inhiba la germinación micelial puede reducir la habilidad de *S. vesicarium* de causar la enfermedad.

Actualmente no se ha realizado estudios sobre el mecanismo de acción de fungicidas sistémicos sobre el crecimiento de *S. vesicarium*, sin embargo, se han realizado trabajos de investigación utilizando fungicidas sistémicos Trifloxystrobin, Tebuconazol, Propiconazol, Azoxystrobin, que han mostrado un control eficiente en varias enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, este último fungicida, Azoxystrobin fue eficiente para reducir la raíz corchosa (*Pyrenochaeta Lycopersici*), la antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) en tomate, en mango se realizó evaluaciones *in vitro* inhibieron

completamente el crecimiento de *C. gloeosporioides* y las aplicaciones en campo controlaron la enfermedad en panículas, hojas y frutos. Azoxystrobin fue el fungicida más efectivo para el control de pudriciones postcosecha en aguacate, la aplicación del fungicida redujo la incidencia de la antracnosis en precosecha (*Colletotrichum gloeosporioides*) en frutos de mandarina, controló pudriciones causadas por *Fusarium pallidoroseum* en melones almacenados a temperatura ambiente y en refrigeración⁶.

La espora o conidio de *S. vesicarium* durante el proceso de germinación atraviesa por dos etapas, la primera es el hinchamiento hidrostático, en la cual la espora absorbe agua, luego le sigue el hinchamiento metabólico, en el cual la conidio incorpora nuevo material que está presente en el medio externo para poder desarrollar el tubo germinativo^{34,35}. Debido a estos procesos es que los dos principios activos Difenconazol más Azoxystrobin disueltos en el agua fueron absorbidos e incorporados como parte del medio externo al atravesar la pared celular del conidio del hongo afectando evidentemente su germinación^{34,36}.

La evaluación de eficiencia de los productos en campo tiene muchas interferencias y resulta más compleja; por lo que una primera evaluación *in vitro* siempre dirige hacia los productos más eficaces. Sin embargo, los ensayos *in vitro* sólo dan una estimación indirecta del valor práctico del producto, por lo que deberá contrastarse este resultado con los obtenidos posteriormente en campo. Un producto que es eficaz *in vitro* no necesariamente será eficaz en campo; pues en su actuación influyen factores como la degradabilidad, persistencia, etc. Sin embargo si un producto no es útil *in vitro* difícilmente lo será en campo³⁷.

CONCLUSIONES

- Al incrementar las concentraciones del Difenconazol más Azoxystrobin en el rango de 243.75 ppm a 325 ppm, disminuye significativamente la germinación de *Stemphylium vesicarium* en condiciones de laboratorio.
- Al incrementar las concentraciones del Difenconazol más Azoxystrobin en el rango de 243.75 ppm a 325 ppm disminuye el crecimiento de *Stemphylium vesicarium* en condiciones de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tenorio R, Terrazas E, Alvarez MT, Vila JL, Mollinedo P. Concentrados de Saponina de *Chenopodium quinoa* y de *Caiphora andina*: alternativas como biocontroladores de hongos fitopatógenos, 2010; 27: 33-40.
2. Agrios G. Fitopatología. 3^{er} ed.: Ed. Limusa, México; 1998
3. Romero F. Manejo Integrado de Plagas: las Bases, los Conceptos, su Mercantilización. 1^a ed. México 2004. Universidad Autónoma Chapingo. Instituto de Fitosanidad, Montecillo.
4. Urrutia Anaya I, Pacheco Aguilar JR, Aislamiento e identificación de *Pythium* sp, un fitopatógeno de interés agrícola en el estado de Queretaro: 1-4.
5. Ibarra JE, Del Rincón MCC, Galindo E, Patiño M, et al. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. 2006; 48(2): 133-120.
6. Isai Quevedo D. Evaluación de fungicidas sistémicos y de contacto en el control de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*). [Tesis de Maestría]. México: Institución de enseñanza de ciencias agrícolas, Colegio de Posgraduados.
7. SENASA, Fungicida Amistar Top, Syngenta Crop protection S.A sucursal Perú.
8. Borga E. Evaluación in vitro de fungicidas para el control de *Monilinia* spp. aislada de duraznos (*Prunus persica*) de diferentes localidades de la sierra del Ecuador. [Tesis], Universidad San Francisco de Quito; 2011.
9. Forbes GA, Escobar X.C, Ayala C.C, Revelo J, et al. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. Phytopathology, 1997; 87: 375-380.
10. Yong Wang, Yun Geng, Yun-Fei Pei, Xiu-Guo Zhang, Molecular and morphological description of two new species of *Stemphylium* from China and France. The Mycological Society of America 2010; 102(3): 708-717.
11. Nayive Pino BHV, Ethnobotany of Four Black Communities of the Municipality of Quibdo, Choco – Colombia, Lyonia, 2004 7 (2): 61-69.

12. Cedeño L, Carrero C, Quintero k, Pino H, Espinoza W, *Stemphylium vesicarium* causante de quema foliar en ajo y cebolla en Mérida, Venezuela, 2003; 28 (3): 174-177.
13. Singh P, Bugiani R, Cavanni P, Nakajima H, et al. Purification and Biological Characterization of Host-Specific SV-Toxins from *Stemphylium vesicarium* Causing Brown Spot of European Pear 1999; 89(10): 947-953.
14. S.S. Jakhar, J.C. Duran, L.S. Surag, Studies on conidial germination and factors affecting disease development of *Stemphylium* blight of onion, 1996; 49 (4): 362-365.
15. Basallote-Urebaa MJ, Prados-Ligeroa AM, Melero-Varab JM, Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain, Phytopathology, 1999; 48: 139-145.
16. Arzanlou M, Khodaei S, Babai-Ahari A, *Helianthus annuus* as a natural host for *Stemphylium vesicarium* in Iran, Australasian Plant Pathology Society Inc, 2012; (7): 167-170.
17. Meyer MP, Hausbeck MK, Optimal Fungicide Management of Purple Spot of Asparagus and Impact on Yield. 1999; 525-530.
18. Köhl J, Groenenboom-de Haas, BH., Kastelein P, Rossi V, and Waalwijk C. Quantitative detection of pear-pathogenic *Stemphylium vesicarium* in orchards. Phytopathology.2009; 99: 1377-1386.
19. Mwakutuya E, Banniza S, Influence of temperature and wetness periods on the development of *Stemphylium* blight on lentil. Plant Dis. 2010; 94: 1219-1224.
20. Edmore Mwakutuya. Epidemiology of *Stemphylium* Blight of Lentil (*Lens culinaris* in Saskatchewan). [Tesis Maestría], Universidad de Saskatchewan Saskatoon; 2006.
21. Llorente I, Montesinos E. Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. Phytopathology, 2002; 92: 99-104.
22. Pramod Kumar, Genetics of Resistance to stemphylium leaf blight of lentil (*lens culinaris*) in the cross barimasur- 4 × cdc milestone. [Tesis de Maestría], University of Saskatchewan Saskatoon; 2007.
23. Suheri H, Price T.V, Infection of onion leaves by *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* and disease development in controlled environments Plant Pathology 2000; 49: 375-382.
24. Rodriguez Lacherre M, Chico Ruiz J, Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de chamico, *Datura stramonium*, sobre *Fusarium oxysporum asparagi* y *Stemphylium vesicarium* aislados del cultivo de espárrago, *Asparagus officinalis*, de Moche, Trujillo (Perú) 2012; 32(1): 56-63.
25. Cadenas Giraldo C. Agentes causales de enfermedades de cuello y raíces en algunos cultivos de selva alta central, La Universidad Nacional Agraria La Molina 2007; 68 (1): 1-10.
26. Quilambaqui JMA, Aislamiento e Identificación de Especies de *Fusarium* spp Asociadas al Declinamiento del Espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en Cinco Municipios de Guanajuato, México 2005; 18 (1): 135-140.
27. Zumarán F. Efecto “in vitro” de diferentes concentraciones de Metribuzina sobre la germinación y crecimiento de *Paecilomyces lilacinus*. Tesis de Biólogo Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2005.
28. Quintin M, Cabero T, Paz Y. Tratamiento estadístico de datos con SPSS. España. 2008.
29. Arrazola A. Biología de la membrana celular. Nefrología. Vo I. XIV. Núm. 4. España 1994.
30. De las Heras Gutierrez, A. Caracterización de genes de poligalacturonasas de “*Fusarium oxysporum*” f.sp. “*Radicis lycopersici*” y su análisis en sistemas heterólogos. [Tesis grado de Doctor]. Universidad Complutense de Madrid. España, 2004.
31. Reuveni M, Sheglov D, Effects of Azoxystrobin, Difenoconazol, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin o germination and growth of *Alternaria alternate* and decay in red delicious apple fruit. Crop protection, 2002; 21: 951-955.
32. Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Rev Iberoam Micol, 2008; 25: 78-82.
33. Lodish H. y col. Biología Celular y Molecular. Buenos Aires. 5ª ed: Ed. Médica Panamericana; 2005.
34. Deacon JW. Introducción a la micología moderna. México. Ed. Limusa. 1990. 67-192.
35. Ruiz J. Viaje al asombroso mundo de los hongos. México. Fondo de cultura económica; 2008.
36. Griffin D. Fungal physiology. 2nd ed. USA. Wiley science paperback series; 1993.
37. Alfonso Pulido DP, Sandoval Sisa ER, Evaluación “in vitro” de fungicidas para el control de hongos patógenos en esquejes de clavel durante la etapa de enraizamiento, [Tesis], Pontificia Universidad Javeriana; 2008.



Identificación de *Listeria monocytogenes* por amplificación del gen *iap* a partir de cultivos de *Listeria* sp. obtenida en lugares de expendio de carne de res en Trujillo, Perú

Identification of *Listeria monocytogenes* by *iap* gene amplification from cultures of *Listeria* sp. obtained in places of sale of beef in Trujillo, Peru

Darwin Zavaleta Isquierdo y Pedro Mercado Martínez

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Se identificó a *Listeria monocytogenes* a partir de cultivos de *Listeria* sp. obtenida de lugares de expendio de carne de res en Trujillo (Perú), mediante la amplificación por PCR clásico de un fragmento de ADN conservado perteneciente al gen *iap* y limitado por los primers MonoA y Lis1B. Se obtuvieron 37 cultivos identificados fenotípicamente como pertenecientes al género *Listeria* y luego, molecularmente, como *L. monocytogenes*. El proceso constó de tres etapas: (i), se extrajo el ADN molde de los cultivos aislados mediante la técnica del hervor para luego, (ii) usando la técnica la PCR clásico se realizó la amplificación de los fragmentos conservados en el termociclador (Applied Biosystems) obteniéndose en las muestras positivas 2³⁵ segmentos objetivos con un peso de 660 bp cada uno, el segmento de ADN amplificado se encuentra dentro del gen *iap* y es específico para *L. monocytogenes*, los segmentos amplificados y (iii) fueron sometidos a un corrido electroforético en gel de agarosa al 10% para luego ser comparados con el control positivo y determinado su peso molecular mediante el marcador ladder. Se encontró que 10 de los 37 cultivos aislados de lugares de expendio de carne de res en Trujillo (Perú) pertenecen a *L. monocytogenes*.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, PCR, primers, Trujillo (Perú)

ABSTRACT

Listeria monocytogenes was identified from cultures of *Listeria* sp. obtained from places of beef sale in Trujillo (Peru) by amplification of classic preserved a DNA fragment belonging to the IAP gene and limited by Monoa and Lis1B PCR primers. 37 culture phenotypically identified as belonging to the genus *Listeria* and then molecularly, as *L. monocytogenes* were obtained. The process consisted of three steps: (i) the crop template DNA isolated by the technique of boiling and then, (ii) using the classical technique PCR amplification of conserved fragments was performed in the thermocycler (Applied extracted Biosystems) obtained in positive samples 2³⁵ target segments with a weight of 660 bp each, the amplified DNA segment is within the *iap* gene and is specific for *L. monocytogenes*, the amplified segments and (iii) were subjected to a bench agarose gel electrophoresis to 10% and then be compared with the positive control and determined its molecular weight by ladder marker. It was found that 10 of the 37 cultures from places of beef sale in Trujillo (Peru) belong to *L. monocytogenes*.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, PCR primers, Trujillo (Peru)

INTRODUCCIÓN

El género *Listeria* incluye a seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi*, distribuidas en el suelo, plantas en descomposición, aguas residuales, el ensilaje y en polvo; las dos primeras son consideradas patógenos de animales, mientras que *L. monocytogenes* está asociada a enfermedades en humanos^{1,2,3}. *L. monocytogenes* está compuesta de 13 serotipos agrupados en tres linajes: I, II y III, de los cuales el serotipo 4b está implicado en la mayoría de casos de listeriosis humana^{4,5}. Las manifestaciones clínicas de la listeriosis invasiva son graves e incluyen abortos, sepsis, meningoencefalitis y/o síndrome de gastroenteritis febril¹. La infección al comienzo del embarazo puede provocar un aborto espontáneo, mientras que las infecciones a finales del embarazo pueden conducir a parto de mortinato o a la muerte del bebé al cabo de unas pocas horas de nacido^{8,9}.

Los factores de virulencia de *L. monocytogenes* están codificados por genes agrupados en los islotes de patogenicidad. El islote de patogenicidad de *Listeria* tipo 1 (LIPI-1) es controlado por el factor regulador positivo A (*prfA*). El regulón *prfA* contiene los 6 principales genes de la virulencia, divididos en tres grupos: el monocistrón *hly*, el operón lecitinasa (*mpl*, *actA* y *plcB*) y el operón *plc A-prfA*. El gen *hly* codifica la Listeriolisina O (LLO), los genes *plcA* y *plcB* codifican las fosfolipasas C tipo A y tipo B respectivamente; mientras que, los genes *mpl*, *actA* y *prfA* codifican sus proteínas correspondientes^{1,11}. Además, las internalinas A y B se codifican en el operón *inlAB* presente en el islote de patogenicidad de *Listeria* tipo 2 (LIPI-2) del cromosoma bacteriano⁽¹²⁾. Esta bacteria se adhiere e ingresa a la célula huésped con la ayuda de una familia de proteínas de superficie llamadas Internalinas, siendo las más notables la Inl A (una proteína de 88 KDa codificada por *InlA*) y la Inl B (una proteína de 65 KDa codificada por *InlB*), las cuales facilitan su ingreso a hepatocitos, fibroblastos, células epiteliales entre otros; dentro de la célula huésped, es localizada en una vacuola primaria en donde dos moléculas asociadas a la virulencia son responsables de la lisis de la membrana de la vacuola primaria y su posterior escape, estas moléculas son la Listeriolisina O (LLO, una proteína de 58 KDa codificada por *hly*), es un formador de poros, toxina de tiol-activado esencial para la virulencia de *L. monocytogenes*, y la Fosfatidilinositol-fosfolipasa C (PI-PLC, una proteína de 33 KDa codificada por *plcA*) que actúa en sinergismo con la Fosfatidilcolina-fosfolipasa C (PC-PLC, una proteína de 29 KDa codificada por *plcB*)¹³.

Además de la Listeriolisina O (LLO), otro estudio identificó una segunda hemolisina la Listeriolisina S (LLS), la cual está presente en un subconjunto de las cepas del linaje I, quienes a su vez están mayormente implicadas en brotes y epidemias esporádicas de listeriosis. Esta segunda hemolisina sólo es inducida bajo estrés oxidativo, condición localizada en los fagosomas, contribuyendo en la supervivencia en neutrófilos polimorfonucleares. La LLS pertenece a una familia de péptidos modificados con capacidad virulenta, incluyendo al potente factor de virulencia Estreptolisina S (SLS), un péptido citolisina producido por *Streptococcus pyogenes*¹⁴. Usando dichos factores de virulencia *L. monocytogenes* escapa al citosol y se replica intracelularmente, para lograr esto ha desarrollado un sofisticado conjunto de mecanismos moleculares que le permite interactuar y manipular la biología de la célula huésped¹⁵.

Los datos epidemiológicos disponibles muestran que se dan tanto casos esporádicos como brotes de listeriosis invasiva, siendo los casos esporádicos los de mayor incidencia¹⁶. La listeriosis invasiva es una enfermedad relativamente poco común pero habitualmente grave, con una frecuencia típica de 3 a 8 casos por cada 1 000 000 de personas y con tasas de mortalidad del 20 al 30 % de los pacientes hospitalizados, en particular neonatos¹⁷. Sin embargo, entre el 2 y el 10 % de la población en general es portador de este microorganismo sin consecuencias evidentes para la salud¹⁸. Los alimentos listos para el consumo (LPC) como helados, leche pasteurizada, productos cárnicos fermentados y pescado ahumado en frío, contaminados pueden ocasionar brotes de listeriosis, como el que ocurrió en el 2008¹⁹. Asimismo, *L. monocytogenes* ocasiona problemas particulares en la industria alimentaria, ya que puede sobrevivir y crecer en condiciones a las cuales frecuentemente se conservan los alimentos, además forma biopelículas que incrementan su persistencia y resistencia durante el procesamiento industrial lo cual conlleva a la contaminación de los alimentos, con la consecuente propagación y daños a la salud^{20,21,22,23,24,25}.

Actualmente se requieren de sistemas de análisis más rápidos, sencillos y menos costosos capaces de detectar “in vivo” patógenos en muestras complejas de alimentos, ya que las técnicas de cultivo de detección e identificación requieren de 5 a 7 días para completarse, por esto se ha desarrollado un dispositivo de análisis basado en papel para la detección de los patógenos *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* y *L. monocytogenes* como un sistema de detección en muestras de alimentos; consiste en un ensayo en papel micropunto (impresión de cera en papel filtro) donde una enzima ligada al patógeno reacciona con un sustrato cromógeno originando un cambio de color, es capaz de detectar concentraciones de bacterias tan bajas como 10^{1} UFC/cm² (26,27,28).

Un ELISA de captura de antígenos usando anticuerpos monoclonales específicos para *L. monocytogenes* ha sido estandarizado y validado con muestras de carne, mariscos, productos lácteos, pasta y harina, encontrándose que es 100% específico para *Listeria* spp. con un límite de sensibilidad de 6.6×10^3 UFC/mL²⁹. También se ha utilizado para tal fin, el análisis de macrorrestricción por electroforesis en gel de campo pulsátil (PFGE), Southern blot, la ribotipificación y el análisis del polimorfismo del ADN cromosómico a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en particular, el polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), el polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)^{27,28,29}.

La PCR es una técnica fiable y reproducible para la identificación de *Listeria* spp. y diferenciación de *L. monocytogenes* de otras especies de *Listeria*, cuando se usan cebadores para genes de factores de virulencia o genes de subunidades de ARN; el principal obstáculo para el uso de la PCR en muestras directamente de comidas y ambientales, es la presencia de inhibidores de la PCR que podrían dar lugar a resultados falsos negativos²³. La PCR múltiple (Multiplex PCR) utiliza varios conjuntos de cebadores que permiten la detección simultánea de más de un patógeno en la misma muestra^{23,24,25,26} y para *L. monocytogenes* emplea el primer específico para el gen *hly*, que produce fragmentos de ADN de 210 pb que son fácilmente detectados por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (37). La PCR anidada (Nested PCR) también utiliza un conjunto de cebadores pero diseñados para un mismo objetivo en reacciones secuenciales, con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad de la reacción^{30,38} y la PCR en tiempo real (RT-PCR), enfocado en el gen *lssX*, se desarrolló como un medio de identificación y diferenciación de aquellas cepas de *L. monocytogenes* que producen Listeriolisina S (LLS-positiva) y las cepas que no lo producen (LLS-negativa), la LLS es una hemolisina adicional producida por las cepas del linaje I que están implicadas en la mayoría de los casos de brotes listeriosis; el límite de detección de este ensayo fue de 10 genoma equivalentes²⁹.

La proteína p60 es una proteína extracelular de 60 KDa con actividad hidrolasa de la mureína, involucrada en la formación del septum durante la división celular y responsable de la invasión listerial en fagocitos no profesionales; el gen *iap* codifica la proteína asociada a la invasión p60 que es común en todas las especies de *Listeria*; una comparación anterior de secuencias de ADN indicó que es conservado y que ciertas porciones del gen son específicas para cada especie, por lo tanto basándose en esto, una combinación de sólo cinco cebadores permite la detección específica y la diferenciación de especies de *Listeria*^{32,33}.

Teniendo en cuenta que la identificación de *L. monocytogenes* por amplificación del fragmento de ADN conservado perteneciente al gen *iap* a partir de los cultivos de *Listeria* sp. proporcionará un elevado porcentaje de confiabilidad al determinar esta especie en los cultivos que fueron aislados e identificados fenotípicamente, en el presente trabajo se aplicó esta metodología en cultivos de *Listeria*, identificadas fenotípicamente, obtenidas de carne de vacuno listas para su venta en lugares de expendio en la ciudad de Trujillo (Perú).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- 37 cultivos identificados como *Listeria* sp. procedentes de lugares de expendio de carne de res en Trujillo (Perú)^{33,34,35}.
- Un par de cebadores diseñados a partir de un fragmento conservado de 660 bp perteneciente al gen *iap* específicos para identificar *L. monocytogenes*^{34,35}. La secuencia de nucleótidos se describe a continuación:

Mono A: 5'-CAAACCTGCTAACACAGCTACT-3'

Lis1B: 5'-TTATACGCGACCGAAGCCAAC-3'

Extracción y preparación del ADN molde

- Se preparó a partir de cultivos bacterianos aislados, un caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) y se dejó enriquecer de 20 - 24 horas a 35 °C, o a partir de una colonia en crecimiento en placa de agar se realizó una suspensión en solución salina al 0.85 %.
- Se transfirió 1 mL de la suspensión a un tubo de microcentrifuga para centrifugar a 12 000 RPM/g por 3 minutos.
- El sobrenadante se eliminó y se resuspendió completamente el precipitado en 1 mL de NaCl al 0.85%.
- Se centrifugó a 12 000 RPM/g por 3 minutos.
- El sobrenadante se eliminó y se resuspendió el precipitado en 1 mL de agua estéril.
- Se hirvió durante 10 minutos.
- Finalmente se centrifugó a 12 000 RPM/g por 1 minuto, el sobrenadante fue separado y guardado como ADN molde a -20 °C.

Ensayo PCR clásico

- El volumen final de la reacción fue de 22 µL, conteniendo 16 µL de agua ultra pura estéril, tampón de reacción MgCl₂ 2.5 µL; desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) 1 µL, enzima *Taq* ADN polimerasa 0.5 µL, cebadores 1 µL de cada uno, y ADN genómico 1 µL.
- La amplificación del ADN se realizó en el Termociclador Applied Biosystems (equipo del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo). Las condiciones de la PCR fueron:
 - i. Desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos.
 - ii. 35 ciclos de:
 - Desnaturalización a 94 °C por 45 segundos.
 - Hibridación a 55 °C por un minuto.
 - Extensión a 72 °C por 45 segundos.
 - iii. Un ciclo final de extensión de 72 °C por 7 minutos.

Electroforesis

- Se preparó el gel para el corrido electroforético con 0.4 g de agarosa, 4 mL de tampón de electroforesis TAE 1X y 0.2 mL de bromuro de etidio.
- En un cinta de parafina de mezcló 1 µL del producto de amplificación con 1 µL de azul de bromofenol para cada cultivo, para luego colocarlo en el pocillo correspondiente del gel de agarosa.
- La placa de electroforesis se conectó a la fuente de poder a una potencia de 200 V por 40 minutos para el corrido de los fragmentos amplificados.

RESULTADOS

En las Figs. 1, 2, 3 y 4 se muestra los resultados del PCR en relación a la banda patrón de 660pb, en las diferentes muestras, consecutivamente de la 1 a la 29.

DISCUSIÓN

La identificación de la especie *Listeria monocytogenes* por amplificación del fragmento de ADN conservado perteneciente al gen *iap* nos garantizó la fiabilidad de los resultados obtenidos, lo cual evidencia la presencia significativa de este patógeno en un 27% de los cultivos de *Listeria* sp. procedentes de lugares de expendio de carne de res en Trujillo, lugares que resultan ser fuentes de desarrollo y diseminación de este microorganismo causante de la listeriosis, enfermedad que hoy en día ocupa el segundo lugar después de la salmonelosis, como causa más frecuente de muerte entre las enfermedades que son transmitidas por alimentos^{6,33}. La diferencia significativa entre la presencia de *L. monocytogenes* con un 27% y *Listeria* sp. con un 73% evidencia que en los lugares donde se aislaron estos cultivos tienen inadecuadas prácticas de limpieza para este patógeno²⁴.

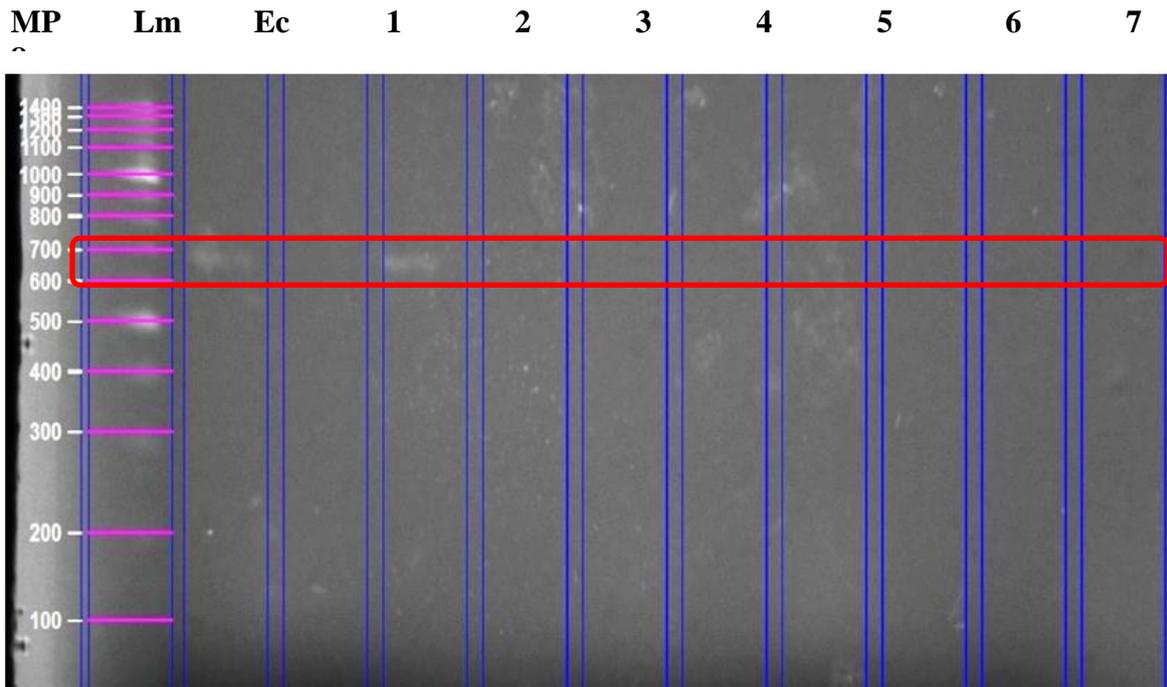


Fig. 1. Fragmento de ADN del gen *iap* amplificado en el cultivo 1 de 660 pb separado por electroforesis en gel de agarosa (MP, marcador de peso molecular ladder 100 bp; Lm, *Listeria monocytogenes* (control positivo); Ec, *Escherichia coli* -control negativo-)

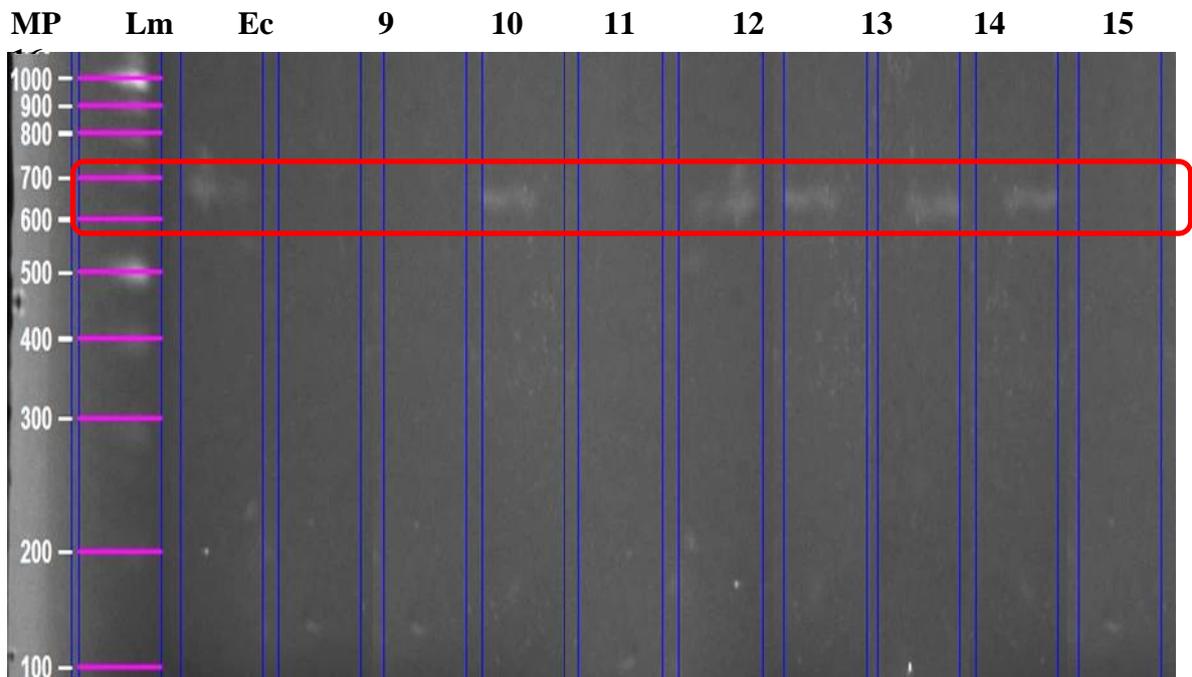


Fig. 2. Fragmentos de ADN amplificados del gen *iap* en los cultivo 10, 12, 13, 14 y 15 de 660 pb separado por electroforesis en gel de agarosa (MP, marcador de peso molecular ladder 100 bp; Lm, *Listeria monocytogenes* (control positivo); Ec, *Escherichia coli* -control negativo-).

MP Lm Ec 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29

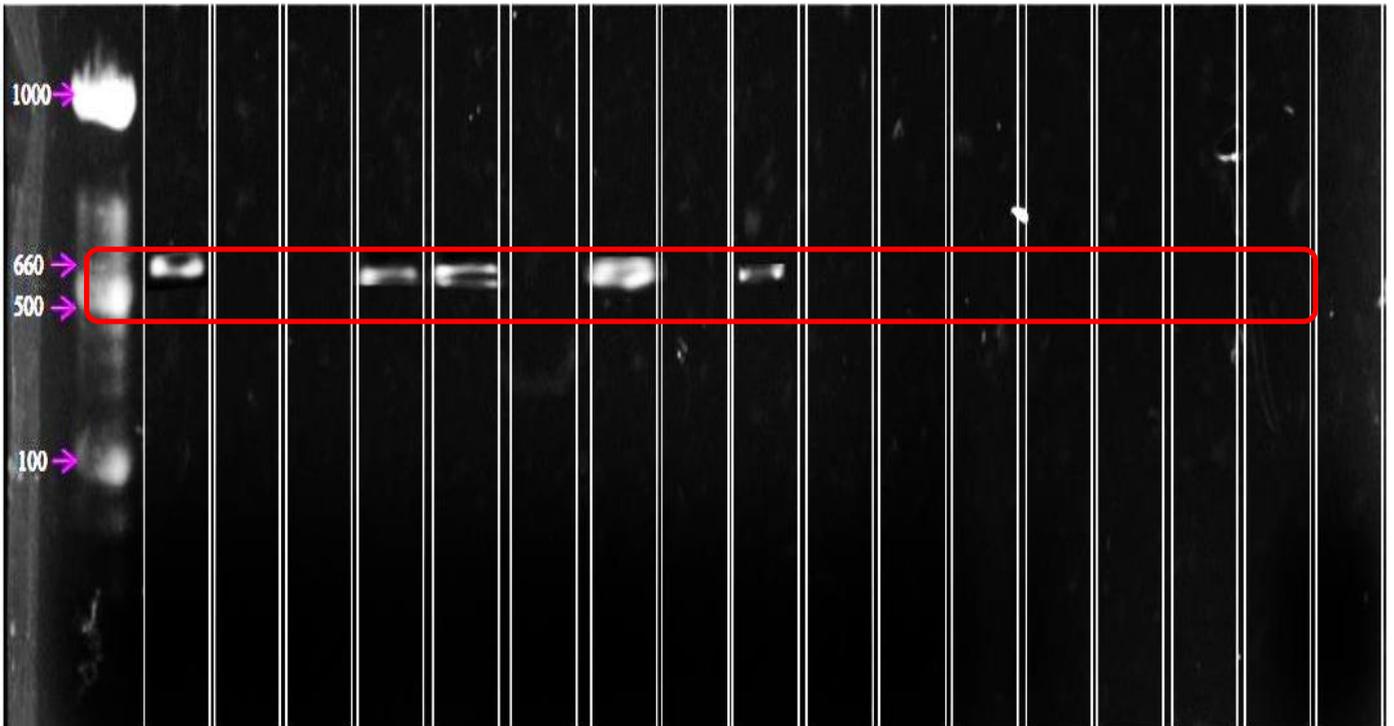


Fig. 3. Fragmentos de ADN amplificados del gen *iap* en los cultivo 18, 19, 21 y 23 de 660 pb separado por electroforesis en gel de agarosa (MP, marcador de peso molecular ladder 100 bp; Lm, *Listeria monocytogenes* (control positivo); Ec, *Escherichia coli*-control negativo-).

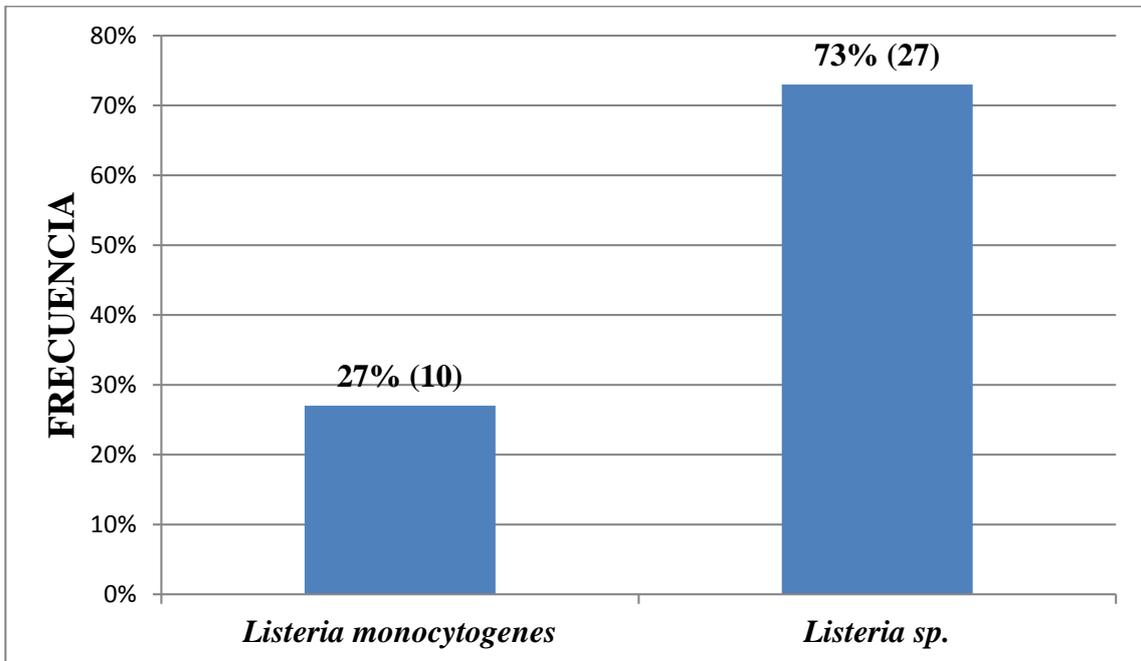


Fig. 4. Frecuencia de la especie *Listeria monocytogenes* identificada usando PCR clásico a partir de cultivos de *Listeria sp.* procedente de lugares de expendio de carne de res en Trujillo ($p < 0.05$, hay significancia: la diferencia es significativa)

La extracción y preparación del ADN molde de los cultivos de *Listeria* sp. se realizó mediante el método del hervor, método sencillo, rápido y económico, el cual nos proporcionó un ADN molde de baja pureza pero que resultó ser de calidad suficiente para realizar la amplificación del fragmento del gen *iap* en 2³⁵ segmentos objetivos²⁷. Los cebadores usados en esta investigación Mono A y Lis1B evidenciaron su alta especificidad al reconocer el segmento objetivo de 660 pb del gen *iap* específico para *Listeria monocytogenes* y no para otras especies de *Listeria*^{1,34}. En otras investigaciones²⁹ usan una combinación de cebadores específicos para identificar otras especies *L. innocua*, *L. grayi* y las tres especies agrupadas *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri* respectivamente, todas de interés clínico. Así, la técnica de PCR puede ser útil para la identificación y diferenciación entre especies del género *Listeria* aisladas de diferentes fuentes. Sin embargo en esta investigación la elección del segmento objetivo de 660 pb ubicado en el gen *iap* fue en base a estudios anteriores en el cual se determinó el uso de los cebadores Mono A y Lis1B para la identificación de *L. monocytogenes* mediante PCR clásico⁽⁴¹⁾, ya que en el ensayo PCR múltiple para la identificación de *L. monocytogenes* se emplea el cebador específico para el gen *hly*, la amplificación con este cebador produce segmentos objetivos de ADN de 210 pb²⁸.

Se conoce que una causa frecuente de falsos negativos y/o amplificaciones atenuadas de fragmentos objetivos por PCR clásico, es debido a inhibidores orgánicos e inorgánicos presentes en las muestras de ADN contaminadas que actúan directamente inhibiendo la acción de la *Taq* polimerasa, pese a esto, en esta investigación los cultivos de *Listeria* sp. usados para la extracción de ADN molde, provienen de un cultivo que fue sometido a un proceso de aislamiento y purificación por lo que se descarta la presencia de inhibidores durante el ensayo de la PCR^{30,31}.

Por otro lado, es importante recalcar que la listeriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria, siendo implicados principalmente los productos lácteos y cárnicos que por su alto contenido proteico y graso favorecen el crecimiento bacteriano⁽⁷⁾, además la transmisión se comporta como brotes epidémicos de fuente común, lo que podría justificar la similitud entre las cepas clínicas de *L. monocytogenes* identificadas; es decir, la poca variabilidad de genotipos observados. Sin embargo, la transmisión vertical y nosocomial de listerias son también posibles, por lo que los datos obtenidos en esta investigación muestran la presencia real de este patógeno en lugares de común tránsito para personas que pertenecen a los grupos de riesgo, por lo que se abre un gran campo de investigación en la identificación mediante técnicas moleculares rápidas, específicas y fiables^{6,32}.

CONCLUSIONES

- Existe diferencia significativa entre *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp. con respecto a la frecuencia de identificación.
- De los 37 cultivos de *Listeria* sp. 10 (27%) cultivos fueron identificados como *Listeria monocytogenes*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 2001; 14(3):584-640.
2. Chanqueo L, Gutiérrez C, Armas R, Urriola G, Bustos M, Tapia C, et al. Bacteriemia primaria por *Listeria monocytogenes* en pacientes con cirrosis hepática. Caso clínico. Rev Méd Chile 2008; 136, 225-229.
3. Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, Chizhikov V. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. J Clin Microbiol 2002; 40(12): 4720-4728.
4. Gray MJ, Zadoks RN, Fortes ED, Dogan B, Cai S, Chen Y, et al. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. Appl Environ Microbiol 2004; 70(10): 5833-5841.
5. Rebagliati V, Philippi R, Rossi M, Troncoso A. Prevention of foodborne listeriosis. Indian J Pathol Microbiol 2009; 52(2): 145-149.
6. Baltimore RS. *Listeria monocytogenes*. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BF, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 19th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011: chap 181.
7. Bennett L. *Listeria monocytogenes*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone; 2009.

8. Koo OK, Amalaradjou MAR, Bhunia AK. Recombinant probiotic expressing *Listeria* adhesion protein attenuates *Listeria monocytogenes* virulence in vitro. PLoS ONE 2012; 7(1): e29277. doi:10.1371/journal.pone.0029277.
9. Bierne H, Cossart P. Inl B, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasive and growth factor. J Cell Science 2002; 115 (17): 3357-3367.
10. Cotter PD, Draper LA, Lawton EM, Daly KM, Groeger DS, Casey PG, et al. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. PLoSPathog 2008; 4(9): e1000144. doi:10.1371/journal.ppat.1000144.
11. O'Byrne C, Ultratna M. *Listeria monocytogenes*: at the coalface of host-pathogen research. Bioeng Bugs 2010; 1(6): 371-377.
12. Okada Y, Okutani A, Suzuki H, Asakura H, Monden S, Nakama A, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan. J Vet Med Sci 2011; 73(12): 1681-1684.
13. FAO y OMS: Consulta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de Riesgos de Peligros Microbiológicos en los Alimentos: Caracterización del riesgo de *Salmonella* spp. en los huevos y en los pollos para asar y de *L. monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo. Estudios FAO 2001: Alimentación y Nutrición No 72.
14. FAO: Consulta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de Riesgos de Peligros Microbiológicos en los Alimentos. Estudios FAO 2000: Alimentación y Nutrición, No 71.
15. Cox LJ, Kleiss J, Cordier JL, Cordellana C, Konkel P, Pedrazzini C, Benmer R, Siebegna A. *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments. Food Microbiol 1989; 6(1): 49-61.
16. Jeong DK, Frank JF. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10 °C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. J Food Prot 1994; 53: 224-227.
17. Thimothé J, Nightingale KK, Gall K, Scoth VN, Wiedmann M. Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. J Food Prot 2004; 67(2): 328-341.
18. Wing EJ, Gregory SH. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. J Infect Dis 2002; 185(Suppl 1): S18-S24.
19. Gandhi M, Chikindas ML. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. Int J Food Microbiol 2007; 113(1): 1-15.
20. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Detección and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in food Chapter 10. 8th Ed. 31 pp. 1992.
21. Jokerst JC, Adkins JA, Bisha B, Mentele MM, Goodridge LD, Henry CS. Development of a paper-based analytical device for colorimetric detection of select foodborne pathogens. Anal Chem. 2012 Feb 7 [Epub ahead of print].
22. Portanti O, Di Febo T, Luciani M, Pompili C, Lelli R, Semprini P. Development and validation of an antigen capture ELISA based on monoclonal antibodies specific for *Listeria monocytogenes* in food. Vet Ital 2011; 47(3): 281-290.
23. Tang Y, Procop G, Persing D. Molecular diagnostic of infectious diseases. Clin Chem 1997; 43(11): 2021-2038.
24. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22 (6): 355-360.
25. Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1986; 51: 263-273.
26. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiol Rev 2005; 29(5): 851-875.
27. Bubert A, Hein I, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W, et al. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol 1999; 65 (10): 4688-4692.
28. Hsieh HY, Tsen HY. Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food samples. J Food Prot 2001; 64 (11): 1744-1750.
29. Chen Y, Knabel SJ. Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 2007; 73 (19): 6299-6304.
30. Park YS, Lee SR, Kim YG. Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). J Microbiol 2006; 44(1): 92-97.
31. Clayton EM, Hill C, Cotter PD, Ross RP. Real-time PCR assay to differentiate Listeriolysin S-positive and -negative strains of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 2011; 77(1): 163-171.
32. Le Monnier A, Abachin E, Beretti JL, Berche P, Kayal S. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* meningoenzephalitis by real-time PCR for the *hly* gene. J Clin Microbiol 2011; 49(11): 3917-3923.

