

REBIOLEST

REVISTA CIENTÍFICA DE ESTUDIANTES



Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional de Trujillo

Volumen 3 , Número 2

Julio - Diciembre, 2015



LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA EN EL NUEVO MODELO DE ACREDITACIÓN DE CARRERAS UNIVERSITARIAS EN EL PERÚ

El 20 de abril del 2015 nuestra Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología se convierte en la primera carrera de Ciencias Biológicas del Perú en obtener la certificación de carrera universitaria acreditada por el SINEACE. Lógicamente, el trabajo, muy bien gestionado por el decano de entonces, Dr. Hermes Escalante, comenzó mucho antes y hubo que formar comisiones y estructurar una serie de documentos, dentro de los que destacaron los reglamentos o procedimientos. Uno de ellos se denominó, “**Procedimientos de generación y evaluación de la investigación formativa**”, tenía el código PIF-02 y debía normar la investigación ejecutada por los estudiantes.

Sin embargo, la concepción, los enfoques y el alineamiento del Modelo de Acreditación de las Carreras Universitarias fueron sometidos a revisión y finalmente fue cambiado. Se adujo, para ello, que el modelo en ese momento vigente estaba centrado en procesos sin hacer énfasis en los resultados; que el número de estándares era excesivo, siendo calificados como específicos y prescriptivos y enfocados en identificar el cumplimiento basado solamente en documentación y que la evaluación externa incidía en la verificación, mas no en una retroalimentación efectiva que contribuyen a la mejora. En consecuencia, se recomendó que un nuevo modelo debería orientarse a resultados sin descuidar los procesos, incentivar la reflexión, incidir en lo cualitativo, respetar la diversidad de universidades que existen en el país, respondiendo a la naturaleza y particularidades de cada institución, así como motivar la mejora continua y la búsqueda de la excelencia académica.

El nuevo modelo, con otro enfoque, no separa la investigación de estudiantes en dos procesos: la formativa, que es ejecutada a lo largo de la formación académica y la final, dirigida a la ejecución de la tesis. Más bien, tiene una sola descripción, que, a la letra dice: “El programa de estudios regula y asegura la calidad de la investigación, desarrollo tecnológico e innovación (I+D+i) realizada por docentes y estudiantes, poniendo especial énfasis en la publicación e incorporación de sus resultados en la docencia, así como en la I+D+i para la obtención del grado y título de los estudiantes. Es decir, no se descuida la investigación, como pareciera, por el contrario, busca consolidarla procurando que las investigaciones sean publicadas (resultados evidenciables), aspecto que es coherente con lo que se propone en la nueva Ley Universitaria, que demanda que los estudiantes deben ejecutar dos investigaciones obligatoriamente: una en los dos últimos ciclos de la carrera conducente a obtener el grado (tesis de graduación) y otra al finalizar la misma (tesis de titulación).

Creemos que esta nueva manera de ver la investigación ayudará a mejorar la calidad de las mismas, porque tiende a ubicarnos en el contexto internacional, es decir, a que los resultados de las investigaciones sean comunicados en revistas indizadas, con la rigurosidad (y calidad) que corresponde.

Foto de la portada: Colonia de *Trichoderma sp*, hongo parásito de hongos fitopatógenos. foto proporcionada por el Dr. Juan Wilson Krugg

Editorial

La investigación científica en el nuevo modelo de acreditación de carreras universitarias en el Perú. 2

Contenido/Contents3

Artículos originales/Original papers

- Efecto de las concentraciones del extracto crudo de *Bunostomum trigonocephalum* sobre la producción de anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus* / **Effect of the concentrations of the Bunostomum trigonocephalum crude extract on the antibodies production in *Oryctolagus cuniculus***. Rebeca Paredes Pizan, Teresa Morillos Silva, María De Jesús Salinas Aranda, Nicole Terrones Rodríguez, Kevin Tuanama Aquino, Cesar A. Jara (e48). 4
- *Pseudomonas fluorescens* de suelos agrícolas degradadora del herbicida ácido 2,4 Diclorofenoxiacético / ***Pseudomonas fluorescens* from agricultural soils degradator of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid herbicide**. Miriam Akintui, Heidhy Alcántara, Alexandra Alva, Hirwin Castillo, José Huayán, Luis Llenque (e49). 9
- Signos y alteraciones histopatológicas en *Mus Musculus* BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi* procedente de Arequipa y de Amazonas (Perú) / **Signs and histopathological alterations in *Mus Musculus* BALB/c infected with *Trypanosoma cruzi* from Arequipa and Amazonas (Peru)**. Angie Saguma, Ana Ñazco, Diana Maldonado, Karla Arteaga, Belén Ramírez, Hermes Escalante (e50). 14
- Efecto atrayente del ácido láctico sobre poblaciones naturales de *Anopheles albimanus* de Laredo (Trujillo, Perú) / **Attractive effect of lactic acid on *Anopheles albimanus* natural populations from Laredo (Trujillo, Peru)**. Cecilia Aguilar, Vanessa Amaranto, Norma Córdova, Melissa Esparza, Claudia Gordillo, Judith Roldan (e51). 21
- Géneros bacterianos presentes en el efluente con anilina de una curtiembre del Distrito de Florencia de Mora, Trujillo (Perú) / **Bacterial genera present in the effluent with aniline a tannery of the Florencia de Mora district (Trujillo, Peru)**. Dara Atilano, Sandy Benites, Roberth Cabrera, Marly Flores, Irvin Gutiérrez, Katherine Sánchez, Luis Llenque (e52). 26
- *Pseudomonas fluorescens* reductora de Cromo VI a partir de agua residual de una curtiembre / **Isolation of *Pseudomonas spp.* Chromium VI reductants from wastewater from a tannery**. Silvia Castillo, Tony Díaz, Andrés Holguín, Cristian Peláez, Miguel Ramírez, Heydi Rodríguez, Heber Robles (e53). 33
- Efecto del fungicida Metalaxyl sobre la germinación, crecimiento y capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* en condiciones de laboratorio / **Effect of the Metalaxyl fungicide on the germination, growth and antagonistic capacity of *Trichoderma asperellum* under laboratory conditions**. Astrid Argomedo, Shirley Rodríguez-Reyes, Carolina Rodríguez-Torres, Miguel Saldaña, Wendy Santos, Juan Wilson Krugg (e54). 37
- Efecto de la temperatura sobre la supervivencia de larvas II de *Lucilia sericata* en condiciones de laboratorio / **Temperature effect on *Lucilia sericata* larvae II survivor under laboratory conditions**. Sonia Desposorio, Sindy Nomberto, Sandra Paz, Maribel Quispe, Brenda Rodríguez, Giovanna Ureta, Judith Roldán (e55). 43
- Guía para los autores. 49



Efecto de las concentraciones del extracto crudo de *Bunostomum trigonocephalum* sobre la producción de anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus*

Effect of the concentrations of the *Bunostomum trigonocephalum* crude extract on the antibodies production in *Oryctolagus cuniculus*

Rebeca Paredes Pizan¹, Teresa Morillos Silva¹, María de Jesús Salinas Aranda¹,
Nicole Terrones Rodríguez¹, Kevin Tuanama Aquino¹ y Cesar A. Jara².

¹Alumnos de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. ²Departamento de Microbiología y Parasitología.
Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Se determinó el efecto de las concentraciones de 50, 250, 500 y 1000 ug/mL de extracto crudo de *Bunostomum trigonocephalum* (Nematoda) sobre la producción de anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus*. El extracto se obtuvo por maceración, en condiciones de esterilidad, de 500 ejemplares hembras recolectados del intestino delgado de ovinos, *Ovis aries*, sacrificados en el Camal Municipal de Otuzco (La Libertad-Perú) y los anticuerpos específicos por inoculación los extractos, por la vía intraperitoneal, en cinco ejemplares de *O. cuniculus* raza Neozelandeza. El extracto tuvo, según el método de Bradford, una concentración proteica de 4850ug/mL. La cuantificación de anticuerpos se determinó mediante la prueba de ELISA indirecta. La mayor concentración de anticuerpos se produjo a 1000ug/mL de extracto y la menor a 50ug/mL ($p < 0,05$). En conclusión, a mayor concentración de extracto crudo de *B. trigonocephalum* inoculadas en *O. cuniculus*, mayor producción de anticuerpos detectados por la técnica de ELISA indirecta.

Palabras claves: *Bunostomum trigonocephalum*, extracto crudo, anticuerpos, *Oryctolagus cuniculus*, ELISA

ABSTRACT

Effect of concentrations 50, 250, 500, and 1000ug/mL of crude extract of *Bunostomum trigonocephalum* (Nematoda) on the production of antibodies in *Oryctolagus cuniculus* was determined. The extract was obtained by maceration, in sterile condition, of 500 female specimens collected of the small intestine of sheep, *Ovis aries*, slaughtered in the Municipal slaughterhouse of Otuzco (La Libertad-Peru) and the inoculation by intraperitoneal via was done in five specimens of *O. cuniculus* race Neozelandeza. The extract, according to the method of Bradford, had a protein concentration of 4850ug/mL and the antibodies quantification it was evaluated by the indirect ELISA test. The highest concentration of antibodies was produced by 1000ug/mL of extract and the lower by 50ug/ml ($p < 0,05$). In conclusion, a greater concentration of crude extract of *B. trigonocephalum* inoculated in *O. cuniculus*, increased production of antibodies detected by indirect ELISA technique.

Keywords: *Bunostomum trigonocephalum*, antigenic proteins, antibodies, *Oryctolagus cuniculus*, ELISA

INTRODUCCIÓN

La bunostomosis es una helmintiasis causada por el nematodo *Bunostomum trigonocephalum*, cuyos adultos habitan en el intestino delgado de ovinos a menudo con otros parásitos gastrointestinales en infecciones mixtas¹. Las helmintiasis intestinales se dan con frecuencia en comunidades donde la pobreza prevalece, la salubridad en la crianza de los animales es deficiente y la educación sanitaria no se practica; el efecto negativo de estos factores es una deficiencia inmunológica que conduce a una susceptibilidad a infecciones producidas por estos parásitos².

La prevalencia varía considerablemente según las condiciones climáticas y ecológicas; tiende a desarrollar y sobrevivir mejor en climas cálidos lo que les da mayor oportunidad y explica su distribución abundante en el país, y su estacionalidad en áreas templadas³.

Las infecciones por *B. trigonocephalum* son más frecuentemente diagnosticadas por el hallazgo de los típicos huevos en muestras de materia fecal⁴. Sin embargo, el diagnóstico específico y sensible de infecciones por nematodos gastrointestinales del ganado respalda el control eficaz de la enfermedad, que es de gran relevancia ya que la resistencia antihelmíntica es un problema importante⁵.

La utilización de las técnicas inmunológicas para apoyar el diagnóstico clínico de las parasitosis se justifica por la baja sensibilidad de los exámenes coproparasitológicos⁵. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es una de las pruebas más usadas en la actualidad, siendo alta su sensibilidad y relativamente baja la especificidad, dependiendo fundamentalmente de la calidad de los antígenos empleados⁶. Diseñada para el diagnóstico de infecciones parasitarias y no parasitarias; dentro de las primeras se cuenta para prácticamente todas las zoonosis, en particular para aquellas que son causadas por larvas, como es el caso de ascariasis^{7,8}, hidatidosis⁹ y toxocarosis¹⁰; al mismo tiempo, para su ejecución se han utilizado diversos tipos de antígenos, entre los cuales están los somáticos, de excreción-secreción y totales.

En el presente informe se presentan los resultados de una investigación orientada a determinar la concentración de proteínas del extracto crudo de *Bunostomum trigonocephalum* a 50, 250, 500 y 1000ug/mL que produce la mayor cantidad de anticuerpos en *Oryctolagus cuniculus* inmunizado experimentalmente, detectados por la técnica de ELISA indirecta, con la finalidad de que se constituya en un aporte dentro de las investigaciones respecto del diagnóstico de las helmintiasis en ovinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de formas adultas de *B. trigonocephalum*

Los ejemplares de *B. trigonocephalum* fueron recolectados vivos de ovinos, *Ovis aries*, sacrificados en el Camal Municipal de Otuzco (La Libertad-Perú) y trasladados al laboratorio de Helminología para su identificación mediante el estudio de sus características morfológicas con ayuda de descripciones morfológicas aceptadas⁷. Luego, los parásitos fueron lavados con solución salina fisiológica estéril (SSFE) tres veces por 10 min y la última de con adición de dos antibióticos: Gentamicina (0.5 ml/100 mL) y Penicilina G sódica (0.5 mL/100 mL de 1,000,000 UI).

Obtención del extracto crudo y determinación de concentración de proteínas.

El extracto crudo se obtuvo por machacado de 500 ejemplares hembras en mortero estéril y en condiciones de esterilidad; luego, se centrifugo a 3,000 rpm por 10 minutos, se realizó el filtrado del sobrenadante a fin de lograr la purificación de la muestra. Este producto fue conservado en viales a -20°C hasta su utilización. La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico de Bradford¹¹.

Obtención del suero anti-extracto crudo de *B. trigonocephalum* en *O. cuniculus*.

Se utilizaron cinco conejos raza Neozelandeza adquiridos, con la correspondiente certificación, de la veterinaria PetPoint (Trujillo, Perú). Uno de ellos fue utilizado como control, al cual se le inoculó, por vía subcutánea en la cara interna de la pata posterior derecha, 1mL de SSFE. A los otros cuatro conejos (grupo experimental) se les inoculó el extracto a las dosis de 50ug/mL, 250ug/mL, 500ug/mL y 1000ug/mL, respectivamente, en el mismo lugar y por la misma vía que al conejo control. Estos conejos del grupo experimental fueron inoculados en tres ocasiones, a intervalos de siete días entre una y otra: la primera, 1mL de extracto crudo de *B. trigonocephalum*, mezclado en partes iguales (v/v) con 1mL de coadyuvante de *Aloe vera* y las tres restantes con 0.5mL de coadyuvante. Antes de las

inoculaciones, de cada uno de los cinco conejos se obtuvo 5mL de sangre mediante punción cardiaca para la obtención del suero preinmune¹². A las cuatro semanas de la primera inmunización se obtuvo una muestra de sangre de los conejos por punción cardiaca, la cual fue centrifugada a 3000 rpm por 15 min para obtener el suero hiperinmune que fue conservado a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Técnica de ELISA.

Se hizo la técnica de ELISA.IgG indirecta, del siguiente modo: (i) se fijó 100uL del extracto crudo de *B. trionocephalum* en la placa (ii) se incubo a 4°C por 18 horas, (iii) se lavó tres veces con 100uL de PBS+Tween, (iv) se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con 200uL de la solución de leche descremada, (v) se incubó a 37°C por una hora, (vi) se lavó de modo similar a como se hizo en el paso iii, (vii) se agregó el suero (1/500) en volumen de 100uL y se incubó a 37°C por una hora, (viii) se lavó de modo similar a las anteriores, (ix) se agregó el conjugado anti IgG rabbit (1/1000), (x) se incubó a 37°C por una hora, (xi) se lavó nuevamente y se agregó 100uL del sustrato, (xii) se incubó a 37°C por 10 minutos y (xiii) se detuvo la reacción enzimática con 50uL de ácido sulfúrico 2N, finalmente se realizó la lectura de absorbancia a 492nm, mediante un lector de ELISA^{13,15}.

RESULTADOS

El extracto crudo de *B. trionocephalum* tenía una concentración de proteínas de 4850 ug/mL. Las placas en el lector de ELISA, a una absorbancia de 492nm, mostraron reactividad a las cuatro concentraciones de extractos antígenos evaluada: 50, 250, 500 y 1000ug/mL, con una mayor coloración en aquellas donde el extracto estuvo más concentrado (Fig. 1); es decir, hubo una relación directa, a mayor concentración del extracto, mayor coloración, lo que se interpreta como mayor cantidad de anticuerpos anti extracto crudo de *B. trionocephalum*. La mayor diferencia, sin embargo se apreció entre las concentraciones de 50 y las demás (p<0,05)

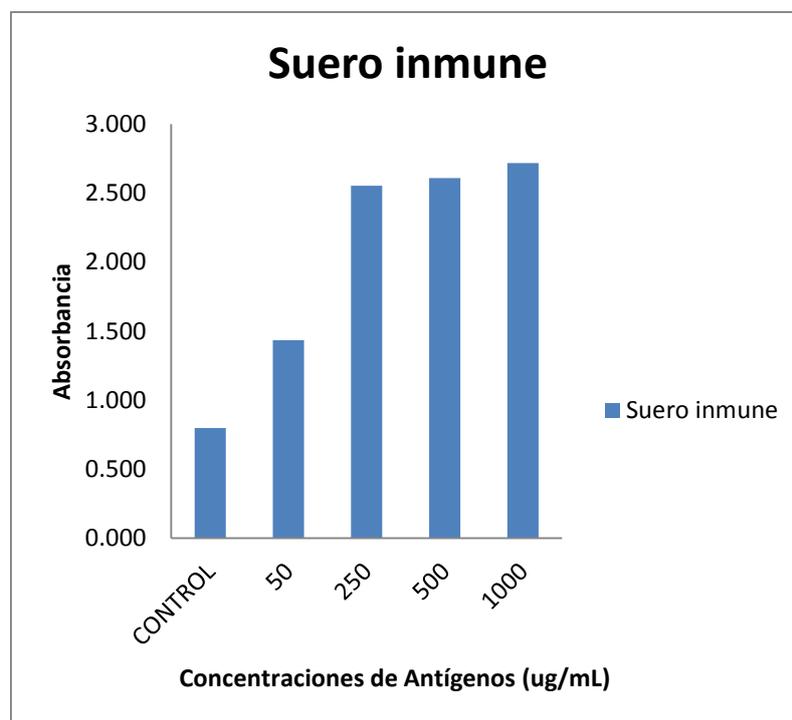


Fig. 1: Absorbancias de Sueros inmunes diluido a 1/500 enfrentado a diferentes concentraciones del antígeno de extracto crudo de *Bunostomum trionocephalum*

DISCUSIÓN

Las parasitosis son consideradas como uno de los principales problemas que afectan la producción bovina a nivel mundial, debido al impacto negativo ejercido sobre parámetros productivos y reproductivos. Estos problemas son más evidentes en los países tropicales y subtropicales, donde los pastos constituyen la base alimenticia de los rumiantes, y donde estos contienen una gran cantidad de formas parasitarias¹⁴. Entonces, los métodos parasitológicos tradicionalmente utilizados permiten demostrar la presencia del parásito, por la detección de sus huevos; sin embargo, presentan algunas limitaciones en dos circunstancias, por lo menos: (i) cuando el parásito aun no produce huevos¹⁰, y (ii) cuando el parasitismo es causado sólo por ejemplares machos¹⁵, es por esa razón que se propone una técnica serológica que permite el diagnóstico de la bunostomosis, tanto en ovinos como en bovinos, en todas sus etapas, incluso cuando la carga parasitaria es baja.

El presente estudio demuestra que los anticuerpos generados debido a la infección por el parásito, fueron específicos contra los antígenos del Extracto crudo de *B. trigonocephalum*. Se tiene en cuenta que podría ser posible usar como fuente de antígenos al extracto crudo, porque (i) son más fáciles de obtener ya que el volumen del antígeno depende del tamaño y de la cantidad de parásitos; (ii) se adquieren en menor tiempo, (iii) se obtienen en buenas cantidades de vivas y muertas y (iv) presentan elevadas concentraciones de proteínas (4850ug/mL) y se ha demostrado ser altamente antigénicas.

Para lograr una buena respuesta inmune en el conejo se necesita una concentración entre 50 y 1000 ug/ml¹⁶. Las concentraciones entre 50 y 1000ug/mL de Extracto crudo de *B. trigonocephalum* inoculadas a los animales en experimentación (*Oryctolagus cuniculus*) logran una buena respuesta inmune; dando como resultado que a 1000ug/mL de antígeno se produce mayor cantidad de anticuerpos, resultado medido bajo la absorbancia leída en el Lector de ELISA empleado. Se tiene en cuenta trabajar en este rango específico, pues un exceso de antígeno puede producir una tolerancia inmunitaria.

En conclusión, los resultados obtenidos indican que la concentración de 1000ug/mL de proteínas del extracto crudo de *B. trigonocephalum* induce una mayor producción de anticuerpos en *O. cuniculus* detectados mediante la técnica de ELISA indirecto que las concentraciones menores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sykes AR. The effect of subclinical parasitism in sheep. Vet Rec. 1978; 102: 32-34.
2. Pullan RL, Brooker SJ. The global limits and populations at risk of soil-transmitted helminth infections in 2010. Parasites & Vectors 2012; 5: 81.
3. Romero JR, Boero CA. Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en las regiones templadas y cálidas de la argentina. Argentina. Analecta Veterinaria 2001; 21(1): 21-37.
4. Sánchez J. Etiología y epidemiología de la ascariosis porcina. Mundo ganadero. 2002; 145: 42-48.
5. Florian Roeber, Aaron R. Jex, Robin B. Gasser. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. Biotech Adv. 2013; 31: 1135-1152.
6. Escalante, H., Davelois K., Ortiz P., Rodriguez H., Diaz E., Jara C. Estandarización de la técnica de Western blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepática*. Rev. perú. med. exp. salud pública. 2011; 28(3)
7. Vlamincck J, Geldhof P. Diagnosis and Control of Ascariasis in Pigs. Elsevier. 2013. 295-425. doi:10.1017/S0031182014000328.
8. Arteaga M., Jara C. Antígenos del líquido pseudocelómico de *Ascaris suum* detectados por Western Blot utilizando IgY producidos en *Gallus gallus* var. Hisex Brown. Perú, Trujillo. Rev. Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas 2013; 1(2): 58-64.
9. Manterola C, Viala M, Schneebergera P, Peña JL, Hinojosa J, Sanhueza A. Precision of ELISA-IgE and ELISA-IgG determination in the postoperative follow-up of patients with hepatic echinococcosis. Cirugia Española. 2007; 81(1); 23-27.
10. Savigny D, Voller A, Woodruff A. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. J Clin Pathol. 1979; 32:284-288 doi:10.1136/jcp.32.3.284.
11. Rios A. Ultrastructure of the adults of *Bunostomum phlebotomum* (Nematoda: Ancylostomatidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1992; 87(1). <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761992000500025>.

12. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
13. Espinoza Y, Huapaya P, Suarez R, Chávez V, Sevilla C, Dávila E et al. Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Toxocariasis humana. *An Fac Med.* 2003; 64(1): 7-12.
14. Rodríguez C, Cely Y, Gómez D. Efecto in vitro del extracto de *Lotus corniculatus* L. sobre nematodos gastrointestinales de bovinos. *Rev Cubana Plantas Med.* 2016; 21(2): 145-156.
15. Gálvez R, Alvarado E, Casana W, Quiroz J, Ríos M, Jara C. La técnica de ELISA con antígenos del fluidoseudocelómico de *Ascaris suum* en el diagnóstico de la ascariasis pulmonar experimental. *REBIOLEST.* 2014; 2(2): 34-38.
16. Colina J, Leiva D, Escalante H, Jara C. Antígenos del líquido pseudocelómico de *Toxocara canis* identificados mediante la técnica de Electroinmunotransferencia utilizando anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. *REBIOLEST.* 2011; 31(2).



Pseudomonas fluorescens de suelos agrícolas degradadora del herbicida ácido 2,4 Diclorofenoxiacético

Pseudomonas fluorescens from agricultural soils degradator of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid herbicide

Miriam Akintui¹, Heidhy Alcántara¹, Alexandra Alva¹, Hirwin Castillo¹, José Huayán¹ y Luis Llenque²

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

RESUMEN

El 2,4-Diclorofenoxiacético es uno de los herbicidas más usados para controlar malezas de hoja ancha, el ingrediente activo, sin embargo, tiene efectos crónicos sobre la salud humana y efectos letales sobre el suelo. Se ha demostrado que existen microorganismos que tienen la capacidad de degradar estos compuestos fenólicos, a la que se le denomina biorremediación. El objetivo de la investigación es determinar la presencia de *Pseudomonas fluorescens* degradadora del herbicida 2,4 D en suelos agrícolas procedentes del sector Barraza, Trujillo, Perú. Se obtuvieron muestras de suelo y de cada una se separó 10 g para efectuar diluciones, posteriormente se sembraron en agar mínimo de sales + 2,4 D y finalmente se seleccionaron colonias con diferentes morfologías. A partir de un cultivo puro se realizó la identificación basándose en su morfología cultural y característica bioquímicas, determinando la presencia de *P. fluorescens* degradador del 2,4 D aislada de suelos del sector Barraza-Trujillo.

Palabras clave: 2,4 D, herbicida, *Pseudomona fluorescens*, biorremediación, Barraza, Trujillo-Perú.

ABSTRACT

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid is one of the herbicides most used to control broadleaf weeds, the active ingredient has chronic health effects, and lethal effects on the soil because it has a residual effect. It has been shown that there are microorganisms that have the capacity to degrade these phenolic compounds, which is called bioremediation. The objective of the research is to determine the presence of *Pseudomonas fluorescens* degrading 2,4 D herbicide in agricultural soils from the Barraza sector; Trujillo - La Libertad. Soil samples collected from the Barraza, Trujillo - La Libertad sector were obtained and dilutions were made from 10 grams of soil, then seeded on minimal agar + 2,4 D salts and finally colonies with different morphologies were selected. From a pure culture the identification was made based on its cultural morphology and biochemical characteristic, determining the presence of *P. fluorescens* degradant of 2,4 D isolated from soils of the sector Barraza-Trujillo.

Keywords: 2,4 D, herbicides, *Pseudomona fluorescens*, bioremediation, Barraza, Trujillo-Perú.

INTRODUCCIÓN

La agricultura moderna se basa en gran medida en el uso herbicidas para el control de malezas y su facilidad para maximizar el rendimiento de los cultivos. Debido al uso excesivo de herbicidas, existe una gran preocupación sobre su potencial riesgo ambiental. La contaminación por herbicidas puede conducir a la contaminación del suelo y del agua, reducción de la biodiversidad y la disminución de bacterias heterótrofas en el suelo (incluyendo las bacterias desnitrificantes) y hongos.^{1,2} El 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) es uno de los herbicidas más utilizados en el mundo y es un análogo de una hormona de crecimiento, la auxina.³ Se ha propuesto como un control selectivo, efectivo y económico de malezas de hoja ancha en cultivos agrícolas, pastos y bosques durante los últimos decenios.⁴

El 2,4-D es uno de los herbicidas más utilizados en tierras cultivables y su alta toxicidad en los animales y plantas han reforzado el descubrimiento de vías de su degradación, junto con genes implicados en tales vías.^{5,6}

Se han descrito a varias cepas bacterianas que son capaces de utilizar 2,4-D como fuente de carbono y energía.⁷⁻⁹ Los géneros degradadores más comúnmente citados son *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Delftia*, *Arthrobacter* y *Burkholderia*.¹⁰⁻¹⁵ De ellos, *Pseudomonas* ha sido registrado como el primer género que presenta especies degradadoras del compuesto y, teniendo en cuenta su ubicuidad debido a que no es exigente respecto de los componentes útiles para su sobrevivencia, es posible que esté presente en suelos agrícolas de diversos lugares, entre ellos, los de Trujillo (Perú).

La presente investigación estuvo dirigida a determinar al o los géneros bacterianos que se encuentran degradando al herbicida 2,4 D en suelos agrícolas del sector Barraza, Trujillo (Perú).

MATERIAL Y MÉTODOS

Zona de estudio.

La zona de muestreo se ubica a 38 msnm a 8° 06' 59.23" LS y 78° 59' 07.01" LO, en el sector **Las Hectáreas** de la zona agrícola Barraza, en el distrito de Trujillo, Región La Libertad, Perú, donde se aplica frecuentemente el herbicida 2,4D con la finalidad de controlar el crecimiento de malas hierbas.

Muestreo.

Se realizó un muestreo probabilístico en la cual se tomó 3 Kg muestra a partir de 3 hectáreas elegidas aleatoriamente de las 11 que conforman el sector, la toma de muestra se realizó entre 30 y 60 cm de profundidad, luego se transportó al laboratorio para su procesamiento, dentro de las 8 horas.

Procesamiento de las muestras^{9,12}

El procesamiento de la muestra se inició con la homogeneización y el tamizado de los 3 Kg de tierra. Luego se realizó el pre-enriquecimiento no selectivo, donde se pesó 700 g de muestra, luego se colocó en una bandeja de plástico de primer uso, inmediatamente se le aplicó una solución de herbicida a 360 ppm con la ayuda de un atomizador. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente (25°C) durante 7 días.

Se preparó 4 diluciones sucesivas (10^{-1} hasta 10^{-4}), partiendo del uso de 10 gramos de la muestra pre-enriquecida y 90 ml de agua destilada.

El Aislamiento selectivo se realizó sembrando por duplicado las 4 diluciones mediante la técnica de estría (0,1 mL), en un medio Agar mínimo de sales suplementado con el herbicida 2,4-D a 360 ppm, luego se incubó en estufa a 37 °C durante 8 días.

La purificación se realizó haciendo repiques en agar nutritivo, sembrado por superficie y posteriormente por estría, y además sets de coloraciones Gram para verificar la pureza, agrupación, y forma de las bacterias, para luego para conservarse como cultivo puro.

Identificación de *P. fluorescens*^{10,20}.

La identificación se realizó en base a las características fenotípicas descritas en el manual de Berguey de bacteriología sistemática 1984. Donde se usó medios específicos para la determinación de especies de *P. fluorescens*. En Caldo glutamato se verificó la presencia de pigmentos, en la que se observó la producción de la pioverdina (verde fluorescente), característico de *P. fluorescens* y *P. putida*. Luego al caldo glutamato de le agregó cloroformo, para el descarte de la presencia de piocianina, característico de *P. aeruginosa*. En TSI se comprobó la no fermentación de azúcares (lactosa, glucosa y sacarosa); manteniéndose su color inicial (rojo). En LIA (Agar de hierro y lisina) se comprobó la ausencia enzima Lisina descarboxilasa, y por tanto se mantuvo el color original del medio (morado). En **Citrato** se verificó la degradación del citrato mediante el viraje de color verde a color azul. En SIM se verificó la movilidad (flagelo). En la **prueba de citocromo oxidasa** se verifico descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, mediante el desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno. En la **prueba de la gelatinasa** se diferenció *P. fluorescens* de *P. putida*, mediante la presencia de la enzima proteolítica (gelatinasa); donde *P. fluorescens* produce la licuefacción de la gelatina.

El proceso de biodegradación, se inició con la propagación de la bacteria conservada sembrando por estría en agar nutritivo incubando a 37°C durante 24 a 48 horas, luego se realizó la cosecha con 1 ml de caldo nutritivo, luego se obtuvo el cultivo en fase logarítmica inicial inoculando el mililitro de la cosecha en 10ml de caldo nutritivo en tubo de ensayo y se incubó 37°C durante 1 hora, luego se realizó 3 lavados con agua destilada estéril por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos, luego se realizó la resuspension de la bacteria en caldo mínimo de sales y se inoculó en un sistema semejante a aun biorreactor agitado en un recipiente de vidrio que contenía 250 ml de medio mínimo de sales suplementado con 2,4D a 360ppm, y se incubó durante 8 horas a temperatura ambiental(25°C).

Luego la determinación de la Biodegradación se realizó mediante el método de Mohr, donde se realizó la detección de iones cloruro producto de la degradación por la bacteria de la estructura química del herbicida 2,4D.

RESULTADOS

Se aisló e identificó a *P. fluorecens* en suelos agrícolas del Sector Barraza de Trujillo (Perú) con capacidad de liberar iones de cloruro a partir del herbicida 2,4-Diclorofenoxiacético.

DISCUSIÓN

El uso inadecuado de herbicidas ha provocado la acumulación y persistencia de agentes químicos que no solo son tóxicos en las plantas para las cuales se aplican; sino que además, por su efecto residual contaminan suelos y aguas usados en la agricultura. Uno de los herbicidas más tóxicos y aun generalmente usados es el ácido 2, 4 diclorofenoxiacético.

Debido a que algunas especies de *Pseudomonas* habitan en suelo y en la superficie de plantas, están expuestas a determinadas concentraciones de 2, 4-D, por lo que terminaron por incorporar una vía metabólica que les permita degradar este compuesto químico y utilizarlo como fuente de carbono y energía. Así como en otras investigaciones^{16, 11}, en este estudio el medio para aislar bacterias

degradadoras de 2,4-D consistió en un medio mínimo suplementado únicamente con el herbicida para asegurar que este sea la única fuente de carbono para el aislado bacteriano.

En el presente estudio se aisló una bacteria con capacidad de degradar al 2, 4-D, *P. fluorescens*. Y aunque anteriormente ya se habían descrito otros géneros de bacterias con capacidad para degradar este compuesto como *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Delftia*, *Arthrobacter* y *Burkholderia*^{3,17,18,19} fue en el género *Pseudomonas* dónde se caracterizó por primera vez la vía de degradación del 2,4-D.²⁰

Las enzimas que participan en la vía de degradación son codificadas por un grupo de genes que han sido encontrados generalmente en tres plásmidos el pJPI, pEMT1 y pJP^{18,21,22} el mismo que se ha encontrado en todos los géneros antes mencionados. Por ello es que siempre existe la posibilidad de encontrar nuevas especies con la capacidad de degradar el 2,4-D, siempre y cuando estas bacterias tengan la capacidad de adquirir estos plásmidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Juhler RK, Sørensen SR, Larsen L. Analysing transformation products of herbicide residues in environmental samples. *Water Res.* 2001; 35(6):1371–8.
2. Song J, Gu J, Zhai Y, Wu W, Wang H, Ruan Z, et al. Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1. *Bioresour Technol.* 2013;140:243-8.
3. Chaudhry GR, Huang GH. Isolation and characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium* sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *J Bacteriol.* 1988; 170(9):3897–902.
4. Garabrant DH, Philbert MA. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Crit Rev Toxicol.* 2002; 32(4):233-57.
5. Holland NT, Duramad P, Rothman N, Figgs LW, Blair A, Hubbard A, et al. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in vitro and in vivo. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2002; 521(1-2):165–78.
6. Aksakal O, Erturk FA, Sunar S, Bozari S, Agar G. Assessment of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on maize by using RAPD analysis. *Ind Crops & Prod.* 2013; 42:552-7.
7. Baelum J, Jacobsen CS, Holben WE. Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional *tfdA* gene distribution in thirty-one different 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders. *Syst Appl Microbiol.* 2010; 33(2):67-70.
8. Marrón-Montiel E, Ruiz-Ordaz N, Rubio-Granados C, Juárez-Ramírez C, Galíndez-Mayer CJ. 2,4-D-degrading bacterial consortium. Isolation, kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community. *Process Biochem.* 2006; 41(7):1521–8.
9. Sandoval-Carrasco CA, Ahuatz-Chacón D, Galíndez-Mayer J, Ruiz-Ordaz N, Juárez-Ramírez C, Martínez-Jerónimo F. Biodegradation of a mixture of the herbicides ametryn, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in a compartmentalized biofilm reactor. *Bioresour Technol.* 2013; 145:33-6.
10. Evans WC, Smith BS, Fernley HN, Davies JI. Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Biochem J.* 1971; 122(4):543-51.
11. Vedler E, Kõiv V, Heinaru A. TfdR, the LysR-type transcriptional activator, is responsible for the activation of the *tfdCB* operon of *Pseudomonas putida* 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid pEST4011. *Gene.* 2000; 245(1):161–8.
12. Greer CW, Hawari J, Samson R. Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. *Arch Microbiol.* 1990; 154:317–22.
13. Daugherty DD, Karel SF. Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by *Pseudomonas cepacia* DBO1 (pRO101) in a Dual-Substrate Chemostat. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(9):3261–7.
14. Kumar A, Trefault N, Olaniran AO. Microbial degradation of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid: Insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. *Crit Rev Microbiol.* 2016; 42(2):194-208.
15. Benndorf D, Thiersch M, Loffhagen N, Kunath C, Harms H. *Pseudomonas putida* KT2440 responds specifically to chlorophenoxy herbicides and their initial metabolites. *Proteomics.* 2006; 6(11):3319–29.
16. Chaudhry, G. R., and A. N. Ali. Bacterial metabolism of carbofuran. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 54:1414-19.

17. Don, R. H., and J. M. Pemberton. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol.* 1981; 145:681-686.
18. Fisher, P. R., J. Appleton, and J. M. Pemberton. Isolation and characterization of the pesticide-degrading plasmid pJP1 from *Alcaligenes paradoxus*. *J. Bacteriol.* 1978; 135:798-804.
19. Tiedje, J. M., J. M. Duxbury, M. Alexander, and J. E. Dawson. 2,4-D metabolism: pathway of degradation of chlorocatechols by *Athrobacter* sp. *J. Agr. Food Chem.* 1969; 17:1021-1026
20. Evans WC, Smith BSW, Fernley HN, Davies JI. Bacterial metabolism of 2,4 dichlorophenoxyacetate. *Biochem J.* 1971; 122:543 – 551
21. Bhat MA, Tsuda M, Horiike K, et al. Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60:307–12.
22. Chong NM, Chang HW. Plasmid as a measure of microbial degradation capacity for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Bioresour Technol.* 2009; 100:1174–9.



Signos y alteraciones histopatológicas en *Mus Musculus* BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi* procedente de Arequipa y de Amazonas (Perú)

Signs and histopathological alterations in *Mus Musculus* BALB/c infected with *Trypanosoma cruzi* from Arequipa and Amazonas (Peru)

Angie Saguma¹, Ana Ñazco¹, Diana Maldonado¹, Karla Arteaga¹, Belén Ramírez¹ y Hermes Escalante²

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Se determinó a los signos y alteraciones histopatológicas producidos por dos cultivos de *Trypanosoma cruzi*, uno procedente del Departamento de Arequipa (C-Areq) ubicado en el sur del Perú y otro del Departamento de Amazonas (C-Utc) ubicado en el norte peruano en *Mus musculus* BALB/c. Los epimastigotes mantenidos en medio bifásico BHI/PYLB se subcultivaron en medio Grace's Insect para obtener los tripomastigotas metacíclicos. Se utilizaron 22 ejemplares de *M. musculus* BALB/c: 10 se inocularon con C-Areq, 10 con C-Utc y 2 fueron inoculados con SSF (testigo). Se evaluó los niveles de parasitemia, y los signos y alteraciones histopatológicas en el modelo animal. A los 20 días post inoculación (pi), se encontró niveles de parasitemia de $6,6 \times 10^7$ tripomastigotas sanguíneos de la población C-Areq, cifra superior a la alcanzada por la población C-Utc ($1,7 \times 10^6$) en el mismo periodo. El estudio histopatológico del encéfalo de ratones inoculados con ambas poblaciones del protozoario mostró, edema, congestión vascular, células gliales, necrosis y grupos (nidios) de amastigotas de *T. cruzi*; del miocardio, también grupos de amastigotes, edema, congestión vascular, hemorragia y necrosis y del hígado se observó una marcada congestión vascular y balonamiento. La totalidad de los ratones del grupo experimental inoculados con tripomastigotes de *T. cruzi* procedentes de Arequipa, presentaron diferente comportamiento en relación al ratón control. Se observó erizamiento del pelo, agitación y parálisis de extremidades inferiores, muriendo la totalidad de ejemplares, sin embargo, en los ratones inoculados con la población de *T. cruzi* C-Utc no apareció el erizamiento del pelo, pero sí se observó agitación de los ejemplares, muriendo la totalidad de ellos.