33. Villegas M. Caracterización molecular de cepas clínicas de *Listeria monocytogenes* aisladas en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima durante el período 2001-2005. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2010.
34. Parimango K. Aislamiento de *Listeria* spp de superficies donde se expende carne de res, en los mercados de la ciudad de Trujillo - La Libertad, en los meses octubre 2012- enero 2013, Perú. Tesis Br. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2013.
35. Guarniz D. Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de *Listeria* sp. obtenidos de mesas de trabajo donde se expenden embutidos de procedencia de la ciudad de Trujillo, en los meses de octubre – marzo del 2013, Tesis Br. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2013.



Degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. a dos temperaturas y tres pH

Sodium cyanide degradation by *Pseudomonas* sp. at two temperatures and three pH

Jhonn Morillo Mendoza y Juan Guevara Gonzales

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 las temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10, 10.5 sobre la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. aislada a partir de lodos activos de la planta de tratamiento de aguas residuales de Covicorti-Trujillo (Perú). La muestra de lodo activo se recolectó mediante un muestreo por conveniencia y fue sometida a un enriquecimiento en un caldo mínimo de sales con 500 ppm de cianuro de sodio durante 4 días. Para los ensayos se tuvieron seis frascos de vidrio conteniendo 100 mL de caldo mínimo de sales con buffer carbonato, 1000 ppm de cianuro de sodio y 4mL de inóculo de *Pseudomonas* sp. (2.7×10^9 cel/mL) a las temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5 (diseño factorial); se usaron también otros seis frascos de vidrio como controles bajo las mismas condiciones pero sin inóculo. Cada ensayo se realizó por triplicado y durante seis días; la degradación de cianuro de sodio fue medida al tiempo cero y cada 24 horas mediante el método titulométrico. Los resultados muestran máxima degradación de cianuro por *Pseudomonas* sp. a 36°C/pH 9.5(655ppm) y 32°C/ pH9.5(648 ppm) pero mínima degradación a 36°C/ pH 10.5(203 ppm). Los análisis de confirman diferencia estadística significativa entre los controles y todos los tratamientos usados; también demuestran que no existe diferencia significativa entre aquellos tratamientos que usaron el mismo pH (9.5, 10 y 10.5). Se concluye que la combinación de las temperaturas 32 y 36°C con los pH 9.5, 10, 10.5 influyen sobre la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* ps siendo las combinaciones de 32 y 36°C con el pH 9.5 las que favorecen este proceso.

Palabras clave: Degradación, cianuro de sodio, *Pseudomonas*, método titulométrico

ABSTRACT

Effect of 32 and 36 °C temperatures in combination with the pH at 9.5, 10.0, and 10.5 on the degradation of sodium cyanide by *Pseudomonas* sp. isolated from activated sludge treatment plant wastewater COVICORTI-Trujillo (Peru) was determined. The activated sludge sample was collected using a convenience sample and was subjected to enrichment in minimal salts broth with 500 ppm of sodium cyanide for four days. For trials six glass bottles containing 100 mL were taken broth minimal salts buffer carbonate, 1000 ppm of sodium cyanide and 4 ml of inoculum of *Pseudomonas* sp. (2.7×10^9 cells/mL) at the temperatures of 32 and 36 °C in combination with the pH 9.5, 10 and 10.5 (factorial design); six were also used other glass bottles as controls under the same conditions but without inoculum. Each assay was performed in triplicate, for six days; Degradation of sodium cyanide was measured at time zero and every 24 hours through titulométric method. The results show high degradation of cyanide by *Pseudomonas* sp. at 36°C / pH 9.5 (655ppm) and 32 °C/pH 9.5 (648 ppm) but minimal degradation at 36 °C/pH 10.5 (203 ppm). Analysis to confirm static significant difference between controls and all treatment used; also show that there is no significant difference between treatments that used the same pH (9.5, 10 and 10.5). The paper concludes that the combination of the temperatures 32 and 36 ° C with pH 9.5, 10, 10.5 influence the degradation of sodium cyanide *Pseudomonas* sp. combinations being 32 to 36 ° C with the pH 9.5 which favors this process.

Keywords: Degradation, sodium cyanide, *Pseudomonas*, titulometric method

INTRODUCCIÓN

Los cianuros son considerados contaminantes debido a su alta toxicidad para todos los organismos aeróbicos, reaccionan con iones metálicos de enzimas tales como Fe, Zn y Cu, es un inhibidor irreversible de enzimas que participan en la cadena respiratoria a nivel mitocondrial, específicamente reacciona con la forma oxidada del citocromo a_3 ^{1,2}; la concentración entre 150 y 300 ppm es letal para el ser humano y a niveles de 50 ppm se puede percibir con el olfato, a pesar de que el cianuro es un compuesto altamente nocivo, se produce naturalmente por mecanismos como la cianogénesis y síntesis de etileno³, pero también es transformado por mecanismos de detoxificación biológica^{4,5}, alcanzándose así un equilibrio ambiental relativo.

Dentro de las formas más tóxicas se tiene el ion cianuro (CN⁻) y el cianuro de hidrogeno (HCN) el cual es letal con una dosis de 90 a 100 ppm y puede ser percibida desde los 20 a 30 ppm ^{3,6}. La vida media del cianuro de hidrógeno en la atmósfera es de aproximadamente 1 a 3 años, este se encuentra principalmente como cianuro de hidrógeno gaseoso; mientras que una pequeña cantidad como finas partículas de polvo. Los compuestos de cianuro se mueven con bastante facilidad en el suelo, formándose cianuro de hidrógeno que luego se evapora; otros compuestos de cianuro se transforman a otras formas químicas por la acción de microorganismos en el suelo. En concentraciones altas, el cianuro es tóxico a estos microorganismos ya que permanece sin ser cambiado a otras formas y atraviesa el suelo llegando hasta el agua subterránea⁷. Las distintas formas de exposición a este compuesto para algunos animales y humanos son: Al respirar aire cerca de sitios de desechos peligrosos que contienen cianuro; al beber agua, tocar tierra o comer alimentos que contienen cianuro de manera natural como algunos tipos de frijoles y almendras, el humo de cigarrillos y el humo proveniente de incendios, son fuentes importantes de cianuro^{3,8}.

En la actualidad, grandes cantidades de cianuro en sus distintas formas son descargados a diario en suelos, aguas y aire procedente de diferentes actividades industriales tales como la minería, en el proceso de recuperación de oro⁹, actividades de electrólisis de aluminio, que se realizan para recubrir la superficie del metal y protegerlo contra la corrosión¹⁰, carbonización de madera empleada para cocinar, llamada también pirolisis y gasificación de carbón o gasificación por pirolisis rápida¹¹, producciones farmacéuticas y producción de fibras sintéticas como plásticos¹².

En Perú, el 20 % de la producción minera aurífera es informal, lo cual hace que la problemática de la contaminación por cianuro, mercurio y otros desechos tóxicos se agudice aún más, debido al poco control del cumplimiento de las normas que regulen sus usos y emisiones al ambiente, contaminando el suelo, aire y agua. Entre los departamentos más afectados tenemos a Madre de Dios, La Libertad y Cajamarca, siendo Madre de Dios donde se centra el 96% de la minería informal¹³.

Existen métodos de tratamientos químicos para degradar el cianuro que generalmente se basan en la cloración alcalina¹⁴, pero no son muy recomendables, debido a que en ellos se utilizan reactivos que causan otro tipo de contaminación, es el caso de los tratamientos de cianuro mediante su oxidación con hipoclorito de calcio, produciéndose cianato de calcio y finalmente cloruro de cianógeno y organoclorados, liberándose al medio ambiente cloro residual y cloruros¹⁵. Entre los efectos que estos compuestos pueden causar a largo plazo, se pueden mencionar: carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis, enfermedades respiratorias y encefalopatías crónicas¹⁶; por lo tanto se hace necesario recurrir a otros tratamientos complementarios, que controlen la liberación de los nuevos contaminantes cuya acumulación llega a ser igual o más dañino que el mismo. También existen métodos biológicos para la degradación de cianuro, utilizando algunas especies de hongos, tales como *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Gliocladium virens* y *Trichoderma koningii*, sin embargo, las bacterias también son buenos degradadores de cianuro y dentro de ellos tenemos algunas especies de los generos *Bacillus* y *Pseudomonas*¹⁷, este último género es considerado entre los mejores para la degradación de cianuro debido a su versatilidad metabólica, ya que tiene una amplia capacidad oxidativa y una alta adaptabilidad para utilizar una gran variedad de sustancias químicas como fuente de carbono y nitrógeno; es también muy tolerante a ambientes alcalinos y con muy poca cantidad de nutrientes^{18,19}.

Los estudios realizados anteriormente demuestran la capacidad de un extracto celular de *Ps. putida* para utilizar el cianuro como única fuente de carbono y nitrógeno. En los ensayos las células crecieron en presencia de cianuro de sodio (NaCN) y se midió la habilidad enzimática para convertir el cianuro en amonio a pH 7.5 y pH 9.5²⁰. Asimismo, se hizo una propuesta de detoxificación de ambientes

mineros mediante métodos químicos y biológicos, para estos últimos propone condiciones de degradación hasta de 700 ppm de cianuro de sodio, realizando mediciones de la concentración residual de cianuro mediante los métodos titulométrico, colorimétrico y por conductividad iónica, aunque recomienda este último por ser más seguro para el operario, se considera muy útil el método titulométrico cuando las concentraciones de cianuro que se van a medir son tan altas²¹.

En el 2004 se aisló una cepa de *Ps. pseudoalcaligenes* CECT5344, utilizando un medio de cultivo mínimo preparado sin amonio y citrato, a pH 9.5 con 100ppm de NaCN y 50 mM de acetato como únicas fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente, durante el proceso de degradación de cianuro, el microorganismo fue capaz de crecer en medios alcalinos, hasta pH de 11.5 siendo 9 el pH óptimo para la degradación de cianuro y tolerar concentraciones de 1400 ppm de cianuro libre; el crecimiento del microorganismo fue concomitante y proporcional a la degradación de cianuro, el cual fue estequiométricamente convertido en amonio, adicional al cianuro el microorganismo utilizó como fuente de carbono amonio, nitrato y cianato: todo el cianuro y amonio fueron asimilados, la actividad enzimática de la cianasa se indujo durante el crecimiento del microorganismo en presencia de cianuro o cianato, pero no con amonio o nitrato como fuente de carbono; los resultados sugieren que el cianato puede ser un intermediario en la ruta de degradación del cianuro, pero no se excluyen en este trabajo otras rutas alternas para la degradación del cianuro²².

La biotecnología microbiana es una opción que cada vez impacta más el campo de la producción limpia, ofreciendo de esta forma otra solución al problema de acumulación de cianuro en el medio ambiente⁶. Sin embargo en el Perú no se toma importancia al estudio e investigación de técnicas y procesos, que con ayuda de microorganismos aporten a la degradación de este compuesto de manera no tóxica, tampoco se ha encontrado antecedentes acerca de la influencia que tienen la combinación de temperaturas y pH en la degradación de cianuro por *Pseudomonas* sp. La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de las temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10, y 10.5 sobre la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico:

- Cultivo de *Pseudomonas* sp. aislado a partir de lodos activos de la planta de tratamiento de aguas residuales de Covicorti, Trujillo.
- Cianuro de sodio (20 g) procedente de la mina San Luis S.R.L. de la provincia de Patate, región La Libertad, Perú.

Recolección de la muestra

Se recolectaron aproximadamente 200 ml de lodo activo en tres frascos estériles, de 3 puntos referenciales de las pozas de oxidación de la planta de tratamiento de aguas residuales de Covicorti-Trujillo (Perú), los cuales fueron transportados posteriormente en un cooler hacia el Laboratorio de Microbiología Ambiental en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De Trujillo donde se mezclaron homogéneamente y enriquecieron para finalmente aislar un cultivo puro de *Pseudomonas* sp.

Enriquecimiento de la muestra con cianuro de sodio

En este enriquecimiento se empleó 100 ml de caldo un medio mínimo de sales (0.005 % de K₂HPO₄, 0.2% de Na₂SO₄, 0.003% de NaCl, 0.1% de MgSO₄) y buffer carbonato a pH 9, a este caldo se le adicionó 500 ppm de cianuro de sodio como fuente de carbono y nitrógeno, finalmente se añadió 10 ml de la muestra de lodo activo. Se homogenizó por 5 minutos y fue incubado a temperatura ambiente por 3 días^{4,6}.

Aislamiento e identificación de *Pseudomonas* sp:

Para el aislamiento de *Pseudomonas* sp. se utilizó: Agar Cetrimide (medio selectivo) el cual una vez sembrado fue incubado a 42°C x 48 horas. La comprobación de la pureza del cultivo de *Pseudomonas* sp. se realizó mediante crecimiento en agar MacConkey e identificación bioquímica usando pruebas tales como: TSI, LIA, SIM, citrato, indol, oxidasa y catalasa; adicionalmente se realizó también una coloración Gram y observación microscópica de la bacteria con lo que se corroboró su morfología y clasificación Gram.

Preparación del inóculo y estandarización

El inóculo utilizado estuvo dado por una población celular en 24 ml de solución buffer carbonato a pH 9, el que se comparó con el tubo N°3 del Nefelómetro de Mac-Farland. Adicionalmente para corroborar la cantidad real de bacterias ingresadas se realizó una siembra del inóculo en agar cetrimide a diluciones 10^{-6} y 10^{-7} y luego de 24 horas de incubación a 36°C se procedió al recuento respectivo²⁶.

Ejecución del bioensayo.

Se agregó 4 ml de inóculo de *Pseudomonas* sp. (1.3×10^9) en 6 matraces Erlenmeyer, cada uno con un volumen de 100 ml de un caldo mínimo de sales con buffer carbonato y cianuro de sodio (NaCN) a 1000 ppm. Como controles, se usaron 6 matraces adicionales, con las mismas condiciones pero sin inóculo y se realizaron mediciones de la concentración residual de cianuro cada 24 horas, durante un periodo de 6 días, tanto en los matraces inoculados como en los controles.)

Las condiciones que se utilizarán para cada bioensayo se describen a continuación:

- Dos matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml del caldo mínimo de sales (K_2HPO_4 0.005%, NaH_2PO_4 0.2%, NaCl 0.003%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, y buffer carbonato) mas 1000 ppm de cianuro de sodio a pH 9.5 se inocularon con *Pseudomonas* sp.; uno de ellos se mantuvo a 32°C y el otro a 36°C durante 6 días. Como control se tuvo dos matraces Erlenmeyer con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano.
- Dos matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml del caldo mínimo de sales (K_2HPO_4 0.005%, NaH_2PO_4 0.2%, NaCl 0.003%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, y buffer carbonato) mas 1000 ppm de cianuro de sodio a pH 10 se inocularon con *Pseudomonas* sp.; uno de ellos se mantuvo a 32°C y el otro a 36°C durante 6 días. Como control se tuvo dos matraces Erlenmeyer con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano.
- Dos matraces Erlenmeyer conteniendo 100 ml del caldo mínimo de sales (K_2HPO_4 0.005%, NaH_2PO_4 0.2%, NaCl 0.003%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, y buffer carbonato) mas 1000 ppm de cianuro de sodio a pH 10.5 se inocularon con *Pseudomonas* sp.; uno de ellos se mantuvo a 32°C y el otro a 36°C durante 6 días. Como control se tuvo dos matraces Erlenmeyer con las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano.

Los ensayos se realizaron en condiciones aeróbicas sólo con la boca de los matraces Erlenmeyer cubierta por tapones de algodón. Se realizaron 3 repeticiones de cada uno de los ensayos.

Medición de la biodegradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp:

La concentración de cianuro residual fue medida por el método titulométrico, cada 24 horas durante 6 días, tanto en los matraces inoculados como en los controles²⁶.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos de la cantidad de cianuro residual en el sexto día de evaluación fueron evaluado mediante Análisis de Varianza (ANAVA) y la prueba de TUKEY para determinar el grado de significancia entre cada una de las combinaciones de temperatura y pH. Esto se realizó con el programa estadístico IBM SPSS statistics versión 20.

RESULTADOS

Se aisló e identifico un cultivo de *Pseudomonas* sp. procedente de las pozas de oxidación de Covicorti-Trujillo (Perú), con capacidad de degradar concentraciones de 1000 ppm de cianuro de sodio y tolerar un pH hasta de 10.5.

En la tabla 1, se muestra que la concentración media residual de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato durante seis días de tratamiento con *Pseudomonas* sp. a temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5 fue realmente distinta ($p < 0,05$)

En la tabla 2, se muestra la degradación media acumulada de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato por *Pseudomonas* sp. a lo largo de seis días de tratamiento con temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5; observándose máxima degradación sp. a $36^{\circ}\text{C}/\text{pH}$ 9.5 (655ppm) y $32^{\circ}\text{C}/\text{pH}$ 9.5 (648 ppm) pero mínima degradación a $36^{\circ}\text{C}/\text{pH}$ 10.5(203 ppm).

En la Fig. 1 se muestra los porcentajes de degradación total de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato a 1000 ppm por *Pseudomonas* sp. después de 6 días de tratamiento a temperaturas de 32°C y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10, 10.5 .

Tabla 1. Concentración media residual de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato inoculado con *Pseudomonas* sp. durante seis días a temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5.

Concentración media residual (ppm)							
Tratamiento	Días						
	0	1	2	3	4	5	6
Control	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000 ^a
32°C / 9.5	1000	849	697	524	442	379	352 ^b
32°C / 10	1000	898	783	702	663	627	594 ^c
32°C / 10.5	1000	961	930	887	848	825	788 ^d
36°C / 9.5	1000	837	669	513	437	386	345 ^b
36°C / 10	1000	906	814	724	656	602	580 ^c
36°C / 10.5	1000	957	906	865	835	812	797 ^d

(a,b,c,d) Letras distintas presentan diferencia significativa (p <0.005)

Tabla 2. Degradación media acumulada de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato por *Pseudomonas* sp. a lo largo de seis días de tratamiento a temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5.

Degradación media acumulada (ppm)							
Tratamiento	Días						
	0	1	2	3	4	5	6
Control	0	0	0	0	0	0	0
32°C / 9.5	0	151	303	476	558	621	648
32°C / 10	0	102	217	298	337	373	406
32°C / 10.5	0	39	70	113	152	175	212
36°C / 9.5	0	163	331	487	563	614	655
36°C / 10	0	94	186	276	344	398	420
36°C / 10.5	0	43	94	135	165	188	203

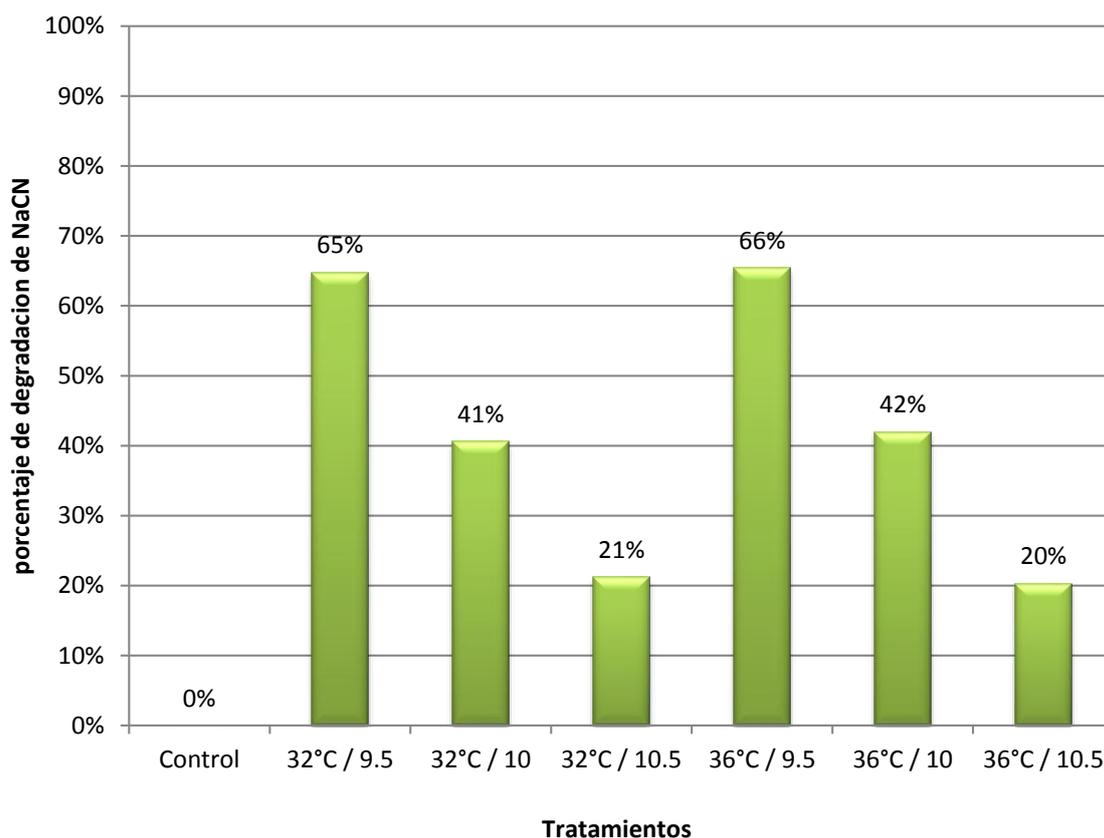


Fig. 1. Porcentajes de degradación total de cianuro de sodio en caldo mínimo de sales con buffer carbonato por *Pseudomonas* sp. después de 6 días de tratamiento a temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5.

DISCUSIÓN

El trabajo se inició con un enriquecimiento de la muestra recolectada (lodo activo); con la finalidad de contribuir a que las *Pseudomonas* presentes en la muestra encuentren una ruta degradativa para el cianuro de sodio y puedan usarlo como fuente de carbono y nitrógeno, seleccionando de esta manera *Pseudomonas* que sean capaces de degradarlo y también de tolerar un pH alcalino en donde el cianuro no se volatilice¹⁴.

Para el aislamiento de *Pseudomonas* sp se utilizó un medio selectivo que fue agar cetrimide, el cual está compuesto de amonio cuaternario que es un inhibidor de gran variedad de especies bacterianas incluyendo muchas especies del genero *Pseudomonas*, lo que permite obtener un cultivo de este género más selectivo; la producción del pigmento piocianina se ve estimulada por el magnesio, cloruro de potasio y sulfato presentes en el medio. La tinción Gram, crecimiento en agar Mac Conkey y pruebas bioquímicas confirman que efectivamente el cultivo aislado fue *Pseudomonas* sp.^{1,18}.

Una de las pruebas de confirmación para asumir que el cultivo aislado fue *Pseudomonas* sp es el crecimiento en agar Mac Conkey que es un medio selectivo para bacterias Gram negativas, en este medio el viraje del color del indicador de pH (rojo neutro) se produce por fermentación de la lactosa presente en el medio ocasionando la disminución del pH alrededor de la colonia. Los microorganismos no fermentadores de lactosa como *Pseudomonas* sp. producen colonias incoloras o amarillas, esto también se evidenció en el crecimiento obtenido en Mac Conkey durante esta investigación^{18,24}.

Pseudomonas sp. es una bacteria que no degrada sacarosa, lactosa ni glucosa con formación de ácidos y que tampoco elimina ácido sulfhídrico luego de degradar el tiosulfato, esto se hace evidente en la prueba bioquímica que usa el medio agar hierro tres azúcares (TSI) el cual manifiesta alcalinidad tanto para la degradación de lactosa y sacarosa como para glucosa con la ausencia de ácido sulfhídrico (K/K-); otra prueba bioquímica realizada fue la descarboxilación de la lisina cuyo resultado es negativo para *Pseudomonas* sp. esto se evidenció con un color violeta del medio agar lisina hierro (LIA) donde fue sembrado el cultivo aislado. El crecimiento en medio SIM que se utiliza para

observar la motilidad de los microorganismos, *Pseudomonas* sp. presenta una motilidad negativa en este medio lo cual también sucedió con el cultivo aislado²⁴. La última prueba bioquímica realizada en medios sólidos fue la del uso del citrato como única fuente de carbono donde el cultivo aislado dio positivo, lo cual es compatible con la bacteria *Pseudomonas* sp.²².

Pruebas como la catalasa, oxidasa e indol también fueron realizadas al medio de cultivo aislado para determinar la presencia de enzimas que confirmen que este cultivo es *Pseudomonas* sp. Los resultados obtenidos en estas pruebas fueron los esperados ya que dieron positivo para las pruebas de catalasa y oxidasa, pero negativo para la prueba de indol¹⁸.

Las bacterias del género *Pseudomonas* tienen requerimientos nutricionales muy simples, ya que pueden utilizar más de 100 compuestos como fuente de carbono y energía, entre ellos el cianuro y poseen también una variedad de operones inducibles por lo cual nutricionalmente son un género muy versátil, esto hace que varias especies de este género sean muy importantes en procesos de biorremediación²¹.

La biodegradación del cianuro podría ser una opción a los procedimientos industriales. Los métodos biológicos y particularmente los microbiológicos, se constituyen en alternativas eficientes, porque son específicos, respecto a los focos en los que se pretende que actúen y luego de estandarizarse, pueden resultar muy económicos, respecto a los procesos químicos. Otra ventaja de estos procesos es su diseño simple y el control que se posee del proceso operativo, los bajos costos de las sustancias químicas y la capacidad de tratar por este método todas las formas de cianuro y subproductos^{12,22,23}.

Existen en la naturaleza organismos capaces de crecer en presencia de cianuro, tal es el caso de *boleophthalmus boddaerti*, una especie de pez que tolera ciertas concentraciones de cianuro en el ambiente, esta tolerancia no envuelve la capacidad de degradarlo, como es el caso de algunas especies del género *Pseudomonas*³⁰, las cuales poseen las herramientas enzimáticas necesarias para sobrevivir en ambientes altamente contaminados con cianuro y tienen la capacidad de degradarlo utilizándolo como fuente de carbono^{14,20} y de nitrógeno^{26,27}, este poder de degradación está reflejado en los resultados obtenidos en la presente investigación: la concentración media y la degradación media de cianuro de sodio en un medio de cultivo inoculado con *Pseudomonas* sp. a lo largo de 6 días a temperaturas de 32 y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10 y 10.5; se observa también que en todos los tratamientos establecidos *Pseudomonas* sp. redujo la concentración de cianuro inicial en todos los caldos de cultivo donde se inoculó dando una diferencia significativa entre estos ($p < 0.05$).

de sodio en medio mínimo de sales con buffer carbonato después de 6 días de tratamiento a temperaturas 32°C y 36°C en combinación con los pH 9.5, 10, 10.5; observándose que a los rangos de temperatura y pH usados en el presente estudio, la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. es inversamente proporcionales al aumento del pH y que la temperatura no ejerce efecto sobre este proceso. En el análisis estadístico realizado por la prueba de tukey no existe diferencia significativa entre los datos de degradación obtenidos bajo el mismo pH tanto para la temperatura de 32 y 36°C, pero si evidencia diferencia significativa entre los datos obtenidos bajo pH diferentes. Esto evidencia que la temperatura no ejerce efecto significativo respecto a la capacidad de degradar cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp.; sin embargo, los pH evaluados de 9.5, 10, 10.5 tiene una gran influencia en la capacidad degradadora de la bacteria sobre el cianuro sodio. Dichos resultados se debe a que en los rangos de temperatura y pH evaluados para la degradación de cianuro, el pH ejerce un mayor afecto sobre los procesos de transporte a través de la membrana celular, ya que *Pseudomonas* sp. es una bacteria que crece preferentemente a pH neutro y con rangos de temperatura mesófilos^{21,29}.

En estudios realizados determinan que algunas especies de *Pseudomonas* poseen oxidasas insensibles al cianuro, las cuales pueden seguir funcionando con altas concentraciones del mismo. Además cuando se produce estrés se activaban una serie de mecanismos de seguridad que incluían a la alquil hidropéroxido reductasa, la cual sustituye a la catalasa en las funciones de protección frente al estrés oxidativo. También se producen HSP (proteínas de choque térmico) estas moléculas no sólo defienden a las proteínas de las altas temperaturas, también lo hacen contra otros fenómenos que provocan desnaturalización, tales como como el pH. Esto pudo haberse dado en el proceso de degradación de cianuro de sodio por el cultivo de *Pseudomonas* sp. aislado ya que fue resistente a una concentración alta de cianuro (1000 ppm) y a pH de hasta 10.5²⁴.

Luque en el 2005, establece que en condiciones fuertemente alcalinas y utilizando el cianuro como única fuente de carbono para la cepa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, los compuestos como el hierro y algunas sustancias orgánicas reaccionan químicamente con el cianuro, afectando el

crecimiento de los microorganismos, esto debido a que el cianuro se asocia con estos elementos formando complejos, de los cuales el microorganismo no puede obtener carbono ni nitrógeno fácilmente. Sin embargo la limitación de hierro en el medio de cultivo sugieren la producción de sideróforos por parte del aislado bacteriano, aunque este metabolito no fue medido en el medio residual, es importante considerar esta variable para trabajos futuros ya que estos metabolitos son de gran interés en la agricultura para el control de algunas bacterias y hongos fitopatógenos^{28,29}.

Durante la evaluación de la degradación de cianuro de sodio se observa que los días 1, 2 y 3 a comparación de los posteriores, se presentó un mayor porcentaje de biodegradación de cianuro de sodio en todos los tratamientos evaluados; estos resultados coinciden con otros trabajos donde se demuestra que las formas de cianuro libre, CN⁻ provenientes de las formas NaCN, KCN, etc., se biodegradan más rápidamente que las formas de cianuro asociadas a complejos metálicos tales como (K₂Ni(CN)₄) y (K₃Fe(CN)₆)³⁰. también se encontró que la limitación de nutrientes como el fosforo incrementa la toma de carbono por parte de las células, lo cual pudo haber favorecido que *Pseudomonas* sp. degrade el cianuro utilizándolo como fuente de carbono³⁶. Es por esto que la composición del caldo mínimo de sales utilizado en los tratamientos presenta muy poco porcentaje de fosforo y potasio (0.005%). Otro motivo por el cual la biodegradación d cianuro de sodio es más rápida en los 3 primeros días y se estabiliza a partir del 4 día sería por el aumento en la concentración de amonio ya que el microorganismo tomaría el amonio como fuente de nitrógeno dejando la toma del cianuro de sodio para cuando la concentración de amonio vuelva a descender^{5,18,19}.

La proporción HCN/ CN⁻ depende fundamentalmente del pH. El elevado pKa del cianuro (9), implica que a pH neutro o ácido, este compuesto se volatilice en forma de HCN. Desde el punto de vista químico la eliminación biológica del cianuro requiere condiciones alcalinas y una fuente de carbono incapaz de reaccionar químicamente con el cianuro como lo es el buffer carbonato a pH 9.6²⁹.

En los controles con caldo mínimo de sales y buffer carbonato a los pH de 9.5, 10, 10.5 en combinación con las temperatura 32 y 36°C, se observa una retención del el 100% de cianuro después de 6 días de tratamiento, observar lo que evidencia la no volatilización del cianuro del medio y el poder de degradación de *Pseudomonas* sp. sobre el cianuro de sodio, ya que en dichos controles no se inoculó la bacteria. La retención del cianuro de sodio es debido a que el pH es el factor determinante para mantener al cianuro en una forma estable no volátil y que la temperatura no ejerce efecto sobre la retención de cianuro en el medio, a esta conclusión también se ha llegado en otros trabajos donde se ha demostrado que el pH es factor clave en estos procesos^{30,31}.

Se eligió usar Buffer carbonato para realizar los bioensayos, pues no reacciona con el cianuro formando complejos u otras sustancias toxicas y porcentaje de recuperación de cianuro es aceptable y se garantiza la estabilidad del pH durante el tiempo de los bioensayos. En trabajos con células neuronales de gatos se ha verificado que el buffer carbonato es un medio eficiente en conservar el pH estable a través del tiempo y mantener las concentraciones de cianuro constante. También es importante resaltar que el cultivo aislado de *Pseudomonas* sp., se ajusta a las condiciones de pH requeridas para la biorremediación de compuestos cianurados, pues toleró los medios con pH 9.5, 10,10.5, sobrepasando la tolerancia de aislados pertenecientes a la misma especie evaluados en otros estudios, a pH de 7.0, 7.5 y 9.5^{5,33}.

Investigaciones como la realizada por Kunz encontraron que *P. fluorescens* NCIMB11764 fue eficaz en la remoción de formas simples de CN⁻ (KCN) en las primeras 72 horas, utilizando el compuesto cianurado como único inductor enzimático. En este caso el cianuro induce la producción de cianuro oxigenasa y se obtiene como productos de conversión enzimática CO₂, NH₃ y α-cetoácidos como coproductos⁵. Esta podría ser una de las vías que utiliza la bacteria durante la degradación del cianuro de sodio sin embargo dichos productos no fueron medidos en esta investigación. Cabe resaltar también que es posible que la biodegradación no haya sido totalmente completa y en el medio permanezcan compuestos intermedios entre cianuro y amonio, como cianatos, tiocianatos y formatos^{31,34}. Por el contrario, todo el cianuro pudo ser convertido a amonio y éste, por procesos de nitrificación pasar a nitritos y nitratos o por procesos de regeneración a α-cetoácidos, en presencia de CO₂^{33,34}.

CONCLUSIONES

- Se aisló *Pseudomonas* sp. a partir de lodos activos de la planta de tratamiento de aguas residuales de Covicorti, Trujillo (Perú) capaces de degradar cianuro de sodio y tolerar un pH de 10.5.
- La combinación de las temperaturas 32 y 36°C con los pH 9.5, 10, 10.5 influyen sobre la degradación de cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. observándose máxima degradación al combinar las temperaturas 32 y 36°C con el pH 9.5, con valores de 648 y 655 ppm de cianuro de sodio degradado para cada combinación respectivamente; Por otro lado la mínima degradación de cianuro de sodio se obtuvo bajo el pH 10.5 con un valor de 312 ppm a 32°C y 203 ppm a 36°C.
- Se encontró diferencia significativa entre los controles y todos los tratamientos utilizados para degradar cianuro de sodio por *Pseudomonas* sp. en el presente estudio.
- No se encontró diferencia significativa entre aquellos tratamientos que usaron el mismo pH, sin importar la temperatura con las que se combinaron; es así que no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos de 32°C/pH 9.5 con 36°C/pH 9.5, 32°C/ pH 10 con 36°C/ pH 10 y 32°C/pH 10.5 con 36°C/ pH 10.5.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Terri C, Jeffrey R. Direct determination of free cyanide in drinking water by ion chromatography with pulsed amperometric detection. J Chromatography A. 2007; 46: 31-39
2. Knowles C. Cyanide utilization and degradation by microorganisms. En: Ciba Foundation Symposium. 140: 1988, p.3-15
3. Kunz D, Chen J, Guangliang P. Accumulation of α -Keto Acids as Essential Components in Cyanide Assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. Applied and Environmental Microbiology. 1998;64(11): 4452-4459
4. Restrepo O, Montoya C, Muñoz N. Degradación microbiana de cianuro procedente de plantas de beneficio de oro mediante una cepa nativa de *P. fluorescens*. Universidad Nacional de Medellín. 2006;73(149): 45-51
5. Quiroga P, Olmos. Revisión de la toxicocinética y la toxicodinamia del ácido cianhídrico y los cianuros. Acta Toxicol. Argent. 2009; 17 (1): 20-32
6. Sancho J, Fernández B, Alaya J, García M, Lavandeira A. Aplicación del permanganato potásico para la eliminación de cianuros de cobre en aguas residuales de una planta de lixiviación en una mina de oro (II): ensayos en planta piloto. Rev met. 2011; 47 (3): 224-233.
7. Quispe L, Arteaga M, Cardenas E, Lopez L, Santelices C, Palanque E, Cabrera S. Eliminación de cianuro mediante sistema combinado UV/H₂O₂/TiO₂. Revista Boliviana de química. 2011;28 (2): 113-118
8. Akcil A, Mudder T. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. Biotechnology Letters. 2003; 25(6): 445-50.
9. Chung B. Control de los contaminantes químicos en el Perú. Rev Peru Med Salud Pública. 2008; 25(4): 413-418.
10. Gaviria A. Análisis de alternativas para la degradación de cianuro en efluentes líquidos y sólidos del municipio de Segovia, Antioquia en la planta de beneficio de la empresa mineros nacionales, municipio de Marmato, redalyc. 2006; 73(149): 31-34.
11. Burbano D, Fajardo A, Burbano D, Burbano E, Apraiz N, Moreano M. estudio de métodos químicos de remoción de cianuro presente en residuos de cianuración provenientes del proceso de extracción de oro de venta en el departamento de Nariño. revista.luna.azul. 2010; 31: 8-16
12. Aguldelo R, Betancur J, Jaramillo C. Biotratamiento de residuos cianurados y su relación con la salud pública. Rev. Fac. Nac. Salud Publica. 2010; 28(1): 7-20
13. Blas J. aislamiento y selección de bacterias degradadoras de cianuro a partir de relaves mineros, procedentes de la sierra del departamento de la libertad. Tesis de Biólogo Microbiólogo. Ciencias biológicas: Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2008
14. Kunz D, Nagappan O, Avalos S, Delong G. Utilization of cyanide as nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion. App Environ Microbiol 1992; 58(6): 2022-2029.
15. Fernandez R, Kunz D. Bacterial Cyanide Oxygenase Is a Suite of Enzymes Catalyzing the Scavenging and Adventitious Utilization of Cyanide as a Nitrogenous Growth of Substrate. J Bacteriol 2005; 187(18): 6396-6402.

16. Babu G, Vijaya O, Ross V, Wolfran J, Chapatuala K. Cell-free extract(s) of *Pseudomonas putida* catalyzes the conversion of cyanides, cyanatos, thiocyanates, formamide, and cyanide containing mine waters into ammonia. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996; 45 (1-2): 273-277.
17. Montoya C. Cianuro, oro y medio ambiente en la minería del nordeste antioqueño. *Rev Facultad de Ingeniería*. 2001; 5 (22): 43-49.
18. Luque V. Characterization of the cyanase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. *Environmental Microbiology*.2004; 15(1): 253–270.
19. Mac Faddin, Jean F. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Tercera edición. Madrid. Panamericana. 2003; P.632-634.
20. Dimitry Y, et al. Microbial Thiocyanate Utilization under Highly Alkaline Conditions. *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(2): 528-538
21. Reyes I, Samillan C, Ñique W. tecnología enzimática para la eliminación de cianuro y xantano etílico de potasio en relaves de la minera en función de pH del medio, concentración de reactivo FPL, tiempo y velocidad de agitación. *SCIENDO*. 1998; 1(1): 35-40.
22. Chew S. Comparative Physiology and Biochemistry Cyanide detoxification in the mudskipper, *Boleophthalmus boddarti*. *Journal of Experimental Zoology*,2005; 15(2): 1-8
23. Knowles C. Cyanide utilization and degradation by microorganisms. *Ciba Foundation Symposium*. 1988;140: 3-15
24. Dhillon J K, Shivaraman N. Biodegradation of cyanide compounds by a *Pseudomonas* species. *Canadian Journal Of Microbiology*.1999; 45 (3): 201-208
25. Quentin M y Weiser R. *Bacteriología y Micología Médica*. 2º ed. México: Interamericana Mac Graw – Hill; 1991
26. Chen J, Kunz D. Cyanide utilization in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 involves a putative siderophore. *FEMS Microbiology Letters* .2006; 156:61-67.
27. Díaz M, Villa P; Frías A. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Latinoamer Microbiol*. 2002; 44(3) :112-117.
28. Anders M, Persson D; Goran L. Physiological and Morphological Changes Induced by Nutrient Limitation of *Pseudomonas fluorescens* 378 in Continuous Culture. *Applied and Environmental Microbiology*.1990; 56(3): 686-692
29. Marder L, Guilherme O, Bernardes A. Removal of Cadmium and Cyanide from Aqueous Solutions through Electrodialysis. *Rev. Latinoamer Microbiol*. 2003; 14(4): 610-615.
30. Luque V. Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Aplicaciones biotecnológicas*. Andalucía. *Analistas económicos*. 2005:187-189.
31. Riani J, Leao V. The elution of metal cyanocomplexes from polyacrylic – and polystyrene – based ion exchange resins using nitrate and thiocyanate eluants. *Brazilian J Chemical Engin*. 2007; 24(3): 421-431.
32. Wang C, Kunz D, Venables B. Incorporation of Molecular Oxygen and Water during Enzymatic Oxidation of Cyanide by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Applied Environmental and Microbiology*. 1996; 62(6): 2195–2197.
33. Figueira M, Ciminelli V, Andrade M. Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain. *Canadian Journal of Microbiology*. 1996; 42(5): 519-23.
34. Akcil A, Mudder T. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining. *Biotechnol Letters*.2003; 25(6): 445-50.



Efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*

Effect of the culture supernatant of *Lactobacillus* sp. on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis*

Giovana Bustamante Saldaña y Pedro Alvarado Salinas

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 del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. aislado a partir de heces de neonatos sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*. Se recolectaron 15 muestras de heces de neonatos, de las cuales se aislaron e identificaron siete cultivos de *Lactobacillus* sp. La capacidad antagonista de los siete cultivos fue evaluada contra las bacterias patógenas mediante el método de difusión en agar. Se encontró que los cultivos de *Lactobacillus* sp. codificados como LMA-1, LMA-4, LMA-7, LMA-9 y LMA-13 presentan evidente capacidad antagonista, ya que inhibió todos los patógenos evaluados, mientras que el cultivo de *S. aureus* presentó resistencia frente a los cultivos de *Lactobacillus* sp. codificados como LMA-2 y LMA-10. Se concluye que el sobrenadante de los cultivos de *Lactobacillus* sp. aislado de heces de neonatos presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*, pero no sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, antagonismo

ABSTRACT

The effect of the culture supernatant of *Lactobacillus* sp. isolated from feces of infants on the growth of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhi* was determined. 15 stool samples from neonates, which were isolated and identified seven cultures of *Lactobacillus* sp. were collected. The ability of antagonist of seven cultures against pathogenic bacteria was assessed by the agar diffusion method. It was found that *Lactobacillus* sp. coded as AML-1 AML-4 AML-7-9 and AML AML-13 showed evident antagonist capacity since all pathogens tested, while the *S. aureus* culture showed resistance against *Lactobacillus* sp. cultures coded as AML-2 and AML-10. It was concluded that the culture supernatant of *Lactobacillus* sp. isolated from stool of newborns has inhibitory effect on the growth of *S. enteritidis* and *S. typhi*, but not on the growth of *S. aureus*.

Keywords: *Lactobacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, antagonism

INTRODUCCIÓN

En el tracto intestinal existe una gran variedad de bacterias (más de 1000 especies distintas) que ayudan a prevenir que microorganismos patógenos lo colonicen. Además en el intestino se cuenta con barreras como la acidez, movimientos peristálticos y la eliminación de microorganismos extraños por medio de la mucosa intestinal. Este tipo de mecanismos de defensa ayudan en muchas ocasiones a combatir la colonización de microorganismos patógenos.

Lactobacillus, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* conforman el grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) usadas como probióticos en humanos. Las primeras se pueden encontrar en el intestino delgado y la vagina de los seres humanos y algunas especies son consideradas benéficas debido a que producen vitamina K, lactasa y sustancias antimicrobianas como acidolina, acidofina, lactocidina, las cuales ayudan a combatir y prevenir infecciones en sus hospedadores.

Sin embargo, la actividad antimicrobiana principal de las BAL se debe a la producción de ácido láctico, ácido acético CO_2 , H_2O_2 , acetaldehído, entre otros. El ácido acético y propiónico producidos a través de la vía heterofermentativa, pueden interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas; estos compuestos antimicrobianos son más efectivos que el ácido láctico debido a los elevados valores de pKa (ácido láctico 3.08, ácido propiónico 4.87 y ácido acético 4.75), por lo tanto, tienen un mayor rango de actividad antimicrobiana contra levaduras, mohos y bacterias. Al mismo tiempo, se ha observado que el ácido acético es más efectivo contra el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y la germinación de *Bacillus cereus* que el ácido láctico y ácido cítrico y que el crecimiento de *S. typhimurium* se reduce cuando se utiliza a los ácidos láctico y acético combinados, lo que demuestra su actividad sinérgica.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), por su lado, es producido en presencia de oxígeno por las BAL a través de la acción de flavoproteína oxidasa o NADH peroxidasa y su efecto antimicrobiano se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilo causando la desnaturalización de enzimas: el H_2O_2 producido por *Lactobacillus* y *Lactococcus* es capaz de inhibir cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. y varios microorganismos psicrotrofos en alimentos; en leche cruda, activa el sistema lactoperoxidasa, produciendo hipotiocianato (OSCN^-), oxiácidos (O_2SCN^- y O_3SCN^-) y productos intermediarios de oxidación que tienen un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram negativas y Gram positivas.

El dióxido de carbono (CO_2) es producido principalmente por la vía heterofermentativa de las BAL y a la concentración del 10% puede disminuir el recuento de bacterianas totales hasta un 50% y a concentraciones de 20-50% tiene una fuerte actividad antifúngica; asimismo, tiene un efecto antibacterial contra aerobias Gram negativas como es el caso de *Pseudomonas*.

El acetaldehído es producido por varias cepas de *Lactobacillus* y *Bulgaricus* mediante la acción de una treonina aldolasa, la cual transforma la treonina en acetaldehído y glicina; sin embargo, debido a que estas bacterias y *Streptococcus thermophilus* presentes en el yogurt no pueden metabolizar el acetaldehído, éste se acumula en el producto aumentando la concentración a 25 ppm y a concentraciones entre 10-100 ppm el acetaldehído inhibe el crecimiento de *S. aureus*, *S. typhimurium* y *E. coli* en productos lácteos²².

Los Lactobacilos también producen bacteriocinas, que son proteínas o complejos de proteínas, actúan formando poros en la membrana citoplasmática, provocando la salida rápida de metabolitos requeridos para la biosíntesis de la célula. En efecto, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos generando la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos, ocasionando la inhibición de la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular.

El género *Lactobacillus*, de difícil cultivo, es considerado como GRAS “Generalmente reconocido como seguro” (Generally Recognized as Safe, GRAS). Es un microorganismo probiótico debido a que tiene características que favorecen la salud humana, no tiene efectos negativos, es decir, es inocuo y,

además, colabora en la prevención de diferentes enfermedades humanas, así como en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Las ETA son causadas principalmente por *Salmonella* y *Staphylococcus* y sus características patogénicas, modos de transmisión y alimentos en los cuales se encuentran han sido ampliamente documentados, así como, la importancia de *Lactobacillus* como agente antimicrobiano de microorganismos patógenos, entre ellos, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*, considerados de gran importancia en la salud pública debido a los brotes de infecciones e intoxicaciones generados por el consumo de alimentos contaminados con estas bacterias. Teniendo en cuenta que no hay referencias respecto de la capacidad bactericida del probiótico en referencia, se hizo una investigación orientada a determinar el efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*, buscando de esta manera una estrategia natural para combatir bacterias patógenas transmitidas por alimentos debido a la creciente resistencia a los antibióticos por parte de estas y al aumento de enfermedades causadas por dichas bacterias a nivel mundial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio:

- Sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. Obtenido de materia fecal de neonatos del Hospital Regional Docente de Trujillo
- Cultivo de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi* proporcionados por el Laboratorio de Alimentos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

Obtención y transporte de la muestra fecal de neonatos (MFN).

Se tomó la muestra directamente del pañal con un hisopo previamente humedecido en SSFE tratando de obtener la mayor cantidad posible de material fecal. Las muestras fueron tomadas con el respectivo consentimiento y participación de los padres. Las muestras obtenidas se trasladaron al Laboratorio de Microbiología y Tecnología de Alimentos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo, para su respectivo procesamiento y análisis respectivo dentro de las tres primeras horas de recolectadas.

Enriquecimiento de la MFN

Las muestras colectadas fueron sembradas en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS), para su respectivo enriquecimiento, luego se incubó a 37°C por 12 horas en condiciones de microaerofilia¹⁸.

Aislamiento, selección e identificación de *Lactobacillus* sp

Luego del enriquecimiento de las muestras, estas se sembraron por estría en agar MRS, a pH 5.5, se incubó por 48 horas a 37°C en atmósfera de microaerobiosis entre 5-10% de dióxido de carbono (CO₂)^[42]. Los cultivos de *Lactobacillus* se seleccionaron teniendo como base la las características macroscópicas y microscópicas mediante tinción Gram, forma bacteriana, formación de esporas, prueba de la catalasa al 3%¹⁸.

Los cultivos puros fueron sometidos a las siguientes pruebas bioquímicas: producción de ácido y gas a partir de la glucosa, formación de H₂S, producción de indol, prueba de oxidación-fermentación, fermentación de la glucosa que están indicadas en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology²³.

• Producción de ácido, H₂S y gas.

Los cultivos puros fueron sembrados en agar TSI, se incubó a 37°C en microaerobiosis por 24 horas; el cambio de color del medio de rojo a amarillo y negro y la presencia de gas se tomó como una reacción positiva.

○ Fermentación de la glucosa

Los cultivos puros fueron sembrados en el medio de Oxidación-Fermentación (O/F) según Hugh y Leifson suplementado con glucosa¹³, se incubó a 37°C por 24 horas en microaerobiosis y las lecturas se realizaron por el viraje del indicador.

Pruebas para determinar factores de virulencia

• Prueba de la gelatina nutritiva

Los cultivos puros fueron sembrados en medio Gelatina Nutritiva [44], se incubaron a 37°C por 24 horas en microaerobiosis. Posteriormente se colocaron los cultivos en refrigeración (5°C) por 2 horas y pasado este tiempo se realizó la lectura observándose si se produce licuefacción.

• Producción de hemolisinas

Los cultivos puros fueron sembrados por estría en agar MRS con sangre de carnero al 5% y se incubó a 37°C por 48h en condiciones de microaerobiosis. Luego se realizó la lectura observando la presencia de hemólisis.

Obtención del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp.

Los cultivos de *Lactobacillus* sp se inocularon en tubos de Caldo MRS, posteriormente se incubaron por 24 horas a 35-37°C en microaerobiosis. Pasado el tiempo de incubación cada cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos; y se almacenó en refrigeración (8 °C) para su uso posterior.

Pruebas de inhibición

Los ensayos de inhibición se harán con el sobrenadante de cada una de los *Lactobacillus* sp. identificados, y frente a los cultivos patógenos de *S. aureus*, *S. enteritidis* y *S. typhi* pertenecientes al Laboratorio de Microbiología y Tecnología de los Alimentos. El método utilizado fue el método de difusión en agar²⁴. Para ello se vertió en cada placa una capa de Plate count Agar de doble concentración, seguidamente después de su solidificación se sirvió Plate count Agar a concentración simple. Posteriormente se sembró *S. aureus*, *S. enteritidis* y *S. typhi* (previamente incubadas en agar nutritivo durante 24 h a 37°C). Seguidamente, en cada placa que contenga los cultivos se abrieron pocillos, en los que se depositaron 50 µL del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. Luego se incubaron por 24 horas a 37°C en condiciones de microaerobiosis, hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos de inhibición. Se detectará la inhibición del crecimiento por la presencia de un halo de inhibición alrededor del pozo y se consideró inhibición cuando la medida del halo sea mayor a 8mm de diámetro. El control negativo de inhibición de crecimiento se realizó con suero salino estéril.

Mantenimiento de cultivos

Los cultivos se mantuvieron en agar MRS inclinado (Merck) y se conservaron en refrigeración a menos de 10°C.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de Varianza ($p = 0,05$).

RESULTADOS

Las colonias seleccionadas para la identificación de *Lactobacillus* sp fueron aquellas de bordes regulares, blancas sin pigmentos, circulares, cremosas, convexas y con márgenes enteros, de consistencia mucosa, coincidiendo con la descripción del género *Lactobacillus*.

En cuanto a las características morfológicas y tintoriales, los siete cultivos aislados fueron bacilos Gram-positivos, con producción positiva de ácido a partir de glucosa, catalasa negativos, producción de indol, producción de CO₂ a partir de glucosa y sulfuro de hidrógeno negativos (Tabla 1).

Respecto de las pruebas de virulencia, se encontró que no producen licuefacción de la gelatina, pero que eran α -hemolíticos (Tabla 2).

Se observó que el cultivo de *Lactobacillus* 2 (LMA-2) y *Lactobacillus* 10 (LMA-10) no presentan inhibición frente al de *S. aureus*, a diferencia de *S. typhi* y *S. enteritidis* las cuales fueron inhibidas por todas los cultivos de *Lactobacillus* sp, ya que presentaron un halo de inhibición mayor a 8 mm; asimismo, que el mayor halo de inhibición se alcanzó frente a *S. aureus* (Fig. 1).

DISCUSIÓN

Si se han logrado aislar siete cultivos de *Lactobacillus* sp., indica que este microorganismo es un miembro importante de la microbiota intestinal de los recién nacidos. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores como Martín y colaboradores quienes han demostrado la presencia de bacterias ácido lácticas y la predominancia de *Lactobacillus* sp en la microbiota intestinal de neonatos, en donde estas bacterias tienen un papel protector para el recién nacido respecto a las enfermedades infecciosas intestinales²⁶.

Tabla 1: Características morfológicas, tintoriales y bioquímicas de cultivos de *Lactobacillus* sp aislados heces de neonatos.

Cultivos de <i>Lactobacillus</i> sp	PRUEBAS DE VIRULENCIA	
	Gelatinasa	Hemolisis
LMA-1	-	-
LMA-2	-	-
LMA-3	-	-
LMA-4	-	-
LMA-5	-	-
LMA-6	-	-
LMA-7	-	-

+: Presencia, -: ausencia

Tabla 2: Pruebas de virulencia de cultivos de *Lactobacillus* sp aislados heces de neonatos.

Cultivos de <i>Lactobacillus</i> sp	Características morfológicas, tintoriales y bioquímicas						
	Esporas	Gram	Catalasa	Acidez	Gas	H ₂ S	Oxidativo/ Fermentativo
LMA-1	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-2	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-3	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-4	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-5	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-6	-	+	-	+	-	-	Fermentativo
LMA-7	-	+	-	+	-	-	Fermentativo

+: Reacción Positiva, -: Reacción negativa

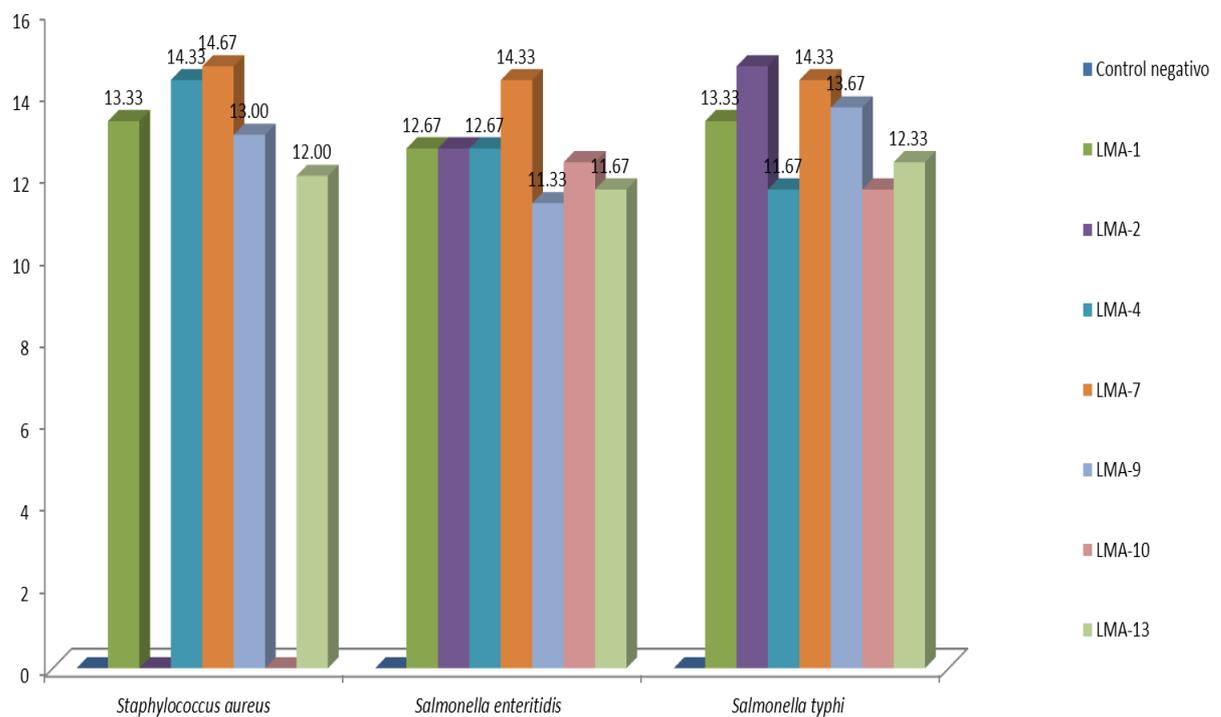


Fig 1: Inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* por el sobrenadante de *Lactobacillus* sp mediante la técnica de la difusión en agar, según promedios. (el 0,2,4,.....16 representa el diámetro promedio de halo inhibición del sobrenadante del cultivo *Lactobacillus* sp (mm))

Al mismo tiempo, el hecho de que no se presentó licuefacción de la gelatina tras el tiempo de incubación de los cultivos de *Lactobacillus* en gelatina nutritiva, es concordante con lo que aparece dentro de la actividad gelatinasa en el manual Bergey's: "el género *Lactobacillus* no posee dicha actividad debido a que comúnmente no es patógeno".

La capacidad de generar sustancias antimicrobianas juega un rol significativo en la habilidad de los probióticos para competir con los microorganismos residentes a lo largo del tracto intestinal y modificarlo beneficiosamente, esto es corroborado con la investigación de Ouwehand quien demostró que el ácido láctico y las bacteriocinas producidas por las BAL crean un ambiente hostil que inhibe el crecimiento de algunas bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Shigella sonnei*¹³. En la presente investigación se corroboró tal apreciación, porque se presentó inhibición de *S. aureus*, *S. typhi* y *S. enteritidis* por el sobrenadante de *Lactobacillus* sp. mediante la técnica de la difusión en agar, más bien, es bueno hacer notar que los siete cultivos de *Lactobacillus* aislados de heces de neonatos presentan importante actividad antimicrobiana contra los microorganismos patógenos probados.

En concordancia con investigaciones previas, de los cultivos de *Lactobacillus* sp probados, el 71.42% mostraron actividad inhibitoria contra al menos dos de los microorganismos de prueba y el 28, 52% de los cultivos no inhibieron a *S. aureus*; es decir, el mayor efecto inhibitorio se presentó contra los cultivos de *S. typhi* y *S. enteritidis*, la primera de las cuales resultó ser la más sensible a los cultivos de *Lactobacillus* aislados mientras que el cultivo *S. aureus* presentó resistencia al no ser inhibida por los cultivos de *Lactobacillus* LMA-2 y LMA-10. Se sabe que las propiedades antagónicas que ocurren en el intestino por parte de *Lactobacillus* sp y los microorganismos son atribuidas a la acumulación de los productos finales de la fermentación, tales como, el ácido láctico, el dióxido de carbono, el peróxido de hidrógeno y a la producción de bacteriocinas⁴⁷; entonces, si las

bacterias probióticas son metabólicamente activas durante su pasaje a través del intestino, es muy probable que se produzca alguna de estas sustancias¹⁸. Se considera que la reducción en el pH es el principal efecto inhibitorio debido a la producción de ácidos orgánicos¹⁹.

Al mismo tiempo, el hecho de que la mayor inhibición del crecimiento se presentó mayormente en las bacterias Gram negativas, coincide con los resultados de la actividad inhibitoria analizada por González y col. (2004). Esto posiblemente se pudo haber originado por metabolitos de bajo peso molecular los cuales pueden penetrar con facilidad la membrana exterior de la bacteria Gram negativa o por bacteriocinas siendo estas compuestos de alto peso molecular que inhiben el desarrollo de especies relacionadas con la cepa productora de estos compuestos²⁵. Asimismo, si los cultivos LMA-2 y LMA-10 inhibieron el crecimiento de *S. typhi* y *S. enteritidis*, sucediendo lo contrario con *S. aureus*, significaría que quizá la cantidad y/o concentración de metabolitos producidos no fue lo suficientemente adecuada para provocar un daño celular e inactivación, o bien, los compuestos generados no le provocaron daño a *S. aureus*. Por esto, se sugiere para estudios posteriores la utilización de otro método o la utilización de agentes antimicrobianos como algún agente quelante (EDTA), HCl, o la combinación de bacteriocinas para el tratamiento de estos microorganismos ya que presentaron resistencia ante las BAL. También se puede optar por la acidificación del medio mediante la producción de ácido láctico y la disminución del pH, como lo sugieren estudios realizados²⁷, en donde evaluó el efecto del ácido láctico, EDTA, KCN y HCl en la permeabilidad de la membrana de *E.coli* O157:H7, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*, obteniendo como resultado la desintegración de la permeabilidad de la membrana exterior.

Existen reportes que presentan estudios sobre la sensibilidad de microorganismos patógenos y/o deterioradores ante las BAL^{28,29}. Los autores mostraron la actividad inhibitoria de cepas probióticas, donde la inhibición fue dirigida a ocho microorganismos patógenos (*S. typhimurium*, *S. paratyphi*, *S. enteritidis*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E.coli* O157:H7 y *Yersinia enterocolitica*); en este ensayo se utilizó la técnica de medición de halos de inhibición en placas de agar Luria inoculadas con los diferentes patógenos y como testigos se usaron el cloranfenicol y cultivos sin sobrenadante. De los cultivos analizados en el estudio mencionado anteriormente, los microorganismos patógenos con mayor sensibilidad a los compuestos generados por las cepas probióticas fueron *S. typhi* y *Yersinia enterocolitica* mientras que una cepa de *E. coli* O157: H7 fue la más resistente²⁹.

Los resultados obtenidos en el presente estudio pueden deberse a las diferencias que existen entre las bacterias Gram positivas y negativas. Estas diferencias se basan en que las bacterias Gram negativas contienen aparte de la pared celular una membrana externa que actúa como barrera selectiva al paso de algunas sustancias (macromoléculas como las bacteriocinas o enzimas). Esta membrana consiste en una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos (capa interna), lipopolisacáridos (capa externa) y proteínas que la atraviesan en todo su espesor y que delimitan poros hidrófilos (porinas) que permiten el paso de sustancias de bajo peso molecular por lo que la sensibilidad también es diferente²⁸. Las BAL producen sustancias de bajo peso molecular las cuales pasan a través de las porinas afectando la permeabilidad de la membrana exterior hasta debilitarla o desintegrarla. Las sustancias que pueden generar este daño son la reuterina y el ácido piroglutámico al igual que la presencia de peróxido de hidrógeno, diacetilo y ácido láctico, tal y como lo revelan los estudios realizados por Alakomi y col. (2000)³⁰, quienes observaron el efecto del ácido láctico en la permeabilidad de la membrana exterior de *E.coli* O157:H7, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*, presentando como resultado la desintegración de la membrana exterior.

Se ha observado que cuando se adicionan compuestos como EDTA, HCl o KCN en combinación con bacteriocinas, estos proporcionan barreras que evitan el crecimiento de microorganismos patógenos en los alimentos³⁰; para ello, se combinaron bacteriocinas (nisina y pediocina) con ácido láctico y EDTA en contra de *E.coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* de interés en la salud pública: para la primera la combinación nisina-EDTA disminuyó su crecimiento, mientras que para la segunda, la combinación pediocina-EDTA-nisina-ácido láctico, nisina-EDTA-ácido láctico, ácido láctico y nisina-pediocina-ácido láctico.

Aún no se sabe con exactitud qué compuesto o compuestos son los responsables de la inhibición de los microorganismos de prueba, por lo que es necesario realizar estudios posteriores, como la identificación de estos compuestos y de los *Lactobacillus* implicados, así como una purificación de las sustancias inhibitorias para determinar con mayor precisión si la actividad mostrada es por la acción de alguna bacteriocina o de algún otro compuesto producido por las BAL; sin embargo, los resultados

mostraron según las pruebas post hoc, de Tukey y Scheffe, que son pruebas que realizan todas las combinaciones posibles entre los diferentes tratamientos, demostrando de esta manera que el sobrenadante de los cultivos de *Lactobacillus* sp (LMA-4) y *Lactobacillus* sp 7 (LMA7) presentan mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. aureus*, mientras que el sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp 2 (LMA2) presenta mayor efecto inhibitorio frente al crecimiento de *S. typhi*, por lo cual se proponen como potenciales probióticos o agentes biocontroladores. Estos cultivos podrían ser investigados para su uso en el control de patógenos y microorganismos “deterioradores” en la industria de los alimentos. Además, es necesario continuar otros ensayos para demostrar los beneficios de estos microorganismos en la salud humana, para que puedan ser utilizados como probióticos.

CONCLUSIONES

- El sobrenadante de los cultivos de *Lactobacillus* sp aislado de heces de neonatos mostró efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhi*, pero no sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.
- Las heces de neonato constituye una importante fuente de aislamiento de *Lactobacillus* con potencial probiótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salminen S, Bouley C, Bouton R, Cummings J, et al. Functional Food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr.* 1998; 80(1): 147
2. Hoier E. Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Austr.* 1992; 44 (9):418-420.
3. Mattila S, Myllärinen R, Crittenden G, Mogensen R, et al. Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J.* 2002; 12:173-182.
4. Liévin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser J, et al. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut.* 2000; 47: 646-52.
5. Fernández M, Boris S, Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol.* 2003; 94: 499-55.
6. McCracken V, Gaskins H. Probiotics and the immune system. *Probiotics: A Critical Review* ISBN 1-898486-15-8 .1999; pp.85-111.
7. Batista M, Miukiabe J. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *J Pediat.* 2006; 86: 189-97
8. Guarner F, Malagelada J. Gut flora in health and disease. *The Lancet.* 2003; 360: 512-519.
9. Macfarle S, Dillon J. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol.* 2007; 102: 1187-1196.
10. Gibson G, Wang X. Regulator y effects of Bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol.* 1994; 77: 412-20.
11. Mejía G. Obtención de cepas de Lactobacilos. Su caracterización (in vitro) como potenciales prebióticas. Tesis de Magister Scientiae en Biotecnología de Microorganismos, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. 2001.
12. Ouwehand A. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic Acid Bacteria.* Edit Marcel Dekker, Nueva York.1993; pp.139-154.
13. Ried K. Gastrointestinal Health. The role of pro and pre-biotics in standard foods. *Clin Practic.* 2004; 33(4): 388-393.
14. Yang Z. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties University of Helsinki. Department of Food Technology. 2000; 9-13.
15. Sánchez O. Uso del permeado de suero suplementando en la producción de bacteriocinas y su aplicación en la bioconservación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Querétaro. México. 2003; 5-15.
16. Holzapfel W, Wood B. Lactic acid bacteria in contemporary perspective, En: *The genera of lactic acid bacteria.* Gran Bretaña: Chapman and Hall Press. 1995; 1-5.
17. Lyhs U. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Food and Environmental Hygiene Department, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki. 2002; 9-10.
18. Gonzales B; Gómez M; Jiménez Z. Bacteriocinas de probióticos. *Rev. Salud Pública y Nutrición.* 2003; 4(2): 17
19. Guglielmetti S, Tamagnini I, Minuzzo M, Arioli S, et al. Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cells. *Curr Microbiol.* 2004; 59:167-72.

20. Espinoza J. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* sp. de queso fresco y caracterización in vitro con potenciales prebióticos. Tesis Biólogo Microbiólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2009.
21. Mac Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra ed. Buenos Aires: Edit. Médica Panamericana; 2003.
22. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*. 2003; 143: 754-58.
23. Lindgren S, Dobrogoz W. Antagonic activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentation. *FEMS. Microbiol. Rev.* 1990; 87: 149-164.
24. Ouwehand A, Kirjavainen P, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and establish effects. *Int. Dairy J.* 1999; 9: 43-52.
25. Carrasco M, Scarincini H, Simonetta A. Antibacterial Activity of Lactic Acid bacteria Isolated from Argentinian Dairy Products. *Aust J Dairy Technol.* 2002; 57(1): 15-19.
26. Klaenhammer T. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 1988; 70: 337-349.
27. Alakomi H, Skyttä E, Saarela M, Mattila S, Latva K, Helande I. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Biotechnology. Finland.* 2000; 165-185
28. Savadogo A, Ouattara C, Bassole I, Traore A. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan J Nutr.* 2004; 3(3): 174-179.
29. González M, Gómez T, Jiménez S. Bacteriocinas de probióticos. *Rev Salud Pub y Nut.* 2004; 4: 10-20.
30. Mendoza G, López G, Escuderm A. Efecto de la combinación de nisina, pediocina y ácido láctico sobre patógenos en alimentos. *Rev Salud Pública y Nut.* 2004; 32-35.



Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus*

Effect of *Syzygium aromaticum* essential-oil on *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A and *Bacillus cereus* survival

Jessenia M. Gamboa Anticona y María N. Vásquez Valles

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 del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” en la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus*. La extracción del aceite esencial (AE) se realizó a partir de brotes de clavo de olor usando el método de destilación por arrastre con vapor de agua. Se prepararon concentraciones del aceite al 10%, 20%, 30% y 40% más Tween 80 como solvente emulsificante. Se emplearon cada uno de los cultivos de *S. typhi*, *S. paratyphi* A y *B. cereus* y se estandarizaron a una turbidez equivalente a 1.5×10^8 células/mL del nefelómetro de MacFarland, los cuales constituyeron los inóculos. El efecto del AE sobre los microorganismos se determinó por el método de difusión en agar utilizándose concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% de aceite; utilizando cloranfenicol (30ug/disco) como control positivo y Tween 80 como control negativo. Se encontró una relación directa entre la concentración del aceite y el efecto inhibitorio: a mayor concentración (40%) mayor efecto inhibitorio sobre los microorganismos en estudio. Se concluye que el AE evaluado presenta un notable efecto inhibitorio en la supervivencia de *S. typhi*, *S. paratyphi* A y *B. cereus*.

Palabras clave: Supervivencia, aceite esencial, *Syzygium aromaticum*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A, *Bacillus cereus*.

ABSTRACT

Effect of essential oil of *Syzygium aromaticum* "clove" on *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A and *Bacillus cereus* survivals was evaluated. The extraction of essential oil (AE) was performed from clove buds using the Distillation with steam method. Likewise, oil concentrations were prepared at 10%, 20%, 30% and 40% plus Tween 80 as an emulsifier solvent. Cultures of *S. typhi*, *S. paratyphi* A and *B. cereus* were used and were standardized to a turbidity equivalent to 1.5×10^8 cells / mL, which constituted the inoculum. The sensitivity of these microorganisms was determined by the agar diffusion method used in concentrations of 10%, 20%, 30% and 40% oil; using chloramphenicol (30ug/disco) as positive control and Tween 80 as negative control. It was found that 40% of the oil in test compared with chloramphenicol has a greater inhibitory effect on the survival of *B. cereus*. Likewise, it was demonstrated that the concentration of 40% of the oil in the study, it exerts an antibacterial power *S. typhi*, *S. paratyphi* A and *B. cereus* survival compared to the other concentrations employed. It was concluded that the assessed AE presents a remarkable inhibitory effect on the survival of *S. typhi*, *S. paratyphi* A and *B. cereus*.

Keywords: Survival, essential oil, agar diffusion, *Syzygium aromaticum*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A and *Bacillus cereus*.

INTRODUCCIÓN

Los patógenos microbianos en alimentos han sido confirmados como la causa principal de las enfermedades transmitidas por estos productos en Latinoamérica y el Caribe^{1,2}. La contaminación de los alimentos, en la mayoría de los casos, suele ocurrir después de ser cocidos y no ser conservados adecuadamente, lo que favorece la multiplicación de los microorganismos³. Microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* son reconocidos como patógenos causantes de enfermedades y graves intoxicaciones alimentarias, generando un gran impacto sobre la salud pública^{2,4}. Este grupo de bacterias, debido a su ubicuidad e incidencia, se ha constituido en el blanco de acción de muchos de los sistemas de aseguramiento de la calidad en industrias alimentarias³.

Dentro de los procedimientos de control de microorganismos patógenos más utilizados están los tratamientos térmicos de pasteurización y esterilización, la irradiación UV, almacenamiento a bajas temperaturas como congelación y refrigeración, así mismo el uso de conservantes químicos^{4,5,6}; sin embargo, no todos son 100% eficientes contra todos los microorganismos ni se pueden utilizar sobre todos los productos^{7,8}.

Como alternativa a los conservantes sintéticos, los aceites esenciales prometen competir con el amplio mercado de los agentes sintéticos que actualmente ofrecen productos económicos, de aplicación sencilla y amplio espectro, pero que están destinados a desaparecer porque se ha demostrado que algunos de estos son altamente tóxicos para el hombre y los animales, así mismo son bioacumulables, y después de un largo tiempo de aplicación son inactivos para muchos microorganismos patógenos^{9,10}.

Las propiedades antimicrobianas de hierbas y especias han sido reconocidas y usadas desde tiempos antiguos en la preservación de los alimentos y en la medicina, pero científicamente confirmado hace pocos años ^[11]. Los aceites esenciales poseen actividad antimicrobiana por lo cual los convierte en una opción atractiva para la sustitución de conservantes sintéticos, los que al ser añadidos van a cambiar o mejorar el sabor de los alimentos ^[12]. Sin embargo, la aplicación de aceites esenciales como conservantes de alimentos requiere un conocimiento detallado de sus propiedades, es decir, su modo de acción y el efecto de los componentes en la matriz de los alimentos^{13,14,15,16,17,18,19}.

Se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales, de los cuales 300 son comercialmente importantes en el mercado de las fragancias, sus componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que éstos pueden verse afectados por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas^{15,16,17,20}.

Syzygium aromaticum ("clavo de olor") ha sido reconocido como analgésico, antiséptico, carminativo, antibacteriano y antifúngico^{14,18,19,20}. Es un producto natural obtenido por destilación de tallos, flores y hojas trituradas de la planta del clavo, cuyo principal ingrediente activo es el eugenol (85-95 % del total/ 4-alil-2-vaselina); está compuesto además por acetileugeno, α y β cariofilenos y pequeñas cantidades de ésteres, cetonas y alcoholes²². Como antiséptico, la acción de los aceites esenciales es similar a un efecto bacteriostático; sin embargo, algunos de sus componentes químicos parecen tener propiedades bactericidas^{19,21}.

Las bacterias Gram negativas son generalmente menos susceptibles a los aceites esenciales que las bacterias Gram positivas. La membrana externa de las bacterias Gram negativas contienen lipopolisacáridos hidrófilos, que crean una barrera hacia macromoléculas y compuestos hidrófobos, proporcionándoles una mayor tolerancia hacia compuestos antimicrobianos hidrófobos como los que se encuentran en los aceites esenciales²³. Las altas concentraciones de los aceites esenciales puede afectar las propiedades organolépticas de los alimentos, las bajas concentraciones puede ser suficiente para la seguridad alimentaria en las situaciones donde la carga bacteriana es baja, además del agradable sabor que es impartida a la comida²⁴.

Dentro de las bacterias Gram negativas que ha cobrado interés en la contaminación de alimentos es *Salmonella* spp. Las especies de este patógeno son quimioorganótrofas, con habilidad para metabolizar nutrientes por las vías fermentativas y respiratoria²⁵. Las bacterias crecen óptimamente a 37°C y pueden catabolizar la D-glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido y gas; estos microorganismos son oxidasa negativos y catalasa negativos, crecen en citrato como única fuente de

carbono, generalmente producen ácido sulfhídrico, descarboxilan la lisina y ornitina, y no hidrolizan la urea²⁶.

Las frutas y verduras han ganado notoriedad en años recientes como fuentes de salmonelosis humana. Esto se presenta como una consecuencia de diversos factores como: la fertilización de sembríos con lodos sin tratamiento o efluentes de drenajes potencialmente contaminados con *Salmonella* spp. resistente a antibióticos, la irrigación de los campos y el lavado de frutas y verduras con aguas contaminadas, la manipulación excesiva por los trabajadores, la exposición a la contaminación ambiental de especias y condimentos durante el secado y la resistencia del microorganismo a valores de pH bajos^{27,28,29,30,31}.

Bacillus cereus, por su lado, es una bacteria Gram positiva que causa enfermedad bajo dos formas clínicas: intoxicación emética por ingestión de toxinas presentes en el alimento o una infección diarreica debida a una ingestión de bacterias o esporas que crecen en los intestinos produciendo toxinas^{19,27}.

Decker et al.²² reportaron un amplio espectro de actividad bacteriostática del clavo de olor contra *E. coli* y *L. monocytogenes*, resultando efectiva las dosis empleadas 20 y 40 % respectivamente; Yossa et al.⁵ evaluaron el efecto in vitro del clavo a un 10% sobre cepas de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. y Sánchez¹¹ demostró concretamente que derivados fenólicos tales como carvacrol y eugenol, provenientes del clavo y tomillo, a concentraciones 20 uL, causan la desintegración de la membrana de *E. coli* y *S. typhimurium*, demostrándose así que las bacterias gram negativas son menos susceptibles que las gram positivas. Así también, se conoce que el eugenol, posee una buena actividad antibacteriana; asimismo, Hao et al.^{14,15} encontraron que el clavo de olor a 10 % fue muy efectivo contra *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophilla* en carne cocida refrigerada; sin embargo su poder inhibidor fue menor al de la canela a 10%.

Por lo anterior, son pocas las investigaciones en las que se ha determinado el efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* contra *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus*. En tal sentido, lograr que la población disponga de alimentos rigurosamente libre de patógenos o contaminantes, es un propósito de muchos investigadores, además hace un bien a la Salud Pública, de allí el interés científico por investigar y descubrir nuevas alternativas viables para la síntesis y producción de antimicrobianos de origen natural, como el aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, que es una alternativa viable debido a su alto rendimiento, fácil extracción porque no requiere tecnología sofisticada, permite la explotación de recursos naturales, abundantes y renovables, no contamina el ambiente, buen antioxidante, no genera resistencia bacteriana, y no requiere elevadas concentraciones. En tal sentido, la presente investigación está dirigida a determinar el efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus* en el laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

- 1 Kg de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor”
- cultivos de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Bacillus cereus*, proporcionados por el Laboratorio de Microbiología y Tecnología de Alimentos, de la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

Obtención de *Syzygium aromaticum*

Los brotes de *Syzygium aromaticum* fueron adquiridos del Mercado Zonal Palermo (Ex Mercado Mayorista) distrito de Trujillo provincia de Trujillo, departamento La Libertad-Perú.

Transporte y conservación de *Syzygium aromaticum*

Los brotes se llevaron al Laboratorio de Investigación N° 04 de la Facultad de Ingeniería Química, posteriormente, se envolvió en papel de molde hasta el momento de la extracción del aceite.

Pesado de *Syzygium aromaticum*

Se pesaron 500 g de brotes de *Syzygium aromaticum* en una balanza mecánica.

Extracción del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* [28,29]- Método: Destilación por Arrastre de Vapor

- Se depositaron 500 g de brotes de *Syzygium aromaticum* en un balón de fondo redondo de 1000 mL de capacidad.
- Se procedió a llenar con agua el balón destilador, previa instalación del conducto refrigerante, cabe resaltar que el extremo superior de este balón fue conectado a un condensador, haciéndose circular el agua a través del mismo.
- Se llevó a calentamiento hasta ebullición, el balón conteniendo agua por un tiempo de tres horas hasta desprendimiento de un líquido inmiscible conteniendo vapor de agua condensada y el aceite vegetal, que fueron recolectados en embudos de decantación.
- Se eliminó el agua contenido en el embudo de decantación.

Conservación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*

El aceite esencial obtenido se colectó en viales de color ámbar y se conservó a temperatura de refrigeración a 10 °C²⁰.

Reactivación, purificación y siembra

- Cada uno de los cultivos bacterianos se sembraron en 4 ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) respectivamente y se incubaron a 37°C durante 12 horas.
- Después del período de incubación se sembró una alícuota del cultivo de *Bacillus cereus* en Agar Selectivo para *Bacillus cereus* y los cultivos de *S. typhi* y *S. paratyphi A* se sembraron en Agar Salmonella Shigella. Posteriormente cada uno de los cultivos se llevó a incubar a 37° C durante 24 horas.
- Se seleccionaron colonias que presentaron características culturales propias a cada microorganismo en estudio. A partir de cada una de las colonias, se tomó una azada y se realizó la coloración Gram, observándose a 100x.
- Una vez comprobada la pureza del cultivo, de la parte restante de la colonia aislada se sembró en agar nutritivo semisólido inclinado.

Preparación del inóculo^{30,31}

Cada uno de los cultivos bacterianos se sembraron en placas conteniendo Plate Count Agar (PCA) y se incubaron a 37°C durante 18 horas.

Estandarización de los inóculos bacterianos

Se realizó una suspensión en 5 mL de Agua Destilada Estéril (ADE). A una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 UFC/ mL). A esta suspensión se le denominó inóculo.

Preparación de las concentraciones del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*

A partir del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* y usando Tween 80 como agente emulsificante, se prepararon concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40%.

Determinación de la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*

Método de Difusión en Agar Kirby- Bauer³²

- En tres placas Petri con 20 mL de Agar Müller Hinton, se sembró 100uL del inóculo de *Salmonella typhi* sobre la superficie del medio de cultivo.
- Las placas se llevaron a secar en la estufa por 10 minutos.
- A cada placa se le realizó 5 orificios de 5 mm de diámetro cada uno utilizando un sacabocado estéril, a una distancia de 3 cm con respecto al otro. A 4 orificios se le añadió 100 uL de cada una de las concentraciones de aceite esencial, al 5 orificio siguiente, se le adicionó 100 uL de Tween 80 como control negativo; así mismo, en la misma placa se utilizó un disco de cloranfenicol (30ug) como control positivo.
- En la otra placa se colocó 100uL de Tween 80 como control negativo; y cloranfenicol (30ug/disco) siendo este el control positivo.
- Las placas sembradas se dejaron una hora, con la finalidad de permitir una mejor difusión del aceite en el agar.
- Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

Lectura

- La lectura de los resultados se realizó en base a la presencia de halos de inhibición del crecimiento (en milímetros), formados alrededor de cada pocillo por efecto de la actividad antibacteriana del aceite esencial a concentraciones de 10% ,20%, 30% y 40% y luego se les restó los 5 mm. del pozo.

- Las mediciones se realizaron en 4 direcciones y se sacó el promedio.
- Se continuó con el mismo procedimiento y por triplicado para el cultivo de *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*.
- Las placas presentaron actividad antibacteriana significativa (definida como una zona clara perfecta con un diámetro ≥ 18 mm para el cloranfenicol, Intermedia si es 13-17 y Resistente ≤ 12) [33,34].

Determinación de la supervivencia de *Bacillus cereus*

Se realizó de acuerdo al ítem 2.11

Análisis Estadístico

El procesamiento y análisis de los resultados obtenidos para la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* que se presenta para *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus* se efectuó mediante el programa SPSS versión 18.0. Para realizar los análisis se tuvo en cuenta los valores promedio de inhibición de cada concentración del aceite esencial evaluado; ya que se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Posteriormente, se realizó el análisis de varianza, específicamente una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis Test; así mismo, a los datos obtenidos para determinar las diferencias significativas en la actividad antibacteriana entre los tres grupos de bacterias así como con el antibiótico utilizado (control positivo). La significancia se reportó con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Los resultados del efecto del aceite esencial de *S. aromaticum* sobre la supervivencia de *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* se muestran en la Fig. 1: se presenta la comparación de promedios de los halos de sensibilidad (mm) entre las bacterias a concentraciones (10%, 20%, 30% y 40%) del aceite esencial y del grupo control “Cloranfenicol, observándose el promedio de la medición de los halos de inhibición del crecimiento (mm) de *S. typhi* por acción de diferentes concentraciones 10%, 20%, 30% y 40% del aceite esencial y del grupo control “Cloranfenicol”, se evidencia la existencia de diferencia significativa entre estos grupos, siendo la concentración del 40% de aceite esencial de *S. aromaticum* la de mayor efecto en relación al Cloranfenicol ($p < 0.05$). Asimismo, se muestra los halos de inhibición de crecimiento (mm) de *S. paratyphi A* por acción de diferentes concentraciones (10%, 20%, 30% y 40%) del aceite esencial y del grupo control “Cloranfenicol”, se observa la existencia de diferencia significativa entre estos grupos, siendo la concentración del 40% de aceite esencial de *S. aromaticum* la de mayor efecto en relación al Cloranfenicol ($p < 0.05$).