Palabras clave: Parasitemia, signos, alteraciones histopatológicas, *Mus musculus* BALB/c, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

Signs and histopathological alterations produced by the inoculation of two *Trypanosoma cruzi* cultures, one from the Department of Arequipa (C-Areq) located at South of Peru, and another from the Department of Amazonas (C-Utc) located at Northern in *Mus musculus* BALB/c under experimental conditions. Epimastigote were maintained in BHI/PYLB medium from which they subcultured in Grace's Insect medium supplemented to generate metacyclogenesis were made. Twenty-two specimens of *M. musculus* BALB/c were used, of which 10 were inoculated with C-Areq metacyclic trypomastigotes, 10 with C-Utc metacyclic trypomastigotes and 2 were inoculated with SSF (control). 20 days post inoculation (pi), found levels of parasitemia in the animal model used of 6, 6 x 10⁷ blood tripomastigotas of the population C-Areq, a figure higher than that achieved by the population C-Utc (1, 7 x 10⁶) in the same period. Histopathological study of the brain of mice inoculated with both populations of the Protozoan showed, oedema, vascular congestion, cell glial, necrosis and groups (nests) of amastigotas of *T. cruzi*; myocardial, groups of amastigotes, oedema, vascular congestion, haemorrhage and necrosis and liver was also observed a marked vascular congestion and reg. All of the experimental group mice inoculated with tripomastigotes of *T. cruzi* from Arequipa, showed different behavior in relation to the mouse control. Was bristling of hair, agitation, and paralysis of lower extremities, dying all copies, however, in mice inoculated with the population of *T. cruzi* C-Utc did not appear the hair bristling, but yes there was agitation of the specimens, and death all of them.

Keywords: signs, histopathological alterations, *Mus musculus* BALB / c, *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es transmitida por vectores conocidos como triatominos, que están ampliamente distribuidos en todo el territorio peruano¹. Se estima que en el Perú existen 621 000 personas infectadas por *T. cruzi* y una de las áreas endémicas de mayor importancia en la región sudoccidental es Arequipa, de donde provienen más del 80% de los casos reportados al sistema de vigilancia epidemiológica del Ministerio de Salud (MINSU)².

Recientemente se está informando un número creciente de casos agudos de la enfermedad de Chagas en los países amazónicos³. En cambio en la región amazónica del Perú se han registrado pocos casos humanos; no obstante, investigaciones efectuadas en las dos últimas décadas han permitido conocer que existen alrededor de 18 especies de triatominos en esta área, lo cual hace dudosa la poca incidencia de casos, que hace pensar que este padecimiento no es una afección de importancia para la salud; por lo tanto, éstas cifras pueden relacionarse con el hecho de que: a) no se establece un diagnóstico adecuado en los servicios de salud sean públicos o privados, dado que la enfermedad se puede confundir con otras anomalías; b) no se considera dentro de los diagnósticos diferenciales de los pacientes, o c) no se usan métodos diagnósticos más sensibles y específicos⁴.

Estudios realizados sobre los niveles de parasitemia en modelos murinos infectados con *T. cruzi* muestran una gran variación respecto a los datos obtenidos, es decir se extiende desde 1×10^4 hasta 1×10^7 , esto depende de la concentración de parásitos/mL en el inóculo y de la virulencia del cultivo de *T. cruzi*⁷.

El conocimiento de la parasitemia resulta importante, porque las diferencias en cuanto al comportamiento patogénico de las distintas cepas, podría correlacionarse con el curso de la enfermedad en humanos⁷.

Se evaluó los signos, niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas producidas en el cerebro, hígado y corazón de *M. musculus* BALB/c en el curso de una infección experimental con *T. cruzi* procedente de los departamentos de Arequipa y Amazonas.

Los cultivos de Arequipa y Amazonas fueron escogidos por la sencilla razón que Arequipa es la zona con mayor número de casos severos en el Perú y Amazonas es una región que cuenta con muchos vectores triatominos pero no reporta casos nuevos con mucha frecuencia, y que quizá si existan personas portadoras de *T. cruzi* pero con signos imperceptibles.

Los signos y alteraciones histopatológicas presentes en *Mus musculus* BALB/c inoculados con *Trypanosoma cruzi* procedentes de Arequipa y Amazonas presentan diferencias notables.

Se buscó determinar la diferencia de los signos y alteraciones histopatológicas que produce *T. cruzi* y comprobar la variabilidad intraespecífica patogénica que presenta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación:

Se utilizaron 22 ejemplares de *Mus musculus* BALB/c isógenos machos, de 21 días de edad, obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud. Dos de ellos se utilizaron como control y los otros 20 restantes se dividieron en dos grupos de 10 que conformaron los grupos experimentales.

Parásitos:

Se utilizaron dos cultivos de *T. cruzi* uno proveniente de Arequipa y otro proveniente de Amazonas, los que fueron proporcionados por la Unidad de Investigación y producción de Escacorp SRL de Trujillo, en la forma de epimastigotas con los códigos C-Areq S01 y C-Uct A04, en medio BHI.

Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*

Las formas epimastigotes de *T. cruzi* proporcionadas fueron cultivadas en 20 tubos de 25x150mm, estériles, con medio bifásico constituido por BHI, fase sólida, y PYLB fase líquida. La siembra se hizo a partir de dos tubos procedentes del mantenimiento de la cepa, a razón de 0.5 mL por tubo.

Metacicligenesis in vitro de *T. cruzi*.

A partir de un lote, después de 15 días de cultivo, se extrajeron los medios líquidos en tubos estériles de 13x100mm, para luego centrifugarlos a 4000 rpm por 5 min. Inmediatamente después, se descartó el sobrenadante de cada tubo y los precipitados se reagruparon en un solo tubo hasta formar aprox. 2mL. Se realizó dos procesos de lavado con PBS estéril y un tercer lavado con PBS estéril

suplementado con Bencil Penicilina y Gentamicina. Los epimastigotes, obtenidos del sedimento, fueron cultivados en el medio Grace's Insect suplementado al 20% con SBF y con Penicilina G sódica y Gentamicina. Con motivo de evaluar la viabilidad de los epimastigotes, se realizó un recuento de parásitos en la cámara hematocitométrica.

Inoculación de tripomastigotes de *T. cruzi*.

De la suspensión que se obtuvo de tripomastigotes metacíclicos se inoculó 0.2 mL (5×10^7 parásitos/mL) vía intraperitoneal a 20 especímenes machos de *Mus musculus* Balb/c. De los 20 especímenes, 10 de ellos fueron inoculados con el cultivo de Arequipa y 10 con el cultivo de Amazonas. Dos ratones control se inocularon, por la misma vía, con 0,2 mL de solución salina fisiológica.

Evaluación de signos y de las alteraciones histopatológicas

Durante el transcurso de la experiencia se observó la manifestación de los signos clínicos en fase aguda evidentes a simple vista, tales como: erizamiento de pelo, agitación y parálisis de extremidades posteriores. Además, se determinó los niveles de parasitemia en la cámara hemacitométrica al 5°, 10°, 15° y 20° día de la inoculación. También se evaluó la fase crónica de la enfermedad, reflejada en las alteraciones histopatológicas desarrolladas en los especímenes. Los ratones que murieron de manera natural fueron necrosados inmediatamente para la preservación de sus tejidos en solución de formol al 4%. Al cumplirse los 35 días post infección los ratones sobrevivientes se sacrificaron y fueron necrosados para extraer el encéfalo, hígado y el corazón para observar las alteraciones histopatológicas.

RESULTADOS

A los 20 días post inoculación (pi), se encontró niveles de parasitemia en el modelo animal empleado de $6,6 \times 10^7$ tripomastigotas sanguíneos de la población C-Areq, cifra superior a la alcanzada por la población C-Uct ($1,7 \times 10^6$) en el mismo periodo (Fig. 1).

El estudio histopatológico del encéfalo de ratones inoculados con ambas poblaciones del protozoario mostró, edema, congestión vascular, células gliales, necrosis y grupos (nidios) de amastigotas de *T. cruzi*. (Fig. 2); del miocardio, también grupos de amastigotes, edema, congestión vascular, hemorragia y necrosis (Figs. 3 y 5) y del hígado se observó una marcada congestión vascular y balonamiento (Figs. 4 y 6).

La totalidad de los ratones del grupo experimental inoculados con tripomastigotes de *T. cruzi* procedentes de Arequipa, presentaron diferente comportamiento en relación al ratón control. Se observó erizamiento del pelo, agitación y parálisis de extremidades inferiores, muriendo la totalidad de ejemplares, sin embargo, en los ratones inoculados con la población de *T. cruzi* C-Uct no apareció el erizamiento del pelo, pero sí se observó agitación de los ejemplares, meriendo a la totalidad de los ejemplares (Tabla 1).

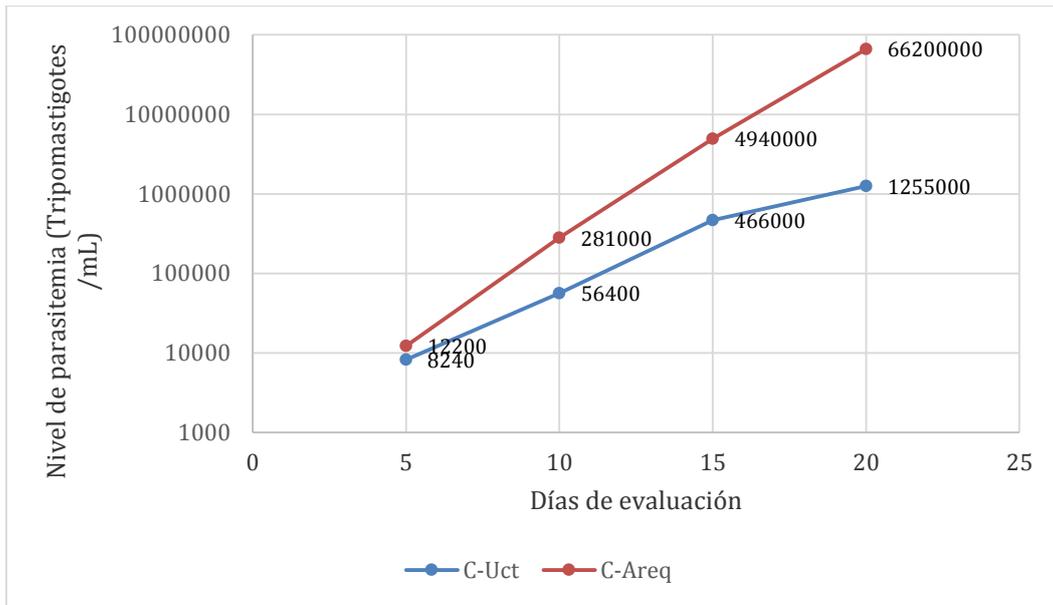


Fig. 1. Niveles de parasitemia en *Mus musculus* BALB/c infectado experimentalmente con *Trypanosoma cruzi* procedente de Arequipa (C-Areq) y de Amazonas -C-Utc- (Perú).

Tabla 1. Niveles de parasitemia y signos observados en *Mus musculus* BALB/c infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi* procedente de Arequipa (C-Areq) y de Amazonas -C-Utc- (Perú)

Días	Cultivo Arequipa C-Areq S01		Cultivo Amazonas C-Amaz A04	
	Nivel de Parasitemia (tripomastigotes/mL)	Signos	Nivel de Parasitemia (tripomastigotes/mL)	Signos
00	0	Ninguno	0	Ninguno
05	12200	Erizamiento Agitación	8240	No erizamiento
10	281000	Agitación	56400	Agitación
15	4940000	Incontinencia	466000	-
20	66200000	2: Parálisis de extremidades inferiores	1255000	-
25	-	2: Muerte	-	-
30	-	3: Muerte	-	-

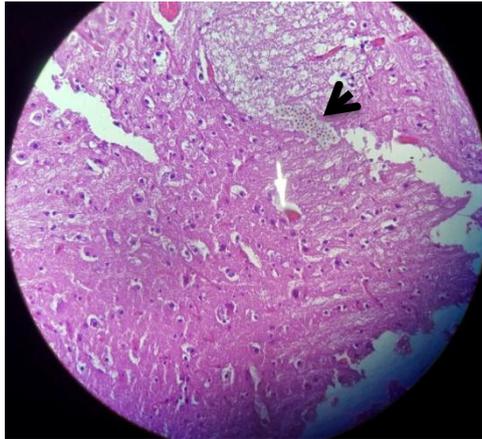


Fig. 2. Corte histológico de cerebro de *Mus musculus* BALB/c inoculado experimentalmente con un cultivo de Arequipa. Se observan áreas con edema (flecha blanca), congestión, gliosis, necrosis y nidos de amastigotes de *T. cruzi* (flecha negra)

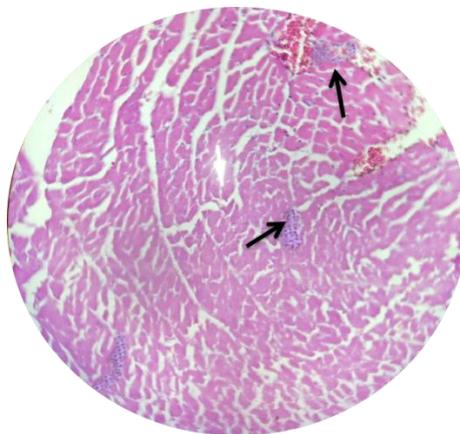


Fig. 3. Corte histológico de tejido cardíaco de *Mus musculus* BALB/c inoculado experimentalmente con un cultivo de Arequipa. Se observan áreas de edema, congestión, hemorragia, necrosis (flecha blanca) y nidos de amastigotes de *T. cruzi* (flecha negra)

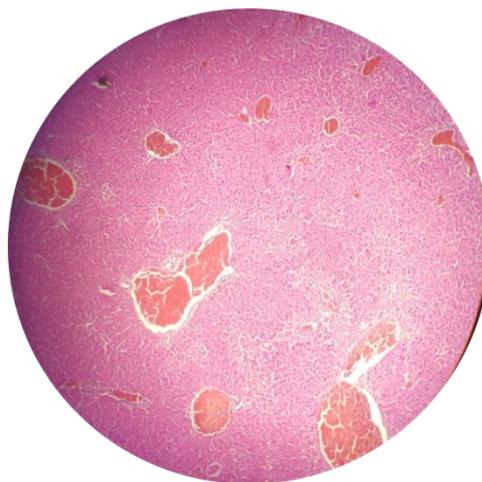


Fig. 4. Corte histológico de hígado de *Mus musculus* BALB/c inoculado experimentalmente con un cultivo de Arequipa. Se observa marcada congestión vascular.

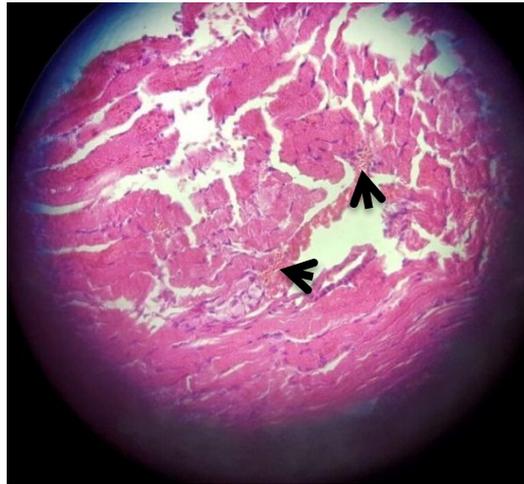


Fig. 5. Corte histológico de tejido cardíaco de *Mus musculus* BALB/c inoculado experimentalmente con un cultivo de Amazonas. Se observan áreas con edema, congestión vascular y nidos de amastigotes de *T. cruzi* (flecha negra)

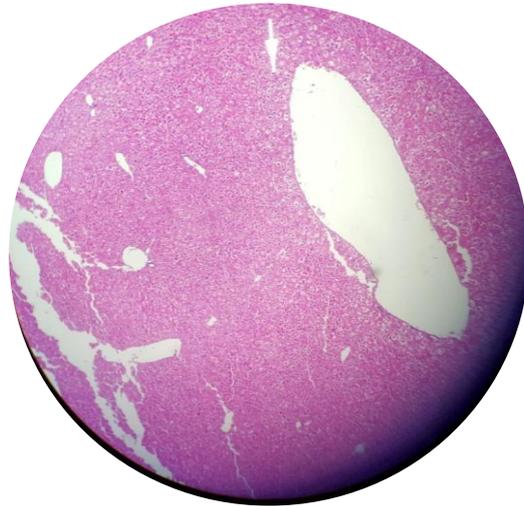


Fig. 6. Corte histológico de hígado de *Mus musculus* BALB/c inoculado experimentalmente con un cultivo de Amazonas. Se observa balonamiento de los hepatocitos.

DISCUSIÓN

Se utilizó especímenes de *Mus musculus* BALB/c machos debido a que en otros estudios se encontró que esta cepa era más susceptible a la infección por *Trypanosoma cruzi*, pudiéndose comparar con el cuadro clínico que afecta al hombre, especialmente los machos ya que en las hembras los estrógenos estimulan la actividad fagocítica de los macrófagos incrementando la respuesta inmune local⁷. Esta elevada susceptibilidad se confirma con el 50% de mortalidad y daños histológicos, hasta el día 30, en ratones infectados con el cultivo de Arequipa.

A fin de facilitar la discusión de los datos que aporta nuestro trabajo se menciona los niveles de parasitemia, signos y alteraciones histopatológicas en la Tabla 1 elaborada a partir de los valores obtenidos en la tabla 1 de parasitemia.

Como se ha venido reflejando a lo largo de todo el trabajo es bien conocida la heterogenicidad existente entre las poblaciones naturales de *T. cruzi*, una variabilidad que se manifiesta en aspectos como su virulencia y morbilidad en el modelo de animal estudiado, capacidad de invasión celular, morfología o composición antigénica.

También está sobradamente contrastado que la naturaleza de la célula hospedadora y las distintas variedades del parásito afecta decisivamente al nivel de parasitación; hay tejidos y líneas celulares especialmente susceptibles a la infección por *T. cruzi* frente a otros que raramente lo sufren.

De acuerdo a una investigación realizada en el norte peruano (Cajamarca), la mayor cantidad de daños histopatológicos se da en el tejido cardiaco y esquelético⁸. Esto se puede verificar en el caso de los ratones infectados con el cultivo de *T. cruzi* procedente de Amazonas, que limita con Cajamarca, pues no se halló daño en el tejido cerebral, pero sí en el tejido cardiaco.

Respecto a los ratones infectados con el cultivo de *T. cruzi* procedente de Arequipa, la presencia de nidos de amastigotas y de los demás daños histopatológicos a nivel de encéfalo y corazón muestra una relación directa con el nivel de parasitemia alcanzado, lo que indica que los parásitos después de instalarse y reconocer los diferentes tejidos se reproducen intensamente a nivel intracelular, dando lugar a cada vez mayor número de parásitos en sangre luego de diferenciarse en tripomastigotas.

Estas diferencias entre los distintos cultivos de diversas zonas geográficas confirman la gran variedad de cepas de este parásito, no sólo desde el punto de vista morfofisiológico, sino también patogénico tratándose de un complejo denominado “cruzi”. Este fenómeno se ve influenciado por factores ambientales e inmunológicos, virulencia, patogenicidad y posible selección de cepas y clones después de interactuar con los vectores y huéspedes vertebrados. La combinación de varios de estos factores podría explicar la variabilidad en el comportamiento biológico del parásito¹⁰.

En general, hemos podido comprobar que la variabilidad de comportamiento demostrada por los dos cultivos estudiados en nuestras experiencias se correlaciona con factores conocidos previamente como la procedencia geográfica o biológica, o la patogenicidad.

Pero el resultado más llamativo aparece cuando, al realizar la comparación de los datos obtenidos de la infección experimental en los especímenes, muestran marcada diferencia. El cultivo de Arequipa generó daño a nivel SNC y SNP, mientras que el cultivo de Amazonas dañó las vísceras, aunque no de manera muy marcada. Estos datos biológicos coinciden con los procedentes de los distintos estudios epidemiológicos, donde Arequipa es zona epidemiológica en alerta, por el número elevado de casos, y Amazonas mantiene un silencio epidemiológico, que claramente no se debe a la falta de casos, más bien a la poca severidad de la enfermedad en esa zona.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alroy K, Huang C, Gilman R, Quispe-Machaca V, Marks M, Ancca-Juarez J, et al. Prevalence and Transmission of *Trypanosoma cruzi* in People of Rural Communities of the High Jungle of Northern Peru. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(5): e0003779
2. Cabrera R, Vega S, Valderrama Y, Cabanillas K, Fernández C, Rodríguez O, et al. New focus of active transmission of Chagas disease in indigenous populations in the Peruvian Amazon basin. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2013; 46(3): 367-372
3. Delgado S, Ernst K, Hanco M.L, Yool S, Comrie A, Sterling C, Gilman R, Náquira C, Levy M. A country bug in the city: urban infestation by the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Arequipa, Peru. International J Health Geographics. 2013; 12: 48
4. Becerril, M. Parasitología médica. 3º ed. Mc Graw Hill: México, 2011.
5. Devera R, Fernandez O, Coura J R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi Complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2003; 98: 1-12.
6. Guhl F. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica y en Colombia. En: Fernando-Rosas MD, Diego I, Vanegas MD, Mauricio F, Cabrales MD, editores. Enfermedad de Chagas. Bogotá: Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular; 2007. p. 7-14.
7. Suárez, N., Cabrera, R., Cartagena, L., Ayaqui R. Características biológicas de una cepa de *Trypanosoma cruzi* en un modelo murino y análisis de supervivencia. Rev. peru. med. exp. salud pública. Lima, Perú 2009; 26(2): 187-192
8. Díaz E, Escalante H, Jara C. Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus musculus* BALB/c infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Pastronylus chinai* del Valle Chamán, La Libertad – Perú. Parasitol Latinoam. 2004; 59: 153-158
9. Aurazo C, Roldan J, Jara C. Caracterización histopatológica en *Mus musculus* BALB/c de *Trypanosoma cruzi* aislado de *Panstrongylus chinai* y de *Panstrongylus herreri* del norte peruano. SCIENDO. 2013; 16(1): 79-90.



Efecto atrayente del ácido láctico sobre poblaciones naturales de *Anopheles albimanus* de Laredo (Trujillo, Perú)

Attractive effect of lactic acid on *Anopheles albimanus* natural populations from Laredo (Trujillo, Peru)

Cecilia Aguilar¹, Vanessa Amaranto¹, Norma Córdova¹, Melissa Esparza¹,
Claudia Gordillo¹ y Judith Roldan²

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

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar cuál de las concentraciones de ácido láctico: de 0.1 ó 1%, produce mayor atracción sobre una población de *Anopheles albimanus* hembra, obtenidos a partir de larvas colectadas en criaderos naturales, del sector Conache-Laredo (Trujillo, Perú). Para determinar la concentración atrayente, se escogieron 60 hembras que fueron sometidas al ácido láctico a 0.1% y 1% en un olfatómetro de acrílico en forma de "Y". El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba T de student. Se demostró que el ácido láctico al 1% tuvo el mayor efecto atrayente sobre la población utilizada de *An. albimanus*.

Palabras clave: *Anopheles*, ácido láctico, concentración, olfatómetro.

ABSTRACT

The aim of this research was to determine which one of the lactic acid concentrations: 0.1 or 1.0% has a major attraction on a female *Anopheles albimanus* population, obtained from larvae collected in natural breeding grounds in the Conache-Laredo (Trujillo, Perú) sector. To determine the attracting concentration, 60 females were selected, which were subjected to 0.1% lactic acid and 1% in a "Y" acrylic olfactometer. Statistical analysis of the data was performed using the student T test. It was shown that 1% lactic acid had the greatest attractive effect on the population of female *An. albimanus*.

Keywords: *Anopheles*, lactic acid, concentration, olfactometer.

INTRODUCCIÓN

Anopheles, género de la familia Culicidae, está conformado por aproximadamente 400 especies, de las cuales solo 40 están involucradas en la transmisión de *Plasmodium* spp., agente etiológico de la malaria¹. De ellas, en el departamento de La Libertad-Perú se han identificado a *An. pseudopunctipennis*, *An. calderoni* y *An. albimanus*^{2,3}.

Las formas adultas de *Anopheles* se alimentan de sustancias azucaradas que usan para el vuelo y sus necesidades metabólicas basales, sin embargo, en las hembras es obligatorio la ingestión de sangre para conseguir las proteínas necesarias para el desarrollo y la puesta de huevos, la cual es obtenida de animales de sangre caliente^{4, 5}.

Las señales de alimentación, reproducción y sitios de oviposición llegan a los zancudos a través de las corrientes de aire en forma de compuestos volátiles⁷. Para percibir estas señales utilizan el olfato, requiriendo la actividad de cascadas de transducción. A nivel celular, en los insectos este proceso se centra en un grupo de neuronas receptoras olfativas (ORNs) que son encerradas en pequeñas estructuras llamadas sensilias⁸.

Ciertos compuestos volátiles generan atracción en un zancudo, es decir, provocan cambios conductuales, de tal manera que estos vuelan en dirección de la fuente que emite tales compuestos. Sin embargo, la respuesta frente estos atrayentes varía de acuerdo al comportamiento de las especies de zancudos⁹ debido a la variabilidad genética entre especies¹⁰. Existen preferencias por diferentes zonas del cuerpo del huésped, debido a que la gran mayoría de kairomonas diferentes del CO₂ son producidas por las glándulas sudoríparas localizándose especialmente en la cabeza, las axilas, región púbica, las palmas de las manos y de los pies¹¹.

La importancia de la atracción por ciertos compuestos volátiles es más evidente cuando se establece la relación huésped-vector.⁷ Un zancudo hembra, en búsqueda de sangre, utiliza una mezcla compleja de compuestos volátiles entre los que sobresalen CO₂, 1-octen-3-ol, ácido butírico, ácido láctico, acetona, 4-metilfenol, amonio, estradiol y lisina¹³.

El ácido láctico es un ácido orgánico producido en la piel de los humanos durante el metabolismo anaeróbico de las células mioepiteliales de las glándulas sudoríparas ecrinas¹⁴. Asimismo, dicho compuesto puede ser producido artificialmente a partir de la fermentación de la celulosa, lignocelulosa y sacarosa.¹⁵ El ácido láctico producido artificialmente ha sido evaluado como atrayente para *An. gambiae* a concentraciones de 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% y 0,0001% solo y en asociación con otros compuestos, encontrándose que por sí solo no resulta significativamente más atractivo que en combinación con otros componentes del sudor humano¹⁶.

Teniendo en cuenta que no se han registrado trabajos sobre la atracción del ácido láctico con *An. albimanus* en el Perú, el objetivo del presente estudio fue determinar cuál de las dos concentraciones de ácido láctico, 0.1% o 1 % tiene mayor atracción sobre una población natural de *An. albimanus* hembra procedentes del sector Conache-Laredo (Perú).

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección e identificación de *An. Albimanus*:

La colecta de larvas se realizó de acuerdo al Manual de Campo para vigilancia entomológica del Ministerio de Salud³, a partir de cuerpos de agua ubicados en el sector Conache, distrito de Laredo, provincia de Trujillo, Región La Libertad, Perú (8° 06' 59.23" LS y 78° 59' 07.01" LO). Se hizo la identificación de la especie *Anopheles albimanus* mediante la clave taxonómica propuesta por la OMS¹. Posteriormente, fueron ubicados en recipientes de plástico de 1L de capacidad los cuales se cubrieron con tul tupido blanco y se aseguraron con doble liga, hasta que emerjan los adultos.

Determinación de la capacidad atrayente

Para determinar la concentración atrayente de ácido láctico se escogieron 60 hembras de 5-8 días de eclosión que se encontraban ávidas, estas se dividieron en 2 grupos experimentales (A y B) de 30 hembras cada uno, los cuales se expusieron a una concentración de ácido láctico al 0.1% y 1%, respectivamente. A su vez estos fueron separados en 3 subgrupos de 10 hembras para cada repetición (A₁, A₂ y A₃) y (B₁, B₂ y B₃). En el puerto N°01 del olfatómetro de acrílico en forma de "Y" se colocó un papel filtro Whatman N°01 (1 x 5 cm²) impregnado con 100uL de ácido láctico a 0.1% y en el

puerto n°02 un papel filtro de las mismas medidas con agua estéril para inyección usado como control. Se colocaron 10 hembras colectadas al azar en el puerto de liberación durante 15 minutos para su aclimatación antes de ubicar las sustancias en los puertos correspondientes. El tiempo del experimento fue de 15 minutos y se contabilizó el número de hembras que se mantuvieron durante este período en cada puerto.

Tratamiento estadístico

Se realizó un análisis estadístico con la prueba T-student para establecer la diferencia significativa de atracción entre las diferentes concentraciones de ácido láctico.

RESULTADOS

En la Fig. 1 se muestra que la concentración de Ácido Láctico al 1% presentó un mayor porcentaje de atracción (33.3%) que la concentración de 0.1% (6.7%) sobre *An. albimanus* hembra.

DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron mediante la prueba T-student muestran que hay una diferencia significativa de atracción entre las concentraciones 0.1% y 1% de Ácido Láctico utilizadas, obteniéndose un mayor efecto atrayente de *An. albimanus* hembra con la concentración al 1%. Estos resultados difieren de una investigación en donde se determinó que la concentración de Ácido Láctico al 0.001% tuvo mayor efecto atrayente que la concentración de 1% para *An. gambiae*¹¹; esto indicaría que la respuesta de atracción frente al ácido láctico para esta especie es distinta que para *An. albimanus*.

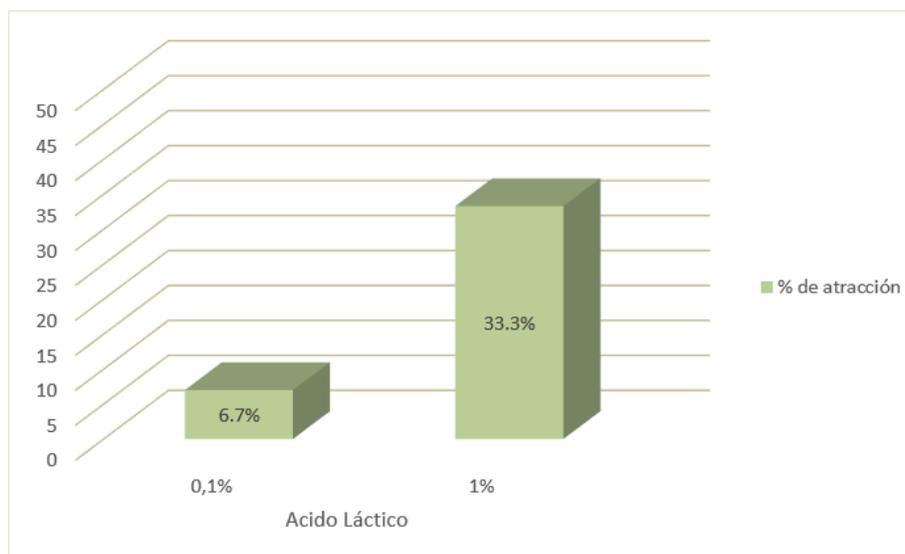


Fig 1. Porcentajes de atracción de hembras de *Anopheles albimanus* frente a concentraciones al 0.1% y 1 % de Ácido Láctico en condiciones de laboratorio (N° hembras de *Anopheles albimanus* por ensayo: 10; Control negativo: Agua estéril -100µL-; Volumen de Ácido Láctico: 100µL; HR: 50% ±5%, T°24,5°C ±0.1; Tiempo de evaluación: 2h; p<0.05 entre el número de zancudos atraídos por la concentración de 0.1% y 1% -T Student).

En investigaciones previas se ha descrito que la efectiva atracción del ácido láctico en *Anopheles* sp. se debe a la presencia de receptores ORNs presentes en los apéndices olfativos de la antena, probóscide y palpo maxilar de este modo cada receptor tiene un perfil de olor-respuesta. Por ejemplo, algunos receptores AgORNs de *An. gambiae* responden a un pequeño grupo de sustancias odoríferas

(específicos), mientras que otros están más ampliamente generalizados y la respuesta de estos receptores varía en una amplia gama de clases químicas¹⁹, ello explicaría la atracción en *An. albimanus* por el ácido láctico.

Según lo expuesto por otros autores, las hembras de *An. gambiae* se ven altamente atraídas por una mezcla de compuestos volátiles de origen humano como el amoníaco, ácido láctico y varios ácidos carboxílicos debido a que estos ejercen un efecto sinérgico en comparación a un solo compuesto volátil como el ácido láctico¹⁵. En el presente estudio se probó al ácido láctico como único atrayente, determinándose que la concentración al 1 %, funciona como atrayente en hembras de *An. albimanus*, sin embargo, adicionándole otros compuestos podríamos tener mejores resultados en la generación de un olor que tenga mayor poder de atracción hacia este zancudo.

La muestra no probabilística de *An. albimanus* empleada fue 10 zancudos hembra por ensayo, esto resultaría ser un factor en desventaja, ya que según otros estudios utilizan una cantidad de 20-30 zancudos hembra por ensayo^{21, 22}. Pese a esto la investigación realizada prueba el efecto atrayente que presenta el ácido láctico a 1% para una población de 60 zancudos hembra de *An. albimanus* que no pueden ser generalizados a todos los zancudos que pertenecen a esta especie.

Finalmente los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el Ácido Láctico al 1% tiene mayor efecto atrayente que al 0.1% sobre 60 hembras de *An. albimanus*. Además se evidencio que ambas concentraciones de ácido láctico generan diferente efecto atrayente sobre las 60 hembras de *An. albimanus* procedentes de Conache.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). Malaria entomology and vector control. Training module on malaria control. Geneva: World Health Organization; 2013.
2. Marquino W, Ylquimiche L, Hermenegildo Y. Efficacy and tolerability of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine and sulfadoxine-pyrimethamine alone for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 May; 72(5):568-72.
3. Dirección General De Salud Ambiental. Ministerio De Salud. Manual de Campo para vigilancia entomológica. Perú. 2002.
4. Khattab A, Barroso M, Miettinen T, Meri S. *Anopheles* Midgut Epithelium Evades Human Complement Activity by Capturing Factor H from the Blood Meal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(2):e0003513.
5. Ribeiro JMC, Mans BJ, Arcà B. An insight into the sialome of blood feeding Nematocera. *Insect Biochem & Mol Biol.* 2010; 40(11):767-784.
6. Massebo F, Balkew M, Gebre-Michael T, Lindtjorn B. Zoophagic behaviour of anopheline mosquitoes in southwest Ethiopia: opportunity for malaria vector control. *Parasites & Vectors.* 2015; 8:645.
7. Sanford MR, Tomberlin JK. Conditioning Individual Mosquitoes to an Odor: Sex, Source, and Time. *PLoS ONE.* 2011; 6(8):e24218.
8. Schmidt JO, Attractant or pheromone: the case of Nasonov Secretion and Honeybee swarms. *J Chem Ecol* 1999; 25 (9): 1-10.
9. Vezenegho SB, Adde A, Gaborit P, et al. Mosquito magnet® liberty plus trap baited with octenol confirmed best candidate for *Anopheles* surveillance and proved promising in predicting risk of malaria transmission in French Guiana. *Malaria Journal.* 2014; 13:384.
10. Mweresa CK, Omusula P, Otieno B, van Loon JJ, Takken W, Mukabana WR. Molasses as a source of carbon dioxide for attracting the malaria mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Malaria Journal.* 2014; 13:160.
11. Dekker T, Geiger M, Carde RT. Carbon dioxide instantly sensitizes female yellow fever mosquitoes to human skin odours. *J Exp Biol.* 2005; 208: 2963-2972.
12. Sutcliffe JF, Yin S. Behavioural responses of females of two anopheline mosquito species to human-occupied, insecticide-treated and untreated bed nets. *Malaria Journal.* 2014; 13:294.
13. Njiru BN, Mukabana WR, Takken W, Knols BG. Trapping of the malaria vector *Anopheles gambiae* with odour-baited MM-X traps in semi-field conditions in western Kenya. *Malaria Journal.* 2006; 5:39.
14. Torres JL, Rodríguez MH. Physico-chemical signals involved in host localization and in the induction of mosquito bites. *Salud Pública Mex.* 2003; 45 (6): 497-505.
15. Smallegange RC, Qiu YT, Van Loon JJ, Takken W. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomons in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). *Chemical senses.* 2016; 30: 145-152.

16. Vezenegho SB, Adde A, Gaborit P, et al. Mosquito magnet[®] liberty plus trap baited with octenol confirmed best candidate for *Anopheles* surveillance and proved promising in predicting risk of malaria transmission in French Guiana. *Malaria Journal*. 2014; 13:384.
17. Omayda Pérez, y col. Manual de Indicaciones Técnicas para Insectarios. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas. 2004.
18. Omrani SM, Vatandoost H, Oshaghi MA, Shokri F, Guerin PM, Yaghoobi Ershadi MR, et al. Fabrication of an olfactometer for mosquito behavioural studies. *JVBD*. 2010; 47(1):17-25
19. Carey A, Wang G, Su C.-Y, Zwiebel LJ, Carlson JR. Odourant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature*. 2010; 464(7285): 66-71.
20. Jiménez P, Conn JE, Wirtz R, Brochero H. *Anopheles* (Diptera: Culicidae) malaria vectors in the municipality of Puerto Carreno, Vichada, Colombia. *Biomedica* 2012; 32(1): 13–21.
21. Fernández-Grandon GM, Gezan SA, Armour JAL, Pickett JA, Logan JG. Heritability of Attractiveness to Mosquitoes. *PLoS ONE*, 2015; 10(4): e0122716.
22. Verhulst NO, Weldegergis BT, Menger D, Takken W. Attractiveness of volatiles from different body parts to the malaria mosquito *Anopheles coluzzii* is affected by deodorant compounds. *Scientific Reports* 2016; 6: 27141



Géneros bacterianos presentes en el efluente con anilina de una curtiembre del Distrito de Florencia de Mora, Trujillo (Perú)

Bacterial genera present in the effluent with aniline a tannery of the Florencia de Mora district (Trujillo, Peru)

Dara Atilano¹, Sandy Benites¹, Roberth Cabrera¹, Marly Flores¹, Irvin Gutiérrez¹, Katherine Sánchez¹ y Luis Llenque²

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento e identificación de géneros bacterianos presentes en el efluente con anilina de una curtiembre del Distrito de Florencia de Mora (Trujillo, Perú). Se realizó una inoculación de 20 mL de efluente con anilina filtrado en 180 mL de caldo medio mínimo de sales (CMMS) en un recipiente con un sistema de aireación estéril a 0,5 VVM por cinco días a temperatura ambiental (23-25 °C). El aislamiento bacteriano se realizó en agar medio mínimo de sales más anilinas (0,3%), incubándose a 26 °C por 3 días. Para demostrar que los géneros aislados tienen la capacidad de degradar el colorante; se realizó una prueba cualitativa empleando caldo medio mínimo de sales con anilina a 50 ppm y 100 ppm; con una suspensión bacteriana al tubo N° 3 del Nefelómetro de Macfarlán y se incubó a 26 °C por 14 días. Se logró aislar a tres géneros bacterianos (*Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*), que presentaron la capacidad de degradar el colorante anilina. Las bacterias lograron un desarrollo y crecimiento en el medio mínimo de sales con anilina y produciendo un aclaramiento del medio de cultivo con el paso del tiempo. Por lo tanto de un efluente con anilina de una curtiembre del distrito de Florencia de Mora se aislaron e identificaron: *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*.