También, se muestra los halos de inhibición de crecimiento (mm) de *B. cereus* por acción de diferentes concentraciones (10%, 20%, 30% y 40%) del aceite esencial y del grupo control “Cloranfenicol”, se observa la existencia de diferencia significativa entre estos grupos, siendo la concentración del 40% de aceite esencial de *S. aromaticum* la de mayor efecto en relación al Cloranfenicol ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Muchos estudios en el mundo se han realizado con los aceites esenciales obtenidos de diferentes plantas clasificadas como medicinales o como especias; la intención de estos estudios ha sido diferente en el sentido de buscar compuestos que inhiban el crecimiento ya sea de bacterias, hongos, virus y parásitos en alimentos, en aguas residuales o también para ser utilizados como medicamentos.

Hoy en día existe una demanda significativa de los consumidores por los alimentos que son mínimamente procesados y libres de conservantes químicos de síntesis con la percepción de ser “natural”; como resultado, la industria alimentaria se enfrenta a grandes desafíos para producir alimentos naturales, es por ello, han surgido investigaciones que utilizan los aceites esenciales como conservantes naturales.

En la Figura N°1, se observa que para *S. typhi*, el halo de inhibición formado por la concentraciones de 10, 20 y 30% del aceite de *S. aromaticum*, fueron de 11.8mm, 15.0mm, y 15.6 mm (Ver anexo 2), respecto al halo de sensibilidad formado por Cloranfenicol que fue de 16.6 mm; esto denota que su actividad antibacteriana es menos eficaz comparado con el patrón cloranfenicol ($P > 0.05$).

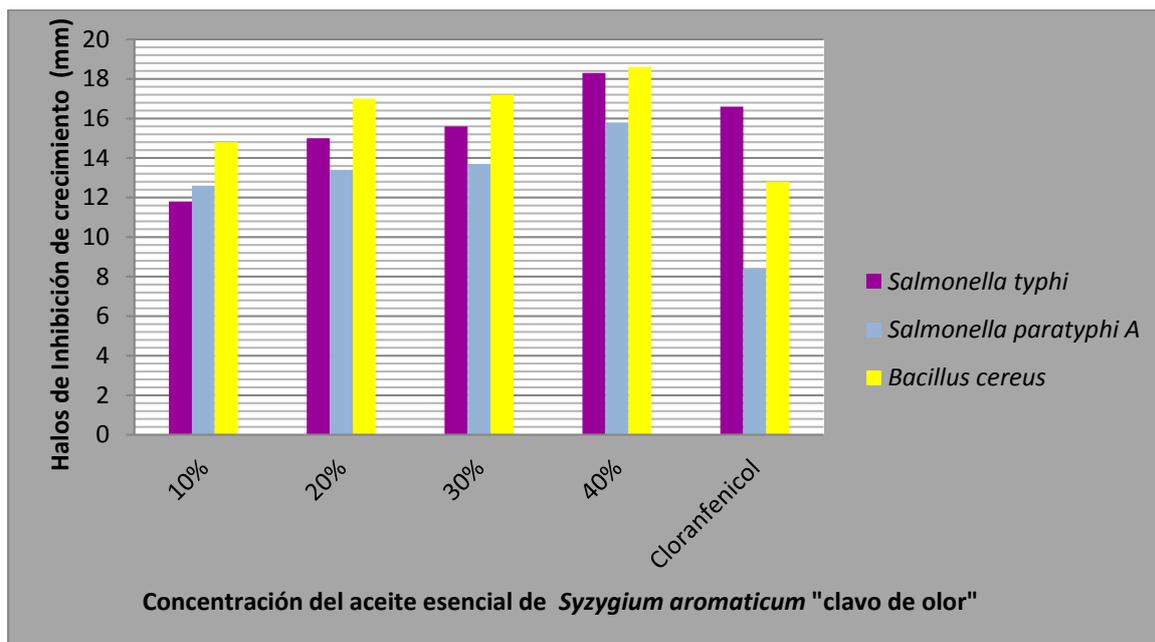


Fig. 1. Comparación de promedios de los halos de inhibición de crecimiento (mm) de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus* a concentraciones de 10, 20, 30, y 40% de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* y del grupo de control "Cloranfenicol".

La mayor zona de inhibición de *S. typhi* se obtuvo con la concentración de 40%, cuyo halo de inhibición fue de 18.3 mm (Ver anexo 02) siendo mucho mayor con respecto a su control (16 mm). Este resultado permite asegurar que *S. typhi* es significativamente más sensible a la concentración de 40% del aceite esencial de *S. aromaticum*, que al antibiótico Cloranfenicol; por lo que resultó con $p < 0.05$, lo cual indica la existencia de diferencia significativa entre el halo de inhibición formado por el aceite al 40% y el formado por Cloranfenicol. Siendo esta concentración eficazmente sensible para *S. typhi*.

El efecto del aceite esencial de *S. aromaticum* sobre la supervivencia de *S. paratyphi A* es menor a las concentraciones de 10, 20 y 30%, con halos formados 12.6, 13.4 y 13.7 mm respectivamente; así mismo, presentan mayor diámetro, en comparación con el halo de inhibición de crecimiento formado por el antibiótico Cloranfenicol (control) que fue de 8.4 mm, aunque producen efecto inhibitorio en la bacteria, no son concentraciones eficaces en relación al antibiótico ($p > 0.05$), esto se interpreta que el halo de sensibilidad formado a dichas concentraciones no es significativamente eficaz para *S. paratyphi A*. Sin embargo la concentración de 40%, formó diámetro de 15.8mm, mucho mayor con respecto a su control (8.4mm), por lo que resultó con $p < 0.05$, lo cual indica la existencia de diferencia significativa entre el halo de inhibición formado el aceite al 40% y el formado por el control positivo. Siendo esta concentración eficazmente sensible para *S. paratyphi A*.

Se observa que *B. cereus* es sensible frente a las concentraciones de 10, 20 y 30% del aceite de *S. aromaticum*, pues se observa la formación de halos de inhibición de 14.8, 17.0 y 17.2mm respectivamente; pero el diámetro de estos halos, es mayor en comparación con el halo de sensibilidad formado por el antibiótico Cloranfenicol (control) que fue de 12.8 mm, aunque producen sensibilidad en la bacteria, no son concentraciones eficaces. Así mismo, la concentración de 40%, formó diámetro de 18.6 mm, mucho mayor con respecto a su control, por lo que resultó con $p < 0.05$, lo cual indica la existencia de diferencia significativa entre el halo de inhibición formado el aceite al 40% y el formado por el control positivo. Siendo esta concentración eficazmente sensible para *B. cereus*.

Así mismo, en la Figura N° 01. los promedios de los halos de inhibición de crecimiento de *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* frente a cada concentración (10, 20, 30 y 40%) del aceite esencial de *S. aromaticum*, existiendo diferencia significativa entre ambas bacterias, es decir una de las bacterias

presenta menor supervivencia frente al aceite esencial, resultando que *B. cereus* es más sensible al aceite de *S. aromaticum* a las concentraciones de 10, 20, 30 y 40% en comparación con la supervivencia de *S. typhi*, *S. paratyphi A* que presentan menor inhibición de crecimiento frente a las mismas concentraciones. Los resultados obtenidos son coherentes y se relacionan con los hallados por Friedman y col. quienes analizando aceite de clavo, sobre *Salmonella enterica*, encontraron que clavo de olor fue uno de los más efectivos a concentración del 50%. Adicionalmente, este aceite evidenció inhibición frente a *B. cereus*, *E. coli* y *Ps. Aeruginosa*^{25, 26}.

También se evidenció que *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* no son sensibles al control negativo, Tween 80, ya que no se observó la formación de halos, mostrando la resistencia de estos microorganismos al emulsificante.

Investigadores señalan que existe una relación entre las estructuras químicas de los más abundantes en el aceite esencial y la actividad antimicrobiana. Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antibacteriana, no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos, en el caso de *S. aromaticum* la actividad antibacteriana se debe a que el eugenol, actúa inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como, amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular^{19, 28}. El presente trabajo, concuerda con lo encontrado por Gutiérrez 2006 y Huerta 2007, en el cual concentraciones de 30 % de aceite esencial de clavo poseen mayor actividad antibacteriana frente a *S. typhimurium*.

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de los componentes del aceite, se sabe que los sitios de acción en la célula bacteriana incluyen la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético, todos ellos estratégicos para la supervivencia de los microorganismos y cualquier acción sobre ellos puede inactivar a la célula bacteriana^{30, 33}.

El resultado de la comparación de los halos de inhibición entre *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* difieren en varios aspectos de otros con respecto a la estructura de sus paredes celulares, principalmente a la presencia de lipoproteínas y lipopolisacáridos en bacterias Gram negativas que forman una barrera para los compuestos hidrófobos^{29, 36}. Los aceites esenciales se introducen a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, alterando su estructura y haciéndolas más permeables. Como consecuencia tiene lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que puede llevar a la muerte celular^{34, 35}. En su mayoría las gram-negativas son más resistentes a los aceites esenciales que las bacterias Gram-positivas³⁶.

El eugenol es el principal componente del aceite del clavo¹¹. Huertas³⁴ encontró que a concentraciones subletales de eugenol inhibe la producción de amilasa y proteasas de *B. cereus*, deteriorando la pared celular, lo que origina la lisis celular. Los aceites esenciales compuestos principalmente por sustancias fenólicas, como el aceite del clavo de olor, expresan una actividad inhibitoria mayor y un espectro de acción más amplio, en comparación con aceites compuestos principalmente por grupos alcohólicos. Lo anterior explica el hecho de que el clavo de olor (que contiene eugenol) posee una actividad antibacteriana mayor a diferencia de compuestos no fenólicos^{26, 34}. En la presente investigación, este compuesto fenólico mostró distintos niveles de inhibición del crecimiento cuando se utilizaron por separado frente a *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus*.

El hecho de que las bacterias Gram (-) sean menos susceptibles a la acción de los AE quizás sea debido a que la membrana externa que poseen y que rodea la pared celular el cual restringe la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de la membrana; así mismo, la compleja composición de los AE puede variar en función de las condiciones de crecimiento de cultivo de la planta, del modo de extracción del mismo, y de otros factores que hacen que éstos tengan diferente grado de actividad antibacteriana³².

En aquellos aceites esenciales que han presentado mayor capacidad inhibitoria se han encontrado como mayores componentes del mismo, compuestos tales como el timol, el carvacrol, el linalool, el aldehído cinámico, la alicina y el eugenol^{25, 36}; dichos aceites en las bacterias, por su acción lipofílica tienen la capacidad de pasar las membranas celulares, romper polisacáridos, ácidos grasos y lípidos, permeabilizando la membrana celular; esta permeabilización, conduce a la pérdida de iones, al colapso de la bomba de protones y a la disminución del ATP lo cual inevitablemente conduce a la muerte celular; también se ha encontrado que a nivel citoplasmático puede actuar sobre lípidos y proteínas coagulando dichas moléculas^{4, 32}. Otros estudios han concluido además, que son más sensibles las

bacterias Gram positivas que las Gram negativas, y este efecto está asociado con aceites esenciales que contengan carvacrol y timol los cuales tienen mayor rendimiento antibacterial [24, 25].

S. typhi y *S. paratyphi* A presentaron menor inhibición al aceite esencial de *S. aromaticum*, que *B. cereus*, ésta diferencia se debería a la estructura de sus membranas, ya que, las Gram negativas (*S. typhi* y *S. paratyphi* A), poseen una pared celular más compleja compuesta por dos capas situadas por fuera de la membrana citoplasmática, la primera y más cercana a la membrana es similar (más delgada) a la de las bacterias Gram positivas, está constituida por péptidoglicanos, la segunda denominada membrana externa está constituida por fosfolípidos con ácidos grasos saturados y entre las dos capas se halla un espacio periplásmico rico en enzimas, esta estructura les confiere un mayor grado de resistencia a los agentes antimicrobianos^{31,33}, además poseen mecanismos de defensa como: presencia de b-lactamasas, modificación enzimática del agente antimicrobiano, cambios en la permeabilidad de la membrana externa debida a la presencia de bombas de expulsión, etc, que generan dificultades para encontrar sustancias que sean efectivas contra ellas^{31,35}. Así mismo, Burt y Reinders³⁶ propusieron que el aceite esencial de clavo ejerce su efecto antimicrobiano sobre los fosfolípidos en la capa externa de la membrana celular de las bacterias, provocando la formación de poros y afectando la permeabilidad de la membrana.

Se observa que el efecto inhibitor del aceite esencial de *S. aromaticum* para *B. cereus* es mayor al compararlos con los demás microorganismos evaluados, posiblemente esto puede deberse a la estructura de su pared celular ya que como es un microorganismo Gram positivo es menos complejo, pues está compuesto por una membrana citoplasmática y una capa gruesa de peptidoglucano en comparación con las bacterias Gram negativas que tienen una pared más compleja, posee una membrana citoplasmática, una delgada capa de peptidoglucano, lipopolisacáridos y proteínas^{32,36}.

En relación a *B. cereus*, son escasos los estudios publicados para esta bacteria; sin embargo, la actividad biológica demostrada en este estudio coincide con los resultados obtenidos previamente en donde se determinó que *E. coli* a una concentración de 0.4% y a una temperatura de 21°C reducen la población microbiana en un logaritmo 5 el cual es más sensible comparado con *S. aureus* y *Ps. aeruginosa* así como que las bacterias Gram negativas: *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. cholerae suis* y *V. cholerae* y las bacterias Gram positivas: *S. aureus* y *B. cereus*, mostraron diferentes grados de sensibilidad, concluyendo en que el aceite de *S. aromaticum* posee un amplio espectro contra todas las bacterias Gram positivas evaluadas que contra las Gram negativas^{34,36}.

Pocos trabajos describen el uso de este aceite como alternativa, sin embargo en este estudio se puede observar que la actividad antimicrobiana de este aceite esencial es de amplio espectro inhibiendo el crecimiento de *B. cereus* (Gram positiva); así mismo para *S. typhi* y *Salmonella paratyphi* A (Gram negativas) encontrándose relación con lo informado en trabajos anteriores que encontraron actividad de los aceites esenciales de las plantas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas^{26,31,32}.

En general, los aceites esenciales poseen fuertes propiedades antibacterianas debido a que contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el eugenol^{12,13,14}. Lo anterior sugiere que su mecanismo de acción, sea similar al de otros compuestos fenólicos, por alteración de la membrana citoplasmática, interrumpiendo la fuerza motriz de protones (PMF), el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación del contenido celular¹⁵.

La eficacia de los aceites esenciales contra patógenos transmitidos por alimentos depende de la molécula activa, también se debe mencionar que la composición química de los aceites esenciales puede variar en gran medida para una especie de planta en particular³⁶. Esto puede ser una posible explicación de la variabilidad de los resultados obtenidos de un experimento a otro. Por otra parte, todo el aceite esencial puede tener una mayor actividad antimicrobiana que su mayor componente aislado. Existe la posibilidad de que un patógeno de transmisión alimentaria desarrolle resistencia a los aceites esenciales. Sin embargo, el riesgo de desarrollo de resistencia contra aceites esenciales sigue siendo muy poco frecuente³³.

La evaluación de la combinación de agentes antimicrobianos es necesaria debido a que un microorganismo puede ser resistente a la inhibición y/o eliminación por dosis convencionales de un solo antimicrobiano, pero al ser expuesto a una combinación de agentes se puede vencer su resistencia.

Por lo que se puede afirmar que el aceite esencial de *S. aromaticum*, presenta efectos inhibitorios en la sobrevivencia de *S. typhi*, *S. paratyphi* A y *B. cereus* lo que podrían ser una alternativa como preservadores de alimentos. Estos resultados contribuyen en dar respuestas a las necesidades de los gobiernos, agencias regulatorias, fabricantes de alimentos y consumidores; frente al uso de agentes conservantes de alimentos de origen natural, que aseguren la inocuidad y la calidad de anaquel de los

alimentos procesados, en un ámbito de salud pública que se caracteriza en la actualidad por incremento de la resistencia a antibióticos de los microorganismos, mayor toma de conciencia de los consumidores frente a lo que consumen y la globalización de las ETA por causa de la globalización de los mercados alimentarios^{14,29}.

CONCLUSIONES

- La mayor concentración del aceite de *Syzygium aromaticum* tiene mayor efecto inhibitorio sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*.
- La supervivencia de *Bacillus cereus* es menor frente a las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* que *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi A*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herrera F, García R. Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas 2006; 4:13-19.
2. Demo M, Oliva M, Lopez M, Zunino M, Zygadlo J. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. Pharm Biol 2005; 43: 129-134.
3. Pilco S, Quito M, Quispe S. Conservación de pan artesanal Ezequiel y pan superbuono usando aceite esencial de clavo de olor (*Eugenia caryophyllus*). Revista de investigación universitaria 2009; 1(1): 12-17.
4. Prabuseenivasan S, Jakakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine 2006; 6:39-47.
5. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology 2004; 94(22): 223-253.
6. Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules 2012; 17(4): 3989-4006.
7. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Revista de Facultad de Medicina 2001; 62(2): 156-161.
8. Ardilla M, Vargas A, Pérez J, Mejía L. Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. Biosalud 2009; 8: 47-57.
9. Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap 2003; 16(4): 385-393.
10. Smith P, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Applied Microbiology 1998; 26:118-122.
11. Nereyda E. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai 2011; 7(1): 153-170.
12. Zink DL. The impact of consumer demands and trends on food processing. Emerg Infect Dis 1997; 3: 467-469.
13. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front Microbiol 2012; 3: 1-24.
14. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. Int J Food Microbiol 2004; 94(3): 223-253.
15. Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules 2012; 17(4): 3989-4006.
16. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 2000; 88(2): 308-316.
17. Rentsenkhand T. Effect of essential oils and their combinations on food-spoilage microorganisms. [Tesis]. Szeged: Univ. of Szeged; 2010.
18. Martino T, Leyva V, Puig Y, Machin M, Aportela N, Ferrer Y. *Bacillus cereus* y su implicación en la inocuidad de los alimentos. Revista Cubana de Salud Pública. 2010; 36(1)128-138.
19. Olaimat AN, Holley RA. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. Food Microbiol 2012; 32(1):1-19.
20. Arias M. Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especies naturales sobre microorganismos asociados a alimentos. [Tesis]. Universidad de Costa Rica; 2007.
21. Ilhami G, Mahfuz E, Hassan Y, Aboul E. Antioxidant activity of clove oil – A powerful antioxidant source. Arabian Journal of Chemistry 2012; 5, 489-499.

22. Vokou D, Varelzidou S, Katinakis P. Effects of aromatic plants on potato storage-sprout suppression and antimicrobial activity. *Agric Ecosyst Environ* 1993; 47:223-235.
23. Hongmei L, Xianjin W, Yizeng L, Zhang J. Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of *Houttuynia THUNB*. *Chem Pharm Bull* 2006; 54(7): 936-940.
24. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 88(2-3):199-204.
25. González R. Eugenol. Propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubana Estomatología* 2002; 39:2.
26. Gupta C, Garg A, Uniyal R, Gupta S. Comparison Of Antimicrobial Activities Of Clove Oil & Its Extract On Some Food Borne Microbes Disponible en: <http://ispub.com/IJMB/7/1/13649>.
27. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essentials oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 1999; 86: 985-990.
28. Sacsquispe R, Velásquez J, Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de discos de difusión. Instituto Nacional de Salud. 2002.
29. Müller, G. Microbiología de los Alimentos Vegetales. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España. 1981. 152-153.
30. Nelson J; Bednarczyk R; Nadle J; Clogher P; Gillespie J; Daniels A; Plantenga M; and et all FoodNet survey of food use and practices in long-term care facilities. *Pub. Med.* 2008; 71(2):365-72.
31. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47: 565-573.
32. Denyer S, Hugo W. Daño inducido por Biocida a la membrana citoplasmática bacteriana. En: Denyer SP, Hugo WB, editor. Mecanismos de acción de los biocidas químicos La Society for Applied Bacteriología, Serie Técnica N ° 27. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1991. pp 171-188.
33. Huertas J. Efecto de tratamientos térmicos en combinación con los aceites esenciales de clavo y tomillo sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* evaluada in vitro y en una sopa comercial. [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
34. Conner D. Naturally occurring compounds, Antimicrobials in foods. New York. 1993. 441-468.
35. Viuda M.; Ruiz N.; Fernández L.; Pérez A. Antifungal Activities of Thyme, Clove and Oregano Essential Oils. *J Food Safety*.2007; 27:91-101.
36. L. Nuñez, Aquino M.; Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). *Brazilian Journal of Microbiology*.2012; 1255-1260.



Efecto de la inoculación mixta de *Rhizobium etli* y *Bradyrhizobium yuanmingense* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Oryza sativa* var. NIR

The effect of the mixed inoculation of *Rhizobium etli* Rf 188-03 and *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc 391-01 on the aerial and root growth of *Oryza sativa* var. NIR

Héctor Daniel Bacilio Pérez y Bertha Soriano Bernilla

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 la inoculación mixta de *Rhizobium etli* Rf 188-03 y *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc 391-01 sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Oryza sativa* var. NIR. Para ello, se realizaron seis tratamientos (T) y tres repeticiones, considerándose: T1 (inoculado con agua destilada estéril), T2 (con fertilizante químico), T3 (inoculado con suspensión bacteriana de *R. etli* Rf 188-03), T4 (inoculado con suspensión bacteriana de *B. yuanmingense* Rc 391-01), T5 (inoculado con suspensión bacteriana *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01), T6 (inoculado con suspensión bacteriana de *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01; además, de fertilizante químico). Se trabajó con ocho plántulas sembradas de manera equidistante en una maceta que contenía 5 kg de suelo agrícola. Se inoculó las suspensiones bacterianas en los días 16 y 36 de realizado el trasplante, añadiendo 60 y 20 mL de las suspensiones bacterianas a cada una de las macetas según los tratamientos descritos anteriormente. Las evaluaciones se hicieron a los 36 y 56 días de realizado el trasplante tomando para ello cuatro plantas al azar de cada maceta y teniendo como base: altura de la planta, número de macollos, peso fresco y seco tanto de la parte aérea y radicular. Se determinó que la inoculación mixta de *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 incrementa de manera significativa ($p < 0,05$) la altura de la planta, el número de macollos y el peso fresco y seco tanto de la parte aérea como radicular de plantas de *Oryza sativa* var. NIR en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: *Rhizobium etli*, *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Oryza sativa*, crecimiento aéreo y radicular

ABSTRACT

The effect of the mixed inoculation of *Rhizobium etli* Rf 188-03 and *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc 391-01 on the aerial and root growth of *Oryza sativa* var. NIR was determined. For this, six treatments (T) and three replicates were performed, considering: T1 (inoculated with sterile distilled water), T2 (with chemical fertilizer), T3 (inoculated with bacterial suspension Rf R.etli 188-03), T4 (inoculated with bacterial suspension *B. yuanmingense* Rc 391-01), T5 (inoculated with bacterial suspension *R. etli* and *B. yuanmingense*), T6 (inoculated with bacterial suspension *R. etli*, *B. yuanmingense* also chemical fertilizer). It was worked with eight equidistant planted seedlings in a pot containing 5 kg of agricultural land. The bacterial suspensions on days 16 and 36 after transplantation was inoculated by adding 60 to 20 mL of bacterial each of the pots as described above treatments suspensions. Evaluations were made at 36 and 56 days after transplantation for it taking four floors at random from each pot and on the basis of: plant height, number of tillers, both fresh and dry weight of aerial and root part. It was determined that the mixed inoculation of *R. etli* Rf 188-03 and *B. yuanmingense* Rc 391-01 increased significantly ($p < 0.05$) plant height, number of tillers and both fresh and dry weight air as part of root plants *Oryza sativa* var. NIR, under laboratory conditions.

Keywords: *Rhizobium etli*, *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Oryza sativa*, aireal and root growth.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años la agricultura se ha caracterizado por el uso intensivo de fertilizantes químicos para mantener altas producciones, sin tener en cuenta que se ocasiona destrucción de los agroecosistemas, evidenciándose principalmente por la pérdida de productividad de los suelos, alteración de la calidad de los productos agrícolas, contaminación del ambiente y problemas de salud en la población^{1,2}.

En el Perú, el arroz es un cereal de gran importancia en la alimentación diaria del poblador peruano, es el cultivo con mayor área instalada en los valles del norte y de la ceja de selva donde se cultivan las variedades, Inti, Sican, Costa Norte, Taymi, San Antonio y NIR-I, y constituye el 10% del valor bruto de la producción agropecuaria³.

El crecimiento de un cultivo de arroz depende de factores tales como, el clima, el agua y los nutrientes accesibles a la planta⁴. El nitrógeno es el nutriente más importante, ya que casi todos los suelos son deficientes en este elemento⁵. Un suministro adecuado de nitrógeno incrementa el área foliar y la fotosíntesis por unidad de área, lo que da como resultado un mayor rendimiento en la cosecha, por el contrario, cuando el suelo es deficiente de este elemento el cultivo se desarrolla mal y las plantas de arroz pierden su color verde normal, hasta tornarse amarillentas^{6,7}.

La forma más conocida y empleada para suplir las necesidades de nitrógeno de los cultivos de arroz es la fertilización química, con el fin de promover el desarrollo rápido del cultivo, aumentando la altura y agrandando el tamaño de las hojas^{7,8}. Si bien ésta forma de fertilización representa una manera rápida de reponer el nitrógeno perdido, en el cultivo de arroz la eficiencia de los fertilizantes químicos aplicados es muy baja, lo cual ocasiona que se aplique más fertilizante del realmente necesario, causando un desmedro económico^{1,8}.

La fijación biológica de nitrógeno en los cultivos de arroz, sin embargo, puede ser potenciada mediante el uso de biofertilizantes, con el objetivo de incrementar el número de microorganismos en el medio y acelerar los procesos microbianos, aumentando de esta forma las cantidades de nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas⁸. Estos son preparados de microorganismos aplicados al suelo y/o planta con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos; los microorganismos utilizados en los biofertilizantes son clasificados dentro de dos grupos: uno que incluye a aquellos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico y mejorando la tolerancia al stress por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas, por parte de la planta, y otro, aquellos que son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos^{9,10}. Dentro del primer grupo están las llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) e incluye al género *Rhizobium*, que se caracteriza por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas.

La capacidad PGPR de *Rhizobium* ha sido estudiada porque la agricultura sustentable demanda mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno a través del uso de bacterias competitivas capaces de extender la ventaja de la simbiosis a otros cultivos no leguminosos^{11, 12}. Distintas especies de rizobios se han encontrado como endófitos de diversas plantas no leguminosas como el algodón y el maíz dulce, arroz asiático *Oryza sativa*, maíz, arroz africano *Oryza breviligulata*, cebada, trigo y canola. Rizobios y otros microbios pueden penetrar las raíces de las especies no leguminosas a través de las grietas o por los puntos de la aparición lateral de la raíz y establecerse en el xilema y en los espacios intercelulares de las plantas¹².

Varios autores han reportado la capacidad promotora del crecimiento de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en plantas no leguminosas¹³. En investigaciones de doble inoculación con *Azospirillum* y *Rhizobium* en leguminosas y no leguminosas se observó un incremento en el crecimiento, cuando se las comparó con la inoculación de cada una de ellas por separado¹⁴. Las asociaciones entre rizobios y plantas no leguminosas pueden mejorar el crecimiento de las plantas, aunque no se ha demostrado que sea mediante la fijación de nitrógeno, sino más bien debido a la producción de sideróforos, fitohormonas o solubilización de fosfatos^{12,15}.

El hecho de que la fijación biológica de nitrógeno esté basada en fuentes de energía renovable y libres de contaminación, y que pueda suplir en parte las necesidades de nitrógeno de cultivos como el

arroz, hace del uso de los biofertilizantes una buena alternativa para la agricultura en el Perú, pues con ellos se podrían reducir los costos de producción y disminuir el daño a la naturaleza; además, debido a que no se han efectuado este tipo de investigaciones en el Perú, se propuso una investigación orientada a evaluar el efecto de la inoculación mixta de *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Oryza sativa* var. NIR, mediante la determinación de seis variables agronómicas: altura de la planta, número de macollos, peso fresco y seco de la parte aérea y radicular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

- Semillas certificadas de *Oryza sativa* var. NIR proporcionadas por la Casa Agrícola Fertiagro S.A.C.
- *Rhizobium etli* Rf 188-03 y *Bradyrhizobium yuanmingense* Rc 391-01 proporcionados por el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo, los cuales fueron caracterizados molecularmente en el Laboratorio Mariano Tabusso de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Obtención y tratamiento del suelo agrícola.

Se utilizó 90 kg de suelo agrícola procedente de una parcela ubicada en el centro poblado Faclo Grande del Distrito de Guadalupe de la Provincia de Pacasmayo, en la que se cultivó arroz en años anteriores. Posteriormente el suelo fue tamizado y se le realizó un análisis físico-químico.

Germinación de las semillas.

Se trabajó con semillas certificadas de *Oryza sativa* var. NIR procedentes de la Casa Agrícola Fertiagro S.A.C. Inicialmente las semillas fueron cubiertas con tela de yute y sumergidas en una tina con agua por un periodo de 48 horas. Luego de éste periodo de remojo, las semillas fueron cubiertas con otra tela de yute durante otras 48 horas. Finalmente al quinto día se procedió a fijar dos semillas en cada hoyo de las almacigueras por un periodo de 25 días de iniciado el proceso de germinación.

Trasplante de plántulas.

Las plántulas obtenidas después del período de 25 días de iniciado el proceso de germinación, fueron trasplantadas en una cantidad de ocho plántulas por maceta, la cual contenía 5 kg de suelo agrícola. A continuación las plántulas fueron sometidas a riego continuo durante 6 días, para posteriormente realizar un período de secado de tres días y finalmente otro periodo de 6 días a riego moderado.

Preparación de inóculos de rizobios.

- **Reactivación y propagación del cultivo *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01.**
Para la reactivación de *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 a partir de cultivos puros, se procedió a sembrar en placas conteniendo Agar Extracto de Levadura Manitol Rojo de Congo (ELMARC) las cuales fueron incubadas a 28 °C por 4 días para el caso de *R. etli* y de 9 días de incubación para *B. yuanmingense*. Después se realizó la propagación de ambas bacterias en frascos Roux estériles conteniendo Agar extracto de levadura manitol (ELMA) incubados a 28 °C por 4 y 10 días respectivamente.
- **Preparación de la suspensión bacteriana de *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 y su posterior inoculación.**

El inoculante se preparó suspendiendo el crecimiento por separado, de los frascos Roux de cada una de las cepas en un volumen de 80 ml de agua destilada estéril hasta obtener una concentración final de aproximadamente 9×10^8 cél/mL comparado con el sistema de Mac Farland. Al mismo tiempo se procedió a sembrar por incorporación en Agar ELMARC para el recuento de UFC/mL. Las suspensiones bacterianas fueron inoculadas en los días 16 y 36 de realizado el trasplante, añadiendo 60 y 20 ml respectivamente, a cada una de las macetas según los tratamientos de estudio.

Tratamiento 1: inoculado con agua destilada estéril.

Tratamiento 2: con fertilizante químico (úrea y fosfato diamónico).

Tratamiento 3: inoculado con suspensión bacteriana de *R. etli* Rf 188-03.

Tratamiento 4: inoculado con suspensión bacteriana de *B. yuanmingense* Rc 391-01.

Tratamiento 5: inoculado con suspensión bacteriana de *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01.

Tratamiento 6: inoculado con suspensión bacteriana de *R. etli* Rf 188-03, *B. yuanmingense* Rc 391-01 y fertilizante químico.

Después de realizado cada tratamiento, se llevó a cabo un período de secado de 2 días y luego un riego moderado durante 6 días.

Fertilización.

La dosis que se utilizó para la fertilización fue de 0,402 g de úrea y fosfato diamónico por maceta, y se aplicó en forma de disolución acuosa. La fertilización se fraccionó en dos partes, en el día 16 y 36 después del trasplante, donde se le administró al Tratamiento 2 y al Tratamiento 6.

Evaluación del efecto de la inoculación mixta de *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Oryza sativa* var. NIR.

Se realizó evaluando seis variables agronómicas: altura de la planta, número de macollos, peso fresco y seco de la parte aérea y radicular en los días 36 y 56 de realizado el trasplante.

- **Medición de la altura de la planta**

Se midió en centímetros, considerando la medición desde la raíz hasta la yema terminal más sobresaliente.

- **Determinación del número de macollo**

Se cuantificó el número de macollos.

- **Determinación del peso Fresco de parte aérea y radicular**

Se cortó a nivel del suelo el sistema aéreo de las plantas y se determinó su peso fresco.

Posteriormente se extrajo cuidadosamente las raíces y se lavaron con abundantemente agua de caño para eliminar los restos de suelo y se determinó el peso fresco empleando una balanza analítica.

- **Determinación del peso seco de parte aérea y radicular**

Para determinar el peso seco de las muestras éstas fueron introducidas en bolsas de papel y secadas a 80 °C por 48 horas en el caso del follaje, y a 100 °C por 24 horas en el caso de las raíces.

Transcurrido el tiempo de secado las muestras se pesaron en una balanza analítica.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las seis variables agronómicas como altura de la planta, número de macollos, peso fresco y seco tanto de la parte aérea y radicular fueron procesados mediante análisis de varianza. En los casos donde se encontró diferencia significativa se realizó la prueba de Tukey para determinar cuáles de los tratamientos fueron diferentes con respecto al control.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra un incremento de la altura de las plantas de *Oryza sativa* var. NIR que fueron inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en comparación al tratamiento con agua destilada, a los tratamientos que fueron inoculados con una sola bacteria y al tratamiento con fertilizante. Además se observa una menor altura de las plantas inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 en comparación al tratamiento con fertilizante tanto a los 36 como a los 56 días de evaluación en condiciones de laboratorio.

En la figura 2 se observa un incremento en el número de macollos de las plantas de *Oryza sativa* var. NIR inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en comparación al tratamiento con agua destilada, a los tratamientos que fueron inoculados con una sola bacteria y con respecto al tratamiento con fertilizante tanto a los 36 como a los 56 días de evaluación en condiciones de laboratorio.

En la figura 3 el peso fresco (g) promedio de la parte aérea de las plantas de *Oryza sativa* var. NIR, fue mayor en las plantas que fueron inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en comparación al tratamiento con agua destilada, a los tratamientos inoculados con una sola bacteria y con respecto al tratamiento con fertilizante. Además se muestra un menor peso fresco en las plantas inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 a comparación de las plantas tratadas con fertilizante tanto a los 36 y 56 días de evaluación en condiciones de laboratorio.

En la figura 4 el peso fresco (g) promedio de la parte radicular de las plantas de *Oryza sativa* var. NIR en los ensayos evaluados a los 36 y 56 días de realizado el trasplante, fue mayor en las plantas que fueron inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en comparación al tratamiento con agua destilada, a los tratamientos inoculados con una sola bacteria y con respecto al

tratamiento con fertilizante. Además se muestra un menor peso fresco radicular en las plantas inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 a comparación de las plantas tratadas con fertilizante tanto a los 36 y 56 días de evaluación en condiciones de laboratorio.

En la figura 5 el peso seco (g) promedio de la parte aérea de las plantas de *Oryza sativa* var. NIR en los ensayos evaluados a los 36 y 56 días de realizado el trasplante, fue mayor en las plantas que fueron inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en comparación al tratamiento con agua destilada, a los tratamientos inoculados con una sola bacteria y con respecto al tratamiento con fertilizante.

En la figura 6 el peso seco (g) promedio de la parte radicular de las plantas de *Oryza sativa* var. NIR, en los ensayos evaluados a los 36 y 56 días de realizado el trasplante, fue mayor en las plantas que fueron inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en comparación al tratamiento con agua destilada, a los tratamientos inoculados con una sola bacteria y con respecto al tratamiento con fertilizante.

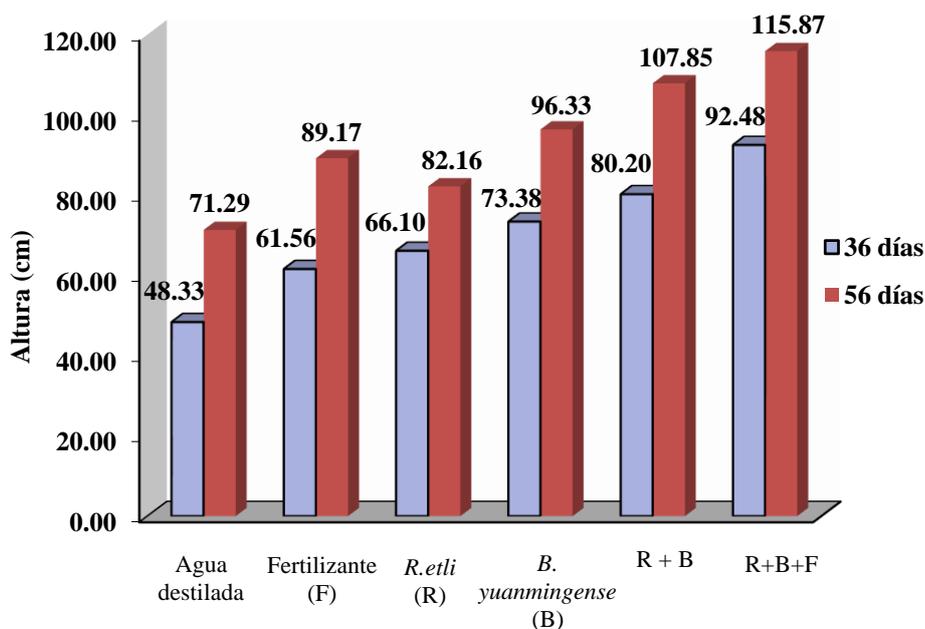


Fig. 1. Altura promedio de plantas de *Oryza sativa* var. NIR a los 36 y 56 días de realizado el trasplante y después de ser inoculadas con *Rhizobium etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en relación a los demás tratamientos en condiciones de laboratorio (* $p < 0.05$ a los 36 días, * $p < 0.05$ a los 56 días)

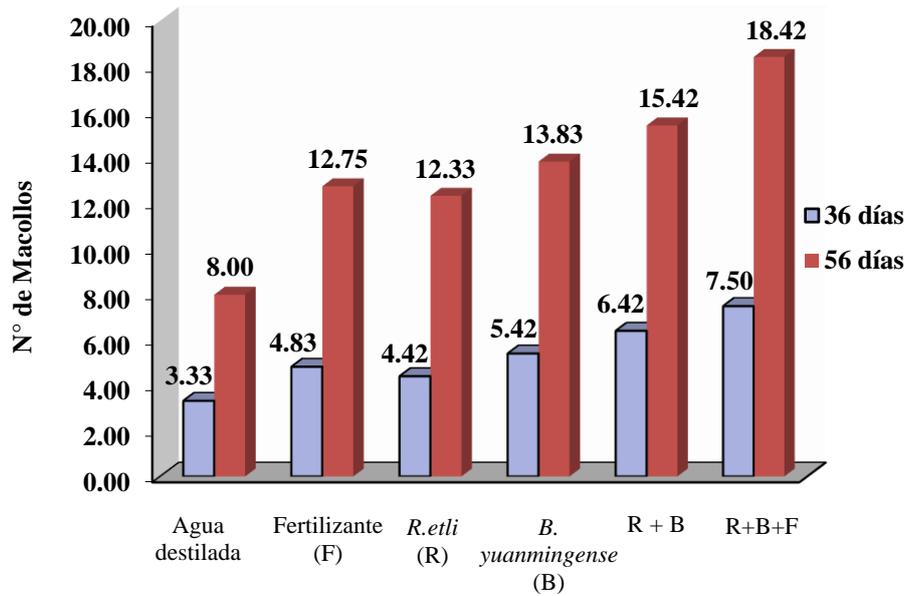


Fig. 2. Promedio del número de macollos de plantas de *Oryza sativa* var. NIR a los 36 y 56 días de realizado el trasplante y después de ser inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en relación a los demás tratamientos en condiciones de laboratorio (* $p < 0.05$ a los 36 días, * $p < 0.05$ a los 56 días).

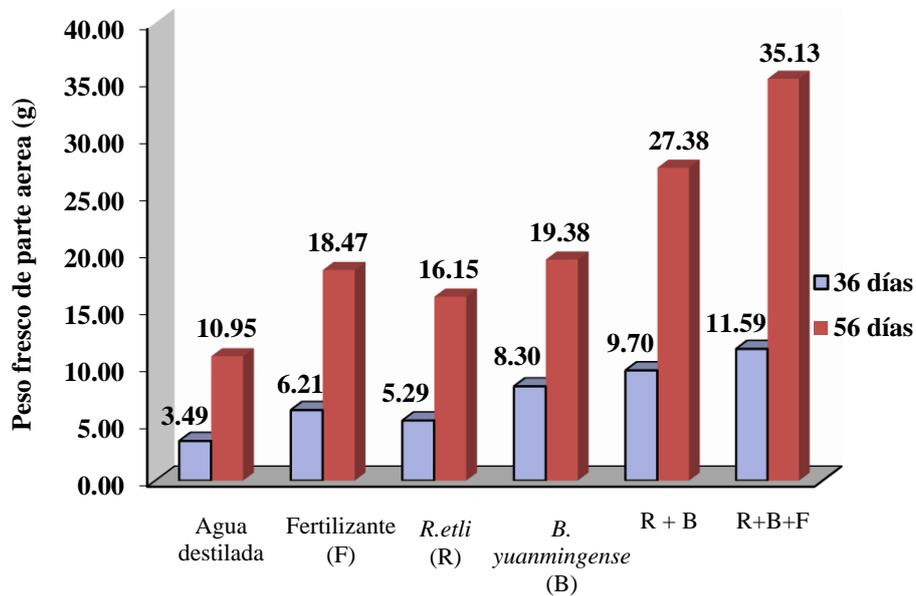


Fig. 3. Peso fresco (g) promedio de la parte aérea de plantas de *Oryza sativa* var. NIR a los 36 y 56 días de realizado el trasplante y después de ser inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en relación a los demás tratamientos en condiciones de laboratorio (* $p < 0.05$ a los 36 días, * $p < 0.05$ a los 56 días).

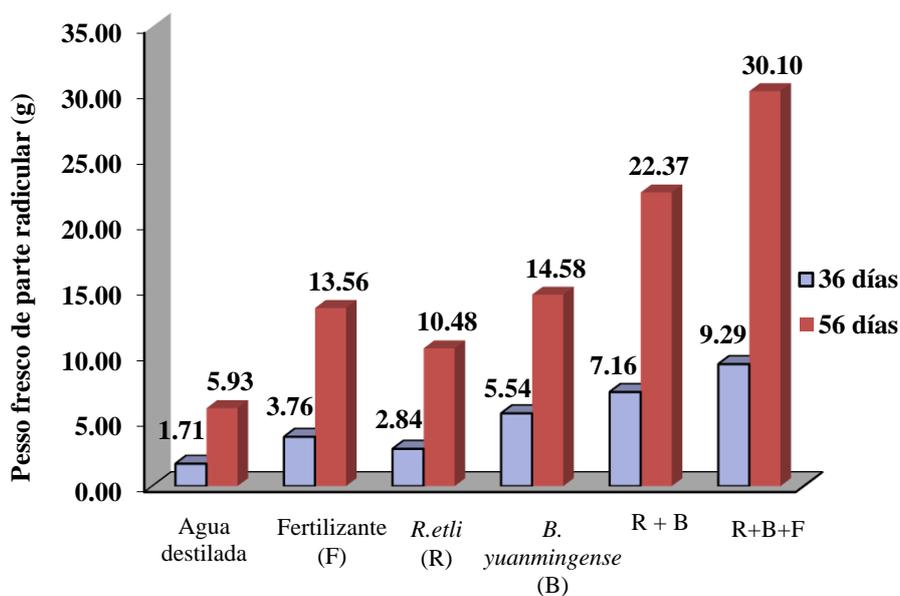


Fig. 4. Peso fresco (g) promedio de la parte radicular de plantas de *Oryza sativa* var. NIR a los 36 y 56 días de realizado el trasplante y después de ser inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en relación a los demás tratamientos en condiciones de laboratorio (* $p < 0.05$ a los 36 días, * $p < 0.05$ a los 56 días).

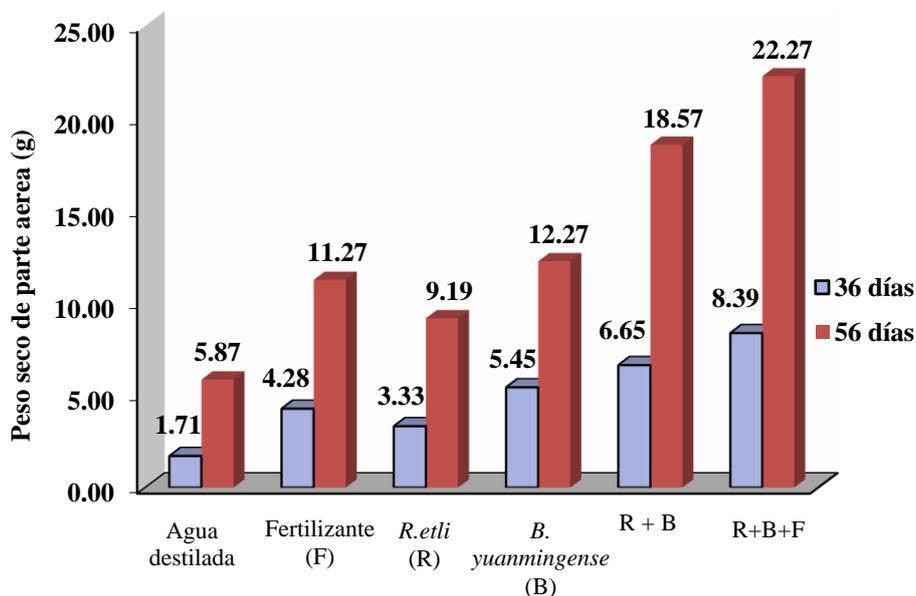


Fig. 5. Peso seco (g) promedio de la parte aérea de plantas de *Oryza sativa* var. NIR a los 36 y 56 días de realizado el trasplante y después de ser inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en relación a los demás tratamientos en condiciones de laboratorio (* $p < 0.05$ a los 36 días, * $p < 0.05$ a los 56 días).

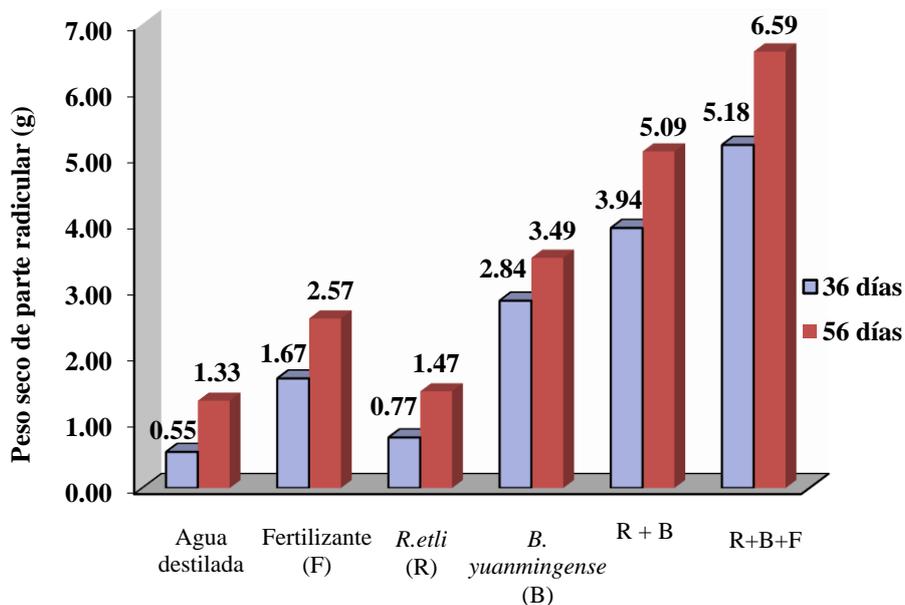


Fig. 6. Peso seco (g) promedio de la parte radicular de plantas de *Oryza sativa* var. NIR a los 36 y 56 días de realizado el trasplante y después de ser inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en relación a los demás tratamientos en condiciones de laboratorio (* $p < 0.05$ a los 36 días, * $p < 0.05$ a los 56 días).

DISCUSIÓN

Las plantas de *Oryza sativa* “arroz” var. NIR inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 incrementaron significativamente su altura en comparación a las plantas inoculadas con agua destilada estéril y a las que fueron tratadas con fertilizante. La altura fue uno de los parámetros morfológicos que expresó mayor claridad el efecto del ensayo y que puede visualizarse a simple vista, con 80.20 y 107.85 cm a los 36 y 56 días de realizado el trasplante respectivamente (Figura 1). Esto se debió probablemente a la existencia de un sinergismo entre las plantas de arroz y las bacterias inoculadas, permitiendo la fijación biológica de N_2 y su posterior absorción por parte de las plantas. Según algunos autores, los rizobios, entre otros diazotrofos, son capaces de producir vitaminas hidrosolubles del grupo B, lo cual es también un factor que estimula el factor de crecimiento de las plantas, específicamente en longitud del tallo, producción de materia seca, así como la capacidad de absorción de nutrientes¹⁶.

En cambio, el menor efecto de la inoculación independiente de ambas bacterias, pudo deberse a que las cepas no encontraron el medio adecuado en la rizófora, ya que, para que los microorganismos puedan asociarse íntimamente con las raíces, tienen que escapar de los mecanismos de defensa de la planta y encontrar condiciones nutritivas y ambientales adecuadas para su crecimiento. La dinámica de colonización de las raíces por las bacterias inoculadas es esencial para su establecimiento efectivo, siendo un factor crítico para la estimulación del crecimiento vegetal.

Por otro lado el tratamiento 6 que es la asociación de ambas bacterias más urea y fosfato diamónico presenta una mayor altura de la planta con 92.48 y 115.87 cm a los 36 y 56 días respectivamente de realizado el trasplante, en comparación a los demás tratamientos (Fig. 1), pues se piensa que por la enzima ureasa, una enzima que abunda en el suelo, aunque la enzima proveniente de estas fuentes se degrada rápidamente por la acción microbiana y es *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 quienes desempeñan el papel de fijar el nitrógeno de la atmósfera, y además utilizaría la urea inoculada como fertilizante y son capaces de llevar a cabo esta hidrólisis para la producción de amonio, la cual sería absorbida por la planta.

Otras características que pueden favorecer el crecimiento de estas plantas es la producción de sideróforos, los que tienen afinidad por el hierro, secuestrando a este elemento, convirtiéndolo en factor limitante para grupos de microorganismos patógenos, también producen sustancias que inducen la resistencia sistémica en algunas plantas; jugando un papel importante para el control biológico de algunas enfermedades en las plantas.

Las plantas tratadas con las bacterias *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 presentaron un mayor macollamiento con un número promedio de 15.42 a los 56 días (de realizado el trasplante) con respecto a las plantas inoculadas con agua destilada (Fig. 2), esto se puede deber a que la inoculación mixta de ambas bacterias estimula una mayor absorción de nitrógeno en forma amónica especialmente en los estados tempranos de crecimiento, ya que los productos de la fotosíntesis son preferencialmente usados para síntesis de proteínas, producción de vainas de las hojas y de macollas. Además existe una correlación positiva entre la cantidad de nitrógeno absorbido en los estados tempranos de crecimiento y el número de macollas efectivas por m² [17].

Por otra parte un óptimo contenido de nitrógeno desde esta etapa hasta la formación de panícula puede asegurar una adecuada densidad de panículas fértiles al momento de floración, lo que conduciría a una mayor productividad.

Así mismo al evaluar el peso fresco de la parte aérea y radicular, se encontró un mayor incremento en el tratamiento con *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 a los 36 y 56 días respectivamente (de realizado el trasplante) con respecto a las plantas inoculadas con agua destilada y sobre las plantas que fueron inoculadas con una sola bacteria (Figs. 3 y 4). El agua es importante cuantitativamente ya que ella constituye el 80-90 % del peso fresco de muchas plantas herbáceas y más del 50% del peso fresco de las plantas leñosas. El agua es parte importante del protoplasma, como también de las proteínas y moléculas de lípidos; una reducción en el contenido de agua en estos componentes de la célula, por debajo de un nivel crítico causa cambios en la estructura celular y finalmente la muerte. Además permite que ocurra la translocación de los elementos disueltos, es un solvente en el cual gases, minerales y otros solutos entran a las plantas¹⁸.

Con respecto a los resultados obtenidos del peso seco de la parte aérea y radicular de las plantas inoculadas con ambas cepas de *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01, se observó que juntas promovieron un mayor crecimiento significativo sobre las plantas tratadas con agua destilada y sobre las plantas que fueron inoculadas con una sola bacteria a los 56 días de realizado el trasplante (Figs. 5 y 6). Esto puede deberse a que tanto *R. etli* como *B. yuanmingense* producen fitohormonas como las auxinas, las cuales aumentan el número de raíces laterales, al igual que el tamaño de las mismas¹⁹. También cabe destacar que hay estudios sobre *B. yuanmingense* para producir AAC diaminasa, compuesto que reduce el nivel de etileno en las raíces de las plantas, incrementando de esta manera la longitud y el crecimiento de raíces²⁰. Además, el ácido indol acético (AIA), las giberelinas y citoquinas producidas por *R. etli* y *B. yuanmingense* presentes ya sea en la rizosfera o en los tejidos de las plantas, estimulan un mayor desarrollo de la raíz y una mejor capacidad de absorción de los nutrientes por parte de las raíces resultando beneficioso para las plantas de arroz.

El aumento del peso seco de la parte aérea en las plantas inoculadas con *R. etli* Rf 188-03 a comparación de las plantas inoculadas con agua destilada, podría deberse a que *R. etli* podría ser capaz de disolver los fosfatos del suelo con lo cual aumentó la producción de la materia seca de la planta aunque también mecanismos como la producción de sideróforos²¹ y la producción del AIA estarían implicados. Otras investigaciones demostraron incrementos de 42% de la materia seca de la parte aérea y de 49% de la materia seca de raíz en plantas no leguminosas inoculadas con *R. etli*. Dichos investigadores mencionan que el efecto benéfico de *R. etli* en plantas no leguminosas puede deberse a los mecanismos descritos anteriormente²².

Si bien *R. etli* Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 no son bacterias específicas para *Oryza sativa* "arroz" var. NIR, estudios han demostrado que los rizobios no solo colonizan la superficie de las raíces sino también las células lisadas de la corteza de la raíz y el espacio intercelular del centro de las células cilindro de las raíces²³. Es así que nuestros resultados nos demuestran que existe una respuesta positiva y un mayor rendimiento en la aplicación asociativa de ambas bacterias. Esto resulta importante para reducir los costos de producción y disminuir el daño a la naturaleza, además de poder incrementar los rendimientos sin la necesidad de incorporar fertilizantes en abundancia que causan un negativo impacto sobre la salud y el medio ambiente.

CONCLUSIÓN

- La inoculación mixta de *R. etli* Rf 188 - 03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 tiene mayor efecto sobre el crecimiento aéreo y radicular de las plantas de *Oryza sativa* var. NIR en comparación a las plantas tratadas con agua destilada estéril, con fertilizante químico y con la inoculación independiente de *R. etli* Rc Rf 188-03 y *B. yuanmingense* Rc 391-01 en condiciones de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rojas J, Moreno N. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). Rev Colomb Biotecnol 2008; 10(2): 50-62.
2. Obando D M. Respuesta fisiológica del frijol caupí (*Vigna guiculata* (L.) Walp) a la coinoculación de bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* y *Rhizobium* en suelos del Departamento del Cesar (Colombia). Tesis de Magister en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, 2012.
3. Portal de ministerio de agricultura y riego, Lima: Ministerio de Agricultura y Riego; 2013. www.minag.gob.pe/portal/sector-agrario/agricola/cultivos-de-importancia-nacional/arroz/producci%C3%B3n?start=7
4. Rariz G, Ferrando L, Fernández A. Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en plantas de arroz cultivadas en diferentes suelos. 7mo Congreso de Medio Ambiente; 2012 mayo 22-24; La Plata. Argentina: Universidad de la República (UdelaR); 2012.
5. Guía de estudio. Morfología de la Planta de Arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT, Cali, Colombia Abril 2005.
6. Prochazka G. Reseña de la producción y comercialización del arroz en el Perú y propuesta metodológica para evaluar pérdidas poscosechas. Publicación Miscelánea N° A3/PE-88-011 ISSN-0534-0591. Lima: Perú; 1988.
7. Hernández W I. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum*, y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en plantas de *Oryza sativa* (arroz). Informe de Bachiller en Ingeniería y Biotecnología. Universidad de Costa Rica. 2010.
8. García F, Muñoz H, Carreño C, Mendoza G. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. Scientia Agropecuaria 2010; 1(2): 107-116.
9. Armenta A, García C, Camacho J, Apodaca M, Gerardo L et al. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai 2010; 6(1): 51-56.
10. Díaz P, Márquez E. Validación de los biofertilizantes *Azotobacter*, *Rhizobium* y fosforina en cuatro sistemas de cultivos en condiciones de producción. Revista CIGET Pinar del Río 2011; 13(2).
11. Santillana N, Arellano C, Zuñiga D. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* miller). Redalyc 2005; 4(1-2): 47-51.
12. Mhadhbi H, Jebara M, Limam F, Elarbi A. Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 2004; 42:717-722.
13. Santillana N, Zúñiga D, Arellano C. Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagónico de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*. Agrociencia Uruguay 2012; 16 (2).
14. Sotelo C, Iglesias M, Morzant E. Inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* en el cultivo de trigo (*Triticumaestivum*). UNNE, 2006.
15. Fugita K, Ofusu-Budu K, Ogata S. Biological nitrogen fixation in mixed legume-cereal cropping systems. Plant and Soil 1992; 141: 155 - 175.
16. Bécquer C, Nápoles J, Álvarez O, Ramos Y, Quintana M, Galdo Y. Respuesta de diferentes variedades de cereales a la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. Rev Mex Cienc Agríc 2012; 3(1).
17. Rios DK, Britto R, Delgado H. Evaluación del rendimiento y sus componentes en genotipos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) Diferenciados por su tipo de espiga y grano. Rev UDCA Act & Div Cient , 2011; 14(2) 55 – 63.
18. Azcon J, Talon M. Fisiología y bioquímica vegetal. Interamericana Mac Grawillill. Madrid. 1993.
19. Ahmad I, Pichtel J, Hayat S. Plant-Bacteria Interactions. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008.

20. Esquivel R, Gavilanes M, Cruz R, Huante P. Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias. *Rev. Fitotec Mex* 2013; 36 (3): 251 – 258.
21. Guerinot ML. Iron uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbioses. *Plant Soil* 1991; 130: 199–209.
22. Gutierrez A, Martinez E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J Biotechnol* 2001; 91: 117-126.
23. Bécquer CJ, Salas B, Archambault D, Slaski J, Anyia A. Inoculación de trigo (*Triticum aestivum*, L.) con rizobios adaptados a ecosistemas ganaderos de Alberta, Canadá *Rev Pastos y Forrajes* 2007; 30(1): 1-4.



Efecto de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* sobre *Planococcus citri* en condiciones de laboratorio

Lecanicillium lecanii and *Beauveria bassiana* effect on *Planococcus citri* under laboratory conditions

Karen L. Avalos Vela y Juan Wilson-Kugg

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 de *Lecanicillium lecanii* (Zimm) y *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill sobre *Planococcus citri* (Risso) en condiciones de laboratorio. Se emplearon hojas de limón que fueron infestadas con 20 ninfas de *P. citri* y luego fueron inoculados con *L. lecanii* a las dosis de 10^6 y 10^7 conidios/mL con ayuda de un aspersor manual, procediendo de la misma forma con *B. bassiana*. Los tratamientos fueron distribuidos aleatoriamente. La muerte de las ninfas de *P. citri* se produjo a las 72 horas después de la aplicación con los siguientes porcentajes de mortandad: 81.5 y 80.0% con *L. lecanii*, y 78.3 y 85.0% con *B. bassiana*, a las concentraciones de 10^6 y 10^7 conidios/mL, respectivamente (no existe diferencia significativa con los demás tratamientos), aunque sí ($p < 0,05$) con el control que presentó 10.0% de mortandad.

Palabras clave: *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Planococcus citri*, % de mortandad

ABSTRACT

Lecanicillium lecanii (Zimm) and *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill effect on *Planococcus citri* (Risso) under laboratory conditions was evaluated. Lemon leaves were infested with 20 *P. citri* nymphs AND then inoculated with *L. lecanii* at doses of 10^6 and 10^7 conidia/mL using a hand sprayer, proceeding in the same way with *B. bassiana* is used. The treatments were randomized. The death of *P. citri* nymphs occurred 72 hours after application with mortality following percentages: 81.5 and 80.0% with *L. lecanii*, and 78.3 and 85.0% with *B. bassiana*, at concentrations of 10^6 and 10^7 conidia/mL, respectively (there is no significant difference with other treatments), although ($p < 0.05$) with the control showed 10.0% mortality.

Keywords: *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Planococcus citri*, % mortality

INTRODUCCIÓN

Los insectos plaga producen graves daños en la agricultura y, dentro de ellos, *Planococcus citri*, conocida como cochinilla algodonosa o chanchito blanco, es considerada como una de las más perjudiciales en particular para los cultivos de vid, cítricos y plantas ornamentales, no solo por ser fitófago sino también por su capacidad vectorial de virus fitopatógenos^{1,2,3,4}.

Cuando la hembra de *P. citri* es fecundada oviposita cientos de huevos en una cubierta algodonosa denominada ovisaco, de donde emergen las ninfas que se alimentan de las raíces, hojas y frutos del vegetal y excretan una mielecilla que favorece el desarrollo de fumagina lo que resta valor comercial a los productos; dependiendo de las condiciones ambientales, puede presentar hasta 10 generaciones al año⁵.

El uso de productos químicos, tales como, buprofezin, pyriproxyfen, flonicamid, acetamiprid, dinotefuran, clotianidina y kinoprene representa una de las principales estrategias de control de la cochinilla algodonosa; sin embargo, éstos no respetan los controladores naturales, factor importante de la regulación natural de esta plaga^{6,7}. Por ello, y en un intento por resarcir este daño, se realizan liberaciones inundativas de *Leptomastix dactylopii*⁷, *Spalgis epius*⁸, *Cryptolaemus montrouzieri*⁹, *Leptomastidea abnormis*¹⁰ y *Sympherobius barberi*¹¹, siendo los tres últimos los controladores más comúnmente usados. Al mismo tiempo, se han utilizado a los nematodos *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis bacteriophora*¹², feromonas sexuales^{13,14} y a los hongos entomopatógenos *Isaria farinosa*^{15,16} y *Metarhizium anisopliae*¹⁷.

En este contexto, la utilización de los hongos entomopatógenos en la agricultura ha ido en aumento en los últimos años debido al gran potencial que tienen en el manejo de plagas, representando una alternativa eficiente al uso de insecticidas químicos, considerados altamente nocivos para la salud del hombre y los ecosistemas^{18,19,20}. En efecto, se ha registrado que *Lecanicillium lecanii* controla veinte especies pertenecen a la familia Coccidae^{21,22,23}, diez especies a la familia Diaspididae²⁴, diez especies a la familia Pseudococcidae^{25,26}, una especie a la familia Margarodidae²⁷ y una especie a la familia Phoenicococcidae²⁸ y que *Beauveria bassiana* a insectos de los Ordenes Lepidoptera (Pyrilidae) y Coleoptera (Curculionidae, Chrysomelidae y Scolytidae)^{29,30}.

En este informe se presentan los resultados de una investigación orientada a determinar el efecto de *L. lecanii* (Zimm) y *B. bassiana* (Bals) Vuill. sobre *P. citri* (Risso), en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

- Cultivo puro de *Lecanicillium lecanii* proporcionado por el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.
- Cultivo puro de *Beauveria bassiana* proporcionado por el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo.
- Un núcleo de *Planococcus citri* (conformado por 1g de las colonias del insecto) proporcionado por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (SENASA).

Crianza de adultos y obtención de ninfas de *Planococcus citri*:

Se obtuvieron las ninfas del núcleo otorgado por SENASA- Lima luego se colocaron en calabacines de zapallito italiano (*Cucurbita pepo* var. Zucchini grey) previamente lavados y desinfectados. Los calabacines infestados se colocaron en una caja de cartón y fueron mantenidos en el laboratorio, monitoreando la temperatura y la humedad relativa. Los especímenes de *P. citri* fueron puestos en cuarentena realizando cambios periódicos de alimento (calabacines) para evitar la contaminación de la colonia por agentes no deseados como parasitoides y hongos.

Reactivación de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana*:

Con el fin de recuperar la actividad metabólica de ambos hongos y se obtener cultivo puro en mayor cantidad se utilizó Agar Sabouraud (ASb), se extrajo micelio del cultivo inicial, se sembró por puntura y se incubó a 25 ± 0.1 °C.

Propagación, estandarización del inóculo e inoculación

Se preparó una suspensión de *L. lecanii* en solución estéril de Tween 80 al 0.1%, la cual se utilizó para propagar el hongo ASb inclinado (contenido en frascos planos), se utilizó 0.1 ml de la suspensión del hongo, se incubó a 25 ± 0.1 °C hasta la formación de esporas. Posteriormente, se les agregó una solución acuosa de Tween 80 al 0.1%, para obtener las esporas. La suspensión de esporas fue colocada en un matraz estéril. Luego se estandarizó en cámara de Neubauer® a las concentraciones de 10^6 y 10^7 las que sirvieron de inóculo. Los mismos pasos se siguieron para preparar el inóculo de *B. bassiana*.

La muestra estuvo constituida por 300 de ninfas de *P.citri*, de las cuales 4 grupos de 20 ninfas fueron ejemplares problema y otro de grupo de 20 ninfas fueron ejemplares testigos, realizando un total de 3 repeticiones. A los ejemplares problema se les inoculó por aspersión una suspensión de esporas en Tween 80 al 0,1%, siendo la concentraciones utilizadas 10^6 y 10^7 esporas/ml de *L. lecanii*. Se siguieron los mismos pasos para el caso de *B. bassiana*. Mientras que, los ejemplares testigo se les inoculó una solución acuosa de Tween 80 al 0,1%. Para este procedimiento se realizó la infestación de hojas de limón con *P. citri* que fue criado en calabacines, estas hojas fueron colocadas en recipientes de plástico adaptado para permitir el intercambio gaseoso y evitar la fuga de los especímenes.

Evaluación de la actividad entomopatogena

Después de la inoculación se evaluó cada 24 horas la aparición de síntomas y/o signos de la infección micótica que presentaron las ninfas problema en comparación a los testigos. La observación de cada una de las ninfas y el posible progreso de la infección micótica se realizó diariamente anotando la aparición de síntomas como pérdida de apetito, parálisis, pigmentaciones, u otros, que se produjeron durante el ensayo, siendo el tiempo máximo de observación 14 días (tanto problema como testigo).

Recuperación e identificación de *L. lecanii* y *B. bassiana*

Este procedimiento se realizó con la finalidad de corroborar la causa de la muerte de las ninfas de *P. citri* y consistió en colocar los especímenes muertos en cámara húmeda e incubados a temperatura ambiental, una vez emergido el hongo se extrajo con ayuda de un asa microbiológica y se sembró en un tubo de ensayo con ASb para posteriormente realizar un microcultivo e identificar las estructuras características de *L. lecanii* y *B. bassiana*

Análisis de datos

Los datos obtenidos se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS v.20, aplicando un análisis de varianza simple para comparar las medias de mortandad producida por el hongo evaluado; aplicándose, un análisis postanova mediante la prueba de Tukey.

RESULTADOS

Se observaron diversos síntomas y signos, luego la muerte, en las ninfas de *P. citri* luego que fueron inoculadas con *L. lecanii* y *B. bassiana* a las dos concentraciones de conidias prescritas (Tabla 1, Fig. 1). Se encontró, asimismo, diferencia significativa entre control (10%) y los tratamientos, mas no entre los tratamientos (Fig. 2).

Tabla 1. Síntomas y/o signos observados en ninfas de *Planococcus citri* inoculadas con dos concentraciones de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana*

Síntomas y/o signos observados	Conidios/mL				
	control	<i>Lecanicillium lecanii</i>		<i>Beauveria bassiana</i>	
	0*	10^6	10^7	10^6	10^7
Pérdida del apetito	-	+	+	+	+
Escasa movilidad	-	+	+	+	+
Oscurecimiento (melanización)	-	+	+	+	+
Muerte	+	+	+	+	+
Aparición de micelio	-	+	+	+	+
Momificación	-	+	+	+	+

(*) Representa al control, (-) Sin presencia, (+) Presencia

DISCUSIÓN

Los síntomas observados en las ninfas de *P. citri* son debido a que los hongos entomopatógenos, a diferencia de otros agentes de control, no necesitan ser ingeridos por el insecto, pudiendo ocurrir la infección por contacto y adhesión de las esporas a las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos³¹.



Fig. 1. Ninfas de *Planococcus citri* inoculadas con *Lecanicillium lecanii* (Panel izquierdo): a, control; b, muerta con oscurecimiento en la parte ventral; c, momificada y d, cubierta con micelio y con *Beauveria bassiana* (panel derecho): a, control; b, momificada y c, cubierta con micelio.

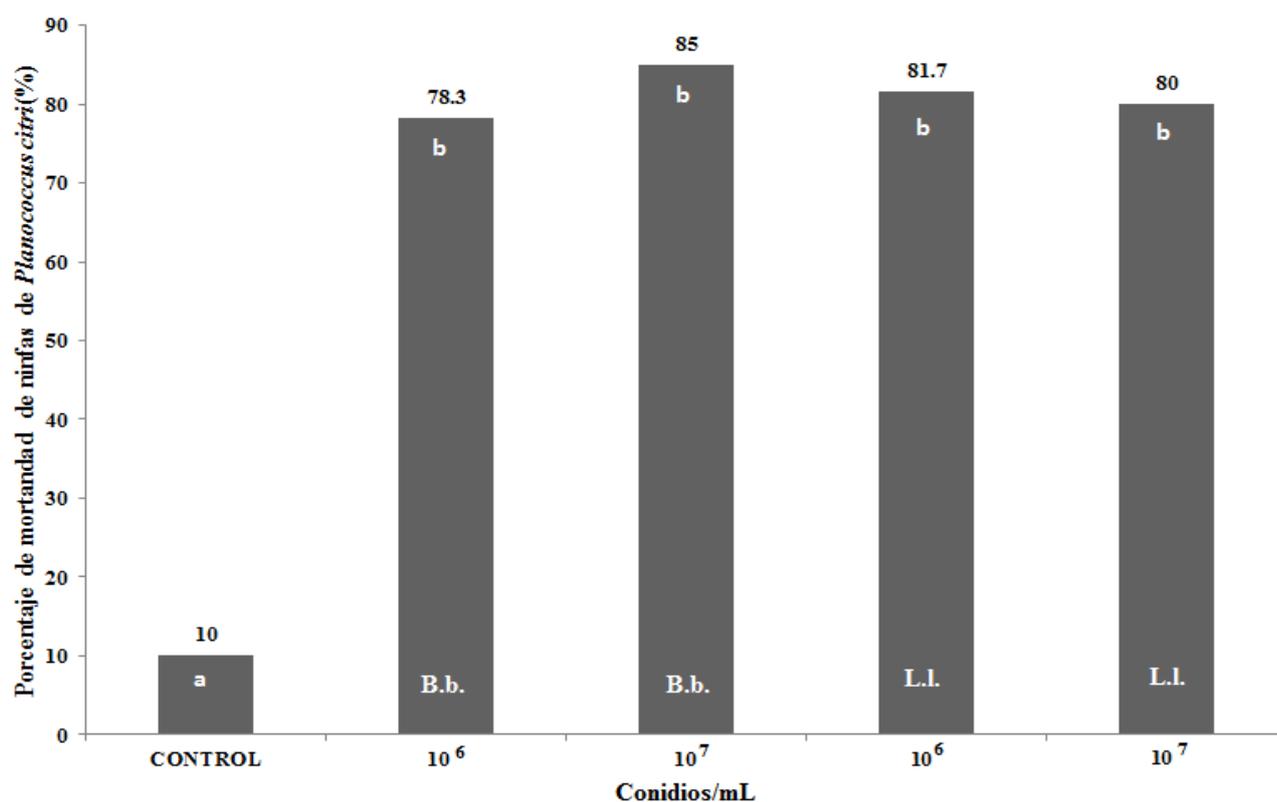


Fig. 2. Porcentaje de mortandad de ninfas de *Planococcus citri* inoculadas con dos concentraciones de *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* a las 72 horas post-inoculación. (B.b.: *Beauveria bassiana*; L.l.: *Lecanicillium lecanii*; a: $p < 0.05$, existe diferencia significativa, b: $p > 0.05$, no existe diferencia significativa).

Es así que, la adhesión de los conidios de los hongos entomopatógenos a la cutícula del hospedero es la etapa inicial del proceso patogénico e incluye eventos tanto pasivos como activos³², lo cual ha sugerido que iones divalentes como el Ca^{+2} y el Mg^{+2} reducen las fuerzas de repulsión de la electrostática de la superficie del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión del complejo pared celular fúngica-cutícula, creando condiciones favorables para el establecimiento de la espora y la subsecuente invasión del hospedero³¹.

Luego de la adhesión viene la germinación de la espora que se inicia con el hinchamiento de la misma, siendo favorecido por una humedad alta; así mismo la hidratación de la espora es favorecida por la acción anti-deseccante de su cubierta mucilaginoso que presenta un alto contenido de aminopeptidasas e hidrofobinas, las cuales favorecen la acción de las enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto., que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas secretadas por el sistema inmune del insecto; luego es estimulada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto³¹.

Tanto *L. lecanii* como *B. bassiana* logran penetrar la cutícula de las ninfas de *P. citri* debido a que producen enzimas tales como lipasas, proteasas y quitinasas, utilizando una combinación de estas para penetrar en la cutícula^{33,34} y acceder al hemocele del hospedero que es rico en nutrientes³², lo cual produce disturbios en el organismo del insecto (Tabla 1).

Durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrimentos pero otros pueden inhibir su crecimiento, sin embargo, los hongos desarrollan una serie de actividades que les permiten evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomodulatorias o toxinas fúngicas^{35,36}. Después de la penetración de las hifas, éstas se diseminan vía hemolinfa, producen blastosporas y cuerpos filamentosos de hifas que invaden el sistema inmune del hospedero multiplicándose rápidamente en los tejidos.

Cabe resaltar la producción de micotoxinas dentro de las actividades que realizan los hongos entomopatógenos, *L. lecanii* y *B. bassiana*, las cuales son metabolitos fúngicos secundarios que hacen parte de los mecanismos de infección y pueden dar lugar a una respuesta toxica en diferentes organismos. Ellos son producidos por una serie de reacciones consecutivas, las cuales son catalizadas por enzimas intermediarias del metabolismo primario³⁷.

Además se conoce que *B. bassiana* produce beauvericinas, beauverolidos y destruxinas, la actividad insecticida de la beauvericina fue descubierto por primera vez por Hamill et al.³⁸ quienes afirman que es el compuesto activo de *B. bassiana* enfrentándolo a *Artimia salina*; posteriormente, fue investigado en *Calliphora erythrocephala*, *Aedes aegypti*, *Lygus* spp., *Spodoptera frugiperda* y *Schizaphis graminum*^{39,40,41,42}. A pesar de que la beauvericina por si sola tiene una fuerte actividad insecticida contra un amplio espectro de plagas, no se ha aplicado como tal debido a, el movimiento de los insectos y a que al aplicar el hongo entomopatógeno este puede propagarse en el cuerpo del insectos y se extenderse ampliamente⁴². A pesar de las similitudes entre las estructuras químicas de beauvericina y otras micotoxinas hexadepsipeptide cíclicos³⁹ esta puede tener un mecanismo de acción único.

B. bassiana también secreta otros compuestos conocidos como beauverolidos L que poseen una fuerte acción inmunomoduladora pero no un efecto insecticida⁴³, por otro lado también están las destruxinas que inducen parálisis flácida y la contracción muscular visceral en los insectos; estos efectos citotóxicos en las células epiteliales probablemente sea porque envuelven los canales Ca^{2+} - ATPasa tipo vacuolar^{44,45}.

En cambio *L. lecanii* secreta una serie de metabolitos secundarios los cuales se constituyen toxinas que producen una reducción del potencial de progenie y disuaden la actividad alimenticia en *Bemisia tabaci*⁴⁶, insecto que posee un hábito alimenticio similar al de *P. citri*, lo cual sugiere un reacción similar.

Las toxinas que estos organismos producen cumplen una función muy importante dentro de los mecanismos de infección de los hongos entomopatógenos³⁷ en la lucha por evadir los mecanismos de defensa del insecto. El sistema inmune del insecto se activa a través de los procesos de melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento; la melanina sustancia responsable del oscurecimiento del tejido, debido a ello las ninfas tratadas con *L. lecanii* y *B. bassiana* se tornan oscuras en comparación a las del control.

Luego de sobrepasados los mecanismos de defensa del insecto este perece y el hongo entomopatógeno entra en la fase de colonización y al agotar los nutrientes y el agua presentes en el

interior de la ninfa esta se momifica, posteriormente el hongo emerge desarrollando sus hifas en la superficie de ésta. Finalmente, el hongo deja de crecer y comienza a esporular^{31,47}.

Mientras ocurren todos los procesos antes mencionado se pueden observar efectos en el comportamiento de las ninfas de *P. citri*, como no poder adherirse y caerse de las hojas que le sirven de alimento, posiblemente por la acción de las toxinas en el sistema nervioso; la pérdida de apetito que se manifiesta por la reducción de nivel de daño en las hojas sobre las que se encontraban, esto ocurre por pérdida de la integridad estructural de las membranas celulares y la consecuente deshidratación de las células causado por pérdidas de fluidos, todo esto ocurre por la acción mecánica de las hifas y la acción química de las toxinas de *L. lecanii* o *B. bassiana*, llevándolas a la muerte³⁵.

La aplicación de *L. lecanii* produjo una mortandad de 81.7% y 80% a las concentraciones de 10^6 y 10^7 , respectivamente, y *B. bassiana* produjo una mortandad de 78.3% y 85% a las concentraciones de 10^6 y 10^7 , respectivamente; existiendo diferencia significativa con el control sin embargo no existe diferencia significativa entre los cuatro tratamientos. Debemos tener en cuenta que los resultados pueden verse influenciados por muchos factores como la temperatura (que puede afectar la estabilidad del entomopatógeno y perder la patogenicidad), la humedad relativa (puede intervenir en las diferentes fases del ciclo de infección del hongo sobre el huésped), lo relacionado con el hongo (concentración y tiempo de vida media), suelo (textura, pH, cantidad y tipo de microorganismos), agroquímicos (algunos tienen acción fungicida o fungistático) así como la radiación solar, los vegetales y las precipitaciones^{45,47}.

En cuanto al porcentaje de mortandad, se observó un 85% al aplicar *B. bassiana* a la concentración de 10^7 conidios/mL el cual podemos comparar los resultados⁴⁷ donde reportan 80% de mortandad en ninfas de *P. citri* a una dosis de 10^8 conidios/mL, donde utilizaron un producto comercial y una dosis superior a la utilizada en el presente trabajo, el 5% de diferencia que se obtuvo puede deberse a la virulencia del aislamiento de *B. bassiana* utilizado, también se observa un menor aumento de la mortandad al utilizar *M. anisopliae* (78%)¹⁷, e *Isaria farinosa* (50-60%) a la misma concentración (10^7 conidios/mL)¹⁵.

CONCLUSIÓN

- *Lecanicillium lecanii* y *Beauveria bassiana* tienen un efecto significativo en el aumento de la mortandad de las ninfas de *Planococcus citri*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franco JC, Suma P, Borges da Silva E, Blumberg D, Mendel Z. Management strategies of mealybug pest of citrus in mediterranean countries. *Phytoparasitica*. 2004; 32(5): 507-522.
2. Kol-Maimon H, Ghanim M, Franco JC, Mendel Z. Evidence for gene flow between two sympatric mealybug species (Insecta; Coccoidea; Pseudococcidae). *PLoS ONE*. 2014; 9(2): e88433
3. Cabaleiro C, Segura A. Field transmission of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant dis.* 1997; 81: 283-287.
4. Mani M. Recovery of the indigenous *Coccidoxenoides peregrinus* and the exotic *Leptomastix dactylopii* on *Planococcus citri* in lemon and acid lime orchards. *Biocontrol Sci Techn.* 1994; 4(1):49-52.
5. Morandi Filho WJ, Grützmacher AD, Botton M, Bertin A. Biología e tabela de vida de fertilidade de *Planococcus citri* em diferentes estruturas vegetativas de cultivares de videira. *Pesq agropec bras.* 2008; 43(8): 941-947.
6. Cloyd RA, Dickinson A. Effect of insecticides on mealybug destroyer (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), natural enemies of citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). *J Econ Entomol.* 2006; 99(5):1596-604.
7. Rothwangl KB, Cloyd RA, Wiedenmann RN. Effects of insect growth regulators on citrus mealybug parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae). *J Econ Entomol.* 2004; 97(4):1239-44.
8. Afifi Ali, El Arnaouty SA, Attia AR, Abd Alla Ael-M. Biological control of citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso) using coccinellid predator, *Cryptolaemus montrouzieri* Muls. *Pak J Biol Sci.* 2010; 13(5):216-22.
9. Dinesh AS, Venkatesha MG. Inter- and intraspecific interactions in two mealybug predators *Spalgis epius* and *Cryptolaemus montrouzieri* in the presence and absence of prey. *Bull Entomol Res.* 2014; 104(1):48-55. doi: 10.1017/S0007485313000485

10. Cadée N, van Alphen JJM. Host selection and sex allocation in *Leptomastidea abnormis*, a parasitoid of the citrus mealybug *Planococcus citri*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1997, 83: 277–284. doi: 10.1046/j.1570-7458.1997.00182.x
11. Reeve RJ; French JV. Laboratory toxicity of pesticides to the brown lacewing *Symphtherobius barberi*. *South western Entomol*. 1978; 3(2): 121-123.
12. Barbosa Negrisoni CR, Negrisoni Júnior AS, Botton M, Garcia MS, Bernardi D. Evaluation of efficacy of 18 strains of entomopathogenic nematodes (Rhabditida) against *Planococcus citri* (Risso, 1813) (Hemiptera: Pseudococcidae) under laboratory conditions. *Exp Parasitol*. 2013; 134(3):295-8. doi: 10.1016/j.exppara.2013.02.002.
13. Passaro LC, Webster FX. Synthesis of the female sex pheromone of the citrus mealybug, *Planococcus citri*. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(10):2896-9.
14. Zada A, Dunkelblum E, Harel M, Assael F, Gross S, Mendel Z. Sex pheromone of the citrus mealybug *Planococcus citri*: synthesis and optimization of trap parameters. *J Econ Entomol*. 2004; 97(2):361-8.
15. Demirci F, Muştu M, Bora Kaydan M, Ülgentürk S. Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen; *Isaria farinosa*, on citrus mealybug, *Planococcus citri*. *Journal of Pest Science*. 2011; 84(3): 337-342.
16. Demirci F, Muştu M, Bora Kaydan M, Ülgentürk S. Effects of some fungicides on *Isaria farinosa*, and in vitro growth and infection rate on *Planococcus citri*. *Phytoparasitica*. 2011; 39(4):353-360
17. Mascarin GM, Pauli G, Lopes RB. Susceptibility of the citrus mealybug, *Planococcus citri*, to *Metarhizium anisopliae*. *Citrus Res Techn*. 2011; 32(3):155-160.
18. Guaharary F, Chaput P. Control Biológico Ayer Hoy y Siempre. En: Cano E, López JA, Carballo M, Fernández O, Gonzáles L, Gruber AK, y otros. Guaharary F, Carballo M [Editores]. *Control Biológico de plagas agrícolas*. Managua, Costa Rica: Catie, 2004.
19. Butt TM, Jackson C, Magan N. Introduction- Fungal Biological Control Agentes: Progress, Problems and Potential. En: Butt TM, Jackson C, Magan N. *Fungal as Biocontrol Agentes: Progress, Problems and Potential*. London, UK: Cabi Publishing, 2001.
20. Téllez-Jurado A, Cruz-Ramírez MG, Mercado-Flores Y, Asaff-Torres A, et al. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Rev Mex Mic*. 2009; 30: 73-80.
21. Evans HC, Hywel-Jones NL. Entomopathogenic fungi. In: Ben-Dov Y, Hodgson CJ (eds.), *Soft Scale Insects: Their Biology, Natural Enemies and Control*, vol. 7B1. New York: Elsevier, 1997.
22. Cavallazzi G, Prieto A, Ariza R. Evaluation of the entomopathogenic *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas in the control of the soft scale *Philephedra tuberculosa* Nakahara & Gill in the Guanabana (*Annona muricata*). *Agronomy Colombiana*. 1998; 15 (2-3), 106–111.
23. Lo PL, Chapman RB. The role of parasitoids and entomopathogenic fungi in mortality of third-instar and adult *Ceroplastes destructor* and *C. sinensis* (Hemiptera: Coccidae: Ceroplastinae) on citrus in New Zealand. *Biocontrol Sci and Techn*. 1998; 8 (4): 573–582.
24. Evans HC, Prior C. Entomopathogenic fungi. En: Rosen D. (ed.) *Armored Scale Insects: Their Biology, Natural Enemies and Control*, vol. B1. Amsterdam: Elsevier, 1990; pp.8-15.
25. Yin FM, Chen QC, Ye Y. Technology study on the control of *Oracella acuta* by *Verticillium lecanii*. *Forest Sci Techn*. 1996; 5: 15–18.
26. Yin FM, Qin CS, Chen QC. Study on the control of *Oracella acuta* by *Verticillium lecanii*. *Forest Sci Techn*. 2000; 16 (1): 41–44.
27. Asensio L, Lopez-Llorca LV, Lopez-Jimenez JA. Use of light, scanning electron microscopy and bioassays to evaluate parasitism by entomopathogenic fungi of the red scale insect of palms (*Phoenicococcus marlatti* Ckll., 1899). *Micron*. 2005; 36 (2): 169–175.
28. Yuan SY, Kong Q, Zhang H, Li ZY, Chen B, Zhu CY. Laboratory assessment of the virulence of *Verticillium lecanii* Viegas to *Trialeurodes vaporariorum* and *Icerya purchasi* maskeli. *China J*. 2007; 32 (1): 111-114.
29. Maurer P, Couteaudier Y, Girard PA, Bridge PD, Riba G. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycol Res*. 1997; 101(2):159-164.
30. Wraight SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, et al. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silver leaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol control*. 2000; 17:203-217.
31. Pucheta M, Flores A, Rodríguez S, de la Torre M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 2006; 31(12):856- 860.
32. Ment D, Gindin G, Rot A, Soroker V, Glazer I, Barel Sh et al. Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 76(11):3521-3528.
33. Pedrini N, Ortiz-Urquiza, Huerte-Bonnet C, Zhang S, Keyhani NO. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. *Front Microbiol*. 2013; 4(24). doi:10.3389/fmicb.2013.00024.