Palabras clave: Anilina, prueba cualitativa, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*.

ABSTRACT

The present work had as objective the isolation and identification of bacterial genera present in the effluent with aniline from a tannery of the District of Florence de Mora. An inoculation of 20 mL of filtered aniline effluent in 180 mL of minimal salt broth (CMMS) was performed in a vessel with a sterile aeration system at 0.5 VVM for 5 days at room temperature (23-25 °C). The bacterial isolation was performed on minimal medium agar of salts plus anilines (0.3%), incubating at 26 °C for 3 days. To demonstrate that the isolated genera have the ability to degrade the dye; A qualitative test was carried out using minimum average broth of salts with aniline at 50 ppm and 100 ppm; With a bacterial suspension to tube No. 3 of the Macfarlane Nephelometer and incubated at 26 °C for 14 days. It was possible to isolate three bacterial genera (*Enterobacter*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*), which presented the ability to degrade the dye aniline. The bacteria achieved a development and growth in the minimal medium of salts with aniline and producing a clearance of the culture medium with the passage of time. Therefore, an effluent with aniline from a tannery in the Florence district of Mora was isolated and identified: *Enterobacter*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*.

Keywords: Aniline, qualitative test, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*.

INTRODUCCIÓN

La anilina es una amina aromática simple de origen orgánico y, junto a sus derivados, son sustancias químicas cuya presencia en el ambiente es el resultado de diversos efluentes que la originan; estos compuestos son ampliamente utilizados como materias primas o en etapas intermedias en la fabricación de productos químicos industriales, tales como pesticidas, medicamentos, colorantes, polímeros, agentes tensoactivos, cosméticos e inhibidores de corrosión, especialmente en fábricas de colorantes¹. Sin embargo, estos compuestos tienen propiedades tóxicas, mutagénicas, carcinogénicas, y se descargan a la atmósfera, agua y suelo, constituyendo una clase importante de contaminantes del medio ambiente².

La mayor parte de los tratamientos utilizados para reducir el impacto negativo de los colorantes al ambiente se concentra en la sustitución de sustancias químicas menos tóxicas, que en la aplicación de alternativas más seguras que erradiquen el problema. A pesar de que las sustancias utilizadas son de baja toxicidad, debido a la masificación de su uso estamos expuestos a altas dosis. Lo señalado exige buscar un tratamiento biológico que elimine el problema de una manera segura tanto para el ambiente como para los seres humanos³.

Existe un gran número de microorganismos con la capacidad de eliminar el color de las aguas residuales mediante la biosorción, la biodegradación aeróbica o anaeróbica y la producción de enzimas que catalizan la decoloración; por ello, la biodegradación con enzimas producidas por algunos microorganismos es utilizado cada vez con más frecuencia, debido a su capacidad de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos, no fenólicos y otros compuestos aromáticos⁴.

Las bacterias que metabolizan la anilina inician la degradación mediante la formación de catecol a través de la vía meta-escisión, tales como: *Pseudomonas putida* UCC22, *Acinetobacter* sp. YAA, *Pseudomonas* sp. AW-2, y *Delftia tsuruhatensis* AD9; mientras que, *Frateuria* sp. ANA-18 y *Delftia* sp. XYJ6 degradan anilina través de la vía orto-escisión⁵. El mecanismo general de desestabilización del anillo aromático desarrollado por los microorganismos aerobios implica una oxidación progresiva de la estructura resonante; al respecto, se tiene conocimiento, a nivel molecular, de algunas rutas catabólicas microbianas de compuestos aromáticos, especialmente de las pertenecientes al género *Pseudomonas* sp.⁶. Una comparación detallada de estas rutas metabólicas indica que el primer paso consiste en la incorporación de dos grupos hidroxilo en el anillo bencénico para lo cual los microorganismos han desarrollado una serie de rutas periféricas de oxidación, deshalogenación, desnitración o desulfuración, que dan lugar a un intermediario dihidroxilado susceptible a la acción de dioxigenasas específicas que provocarán la apertura del anillo. Estos derivados dihidroxilados serán canalizados por dos rutas generales: por la ruta del catecol, en la que los intermediarios catecólicos pueden ser metabolizados a su vez mediante la ruta meta o la ruta orto dependiendo de la posición en la que se efectúe la apertura del anillo, o por la ruta del gentisato. Los metabolitos finales de ambas rutas entran directamente en el metabolismo intermediario de la célula⁷.

La conversión inicial de anilina a catecol es una reacción de múltiples etapas catalizada por tres enzimas; la glutamina sintetasa (GS), una amidotransferasa y un dioxigenasa anilina. La GS es una enzima dependiente de ATP y de L-glutamato, que transforma la anilina en gamma-glutamylanilamida, y la dioxigenasa anilina hace la conversión de gamma-glutamylanilina en catecol⁵.

Se sabe que *Nocardia* sp, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter* sp⁸, *Dietzia notronolimnaea*, *Dietzia papilomatosis* sp., *Rhodococcus koreensis* sp, como degradadores de anilina⁹. *Enterobacter* sp. EC3 también mostró una fuerte capacidad para decolorar diversos colorantes textiles, refiriéndose que la decoloración se debe a la biodegradación y no a una adsorción superficial inactiva¹⁰. Por otro lado al agruparse el consorcio bacteriano que contiene *Enterobacter dissolvens* AGYP1 y *Pseudomonas aeruginosa* AGYP2 representan una eliminación del 96% de colorante (100 mg / l) dentro de 6 h cuando se inmoviliza en agar-agar¹¹.

Diversos microorganismos han sido usados en la degradación de colorantes. Se ha reportado una nueva cepa bacteriana aislada de las aguas subterráneas, designada *Pseudomonas migulae* AN1 demostrando que era capaz de degradar la anilina en un intervalo de 72 horas a 10°C a una concentración de 135 a 2202 mg L (-1)¹². Por otro lado la formación y la actividad de las biopelículas de *Pseudomonas migulae* AN-1, fueron estudiadas para la remediación in situ de un acuífero contaminado. Las biopelículas cultivadas en medio de sal mineral con anilina exhibieron tolerancia a

altas concentraciones de anilina. En la tasa de degradación de la anilina, las biopelículas de *Pseudomonas migulae* AN-1 muestran diferentes niveles en comparación con las células planctónicas. Los resultados demuestran que las biopelículas de *Pseudomonas migulae* AN-1 sobrevivieron el proceso con una alta eficiencia de degradantes de la anilina¹³. También se ha registrado el metabolismo aerobio de colorantes azo utilizando diferentes cepas de bacterias, como; *Aeromonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas luteola*¹⁴.

Debido a que los efluentes con anilina procedentes de curtiembres, son eliminados por sus alcantarillas a medios acuático, provocando bioacumulación y disminución del poder absorbente de agua, por ende, una disminución de la actividad fotosintética de los organismos presentes en el ecosistema, disminución del oxígeno disuelto en el agua, no contando con un tratamiento adecuado; es importante realizar este proyecto con la finalidad de proponer un método biológico para el tratamiento de estos efluentes que contaminan el agua tanto de la superficie como la subterránea. Por tal motivo el presente trabajo tiene como objetivo aislar e identificar géneros bacterianos procedente de un efluente con anilina de una curtiembre del Distrito de Florencia de Mora, en condiciones de laboratorio

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras de anilina

La muestra fue obtenida de una curtiembre del Distrito de Florencia de Mora, provincia de Trujillo, Región La Libertad (Perú) a partir de un pozo reservorio de efluente con anilina, de donde se recolectaron submuestras de los cuatro extremos y del centro del pozo a 30 cm debajo de la superficie. Las submuestras fueron depositadas en un recipiente plástico de 4 litros en donde se mezcló homogéneamente y del cual se separó un litro aproximadamente en un envase de plástico de primer uso, para luego ser transportado al laboratorio.

Aislamiento e identificación de géneros bacterianos

En el laboratorio, la muestra fue filtrada en 5 capas de gasa de primer uso, en un recipiente estéril. Luego se realizó un enriquecimiento en 180 mL de medio mínimo de sales con anilina al 0.3%, con 20 mL de muestra filtrada colocando en un recipiente, conectado a un sistema de aireación esterial a 0.5 VVM, por 5 días a temperatura ambiental (23-25°C). Luego de la etapa de enriquecimiento de la muestra, se procedió a realizar diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶; a partir de estas, se realizó la siembra en superficie en placa por duplicado en agar medio mínimo de sales con anilina al 0,3%, incubándose por 3 días a 26°C. Posteriormente, se seleccionaron las colonias en base a sus características macroscópicas y microscópicas (coloración Gram). De las colonias seleccionadas se sembraron en agar medio mínimo de sales con anilina al 0,3% para su conservación y posteriores pruebas. Para su identificación se realizaron las pruebas bioquímicas de TSI, LIA, CITRATO, SIM y OXIDASA.

Prueba cualitativa:

Se realizó una estandarización de las colonias seleccionadas en solución salina fisiológica estéril comparándose la turbidez con el tubo N° 3 (9x10⁸ UFC/mL) del nefelómetro de Mac Farland, luego se prepararon 10 tubos por cada cultivo, conteniendo cada tubo 4,5 mL de medio mínimo de sales y anilina a distintas concentraciones (50 ppm a 1000 ppm). Además del control positivo (medio mínimo de sales más anilina a distinta concentración) y del control negativo (medio mínimo de sales más suspensión bacteriana). Se inoculó a cada tubo 0,5mL de la suspensión bacteriana estandarizada anteriormente y se incubó a 26 °C por 14 días.

RESULTADOS

Se aislaron e identificaron a los géneros: *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, cuyos criterios de identificación aparecen en las Tablas 1, 2 y 3. Se observó el cambio del color del caldo medio mínimo de sales combinado con anilina cuando se cultivaron a los tres géneros (Figs, 1 y 2) en cambio ello no ocurrió cuando el medio carecía de anilina (control negativo), como se observa en la Fig. 3.

Tabla 1. Características bioquímicas y microscópicas de *Enterobacter* aislado de una curtiembre con anilina del distrito de Florencia de Mora (Trujillo, Perú).

Prueba	Lectura
¹ TSI	⁴ A/A
² LIA	Negativo
CITRATO	Positivo
³ SIM	⁵ S(-) ⁶ I(-) ⁷ M(+)
Producción de gas	+++
Coloración GRAM	Gram negativo

¹TSI: Agar hierro triple azúcar. ²LIA: Agar lisina hierro. ³SIM: Sulfuro, indol, movilidad. ⁴A/A = acidez del medio por degradación de lactosa, sacarosa y glucosa. ⁵S = producción de ácido sulfhídrico. ⁶I = producción de Indol. ⁷M = movilidad.

Tabla 2. Características bioquímicas y microscópicas de *Acinetobacter* aislado de una curtiembre con anilina del distrito de Florencia de Mora.

Prueba	Lectura
¹ TSI	⁴ K/K
² LIA	Negativo
CITRATO	Positivo
³ SIM	⁵ S(-) ⁶ I(-) ⁷ M(-)
OXIDASA	Negativo
Coloración GRAM	Gram negativo

¹TSI: Agar hierro triple azúcar. ²LIA: Agar lisina hierro. ³SIM: Sulfuro, indol, movilidad. ⁴K/K = no fermenta glucosa, sacarosa ni lactosa. ⁵S = producción de ácido sulfhídrico. ⁶I = producción de Indol. ⁷M = movilidad.

Tabla 3. Características bioquímicas y microscópicas de *Pseudomonas* aislado de una curtiembre con anilina del distrito de Florencia de Mora.

Prueba	Lectura
¹ TSI	⁴ K/K
² LIA	Positivo
CITRATO	Positivo
³ SIM	⁵ S(-) ⁶ I(-) ⁷ M(+)
OXIDASA	Positivo
Producción de gas	Negativo
Coloración GRAM	Gram negativo

¹TSI: Agar hierro triple azúcar. ²LIA: Agar lisina hierro. ³SIM: Sulfuro, indol, movilidad. ⁴K/K = no fermenta glucosa, sacarosa ni lactosa. ⁵S = producción de ácido sulfhídrico. ⁶I = producción de Indol. ⁷M = movilidad.

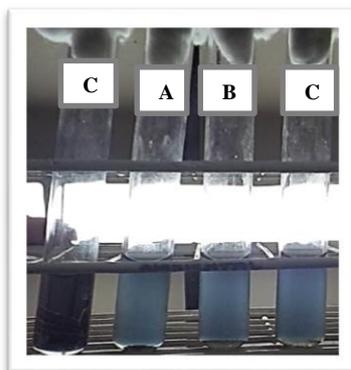


Fig. 1. Tubos de ensayo con caldo medio mínimo de sales (MMS) y anilina; a una concentración de 50 ppm del colorante, inoculados con 1mL de suspensión de cada cultivo bacteriano equivalente al tubo N°3 (9×10^8 UFC/mL) del nefelómetro de Mac Farland, menos el CP; después de 14 días de incubación a 26 °C. (CP: control positivo, que contiene MMS y anilina. **A:** MMS y anilina, inoculado con *Pseudomonas*. **B:** MMS y anilina, inoculado con *Acinetobacter*. **C:** MMS y anilina, inoculado con *Enterobacter*)

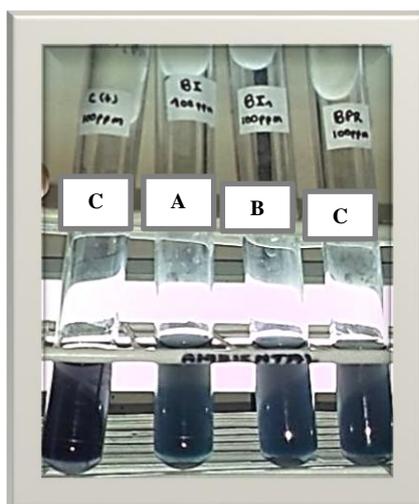


Fig. 2. Tubos de ensayo con caldo medio mínimo de sales (MMS) y anilina; a una concentración de 100 ppm del colorante, inoculados con 1mL de suspensión de cada cultivo bacteriano equivalente al tubo N°3 (9×10^8 UFC/mL) del nefelómetro de Mac Farland, menos el CP; después de 14 días de incubación a 26 °C. (CP: control positivo, que contiene MMS y anilina. **A:** MMS y anilina, inoculado con *Pseudomonas*. **B:** MMS y anilina, inoculado con *Acinetobacter*. **C:** MMS y anilina, inoculado con *Enterobacter*).

DISCUSIÓN

Según la literatura revisada, indica que las bacterias degradadores de anilina reportadas en su mayoría son Gram negativas, coherente con los géneros bacterianos encontrados en este estudio; además de reportar a los géneros de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* como buenos degradadores de anilina y al género *Enterobacter* reportado en trabajos relacionados con otros colorantes que pertenecen a los hidrocarburos aromáticos.

No hay muchos trabajos que permitan realizar una comparación más detallada con nuestros resultados, debido a que la mayoría de trabajos existentes realizan pruebas con bacterias ya aisladas y conocidas que no son nativas.

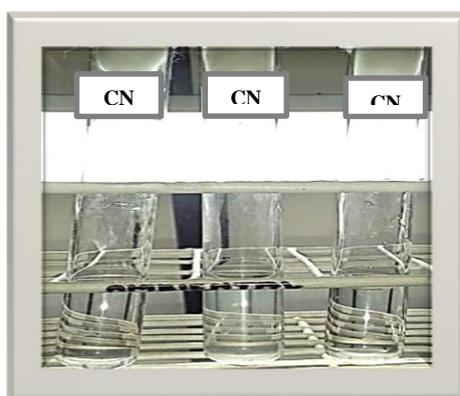


Fig. 3. Tubos de ensayo con caldo medio mínimo de sales (MMS) inoculados con 1mL de suspensión de cada cultivo bacteriano equivalente al tubo N°3 (9×10^8 UFC/mL) del nefelómetro de Mac Farland; estos tubos vendrán hacer los controles negativos. (CN-A: control negativo inoculado con *Pseudomonas*. CN-B: control negativo inoculado con *Acinetobacter*. CN-C: control negativo inoculado con *Enterobacter*).

Para demostrar la degradación de la anilina por los tres géneros bacterianos identificados de forma indirecta, se realizó un método cualitativo. La evaluación de la degradación del colorante se realizó mediante la observación de un aclaramiento de color, a comparación del control, aprovechando la capacidad de las colonias de utilizar el colorante como fuente de carbono; como menciona la literatura, debido a las enzimas que producen.

En los tres cultivos se observó este aclaramiento del medio a diferencia del control (ver fig. 1 y 2); además que en un control negativo realizado con solo la suspensión bacteriana y el caldo medio mínimo de sales no se observó turbidez (crecimiento) en el medio. Por lo tanto nos permite decir que las bacterias utilizan el colorante para su metabolismo como fuente de carbono ya que al no agregar el colorante en el control negativo no se observa turbidez (crecimiento)

Se ha descrito que las bacterias que degradan anilina lo asimilan mediante vías catabólicas; empleando dos tipos de procesos en condiciones aerobias, el cual consiste en la hidroxilación del anillo aromático y la escisión del anillo bencénico catalizado por enzimas que requieren oxígeno denominados monooxigenasas o hidroxilasas y dioxigenasas respectivamente. Generalmente, los productos de rotura son metabolizados hasta compuestos intermediarios como el catecol y otros¹⁵.

Estudios realizados con los género *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, se ha encontrado que realizan una conversión inicial de anilina a catecol la cual es una reacción de varios pasos catalizada por tres enzimas, una glutamina sintetasa (GS), glutamina amidotransferasa y una dioxigenasa anilina (una grande y pequeñas subunidades de un componente de la oxigenasa y un componente de ferredoxina reductasa). En el primer paso, catalizado por gamma-glutamylanilina. El siguiente paso, catalizado por dioxigenasa anilina implica conversión de gamma-glutamylanilina en catecol. Altas concentraciones de gamma-glutamylanilina son citotóxicas, pero la acción de otra enzima, glutamina amidotransferasa, previene su acumulación por conversión de anilina. En el caso del género *Enterobacter* no hay información referente al metabolismo de anilina¹⁶.

Los catecoles son un grupo de compuestos intermediarios representativos centrales en el metabolismo de compuestos aromáticos por bacterias. Las bacterias lo degradan principalmente a través de dos vías: la vía de orto-escisión y la vía de meta-escisión, en el que los primeros pasos son reacciones de escisión de anillos mediada por catecol 1,2-dioxigenasa (C12O) y catecol 2,3-dioxigenasa (C23O), respectivamente¹⁷. La degradación del catecol mediada por estas enzimas ha sido reportada en los metabolismos de muchos compuestos aromáticos por bacterias del medio ambiente. Por lo tanto, estas enzimas juegan un papel importante y esencial en la degradación aeróbica de los productos químicos con los anillos aromáticos¹⁸.