34. Rocha-Pino Z, Viguera G, Shirai K. Production and activities of chitinases and hydrophobins. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2011; 34:681-686.
35. Mnyone L, Kirby M, Lwetoijera D, Mpingwa M, Knols B, Takken W *et al.* Infection of de Malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effect of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malar J.* 2009; 8:309-320.
36. Wang Ch, St Leger RJ, Acollagenus protective coat enable *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103(17): 6647-6652.
37. Arboleda JW, Delgado F, Valencia A. efecto de la toxina beauvericina sobre *Hypothenemus hampei*. *Manejo integrado de plagas y agroecología.* 2003; 68: 71-76.
38. Hamill, R.L.; Higgins, G.E.; Boaz, H.E.; Gorman, M. The structure of beauvericin, a new desipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett.* 1969, 49, 4255–4258.
39. Grove, J.F.; Pople, M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia.* 1980; 70: 103–105.
40. Jestoi M. Emerging Fusarium - Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin - A Review. *Crit Rev Food Sci.* 2008; 48: 21- 49.
41. Fornelli F, Minervini F, Logrieco A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *J Invertebr Pathol.* 2004, 85: 74–79.
42. Leland JE, McGuire MR, Grace JA, Jaronski ST, Ulloa M, Park Y, Plattner RD. Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* spp.)(Heteroptera: Miridae). *Biol Control.* 2005; 35: 104–114.
43. Jegorov A, Sedmera P, Matha V, Simek P, Zahradnickova L, Eyal J. Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry.* 1994; 37:1301-1303.
44. Wang B, Kang Q, Lu Y, Bai L, Wang Ch. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proc Natl Acad Sci.* 2012; 109(4): 1287-1292.
45. Roberts DW, St Leger RJ. Toxins. En: Roberts DW, St Leger R. *Metarhizium* spp., Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. *Adv Appl Microbiol.* 2004; 54: 13- 17.
46. Wang L, Huang J, You M, Guan X, Liu B. Toxicity and feeding deterrence of crude toxin extracts of *Lecanicillium (Veticillium) lecanii* (Hyphomycetes) against sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). *Pest Manag Sci.* 2007; 63:381-387.
47. Ojeda-Chi M, Rodríguez-Vivas R, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R, Cruz-Vázquez C. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Rev Mex Cienc Pecu.* 2011; 2(2): 177-192.



Efecto de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* C1 atenuados por temperatura a la infección experimental en *Mus musculus* BALB/c con formas infectivas del parásito

Effect of *Trypanosoma cruzi* C1 tripomastigotes attenuated by temperature to experimental infection in *Mus musculus* BALB/c with infective forms of the parasite

Yolanda Vértiz Vereau y Hermes Escalante Añorga

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT.

RESUMEN

La investigación estuvo orientada a determinar el efecto de los tripomastigotes atenuados por calor de *T. cruzi* a la infección experimental en *Mus musculus* BALB/c con la forma infectiva del parásito; para lo cual, se utilizaron tripomastigotes de *T. cruzi* cepa C1 y ejemplares de *Mus musculus* BALB/c “ratón”. Los tripomastigotes se obtuvieron en Medio Grace a partir de epimastigotes mantenidos en un cultivo axénico en medio bifásico (BHI + 10% de sangre / PYLB), los que fueron atenuados por shock térmico a temperaturas de 37; 37,5; 38; 38,5 y 39°C con tiempos de exposición de 30, 60, 90 y 120 segundos y posteriormente inoculados a 20 ejemplares de *Mus musculus* BALB/c. A los 30 días de la inoculación, se evidenció la presencia del parásito en tres ratones del grupo experimental y en los 17 ratones restantes la ausencia del parásito. Verificada la efectividad de la atenuación, estos parásitos fueron inoculados a 68 ratones del grupo experimental (4 ratones/17 casos positivos) con una dosis de 10⁶ parásitos/0.2 mL al 0, 7, 21 día; mientras que al grupo control comprendido por cuatro ratones sólo se suministró una dosis de 0.2 mL de Medio Grace. Después de los 30 días de inoculación con la forma infectiva del parásito, una semana posterior a la última inmunización, se obtuvo un 96% de supervivencia en los ratones del grupo experimental y 25% de supervivencia en los ratones del grupo control; con lo cual se comprobó que los parásitos atenuados a temperaturas de 37; 37,5; 38; 38,5 y 39°C generan un efecto protector en *Mus musculus* BALB/c.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, tripomastigotes, epimastigotes, cultivo axénico.

ABSTRACT

The research was aimed at determining the effect of the tripomastigotes attenuated by heat of *T. cruzi* to the experimental infection in *Mus musculus* BALB/c with the ineffective form of the parasite, in which case, they were used tripomastigotes of *T. cruzi* strain C1 and specimens of *Mus musculus* BALB/c “mouse”. The tripomastigotes were obtained in Medium Grace from epimastigotes kept in an axenic culture of a biphasic environment (BHI+10% of blood / PYLB), which were attenuated by thermal shock at temperatures of 37; 37.5; 38; 38.5; 39 °C with exposure time of 30, 60, 90 and 120 seconds and subsequently inoculated to 20 specimens of *Mus musculus* BALB/c. After 30 days of inoculation, the presence of the parasite was evident in the 3 mice from the experimental group and in the remaining 17 mice the absence of the parasite. Verified the effectiveness of the attenuation, these parasite were inoculated to 68 mice from the experimental group (4 mice / 17 positive cases) with a dose of 10⁶ parasites/0.2 mL at 0, 7, 21 day; whereas the control group comprised of 4 mice only one dose was supplied of 0.2 mL from Medium Grace. After 30 day of inoculation with the ineffective form of the parasite, a week later to the last immunization, it was obtained 96% survival in the mice from the experimental group and 25% survival in the mice from the control group; whereupon it was proved that the attenuated parasites by temperatures of 37; 37.5; 38; 38.5; 39 °C generate a protective effect in *Mus musculus* BALB/c.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, tripomastigotes, epimastigotes, axenic culture.

INTRODUCCIÓN

Causada por *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, la enfermedad de Chagas constituye un serio problema de salud pública porque aproximadamente ocho millones de personas están infectadas, de las cuales, entre 23 y 43 mil personas mueren al año y otras 100 millones están en riesgo de contraer la infección^{1,2}. En el Perú, la zona costera sur (Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna) son las zonas donde se han presentado la mayoría de casos de enfermedad de Chagas, siendo *Triatoma infestans* el vector y *Cavia porcellus* "cobayo" el principal reservorio^{3,4}.

La enfermedad de Chagas presenta una fase aguda con síntomas no específicos, seguida de una fase indeterminada que puede durar hasta 10 años y una fase crónica progresiva con patología severa del corazón y/o tracto digestivo^{1,4,5}. En la fase aguda se aprecia activación de sistema inmune, con presencia de citoquinemia, intensa activación de linfocitos T y B, linfadenopatía, esplenomegalia y un intenso proceso inflamatorio difuso o local asociado a la miocitólisis inducida por el parásito. En la fase indeterminada aparecen los IgG específicas y hay ausencia de signos, síntomas y de anomalías del electrocardiograma y el corazón, esófago y colon presentan tamaño normal. En la fase crónica se presenta una reacción inflamatoria fibrótica que daña el músculo cardíaco y la red de conducción y el sistema nervioso entérico^{2,4,5}.

La variabilidad de susceptibilidad del hospedador a *T. cruzi* depende de factores ligados tanto al parásito como al hospedador^{6,7,8}. Una misma línea isogénica de ratón presenta diferentes grados de susceptibilidad a la infección causada por diferentes cepas de *T. cruzi*^{9,10,11}, lo que demuestra que el curso de la infección depende de las características intrínsecas del parásito¹².

En la actualidad, la principal medida de control es el tratamiento con insecticidas de las viviendas y peridomicilios donde habita el insecto vector, metodología especialmente eficiente cuando la propia comunidad participa en la vigilancia epidemiológica¹². Sin embargo, la continua recolonización de las viviendas hace necesario ampliar el marco del control de la transmisión abriendo el desafío del desarrollo de extrategias confluyentes de control y prevención, tales como el desarrollo de una vacuna de agentes terapéuticos efectivos. Una vacuna, ya sea preventiva o terapéutica, contribuiría en gran medida al control de la enfermedad de Chagas mediante la reducción de la infecciosidad del principal reservorio interno del parásito, así como mejorar la atención de los animales que cada vez más se ha detectado como infectados por *T. cruzi*^{13,14}.

Una amplia gama de formulaciones de vacunas han sido evaluadas a lo largo de los años, que van desde los parásitos enteros a purificados o proteínas recombinantes, vectores virales y vacunas de ADN. Intentos iniciales de utilizar parásitos muertos de *T. cruzi* produjeron modestos resultados de protección contra la infección^{15,16}, posiblemente debido a una inmunogenicidad más bien baja. Por otra parte, parásitos vivos atenuados son mucho más inmunógenos y los primeros estudios indican que son capaces de conferir protección significativa contra la infección^{16,17,18}. Del mismo modo, la inmunización con *T. rangeli* en vivo, una relacionada especie de parásito no patógeno en seres humanos, también puede proporcionar cierta inmunidad cruzada reactiva y una protección parcial, posiblemente debido a antígenos homólogos^{19,20}.

Estos enfoques plantean los problemas comúnmente asociados con las vacunas vivas, es decir, la seguridad y los retos asociados con su producción a gran escala y distribución. No obstante, existe un renovado interés en un vivo enfoque de vacuna atenuada y estudios recientes han descrito la generación de mutantes de *T. cruzi* por genes específicos, que puede proporcionar una buena protección contra la infección en los ratones, incluso a través de la administración oral [33-35]. Por tanto, es de gran interés que las formulaciones de vacunas puedan utilizarse tanto para la prevención de la enfermedad de Chagas, así como para la terapia de una infección en curso, siendo esta una herramienta muy flexible para el control de la enfermedad^{21,22,23}. Desde muy diversas perspectivas se ha intentado inducir una respuesta inmune protectora contra *Trypanosoma cruzi*. Ensayos con parásitos vivos atenuados o no proliferativos, muertos intactos u homogeinizados, fracciones subcelulares y macromoléculas purificadas, han demostrado, en el mejor de los casos, protección expresada como mayor sobrevida y menor parasitemia²⁷.

En este artículo se presentan los resultados de una investigación orientada a inducir un efecto protector en ejemplares de *Mus musculus* BALB/c, utilizando tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*

cepa C1 obtenidos en medio Grace y atenuados a temperaturas de 37; 37,5; 38; 38,5 y 39°C con tiempos de exposición de 30, 60, 90 y 120 segundos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- Cultivo de *T. cruzi* cepa C1 en su forma epimastigote donado por el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Nacional de San Marcos (Lima, Perú)
- 72 ejemplares machos de *Mus musculus* BALB/c “ratón” de cuatro semanas de edad, adquiridos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú).

Propagación de la forma epimastigote de *T. cruzi* C1.

Las formas epimastigotes de la cepa C1 de *T. cruzi*, fueron cultivadas en tubos estériles de 20x150 mm con tapa rosca. El cultivo estaba compuesto por un medio Bifásico, conformado por Agar BHI (fase sólida) y medio PYLB (fase líquida). Cada tubo contenía ocho mL de fase sólida, debidamente suplementada con 10% de sangre desfibrinada de conejo o humana¹⁸, la cual se agregó cuando el agar se encontraba a una temperatura entre 40 a 50°C, luego se colocó en plano inclinado hasta solidificar. Mientras que la fase líquida a razón de 11 mL por cada tubo, tenía como aditivo necesario 0.01% de Amikacina (500mg/2mL). Seguidamente, se realizó la siembra de los parásitos, extrayendo 1 mL de inóculo procedente del medio líquido del cultivo de la cepa. Según esta descripción, se obtuvo por cada lote de cultivo, 20 tubos y se mantuvo a 22 +/- 2°C (temperatura óptima de crecimiento del epimastigote) durante 15 días^{24,26}.

Obtención de formas tripomastigote de *T. cruzi*.

Después de los 15 días de incubación, se verificó la presencia de los epimastigotes en cada uno de los tubos a través de observación microscópica de una pequeña gota del cultivo. La fase líquida de cada uno de los tubos fueron traspasados a otros tubos limpios de 13x100 mm. Estos tubos fueron centrifugados a 4000 rpm por cinco minutos con la finalidad de obtener en el sedimento los parásitos y eliminar el sobrenadante. Luego fueron lavados tres veces con PBS estéril pH 7.26 conteniendo 0.5% Bencilpenicilina 10⁶UI/5mL y 0.25% Gentamicina 160mg/2mL y centrifugado a 4000 rpm por cinco minutos. Luego se eliminó el sobrenadante y a partir del pellet, se cambió a tubos limpios y estériles en donde se añadió medio Grace (Sigma Aldrich) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino. Los cultivos fueron mantenidos durante seis días a 22 +/- 2°C y a partir de los tres días se evaluó mediante la observación y búsqueda microscópica de parásitos metacíclicos²⁶.

Atenuación de tripomastigotes de *T. cruzi*.

Luego de la transformación de las formas tripomastigotes, se procedió a la atenuación de dicha forma infectiva sometiendo al parásito a baño maría a temperaturas de 37°C ; 37,5°C; 38°C; 38,5°C y 39°C en tiempos de 30, 60, 90 y 120 segundos por cada temperatura.

Evaluación de la efectividad de la atenuación.

Para comprobar la efectividad de la atenuación se inocularon 20 ejemplares de *Mus musculus* BALB/c (un ejemplar por temperatura/ tiempo), con una dosis de 10⁶ tripomastigotes /0.2 mL que fue monitoreado por recuento en cámara de Neubauer. A partir del segundo día de inoculados se empezó a evaluar el estado de los ratones hasta el día 30. Transcurrido este tiempo se tomó muestras de la parte distal de la cola de cada uno de los ratones y se buscó los parásitos por observación microscópica.

Inmunización con tripomastigotes atenuados en *Mus musculus*.

Luego de evaluar y determinar la ausencia del parásito en sangre de los ratones y comprobar la atenuación de los tripomastigotes, el grupo experimental de *M. musculus* BALB/c comprendido por 17 subgrupos con cuatro ratones cada uno, fue inmunizado con una dosis de 10⁶ tripomastigotes atenuados/0,2 mL por la ruta intraperitoneal (IP)^[41], al mismo tiempo el grupo control comprendido por cuatro ratones, cada uno recibió una dosis de 0.2 mL de Medio Grace. Las inmunizaciones, tanto al grupo experimental como control, se realizaron a los días 0, 7 y 21.

Inoculación con formas tripomastigotes de *T. cruzi* C1 en *Mus musculus*.

Siete días después de la última inmunización se realizó la infección experimental, para lo cual a todos los ratones del grupo control y del grupo experimental se les administró vía intraperitoneal una dosis de 10⁵ tripomastigotes/ 0.2 mL de *T. cruzi* cepa C1 obtenidos de medio Grace y que no fueron atenuados. Después de 30 días de la administración del parásito, se evaluó la supervivencia de los ejemplares y se comprobó la eficacia de la protección.

RESULTADOS

Se encontró que la dosis de 10^5 tripomastigotes metacíclicos, después de un mes, en su mayoría originó un efecto inmunoprotector en los ejemplares experimentales, obteniéndose un 96% de supervivencia (65 de 68) en los ratones inmunizados (grupo experimental). La tasa de supervivencia de los ejemplares inmunizados en comparación al grupo control es notablemente superior, debido al reporte de sobrevivencia del 25% (1 de 4) en los ratones no inmunizados (grupo control). (Tabla 1)

En la Tabla 2 se registró un 100 % de supervivencia(4/4) en 14 casos de ratones experimentales inmunizados con parásitos atenuados a temperaturas comprendidas entre 37°C/120"; 37,5°C/30" a 90"; 38°C/ 30" a 120"; 38,5°C/ 30" a 90"; así como 39 °C/ 30" a 90"; mientras que los parásitos atenuados a 37,5°C/ 120"; 38,5°C/ 120" y 39°C/ 120" sólo lograron un 75% de supervivencia (3/4) al día 30 en los ejemplares experimentales de *Mus musculus*.

Tabla 1. Porcentaje de supervivencia de los ejemplares del grupo control y experimental de *Mus musculus* cepa BALB/c a la infección con tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa C1.

Grupo	N° total de Ejemplares	N° de supervivientes al 30 día/total (%)	
Experimental	68	65/68	96%
Control	4	1/4	25%

p < 0.05

DISCUSIÓN

El conocimiento sobre la fisiopatología de la infección de *T. cruzi* en animales de experimentación ha constituido un avance importante en el estudio de la Enfermedad de Chagas²², ya que los modelos experimentales controlados permiten analizar diferentes parámetros dependientes tanto del hospedador como del parásito, lo que por razones prácticas y éticas no pueden realizarse en humanos.

Con el objeto de estudiar la respuesta inmunológica producida por la inmunización y la inmunoprotección ante el desafío con formas infectantes del parásito; por los resultados obtenidos, se pone de manifiesto que la supervivencia en la mayoría de los casos, fue del 100 % en los grupos inmunizados con tripomastigotes atenuados y del 25 % en el control sin inmunizar. De tal modo, se podría aludir que la inmunización redujo significativamente la parasitemia y mortalidad post-desafío con la forma infectante del parásito.

En la Tabla 1. se observa que 65 de 68 ejemplares del grupo experimental representan un 96% de supervivencia acumulada a los 30 días post infección, mientras que 1 de 4 ratones del grupo control sobrevivió a dicha infección, lo que equivale a una supervivencia significativamente más baja del 25% en el mismo período (aún cuando en las primeras tres semanas, el ejemplar mostró decaimiento y el pelo erizado como expresión de un síndrome de enfermedad) ; lo que demostraría que dicho evento conllevó a una protección en los animales experimentales por la efectividad del tratamiento térmico al que fueron sometidos los tripomastigotes de *T. cruzi*. Sin embargo, se sugiere evaluar mayor número de ratones como controles para lograr un resultado más significativo.

Tabla 2. Número de casos y porcentaje de supervivencia de los ejemplares del grupo experimental de *Mus musculus* inmunizados con tripomastigotes atenuados a diferentes temperaturas y tiempos a la post-infección con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa C1.

Grupo experimental			
Temperatura de atenuación (°C)	Tiempo de exposición (segundos)	Supervivencia	
		Casos de ratones vivos al 30 día	Porcentaje (%)
37	120	4/4	100
37,5	30	4/4	100
37,5	60	4/4	100
37,5	90	4/4	100
37,5	120	3/4	75
38	30	4/4	100
38	60	4/4	100
38	90	4/4	100
38	120	4/4	100
38,5	30	4/4	100
38,5	60	4/4	100
38,5	90	4/4	100
38,5	120	3/4	75
39	30	4/4	100
39	60	4/4	100
39	90	4/4	100
39	120	3/4	75

Como todos los ratones fueron infectados con el mismo número de parásitos, se utilizó la muerte o supervivencia como criterio para determinar la inmunoprotección y resistencia de cada grupo de ratones a la infección con 10^5 tripomastigotes metacíclicos. En la Tabla 2 se muestra que el grupo de ratones experimentales, de 4 semanas de edad, presentó un 100% de supervivencia en 14 de 17 casos a los 30 días p.i. mientras los 3 casos restantes, presentaron un 75% de supervivencia en el mismo período. Al día 21 se observó mortalidad 1 de 4 en los ratones inmunizados con tripomastigotes sometidos a 37,5°C por 120 segundos, mientras que 1 de 4 ratones a 38,5 y 39 ° C por 120 segundos presentaron una mortalidad al día 28. Aunque, en los primeros diez días post-infección los ejemplares muertos no presentaron cuadro alguno de parasitemia, lo que si se dejó ver a los 18-20 días (pese a encontrarse bajo las mismas condiciones que el resto de individuos), se presume que dicho evento sucede debido a que no todos los ratones presentaron el mismo cuadro de resistencia y/o su sistema inmunológico fue deficiente, favoreciendo la capacidad infectiva del parásito. Este suceso parece apoyar la sugerencia que la persistencia del parásito es una de las principales causas de la Enfermedad de Chagas^{26,28}.

Desde luego, uno de los aspectos más sorprendentes de la enfermedad es la compleja red de eventos que parece acompañar, tanto el desarrollo de una respuesta inmune protectora como el desarrollo de una respuesta autoinmune que progresa en el transcurso de la infección y/o de la enfermedad. En otras palabras, el elevado porcentaje de supervivencia en los ratones BALB/c, puede explicarse por el temprano desarrollo de una respuesta inmune que logra controlar la infección, pero que secundariamente conduce al desarrollo de hipersensibilidad y luego a un cuadro de autoinmunidad como consecuencia de la autoprotección del hospedero. De esta forma, la obtención de vacunas contra

T. cruzi, es un verdadero desafío, porque podría ser un paso importante en la prevención de la Enfermedad de Chagas en humanos.

CONCLUSIÓN

- Los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa C1 atenuados a temperaturas con tiempos de exposición de 37°C/120"; 37,5°C/30" a 90"; 38°C/ 30" a 120"; 38,5°C/ 30" a 90"; así como 39 °C/ 30" a 90", lograron generar protección al infectar ejemplares de *Mus musculus* BALB/c encontrando un porcentaje elevado de supervivencia del grupo experimental en relación al grupo control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodriguez Coura J, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review: Act Tropica 2010; 115: 5-13
2. Lescure F-X, Le Loup G, Freilij H, Develoux M. Chagas disease: changes in knowledge and management. Lancet Infect Dis 2010; 10: 556-570
3. Hunter Gc, Borrini-Mayorí K, Ancca Juarez J, Castillo Neyra R, et la. A field trial of alternative target screening strategies for Chagas disease in Arequipa, Perú. PLoS Neg Trop Dis 2012; 6(1): e1468
4. Vega S, Náquira C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Tripanosomiasis americana (Enfermedad De Chagas). 2da ed. Serie de Normas Técnicas N° 26. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional De Salud; 2006.
5. De Lima AR, Arévalo P, Bastidas V, Bolívar V, Navarro MC, Contreras VT. Efecto de las condiciones de mantenimiento de *Trypanosoma cruzi* sobre la calidad de los antígenos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Revista de la facultad de ciencias de la salud 2007; 11:20-26.
6. Garg N, Bhatia V. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. Expert Rev Vaccines 2005; 4:867-80.
7. Cazorla SI, Frank FM, Malchiodi EL. Vaccination approaches against *Trypanosoma cruzi* infection. Expert Rev Vaccines 2009; 8:921-35.
8. Dumonteil E. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species in the post-genomic era. Infect Genet Evol 2009; 9:1075-82.
9. Kjos SA, Snowden KF, Craig TM, Lewis B, Ronald N, Olson JK. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. Vet Parasitol 2008; 152:249-56.
10. Garg N, Bhatia V. Current status and future prospects for a vaccine against American trypanosomiasis. Expert Rev Vaccines 2005; 4:867-80.
11. Basombrio MA. *Trypanosoma cruzi*: partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine. Exp Parasitol 1990; 71:1-8.
12. Wrightsman RA, Miller MJ, Saborio JL, Manning JE. Pure paraflagellar rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. Infect Immun 1995; 63:122-5.
13. Miller MJ, Wrightsman RA, Manning JE. *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice immunized with paraflagellar rod proteins is associated with a T-helper type 1 response. Exp Parasitol 1996; 84:156-166.
14. Frank FM, Petray PB, Cazorla SI, Munoz MC, Corral RS, Malchiodi EL. Use of a purified *Trypanosoma cruzi* antigen and CpG oligodeoxynucleotides for immunoprotection against a lethal challenge with trypomastigotes. Vaccine 2003; 22:77-86.
15. Dumonteil E (2007) DNA Vaccines against Protozoan Parasites: Advances and Challenges. J Biomed Biotechnol 2007: 90520.
16. Zuñiga C, Palau T, Penin P, Gamallo C, de Diego JA. Protective effect of *Trypanosoma rangeli* against infections with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. Trop Med Int Health 1997; 2:482-7.
17. Basso B, Cervetta L, Moretti E, Carlier Y, et al. Acute *Trypanosoma cruzi* infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in *T. rangeli*-vaccinated mice. Vaccine 2004; 22:1868-72.
18. Basso B, Moretti E, Fretes R. Vaccination with epimastigotes of different strains of *Trypanosoma rangeli* protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008; 103:370-4
19. Collins MH, Craft JM, Bustamante JM, Tarleton RL. Oral exposure to *Trypanosoma cruzi* elicits a systemic CD8⁺ T cell response and protection against heterotopic challenge. Infect Immun 2011; 79:3397-406.
20. Zuñiga E, Motran C, Montes CL, Diaz FL, Bocco JL, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. Clin Exp Immunol 2000; 119:507-15.

21. Taibi A, Plumas-Marty B, Guevara-Espinoza A, Schöneck R, Pessoa H, Loyens M, et al. *Trypanosoma cruzi* immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *J Immunol* 1993; 151:2676-89.
22. Limon-Flores AY, Cervera-Cetina R, Tzec-Arjona JL, Ek-Macias L, Sánchez-Burgos G, Ramírez-Sierra MJ, et al. Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Vaccine* 2010; 28:7414-9.
23. Rottenberg ME, Cardoni RL, Moreno M, Segura EL. *Trypanosoma cruzi*: Immune response in mice immunized with parasite antigens. *Exp Parasitol* 1988; 6: 101.
24. De Lima AR, Aparicio A, Berrocal A, Navarro MC, Graterol D, Contreras V. Epimastigogénesis de *Trypanosoma cruzi* en medio axénico: cambios peptídicos, glicopeptídicos y enzimáticos. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud* 2007; 11(2):39-47.
25. Goicochea MA. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en las comunidades de Rumiaco y Nuevo Guayaquil, distrito de Callayuc, provincia de Cutervo, departamento de Cajamarca, diciembre 2005 – abril 2006. Tesis de Biólogo Microbiólogo, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2007.
26. Basombrio MA, Besuschio S and Cossio PM. Side effects of immunization with live attenuated *Trypanosoma cruzi* in mice and rabbits. *Infect. Immun* 1982; 36:342-350.
27. Trischamann T, Bloom B. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 1982; 35: 546-551.
28. Tarleton RI. Parasite persistence in the etiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol* 2001; 31: 550-554.



Efecto insecticida del extracto alcohólico de *Ocimum basilicum* en *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio

Insecticide effect of *Ocimum basilicum* alcoholic-extract on *Aedes aegypti* under laboratory conditions

Ana María Torres Cordero y Judith Roldán Rodríguez

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 insecticida de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Ocimum basilicum* (EAO) en dos poblaciones de L3 y L4 de *Aedes aegypti*: una natural de Sullana y la otra, una cepa de referencia (Rockefeller). Para determinar la actividad larvicida se utilizaron las concentraciones de 1.5, 2.0 y 4.5% del EAO y un control (etanol al 1%) en recipientes de 500mL. Se llevaron a cabo cinco repeticiones: dos para los provenientes de Sullana y tres para la cepa Rockefeller; la actividad adulticida fue determinada mediante el método de la botella (CDC), para ello se estableció un grupo control (etanol absoluto) y tres grupos experimentales de 1mL de las concentraciones de 15%, 20% y 30% del EAO con cinco repeticiones: dos para los provenientes de Sullana y tres repeticiones para la cepa Rockefeller. Se observó una elevada mortalidad de las larvas de *Ae. aegypti* de Sullana y en las cepa Rockefeller encontrándose diferencia significativa para todas las concentraciones respecto al control y sin diferencia significativa entre las poblaciones, produciendo la concentración de 4.5% un 100% de mortalidad para ambas cepas en 60 minutos, con un CL₅₀ de 2.9% para Sullana y CL₅₀ de 3.158% para Rockefeller. Asimismo, se observó una elevada mortalidad de los adultos encontrándose diferencia significativa para todas las concentraciones respecto al control y sin diferencia significativa entre poblaciones, produciendo la concentración de 30% un 100% de mortalidad para ambas cepas en 40 minutos, observándose un CL₅₀ de 24.260% para la cepa Sullana y un CL₅₀ de 24.468% para la cepa Rockefeller. Se concluye que existe un efecto insecticida del EAO en *Ae. aegypti* para larvas con un CL₅₀ de 2.9% para la cepa Sullana y 3.158% para la cepa Rockefeller, y para adultos con un CL₅₀ de 24.260% para la cepa Sullana y un CL₅₀ de 24.468% para la cepa Rockefeller, no encontrándose diferencia significativa en mortalidades entre las poblaciones.

Palabras Clave: *Aedes aegypti*, insecticida, larvicida, adulticida, extracto alcohólico, *Ocimum basilicum*.

ABSTRACT

The insecticidal effect of different *Ocimum basilicum* alcoholic extract concentrations was evaluated in *Aedes aegypti*, for this, two populations of mosquitoes from Sullana and Rockefeller strain was used. To determine the larvicidal effect three *O. basilicum* alcoholic extract concentrations of 1.5%, 2.0% and 4.5% and one ethanol 1% control was used. The concentrations and control placed in 500mL containers, then the III and IV instar *Ae. aegypti* larvae were put in the containers, performing five repetitions: two for Sullana and three for Rockefeller strain; the adulticidal effect was determined through the CDC bottle method, for this, one control group (ethanol absolute) and three experimental groups of 15%, 20% and 30% *O. basilicum* alcoholic extract concentrations were established with five repetitions: two for Sullana and three for Rockefeller strain. A high mortality in *Ae. aegypti* from Sullana and Rockefeller strain larvae was observed, finding a significant difference for all concentrations in relation to control and without significant difference between populations, producing the 4.5% concentration 100% mortality in 60 minutes for both strains, with a LC₅₀ of 2.9% for Sullana and LC₅₀ of 3.158% for Rockefeller. A high mortality in adults also was observed, finding a significant difference for all concentrations in relation to control and without significant difference between populations, producing the 30% concentration 100% mortality in 40 minutes finding the LC₅₀ of 24.260% for Sullana and LC₅₀ of 24.468% for Rockefeller. Therefore there is an insecticidal effect of *O. basilicum* alcoholic extract in *Ae. Aegypti* with a LC₅₀ of 2.9% for Sullana and LC₅₀ of 3.158% for Rockefeller larvae and LC₅₀ of 24.260% for Sullana and LC₅₀ of 24.468% for Rockefeller adults not finding a significant difference between populations was concluded.

Keywords: *Aedes aegypti*, insecticidal, larvicidal, adulticidal, alcoholic extract, *Ocimum basilicum*.

INTRODUCCIÓN

El control de vectores sigue siendo la principal prevención y control de enfermedades metaxénicas por cuanto aún no se cuenta con vacunas; de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el enfoque para combatir tales enfermedades se basa en la interrupción del ciclo de transmisión mediante la reducción del vector con insecticidas sintéticos, aspecto que está siendo revisado debido al incremento de resistencia a éstos y por sus efectos negativos al medio ambiente y a los integrantes de la Clase Mammalia en general^{1,2,3,4}.

Diferentes compuestos bioactivos de las plantas están siendo utilizadas en el control de mosquitos, ya que pueden actuar: como insecticidas, deteniendo la alimentación, inhibiendo hormonas de muda, deteniendo la oviposición, como repelentes, inhibiendo el crecimiento, incluso como atrayentes^{5,6,7,8,9,10}. Los principios activos en el vegetal se agrupan en función al “precursor” a través del cual se biosintetizan, tales como, flavonoides, quinonas, lignanos y cumarinas, fenoles simples y ácidos fenólicos y lípidos; así como, derivados del ácido mevalónico, de los aminoácidos y de polisacáridos, heterósidos cianogenéticos y sulfocianogenéticos^{11,12}. Por estas razones los insecticidas de plantas están ganando más popularidad en este contexto, particularmente por su viabilidad en el medio ambiente¹³.

Los miembros del género *Ocinum* (Lamiaceae) han sido evaluadas como fuentes naturales de insecticidas en general y contra vectores en particular; así, se ha registrado que *O. canum* y *O. sanctum* presentan efecto larvicidas contra *Anopheles subpictus*¹⁴ y adulticida contra *Culex quinquefasciatus* y *Ae. Aegypti*¹⁵, *O. gratissimum* contra *An. gambiae* y *An. funestus* en los cuales produce el denominado efecto knockdown¹⁶.

La albahaca, *O. basilicum* es comúnmente usada como antiespasmódicos, antiséptico, analgésico y para tratar desórdenes cardiovasculares, como estimulante digestivo y para el dolor de cabeza, tos, diarrea, insomnio, constipación, verrugas, heridas y malfuncionamiento de los riñones¹⁷. En su aceite esencial predominan el linalol, eugenol, safrol, 1,8 cineol y otros monoterpenos¹⁸; sin embargo, los componentes químicos pueden variar según los quimiotipos dados por la diferencia geográfica: el quimiotipo Europeo, presentando el linalol y estragol como componentes principales; el quimiotipo Reunión, se caracteriza por tener altas concentraciones de estragol; el quimiotipo tropical por ser rico en cinamato de metilo; y un quimiotipo de África del norte y de la antigua Unión Soviética es rico en eugenol¹⁹, entre otros. Sus compuestos han sido reportados con efectos antivirales¹⁰ antibacterianos¹¹, antifúngicos^{12,13} antiparasitarios¹⁹ e insecticidas. Estas propiedades han conducido a probar su toxicidad y potencial repelente contra diferentes estadios y pupas de *Ae. Aegypti*, habiéndose encontrado que los valores de LC₅₀ para la L1 fue 3.734; la L2, de 4.154; la L3, de 664 y L4 de 5.124²⁵

Teniendo en cuenta que ha sido documentado el efecto insecticida de *O. basilicum* en culícidos y al no existir publicaciones del extracto etanólico sobre *Ae. Aegypti* de esta región así como la variación de la composición química de los quimiotipos y que el uso de insecticidas químicos conducen a promover la resistencia, contaminación del medio ambiente y daños en la salud del hombre, se propuso el presente trabajo que tuvo como propósito: determinar el efecto larvicida y adulticida de las concentraciones de 1.5%, 2.0%, 4.5% y 15%, 20%, 30%, respectivamente, del extracto alcohólico de *O. basilicum* contra *A. aegypti* bajo condiciones de laboratorio. Teniendo en cuenta los antecedentes, se puede afirmar que a medida que se incrementa las concentraciones del extracto alcohólico, disminuye la viabilidad de las L4 tempranas y adultos de *A. aegypti* en condiciones experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron adultos de *Aedes aegypti* que fueron obtenidos en el laboratorio a partir de huevos colectados en el distrito de Sullana (Piura, Perú), asimismo, se utilizó una cepa susceptible (Cepa Rockefeller) que es mantenida en el cual insectario de Artropodología Parasitaria de la Universidad Nacional de Trujillo (Trujillo, Perú). Las larvas fueron depositadas en recipientes de plástico de 30x35 cm y 5 cm de alto conteniendo 1500 mL de agua, y se mantuvieron con alimento balanceado estéril “purina” hasta el estadio de larva IV²². Posteriormente, las pupas fueron transferidas a jaulas de

crianza con medidas de 30x30x30 cm^{15,23,24}. Los adultos fueron alimentados con una dieta a base de una solución de sacarosa al 10% y las hembras además con sangre de *Mus musculus*, se mantuvieron a una temperatura de 25±2°C⁵⁹ y a una humedad de 70-75%^{20,21}. Para la ovoposición se acondicionaron recipientes de plástico de 10x10x5 cm. con agua libre de cloro⁶² y alrededor del recipiente papel filtro^{63,64}. Los adultos de *Ae. aegypti* emergidos de estos huevos eclosionados, fueron utilizados para la realización de los respectivos bioensayos.

La planta de *Ocimum basilicum* fue colectada del distrito de Simbal, provincia de Trujillo, Departamento de La Libertad (Perú) e identificada en el *Herbarium Truxillense* de la Universidad Nacional de Trujillo.

Obtención del extracto alcohólico de *O. basilicum*

• Extracción del extracto etanólico de *O. basilicum*

El extracto fue preparado siguiendo el protocolo de Renisheya et al²⁵ as hojas frescas (gramos) fueron secadas y pulverizadas utilizando un moledor, el material pulverizado fue remojado en etanol por 48 horas en una temperatura ambiente. Después del remojo, el extracto fue filtrado usando papel filtro Whatman N° 41. El filtrado fue colectado y guardado a 4°C²⁶

Determinación del efecto larvicida

▪ Preparación de las concentraciones usadas

Las concentraciones de 1.5% 2.0% y 4.5% fueron preparadas según Basheer⁶⁷ siendo obtenidas a partir de la solución de 30% de extracto alcohólico y se añadió agua destilada hasta completar unos 250 ml, luego fueron transferidos al recipiente de experimentación, el control fue con etanol al 1%. Se colocaron 25 larvas de estado IV temprano de *Ae. aegypti* en un recipiente de plástico de 500mL, en cuatro recipientes en total, colocándose unos 250 mL de agua destilada en cada recipiente para someterla a condiciones de estrés; los recipientes fueron cubiertos con un pedazo de malla sujetados firmemente con una liga, por 24 horas antes del experimento.

▪ Bioensayo

Se colocaron los 250 mL preparados de cada concentración en los recipientes de 500mL incluyendo el control, después se colocaron 20 larvas de cara recipiente que fue sometido a estrés con ayuda de un pincel. Se realizó cinco repeticiones: Dos para la población Sullana y tres para la cepa Rockefeller siendo todos mantenidos a la misma temperatura de 27 ± 2°C^{6y} a una humedad de 70-75 %²⁶

▪ Cálculo del porcentaje de mortalidad

Después de 3, 6, 9, 12 y 24 horas desde el inicio de la colocación de las larvas el número de muertos y vivos fue contado y se realizó la curva de muerte. El tiempo de muerte de las larvas fue contado cada 5 minutos hasta los 360 minutos, para determinar el porcentaje de mortalidad se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de mosquitos muertos}}{N^{\circ} \text{ de mosquitos expuestos}} \times 100$$

Determinación del efecto insecticida

▪ Preparación de las concentraciones usadas:

Se preparó las concentraciones a partir de la solución madre, siendo diluidas en alcohol para cada prueba, se siguió el protocolo del ensayo biológico de a botella del Centro Para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC)²⁸, colocando 1mL en tres botellas de cada concentración, posteriormente se recubrió toda la botella agitándola y rodándola suavemente como indica el protocolo, la botella control se recubrió con 1mL de agua destilada y etanol absoluto respectivamente. Las botellas fueron secadas a las 24 horas antes de colocarlas en posición vertical. Se colocaron 25 adultos al azar de *Ae. aegypti* con la ayuda de un tubo colector, en un recipiente de plástico de 500mL en cuatro recipientes en total para someterla a condiciones de estrés; los recipientes fueron cubiertos con un pedazo de malla sujetados firmemente con una liga, por 24 horas antes del experimento y alimentados a través de un algodón remojado con 10% de dilución de azúcar.

▪ Bioensayo

Se colocaron 20 adultos de *Ae aegypti* de los sometidos a estrés y con la ayuda de un tubo colector, en la botella seca y cubiertos con un pedazo de malla sujetados firmemente con una liga para prevenir el escape; lo mismo se realizó para las demás botellas. Los mosquitos fueron provistos de 10% de dilución de azúcar

estéril en un algodón remojado y fue colocado encima de las botellas. Se realizó cinco repeticiones: Dos para la población Sullana y tres para la cepa Rockefeller.

▪ **Cálculo del porcentaje de mortalidad**

Después de los 300 minutos desde el inicio de la exposición los mosquitos fueron considerados muertos si ellos se encontraban tumbados sobre sus espaldas o de lado en la parte inferior de la botella y si no podían volar después de unos suaves golpecitos en la botella. El número de muertos y vivos será contado y se realizará la curva de muerte, determinándose el porcentaje de mortalidad mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de mosquitos muertos}}{N^{\circ} \text{ de mosquitos expuestos}} \times 100$$

Análisis de datos y análisis de los CL₅₀ y CL₉₀

Los datos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias T-student, a fin de determinar las diferencias significativas entre los grupos experimentales y control con un grado de significancia de 0.05³⁷ Los valores de CL₅₀ (concentración letal que mató al 50% de la población) y CL₉₀ (concentración letal que mató al 90% de la población), la actividad larvicida y adulta fueron calculados mediante el programa de análisis de la agencia de protección ambiental (EPA Analysis Program) versión 1.5²⁹

RESULTADOS

Se encontró que hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales y controles (etanol al 1%), que la concentración de 4.5% causó la mortalidad del 100% de la población en tan solo 60 minutos para cepa Rockefeller y cepa Sullana y que, a pesar que la concentración de 1.5 y 2.0% no tiene diferencia significativa entre éstos, la concentración de 4.5% obtuvo una diferencia significativa para ambas cepas de *Ae. aegypti*. (p<0.05) (Figs. 1, 2, 3 y 4)

Los resultados del Programa de análisis de la agencia de protección ambiental (EPA Analysis Program) versión 1.5 de los bioensayos para determinar la actividad insecticida en larvas del extracto esencial de *O. basilicum*, permitieron establecer las concentraciones letales, la concentración letal media (CL₅₀) y la concentración letal 90 (CL₉₀) encontradas en el trabajo fue CL₅₀ de 2.900% y CL₉₀ de 4.783% para la cepa Sullana (Tabla 1) y un CL₅₀ de 3.158% y CL₉₀ de 5.924% para la cepa Rockefeller (Tabla 2),

En las Figuras 4, 5, y 6 indican los resultados obtenidos al colocar el extracto de *O. basilicum* en la botella donde se encontraban los adultos de *Ae aegypti*. (Método CDC) Se observa variación en la mortalidad en las concentraciones utilizadas de 15%, 20% y 30% de extracto alcohólico de *O. basilicum* mostrando efectos estadísticamente significativos en comparación con los controles (etanol al 100%) (p≤0.05) (Figura 8) que mostraron una escasa mortalidad. La concentración de 30% afectó drásticamente causando la mortalidad del 100% de la población, que murieron todos a los 45 minutos de la exposición, siendo altamente significativo (p<0.05).

Los resultados del Programa de análisis de la agencia de protección ambiental (EPA Analysis Program) versión 1.5 de los bioensayos para determinar la actividad insecticida en adultos del extracto esencial de *O. basilicum*, permitieron establecer las concentraciones letales CL₅₀= 24.260% y CL₉₀= 29.390% para la cepa Sullana (Tabla 3) y un CL₅₀ de 24.468 y CL₉₀ de 30.295 para la cepa Rockefeller (Tabla 4) , encontrándose que no existe diferencia significativa entre cepas, pero si existe diferencia significativa entre las concentraciones (Figura 8)

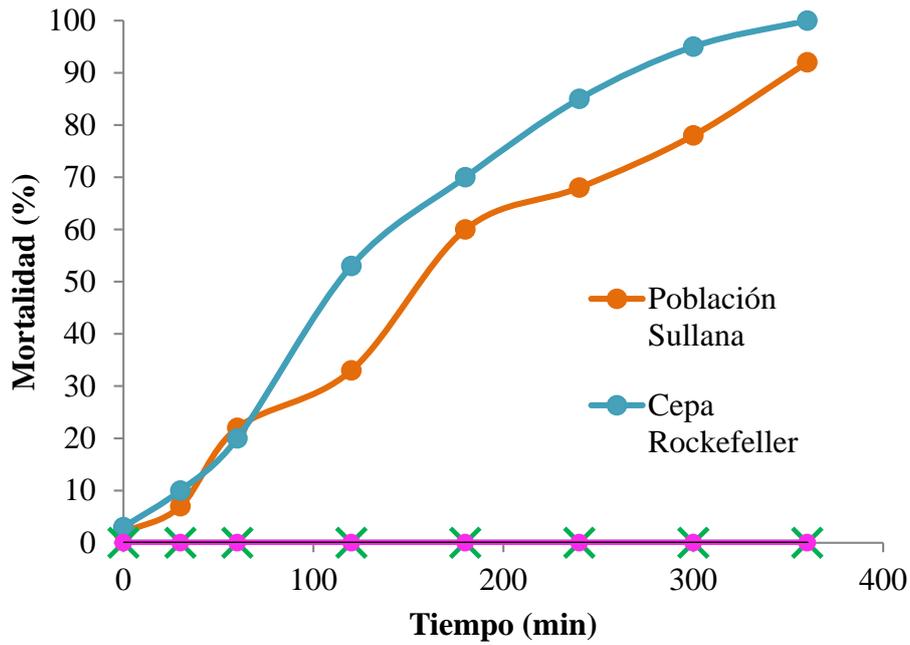


Fig. 1: Porcentaje de mortalidad de larvas IV tempranas de *Aedes aegypti* cepa Sullana y cepa Rockefeller expuestas al extracto etanólico de *Ocimum basilicum* al 1.5%

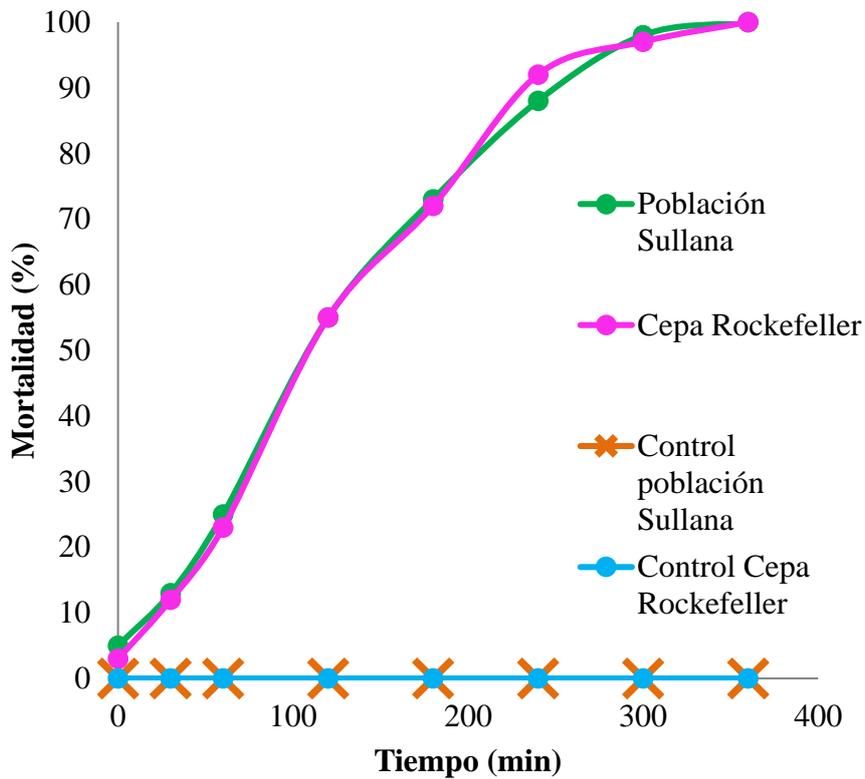


Fig. 2: Porcentaje de mortalidad de larvas IV temprana de *Aedes aegypti* cepa Sullana y cepa Rockefeller expuestas al extracto etanólico de *Ocimum basilicum* al 2.0%

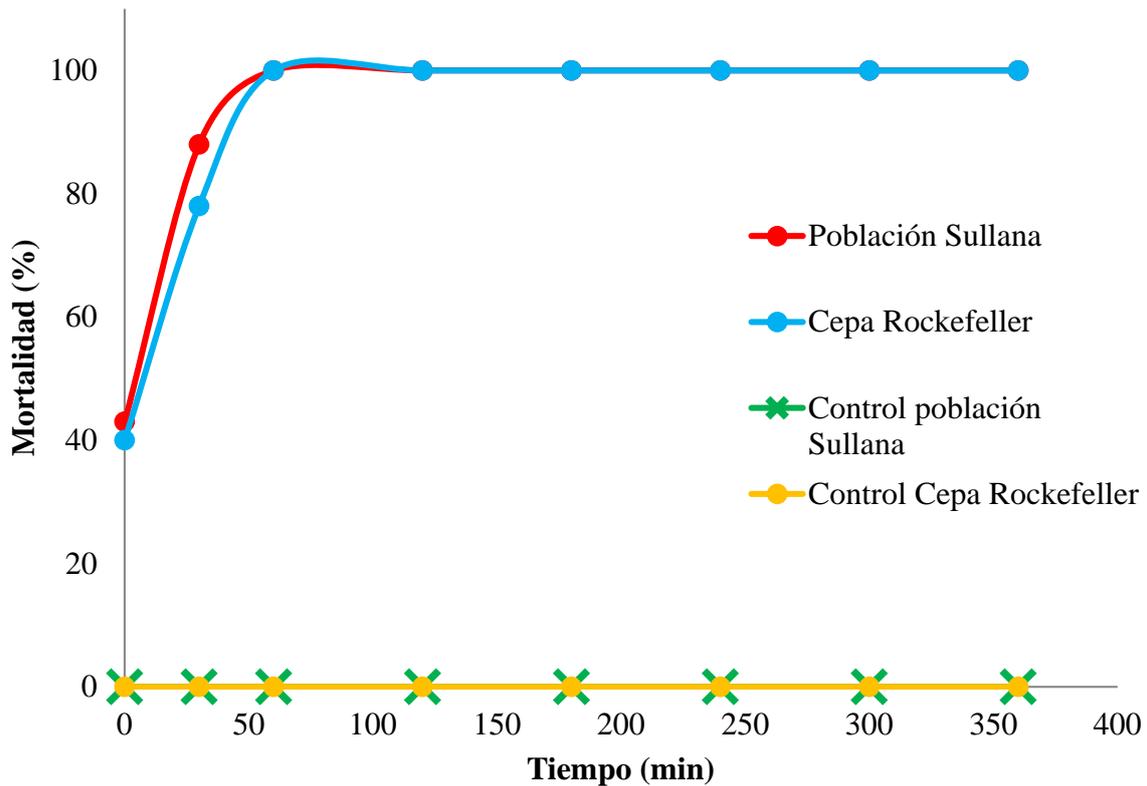


Fig. 3: Porcentaje de mortalidad de larvas IV tempranas de *Aedes aegypti* cepa Sullana y cepa Rockefeller expuestas al extracto etanólico de *Ocimum basilicum* al 4.5%

Tabla 1: Concentración letal media (CL₅₀) y concentración letal 90 (CL₉₀) del extracto alcohólico de *Ocimum basilicum* contra larvas IV tempranas de *Aedes aegypti* cepa Sullana.

Extracto alcohólico	Concentración % (v/v)	%Mortalidad	CL ₅₀	CL ₉₀	χ^2_c
<i>Ocimum basilicum</i>	1.5	7%	2.900 %	4.783 %	0.524
	2.0	13%			
	4.5	88%			
	Control (agua destilada)	0%			
	Control (etanol 1%)	0%			

Tabla 2: Concentración letal media (CL₅₀) y concentración letal 90 (CL₉₀) del extracto alcohólico de *Ocimum basilicum* contra larvas IV tempranas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller.

Extracto alcohólico	Concentración % (v/v)	%Mortalidad	CL ₅₀	CL ₉₀	χ^2_c
<i>Ocimum basilicum</i>	1.5	10%	3.158 %	5.924 %	0.872
	2.0	12%			
	4.5	78%			
	Control (agua destilada)	0%			
	Control (etanol 1%)	0%			

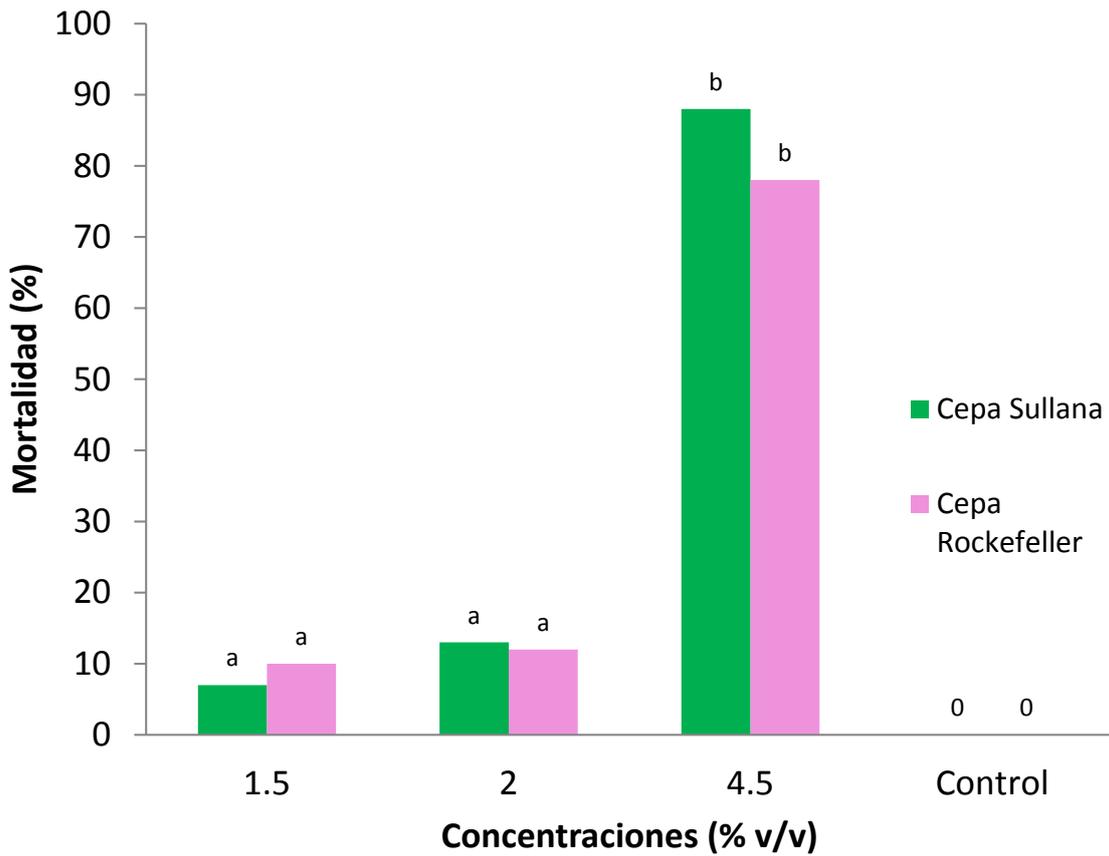


Fig. 4: Porcentajes de mortalidad de larvas IV tempranas de *Aedes aegypti* cepas Sullana y Rockefeller tratadas a diferentes concentraciones (1.5%, 2.0% y 4.5%) del extracto alcohólico de *O. basilicum* y control (etanol 1%). Letras diferentes presentan diferencia significativa entre grupos

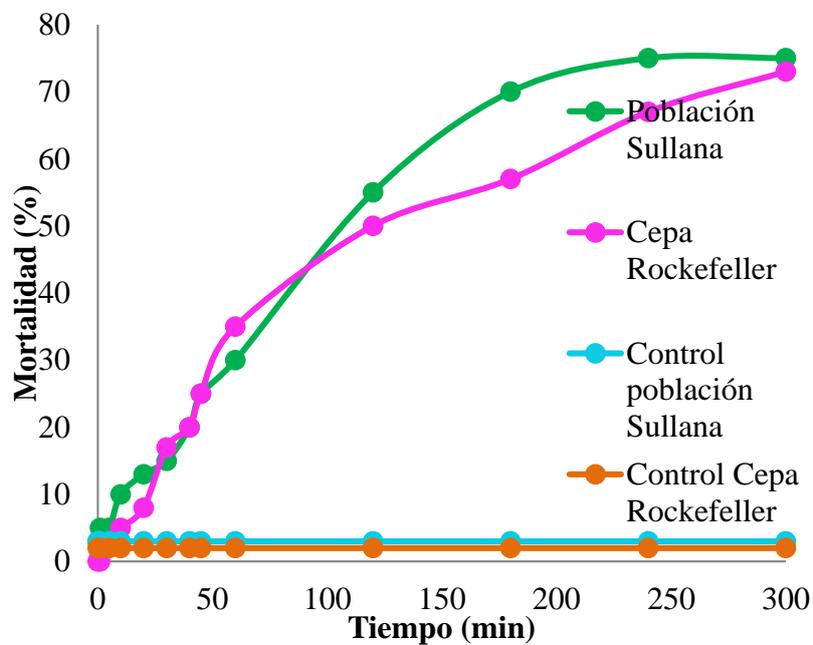


Fig. 5: Porcentaje de mortalidad de adultos de *Aedes aegypti* cepa Sullana y cepa Rockefeller expuestas al extracto etanólico de *Ocimum basilicum* al 15%

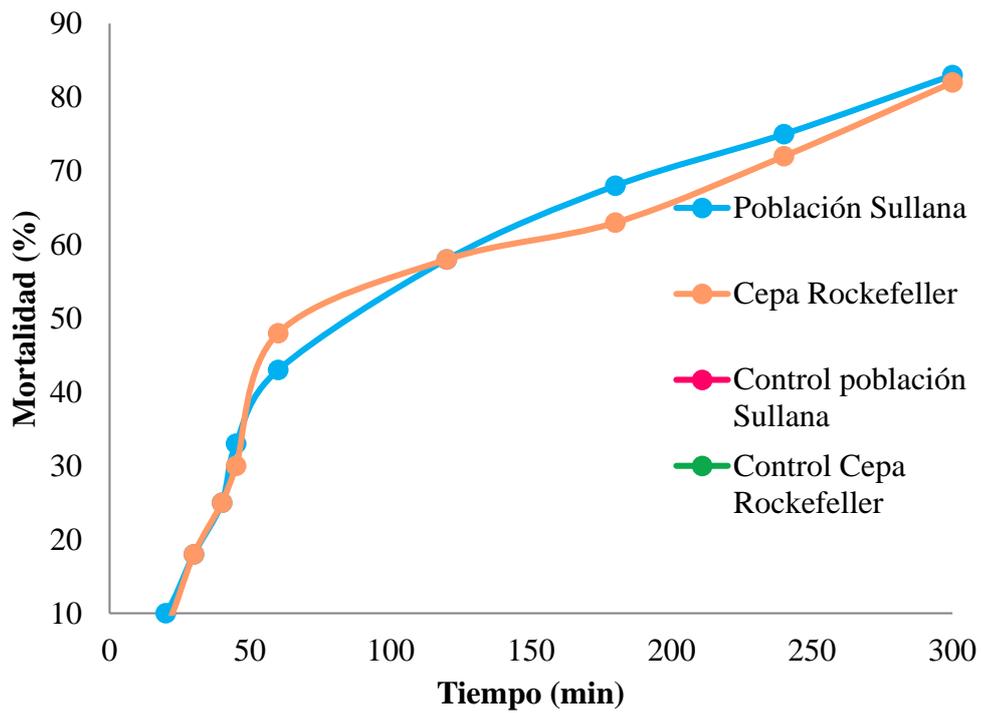


Fig. 6: Porcentaje de mortalidad de adultos de *Aedes aegypti* cepa Sullana y cepa Rockefeller expuestas al extracto etanólico de *Ocimum basilicum* al 20%

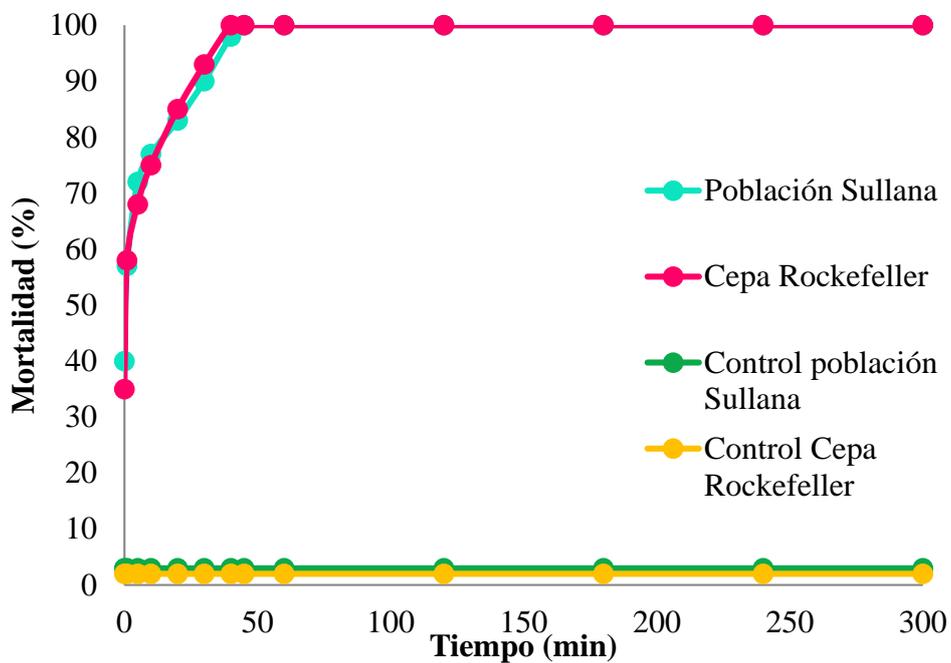


Fig. 7: Porcentaje de mortalidad de adultos de *Aedes aegypti* cepa Sullana y cepa Rockefeller expuestas al extracto etanólico de *Ocimum basilicum* al 30%

Tabla 3: Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) y concentración letal 90 (CL₉₀) del extracto alcohólico de *Ocimum basilicum* contra adultos de *Aedes aegypti* cepa Sullana.

Extracto alcohólico	Concentración % (v/v)	%Mortalidad	CL ₅₀	CL ₉₀	X _c ²
<i>Ocimum basilicum</i>	15%	17%	24.260 %	29.390 %	1.342
	20%	18%			
	30%	93%			
	Control (agua destilada)	3%			
	Control (Etanol 100%)	2%			

Tabla 4: Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) y concentración letal 90 (CL₉₀) del extracto alcohólico de *Ocimum basilicum* contra adultos de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller

Extracto alcohólico	Concentración % (v/v)	%Mortalidad	CL ₅₀	CL ₉₀	X _c ²
<i>Ocimum basilicum</i>	15%	15%	24.468 %	30.295 %	1.145
	20%	18%			
	30%	90%			
	Control (agua destilada)	3%			
	Control (Etanol 100%)	3%			

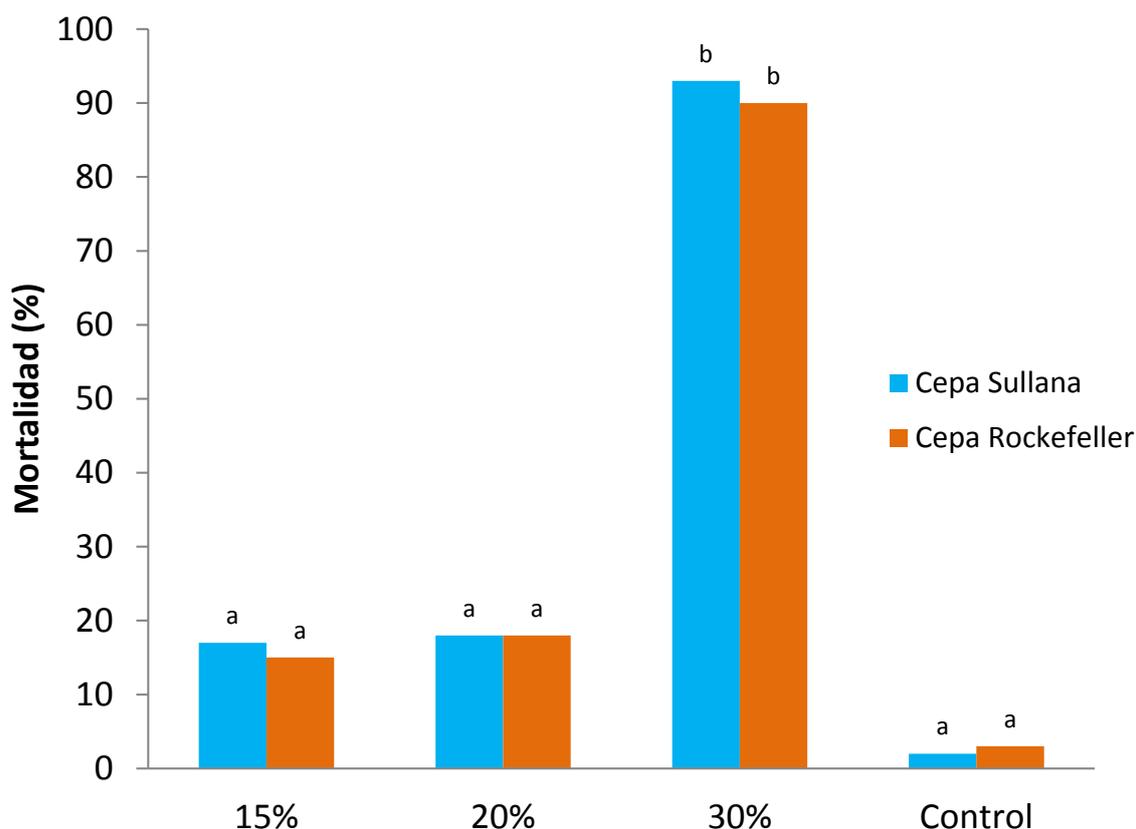


Fig. 8: Porcentajes de mortalidad de adultos de *Aedes aegypti* cepas Sullana y Rockefeller tratadas a diferentes concentraciones (15%, 20% y 45% -% v/v) del extracto alcohólico de *Ocimum. basilicum* y control (etanol 100%): **Letras diferentes presentan diferencia significativa entre grupos**

DISCUSIÓN

El efecto larvicida, 100% para ambas poblaciones, se debería a que esta planta presenta alcaloides, glicósidos, flavonoides, fenoles, saponinos, triterpenoides, proteínas, resinas, esteroides y taninos en el extracto alcohólico las cuales son conocidos por tener propiedades larvicidas, ninfocidas y adulticidas en insectos algunos compuestos fenólicos como linalool y eugenol identificados en esta especie, se demostró su eficacia en hongos: el linalool se encuentra en mayor cantidad en esta planta. Dentro de los compuestos fenólicos que posee *O. basilicum* se encuentran monoterpenos como el metileugenol, que se ha demostrado que tiene propiedades insecticidas, siendo éste más tóxico que los terpenos cineol, limoneno, p-cimeno y más efectivo en actividad knockdown, así como repelente y en mortalidad²⁵. También indujo el 100% de mortalidad en larvas IV de *Ae. aegypti*.

Otro componente presente en *O. basilicum* es el metilclavicol, o también conocido como estragol, Nour et al²⁷ determinaron que el metilclavicol y el geranial - geraniol extraído del aceite esencial en dosis de 500 µg/ml causó el 100% de mortalidad en larvas III de *Aedes aegypti* después de tres y seis horas respectivamente siendo el LC₅₀ y LC₉₀ de 160 µg/ml y 262 µg/ml para el metilclavicol y 174 µg/ml y 356 µg/ml para el geranial- geraniol.

Los resultados obtenidos en el trabajo concuerdan con Aidaross⁷⁹ et al que demostraron que la más alta concentración de 10 000 ppm del extracto acuoso de *O. basilicum* causó el 20%, 30%, 50% y 60% de mortalidad exponiendo a 1, 2, 3, 4 y 24 horas en larvas III de *Cx. quinquefasciatus* respectivamente siendo la concentración de 1000 ppm la más eficaz produciendo una mortalidad de 10%, 10% y 26% a las 3, 4 y 24 horas de exposición. Así como con Aarthi y Murugan⁵³ que estudiaron que la mortalidad incrementa con el aumento de la concentración, encontrando así 78%, 81% y 84% de mortalidad para larva IV, III y II de *An. stephensi* respectivamente, producido por el tratamiento del extracto metanólico al 2%

En el presente trabajo la concentración letal media (CL₅₀) y la concentración letal 90 (CL₉₀) encontradas fue un CL₅₀ de 2.900% y CL₉₀ de 4.783% para la cepa Sullana (Tabla 1) y un CL₅₀ de 3.158% y CL₉₀ de 5.924% para la cepa Rockefeller (Tabla 2), estos resultados difieren de Maurya et al⁵⁴ que comprobaron el efecto larvicida del extracto de éter petróleo de *O. basilicum* teniendo valores de LC₅₀ de 8.29±1.92 ppm y 4.57±1.24 ppm para las 24 y 48 horas respectivamente y un LC₉₀ de 87.69±34.35 ppm para las 24 horas y un LC₉₀ de 47.25±16.01 ppm para las 48 horas, todos para *An. stephensi* Anteriormente evaluaron el extracto de éter petróleo de éter petróleo obteniendo un CL₅₀ de 4.57 ppm y 6.06 ppm a las 24 y 48 horas para *Cx. quinquefasciatus* y una CL₅₀ 8.29 ppm a las 24 y 10.06 ppm a las 24 y 48 horas contra larvas de *An. stephensi*²⁵.

Otros reportes que demuestran la actividad larvicida encontrada es el de Manzoor et al²⁹ que estudiaron la eficacia de aceite esencial de *O. basilicum* contra *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* (Say) con un LC₅₀ de 75.35 ppm y 92.30 ppm respectivamente y Chavan y Nikam²⁸ mostraron el efecto larvicida que indujo el 100% de mortalidad en *Cx. quinquefasciatus* a la concentración de 0.12%. y Govindarajan et al.²¹ que encontraron que el aceite esencial posee propiedades larvicidas con un LC₅₀ de 9.75, LC₉₀ 18.56 ppm para *An. subpictus*, un LC₅₀ de 14.01, LC₉₀ 23.44 ppm para *Culex tritaeniorhynchus* y un LC₅₀ de 11.97, LC₉₀ 23.44 ppm para *Aedes albopictus*

Basheer⁶⁷ encontró un LC₅₀ de 705, 532, 455 ppm a las 24, 48 y 72 horas en larvas III de *An. arabiensis* producido por el extracto etanólico de hojas de *O. basilicum*, sin embargo se encontró un menor LC₅₀ por el extracto etanólico de las semillas con una LC₅₀ de 657, 556, 442 ppm a las 24, 48 y 72 horas, a pesar de estos resultados se extrajo el extracto alcohólico de las hojas en el trabajo ya que estudios como el de Inbaneson et al⁴⁴ demostraron que las hojas de *O. basilicum* tienen más baja CL₅₀ que las semillas, raíces y flores para *Plasmodium falciparum* con un CL₅₀ de 43.81 mientras el resto de 63.67, 78.69 y 76.75 µg/ml de extracto alcohólico, mostrando que el extracto de hojas es más eficaz que el extracto de semillas pudiéndose deber a la alta concentración de aceites esenciales en la hoja que son conocidos por ser tóxicos debido a que posee alcaloides, taninos, proteínas que no se encuentran en las semillas ni en los tallos²².

A pesar que Murugan et al⁵⁵ encontraron valores de LC₅₀ y LC₉₀ para el extracto metanólico de hojas de *O. basilicum* en larvas de I, II, III, IV y pupa de *Ae. aegypti* de 3.734% y 7.528% para larva I, 4.154 y 8292 para larva II, 4.664% y 8.746% para larva III, 5.124 y 9.767% para larva IV y 5.449 y 15.474% para pupas; estos resultados son diferentes a los encontrados en el presente trabajo lo cual se debería a la composición química de la planta que difiere en variedades encontrándose diferentes variedades de la planta como *O. basilicum* L. var minima Benth, contenía geraniol (45%) y eugenol

(25%) como los mayores componentes, *O. basilicum* L. var *glabratum* Benth., quimiotipo N° 1 contenía metilclavicol (38%) y linalool (35%). *O. basilicum* var *glabratum* Benth., quimiotipo N° 2 contiene linalool (47%) y eugenol (20%) como los mayores componentes; *O. basilicum* L. var. *glabratum* Benth., quimiotipo N° 3 contiene linalool (40%) eugenol (20%) y camphor (20%) *O. basilicum* L. var *purpurascence* Benth. contiene methylcinnamato (20 %) y linalool (60 %); *O. basilicum* L. var *tryrsiflora* Benth. contiene metilcinamato (35 %) y linalool (60 %); *O. basilicum* L. var *crispum* Benth. contiene metilelavicol (50 %) y linalool (28 %); y *O. basilicum* L. var *darkapal* contiene geraniol (35 %), linalool (35 %) y eugenol (25 %)²³.

Además de los anteriores quimiotipos presentados, existen otras clasificaciones de acuerdo al origen geográficos como el quimiotipo Europeo, presentando el linalool y estragol como componentes principales; el quimiotipo Reunión, se caracteriza por altas concentraciones de estragol; el quimiotipo tropical, es rico en cinamato de metilo; y un quimiotipo de África del norte y de la antigua Unión Soviética es rico en eugenol⁸⁴ y los descritos por Koba⁸⁵ que son quimiotipos provenientes de Togo, siendo del tipo estragol, el tipo linalool/estragol, el tipo metileugenol, tipo metileugenol T- anetol y el tipo anetol Nour et al⁸⁶ demostraron el efecto insecticida varía con la variabilidad encontrándose que a 500 µL/L el aceite esencial de *O. basilicum* como planta ornamental proveniente de Sudán produjo una mortalidad del 60% de larvas del III estado de *Anopheles* sp. mientras el aceite esencial de como planta silvestre proveniente de Sudán obtuvo un 90% a las 3 horas y el aceite esencial de proveniente de Emiratos Árabes Unidos y el de Alemania obtuvieron ambos un 100% de mortalidad a las 3 horas, encontrándose un LC₅₀ de 300 µL/L para el proveniente de Sudán utilizado como planta ornamental, 280 µL/L para el proveniente de Sudán como planta silvestre, 190 µL/L para el proveniente de Emiratos Árabes Unidos y 16.200 µL/L para el proveniente de Alemania, el cual indicaría que la efectividad del efecto larvicida está en relación con su variedad; y con Umesh et al¹⁷ que encontró un LC₅₀ de 10 µg/ml para el aceite esencial de *O. basilicum* var. *purpurascens* para *Ae. albopictus*.

La actividad insecticida del extracto alcohólico de *O. basilicum* en adultos de *Ae. aegypti* mostró que la concentración letal incrementa con la concentración y el tiempo de exposición (Figura 5, 6, 7). Las concentraciones más bajas de extracto alcohólico utilizadas (1.5%, 2% y 4.5%) afectan en el aumento de la mortalidad de las larvas pero son menos eficaces en la mortalidad de los adultos, por esta razón se utilizaron concentraciones más elevadas. Se observó que los zancudos muertos tuvieron cierta atracción hacia el extracto alcohólico y quedaron paralizados hasta tener el knockdown, estas propiedades como atrayente concuerdan con la presencia de fenoles el cual los polifenoles actúan como atrayente para insectos y microbios^{11,18} el 99% mortalidad se encontró a los 40 minutos (Figura 7) indicando que el extracto tiene propiedades insecticidas lo cual se debería a que esta planta presenta alcaloides, glicósidos, flavonoides, fenoles, saponinos, triterpenoides, proteínas, resinas, esteroides y taninos en el extracto alcohólico⁴⁴. Ya que como se había explicado antes, contienen monoterpenos como el metileugenol, eugenol y linalool que se han demostrado que tienen efectos insecticidas.

Uno de los monoterpenos como el metileugenol también se utilizó como fumigante siendo muy tóxico para *Ceratitis capitata* y *Bactrocera cucurbitae* comparado con el aceite esencial de *O. basilicum*, linalool, estragol y e-anetol que no mostraron efecto knockdown a la concentración de 0.75%. Después de dos horas de exposición al metil eugenol a concentraciones de 0.5 y 0.75% la mortalidad /knockdown fue de 96 y 100% contra *C. capitata* y 98 y 08% contra *Ba. cucurbitae*¹⁹.

El mecanismo de acción que posee los monoterpenos como el metileugenol se debería a que son inhibidores de la acetilcolina esterasa un enzima responsable de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina¹⁷, como los insecticidas sintéticos quedando la enzima bloqueada e inactiva, de esta manera las concentraciones sinápticas de acetilcolina aumentan y ocurre una hiperexcitación del sistema nervioso central paralizando la transmisión nerviosa reportándose hiperactividad, convulsiones, temblores, seguido por parálisis “knockdown” una pérdida de la locomoción²⁴ e incluso la muerte²⁰. Otro de los monoterpetos con esta propiedad es el linalool, que se ha encontrado en trabajos como el de López Belchi⁷⁴ que es un inhibidor de la acetilcolinesterasa; por lo tanto también tiene un modo de acción como el metileugenol, como lo indica Pravena y Sanjayan⁹¹ siendo el linalool un inhibidor de la de acetilcolinesterasa de *Ae. aegypti* con mayor actividad. actuando en el sistema nervioso afectando el transporte de iones e inhibiendo la acetilcolinaesterasa^{28,31}.

Los resultados encontrados concuerdan con Zahir et al⁵². que observaron un 100% de mortalidad a las 24 horas en adultos de *An. stephensi*, causada por el extracto de etil acetato de *O. basilicum*, con una CL₅₀ de 93.02 µg/ml y una IE₉₀ de adultos es 705.09 µg/ml del extracto de cloroformo. Akono et

al³¹ estudiaron que tuvo una mortalidad de 100% a la concentración de 250 ppm para *Anopheles funestus* ss y Belong et al³² con una LC₅₀ de 84 ppm para el mismo mosquito. También concuerda con Bhatnagar³² et al que reportó que el aceite esencial y su mayor constituyente: metil clavicol en dosis de 0.003 ml/43.0 cm² y 0.001 ml/ 43.0 cm² indució el 100% de mortalidad en *An. stephensi*, *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus*.

El presente trabajo indicaría que el extracto alcohólico de *O. basilicum* posee propiedades larvicidas y adulticidas para *Ae. aegypti* siendo debido a la presencia de alcaloides, glicósidos, flavonoides, fenoles, saponinos, triterpenos, proteínas, resinas, esteroides, taninos y monoterpenoides como el linalool y metileugenol que actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa, de esta manera alteran el sistema nervioso y contribuyen a su muerte.

CONCLUSION

- Las concentraciones de 1.5, 2.0 y 4.5% del extracto alcohólico de *O. basilicum* así como las de 15, 20 y 30% tienen efecto larvicida y adulticida respectivamente con un CL₅₀ de 2.9% para las larvas de la población Sullana y de 3.158% para la de la cepa Rockefeller asimismo un CL₅₀ de 24.26% para los adultos de la población Sullana y 24.468% para los de la cepa Rockefeller.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marquetti Fernandez MC. Aspectos bioecológicos de importancia para el control de *Aedes aegypti* y otros culicidos en el ecosistema urbano. [Tesis doctoral]. La Habana. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Departamento de control de vectores, 2008.
2. Salvatella Agrelo R. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. Rev Med Uruguay. 1996; 12(1): 28 – 36.
3. Tsao R, Romanchuk FE, Peterson CJ, Coats JR. Plant growth regulatory effect and insecticidal activity of the extracts of the Tree of Heaven (*Ailanthus altissima* L.). BMC Ecol. 2002; 2: 1-6
4. Chiu BC, Dave BJ, Blair A, Gapstur SM, Zahm SH, Weisenburger DD. Agricultural pesticide use and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma. Blood. 2006; 108(4):1363-9.
5. Fathiazad F, Matlobi A, Khorrami A, Hamedeyazdan S, et al. Phytochemical screening and evaluation of cardioprotective activity of ethanolic extract of *Ocimum basilicum* L. (basil) against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. Daru. 2012; 20(1):87.
6. Reyes JA, Patiño JG, Martínez JR, Stashenko EE. Caracterización de los metabolitos secundarios de dos especies de *Ocimum* (Fam. Labiatae), en función del método de extracción. Scientia et Technica. 2007; 33:121-123.
7. Chiang L, Ng L, Cheng P, Chiang W, Lin C. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2005; 32: 811–16.
8. Opalchenova G, Obreshkova D. Comparative studies on the activity of basil--an essential oil from *Ocimum basilicum* L.--against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. J Microbiol Methods. 2003; 54(1):105-110.
9. Ji-Wen Z, Sheng-kun L, Wen-jun W. The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth, Molecules. 2009; 14: 273–278.
10. Anees A. Larvicidal activity of *Ocimum sanctum* Linn. (Labiatae) against *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Parasitol Res. 2008; 103(6):1451-3.
11. Oparaocha ET, Iwu I, Ahanakuc JE. Preliminary study on mosquito repellent and mosquitocidal activities of *Ocimum gratissimum* (L.) grown in eastern Nigeria. J Vector Borne Dis. 2010; 47(1):45-50.
12. Kéita SM, Vincent C, Schmit J, Arnason JT, Bélanger A. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) J Stored Prod Res. 2001; 37(4):339-349.
13. Maurya P, Sharma P, Mohan L, Batabyal L, Srivastava C. Evaluation of the toxicity of different phytoextracts of *Ocimum basilicum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. Journal of Asia-Pacific Entomology. 2009; 12(2): 113-115.