En un efluente con anilina de una curtiembre del distrito de Florencia de Mora se aislaron e identificaron *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*, que tienen la capacidad de metabolizar y degradar la anilina, que pueden ser empleados en los tratamientos de estas aguas antes de ser vertidas a los ríos y reducir la contaminación de estos ambientes por estos efluentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhunia F, Saha NC, Kaviraj A. Effects of aniline an aromatic amine to some freshwater organisms. *Ecotoxicology*, 2003; 12(5): 397-404.
2. Takeo M, Ohara A, Sakae S, Okamoto Y, Kitamura C, Kato DI, et all. Function of a glutamine synthetase-like protein in bacterial aniline oxidation via γ -glutamylanilide. *J Bacteriol*, 2013; 195(19):4406-4414.
3. Garzón R. “Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilana Webber var. Azul”. [Tesis doctoral]. Bogotá: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad Javeriana de Bogotá; 2009; p. 37-41.
4. Mayer A, Staples R. Laccase: new functions for an old enzyme. *United States of America. Phytochemistry*, 2002; 60 (6): 551-565.
5. Arora P. Bacterial degradation of monocyclic aromatic amines. *Frontiers in Microbiology*, 2015; 6:820. doi:10.3389/fmicb.2015.00820.
6. Harayama S, Timmis K. *Aerobic biodegradation of aromatics hydrocarbons by bacteria*. Sigel and Dekker Inc. New York, 1992; p. 99-156.
7. Frantz B, Chakrabarty M. *The biology of Pseudomonas*. Ed. J.R. Sokatch. New York: Academic Press; 1996. p. 295-323.
8. Aoki K, Ohtsuka K, Shinke R, Nishira H. Rapid biodegradation of aniline by *Frateria* species ANA-18 and its aniline metabolism. *Agricultural and biological chemistry*, 1984; 48(4):865-872.
9. Jin Q, Hu Z, Jin Z, Qiu L, Zhong W, y Pan Z. Biodegradation of aniline in an alkaline environment by a novel strain of the halophilic bacterium, *Dietzia natronolimnaea* JQ-AN. *Bioresource technology*, 2012; 117, 148-154.
10. Wang H, Zheng X, Su J, Tian Y, Xiong X y Zheng T. Decoloración biológica de los reactivos colorantes reactivos Negro 5 por una novedosa cepa bacteriana aislada *Enterobacter* sp. EC3, 2009; 15(3):9-65.
11. Patel Y, Gupte A. Biological treatment of textile dyes by agar-agar immobilized consortium in a packed bed reactor. *Water Environ Res*, 2015; 87(3):242-251.
12. Liu Y, Qu D, Wen Y, Ren H. Biorremediación de *Pseudomonas migulae* AN-1 a baja temperatura de anilina suspendido libremente y magnético. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015; 99(12):26-53
13. Zhao Y, Qu D, Zhou R, Yang S, Ren H. Efficacy of forming biofilms by *Pseudomonas migulae* AN-1 toward in situ bioremediation of aniline-contaminated aquifer by groundwater circulation wells. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 2016; 23(12):73-115
14. Cortázar A, González C, Coronel C, Escalante J, Castro J, Villagómez J. Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Universidad y ciencia*; 2012; 28(2): 186-2979.
15. Cristovao R, Tavares A, Ribeiro A, Loureiro J, Boaventura R, Macedo E. Kinetic modeling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. *Bioresource Technol*, 2008; 99: 4768 - 4774.
16. Carrasco D. Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, comprobando su actividad enzimática. [Tesis Doctoral]. Quito-Ecuador: Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales; 2007.
17. Suarez M. Degradación de los ácidos 3- y 4- Hidroxibenzoico en *Klebsiella pneumoniae*: Purificación, caracterización y propiedades de las hidroxilasas. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1993.
18. Takeo M, Nishimura M, Shirai M, Takahashi H, Negoro S. Purification and characterization of catechol 2, 3-dioxygenase from the aniline degradation pathway of *Acinetobacter* sp. YAA and its mutant enzyme, which resists substrate inhibition. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2007; 71(7), 1668-1675.



Pseudomonas fluorescens reductora de Cromo VI a partir de agua residual de una curtiembre

Isolation of *Pseudomonas* spp. Chromium VI reductants from wastewater from a tannery

Silvia Castillo¹, Tony Díaz¹, Andrés Holguín¹, Cristian Peláez¹, Miguel Ramírez¹, Heydi Rodríguez¹ y Heber Robles²

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología, UNT

RESUMEN

La finalidad del presente trabajo fue aislar *Pseudomonas* spp. reductoras de Cromo VI. Se usó 150mL de agua residual de una curtiembre como muestra biológica a la cual se realizó un enriquecimiento no selectivo en medio Luria Bertani durante 24h a 30°C. Se preparó Medio King B suplementado con $K_2Cr_2O_7$ para el aislamiento obteniéndose 9 cultivos 1A, 1B, 1C; 2A, 2B, 2C; 3A, 3B, 3C y se seleccionó el cultivo 3C que se identificó fenotípicamente como *Pseudomonas fluorescens* mediante observación de colonias verdes fluorescentes en Medio King Base y pigmento verde fluorescente en Caldo Glutamato y mediante la Prueba de Lipasa, (permitiendo diferenciarla de otras especies) siendo *P. fluorescens* Lipasa negativo. La reducción de Cromo VI se llevó a cabo en Medio Luria Bertani suplementado con $K_2Cr_2O_7$ (Cr VI 69,75 mg/L) en condiciones de aerobiosis y agitación (130 RPM) a 22,3 °C durante 12 horas. La reducción se determinó mediante método colorimétrico que se basa en la reacción del cromo hexavalente con 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, lo que produce la formación de un compuesto desconocido de color rojo violeta. Éste puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm y la absorbancia es proporcional a la concentración de cromo en la muestra, obteniéndose que el cultivo aislado identificado como *P. fluorescens* tiene la capacidad de reducir Cr VI en un 51.9 %. (de 69,75 mg/L a 33, 58 mg/L).

Palabras clave: Cromo VI, reducción, *Pseudomonas fluorescens*.

ABSTRACT

The purpose of this work was to isolate *Pseudomonas* spp. reducers of Chromium VI. 150mL of wastewater from a tannery it was used as a biological sample to which non-selective enrichment was carried out in Luria Bertani medium for 24h at 30°C. King B medium supplemented with $K_2Cr_2O_7$ was prepared for isolation to yield 9 cultures 1A, 1B, 1C; 2A, 2B, 2C; 3A, 3B, 3C and the 3C culture was selected which was phenotypically identified as *Pseudomonas fluorescens* by observation of fluorescent green colonies in Medium King Base and fluorescent green pigment in Glutamate Broth and by the Lipase Test (Allowing differentiation of other species), *Pseudomonas fluorescens* is Lipase negative. Chromium VI reduction was carried out in Luria Bertani medium supplemented with $K_2Cr_2O_7$ (Cr VI 69.75 mg / L) under aerobiosis and stirring conditions (130 RPM) at 22.3 ° C for 12 hours. The reduction was determined by colorimetric method which is based on the reaction of hexavalent chromium with 1,5-diphenylcarbazide in acid medium, which causes the formation of an unknown compound of red violet color. This can be measured spectrophotometrically at a wavelength of 540 nm and the absorbance is proportional to the concentration of chromium in the sample, with the isolated culture identified as *Pseudomonas fluorescens* being able to reduce Cr VI by 51.9%. (From 69.75 mg / L to 33.58 mg / L).

Keywords: Chromium VI, reduction, *Pseudomonas fluorescens*

INTRODUCCIÓN

Los compuestos de cromo hexavalente (cromatos y dicromatos) son altamente tóxicos y son considerados como mutágenos y carcinógenos. Estos compuestos son desechados frecuentemente hacia el medio ambiente como resultado de diversos procesos industriales¹. Las principales fuentes de contaminación por cromo provienen de su uso industrial en curtiembres.²

El curtido es el proceso por el cual las pieles de los animales como vacunos, ovinos y caprinos son convertidas en cuero, es una técnica que permite estabilizar la materia orgánica mediante una serie de etapas, en las que es necesario adicionar productos químicos. Se utiliza CrSO_4 con la finalidad de estabilizar la estructura de colágeno que compone al cuero.³ La descarga de cromo en efluentes contamina suelos, sedimentos y aguas superficiales y subterráneas. El Cr (VI) en el ambiente puede llegar a los seres humanos y animales a través del agua y los alimentos.⁴

Las empresas industriales que tratan el efluente de curtiembre utilizan métodos físico-químicos para eliminar la concentración Cr^{6+} tales métodos incluyen la reducción química, precipitación, filtración, electroforesis, tratamiento químico, las tecnologías de membrana, la recuperación por evaporación, extracción con disolvente, intercambio iónico, ósmosis inversa, y la adsorción sobre carbón activado. En países en desarrollo, ninguno de estos métodos ha alcanzado la viabilidad económica. Por lo tanto, los métodos convencionales para la eliminación de Cr^{6+} de residuales presentan un costo excesivo. Estas limitaciones han llevado a una continua búsqueda de tecnologías de tratamiento alternativos que se basan en la búsqueda de microorganismos con capacidad reductora de dicho metal como un enfoque eficaz y ambientalmente aceptable.⁴

Se sabe que los microorganismos pueden interactuar con iones de metales pesados. Tales interacciones se producen en muchos géneros de microorganismos utilizados para la biorremediación.

⁴ Algunas especies de *Pseudomonas* pueden reducir eficazmente el Cr (VI) en las aguas residuales industriales y mostrar gran potencial en la biorremediación de Cr (VI). Sin embargo en presencia de exudados (metabolitos orgánicos celulares), bacterias tales como *Pseudomonas* spp. no solo puede reducir el Cr (VI), sino también formar Cr soluble (III) como productos finales.⁵ Las diferentes especies de *Pseudomonas* muestran una variada adaptabilidad a entornos y diferente capacidad de la reducción de Cr (VI). Se sabe entonces que especies del género *Pseudomonas* existentes en lugares contaminados con Cromo, tienen capacidad de reducir Cr (VI) a Cr (III) ⁶

En un estudio una cepa de *Pseudomonas fluorescens* fue aislada de los suelos industriales del estado de Aligarh, India. Esta cepa fue resistente a algunos de los principales contaminantes del agua, entre ellos el Cr VI. Se estimó la reducción en 74,2% para el cromo hexavalente durante el tratamiento en 24 horas.⁹ *Pseudomonas* spp. pueden asimilar distintos sustratos por lo que pueden colonizar distintos hábitats. Distintas especies de *Pseudomonas*, como *P. auriginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida*, tienen la capacidad de reducir el Cr (VI) hasta Cr (III).

Las curtiembres utilizan Cr (III) durante el proceso de curtido bajo la forma de CrSO_4 . En el agua residual de este proceso el Cr (III) varía entre 10 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, del cual el 3% en presencia de oxígeno se oxida a Cr (VI). El Cr (VI) en el ambiente puede llegar a los seres humanos y animales a través del agua y los alimentos.

Es por ello la importancia de aislar bacterias del género *Pseudomonas* que reduzcan el Cr (VI) en Cr (III) para posteriormente ser usados en la biorremediación. Por tal motivo esta investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacterias del género *Pseudomonas* que reduzcan el Cr (VI) a Cr (III).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y medios de cultivo:

150mL de agua residual del proceso de curtido de cuero de una curtiembre ubicada en el distrito de Florencia de Mora, Trujillo, La Libertad, Perú.

Medio Luria Bertani: Triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5g/L, pH final 7.2 (a 37°C) y

Medio King B: Peptona proteasa 20.00 g/L, fosfato dihidrogeno de potasio 1.50g/L, sulfato de magnesio heptahidratado 1.50 g/L, agar 20.00 g/L, pH final 7.2 ± 0.2 (a 25°C).

Toma de muestra y enriquecimiento no selectivo

La muestra fue tomada de tres puntos de la superficie del pozo, donde llegan las aguas del de curtido del cuero, utilizando 3 recipientes de polietileno de 50 mL de capacidad. De los 150 mL de muestra se realizó un enriquecimiento no selectivo de la muestra en medio Luria Bertani y se incubó a 30°C durante 24 horas.

Aislamiento e identificación

Posteriormente, se realizó el aislamiento en Medio Base King suplementado con $K_2Cr_2O_7$ (4 mg/L Cr VI) a 30°C por 24 horas. Se seleccionaron 9 colonias aisladas verde fluorescente y se purificó en Medio King B obteniendo 9 cultivos 1A, 1B, 1C; 2A, 2B, 2C; 3A, 3B, 3C que se conservaron en Agar Luria Bertani. Los nueve cultivos aislados presentaron las mismas características fenotípicas observando colonias verdes fluorescentes en Medio King B y pigmento verde fluorescente en Caldo Glutamato. Se seleccionó el cultivo 3C que se identificó fenotípicamente como *P. fluorescens* mediante pruebas usadas para tal fin (Tabla 1)

Tabla 1. Pruebas fenotípicas para la identificación del cultivo 3C

Prueba	Resultado
Oxidasa	negativo
Catalasa	Positivo
Lipasa *	negativo
Hidrólisis de gelatina	Positivo
Lisina descarboxilasa	negativo
Movilidad	Positivo
TSI	K/K --

*Prueba específica que permite diferenciar a *Pseudomonas fluorescens* (-) de *P. aeruginosa* (+).

Determinación de la reducción de Cr VI

La reducción de Cromo VI se llevó a cabo en Medio Luria Bertani suplementado con $K_2Cr_2O_7$ (Cr VI 69,75 mg/L) en condiciones de aerobiosis y agitación (130 RPM) a 22,3 °C durante 12 horas. La reducción se determinó mediante método colorimétrico que se basa en la reacción del cromo hexavalente con 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, lo que produce la formación de un compuesto desconocido de color rojo violeta. Éste puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm y la absorbancia es proporcional a la concentración de cromo en la muestra.

RESULTADOS

El cultivo aislado identificado como *Pseudomonas fluorescens* tiene la capacidad de reducir Cr VI de 69,75 mg/L a 33, 58 mg/L en 12 horas, siendo el porcentaje de reducción de 51.9 %.

DISCUSIÓN

Esta investigación se orientó a la evaluación de la capacidad de reducción de Cr VI por un cultivo de *P. fluorescens* aislado del agua residual de una curtiembre con la finalidad de ser utilizada en futuros tratamientos de biorremediación de aguas residuales contaminadas por dicho metal tóxico.

La reducción de Cr VI se midió durante la fase logarítmica (12 horas); debido a la expresión del factor sigma conocido como RpoS, incrementando su concentración al final de la fase logarítmica y durante la fase estacionaria. El factor sigma RpoS controla la expresión de los genes involucrados en la producción de biofilm⁸, el cual podría interferir en la medición de la reducción ya que el Cromo VI podría ser adherido a estos biofilm.

El mecanismo por el cual el cultivo de *P. fluorescens* redujo el Cr VI, esto se debe a que el ión cromato es estructuralmente similar al ión sulfato por lo que puede atravesar la membrana celular de la bacteria a través de un transportador aniónico no específico de sulfato. En presencia de oxígeno, la enzima responsable de la reducción aeróbica de Cr VI a Cr III requiere NAD(P)H. La reacción se produce en dos pasos; primero Cr VI acepta un electrón de una molécula de NAD(P)H para generar Cr (V) como intermediario y luego el Cr (V) acepta dos electrones para formar Cr (III). Una vez reducido, Cr (III) usualmente se une a los grupos funcionales cargados electronegativamente de la superficie celular, la cual sirve como sitio de nucleación para la precipitación.

Por lo tanto se demostró que el cultivo identificado como *P. fluorescens* redujo el Cr VI a Cr III ya que la concentración de este disminuyó.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garg SK, Tripathi M, Srinath T. Strategies for chromium bioremediation of tannery effluent. Rev Environm Contamin & Toxicol. 2012; 217: 75-140
2. Tapia J, Freer J, Mansilla J, Villaseñor J. Estudio de reducción fotocatalizada de cromo hexavalente Bol. Soc. Chil. Quím., 2002; 47 (4):
3. Aloy M. Tannerie et Pollution, Centre Technique du Cuir, Lyon, 1976; 1: 40
4. Garg SK, Tripathi M, Srinath T. Strategies for chromium bioremediation of tannery effluent. Rev Environm Contamin & Toxicol. 2012; 217: 75-140
5. Jian-Kun Zhang & Zhen-Hua Wang & Yun Ye. Heavy Metal Resistances and Chromium Removal of a Novel Cr (VI)-Reducing *Pseudomonas* Strain Isolated from Circulating Cooling Water of Iron and Steel Plant. Appl Biochem Biotechnol. 2016; 1(2): 2-3
6. Oves M, Khan MS, Zaidi A. Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 enhance chickpea growth in chromium amended soils. Eur J Soil Biol. 2013; 56:72-83
7. Huang H, Wu K, Khan A, Jiang Y. A novel *Pseudomonas gessardii* strain LZ-E simultaneously degrades naphthalene and reduces hexavalent chromium. Bioresource Technol. 2016; 207: 370-378
8. Jeyalakshmi D, Kanmani S. Bioremediation of chromium contaminated soil by *Pseudomonas fluorescens* and indigenous microorganisms. J Environ Sci Eng. 2008; 50(1):1-6.
9. Ali Khan MW1, Ahmad M. Detoxification and bioremediation potential of a *Pseudomonas fluorescens* isolate against the major Indian water pollutants. J Environ Sci Health & Tox Hazard Subst Environ Eng. 2006; 41(4):659-74.



Efecto del fungicida Metalaxyl sobre la germinación, crecimiento y capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* en condiciones de laboratorio

Effect of the Metalaxyl fungicide on the germination, growth and antagonistic capacity of *Trichoderma asperellum* under laboratory conditions

Astrid Argomedeo¹, Shirley Rodríguez-Reyes¹, Carolina Rodríguez-Torres¹, Miguel Saldaña¹, Wendy Santos¹ y Juan Wilson Krugg²

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología

RESUMEN

Se determinó el efecto de las concentraciones (262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm) del fungicida Metalaxyl sobre la germinación, crecimiento y capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum*. El efecto del fungicida sobre la germinación de esporas se determinó colocando 1 mL de cada concentración del fungicida en frascos, adicionando 1 mL de la suspensión de esporas, con lo cual se obtuvo una concentración final de 1×10^5 esporas/mL, incubándose a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$, durante 24 horas. Para determinar el efecto del fungicida sobre el crecimiento de *T. asperellum*, se sembró en la parte central de las placas Petri de acuerdo a su correspondiente concentración de fungicida agrícola incubándose a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ durante 7 días. Y para la determinación del efecto sobre la capacidad antagónica de *T. asperellum*, se sembró micelio procedente de enfrentamientos con Metalaxyl a las concentraciones establecidas y *Rhizotocnia solani* de manera separada y en puntos equidistantes en Agar Papa Dextrosa e incubados a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ por 7 días. Se encontró que a medida que la concentración de Metalaxyl aumenta, el porcentaje de germinación de *T. asperellum* disminuye. El porcentaje de crecimiento, obtenido fue 83 %, 63% y 60% a las concentraciones de 262.5 ppm, 350ppm, 437.5 ppm de Metalaxyl, respectivamente. Además *T. asperellum* presentó antagonismo de grado 1 sobre *R. solani*, según la escala de Bell. Al incrementarse las concentraciones de metalaxyl de 262.5 ppm, 350ppm, 437.5 ppm, disminuyó el porcentaje de germinación de esporas, sin embargo no afecta de modo significativo los procesos de crecimiento y actividad antagónica de *Trichoderma asperellum*.

Palabras clave: *Trichoderma asperellum*, *Rhizotocnia solani*, metalaxyl, germinación, crecimiento

ABSTRACT

Effect of the concentrations (262.5 ppm, 350 ppm and 437.5 ppm) of the fungicide Metalaxyl on the germination, growth and antagonistic capacity of *Trichoderma asperellum* was determined. The effect of the fungicide on spore germination was determined by placing 1 mL of each fungicide concentration in vials, adding 1 mL of the spore suspension, resulting in a final concentration of 1×10^5 spores/mL, incubated at $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ for 24 hours. To determine the effect of the fungicide on the growth of *T. asperellum*, it was planted in the central of Petri dishes according to their corresponding concentration of agricultural fungicide; this was incubated at $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ for 7 days. As well as, for the determination of the effect on the antagonistic capacity of *T. asperellum*, mycelium was harvested from the confrontation with Metalaxyl at the established concentrations and *Rhizotocnia solani* separately and at equidistant points, in Papa Dextrose Agar and incubated at $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$ per 7 days. It was found that as the concentration of Metalaxyl increases, the percentage of germination of *T. asperellum* decreases. The percentage growth obtained was 83%, 63% and 60% at the concentrations of 262.5 ppm, 350 ppm, 437.5 ppm of Metalaxyl, respectively. In addition, *T. asperellum* presented grade 1 antagonism on *R. solani*, according to the Bell scale. As metalaxyl concentrations increased from 262.5 ppm, 350 ppm, 437.5 ppm, the percentage of spore germination decreased, however, this does not significantly affect the growth processes and antagonistic activity of *Trichoderma asperellum*.