14. Aarthi N, Murugan K. Larvicidal and repellent activity of *Vetiveria zizanioides* L., *Ocimum basilicum* Linn and the microbial pesticide spinosad against malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Insecta: Diptera: Culicidae). J of Biopes 2010; 3: 199-204.
15. Maurya P, Sharma P, Mohan L, Mohan M, Narayan C. Larvicidal efficacy of *Ocimum basilicum* extracts and its synergistic effect with neonicotinoid in the management of *Anopheles stephensi*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2012; 110-116.
16. Murugan K, Murugan P, Noortheen A. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta: Diptera: Culicidae). Bioresour Technol. 2007; 98(1):198-201.
17. Siriporn P, Mayura S. The effects of herbal essential oils on the oviposition-deterrent and ovidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). Trop Biomed. 2012; 29(1):138-50.
18. Mandal S, Mandal M, Pal N. Enhancing chloramphenicol and trimethoprim in vitro activity by *Ocimum sanctum* Linn. (Lamiaceae) leaf extract against *Salmonella enterica* serovar Typhi. Asian Pac J Trop Med. 2012 Mar; 5(3): 220- 224.
19. Basheer A. Larvicidal activity of *Ocimum basilicum* L. (basil) chemical extracts on *Anopheles arabiensis* Patton. J Pharm Biol Sci. 2013; 1(6): 66 – 73.
20. CDC. Instrucciones para la Evaluación de la Resistencia a Insecticida en Vectores mediante el ensayo Biológico de la Botella de los CDC. URL disponible en: www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/fsp/ir_manual/ir_cdc_bioassay_es.pdf
21. Manzoor F, Samreen K, Parveen Z. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae (Diptera: Culicidae). J. Anim. Plant Sci. 2013; 23(2): 420 – 424
22. Tripathi R, Banerji R, Sharma M, Balasubrahmanyam V, Nigam S. Essential oil from a new strain of *Ocimum gratissimum* against betelvine pathogenic fungi, Agric. Biol. Chem. 1985; 44 : 2277-2282.
23. Nour, Azhari H, Nour, Abdurahman H, Yusoff, Mashitah M. Bioactive Compounds from Basil (*Ocimum basilicum*) Essential Oils with Larvicidal Activity against *Aedes aegypti* Larvae. In: III International Conference on Biology, Environment and Chemistry. Thailand; 24 – 25 de Noviembre de 2012. Bangkok: IPCBEE; 2012. 21 – 24.
24. Aidaross M, Kohob W, Galalb M. Evaluation of repellent and larvicidal activity of *Ocimum basilicum* L. and *Cymbopogon citratus* DC. Against *Culex quinquefasciatus*. Inti Chern. Pharm. Med J. 2005; 2(2): 243 – 246
25. Chavan S, Nikam T. Mosquito larvicidal activity of *Ocimum basilicum* Linn. Indian J. Med Res. 1982; 75:220-222.
26. Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswary M, Yogalakshmi K. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). Exp Parasitol. 2013; 134(1):7-11.
27. Reyes J, Patiño J, Martínez J, Stashenko E. Caracterización de los metabolitos secundarios de dos especies de *Ocimum* (fam. Labiatae), en función del método de extracción. Scientia et Technica Año XIII. 2007; 1(3): 121 – 123.
28. Nour A, Elhussein S, Osman N. A study of the essential oils of four sudanese accessions of basil (*Ocimum basilicum* L.) against *Anopheles* mosquito larvae. Am. J. Applied Sci. 2009; 6(7): 1359 – 1363
29. Umesh B, Leeja L, Thoppil E. A study on mosquito larvicidal activity of essential oil of four species of *Ocimum* against *Aedes albopictus*. Skuse. International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences. 2014; 4(2): 1-4.
30. Akono P, Belong P, Tchoumboungang F, Bakwo E, et al. Composition chimique et effets insecticides des huiles essentielles des feuilles fraîches d' *Ocimum canum* Sims et d' *Ocimum basilicum* L. sur les adultes d' *Anopheles funestus* ss. Vecteur du paludisme au Cameroun. J. Appl. Biosci. 2012; 59: 4340-4348.
31. Belong P, Akono P, Bakwo E, Foko G, Tamesse J. Chemical composition and residue activities of *Ocimum canum* Sims and *Ocimum basilicum* L essential oils on adult female *Anopheles funestus* ss. J. Anim. Plant .Sci. 2013; 19 (1): 2854-2863.
32. Bhatnagar M, Kapur K, Jalees S, Sharma S. Laboratory evaluation of insecticidal properties of *O. basilicum* Lin. and *O. sanctum* Lin. Plants, essential oils and their major constituents against vector mosquito species. J Entomol Res 1993; 17: 21–6.



Ciclo biológico y Tabla de Vida de *Aedes aegypti*, en laboratorio: Trujillo (Perú), 2014

Biological cycle and Life Table of *Aedes aegypti*, under laboratory conditions: Trujillo (Peru), 2014

Elia Quispe-Pretel, Aida Carbajal-Villaverde, Janeth Gozzer-Fernández y Bertha Moreno-Rodríguez

¹Tesista Escuela AP de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú. ²Departamento de Entomología (UNT), ³Laboratorio Referencial de la Gerencia Regional de Salud de La Libertad

RESUMEN

Se determinó las características del ciclo biológico y se obtuvo la Tabla de Vida de *Aedes aegypti* L., en condiciones de laboratorio, Trujillo (Perú) 2014. La investigación se realizó en el Laboratorio Referencial de la Gerencia Regional de Salud de La Libertad, a una temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ y $80\pm 15\%$ de humedad. Las larvas fueron alimentadas con "Super Cat[®]" y los adultos con agua azucarada además a las hembras se les alimentó con sangre humana para la oviposición. Según los resultados obtenidos, se concluyó que el ciclo biológico fue de aproximadamente 18 días y respecto a la tabla de vida se encontró que la tasa de mortalidad fue mayor en adultos de 46 a 55 días, siendo para los padres del 50% y para la F1 del 81%. La esperanza de vida fue aproximadamente de 11 días y ésta fue disminuyendo conforme avanzó en edad. La curva de supervivencia fue del tipo I y la longevidad fue mayor para las hembras con 44 días, mientras que para los machos fue de 29 días.

Palabras clave: *Aedes aegypti* L., Ciclo biológico, Tabla de vida. Supervivencia, Mortalidad.

ABSTRACT

The biological cycle characteristics and Life Table of *Aedes aegypti* L., under laboratory conditions, Trujillo (Peru) 2014 were determined. The research was conducted in the Reference Laboratory of the Regional Health Management-Headquarters of La Libertad, at the temperature of $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ and $80 \pm 15\%$ humidity. The larvae were fed with "Super CatTM". The adult were fed with sugared water, and the female were also fed with human blood for oviposition. According to the results, it was concluded that the biological cycle was approximately 18 days. And regarding the life table, it was found that the mortality rate was higher in adult aged 46-55 days; that is, 50% for parents and 81% for F1. The life expectancy was about 11 days and it started to decrease as it advanced in age. The survival curve was of type I and the longevity was greater for female 44 days, while for male ones it was only 29 days.

Keywords: *Aedes aegypti* L., Biological cycle, Life table, Survival, Mortality.

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos hematófagos son los responsables de la transmisión biológica de varios agentes patógenos causantes de enfermedades como la malaria, bartonelosis, leishmaniasis, dengue y fiebre Chicungunya, entre otros^{1,2}. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente ocurre un estimado de 50 millones de infecciones por el virus del dengue y aproximadamente 2,5 mil millones de personas viven en países endémicos debido a que el vector: *Aedes aegypti* L., (Diptera: Culicidae) presenta adaptación al ambiente y al comportamiento urbano³.

Ae. aegypti es originario de Etiopía (Africa) y se encuentra distribuido y adaptado a las regiones tropicales y subtropicales del mundo⁵. El ciclo de desarrollo abarca siete días o un poco más, dependiendo de la temperatura y de la disponibilidad del alimento. Las fases biológicas son de huevo, larva con cuatro instars, pupa y adulto. El comportamiento del adulto es diurno, sin embargo pueden prolongar su actividad durante la noche si la luz permanece encendida; prefieren criaderos artificiales como cilindros, baldes, floreros así como objetos de desecho que no son eliminados adecuadamente en ambientes domiciliarios o peridomiciliarios^{4,6}.

La necesidad de erradicar el dengue ha impulsado el desarrollo de investigaciones que permitan determinar los factores que influyen en el comportamiento del mosquito, como en el caso de las temperaturas elevadas y precipitaciones frecuentes que son determinantes, ya que mejoran la actividad y la proliferación del vector transmisor, siendo esto explicado por la ola epidémica del dengue del verano de 1986-1987 en Río de Janeiro, Brasil⁷. Se sabe que el proceso de colonización, es decir la crianza en laboratorio influye en la duración del ciclo biológico⁸. El desarrollo inmaduro de *Ae. aegypti* así como la oviposición pueden ser influenciado por el tipo y la calidad del agua, éste vector se reproduce en reservorios de agua limpia, aunque puede adaptarse a las nuevas situaciones impuestas por el hombre⁹. Se ha demostrado que la salinidad del agua, y los coliformes fecales y bacterias son factores que afectan la oviposición de este insecto, disminuyendo o aumentando respectivamente¹⁰.

El tamaño de los mosquitos es un indicador del lugar donde se cría, así lo demostró un estudio en el que se encontró que los individuos de mayor longitud provinieron de bebederos de animales; mientras que los valores más pequeños, de depósitos artificiales abandonados en los patios, resultado de esperarse porque éstos por lo general presentan bajo volumen de agua y pudiera existir posible competencia interespecífica por espacio y alimento¹¹. En Santiago de Cuba, se determinó que las pupas de *Ae. aegypti*, sobrevivieron y emergieron a adultos, a pesar de ser extraídas del agua y colocadas en tierra. Si estos resultados obtenidos en laboratorio sucedieran en la práctica de rutina, entonces una gran cifra de mosquitos adultos estarían emergiendo luego de la supuesta destrucción de focos detectados en estado de pupas, durante el vaciado del agua del depósito a la tierra, de esta manera persistiría la infestación¹².

En Perú, en el departamento de Ancash, se han realizado estudios de la duración del ciclo biológico de *Ae. taeniorhynchus* y de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio^{13,14}, y en La Libertad se ha investigado el efecto de plantas en el control de larvas y pupas de *Ae. aegypti*^{15,16}.

En el desarrollo del ciclo biológico de *Ae. aegypti* se puede determinar también aspectos sobre fecundidad y supervivencia de las poblaciones, que está en función de la edad de los individuos. Los procesos de mortalidad, natalidad, determinan el valor numérico de la población y se representan de manera sinóptica y sintética en tablas de vida¹⁷. Estos parámetros poblacionales que son obtenidas en condiciones de laboratorio son apropiados para estudiar poblaciones de vida corta como los mosquitos, y permiten estimar lo que está sucediendo en la naturaleza, que unido al conocimiento del ciclo biológico ofrecen información importante sobre aspectos necesarios para su control. Así, se determinó las principales características del desarrollo y tablas de vida de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio a partir de larvas colectadas en campo y se observó que los machos desarrollan más rápido que las hembras; sin embargo la esperanza de vida en las hembras es mayor que en los machos¹⁸. Asimismo, se estudió la fluctuación poblacional, patrones de dispersión, además de la esperanza de vida en condiciones de campo y de laboratorio de este mosquito, encontrándose que la población mantenida en laboratorio fue más longeva que la del campo y que los valores de los parámetros de crecimiento poblacional son altos para la población en condiciones de laboratorio¹⁹. Al mismo tiempo, se estudió a *Culex quinquefasciatus*, en la cual tres cohortes ubicadas en diferentes pisos altitudinales fueron evaluadas teniendo en cuenta diferencias en desarrollo, supervivencia y mortalidad, las que

fueron expresadas en una tabla de vida, cuyos valores permitieron determinar que se ha ido adaptando a zonas más altas con temperaturas menores²⁰.

Considerando la falta de referencias en Perú respecto de tablas de vida de *Ae. Aegypti* y que las condiciones ambientales influyen en la duración de su ciclo de vida se propuso una investigación que tuvo el propósito determinar las características del ciclo biológico y obtener de la tabla de vida de *Aedes aegypti*, en condiciones de laboratorio, Trujillo (Perú), 2014.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de Ejecución:

El trabajo se llevó a cabo en el área de Entomología Médica del Laboratorio Referencial de la Gerencia Regional de Salud de La Libertad (LRGRL), ubicado en el Jr. Ayacucho N° 314 de la ciudad de Trujillo-Perú.

Procedencia del Material Biológico

El ciclo biológico se realizó a partir de huevos, los que fueron proporcionados por el área de Entomología Médica, producto de la crianza masiva a partir de larvas colectadas en el distrito de Florencia de Mora-Trujillo en los meses de febrero y marzo del 2014, los que fueron conservados a una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}$ y humedad relativa en un rango de 75-80%.

Determinación del ciclo Biológico

- **Huevo:** Se hirvió 500 mL de agua, luego se vertió hacia una bandeja de plástico de 39 x 26 x 6 cm, así mismo se colocó un termómetro para medir la temperatura, ya que a 30°C se tenía que agregar 12g de azúcar. Una vez disuelta el azúcar se procedió a agregar 8mL de la solución preparada en cada una de las 11 divisiones de 5 cajas de “Pandora” N°10. Luego se colocó los huevos individualmente en cada uno de las divisiones de la caja y se llevó los recipientes a la cámara de crianza de *Ae. aegypti*. La temperatura se registró diariamente utilizando un termómetro, que fue colocado en el agua.
- **Larva:** Cuando emergieron las larvas de primer instar, se agregó en cada división 0,05 mg de comida para gatos “Super Cat^R”, previamente triturada y tamizada. Diariamente se observó en el estereoscopio, la presencia de exuvias las que fueron retiradas con una pipeta de transferencia, anotándose el tiempo correspondiente para cada cambio de instar. El agua y el alimento se cambió, cada dos días para evitar la formación de hongos.
- **Pupa:** Se prepararon vasos colectores de plástico de 250mL y se agregó 50mL de agua potable sedimentada. Cuando se observó en los recipientes la presencia de pupas, se trasladaron con ayuda de una pipeta de transferencia hacia los vasos y luego se colocaron a la cámara de crianza para la emergencia de los adultos. Se controló la temperatura y la humedad con un termohigrómetro “VWR”.
- **Adulto:** En los adultos emergidos se determinó el dimorfismo sexual, teniendo en cuenta el tipo de antenas y se trasladaron en parejas, con ayuda del tubo capturador, hacia otro vaso colector que contenía en la base algodón con papel toalla, el que fue previamente humedecido para la oviposición. Se colocó algodón embebido en agua azucarada en una proporción de 5g de azúcar en 100mL de agua para la alimentación de machos y hembras, luego se llevó a la cámara de crianza. Se cambió el sustrato cada dos días para evitar la formación de hongos y cada 6 días se colocó los dedos de la mano sobre el vaso para la alimentación de las hembras.
 - Se realizaron tres repeticiones con 14 parejas. La primera repetición fue con los padres; la segunda repetición, con la primera generación y la tercera repetición con la segunda generación.

Determinación de la Tabla de Vida

Al igual que en la crianza para el ciclo biológico, se preparó la solución de agua azucarada, sin embargo ya no se trabajó individualmente, por lo que en un bandeja se colocó 100 huevos. Cuando se observó la presencia de larvas I, se agregó 0.09g de comida para gatos. Diariamente se revisó la bandeja y se retiró las exuvias con una pipeta de transferencia. Se cambió el agua y el alimento cada dos días, y cuando emergieron las pupas se trasladaron a un frasco que contenía 50 mL de agua. Luego se colocó dentro de una jaula de 23x23x23 cm, siendo el armazón de madera y las caras laterales cubiertas con tul, en la cara anterior presentó una manga adicional de 30 cm confeccionado del mismo

material. La jaula se colocó en la cámara de crianza para la emergencia de adultos (Anexo 14). Para la alimentación de machos y hembras se colocó algodón embebido con agua azucarada 5g/100mL, así mismo las hembras por su naturaleza hematófaga, necesitan de la ingesta de sangre, por lo que se introdujo el brazo humano cada seis días. Para la obtención de huevos se colocó una bandeja de plástico de 20x10cm, sobre la cual se colocó papel toalla humedecida.

Para determinar la tabla de vida, se trabajó primero con el grupo de los padres, anotando en Excel el número de individuos muertos; a la vez se creó la tabla de vida y en la primera columna “Nx” se anotó el número de sobrevivientes en cada estado biológico. Cuando llegó a adulto se anotó el número de sobrevivientes en un rango de cinco días hasta la muerte del último espécimen. Una vez ingresado todos los datos, se procedió a aplicar las fórmulas para la obtención de los parámetros poblacionales como supervivencia (l_x), tasa de mortalidad (q_x), y esperanza de vida (e_x). Se trabajó también con la primera generación, por lo que se seleccionó al azar las oviposiciones obtenidas por los padres, repitiéndose los pasos anteriormente descrito. De esta manera se realizaron dos repeticiones, describiendo ambos grupos en una sola tabla de vida.

Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se empleó el programa Minitab 17.

La tabla de vida se realizó aplicando fórmulas planteadas por Rabinovich (1980), las cuales se muestran a continuación.

$$l_x = N_x / N_0$$

$$dx = (l_x - l_{x+1})$$

$$q_x = dx / l_x$$

$$L_x = (l_x + l_{x+1}) / 2$$

$$T_x = \sum_m^x L_x$$

$$e_x = T_x / l_x$$

Donde:

N_x: cantidad de individuos de edad (x) que se registran.

N₀: Cantidad de individuos de edad inicial.

l_x: Supervivencia específica por edad.

dx: Proporción de la cohorte original que muere durante la edad (x).

q_x: Tasa de mortalidad. Mortalidad específica por edades.

L_x: Media de la probabilidad de supervivencia entre dos edades sucesivas.

T_x: Número total de días que quedan por vivir a los sobrevivientes que han alcanzado la edad (x); “m” representa la máxima edad alcanzada.

e_x: Esperanza de vida.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra los resultados obtenidos referente a la duración en días de cada uno de los estados biológicos y en la Fig.1 se observa la morfología de los diferentes estados biológicos de *A. aegypti*: en el estado de larva, el número mayor de días lo presentó la segunda generación con 7.07 días y el menor en los padres con 6.72 días. En el estado de pupa, el mayor valor fue para la primera generación con 3.00 días y el menor para los padres con 2.79 días.

En el ciclo de desarrollo, que comprende desde el estado de huevo hasta la emergencia del adulto, el mayor valor se obtuvo en la segunda generación con 11.00 días y el menor para los padres con 10.51 días. En el ciclo biológico que comprende desde el estado de huevo hasta la primera oviposición de los adultos, de la misma manera, el mayor valor fue para la segunda generación con 17.86 días y el menor valor para los padres con 17.51 días. En el ciclo de vida, que comprende el ciclo de desarrollo más la longevidad, a diferencia de los anteriores, el mayor valor lo presentaron los padres con 73.83 días y el menor valor la segunda generación con 69.29 días. El análisis de significancia se realizó con el programa Minitab 17, no encontrándose diferencias significativas y con un nivel de confianza del 95%.

En la Tabla 2 se muestra los resultados correspondientes a la oviposición. Se trabajó con las hembras por lo que se realizó 14 repeticiones. La ovipostura de *A. aegypti* obtuvo como mayor promedio para la F1 con 37.07 huevos y el menor para los padres con 26.00 huevos. El coeficiente de variación (%) presenta valores no homogéneos; la F1 con un 90.13%, siendo este valor posible, debido a que en dos oviposiciones se obtuvieron valores extremos respecto a los demás y como menor valor a la F2 con 69.86%.

En la Tabla 3 se presenta la población padre en la que la emergencia a larva I fue total, manteniéndose hasta larva II. A partir de Larva III empezó con la pérdida de individuos por lo que al estado de adulto llegaron 93 especímenes entre machos y hembras. Para la población de primera generación no hubo una emergencia total a larva I, se continuó con los estados llegando a adulto con 82 mosquitos, menor cantidad que la población padre. En ambas poblaciones se continuó hasta la muerte del último individuo. Respecto a la tasa de mortalidad (qx) en los primeros estados se encuentra la menor cantidad de muertes para ambas poblaciones en estudio, en los padres la tasa de mortalidad osciló del 0 al 4% y en la F1 del 0 al 9% pero a partir de los adultos de 16 días en adelante la mortalidad va en aumento llegando incluso al 50% para los padres y a 81% en la F1. En la esperanza de vida (ex) se observa que en ambas poblaciones va disminuyendo conforme avanza en edad. Del estado de huevo a adulto la esperanza de vida fue mayor para la población padre con 11.84 días a diferencia de la F1 que fue de 10.39 días.

En la Fig. 2, se observa la curva de supervivencia de *Ae. aegypti* de la población padre y F1. Según el número de individuos sobrevivientes en cada estado biológico se va formando la curva de supervivencia, obteniéndose al término del estudio una curva del tipo I para las dos poblaciones, en donde la mortalidad actúa fuertemente en los individuos viejos. En las curvas se puede observar que en los primeros estados biológicos no hay una pérdida considerable pero a medida que van aumentando en edad la supervivencia disminuye. En la curva de la población padre la supervivencia se hace nula en los adultos de 66 a 70 días y en la de la primera generación termina en los adultos de 61 a 65 días.

Tabla 1. Duración promedio en días y error de estimación de los estados de desarrollo de *Aedes aegypti* en Padres, F1 y F2 bajo condiciones controladas de laboratorio a una temperatura de 25±3°C y 80±15% de humedad, Trujillo (Perú) 2014.

Estados Biológicos	Duración en días		
	Padres	F1	F2
Huevo	1.00 ± 0.00	1.04 ± 0.08	1.00 ± 0.00
Larva I	1.18 ± 0.16	1.11 ± 0.13	1.21 ± 0.17
Larva II	1.36 ± 0.23	1.46 ± 0.21	1.50 ± 0.21
Larva III	1.29 ± 0.19	1.39 ± 0.20	1.43 ± 0.21
Larva IV	2.89 ± 0.20	2.86 ± 0.21	2.93 ± 0.27
Total en Larva	6.72 ± 0.2	6.82 ± 0.21	7.07 ± 0.22
Pupa	2.79 ± 0.17	3.00 ± 0.11	2.93 ± 0.15
Total del Ciclo de Desarrollo	10.51 ± 0.46	10.93 ± 0.45	11.00 ± 0.46
Total del Ciclo Biológico	17.51 ± 0.51	17.57 ± 0.45	17.86 ± 0.49
Total Ciclo de Vida	73.83 ± 2.82	71.29 ± 1.14	69.29 ± 1.21

P<0,05; F1=primera generación; F2=segunda generación

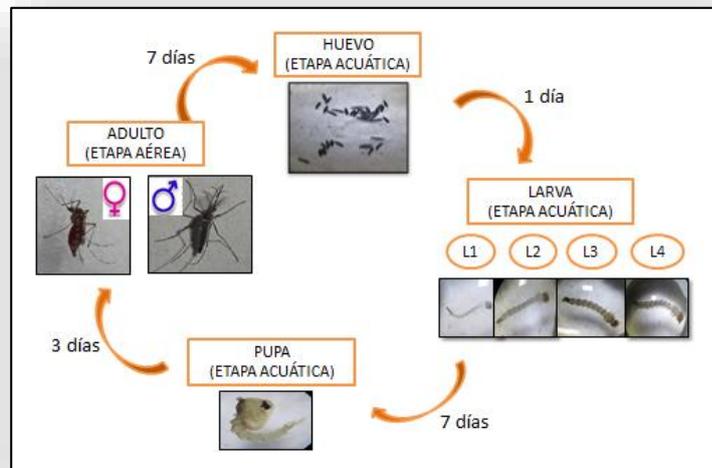


Fig. 1. Ciclo Biológico de *Aedes aegypti*

Tabla 2. Promedio del Número de huevos de *Aedes aegypti* con error estándar, desviación estándar, varianza y coeficiente de variación, bajo condiciones controladas de laboratorio a una temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ y $80\pm 15\%$ de humedad, Trujillo (Perú), 2014.

Variable	Nº de hembras	Promedio del Nº de huevos/hembra	ES	DS	Varianza	CV (%)
Padres	14	26.00	5.12	19.17	367.54	73.74
F1	14	37.07	8.93	33.41	1116.38	90.13
F2	14	27.93	5.21	19.51	90.13	69.86

F1=primera generación; F2=segunda generación; ES= error estándar; DS= desviación estándar; CV= coeficiente de variación

Cuadro 3. Tabla de vida de una población de padres y primera generación de *Aedes aegypti* bajo condiciones controladas de laboratorio a una temperatura de 25±3°C y 80±15% de humedad, Trujillo (Perú), 2014.

Estado Biológico y rango de longevidad de adultos (días)	Nx		lx		dx		qx		Lx		Tx		ex	
	P	F1	P	F1	P	F1	P	F1	P	F1	P	F1	P	F1
Huevo	100	100	1.00	1.00	0.00	0.08	0.00	0.08	1.00	0.96	11.84	10.39	11.84	10.39
Larva I	100	92	1.00	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.92	10.84	9.43	10.84	10.25
Larva II	100	92	1.00	0.92	0.04	0.02	0.04	0.02	0.98	0.91	9.84	8.51	9.84	9.25
Larva III	96	90	0.96	0.90	0.01	0.08	0.01	0.09	0.96	0.86	8.86	7.60	9.23	8.44
Larva IV	95	82	0.95	0.82	0.02	0.00	0.02	0.00	0.94	0.82	7.90	6.74	8.32	8.22
Pupa	93	82	0.93	0.82	0.02	0.04	0.02	0.05	0.92	0.80	6.96	5.92	7.48	7.22
Adulto (1-5)	91	78	0.91	0.78	0.04	0.04	0.04	0.05	0.89	0.76	6.04	5.12	6.64	6.56
Adulto (6-10)	87	74	0.87	0.74	0.02	0.06	0.02	0.08	0.86	0.71	5.15	4.36	5.92	5.89
Adulto (11-15)	85	68	0.85	0.68	0.02	0.00	0.02	0.00	0.84	0.68	4.29	3.65	5.05	5.37
Adulto (16-20)	83	68	0.83	0.68	0.16	0.01	0.19	0.01	0.75	0.68	3.45	2.97	4.16	4.37
Adulto (21-25)	67	67	0.67	0.67	0.12	0.11	0.18	0.16	0.61	0.62	2.70	2.29	4.03	3.42
Adulto (26-30)	55	56	0.55	0.56	0.05	0.07	0.09	0.13	0.53	0.53	2.09	1.67	3.80	2.98
Adulto (31-35)	50	49	0.50	0.49	0.05	0.10	0.10	0.20	0.48	0.44	1.56	1.14	3.12	2.33
Adulto (36-40)	45	39	0.45	0.39	0.10	0.11	0.22	0.28	0.40	0.34	1.08	0.70	2.40	1.79
Adulto (41-45)	35	28	0.35	0.28	0.11	0.12	0.31	0.43	0.30	0.22	0.68	0.36	1.94	1.29
Adulto (46-50)	24	16	0.24	0.16	0.12	0.13	0.50	0.81	0.18	0.10	0.38	0.14	1.58	0.88
Adulto (51-55)	12	3	0.12	0.03	0.04	0.01	0.33	0.33	0.10	0.03	0.20	0.04	1.67	1.33
Adulto (56-60)	8	2	0.08	0.02	0.03	0.02	0.38	1.00	0.07	0.01	0.10		1.25	0
Adulto (61-65)	5	0	0.05	0.00	0.05		1.00		0.03				0	
Adulto (66-70)	0		0.00											

Nx= número de individuos en cada edad; lx = proporción de sobrevivientes en la edad x; dx = proporción de individuos que mueren entre las edades; qx = Tasa de mortalidad; Lx = media de la probabilidad de supervivencia; Tx= días por vivir en cada edad; ex = esperanza de vida para cada edad

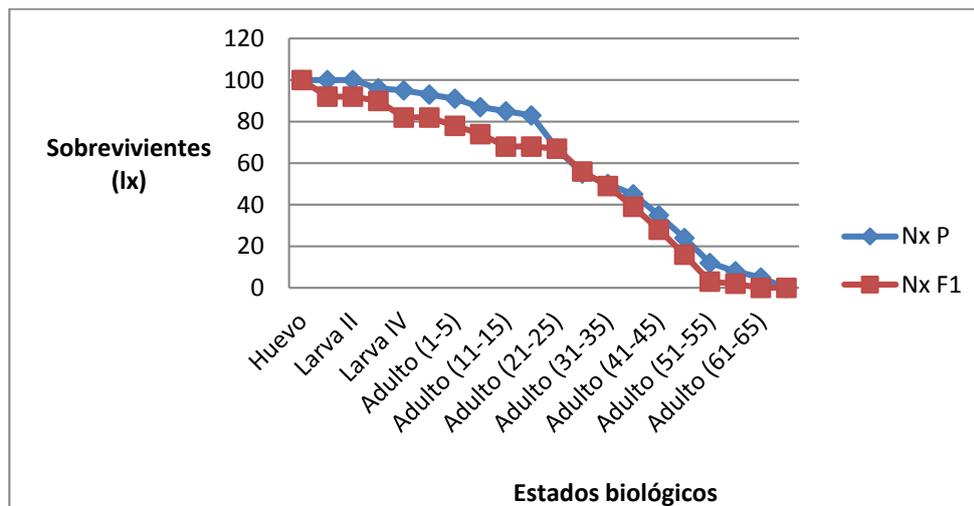


Fig. 2. Curva de supervivencia de los estados biológicos de *Aedes aegypti* bajo condiciones controladas de laboratorio a una temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ y $80\pm 15\%$ de humedad, Trujillo (Perú), 2014.

En la Tabla 4 se muestra la relación de sexos y longevidad de las dos poblaciones en estudio. En la población de padres emergieron 50 machos y 41 hembras, sin embargo para la F1 la cantidad de machos es de 37 y para las hembras 41. Respecto a la longevidad, se observa que en la población de padres, la duración promedio del tiempo de vida como adultos para las hembras es de 46.39 días, y para los machos de 29.98 días. En la F1 la duración promedio del tiempo de vida como adultos para las hembras es de 40.74 días, y para los machos de 28.80 días.

Tabla 4. Número de individuos machos y hembras y longevidad promedio en días de *Aedes aegypti* bajo condiciones controladas de laboratorio a una temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ y $80\pm 15\%$ de humedad, Trujillo (Perú), 2014.

Variable	hembras		machos	
	N° de individuos	Longevidad (días)	N° de individuos	Longevidad (días)
Padres	41	46.39 ± 5.46	50	29.98 ± 3.55
F1	41	40.74 ± 5.54	37	28.80 ± 5.72
Promedio	41	44 ± 5.50	43.5	29 ± 4.64

DISCUSIÓN

Se realizó la crianza de *Aedes aegypti* bajo condiciones de laboratorio, desarrollándose para padres, F1 y F2; en el estado de larva se necesitó en 6.72, 6.82 y 7.07 días respectivamente sin diferencias significativas, lo que en promedio fue 7 días. Este tiempo está dentro del rango que menciona Vargas (1998), quién cita que el estado larval con frecuencia comprende de 4 a 10 días, en condiciones favorables de temperatura entre $25-29^{\circ}\text{C}$ ²¹. Así mismo otros autores, citan el tiempo en estado de larva, en función del alimento y la temperatura encontrando que las larvas criadas en aguas residuales no tratadas a 25.7°C necesitaron 6.3 días; agua de lluvia a 25°C , 9.5 días y en agua no clorada a 25.8°C , 9.7 días²². Así mismo Thirion (2003) menciona que el tiempo que permanece cada individuo en este estado depende en gran medida de la disponibilidad de alimento, temperatura y de la densidad larvaria del criadero²³. En el presente estudio, se observó que el cuarto instar demora un día más que los tres primeros, ya que la continua y constante alimentación es fundamental para acumular las reservas de energía, las que no son obtenidas en el estado de pupa, porque ya no se alimenta, y de esta

manera se asegura la transformación de una forma acuática a una terrestre y voladora que es el adulto²¹.

El ciclo de desarrollo para los padres tuvo una duración promedio de 11 días, sin embargo para Lucero y col (2002), el tiempo del ciclo de desarrollo fue de 14 días a una temperatura de 28°C¹⁴. El número de días va a depender de factores externos como temperatura, humedad, tipo de alimentación en el estado larval, entre otros²³; siendo la temperatura uno de los factores que más influye en el crecimiento y desarrollo, puesto que tiene acción directa sobre la tasa metabólica, que es la velocidad a la cual el organismo utiliza la energía disponible. Cuando la temperatura aumenta, la tasa metabólica incrementa y disminuye cuando la temperatura desciende. Por lo que los procesos bioquímicos se van a acelerar o disminuir respectivamente²⁴.

Como se mencionó anteriormente, el ciclo de desarrollo necesitó en promedio 11 días, a lo cual se le sumó el tiempo de 6 a 8 días que transcurrió desde la ingesta de sangre (una sola ingesta), digestión de la misma y hasta la primera oviposura, obteniéndose un promedio de 18 días para el desarrollo del ciclo biológico; sin embargo en condiciones naturales se desarrolla en un lapso de 15 días, siendo probable que haya realizado más de una ingesta de sangre^{25,26}. Este periodo suele estar en función de la temperatura, humedad, y del número de veces de ingestas de sangre.

El ciclo de vida se desarrolló en un promedio 71 días ya que bajo condiciones de laboratorio se mantiene en un rango de temperatura y humedad óptima, así mismo no va a existir competencia por alimento, lo que permite que el desarrollo se de en un ambiente favorable; sin embargo en condiciones naturales sobrevive en un promedio de entre 15 y 30 días puesto que las condiciones ambientales varían constantemente²⁷.

El número promedio de huevos en las oviposuras de *Ae. aegypti* fue de 30; sin embargo se observó que los padres, F1 y F2 presentaron alta variabilidad respecto a sus medias, sobre todo para la F1, debido a la existencia de valores extremos (Anexo 5). Thirion (1993), afirma que la cantidad de huevos que producen las hembras por cada oviposura está directamente en relación con el volumen de sangre ingerida²³. En la presente investigación, todas las hembras ingirieron sangre hasta tener el abdomen distendido, sin embargo la producción de huevos fue diferente entre ellas a pesar que los especímenes se mantuvieron en las mismas condiciones, por lo que la variabilidad debe ser por las características genéticas de la especie, puesto que las poblaciones de la variante costera presenta un elevado flujo genético^{28,29}.

Respecto a la tabla de vida se muestran los parámetros poblacionales en el Cuadro 3, dando inicio con el estado de huevo, el cual emerge a larva siempre y cuando se hayan formado completamente el embrión²³, en el estudio solo en la población de padres emergieron en su totalidad. En los siguientes estados se mantiene casi constante una proporción baja de individuos muertos (dx) por lo que la tasa de mortalidad (qx) es relativamente baja en las etapas inmaduras, hasta que en los adultos de 16 días en adelante empieza a aumentar la mortalidad debido al avance en edad. Todo lo contrario sucedió en condiciones naturales de *Ae. cantans*, especie que fue estudiada por tres años en Inglaterra, lo que mostró que la pérdida sustancial de la población se produjo en los dos primeros instar larvales, puesto que en el campo las variaciones ambientales, ya sea de temperatura, humedad y alimentación, entre otros factores externos, son constantes por lo que no logran sobrevivir en su totalidad hasta el estado adulto³⁰.

En cuanto a la esperanza de vida (ex) la cual representa el número de días que le queda a los individuos de la edad (x), la tabla muestra que los valores van disminuyendo a medida que avanza en crecimiento y desarrollo biológico. La esperanza de vida máxima para *Ae. aegypti* en el estado de huevo (edad 0), fue de 11 días; por otro lado en Arabia Saudita se encontró en laboratorio que la esperanza de vida fue de 13.37 días¹⁸, este valor está cercano al encontrado en México en una población de campo a una temperatura que osciló de 27.5 a 5°C en donde en el estado de larva (edad 7) tuvo 15.3 días y a partir de los adultos (edad 13) baja gradualmente mientras que para la población en laboratorio a 20 ± 2°C en el estado de huevo fue de 60 días, por lo que es evidente que la temperatura es el factor que más influye en la esperanza de vida¹⁹.

Una manera de presentar gráficamente los datos de la tabla de vida es la curva de supervivencia en base a la columna "lx" y tiene su utilidad porque permite describir un patrón de mortalidad a la cual está sujeta una población. En el presente trabajo en la Fig. 2 se observa que ambas poblaciones presentaron una curva de supervivencia de tipo I, en la cual la mortalidad actúa fuertemente en individuos viejos. Este tipo de curva se ha dado debido a que la crianza se ha realizado bajo condiciones controladas de laboratorio; sin embargo Treviño (1992), obtuvo una curva entre el tipo I y

II trabajando a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, mientras que la curva para la población estudiada en campo fue del tipo III, en la cual la mortalidad es mayor para los estados inmaduros¹⁹. Todo lo contrario encontró Manrique y col. (1998), quién en condiciones de campo obtuvo una curva del tipo II, en la cual la tasa de mortalidad es casi constante con forme transcurre el tiempo³¹.

La longevidad promedio de hembras fue de 40 días, a diferencia de los machos que fue de 29 días. La última hembra en morir vivió un promedio de 65 días, mientras que el macho 55. Tal como lo indica Conde (2003), la hembra tiene una longevidad mayor que el macho y esto se debe al tipo de alimentación, si bien es cierto los machos y hembras suelen alimentarse del néctar de las plantas, pero en el caso de las hembras también son hematófagas, por lo que reciben mayor cantidad de nutrientes que los machos favoreciendo directamente en su longevidad³². Así mismo Harrington y col (2001), menciona que la hembra al alimentarse de sangre humana ingiere el aminoácido isoleucina, el cual en concentraciones altas junto con los azúcares obtenidos de las plantas, permiten la síntesis y la acumulación de energía, por lo que aumenta la supervivencia específica por edad, el rendimiento reproductivo, y por ende la longevidad³³.

CONCLUSIONES

- El ciclo biológico de *Aedes aegypti* fue de aproximadamente 18 días, bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ y $80 \pm 15\%$ de humedad.
- La tasa de mortalidad mayor fue en los adultos de 46 a 55 días, siendo para los padres de 50% y para la F1 de 81%.
- La esperanza de vida fue de aproximadamente 11 días y fue disminuyendo conforme avanza en edad.
- La curva de supervivencia de *Aedes aegypti* fue del tipo I, bajo condiciones de laboratorio, a una temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ y $80 \pm 15\%$ de humedad.
- Las hembras tuvieron una longevidad mayor que los machos, en un promedio de 44 y 29 días respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villaseca EP, León CW, Palomino SM, Mostorino ER, Lecca GL. Validación de sustratos atractivos a oviposición para la detección de *Aedes aegypti*. Rev peru med exp y salud pública 2001; 19 (3-4): 171-180.
2. Cabezas C. Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. Rev peru med exp y salud pública 2005; 22 (3): 212-228.
3. Badii M, Garza V, Landeros J, H. Quiroz. Diversidad y Relevancia de los Mosquitos. Cultura Científica y Tecnológica 2006; 3 (13).
4. MINSA. Plan Nacional de Preparación y Respuesta frente a la Fiebre de Chikungunya – Perú. 2014.
5. Carranza M, Marquetti M, Vásquez A, Montes J. Dinámica Estacional y Temporal de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en el Municipio Cienfuegos. Rev Cubana Med Trop 2010; 62 (2): 98-106.
6. Ogusuku E, Pérez J. Manual de Campo para la vigilancia Entomológica. Dirección General de Salud Ambiental. Ministerio de Salud. Perú. 2002.
7. Narro J, Gómez H. El dengue en México: un problema prioritario de Salud Pública. Salud Pública de México 1995; 37 (1): 12-20.
8. Hernández C, Bello F, Duran F, Olano V, Ferro F. Estudios comparativos del ciclo de vida del mosquito *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) de dos colonias de la costa atlántica colombiana. Rev Biomédica 1996; 16: 303-306.
9. Malta J, Biral C, Ricas H, Carlos L, Falqueto A. Criadouros de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na Cidade de Vitória, ES. Rev Soc Brasileira Med Trop 2005; 38 (3): 238-240.
10. Navarro D, Oliveira P, Potting R, Brito A, Fital S. The potential attract or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Diptera, Culicidae). J Appl Entomol 2003; 127(1): 46-50.
11. Bisset J, Marquetti M, Leyva M, Rodríguez M. Distribución y talla del adulto de *Aedes aegypti* asociado con los sitios de cría. Rev Cubana Med Trop 2008; 60 (1): 68-73.
12. Popa J, Castillo R, Pérez M, Figueredo D, Montada D. Metamorfosis y emergencia de *Aedes aegypti* fuera del medio acuático y nuevo reporte de importancia entomológica y epidemiológica en Santiago de Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol 2011; 49 (2): 173-182.

13. Lucero J, Jaramillo K, Hernández C, Hernández M, Rodríguez J, Lucientes J. Ciclo biológico de *Aedes aegypti* en condiciones naturales del laboratorio de entomología de la ONGD “ANAWIM”, Casma-Ancash. 2002.
14. Bobadilla M. Evaluación de recursos vegetales biocidas en el control de estadios inmaduros de *Aedes aegypti* L. Trujillo, La Libertad Perú, 2006-2007. Tesis de Doctor en Ciencias Ambientales. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2007.
15. Vidal J, Carbajal A, Sisniegas M, Bobadilla M. Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb. y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L. Rev Peru Biol 2009; 15 (2): 103-109.
16. Rabinovich J. Introducción a la Ecología de Poblaciones Animales. (2a. ed). México, DF: Continental S.A.1980.
17. Sowilem M, Kamal H, Khater I. Características de la Tabla de vida de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Arabia Saudita. Trop Biomed 2013; 30 (2):301-314.
18. Treviño N. Distribución y abundancia de poblaciones de huevecillos y tablas de vida de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) en Monterrey, Nuevo León. Tesis de Maestro en Ciencias, especialidad en Entomología Médica. Universidad de Nuevo León, México. 1992.
19. García C, Escovar J, Londoño Y, Moncada L. Altitud y tablas de vida de poblaciones de *Culex quinquefasciatus* (Diptera Culicidae). Rev Colombiana de Entomol 2010; 36 (1): 62-67.
20. Vargas M. El mosquito un enemigo peligroso. Universidad de Costa Rica. 1998.
21. Beserra E, Fernandes C, Sousa J, Freitas E, Santos K. Efeito da Qualidade da Água no Ciclo de Vida e na Atração para Oviposição de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Neotrop Entomol 2010; 39(6): 1016-1023.
22. Thirion J. El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. Bayer Environ Sci. México. 2003.
23. Curtis H, Barnes N, Schnek A, Massarini A. Biología. (7a.ed). España: Médica Panamericana. 2008.
24. Salas M. Ciclo gonotrófico, tasa de supervivencia y estructura de edades de *Aedes aegypti* L. en la zona metropolitana de Monterrey, Nueva León, México. Tesis de Maestro en Ciencias, con especialidad en Entomología Médica. Universidad de Nuevo León. México.1993.
25. Centro Nacional de Programas Preventivos y control de enfermedades (CENAPRECE). Enfermedades transmitidas por vector. www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/vector.html. 2012.
26. Ministerio de Salud (MSAL). Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. Catamarca. Argentina. 2012.
27. Leiva N, Cáceres O. Variabilidad Genética de *Aedes aegypti* en algunas áreas del Perú usando single stranded conformational Polymorphism (Sscp). Rev Peru Med Exp y Salud Pública 2004; 21(3): 157-166.
28. Cáceres O, León W. Variantes genéticas de *Aedes aegypti* y su asociación con el serotipo del virus dengue en una área endémica del Perú. Ministerio de Salud-Instituto Nacional de Salud. Serie informes técnicos N° 96. 2007.
29. Lakahani K, Service M. Estimated mortalities of the immature stages of *Aedes cantans* (Mg.) (Diptera, Culicidae) in a natural habitat. Bull Ent Res 1974; 64:265-276.
30. Manrique P, Delfin H, Parra V, Ibáñez S. Desarrollo, mortalidad y sobrevivencia de las etapas inmaduras de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en neumáticos. Rev Biomedica 1998; 9:84-91.
31. Conde A. Estudio de la longevidad y el ciclo Gonotrófico del *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762), cepa Girardot (Cundinamarca) en condiciones de Laboratorio. Tesis de Biólogo. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 2003.
32. Harrington L, Edman J, Scott T. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? J Med Entomol 2001; 38 (3): 411-22.

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.