Keywords: *Trichoderma asperellum*, *Rhizotocnia solani*, metalaxyl, germination, growth

INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los problemas fitosanitarios son causados por hongos, insectos y virus, quienes colonizan diversas partes de la planta, provocando desde la disminución de la calidad del producto y hasta la pérdida total de la planta.¹ El control químico se emplea para reducir las poblaciones de especies de plagas que se elevan a niveles peligrosos cuando las presiones ambientales son inadecuadas. El control químico es solamente necesario en esos momentos y lugares donde el control natural es insuficiente.² Dentro de los controladores químicos tenemos a metalaxil [(R, S) -metil-N-(2-metoxiacetil) -N-(2,6-xililo) -D, L-alaninato] que es una acilanilida, fabricado por primera vez por la Ciba-Geigy Corporation en 1977.³ Es un fungicida sistémico, altamente activo contra hongos de orden Peronosporales, que causan el tizón tardío, el mildiu, podredumbre húmeda, y pudrición de las fruta de muchas plantas⁴

El control biológico es parte del control natural que regula la densidad de población de especies de plagas.² Con el empleo de la lucha o control biológico se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales.⁵ Dentro de los organismos emplados como controladores biológicos tenemos al género *Trichoderma* que pertenece al phylum Ascomycota, orden Hypocreales, Hypocreaceae familia y corresponde a los hongos filamentosos que son de vida libre y ampliamente distribuido en la naturaleza. Una de las principales características de este género es su capacidad para actuar como un agente de control biológico (BCA) contra organismos fitopatógenos tales como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp.^{6,7}

El control biológico basado en hongos como *Trichoderma*, es una estrategia efectiva a largo plazo, ya que es necesaria la adaptación del microorganismo al ambiente y su establecimiento en los ecosistemas, mecanismo muy diferente al de los productos químicos, que son compuestos inertes. Todos estos aspectos deben tenerse en cuenta para el manejo integrado de enfermedades de plantas.⁸

Debido a que *Trichoderma* es uno de los controladores biológicos más utilizados contra diversos fitopatógenos que habitan en el suelo, para cuyo control se usan fungicidas como el Metalaxyl, es por eso que se hace necesario realizar estudios acerca del efecto que puede tener este fungicida sobre el mencionado hongo, a fin de poder establecer si ambos se pueden aplicar juntos dentro de un programa de control de plagas; y así planear los tratamientos fúngicos o químicos adecuados para minimizar cualquier efecto nocivo en la eficacia de *T. asperellum*, por tal razón, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar el efecto del fungicida Metalaxyl sobre la germinación, el crecimiento y capacidad antagonista de *T. asperellum*, en condiciones de laboratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos:

Los cultivos puros de *Trichoderma asperellum* y *Rhizotocnia solani* fueron proporcionados por la cátedra de Fitopatología del departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo. El cultivo de *T. asperellum*, joven de 6 meses, identificado molecularmente en EEUU. Asimismo se utilizó un frasco del Fungicida Fitoklin, cuyo principio activo es el Metalaxyl.

Reactivación del cultivo de *T. asperellum* y obtención de cultivos monospóricos:

Para la reactivación de *Trichoderma asperellum*, a partir del cultivo puro, se resembró en frascos planos de vidrio con Agar papa dextrosa inclinado y luego se incubó a 25°C durante 7 días, posteriormente se resembró en 5 tubos conteniendo APD inclinado incubándose a 25°C por 7 días.

Evaluación del efecto de Metalaxil sobre la germinación de esporas de *T. asperellum*

La preparación de las soluciones doble concentradas de Metalaxil, se hizo mediante diferentes diluciones de Metalaxil en agua destilada estéril hasta alcanzar las concentraciones de 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm a partir del producto original.

El inóculo de esporas se obtuvo agregando 50 mL de agua destilada estéril a cada frasco plano de vidrio agitándolo moderadamente a fin de liberar las esporas del hongo. La suspensión resultante se colocó en un matraz estéril determinándose la concentración de esporas mediante recuento en cámara de Neubauer, diluyéndose hasta una concentración final de 1×10^3 esp/mL. Inoculación e incubación: Se colocó 2 mL de cada dilución de Metalaxil doble concentrado en tubos de ensayo estériles, a los

cuales se les agregó 2mL de la suspensión de esporas obtenida previamente, con lo cual se obtuvo una dilución de 5×10^2 esp/mL y concentraciones finales de Metalaxil de 262.5 ppm, 350 ppm y 437 ppm. Se preparó también una suspensión de esporas control, agregándole 2 mL de la suspensión de esporas en 2mL de agua destilada estéril. Cada suspensión de esporas en las diferentes concentraciones del fungicida y el control posteriormente se incubaron a temperatura ambiente por 12-24 horas. Luego del periodo de incubación (24 horas), se colocó 5 gotas de azul de lactofenol en cada frasco que contenía la suspensión de esporas en cada concentración (0 ppm, 262.5 ppm, 350 ppm y 437 ppm) con el fin de para observar en el microscopio la presencia de esporas germinadas y no germinadas y hacer el conteo respectivo.

Evaluación del efecto del Metalaxil sobre el crecimiento de *T. asperellum*:

Preparación del medio de cultivo: Se preparó Agar papa dextrosa en cuatro matraces conteniendo 100 mL de medio cada uno. El medio de cultivo se esterilizó en olla a presión y se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 50 °C. Estando aún fundido el medio, a tres de los matraces se les adicionó Metalaxil en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 437.5, 350 y 262.5 ppm., respectivamente. Al medio contenido en el matraz restante no se le agregó el fungicida, a fin de utilizarlo como control. Luego, el medio de cultivo se sirvió en placas de Petri estériles (cuatro placas por cada concentración, incluyendo el control).

Siembra e incubación: Se sembró por puntura *T. asperellum* en cada placa de Petri de cada una de las concentraciones del fungicida preparadas en el paso anterior, además del grupo control. Luego se incubará a 25°C por 5 días. A partir del primer día de siembra, y hasta el quinto día, se midió el radio de crecimiento (mm.) de la colonia en diferentes direcciones, obteniéndose un radio promedio de crecimiento por día por cada concentración de fungicida y el grupo control. Los resultados de crecimiento de *T. asperellum* se expresaron en milímetros (mm) y en porcentaje de crecimiento (%C), teniendo en cuenta el crecimiento alcanzado por el grupo control (100%), de la siguiente manera:

$\%C = \frac{\text{RADIO PROBLEMA DE LA COLONIA PROBLEMA}}{\text{RADIO PROBLEMA DE LA COLONIA TESTIGO}} \times 100$
Evaluación de la capacidad antagonista de *T. asperellum* con *R. solani* luego de ser sometido al enfrentamiento con el metalaxyl.

Efecto antagonístico de *T. asperellum* sobre *R. solani* mediante el método de cultivo dual: La prueba de enfrentamiento se realizó empleando la técnica de cultivo dual. Para ello se utilizaron placas de Petri con 10 mL de medio de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa). Se colocaron en un extremo de la placa de Petri por puntura micelio del hongo patógeno (*R. solani*) y en el extremo opuesto se sembró micelio de *T. asperellum*, que creció en la concentración de 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm de Metalaxyl, con distancia de 4.5 cm aproximadamente entre ellos. Como testigo se colocó en una placa de Petri *R. solani* en un extremo con la presencia de *T. asperellum*. Posteriormente, los cultivos se incubaron a 27 °C hasta el contacto de antagonista y patógeno. Se procedió de manera similar por cada placa en donde se evidenció crecimiento de *Trichoderma asperellum* en las concentraciones del químico. Se tomó como índice de antagonismo la invasión del antagonista sobre la superficie del micelio patógeno tomando en cuenta la escala mostrada en la Tabla 1.

Tabla 1. Escala de evaluación del antagonismo in vitro, tomando en cuenta la invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Trichoderma asperellum* sobre *Rhizoctonia solani*.

Grado de capacidad antagonística	Observación macroscópica
1	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo
2	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno
3	Invasión de ½ de la superficie de la colonia del hongo patógeno
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno
5	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno, esporulación sobre ella

Análisis de datos

La determinación del efecto del fungicida Metalaxil sobre *T. asperellum*, se realizó analizando el porcentaje de germinación y el porcentaje de crecimiento de *T. asperellum*, en las diferentes concentraciones de Metalaxil, procesando los datos en base a la prueba de Análisis de Varianza Unidireccional (ANOVA). El antagonismo se evaluó comparando las velocidades de crecimiento, de *R. solani* de *T. asperellum* y del testigo.

RESULTADOS

Se encontró que el porcentaje de germinación de esporas de *T. asperellum* disminuye a medida que aumenta la concentración del fungicida metalaxyl en un rango de 262.5 ppm a 437 ppm (Fig, 1) y la concentración del fungicida metalaxyl en un rango de 262.5 ppm a 437.5 ppm (Fig 2). Asimismo, se encontró antagonismo de grado 1 entre *T. asperellum* y *R. solani* (Fig, 3).

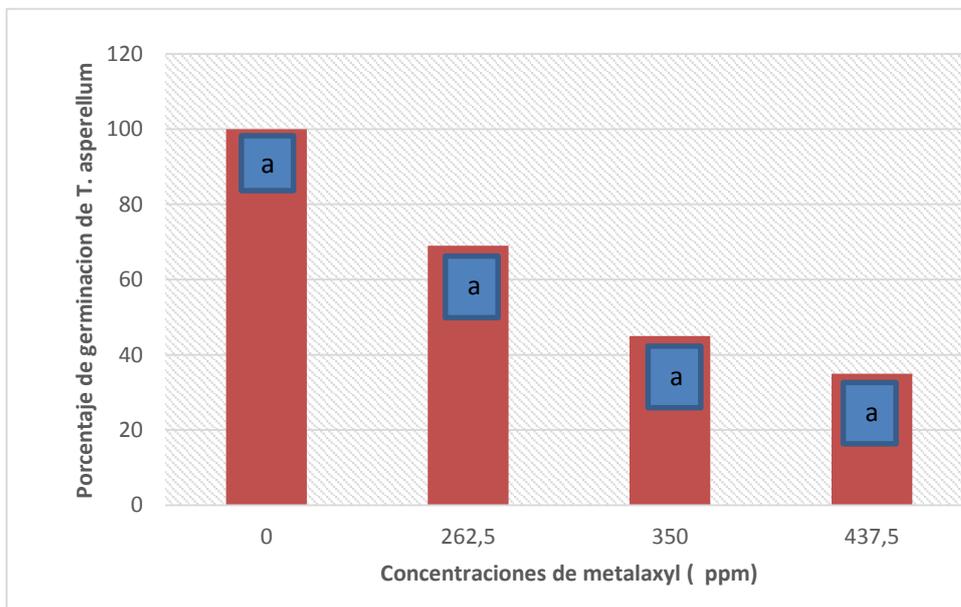


Fig.1. Porcentaje de germinación de *Trichoderma asperellum* frente a diferentes concentraciones (ppm) de Metalaxyl a las 24 horas de incubación. (a: $p < 0.05$, existe diferencia significativa).

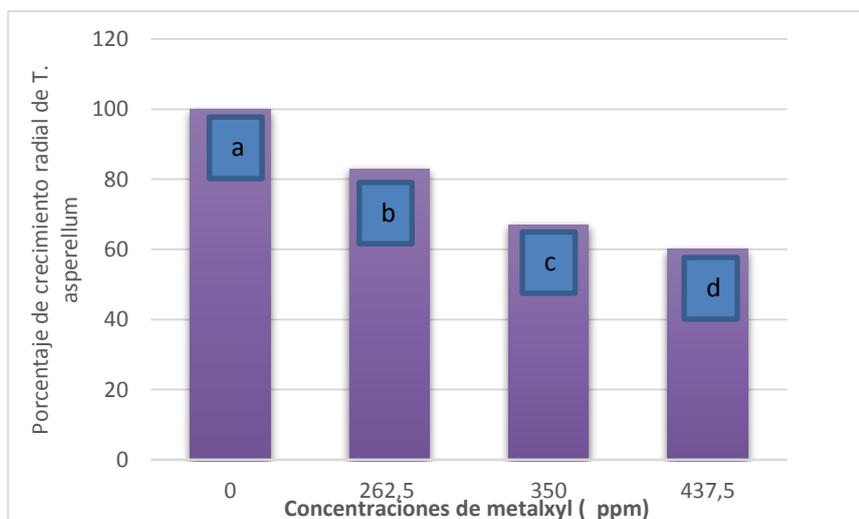


Fig.2 Porcentaje de crecimiento de *Trichoderma asperellum* frente a diferentes concentraciones (ppm) de metaxyl en condiciones de laboratorio y 5 días de incubación. (a, b, c, d: $p>0.05$, no existe diferencia significativa)

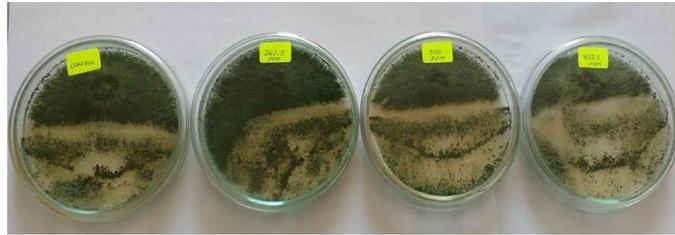


Fig. 3. Antagonismo grado 1 (Según la escala de bell)¹³ sobre *Rhizoctonia solani* que presenta *Trichoderma asperellum* procedente de enfrentamientos con metalaxyl a las concentraciones de 262.5 ppm, 350 ppm, 437.5 ppm y control.

DISCUSIÓN

El análisis estadístico revela que entre las concentraciones 262.5 ppm, 350ppm y 437.5 ppm del fungicida metalaxyl existe diferencia significativa; es decir, causan inhibición de la germinación de *T. asperellum* presentando valores de 69 %, 45 % y 35% respectivamente. Estudios realizados por Boucias et al. Establecen una probable explicación para la inhibición de la germinación de esporas; ellos demostraron que el tratamiento de las esporas de los hongos con productos agroquímicos, tanto iónicos como moleculares, pueden neutralizar la carga electrostática de la superficie y/o remover la capa mucosa que recubre la espora, afectando así el proceso de reconocimiento de sustrato y la transducción de las señales de iniciación de la germinación⁹.

En relación a los resultados obtenidos sobre el porcentaje de crecimiento de *T. asperellum*, se puede observar que hubo una leve disminución del crecimiento conforme aumentó la concentración del fungicida metalaxyl, presentando las concentraciones de 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm valores de 83 %, 63 % y 60% respectivamente. Así pues pese a que el porcentaje de crecimiento fue mucho menor a la concentración 437.5, en comparación con el control (0 ppm); al realizar el análisis estadístico se puede comprobar que no existe diferencia significativa entre las concentraciones 0 ppm, 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm del fungicida metalaxyl, es decir estadísticamente son iguales y por lo tanto no producen ningún efecto sobre el crecimiento de *T. asperellum*. Pasado los 5 días de incubación *T. asperellum* cubrió completamente la placa con medio Agar Papa Dextrosa, con las concentraciones del fungicida, incluida la placa control. Esto implica que el agroquímico evaluado no afecta de forma significativa los procesos que ocurren en la pared celular durante el desarrollo del hongo así como no produciría cambios en la actividad metabólica a nivel vesicular pues *T. asperellum* tendría la energía suficiente para efectuar su crecimiento¹⁰.

Cabe indicar además que el efecto inhibitorio de los fungicidas sobre el crecimiento de *T. asperellum* es mucho menor que el producido sobre la germinación, debido a que durante el crecimiento hongo presenta un mayor número de mecanismos que le permiten resistir el efecto de este fungicida¹⁰.

Los aislamientos de *T. asperellum* evaluados en la prueba de antagonismo (0 ppm, 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm), se ubicaron en la categoría I de la escala de Bell et al. *T. asperellum* cubrió completamente al patógeno *R. solani*. Las especies de *Trichoderma* regularmente presentan resultados satisfactorios en las pruebas de Antagonismo. Esto ha sido observado en experimentos realizados por Bell et al, quienes hallaron que un 65% de las cepas de este hongo se ubicaron en la clase I al evaluarse contra *R. solani* G-2 y un 85% se ubicó en la clase II al evaluarse contra el mismo hongo *R. solani* AG-3¹¹.

Cabe indicar que resultan escasos los informes sobre la compatibilidad de *Trichoderma* con productos químicos que son aplicados en los cultivos donde se utiliza. Posiblemente esto se deba a que se ha señalado que *Trichoderma* posee resistencia innata a la mayoría de los agroquímicos, incluyendo los fungicidas¹². En conclusión, el fungicida Metalaxyl a las concentraciones de 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm afecta la germinación de las esporas de *T. asperellum*, disminuyendo la germinación al

incrementarse la concentración de Metalaxyl y el fungicida Metalaxyl a las concentraciones de 262.5 ppm, 350 ppm y 437.5 ppm no afecta significativamente el crecimiento y la actividad antagonista de *T. asperellum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ibarra JE, Del rincón C. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Rev Latinoam Microbiol. 2006; 48 (2): 113-120.
2. Stern VM, Smith RF, Van den Bosch R, Hagen KS. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid. The integrated control concept. Hilgardia. 1959; 29(2): 81-101.
3. Monkiedje A, Spiteller M. Degradation of metalaxyl and mefenoxam and effects on the microbiological properties of tropical and temperate soils. Intern J Environ Res & Public Health, 2005; 2(2), 272-285.
4. Stern VM, Smith RF, Van den Bosch R, Hagen KS. The integration of chemical and biological control of the spotted alfalfa aphid. The integrated control concept. Hilgardia. 1959; 29(2): 81-101.
5. Badii MH, Abreu JL. Biological control a sustainable way of pest control. Daena: Intern J Good Conscience. 2006; 1(1): 82-89.
6. Harman GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathol. 2006; 96 (1): 190-194.
7. Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 87(1): 787-799.
8. Guédez C, Cañizaleza L, Castillo C, Olivares R. Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Rev Soc Venezolana Microbiol, 2012; 32(1): 44-49
9. Boucias N. factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. Environ. Microbiol. 1988; 54 (1) 795-1805
10. Reyes Y, Martínez B, Infante D, García-Borrego J. Efecto de tres herbicidas sobre el crecimiento y la esporulación de *Trichoderma asperellum* Samuels. In Congreso Científico del INCA, XVII, San José de las Lajas, 22-26 nov. 2010. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.
11. Bell, D; Well, H; Markham, C. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72:379-382.
12. Harman G. *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). [en línea] 2003 marzo 3 [Fecha de acceso 7 de febrero de 2008]. URL disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.htm>
Bell, D; Well, H; Markham, C. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 1982; 72:379-382.



Efecto de la temperatura sobre la supervivencia de larvas II de *Lucilia sericata* en condiciones de laboratorio

Temperature effect on *Lucilia sericata* larvae II survivor under laboratory conditions

Sonia Desposorio¹, Sindy Nomberto¹, Sandra Paz¹, Maribel Quispe¹, Brenda Rodríguez¹, Giovanna Ureta¹ y Judith Roldán²

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

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Se evaluó el efecto de las temperaturas de 5°C y 7.5°C sobre la supervivencia de larvas asépticas del segundo estadio de *Lucilia sericata*. Para ello, se emplearon 135 huevos, obtenidos a partir de la crianza de imagos de *L. sericata* en condiciones de laboratorio, que se lavaron con solución salina estéril 0.85%, se trataron con hidróxido de sodio 0.5%; y finalmente, se esterilizaron con formalina 10%. Luego los huevos fueron colocados en agar sangre hasta obtener el segundo estadio larval, dos grupos experimentales fueron sometidos a las temperaturas de 5°C y 7.5°C utilizando una refrigeradora calibrada, durante 5 días; y se utilizó un grupo control, que siguió su desarrollo a temperatura ambiente. Se observó que la temperatura de 5°C tuvo un promedio de 19.69% de supervivencia, mientras que a la temperatura de 7.5°C tuvo un promedio de 51.70% de supervivencia. Conclusiones. La temperatura 5°C tiene un efecto desfavorable en la supervivencia de larvas de estadio II de *L. sericata* y que la temperatura de 7.5°C permite una mayor supervivencia de larvas que a la temperatura de 5°C pero un menor porcentaje de supervivencia que a la temperatura de 23°C.

Palabras clave: supervivencia, temperatura, *Lucilia sericata*, larvas asépticas.

ABSTRACT

Effect of temperatures of 5°C and 7.5°C on the survival of aseptic larvae of the second stage of *Lucilia sericata* it was evaluated. For this, 135 eggs, obtained from the imaging of *L. sericata* were used in laboratory conditions, washed with 0.85% sterile saline solution, treated with 0.5% sodium hydroxide; And finally, 10% formaldehyde were sterilized. The eggs were then placed on blood agar until the second larval stage, two experimental groups were subjected to temperatures of 5°C and 7.5°C using a calibrated refrigerator for 5 days; and a control group was used, which followed its development at room temperature. It was observed that the temperature of 5°C had an average of 19.69% of survival, while at the temperature of 7.5 ° C it had an average of 51.70% of survival. It was concluded that, at temperature of 7.5°C allows a higher larval survival than at a temperature of 5°C but a lower survival rate, compared with the temperature of 23°C.

Keywords: survival, temperature, *Lucilia sericata*, aseptic larvae

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad se han utilizado larvas de mosca para tratar heridas crónicas, esta terapia fue abandonada con el advenimiento de los antibióticos. La creciente resistencia antimicrobiana y la gran dificultad para desarrollar nuevos antibióticos han ocasionado que, en años recientes, se retomara el uso de este tratamiento y así, hoy día, se utilizan larvas de *Lucilia sericata* producidas asépticamente en laboratorios especializados para evitar la contaminación secundaria de las heridas¹.

L. sericata (Diptera; Calliphoridae) es una mosca necrófaga y una de las especies predominantes en la fauna cadavérica. Se presenta frecuentemente en los meses de verano y tiene distribución cosmopolita. Presentan una coloración metálica verde botella en el abdomen, llegando a medir en estado adulto de diez a quince milímetros².

En un inicio las larvas utilizadas en los tratamientos no eran estériles, esto trajo consigo resultados negativos, la superficie exterior de los huevos de las moscas son por lo general contaminadas de bacterias por lo cual deben ser esterilizadas previo al tratamiento⁵. Algunos casos a consecuencia del uso de larvas no estériles, los pacientes presentaron tétanos y erisipelas⁶, de ahí creció la necesidad de buscar medios para la esterilización de huevos de mosca. Livingston mostró la gran necesidad de esterilizar los huevos de mosca antes del tratamiento^{7,8}.

La aplicación de la terapia larval requiere el uso de larvas estériles. Aun cuando se pueda dar un eficiente tratamiento microbicida a las larvas, la desinfección se realizaría solamente en la superficie, sin poder esterilizarse el tracto intestinal⁹. Es por esta razón que se prefiere utilizar procedimientos para la esterilización de huevos². Parte fundamental del proceso de desinfección es eliminar una pegajosa masa de albúmina que los cubre y atrapa bacterias; para tal fin, se han propuesto diversos métodos de desinfección¹. Los primeros procedimientos de este tipo incluían un pretratamiento con solución de Dakin (hipoclorito de sodio diluido o cloro) seguido de una inmersión en cloruro de mercurio o formalina¹⁰. Otros investigadores sumergieron los huevos sucesivamente en soluciones de hipoclorito de sodio 0.5 % y formaldehído 10 % para después lavarlos en solución de cloruro de sodio 0.15 M.^{16 2}.

Los efectos de la temperatura sobre la tasa de desarrollo de moscas se han estudiado ampliamente, sobre todo en los géneros *Calliphora*, *Chrysomya* y *Lucilia*¹². Las larvas recién nacidas deben utilizarse en las primeras 8 horas posteriores a la eclosión o refrigerarse a temperaturas de entre 8 y 10 °C para ralentizar su metabolismo¹³. Un estudio realizado demuestra que la mínima temperatura para el desarrollo biológico de *L. sericata* se encuentra entre 7.5 y 10°C. Altas tasas de mortalidad se han reportado a 35,0 °C, mientras que temperaturas subóptimas pueden afectar la supervivencia y el crecimiento.

El propósito de este estudio fue determinar el efecto de las temperaturas 5°C y 7.5°C sobre la supervivencia de larvas en estadio II (L2) de *L. sericata* en condiciones de laboratorio, con el fin de utilizarlas posteriormente en el tratamiento de heridas necróticas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las L2

Se realizó una colecta de adultos de *L. sericata* en el campus de la Universidad Nacional de Trujillo (Trujillo, Perú) utilizando como cebo carne en estado de descomposición. A las 12 horas de la exposición del cebo, se capturó moscas califóridas utilizando trampas entomológicas, las cuales fueron trasladadas al Laboratorio de Artropodología Parasitaria para su determinación taxonómica mediante claves y crianza en jaulas de 31 cm x 53 cm x 31 cm cubiertas con tela tool, a 23-24 °C de temperatura ambiental y 80% HR; para su alimentación se utilizó leche en polvo y agua azucarada embebida en algodones y como medio de oviposición, hígado de vacuno fresco.

Los huevos ovipuestos fueron sometidos al proceso de desinfección, utilizando como base la metodología descrita por Figueroa y col, modificada; es decir, los huevos se separaron en grupos, los cuales se colocaron en cajas estériles de papel filtro que sirvieron de soporte para el lavado en solución salina estéril al 0.85 % en placas Petri estériles. Luego, fueron transferidos a placas Petri con NaOH al 0,5 % por 30 segundos, el cual constituye el tratamiento previo a la esterilización, que permitió disgregar los huevos. Posteriormente, los grupos de huevos fueron lavados con SSFE para eliminar los

residuos de NaOH y se agregó formalina 10% como esterilizante definitivo por 3 minutos. Luego de este tiempo, se llevaron a cabo tres lavados con solución salina estéril al 0,85 %, y finalmente, los huevos fueron secados sobre un papel de filtro estéril.

Los huevos desinfectados se dividieron a su vez en tres grupos de 15 huevos cada uno, los cuales se transfirieron en condiciones de esterilidad, en tres placas Petri con agar sangre, y se sellaron con parafilm, estos representaron los grupos de huevos que posteriormente fueron sometidos a las temperaturas evaluadas (5°C, 7.5°C y T° ambiente). El agar sangre constituyó el medio para la eclosión y a la vez sirvió como fuente de nutrientes para el crecimiento larval. Las placas de Petri se mantuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 48 horas, tiempo suficiente para alcanzar el segundo estadio larval. Posteriormente, las larvas fueron identificadas morfológicamente por su tamaño.

Al término de las 48 horas, se transfirieron las larvas asépticas en un nuevo medio con agar sangre, para asegurar que la mortalidad de las larvas sea a causa de la temperatura y no a causa factores externos como la falta de oxígeno, la falta de alimento o la acumulación de componentes tóxicos provenientes del metabolismo de las larvas. Las 3 placas Petri que contenían larvas asépticas de segundo estadio, fueron sometidas a temperaturas diferentes: 5 °C, 7.5 °C y 24 °C durante 5 días. Cada 24 horas, durante 5 días se evaluó la contaminación, el índice de eclosión, el tamaño y movilidad de las larvas de cada temperatura.

Determinación de la supervivencia de las L2:

La supervivencia se determinó realizando un conteo de larvas en estadio II de *L.sericata* vivas, a los 5 días de incubación de cada grupo experimental, y para cada una de las repeticiones realizadas, escribiendo los resultados en una tabla de recolección de datos, que incluye la fecha del conteo, la temperatura empleada, el número de larvas vivas y algunas observaciones sobre las características de las larvas al momento del conteo.

Análisis estadístico:

Los porcentajes de supervivencias obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza ANOVA o AVAR, y posteriormente sus promedios se compararon mediante la prueba de Tukey (p0.05) para verificar si existe o no diferencia significativa entre dos o más medias.

RESULTADOS

La figura 1 muestra los promedios de porcentajes de supervivencia de larvas en estadio II de *L.sericata* después de haber sido sometidas a las temperaturas de 5°C, 7.5°C y 23°C (Control), en esta gráfica se puede observar que el menor promedio de porcentaje de supervivencia se registró para las larvas sometidas a la temperatura de 5°C con un 19.69% , en tanto que el mayor promedio de porcentaje de supervivencia fue para las larvas sometidas a la temperatura de 23°C (Control) con un 63.68% mientras que a la temperatura de 7,5°C se tuvo un promedio de 51.70% de supervivencia.

El análisis de varianza (ANAVA) entre los promedios de porcentaje de supervivencia de las larvas II de *L.sericata* con relación a las temperaturas de 5, 7.5°C y 23°C (control), se presenta en la figura 2 donde se observa que hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en las temperaturas de 5 y 23°C.

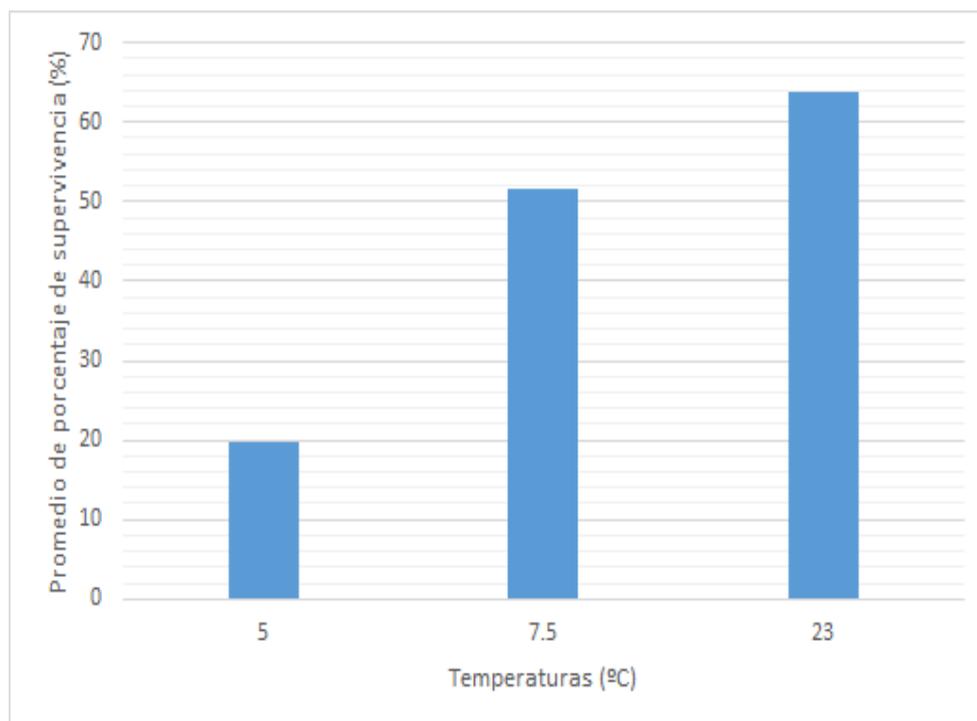


Fig. 1. Promedios de porcentajes de supervivencia de larvas de segundo estadio de *Lucilia sericata* sometidas a las temperaturas de 5, 7.5 y 23°C (control). ($p < 0,05$)

DISCUSIÓN

En este estudio, se observa que la temperatura en la cual existió un mayor porcentaje de supervivencia de larvas II de *L. sericata* fue a 23°C con un valor promedio de 63.68% \pm 22.78 la cual corresponde al grupo control. Así mismo, se obtuvieron menores porcentajes de supervivencia con las temperaturas de 7.5°C y 5°C con valores promedio de 51.7% \pm 22.78 y 19.69% \pm 22.78 respectivamente.

Con respecto al análisis estadístico de varianza (ANAVA), se obtuvo una diferencia significativa ($\mu=0.05$) entre los promedios de supervivencia de larvas II de *L. sericata* obtenidos en los grupos experimentales (5°C, 7.5°C y 23°C). Posteriormente, utilizando la prueba de Tukey, se obtuvo que la temperatura de 5°C tuvo diferencia significativa con la temperatura de 23°C (control), pero no fue estadísticamente significativa con la temperatura de 7.5 °C.

La diferencia significativa obtenida entre las temperaturas de 5 y 23°C, podría haber ocurrido por un cambio brusco de temperatura (choque en frío), debido a que el desarrollo de larvas a temperaturas bajas provocan un estrés fisiológico que se evidencia en un desarrollo más lento y en la disminución de la supervivencia.¹⁷

Tras la exposición a temperaturas bajas, las larvas pueden entrar en un estado en el cual su movimiento y fisiología se ralentiza progresivamente hasta que las funciones vitales, como la alimentación, cesen por completo.¹⁸ Dado que la frecuencia de contracción de los músculos faríngeos responsable de la ingesta de alimentos también aumenta con las temperaturas más altas, a temperaturas bajas las larvas deben haber ingerido menos nutrientes por unidad de tiempo, afectando su desarrollo.¹⁹

La exposición al frío también puede causar choque severo que puede producir una lesión irreversible del sistema neuromuscular y eventualmente resultar en muerte, asimismo, puede alterar las hormonas y las proteínas necesarias en la muda y mantenimiento.

Por otro lado, a la temperatura de 7.5°C no se observó diferencia significativa con las temperaturas de 5 y 23°C (control), debido a que algunos autores como Chang y col. afirman que el mantenimiento

idóneo de larvas de *L. sericata* es a temperaturas superiores 8°C, lo que podría aumentar la supervivencia de dichas larvas.

Con respecto a la temperatura de 23°C (control), si bien se obtuvo un mayor porcentaje de supervivencia de larvas II de *L. sericata*, estas siguieron su desarrollo hasta el estadio 3, sin poder permanecer como estadio II, debido a que el tiempo de mantenimiento a temperatura ambiente fue de 5 días (120 horas), tiempo suficiente para pasar del segundo al tercer estadio (69 horas), por otra parte a la temperatura de 7.5 °C permitió la conservación de un menor porcentaje de larvas II, de *L. sericata*.

Las larvas que se utilizan en el tratamiento de heridas son las de tercer estadio, sin embargo las utilizadas como muestra fueron de segundo estadio debido a que las larvas de estadio III al someterla a condiciones de refrigeración corren el riesgo de empupar por un periodo de tiempo más corto (270 horas), mientras que las larvas II al ser sometidas a refrigeración, retrasa su metabolismo permitiendo su conservación por un mayor periodo de tiempo.

Nuestros resultados sugieren que factores como la temperatura de almacenamiento (5° y 7.5°C), la duración del almacenamiento (5 días) y el estadio de vida (II instar) influyen significativamente en la supervivencia y desarrollo de las larvas de *L. sericata*.

Dentro de la misma especie, la tolerancia a baja temperatura puede variar mucho entre individuos, etapas de vida y poblaciones. Los huevos y los primeros instares tienen menos reservas de energía en comparación con las etapas posteriores y son más susceptibles a temperaturas bajas. En un estudio realizado por Retana M, et al., las larvas de estadio 3 fueron más resistentes a 4°C que las de estadio 2.

Las larvas que se utilizan en el tratamiento de heridas necróticas son las de estadio III, pero estas no se utilizaron como muestra, porque si bien estas larvas permanecen como estadio 3, 87 horas, aproximadamente a la mitad de este periodo de tiempo las larvas comienzan a buscar un lugar oscuro, donde se inmovilizan para comenzar el proceso de pupación dejando de alimentarse del tejido necrótico, por lo cual ya no podrían servir en este tratamiento; es por eso que se utilizó las larvas de estadio 2, que al ser sometidas a refrigeración, retrasa su metabolismo permitiendo su conservación en este estadio, para que cuando un médico requiera dichas larvas, se les pueda entregar larvas finalizando el estadio 2 o empezando el tercer estadio, y puedan permanecer en el tratamiento por un mayor periodo de tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ríos J, Mercadillo P, Yuil E, Ríos M. Terapia con larvas de mosca para heridas crónicas: alternativa en una época de creciente resistencia a los antimicrobianos. *Dermatología CQM*. 2013; 11(2):134-141.
2. Figueroa L, Flores J, Rodríguez S. Método de cultivo de larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. *Parasitol Latinoam* 2007; 62: 79-82.
3. Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe N. Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part I-History and Bacterial Resistance. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006; 3(2): 223-227.
4. Sánchez M, Chuairé L, Narváez R, Segura N. Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. *La terapia larval*. *Cienc. Salud*. 2004; 2 (2): 156-164.
5. Lam K, Babor D, Duthie B, Babor E, Moore M, Gries G. Proliferating bacterial symbionts on house fly eggs affect oviposition behaviour of adult flies. *Animal Behaviour* 2007; 74(1): 81-92.
6. Weil J, Simon R, Sweadner W. A biological, bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *Am J Surg* 1933; 19(1): 36-48.
7. Livingston S. The Therapeutic Active Principle of Maggots: With a Description of its Clinical Application in 567 Cases. *J Bone Joint Surg Am* 1936; 18(3): 751-756
8. Lyder C. Pressure ulcer prevention and management. *JAMA* 2003; 289 (2):223-226.
9. Namias N, Varela J, Varas R, Quintana O, Ward C. Biodebridement: a case report of maggot therapy for limb salvage after fourth-degree burns. *J Burn Care Rehabil*. 2000;21(3):254-257.
10. Sherman R, Hall M, Thomas S. Medicinal Maggots: An ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu Rev Entomol*. 2000; 45:55-81.
11. Roe A, Higley L. Development modeling of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Peer J*. 2015; 3: e803. Disponible en:Classic design
12. Kotzé Z, Villet M, Weldon C. Effect of temperature on development of the blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Int J Legal Med*, 2015; 129(5); 1155-1162.
13. Chan D, Fong D, Leung J, Patil N, Leung G. Maggot debridement therapy in chronic wound care. *Hong Kong Med J* 2007; 13(5): 382-386.

14. Richards C, Paterson I, Villet M. Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude. *Int J Legal Med* 2008; 122(4): 271–279
15. Grassberger M, Reiter C. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci Int* 2001; 120 (1-2):32–36
16. Richards C, Price B, Villet M. Thermal ecophysiology of seven carrion-feeding blowflies in Southern Africa. *Entomol Exp Appl* 2008; 131:11–19
17. Kotze Z, Villet M, Weldon C. Effect of temperature on development of the blowfly, *Lucilia ciproina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Int J Legal Med*. 2015; 129(5):1155-62.
18. Boivin, G., U. M. Koç Liker-Ott, J. S. Bale, and F. Bigler. 2006. Assessing the establishment potential of inundative biological control agents, pp 98–113. In F. Bigler, D. Babendreier, and U. Kuhlmann (eds.), *Environmental impact of invertebrates for biological control of Arthropods: methods and risk assessment*. CABI Publication, Wallingford. United Kingdom.
19. Niederegger S, Pastuschek J, Mall G. Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies. *Forensic Sci Int*. 2010; 199(1-3):72-8.

Guía para los autores

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

ESTRUCTURA

Deberán estructurarse como sigue:

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

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

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

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